



II-155 – OCORRÊNCIA DE BACTÉRIAS ANAMMOX EM DIFERENTES LODOS PROVENIENTES DE SISTEMAS DE TRATAMENTO DE EFLUENTES DOMÉSTICO E INDUSTRIAL

Maria Cristina Monteiro de Souza Costa⁽¹⁾

Graduação em Ciências Biológicas pelo Instituto de Ciências Biológicas - ICB/ Universidade Federal de Minas Gerais. Mestre em Imunologia pela Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG). Doutoranda em Meio Ambiente pela Escola de Engenharia Sanitária e Ambiental (DESA/UFMG). Professora de Microbiologia do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais – CEFET – MG.

Luciana Carvalho⁽²⁾

Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Ouro Preto. Mestrado em Bioquímica pela Faculdade de medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. Experiência na área de Bioquímica com ênfase em Metabolismo. Bolsista de apoio técnico a pesquisa 1A - no Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Minas Gerais.

Carlos Augusto de Lemos Chernicharo⁽³⁾

Graduação em Engenharia Civil pela Universidade Federal de Minas Gerais, mestrado em Engenharia Sanitária pela Universidade Federal de Minas Gerais. Doutorado em Environmental Engineering pela University Federal de Minas Gerais. Professor associado - nível IV da Universidade Federal de Minas Gerais. Experiência na área civil com ênfase em Tratamento de águas Residuárias.

Juliana Calábria de Araújo⁽⁴⁾

Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento pela Universidade de São Paulo e EAWAG, Suíça. Realizou pós- doutorado no Departamento de Microbiologia da USP, e no Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Minas Gerais abordando ecologia molecular microbiana e biorremediação de áreas contaminadas. Professora do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Minas Gerais.

Endereço⁽¹⁾: Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha - Belo Horizonte - MG – Brasil. CEP: 31270-901. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Laboratório de Microbiologia, sala 4546, Bloco 2, 4º andar, Telefone: 31- 34093624. - e-mail: cristinacosta.ufmg@yahoo.com.br

RESUMO

Esse trabalho investigou a presença de bactérias anammox (anaerobic ammonium oxidation) em lodos de diferentes sistemas de tratamento de águas residuárias de esgoto doméstico e industrial. O objetivo dessa investigação foi a obtenção de amostras positivas que pudessem ser utilizadas como inóculos de dois reatores anaeróbios construídos na configuração de leito fixo com fluxo ascendente e contínuo. Ao todo, foram coletadas e analisadas 23 amostras. A análise foi realizada através da técnica de reação em cadeia da polimerase - PCR, utilizando quatro grupos de primers, sendo três primers específicos para detecção de genes que codificam 16S rRNA e um primer específico para a detecção do gene funcional que codifica a enzima hidrazina oxidase. Os resultados da PCR mostraram que 65,2% de todas as amostras foram positivas para os primers 16S rRNA de anammox. Entretanto, quando utilizados os primers específicos para enzima hidrazina oxidase somente 26% das amostras foram positivas. Os lodos escolhidos para inóculos dos reatores foram obtidos através de coletas feitas na lagoa de aeração do sistema de tratamento de efluente industrial e coletas feitas no sistema de wetland da planta de tratamento de esgoto doméstico. Ambos os lodos apresentaram resultados positivos para todos os primers testados. A próxima etapa deste trabalho consiste em enriquecer as bactérias anammox em reatores inoculados com os lodos escolhidos acima e avaliar a eficiência do processo de remoção de nitrogênio amoniacal quando se utiliza inóculos distintos, submetidos à mesma condição de operação além de estudar a variação da diversidade microbiana ao longo do experimento.

PALAVRAS-CHAVE: Anammox, detecção por PCR, remoção de N-amoniacal, reator anaeróbio, primer.



INTRODUÇÃO

A descarga de efluentes não tratados em corpos de água receptores resulta em impactos como contaminação de lençóis freáticos, assoreamento de corpos d'água, eutrofização, morte de animais, elevação dos custos no tratamento de água, problemas estéticos, recreacionais e deterioração dos meios naturais. Dentre os diversos poluentes presentes nas águas residuárias, os compostos nitrogenados, principalmente a amônia, se destacam, em função de seus efeitos adversos em termos de toxicidade e elevada demanda de oxigênio em corpos de água receptores.

A remoção de compostos nitrogenados em sistemas de tratamento tem sido tradicionalmente realizada pelo processo microbiológico de nitrificação seguida pela desnitrificação.

O processo anammox, do inglês *anaerobic ammonium oxidation* implica na oxidação anaeróbia da amônia onde o íon amônio é oxidado a nitrogênio gasoso tendo o nitrito comoceptor final de elétrons (VAN DER GRAAF *et al.*, 1996). Desde a sua descoberta em 1995 (MULDER *et al.*, 1995), o processo anammox tem sido considerado mais vantajoso e econômico para o tratamento de águas residuárias contendo altas concentrações de nitrogênio amoniacal, quando comparado ao sistema convencional de nitrificação e desnitrificação (KUENEN *et al.*, 2008). A aplicação do processo anammox, reduz em até 60% os custos com aeração e aporte de carbono orgânico e diminui, em quase 90%, a emissão de gases relacionados ao efeito estufa, pois o processo consome CO_2 e não emite N_2O (KARTAL *et al.*, 2010). Outro aspecto positivo deste processo é a baixa produção de lodo devido à baixa taxa de duplicação destas bactérias (JETTEN *et al.*, 2009).

Os organismos Anammox estão classificados no filo dos Planctomicetos, ordem Brocadiales, e até o momento foram identificados cinco *Candidatus* a gêneros “Kuenenia”, “Brocadia”, “Anammoxoglobus”, “Jettenia”, “Scalindua”. Apresentam morfologia de cocos com diâmetro menor que $1 \mu\text{m}$, tempo de duplicação de aproximadamente 11 dias e são fisiologicamente distintas dos outros membros dos Planctomicetos, pois são anaeróbias e quimiolitotróficas. (JETTEN *et al.*, 2009).

Entretanto, a aplicação do processo Anammox está limitada pela disponibilidade de biomassa anammox e pela dificuldade associada a cultivar e manter grandes quantidades dessas bactérias viáveis.

A prática comum para partida de reatores anammox em escala real é utilizar biomassa anammox ativa oriunda de reatores anammox já em operação. Isso dificulta a aplicação do processo no Brasil, pois os reatores anammox em escala real que estão em operação, se situam na Europa, Estados Unidos e Japão, o que logisticamente impossibilita a obtenção de grandes quantidades de lodo anammox. (CAMPOS, 2011).

Uma estratégia de enriquecimento das anammox se faz utilizando lodos de ambientes onde já tenha sido detectada a presença da bactéria na tentativa de acelerar o “*start up*” dos reatores. Todavia, pouca atenção tem sido dada ao efeito da utilização de diferentes tipos de inóculos do reator (DATE *et al.*, 2009) e suas implicações na eficiência do processo de remoção de nitrogênio amoniacal.

Essa pesquisa tem como objetivo investigar a presença de bactérias anammox em lodos de diferentes sistemas de tratamento de águas residuárias de esgoto doméstico e industrial para selecionar inóculos de dois reatores que serão utilizados no enriquecimento da cultura anammox destinados a estudar a remoção de amônia de efluentes.

Como as anammox não foram isoladas em técnicas convencionais de cultivo em microbiologia, seus estudos dependem das técnicas moleculares, como a hibridação *in situ* fluorescente (FISH, do inglês *fluorescent in situ hybridization*) e a reação em cadeia da polimerase (PCR), para o desenvolvimento das pesquisas com essas bactérias (SCHIMID *et al.*, 2005).



MATERIAIS E MÉTODOS

Pesquisa de inóculos

Para a realização dos experimentos foram pesquisados diferentes sistemas de tratamentos de esgoto doméstico e industrial situados no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento- CePTS, UFMG/ COPASA, e na Refinaria de Petróleo Gabriel Passos – REGAP- unidade da Petrobras localizada em Minas Gerais. As amostras coletadas foram acondicionadas em caixas de isopor com gelo, devidamente lacradas, identificadas e levadas ao laboratório para processamento e estocagem.

CePTS

O CePTS está localizado junto à Estação de Tratamento de Esgoto do Ribeirão Arrudas - ETE Arrudas, situada no município de Belo Horizonte, Minas Gerais. Dispõe de diferentes sistemas de tratamento de esgoto em escala de demonstração destacando-se Upflow anaerobic Sludge blanket- UASB-, filtros biológicos percoladores, lagoas de polimento, leito submerso de fluxo (wetland) horizontal e leito plantado de fluxo vertical. Dentre esses foram escolhidos para a pesquisa do inóculo: três lagoas de polimento em série, quatro reatores UASB, uma wetland com leito plantado com *Typha latifolia* e outra sem plantar.

A coleta nos wetlands foi realizada nos tubos de PVC dispostos ao longo dos wetland não plantado e plantado que alcançam 40, 45 e 50 cm de profundidade respectivamente. A coleta do sedimento das três lagoas de polimento que estão dispostas em série, foi realizada a 7(A) e 10 (B) metros da entrada do afluente numa profundidade de 50 cm aproximadamente por meio de um amostrador de coleta de plâncton. O volume coletado para análises de PCR foi de 500 mL. A coleta nos quatro reatores UASB foi realizada como amostragem composta. Foram coletados 500 mL de cada altura do reator. Como as dimensões variam pra cada reator, também variaram o número de pontos de coleta por reator e conseqüentemente o volume amostrado.

REGAP

Na REGAP os efluentes líquidos industriais foram coletados em três redes distintas: águas contaminadas, águas oleosas e águas da unidade de coque. Estas correntes se unem à montante da estação de tratamento de despejos industriais. Essa estação é constituída de quatro separadores de água e óleo, uma unidade de flotação, duas bacias de acumulação de águas de chuvas ou excedentes das redes de água oleosa e de água contaminada que consistem no tratamento primário. O tratamento secundário é constituído lagoas de aeração. Atualmente essa lagoa aerada tem funcionado como zona de decantação e se encontra com grande acúmulo de lodo devido ao extenso período sem remoção do mesmo. O efluente dessas lagoas é encaminhado para o sistema de biodiscos e em seguida para lagoa de polimento “Lagoa de Ibirité” e posteriormente é lançado no corpo receptor, Córrego Pintados. Os locais da REGAP definidos para coleta foram a lagoa de aeração, sistema de biodiscos, lagoa de Ibirité e sala de bombas .

Processamento das amostras

O processamento das amostras consistiu em distribuir o lodo em frascos estéreis, centrifugar por 20 min a 4000rpm. O sobrenadante era descartado e a biomassa sedimentada foi parte armazenada em papel alumínio e estocadas em freezer a -80°C e 0,25g (em duplicata) colocadas em tubos de 2mL, e armazenadas a 4°C .

Extração de DNA

A extração de DNA genômico dos organismos presentes nos lodos foi realizada com o kit comercial Power Soil DNA Kit, Mo Bio laboratórios, Inc., Carlsbad, CA, EUA, seguindo as instruções do fabricante.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a detecção das bactérias anammox, o DNA extraído a partir das amostras dos lodos coletados foi amplificado por PCR utilizando pares de *primers* específicos para os genes que codificam o RNAr16S de anammox e Planctomicetos (ARAÚJO., 2011), e um par de *primer* que codifica o gene da enzima hidrazina oxidase. Os *primers*, bem como a seqüência e especificidade dos mesmos, encontram-se descritos na Tabela 1.

Para o *mix* de cada reação de PCR foram utilizados 5µL de tampão IV B 10X (Phoneutria), 0,2 µL de dNTPs (*Fermentas*), a 10mM e 0,25 µL de cada *primer a* 30pmol e 1µL de taqpolimerase (Phoneutria) a 5U e o

volume final de 25 μL era completado com água para PCR, dependendo do volume de DNA utilizado como molde. A condição de amplificação usada na PCR para os pares de *primers*: Pla46F-Amx667R, Pla46F-Amx820R, Pla46F-Amx1240R foi: desnaturação inicial de 4 minutos à 94°C, 35 ciclos de 45 segundos de desnaturação à 94°C, anelamento de 50 segundos à 56°C (exceto para o par Pla46F-Amx667R que foi de 55°C), 1 minuto de extensão à 72°C, e extensão final de 7 minutos à 72°C. Para os primers *HzoF1/ Ana hzo2R* a condição usada foi de 94°C por 5 min de desnaturação, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 45s, extensão a 72 °C por 2 min, extensão final 95 °C por 30s, 55 °C por 45 s, e 10 min a 72 °C.

Tabela 1 – Iniciadores utilizados no PCR para a detecção de bactérias anammox

| Primers | Especificidades | Sequencia 5'→3' | Referência |
|------------------|--|-------------------------|-----------------------------------|
| Pla46f | Planctomicetos | GGATTAGGCATGCAAGTC | Schmid <i>et al.</i> (2000) |
| Amx667r | Organismos anammox | ACCAGAAGTTCCACTCTC | Van der Star <i>et al.</i> (2007) |
| Am820r | Generos " <i>Ca. Brocadia</i> " " <i>Ca. Kuenenia</i> " | AAAACCCCTCTACTTAGTCCC | Schmid <i>et al.</i> (2000) |
| Amx1240r | " <i>Ca. Brocadia anammoxidans</i> " | TTTAGCATCCCTTTGTACCAACC | Schmid <i>et al.</i> (2000) |
| <i>HzoF1</i> | Gene <i>hzo</i> - bactérias anammox | TGTGCATGGTCAATTGAAAG | Li <i>et al.</i> (2010) |
| Ana <i>hzo2R</i> | Gene <i>hzo</i> - bactérias anammox | ACCTCTTCWGCAGGTGCAT | Li <i>et al.</i> (2010) |

Eletofórese em gel de agarose

Alíquotas de 5,0 μL de ácidos nucleicos : DNA genômico / produtos de PCR foram analisados mediante eletrofórese horizontal, em géis de agarose 1%, corrido a 75 V por 40 minutos; corados com brometo em etídio (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 10 min, parcialmente descorados em água destilada por 5 min. A observação do gel foi realizada no transluminador de luz UV (UVP Products) com a finalidade de comprovar o tamanho, quantidade e a pureza do DNA. As imagens dos géis foram registradas por um sistema de captura de imagem. Todas as amplificações foram realizadas no mínimo duas vezes em dois eventos distintos de PCR. Os marcadores de peso molecular utilizados foram: 100 bp DNA Ladder, GeneRuler™ Low Range DNA Ladder.

Reatores e periféricos

Foram confeccionados dois reatores tubulares (Figura 1) de vidro com 60 cm de altura e 7 cm de diâmetro interno, com volume útil de 2L para serem utilizados na configuração de reatores anaeróbios de fluxo ascendente contínuo com leito fixo para o enriquecimento das culturas anammox. A entrada do meio afluente e saída do efluente do reator é realizados por bomba peristáltica modelo Minipuls 3, marca Gilson e as conexões utilizadas são de silicone. O material suporte escolhido foi o minibiobob, (BIOPROJ, Tecnologia Ambiental Ltda) produzido com um suporte em prolipropileno injetado e espuma de poliuretano flexível expandido. A temperatura é mantida em torno de 33°C via um aquecedor/ventilador elétrico (DeLonghi).



Figura 1 – Foto dos reatores e periféricos

RESULTADOS

As tabelas 2 e 3 apresentam os resultados obtidos dos testes de PCR para as amostras coletadas na REGAP e no CePTS, respectivamente. A PCR realizada com as amostras coletadas na REGAP apresentou resultados positivos para todos os primers em 100% das amostras (Tabela 2).

Tabela 2: Resultados de amplificação da reação em cadeia da polimerase das amostras coletadas na REGAP, utilizando diferentes pares de primers específicos para o DNA do RNAr 16S e para o gene funcional *hzo*, de organismos anammox.

| Pontos de amostragem | Primers | | | |
|----------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|
| | Pla46rc/ Amx667r | Pla 46rc/ Amx 820r | Pla 46rc/ Amx1240r | hzoF1/ Ana hzo2R |
| Lagoa de aeração | + | + | + | + |
| Biodiscos | + | + | + | +/- |
| Lagoa de Ibirité | + | + | + | +/- |
| Sala de Bombas | + | + | + | +/- |

(+) Resultados positivos dos produtos de PCR amplificados visualizados em gel de agarose 1%.

(-) Resultados negativos, nenhum produto foi amplificado.

Já nas amostras coletadas no CePTS, usando primers específicos para o DNA do RNAr 16S, 78,9% das amostras foram positivas para os primers Pla46F-Amx667R, 68,4% positivas para os primers Pla46F-Amx820R e 57,4 % positivas para os primers Pla46F-Amx1240R. Porém quando utilizamos o par de primers funcional que codifica o gene da enzima hidrazina oxidase, *HzoF1/ Ana hzo2R*, apenas 10,5 % das amostras apresentaram ampliações positivas (Tabela 3), correspondendo as amostras do wetland não plantado coletado na profundidade de 50 cm e no wetland plantado, amostrado em 45cm de profundidade.

O parâmetro de escolha dos lodos para inóculo dos reatores foi a amplificação positiva em todos os primers incluindo o *hzo*. Tem sido observado que a natureza altamente conservada do 16S rRNA pode limitar a

eficiência em detectar/definir a diversidade das bactérias Anammox e sua distribuição em diferentes ambientes por amplificar genes pertencentes aos *Planctomycetes* e não especificamente das bactérias Anammox (LI *et al.*, 2010).

No entanto, o gene que codifica a enzima nas anammox é específico das mesmas, e está ausente nas outras bactérias. Avanços na genômica das anammox têm demonstrado, por exemplo, que o gene da hidrazina oxidase (HZO), que desempenha papel chave na bioquímica do processo Anammox é um bom biomarcador das anammox.(HIRSCH *et al.*, 2010).

Foram escolhidos como inóculos dos reatores os lodos oriundos da lagoa de aeração coletada no sistema de tratamento de efluente industrial, REGAP e o lodos coletado a 50 cm de profundidade do sistema de wetland da planta de tratamento de esgoto doméstico, CePTS.

Tabela 3: Resultados de amplificação da reação em cadeia da polimerase das amostras coletadas no Cepts, utilizando diferentes pares de primers específicos para o DNA do RNAr 16S e para o gene funcional *hzo*, de organismos anammox.

| Ponto de amostragem | Primers | | | |
|-------------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|
| | Pla46rc/ Amx667r | Pla 46rc/ Amx 820r | Pla 46rc/ Amx1240r | hzoF1/ Ana hzo2R |
| Lagoa de polimento 1A | + | - | - | - |
| Lagoa de polimento 1B | + | + | + | - |
| Lagoa de polimento 2A | + | + | + | - |
| Lagoa de polimento 2B | + | + | + | - |
| Lagoa de polimento 3A | + | + | + | - |
| Lagoa de polimento 3B | + | + | + | - |
| Wetland não plantado 40 | + | + | - | - |
| Wetland não plantado 45 | + | + | - | - |
| Wetland não plantado 50 | + | + | + | + |
| Wetland Plantado 40 | + | + | + | - |
| Wetland Plantado 45 | + | + | + | + |
| Wetland Plantado 50 | + | - | - | - |
| UASB 1-A | - | - | - | - |
| UASB 1-B | - | - | - | - |
| UASB 1-C | + | + | + | - |
| UASB 2 | + | + | + | - |
| UASB 3 | - | - | - | - |
| UASB 4- A | - | - | - | - |
| UASB 4- B | + | + | + | - |

(+) Resultados positivos dos produtos de PCR amplificados visualizados em gel de agarose 1%.

(-) Resultados negativos, nenhum produto foi amplificado.

A- B- C- : Diferentes distâncias em relação ao ponto de entrada do afluente.

(40-45-50) : Diferentes profundidades (cm) amostradas nos wetlands

CONCLUSÕES

Os resultados da PCR mostraram que 65,2% de todas as amostras foram positivas para os primers 16S rRNA. Entretanto, quando utilizados os primers específicos para enzima hidrazina oxidase somente 26% das amostras foram positivas.

Os resultados de amplificação positivo nas reações de PCR para os diferentes pares de primers testados indicam que o processo anammox pode estar ocorrendo nestas plantas de tratamento de efluentes domésticos e industriais e o lodo correspondente poderia ser usado como inóculo para reatores de enriquecimento anammox.

Os lodos escolhidos para inóculo dos reatores foram os obtidos da lagoa de aeração do sistema de tratamento de efluente industrial, coletado na REGAP e no do sistema de wetland da planta de tratamento de esgoto doméstico, CePTS, ambos apresentaram resultados positivos para todos os primers testados.

Encontra-se em andamento o enriquecimento das bactérias anammox em dois reatores anaeróbios de leito fixo e fluxo ascendente utilizando como inóculo os lodos escolhidos nesse trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARAUJO, J.C.; CAMPOS, A.C.; CORREA, M.M., SILVA, E.C., MATTÉ, M.H.; MATTÉ, G.R.; Von SPERLING, M.; CHERNICHARO, C.A.L. Anammox bactéria enrichment and characterization from municipal activated sludge. *Water Science and Technology*, v.64.7, p. 1428-1434, 2011.
2. CAMPOS, A. P. & ARAÚJO, J. C. *Enriquecimento e caracterização* de bactérias anammox para a remoção de nitrogênio amoniacal de efluentes. Dissertação (mestrado) Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2011
3. DATE, Y., ISAKA, K., IKUTA, H., SUMINO, T., KANEKO, N., YOSHIE, S., TSUNEDA S., INAMORI, Y. Microbial diversity of anammox bacteria enriched from different types of seed sludge in an anaerobic continuous-feeding cultivation reactor, *J. Biosci. Bioeng.* **107**, 281–286, 2009.
4. HIRSCH M. D., LONG Z. T. AND SONG B. Anammox bacterial diversity in various aquatic ecosystems based on the detection of hydrazine oxidase genes (hzoA/hzoB). *Microbial Ecology*, **61**(2), 264-276, 2010.
5. JETTEN, M. S. M., NIFTRIK, L. V. V., STROUS, M., KARTAL, B., KELTJENS, J. T., AND OP DEN CAMP, H. J., Biochemistry and molecular biology of anammox bacteria. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 44, 65–84, 2009.
6. KARTAL, B., KUENEN, J. G., LOOSDRECHT, M. C. M., Sewage treatment with anammox. *Science* 328 (5979), 702-703, 2010.
7. KUENEN J. G., SINNINGHE DAMSTÉ J. S., STROUS M., JETTEN M. S. M. Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. *Nature* 422: 608-611, 2008.
8. LI, M., HONG, Y., KLOTZ, M. G., GU, J. D. A comparison of primer sets for detecting 16S rRNA and hydrazine oxidoreductase genes of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in marine sediments. *Appl Microbiol Biotechnol*, 86:781–790, 2010.
9. MULDER, A., VAN DE GRAAF, A. A., ROBERTSON, L. A., KUENEN, J. G. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidised bed reactor. *FEMS Microbiology Ecol.*, 16, 177-184, 1995.
10. PARK, H., ROSENTHAL, A., JEZEK, R., RAMALINGAM, K., FILLOS, J., CHANDRAN, K. Impact of inocula and growth mode on the molecular microbial ecology of anaerobic ammonia oxidation (anammox) bioreactor communities. *Water Research*, 44, 5005 – 5013, 2010.
11. SCHMID, M., MAAS B., DAPENA A., VAN DE PAS-SCHOONEN K., VAN DE VOSSENBERG J., KARTAL B., VAN NIFTRIK L., SCHMIDT I., CIRPUS I., KUENEN J.G., WAGNER M., DAMSTÉ J.S.S., KUYPERS M., REVSBECH N.P., MENDEZ R., JETTEN M.S.M., STROUS M. Biomarkers for in situ detection of anaerobic ammonium-oxidizing (Anammox) Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1677-1684, 2005.
12. 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* 142: 2187-2196, 1996.



13. VAN DER STAR, W. R. L., MICLEA, A. I., VAN DONGEN, U. G. J. M., MUYZER, G., PICIOREANU, C., VAN LOOSDRECHT, M. C. M. The membrane bioreactor: a novel tool to grow Anammox bacteria as free cells, *Biotechnol. Bioeng.* 101; 286–294, 2007.