



II-463 – DIFERENTES ESTRATÉGIAS PARA O ENRIQUECIMENTO DE BIOMASSA ANAMMOX A PARTIR DE LODOS AERÓBIO E ANAERÓBIO

Betânia Salerno Lara⁽¹⁾

Farmacêutica Bioquímica pela UFMG. Mestranda do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (DESA) da UFMG.

Juliana Calábria de Araújo⁽²⁾

Bióloga pela UFRJ. Doutora em Hidráulica e Saneamento pela EESC/USP. Pesquisadora do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (DESA) da UFMG e professora do CEFET/MG.

Carlos Augusto de Lemos Chernicharo⁽¹⁾

Engenheiro Civil e Sanitarista. Doutor em Engenharia Ambiental pela Universidade de Newcastle upon Tyne – UK. Professor Associado do DESA/UFMG.

Endereço⁽¹⁾ : Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG; Av. do Contorno, nº. 842 - 7º. andar - Centro - Belo Horizonte - MG - CEP: 30110-060 - Brasil - Tel: (31) 3409-1050- e-mail: beta7lara@yahoo.com.br

Endereço⁽²⁾ : Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET-MG), Av Amazonas, 5253- Nova Suíça- Belo Horizonte-MG- CEP: 30480-000- Tel: (31) 3319-7109- e-mail: juli.calabria@ig.com.br

RESUMO

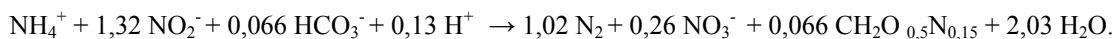
O presente trabalho testou e comparou diferentes estratégias para permitir o enriquecimento de bactérias ANAMMOX, a partir de amostras de lodo provenientes de reator UASB e do sistema de lodos ativados, utilizados no tratamento de esgoto doméstico. As estratégias usadas foram: (i) enriquecimento em reator batelada com adição de amônia e nitrito (reatores F7 e F8), (ii) enriquecimento em reator batelada com adição de cloranfenicol (reatores F4 e F9). Além disso, foi feito um reator controle, que continha somente o meio de cultura autotrófico (sem inóculo). Os reatores foram incubados a 37°C, sob agitação, e monitorados quanto ao consumo dos compostos nitrogenados amônia e nitrito, por um período que variou de 231 a 430 dias. Para todos os reatores, observou-se que o processo verificado ao longo do tempo de incubação foi o de desnitrificação (evidenciado pelo intenso consumo de nitrito), independente da estratégia usada, bem como do tipo e da concentração de inóculo. O tempo de duração da atividade desnitrificante variou para cada reator. Nos reatores F4 e F9 (com cloranfenicol), em alguns momentos foi possível diminuir esta atividade, mas não eliminá-la completamente. A atividade desnitrificante verificada, deve ter sido favorecida pela condição em batelada dos reatores, permitindo com que as bactérias heterotróficas do lodo sobrevivessem durante todo o processo, pois apesar do meio ser desprovido de fonte de carbono, estas bactérias conseguem viver dos compostos oriundos da lise celular das outras bactérias, além de poderem utilizar tanto o nitrito como o nitrato como aceptores de elétrons. Em resumo, não foi observado, nos quatro reatores testados, consumo simultâneo de amônia e de nitrito, o que indicaria oxidação da amônia sob condições anaeróbias. Portanto, não foi possível enriquecer bactérias Anammox nas condições usadas neste trabalho.

PALAVRAS-CHAVE: Atividade Desnitrificante; Cloranfenicol; Enriquecimento de Anammox, Reator batelada, Remoção de Nitrogênio.

INTRODUÇÃO

A remoção de nitrogênio é um tema importante no tratamento de águas residuárias e geralmente é realizada por processos microbiológicos como nitrificação e desnitrificação. Essas reações são conhecidas desde muito tempo e vêm sendo aplicadas com sucesso na maioria dos sistemas modernos de tratamento de águas residuárias (EGLI *et al.*, 2001). Há quase uma década, foi verificado, em reator de leito fluidizado, um processo microbiológico novo para a remoção de nitrogênio (MULDER *et al.*, 1995). Este processo foi denominado de ANAMMOX (“Anaerobic Ammonium Oxidation”), e envolve a oxidação anaeróbia do íon amônio a nitrogênio gasoso, sob condições anóxicas estritas usando o nitrito comoceptor final de elétrons (VAN de GRAAF *et al.*, 1996).

O modo de crescimento autotrófico (em combinação com a necessidade de alta manutenção das células ANAMMOX associada ao crescimento lento) resulta em uma estequiometria que apresenta um baixo rendimento de biomassa (STROUS *et al.*, 1998), conforme a equação:





Os objetivos deste trabalho foram: (i) investigar a ocorrência de atividade ANAMMOX em amostras de lodos provenientes de reator UASB e do sistema de lodos ativados utilizados no tratamento de esgoto doméstico, e (ii) enriquecer bactérias ANAMMOX a partir desses lodos, em reatores de bancada operados sob a forma de batelada.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para investigar a atividade dos lodos e fazer o enriquecimento da biomassa ANAMMOX foram utilizados reatores em batelada (frascos tipo Schott de 1,25 L fechados com rolha de butila e tampa de rosca, conforme Figura 1), com e sem adição de cloranfenicol. Foram montados cinco reatores (sendo um controle) com condições e inoculos diferentes (conforme Tabela 1), contendo 1000 mL de meio de cultura autotrófico e anaeróbico, conforme composição descrita em DAPENA-MORA *et al.*, (2004) e VAN de GRAAF *et al.*, (1996). Os reatores foram incubados em estufa *shaker* a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, na ausência de luz e sob agitação (190 – 200 rpm). A concentração inicial de nitrito (na forma de NaNO_2), usado como aceptor final de elétrons, e amônio, usado como doador de elétrons (fornecido na forma de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), variou de acordo com cada reator, como pode ser verificado na Tabela 1. Os reatores foram operados sob a forma de batelada alimentada, pois sempre que o nitrito (ou a amônia) era consumido, esses compostos eram novamente adicionados (por meio de soluções estoques de sulfato de amônio (600mM) ou nitrito de sódio (600 mM), e através de seringas com agulhas hipodérmicas, de modo a manter a anaerobiose do sistema). Além disso, esporadicamente (1 vez a cada 20 dias), retirava-se cerca de 250ml de meio dos reatores (através de seringas) e adicionava-se meio de cultura fresco e anaeróbico. Periodicamente, fluxionava-se na atmosfera do frasco a mistura de gás (Argônio 95% e CO_2 5%), de modo a garantir a anaerobiose no frasco.

Como inóculo dos reatores foram utilizados dois lodos, um proveniente do reator UASB do CePTS (Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento da UFMG), localizado junto à ETE ARRUDAS-COPASA, e outro proveniente do decantador secundário que compõem o sistema de lodos ativados da ETE ARRUDAS-COPASA, que trata esgoto doméstico da cidade de Belo Horizonte /MG. Esses lodos foram escolhidos, pois em trabalho prévio (ARAUJO & CHERNICHARO, 2007) verificou-se a presença de bactérias ANAMMOX em ambos, através da técnica da PCR com iniciadores específicos para este grupo. Não obstante, não foram detectadas bactérias ANAMMOX ativas nestes lodos, através da utilização da técnica de hibridação *in situ* com sondas fluorescentes- FISH, (ou estas se encontravam abaixo do limite de detecção da técnica, que é de 10^3 a 10^4 células/ml). O volume de lodo utilizado em cada reator encontra-se descrito na Tabela 1. Os reatores foram monitorados a cada dois ou três dias, para determinação de pH e análise da concentração de amônia e nitrito. Análises da concentração de nitrato e gás nitrogênio (na atmosfera do frasco) foram feitas esporadicamente.

Amônia e nitrito foram determinados colorimetricamente pelo método do fenato e ácido sulfanílico, respectivamente, ambos descritos no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (2005). O nitrato foi determinado através do método do salicilato, segundo RODIER, (1981).

Análises da biomassa desenvolvida nos reatores foram realizadas, através da técnica de FISH, para verificar a presença (ou não) de bactérias ANAMMOX. Para tanto, 10 a 20 ml de amostra dos reatores foram retiradas, fixadas (em paraformaldeído 4%) e posteriormente hibridadas com a sonda Amx820 (detecta bactérias ANAMMOX dos gêneros *C. Brocadia anammoxidans* e *Kuenenia stuttgartiensis*) de acordo com o protocolo descrito em EGLI *et al.*, (2001).

Tabela 1: Características dos reatores e tempo de operação

Reator	Tipo de Lodo Inoculado	Volume do Inoculo	Adição de Cloranfenicol	Concentração Inicial de Nitrito e Amônia	Modo de Operação	Tempo Operação (dias)
F4	lodo ativado	200 mL	Com	21 e 28 mg.L ⁻¹	batelada	430
F7	lodo ativado	50 mL	Sem	28 e 28 mg.L ⁻¹	batelada	257
F8	lodo UASB	50 mL	Sem	28 e 28 mg.L ⁻¹	batelada	231
F9	lodo UASB	50 mL	Com	28 e 28 mg.L ⁻¹	batelada	358
Controle	Sem lodo	-	Sem	42 e 42 mg.L ⁻¹	batelada	162

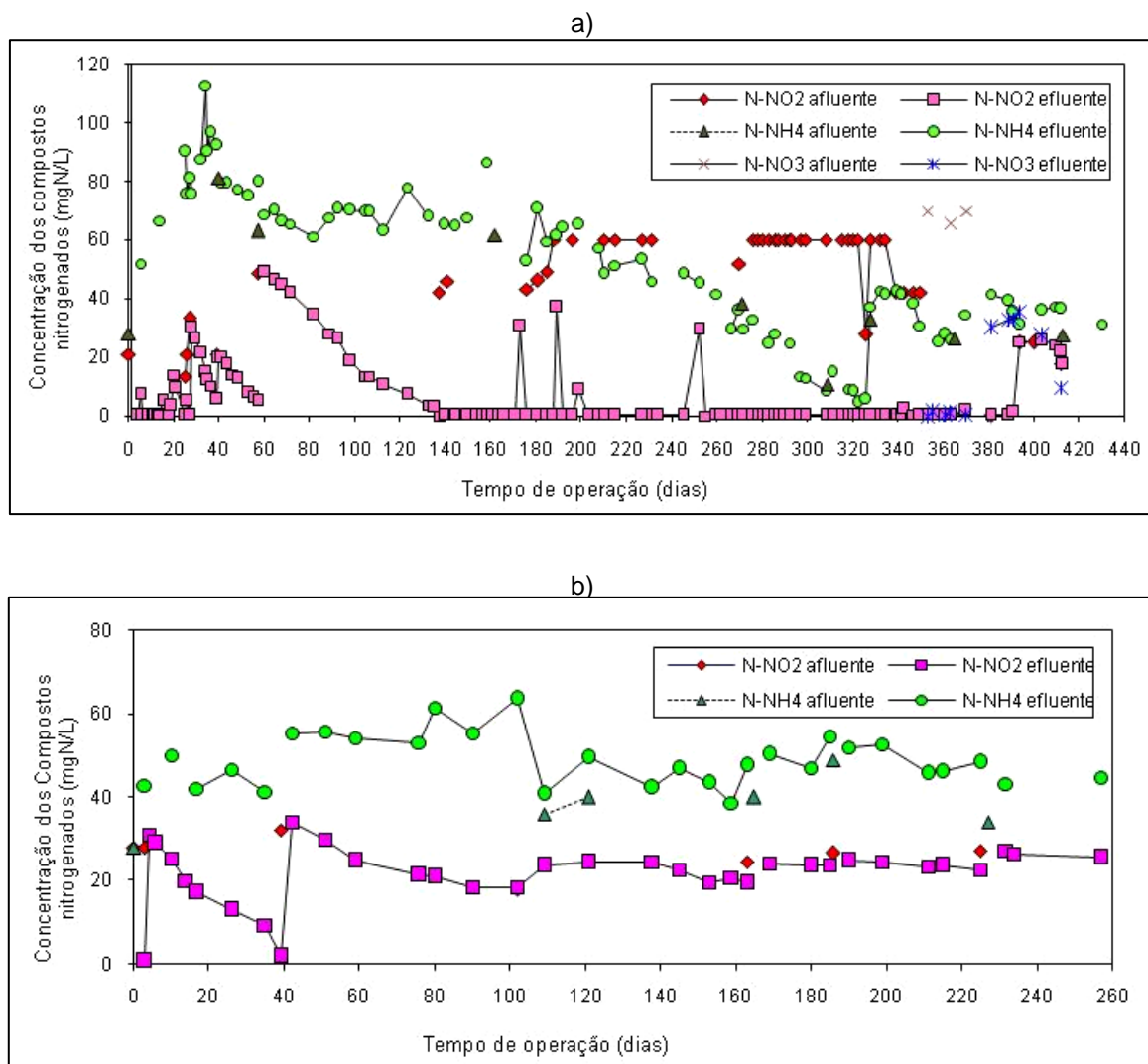
**Figura 1 : Reatores e utensílios utilizados na pesquisa**

RESULTADOS

Nos primeiros dias de operação dos reatores, a eficiência de remoção de nitrito foi alta (Figuras 2 e 3), demonstrando intensa atividade das bactérias desnitrificantes presentes nos lodos de inóculo. Por sua vez, houve aumento na concentração de amônia, pois a mudança no ambiente pode ter causado uma alteração na população bacteriana, causando a morte de bactérias heterotróficas que não tinham fonte de carbono nesse meio de cultura para sobreviver. Assim com a morte e lise celular, houve quebra de nitrogênio orgânico em amônia, justificando o aumento da concentração de amônia nos reatores.

No caso do reator F4 (Figura 2a), até o 27º dia de operação verificou-se uma eficiência de remoção de nitrito de aproximadamente 85%, porém não foi observada remoção da amônia. A concentração desta permaneceu elevada até o 39º dia de operação do reator, quando foi feita troca parcial do meio de cultivo, o que proporcionou uma diminuição na concentração de amônia (por diluição) de $92,4 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ para $81,3 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$. Do 27º ao 43º dia, verificou-se redução abrupta no consumo de nitrito, causado provavelmente pela presença do cloranfenicol, que inibiu a flora desnitrificante, elevando-se gradativamente até o 57º dia de operação do reator, quando atingiu 90% de redução do nitrito. Dentro do mesmo período, a eficiência de remoção de amônia foi muito baixa, não alcançando 10% em média. No 57º dia, foi realizada nova troca de meio e a concentração afluente de nitrito foi alterada para 48 mg.L^{-1} , objetivando manter proporção amônia:nitrito de 1:1. Não obstante, até o dia 135 (a partir do 57º dia), não houve consumo simultâneo de nitrito e amônia, apesar do aumento gradativo na eficiência de remoção do nitrito (variação de 3 a 46%). Entretanto nos 211 dias subsequentes, correspondente ao 350º dia, verificou-se novamente intenso consumo de nitrito no reator. A remoção de amônia no período, a partir do dia 176 apresentou dados variáveis, indicando remoção deste composto (cerca de 35 a 60% de eficiência). A partir do 351º dia, o reator F4 passou a ser alimentado com $70 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$ (e não mais nitrito), objetivando diminuir a competição das desnitrificantes com as ANAMMOX pelo mesmo aceptor final de elétrons, já que as desnitrificantes devem usar o nitrato e reduzi-lo a nitrito. Dos 49 dias mantidos com nitrato, observou-se consumo total deste nos 15 primeiros dias e um período de 23 dias com consumo parcial do mesmo, até estagnação em torno de 30% na eficiência da remoção. Nos dias finais de operação do reator (até o dia 429), verificou-se novamente remoção acentuada do nitrito, indicando (provavelmente) que ainda havia atividade desnitrificante e não atividade ANAMMOX, já que neste mesmo período não houve remoção de amônia. Portanto, após 430 dias de operação deste reator, como não houve enriquecimento de ANAMMOX, este foi desativado.

Figura 2: Concentração dos compostos nitrogenados nos reatores inoculados com lodo ativado:
a) reator F4 (com cloranfenicol); b) reator F7 (sem cloranfenicol)



O reator F7 (Figura 2b) foi montado com o objetivo de comparar o comportamento deste reator com o do F4. Pela Figura pode-se observar que ao longo dos 80 dias de operação, o nitrito foi consumido lentamente, porém a amônia não, sugerindo a ocorrência de morte celular e liberação de nitrogênio orgânico. A amônia não foi consumida ao longo dos 257 dias de operação e portanto, como não houve indícios de atividade ANAMMOX, o reator foi desativado.

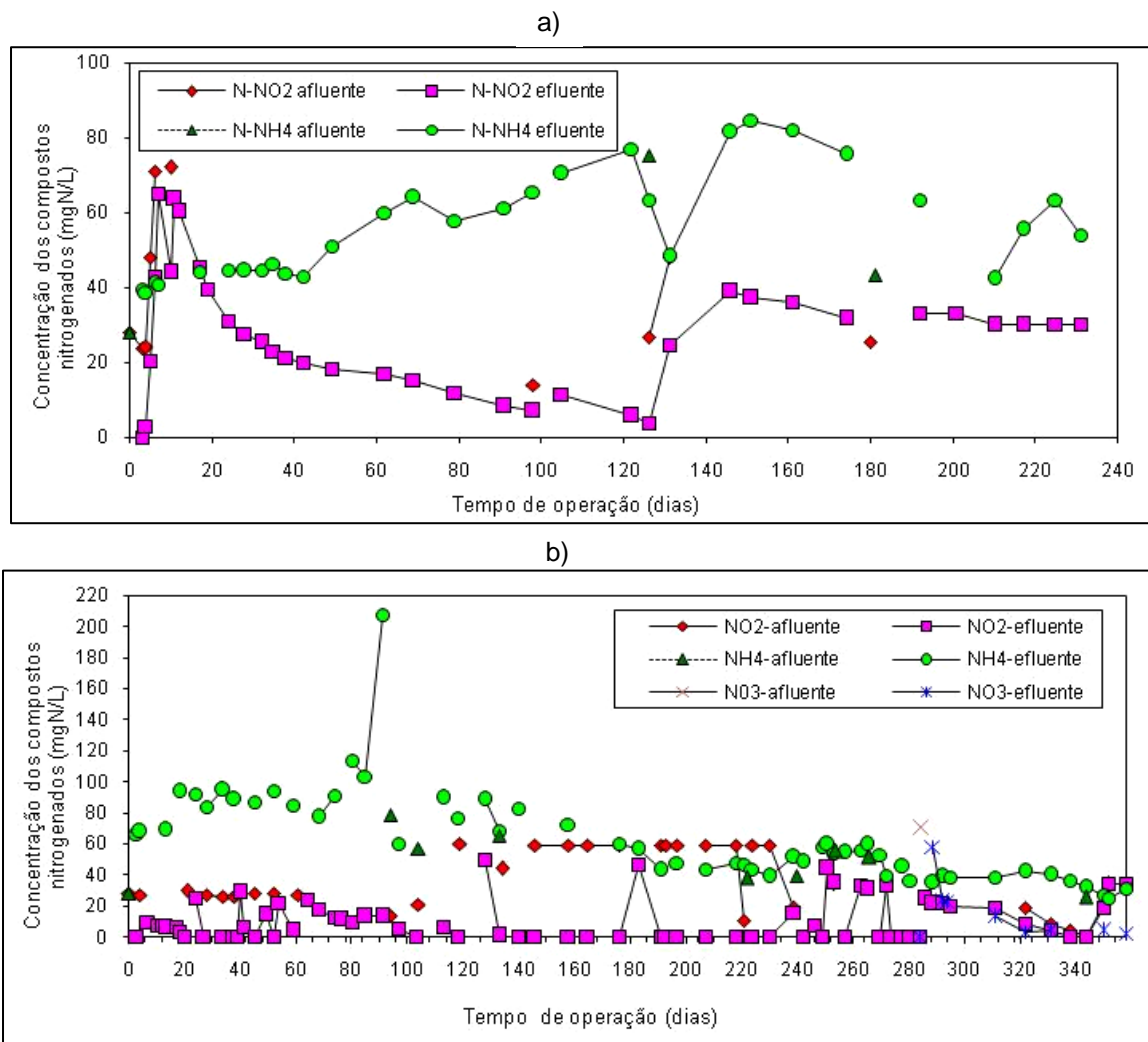
O reator F8 (Figura 3.a) apresentou comportamento semelhante ao reator F7, pois houve consumo gradativo do nitrito sem consumo da amônia (o valor máximo de eficiência de remoção deste composto foi de 24%). Portanto, após 231 dias de operação, como não houve consumo simultâneo de amônia e nitrito, este reator foi também desativado.

Com relação ao reator F9 (Figura 3b), verificou-se nos 100 dias iniciais de operação, que o nitrito foi sempre consumido, ainda que mais lentamente, pelo fato do cloranfenicol ter inibido em parte a atividade das bactérias desnitrificantes. Não obstante, a amônia não foi consumida, pelo contrário houve aumento deste composto indicando provável morte celular e liberação de nitrogênio orgânico no meio. Durante o 158º dia ao 207º dia de operação, verificou-se redução na concentração de amônia, de 72,5 mg.L⁻¹ para 43,6 mg.L⁻¹, o que pode indicar início de atividade ANAMMOX. Não obstante, nos dias subsequentes a eficiência de remoção diminuiu, já que neste mesmo período o nitrito foi prontamente consumido. No período compreendido entre o 270º ao 295º dia de operação do reator, foi observada redução de 30% na concentração de amônia (de 53,0 mg.L⁻¹ para 38,4 mg.L⁻¹). Como o nitrito continuou sendo consumido rapidamente (ainda indicando atividade desnitrificante), decidiu-se, a partir do 286º dia de operação, alimentar o reator com nitrato (e não mais com



nitrito), na tentativa de fornecer outro aceptor final de elétrons para as desnitrificantes e reduzir a competição entre elas e as ANAMMOX pelo mesmo aceptor. Durante este período foi observada uma redução e uma elevação na remoção do nitrito, porém sem que a amônia estivesse sendo removida simultaneamente. Portanto, como não houveram sinais de atividade ANAMMOX também nesse reator, o mesmo foi descartado após 358 dias.

Figura 3: Concentração dos compostos nitrogenados nos reatores inoculados com lodo UASB:
a) reator F8 (sem cloranfenicol), b) reator F9 (com cloranfenicol)



Observações da biomassa presente nos reatores, através da técnica de FISH com a sonda Amx820, revelaram que as bactérias ANAMMOX não estavam presentes nestes reatores (não houve sinal positivo com a sonda), ou poderiam estar mas em concentração abaixo do limite de detecção da técnica (10^3 a 10^4 células/ml).

O reator controle foi montado para verificar se haveria degradação da amônia e do nitrito por fatores abióticos. Nos 162 dias de monitoramento do mesmo não foi verificado consumo de amônia, tampouco de nitrito (dados não apresentados), indicando que não houve degradação destes compostos por fatores abióticos. Portanto, os resultados apresentados anteriormente para os outros reatores (que continham inóculo), evidenciaram que o consumo de nitrito verificado foi por via biológica devido a atividade das bactérias desnitrificantes.

Na Tabela 2 apresenta-se um resumo dos resultados obtidos no presente estudo de acordo com a atividade metabólica identificada em cada reator, em função do monitoramento dos compostos nitrogenados amônia e nitrito. Pode-se observar que em todos os reatores o processo verificado ao longo do tempo de incubação foi o de desnitrificação, independente do tipo e da concentração de inóculo usado. O tempo de duração desta atividade desnitrificante variou para cada reator. Nos reatores F4 e F9 que foram suplementados com cloranfenicol, em alguns momentos foi possível diminuir esta atividade, mas não eliminá-la completamente.

Este processo deve ter sido favorecido pela condição em batelada existente nos reatores, que permitiu com que as bactérias heterotróficas presentes no lodo conseguissem sobreviver durante todo o processo, pois apesar do meio ser desprovido de fonte de carbono, estas bactérias conseguem viver dos compostos oriundos da lise celular das outras bactérias (chamado crescimento críptico) em ausência de oxigênio, além de poderem utilizar tanto o nitrito como o nitrato como aceptor de elétrons. Tal fato também foi verificado por DAPENA-MORA *et al.*, (2004). Não obstante, não foi observada atividade ANAMMOX, e, portanto, não foi possível enriquecer as bactérias ANAMMOX nestes reatores.

Tabela 2: Resumo dos experimentos realizados e atividades metabólicas verificadas nos reatores a partir das variações nos compostos nitrogenados

Reator	Inóculo	Concentração de STV(g/l) no enriquecimento	Amônia	Nitrito	Metabolismo identificado
F4	Lodo ativado + cloranfenicol	0,96	0	↓	Desnitrificação intensa
F7	Lodo ativado	0,15	0	↓	Desnitrificação até 102 dias, depois
F8	Lodo anaeróbico	0,50	0	↓	Desnitrificação até 170 dias, depois sem atividade
F9	Lodo anaeróbico + cloranfenicol	1,30	0	↓	Desnitrificação e discreta remoção de amônia (de 158 até 207 dias, e de 270 até 334 dias)

↓=consumo; 0= nenhum consumo foi observado

O reator F9 apresentou além da atividade desnitrificante intensa, ligeira remoção de amônia em dois períodos distintos, o que poderia sugerir início de atividade ANAMMOX. Não obstante, como este consumo estava muito distante da estequiometria da reação ANAMMOX proposta por STROUS *et al.* (1998), que é de 1,32 moles de nitrito para cada 1 mol de amônia, não se pode afirmar com precisão se houve atividade ANAMMOX neste reator. Quando essa relação foi calculada para o reator F9, (no período compreendido entre os dias 158 até o 207), verificou-se que para cada 30 mg $\text{N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ removidos, foram consumidos 420 mg de $\text{N-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$, indicando uma relação ($\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$) de 14. Portanto, evidenciando intensa atividade desnitrificante, apesar do ligeiro consumo de amônia.

Atividade desnitrificante em reatores batelada usados para o enriquecimento de ANAMMOX, também foi verificado por SANCHEZ-MELSIÓ *et al.*, (2009). Esses autores testaram 12 inóculos diferentes para o enriquecimento de ANAMMOX. Verificaram que dos 12 experimentos realizados em frascos batelada, em sete foi detectada e desenvolvida intensa atividade desnitrificante, sugerindo que em experimentos em batelada o desenvolvimento de atividade ANAMMOX dependerá em muito do inóculo utilizado. Em cinco desses enriquecimentos, usando lodo anóxico oriundo de RBS, sedimento de uma *wetland* artificial, e sedimento de uma lagoa salobra, conseguiram verificar atividade ANAMMOX. Em quatro destes experimentos a atividade ANAMMOX foi detectada após 12 meses de incubação, e, somente em um enriquecimento, a atividade foi detectada após 3 meses. Posteriormente, através de técnicas moleculares verificaram que *Brocadia anammoxidans* foi o organismo enriquecido, e detectado nesses reatores.

Comparando os resultados obtidos no presente estudo com os dados de TSUSHIMA *et al.*, (2007), no qual os autores incubaram 11 lodos (provenientes de diferentes plantas de tratamento de efluentes domésticos) em meio mineral autotrófico sob condições batelada (nas mesmas condições usadas no presente trabalho). Verificaram que dentre as 11 amostras testadas, em duas delas não conseguiram enriquecer bactérias ANAMMOX, mesmo tendo sido verificada (através da técnica de PCR quantitativo) a presença de $1,0 \times 10^7$ e $2,7 \times 10^7$ cópias do DNAr 16S de ANAMMOX por mg de lodo seco. Em 4 delas, conseguiram detectar atividade ANAMMOX, ou seja, o consumo simultâneo de amônia e nitrito foi verificado após 37, 54, 64 e 69 dias de incubação. Nessas amostras a concentração de ANAMMOX detectada foi de, respectivamente, $1,6 \times 10^8$, $2,4 \times 10^7$, $1,1 \times 10^8$ e $1,1 \times 10^7$ cópias do gene 16S RNAr de ANAMMOX por mg de lodo seco. Nas outras cinco amostras restantes detectaram atividade ANAMMOX, mas somente após 107, 143, 171 e 223 dias de incubação. Esses resultados evidenciam que mesmo que um lodo tenha apresentado resultado positivo para a presença de ANAMMOX não significa que estas estejam em atividade, ou que mesmo após incubação em condições favoráveis para esta população, a atividade ANAMMOX seja detectada. Ainda de acordo com os resultados de THUSHIMA *et al.*, (2007), quanto maior a concentração de ANAMMOX no lodo (em torno de 10^7 a 10^8) maior a chance de se detectar atividade ANAMMOX e em tempos curtos de incubação.



No trabalho de TOH *et al.* (2002), os autores incubaram amostras de lodos ativados em meio mineral autotrófico em condições batelada, na presença de diferentes inibidores (como cloranfenicol, cianeto, 2,2-dinitrofenol, e dietilditiocarbamato). Conseguiram verificar atividade ANAMMOX (porém o consumo de amônia foi muito pequeno) unicamente nas amostras incubadas com cloranfenicol (após vários subcultivos). Para esses frascos (nos sub-cultivos) o consumo simultâneo de amônia e nitrito foi verificado somente quando as amostras foram incubadas em meio de cultura fresco com cloranfenicol e acrescido de 5% de CO₂ na atmosfera do frasco. Indicando que a presença de CO₂ estimulou o crescimento das bactérias ANAMMOX já que estas são autotróficas e podem utilizar o CO₂ como fonte de carbono. Não obstante, o enriquecimento das bactérias ANAMMOX só foi possível quando utilizaram reator contínuo de leito fixo (usando lodo ativado como inóculo e cloranfenicol). No reator, a atividade ANAMMOX começou a ser verificada após 5 meses de operação.

Os lodos de reator UASB e lodo ativado usados no presente trabalho, apesar de apresentarem resultados positivos para a presença de ANAMMOX (de acordo com o trabalho prévio), não apresentavam atividade ANAMMOX dentro dos reatores, ou seja, o reator UASB não apresentou perda de amônia sob condições anaeróbias, tampouco o sistema de lodos ativados. Não obstante, é importante esclarecer, que esse reator UASB foi operado durante muito tempo acoplado a um filtro biológico percolador (ou seja, o efluente do UASB alimentava o filtro biológico), sendo que o efluente do filtro era recirculado para o reator UASB, portanto havia entrada de nitrito neste reator oriundo do processo de nitrificação que ocorria no filtro. Acredita-se que essa seja a explicação mais provável para a presença de ANAMMOX no lodo deste reator UASB tratando esgoto doméstico.

Portanto, enriquecer bactérias ANAMMOX em condições batelada e batelada alimentada partindo de lodos sem atividade ANAMMOX aparente é muito mais difícil e demanda muito tempo (segundo os dados de TSUSHIMA *et al.*, 2007, pode variar de 37 à 223 dias), ou até mesmo pode-se não chegar a detectar a atividade, de acordo com os dados obtidos no presente trabalho. Alguns trabalhos conseguiram enriquecer bactérias ANAMMOX a partir de lodos provenientes de reatores UASB e de sistema de lodos ativados, que não apresentavam atividade ANAMMOX prévia. Porém todos utilizaram reatores contínuos (reator em batelada sequencial) e o tempo para o início da detecção de atividade ANAMMOX variou de 50 dias (THIRD *et al.*, 2005), 70 dias (DAPENA-MORA *et al.*, 2004) até 120 dias (CHAMCHOI & NITISORAVUT, 2007), o que pode indicar que cada lodo responde de forma diferente às condições de cultivo (já que de modo geral os três artigos mencionados utilizaram meio de cultura e condições de temperatura, pH e anaerobiose semelhantes).

CONCLUSÕES

Os lodos provenientes de reator UASB e do sistema de lodos ativados não apresentaram atividade ANAMMOX, quando incubados em meio autotrófico e anaeróbio em condições batelada mesmo após 400 dias de incubação.

O processo biológico verificado, nesta condição de incubação, foi a atividade desnitrificante intensa, tanto para o lodo aeróbio quanto para o anaeróbio. A adição de cloranfenicol nos reatores não conseguiu inibir as bactérias desnitrificantes, que na condição de batelada foram favorecidas em detrimento das ANAMMOX. Não obstante, o lodo aeróbio (proveniente do sistema de lodos ativados) apresentou (no período de 266 à 326 dias de incubação) eficiência de remoção da amônia maior (de cerca de 40%), quando comparado com o lodo anaeróbio (que em quase todo período apresentou cerca de 20%). Ainda assim, não houve enriquecimento de biomassa ANAMMOX nos reatores inoculados com lodo aeróbio, e operados na condição de batelada.

Portanto, a partir desses resultados, decidiu-se fazer o enriquecimento das bactérias ANAMMOX usando o lodo ativado para inocular um reator em batelada sequencial (operado com controle automatizado de pH, temperatura e anaerobiose), com tempo de detenção hidráulica de 24 horas e retenção total de biomassa. A condição de troca contínua do meio de cultura, favorecida no reator em batelada sequencial, e que não ocorreu nos reatores batelada, pode ser a condição chave para o sucesso do enriquecimento das ANAMMOX e eliminação da competição destas com as bactérias desnitrificantes. Os resultados deste segundo trabalho (Enriquecimento e Cultivo de bactérias ANAMMOX em reator sequencial em batelada) fazem parte de outra pesquisa que está em desenvolvimento no Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFMG, e os resultados serão apresentados em outro artigo neste Congresso.



AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pelo CNPq através do Edital Universal (471830/2006-2). Os autores agradecem também o apoio da COPASA em fornecer o lodo ativado proveniente da ETE Arrudas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APHA; AWWA; WEF. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 21^a. ed. Washington: APHA, 2005.
2. ARAUJO, J.C.; CHERNICHARO, C.A.L. (2007) Detection of Anaerobic Ammonium-oxidizing bacteria in different sludges and in a landfill leachate sample. Proceedings of the 11th World Congress on Anaerobic Digestion (AD11)”, Brisbane, Austrália, 23-27 de Setembro, 2007.
3. CHAMCHOI, N. & NITISORAVUT, S.. ANAMMOX enrichment from different conventional sludges. *Chemosphere*, 66 : 2225-2232, 2007.
4. DAPENA-MORA, A.; VAN HULLE, S.W.H.; CAMPOS, J.L.; MENDEZ, R.; VAN ROLLEGHEM, P.A., JETTEN, M.. Enrichment of Anammox biomasa from municipal activated sludge: experimental and modeling results. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, v.79, p. 1421-1428, 2004.
5. EGLI, K.; LANGER, C.; SIEGRIST, H.R.; ZEHNDER, A.J.B.. Enrichment and characterization of an Anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate. *Arch Microbiol.*, v.175, p. 198-207, 2001.
6. MULDER, A.; VAN de GRAAF A.A.; ROBERTSON, L.A.; KUENEN, J.G.. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol. Ecol.* v.16, p. 177-184, 1995.
7. RODIER, J. *Análisis de las aguas*, Editora Omega, Barcelona, 1981, 1057 p.
8. SANCHEZ-MELSIÓ, A., CALIZ, J., BALAGUER, M.D., COLPRIM, J., VILA, X. Development of batch-culture enrichment coupled to molecular detection for screening of natural and man-made environments in search of Anammox bacteria for N-removal bioreactors systems. *Chemosphere* 75: 169-179, 2009.
9. STROUS, M.; HEIJNEN, J.J.; KUENEN, J.G.; JETTEN, M.S.M. The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. *Appl. Microbiol Biotechnol.*, 50 : 589-596, 1998.
10. THIRD, K.A.; PAXMAN, J.; SCHMID, M.; STROUS, M.; JETTEN, M.S.M.; CORD-RUWISH R.. Enrichment of Anammox from activated sludge and its application in the CANON process. *Microbial Ecology* 49: 236-244, 2005.
11. TOH, S.K.; WEBB, R.I.; ASHBOLT, N.J.. Enrichment of Autotrophic Anaerobic Ammonium-Oxidizing Consortia from various wastewaters. *Microbial Ecology* 43: 154-167, 2002.
12. TSUSHIMA, I.; OGASAWARA, Y.; KINDAICHI, T.; SATOH, H.; OKABE, S.. Development of high-rate anaerobic ammonium-oxidizing (ANAMMOX) biofilm reactors. *Water Research*, 41:1623-1634, 2007.
13. VAN de GRAAF, A.A.; de BRUIJN, P.; ROBERTSON, L.A.; JETTEN, M.S.M., KUENEN, J.G.. Autotrophic growth anaerobic ammonium-oxidation micro-organisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology*, v.142, p. 2187-2196, 1996.