

II-275 - COMPARAÇÃO ENTRE DOIS INÓCULOS EM SISTEMAS PARA ENRIQUECIMENTO E ATIVIDADE ANAMMOX

Genilda Maria de Oliveira ⁽¹⁾

Bióloga pela Universidade Federal de Uberlândia, Mestre em Ecologia pela Universidade de Brasília. Professora de Educação Básica, Técnica e Tecnológica do Instituto Federal de Tecnologia do Triângulo Mineiro, Campus Uberlândia. Doutoranda em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos da Universidade de Brasília.

Ariuska Karla Barbosa Amorim ⁽¹⁾

Engenheira Química pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Mestre e Doutora em Engenharia Civil, área de concentração Hidráulica e Saneamento, pela Escola de Engenharia de São Carlos (EESC) da Universidade de São Paulo (USP). Professora adjunta do Departamento de Engenharia Civil e Ambiental da Universidade de Brasília (UnB).

Endereço ⁽¹⁾: Universidade de Brasília, Faculdade de Tecnologia. Campus Universitário Darcy Ribeiro, Prédio SG12. Asa Norte. CEP 70919-900. Brasília, DF, Brasil. genioli@unb.br; genilda@iftm.edu.br

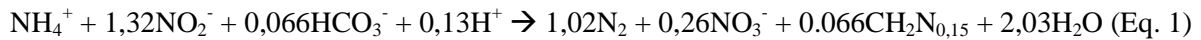
RESUMO

A utilização de biomassas oriundas de ecossistemas naturais ou artificiais, onde ocorre presença de altas concentrações de nitrogênio amoniacal e onde os fatores ambientais favorecem o desenvolvimento de micro-organismos anammox, pode reduzir o longo período de tempo gasto na partida de reatores. Dessa forma, buscou-se avaliar o comportamento de dois inóculos quanto à presença de bactérias anammox e o desenvolvimento dos mesmos em culturas em bateladas para enriquecimento e atividade anammox. Para tanto foram selecionados um inóculo proveniente do sedimento de fundo do Lago Paranoá Brasília, DF e outro de uma lagoa anaeróbia tratando efluente de abatedouro de bovinos. Os lodos foram avaliados quanto às suas características físico-químicas e 25 g de cada inóculo foram inseridos em reatores (1,6L) em modo de culturas em bateladas usando meio sintético, livre de oxigênio dissolvido, e substratos de $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NaNO}_2$. O pH e a temperatura foram mantidos entre as faixas de 7,0 a 8,0 e 28° a 32°C, respectivamente. Foram realizadas análises das concentrações dos compostos nitrogenados (NH_4 , NO_2 e NO_3) no início e ao final de cada batelada e de PCR para verificação da presença de bactérias anammox antes e após o enriquecimento. Na etapa de caracterização dos lodos, verificou-se que o lodo proveniente da lagoa anaeróbia do frigorífico apresentou concentrações de nitrogênio total (517,8 mg/L) e carbono (em termo de DQO, 300,5 mg/L) bem superiores às concentrações registradas para o sedimento oriundo do lago Paranoá com concentrações de 138,2 mg/L e 64 mg/L para nitrogênio total e DQO, respectivamente. A presença de bactérias anammox foi confirmada nos dois inóculos, antes e após o período de enriquecimento para atividade anammox, por análise de PCR usando os pares de iniciadores PLA46F e AMX 820R. O comportamento na conversão dos compostos amônia e nitrito foi diferente entre os dois inóculos. Durante o período avaliado, de 100 dias, predominou nos sistemas com inóculos do lago Paranoá os processos de nitratação e anammox, enquanto nos sistemas com inóculo da lagoa anaeróbia os processos anammox e de desnitrificação heterotrófica. Os dois inóculos apontam-se como promissores para uso visando a atividade anammox devendo-se ajustar condições para que prevaleça o processo anammox.

PALAVRAS-CHAVE: Anammox, Remoção de Nitrogênio, Fonte de Inóculos, Culturas em Bateladas, Enriquecimento bactérias anammox.

INTRODUÇÃO

O processo anammox configura-se pela oxidação da amônia para gás nitrogênio usando o nitrito como aceptor de elétrons, conforme Equação 1 (Strous *et al.*, 1998). Essa rota metabólica havia sido considerada termodinamicamente possível por Broda em 1977. No entanto, a primeira descrição da ocorrência da oxidação anaeróbia da amônia em sistemas de tratamento de águas residuárias foi realizada por Mulder *et al.* (1995). A partir dessa descoberta, estudos foram realizados para determinação dos substratos, substâncias intermediárias e produtos envolvidos na reação, os micro-organismos responsáveis sendo eles pertencentes aos Planctomycetes, as características celulares, o sequenciamento genético, entre outros (Kuenen, 2008).



De acordo com Terada *et al.* (2011) os próximos desafios para essa área são justamente a estratégia de partida de reatores visando reduzir o tempo de emergência da atividade anammox e a estabilização da eficiência do processo anammox.

A composição do inóculo parece ser determinante no tempo de partida de reatores com atividade anammox e, portanto, está correlacionada com a origem do inóculo (Terada *et al.*, 2011). Tsushima *et al.* (2007), demonstraram que o número de cópias do gene que codificam o RNAr 16S de organismos anammox e a relação carbono/nitrogênio (C/N) influenciam no tempo de emergência da atividade anammox e na taxa de remoção de nitrogênio. Assim, quanto maior a densidade de cópias de genes relacionados à anammox e menor valor na relação C/N mais rapidamente consegue-se a partida de reatores visando a atividade anammox. Da mesma maneira, Tao *et al.* (2013) discutem que a equidade entre as espécies da comunidade e uma elevada concentração de bactérias anammox em inóculos favorecem a partida dos sistemas e alta atividade anammox.

O enriquecimento de micro-organismos anammox é uma importante etapa durante a partida dos reatores e torna-se imprescindível o controle de parâmetros operacionais a fim de que não ocorram inibições devido às concentrações de nitrogênio, em suas formas de amônia, nitrito, nitrato e de outras substâncias.

Os micro-organismos anammox tem uma taxa de crescimento lenta (Strous *et al.*, 1998) e por isso a etapa para enriquecimento é longa. Vives *et al.* (2007) que usaram biomassa proveniente de um sistema de lodos ativados tratando esgoto/chorume detectaram atividade anammox em um reator de batelada sequencial (RBS) a partir do 60º dia do início da operação do reator e gastaram 145 dias no estágio de enriquecimento. Um RBS, com inóculo proveniente de sistemas de lodos ativados tratando esgoto doméstico, visando o enriquecimento da biomassa anammox, gastou-se 25 dias para cessar a atividade desnitrificante por bactérias heterotróficas e mais 62 dias para a etapa de enriquecimento (Araújo *et al.*, 2010).

Martins (2007) operando quimiostatos inoculados com biomassas originárias de um reator nitrificante/desnitrificante tratando água residuária de produção de glutamato monossódico e de um UASB tratando efluente de abatedouro de aves obteve estabilização do processo anammox a partir 136 dias de operação. Mas somente a partir de 272 dias de operação é que se observaram eficiências em torno de 70% na remoção de amônia e nitrito.

Mesmo para a biomassa oriunda do reator que se detectou pela primeira vez a atividade anammox, na Holanda, o enriquecimento de culturas anammox levou cerca de 3 a 4 meses (Jetten *et al.*, 1999). No entanto, Dapena-Mora *et al.* (2004) realizaram experimentos para avaliação da atividade anammox usando biomassa já enriquecida oriunda de um RBS em escala de bancada na Universidade Técnica de Delft na Holanda e conseguiram remover amônia e nitrito pelo processo anammox a partir do início dos experimentos.

A maioria dos estudos para remoção de nitrogênio de águas residuárias ou de meios sintéticos por processo anammox e que apresentaram eficiências de remoção superiores a 95% do nitrogênio total usaram biomassa aclimatada às condições ótimas para as bactérias anammox por mais de 3 anos (Jetten *et al.*, 1999, Dapena-Mora *et al.*, 2004).

A utilização de biomassas oriundas de ecossistemas naturais ou artificiais, onde ocorre presença de altas concentrações de nitrogênio amoniacal e onde os fatores ambientais favorecem o desenvolvimento de micro-organismos anammox, pode reduzir o longo período de tempo gasto na partida de reatores. Tsushima *et al.* (2007) demonstram que quanto menor a relação carbono/nitrogênio melhor é a resposta de enriquecimento e atividade anammox. Da mesma maneira, concentrações de amônia, nitrito e a ausência de oxigênio são condições para a ocorrência do processo de oxidação anaeróbia da amônia pelo mecanismo anammox (Jetten *et al.*, 1999). Alguns outros aspectos tais como, potencial redox elevado e concentração baixa de sulfetos também são condições importantes para o desenvolvimento dos organismos anammox (Sánchez-Melsió *et al.*, 2009).

Nesse contexto, foram objetivos na presente pesquisa: a) definir dois inóculos com procedência distinta, sendo um de sistema natural e outro de estação de tratamento de águas residuárias com altas concentrações de nitrogênio; b) avaliar a presença de consórcios de bactérias anammox antes e após o enriquecimento e; c) comparar a atividade anammox durante período de enriquecimento entre os dois inóculos testados usando água residuária sintética.

MATERIAIS E MÉTODOS

Reatores, com capacidade de 1,6 L, foram desenvolvidos usando tubos de acrílicos de diâmetro interno de 90 mm e parede com espessura de 5 mm, capazes de resistir a uma pressão de 2,24 Kgf/cm² (Figura 1 AB) e válvulas de engate rápido foram adotadas para facilitar a operação dos mesmos e reduzir o tempo de perturbações aos sistemas. As tampas inferiores e superiores foram moldadas em tarugos de nylon, com mecanismos de suporte para oringes e encaixes de aperto, garantindo vedação aos sistemas. Cada sistema é composto por 2 peças, sendo uma responsável por conter a mistura biomassa/água residuária sintética e a outra para conter água para dissolução dos gases formados no primeiro reator e para quantificar a produção de gases pelo deslocamento da massa de água (Figura 1 B).

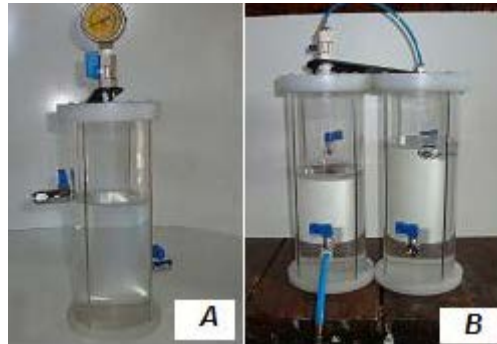


Figura 1: a) reator para desenvolvimento de culturas em bateladas b) sistema composto por dois reatores (biomassa/meio cultivo – água para dissolução de gases)

Como inóculos para os reatores para enriquecimento e atividade anammox foram utilizados sedimento do lago Paranoá, Brasília/DF (SFLPARB) e lodo de uma lagoa anaeróbia tratando efluente de abatedouro de bovinos, Araguari/MG (SFLANF3). Durante as coletas das amostras dos inóculos foram feitas avaliações da temperatura e pH, *in situ*. Os dois inóculos foram caracterizados usando-se os seguintes parâmetros: pH, sólidos totais (voláteis e fixos), nitrogênio total kjeldahl (NTK), nitrogênio amoniacal, nitrito, nitrato, Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) por métodos de análise recomendados no *Standard Methods* (APHA, 2005).

A água residuária sintética foi o meio sintético proposto por Sánchez-Melsió *et al.* (2009) que realizou uma adaptação ao meio de van de Graaf *et al.* (1996). O oxigênio dissolvido (OD) presente no meio de cultivo foi removido por deslocamento com nitrogênio gasoso até a concentração do OD igual a zero (Wang *et al.*, 2011). O suprimento dos substratos amônia e nitrito ocorreu pela adição de NH₄Cl/NaNO₂ para manutenção da atividade anammox.

Os experimentos, visando o enriquecimento da biomassa e atividade anammox, foram realizados em reatores em escala de bancada operados em bateladas com duração de sete dias, quando novos suprimentos dos substratos NH₄Cl/NaNO₂ foram inseridos. Cada um dos reatores foi preenchido com 25 g de lodo centrifugado de cada ambiente e 975 ml água residuária sintética e mantidos em condições anóxicas. A quantidade de lodo inserido nos reatores (25g) foi determinada visando uma concentração inicial em torno de 1,5 a 2 g de sólidos suspensos voláteis conforme relatado na literatura (Kuai & Verstraete, 1998; Schierholt Neto, 2007; Wang *et al.*, 2011). O sistema para cada inóculo foi montado em duplicata para verificar a reprodutividade dos experimentos. Foi deixado um *headspace* de 600 ml em cada um dos reatores. Os reatores foram encaixados em uma mesa agitadora (Shaker Fanem 2540) em velocidade equivalente a 100 rpm e colocados em sala climatizada, com temperatura oscilando entre 28° a 32°C. O valor de pH foi mantido dentro de uma faixa de 7,0 a 8,0, com o uso de soluções de HCl, NaOH e NaCO₃ a 1M.

A água residuária sintética foi periodicamente substituída para evitar problemas ocasionados por acumulação ou consumo de substâncias que inibissem o desenvolvimento dos organismos anammox (Tisushima *et al.*, 2007; Sánchez-Melsió *et al.*, 2009; Suneethi & Joseph 2011).

O aumento das concentrações de amônia e nitrito no meio foi gradativo, iniciando com concentrações de 20 mg L⁻¹ para ambos componentes e fazendo incrementos de 10 mg L⁻¹ em cada etapa, até a concentração de 50 mgL⁻¹ para ambos os componentes. O nitrato (NaNO₃), em concentrações de 30 mgL⁻¹, foi inserido nas

bateladas iniciais para favorecer a eliminação da biomassa degradadora composta pelas bactérias desnitrificantes e para evitar a produção de H₂S (Sánchez-Melsió *et al.*, 2009). Os compostos nitrogenados foram avaliados a cada 7 dias.

Para avaliação das concentrações de amônia o método selecionado foi o potenciométrico com uso de eletrodo íon seletivo e seguindo as recomendações do *Standard Methods*, método 4500 (APHA, 2005) e as concentrações de nitrito e nitrato foram determinadas por cromatografia iônica (Dionex ICS 900).

Para avaliação da presença de micro-organismos anammox nos inóculos antes e após o período de enriquecimento, visando a atividade anammox, foram feitas extrações de DNA dos inóculos usando o kit de extração de DNA, o PowerSoil da MoBio. A PCR utilizando os pares de iniciadores Pla 46F (GGATTAGGCATGCAAGTC – Neef *et al.*, 1998) específico para os Planctomycete acompanhado do AMX 820R (AAAACCCCTCTACTTAGTGCCC - Schmid *et al.*, 2000) específico para organismos anammox dos grupos *Candidatus Brocardia* e *Candidatus Kuenenia*. As condições de amplificação foram desnaturação inicial a 94°C por 5min, seguidos por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45s, anelamento a 62°C por 60s, extensão a 72°C por 60s, seguida por uma fase de extensão final a 72°C por 7min (Termociclador PTC-100, MJ Research, Inc). O volume das reações em cada microtubo foi de 50 µl contendo Tampão 1X, MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,8 mM, Taq Dna Polimerase 1U (Invitrogen), os iniciadores 0,5 µM cada e 10 µl de DNA (5 ηg). A avaliação dos fragmentos amplificados ocorreu pela análise do gel de eletroforese 1% corado com brometo de etídeo.

RESULTADOS

Dentre as características físico-químicas dos lodos as concentrações de amônia e carbono podem interferir no sucesso do enriquecimento por meio da inibição do processo anammox (Jin *et al.*, 2012). Espera-se mais sucesso em enriquecimento de inóculos que apresentam menores concentrações de carbono, e menor relação C/N (Wang *et al.*, 2011; Li-dong *et al.*, 2012).

O inóculo coletado no sistema de tratamento de águas residuárias de abatedouros de bovinos apresentou elevadas concentrações de nitrogênio e de carbono (Tabela 1). Essas elevadas concentrações são decorrentes do tipo de água residuária tratada com presença de sangue, gorduras, estrume oriundos do abate e do processamento das carnes dos animais abatidos. O sedimento coletado no Lago Paranoá, como esperado, apresentou concentrações de nitrogênio e carbono bem menores do que a do sistema de tratamento de águas residuárias de frigorífico (Tabela 1). O pH dos inóculos também variou de acordo com os habitats de coleta, sendo mais ácido (pH 5,73) no sedimento do lago Paranoá.

Tabela 1: Inóculos usados nos experimento em batelada para enriquecimento de organismos anammox.

Características	Inóculo 1	Inóculo 2
Código	SFLPARB	SFLANF3
Origem	Sedimento fundo do lago Paranoá / Brasília	Lagoa anaeróbia tratando efluente de abatedouro de bovinos
Metabolismo	Anaeróbio	Anaeróbio
Etapa/tipo de Tratamento	-	Início/Biológico
pH	5,73	6,63
Temperatura (°C)	-	28,0
DQO (mg/L)	64	300,5
NTK (mg/L)	6,4	236,3
NH₃ (mg/L)	5,1	173,3
NO₂ (mg/L)	24,0	100,0
NO₃ (mg/L)	107,8	181,5
N Total (mg/L)*	138,2	517,8

* N total = [NTK+ NO₂ + NO₃]

Usando-se a combinação de primers Pla 46F e Amx 820R, específicos para amplificação dos genes que codificam o RNAr 16S de organismos relacionados aos gêneros *Candidatus Brocardia* e *C. Kuenenia*, nas condições testadas por Araújo *et al.* (2010), foi possível obter amplicons de aproximadamente 774 pb nos

inóculos antes do enriquecimento (Figura 2A). A amplificação de fragmentos de DNA relacionados às bactérias anammox nem sempre é conseguida quando o DNA é extraído de amostras onde as condições não favoreciam o desenvolvimento desses micro-organismos. Araújo *et al.* (2010) também obtiveram bandas usando primers para amplificação anammox a partir de inóculo coletado em sistema convencional de lodos ativados da estação de tratamento de Belo Horizonte, MG, antes do experimento para enriquecimento. De forma contrária, Sánchez-Melsiò *et al.* (2009) não conseguiram amplificar fragmentos de DNA anammox antes do enriquecimento em 13 lodos usados como inóculos.

Após 120 dias do início dos experimentos com cultura em bateladas foi confirmada a amplificação de fragmentos de DNA relacionados às bactérias anammox nos dois sistemas com inóculos da SFLPARB e SFLANF3, mesmo com o sinal da banda para o inóculo proveniente do sistema inoculado com SFLANF3 ter sido menos expressivo (Figura 2B). Destaca-se que a análise de PCR é apenas qualitativa. Por meio do resultado da análise de PCR antes e após o enriquecimento verifica-se a permanência do grupo de micro-organismos anammox nos dois sistemas.

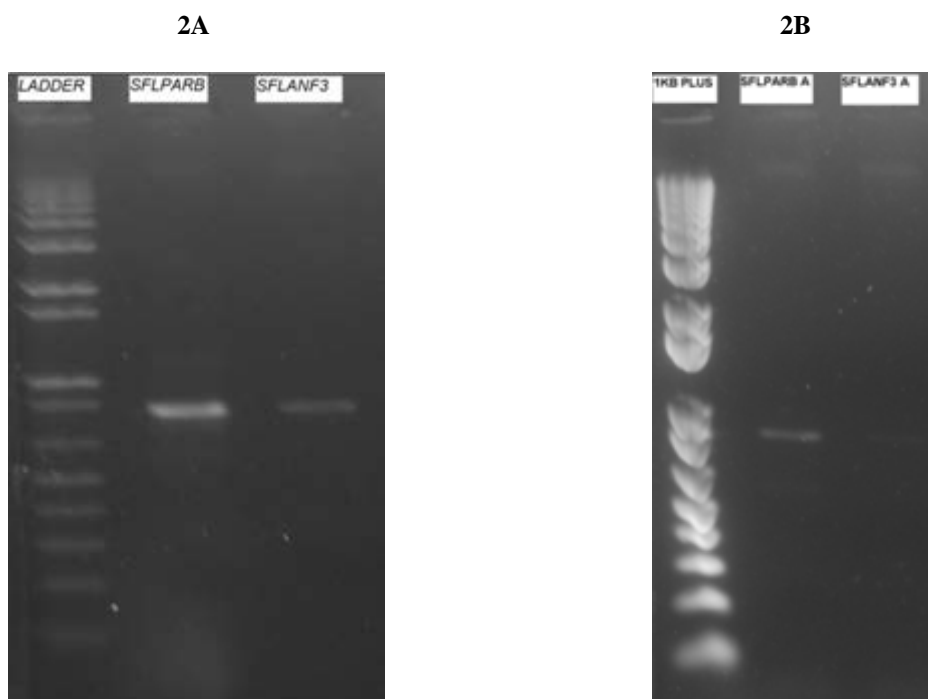


Figura 2: Fragmentos Amplificados de aproximadamente 774 pb, a partir dos inóculos testados nos experimentos em bateladas para enriquecimento anammox, com os pares de primers Pla 46F e Amx 820R. ANTES (2A) E APÓS (2B) o enriquecimento.

As curvas de conversão de amônia e nitrito e formação de nitrato para os dois sistemas com inóculos provenientes do sedimento do lago Paranoá (SFLPAR A) e do lodo de lagoa anaeróbia tratando efluente de frigorífico (SFLANF3 A) são apresentados nas Figuras 03 e 04, respectivamente. Foram apresentados os resultados de uma das réplicas para cada sistema utilizado dado a semelhança entre elas.

Como esperado, os sistemas inoculados com lodo provenientes do lago Paranoá (SFLPARB) apresentaram comportamento de conversão dos compostos nitrogenados diferenciado das culturas com inóculos proveniente da lagoa anaeróbia tratando efluente de frigorífico (SFLANF3) (Figura 3). As características microbiológicas dos lodos e as baixas de concentrações de carbono e da relação C/N do lodo SFLPARB, quando comparadas ao inóculo SFLANF3, podem ter contribuído para os diferentes comportamentos entres esses sistemas.

Para o sistema inoculado com lodo proveniente do lago Paranoá (SFLPARB) observou-se redução nas concentrações de amônia e nitrito e aumento nas concentrações de nitrato, desde o início dos experimentos. Dessa forma, logo após as primeiras bateladas (aos 40 dias) o nitrato deixou de ser inserido nas culturas com inóculos SFLPARB. A formação de nitrato foi superior ao esperado pela estequiometria da reação anammox, com formação média de 0,40 mmol (s= 0,19 mmol).

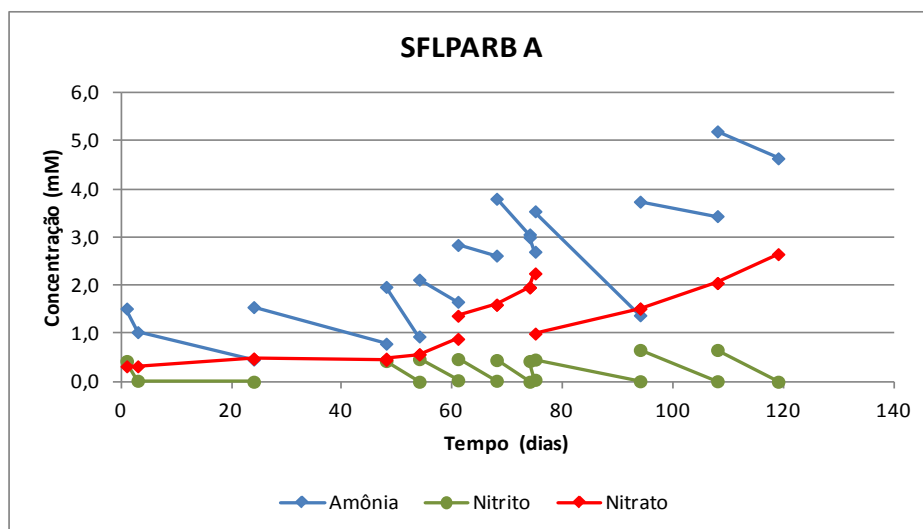


Figura 03: Desempenho das culturas em bateladas com inóculo oriundo do lago Paranoá, Brasília/DF (SFLPARB A).

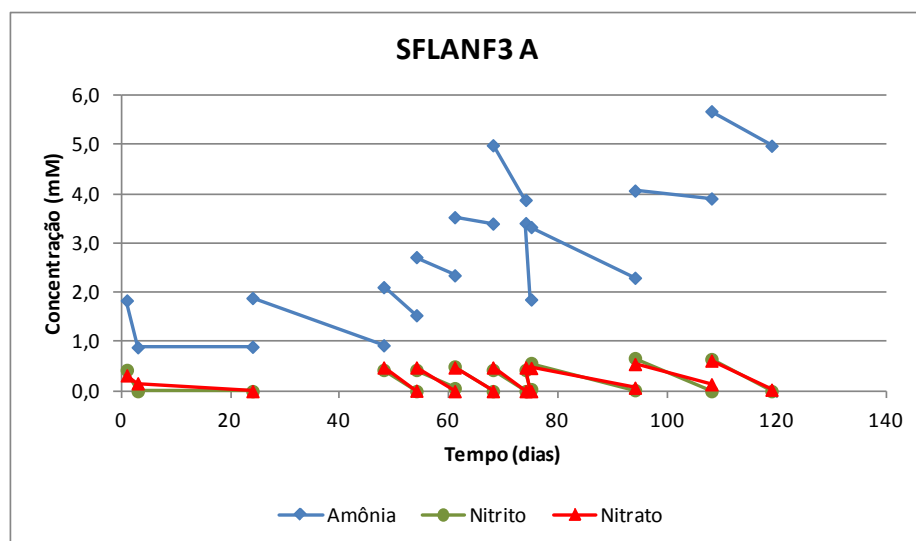


Figura 04: Desempenho das culturas em bateladas com inóculo oriundo da lagoa anaeróbia do Frigorífico 3, Araguari/MG (SFLANF3 A).

Dessa forma, a nitratação ocorreu concomitantemente ao processo anammox nas culturas com inóculo proveniente do SFLPARB. Ainda que tenha sido removido o oxigênio dissolvido do meio de cultivo, o movimento de agitação deve ter promovido uma pequena oxigenação no meio favorecendo as bactérias oxidantes de nitrito e assim um maior acúmulo de nitrato.

Nos sistemas inoculados com lodo proveniente da lagoa anaeróbia (SFLANF3) foi observada principalmente a desnitrificação heterotrófica, visto que todo nitrato inserido nos sistemas foi removido sem significativa conversão de amônia (Figura 4). No entanto, é provável a ocorrência concomitante do processo anammox nesses sistemas, uma vez que houve redução nas concentrações de amônia de forma estequiométrica com o nitrito adicionado, em condições anaeróbias, ao longo do tempo monitorado.

Vários autores relataram o processo de desnitrificação heterotrófica predominando inicialmente nos sistemas para enriquecimento anammox devido à atmosfera anaeróbia e à presença de carbono e das formas oxidadas

de nitrogênio necessárias para o metabolismo das bactérias desnitrificantes (Sánchez-Melsió *et al.*, 2009; Araújo *et al.* 2010; Wang *et al.* 2011; Suneethi & Joseph. 2011).

Araújo *et al.* (2010) usando inóculo a partir de sistema de lodos ativados registrou que a atividade desnitrificante foi exclusiva durante os primeiros 25 dias e concomitante ao processo anammox até 87º dia, predominando então o processo anammox. Wang *et al.* (2011) usaram 3 fontes de inóculos para enriquecimento anammox em RBS e obtiveram sucesso apenas com o inóculo proveniente de um bioreator de membranas tratando água residuária sintética, com baixa relação C/N. Nos primeiros 19 dias apenas atividade desnitrificante foi registrada e permaneceu de forma menos acentuada até o dia 59º. O processo anammox ficou estável e predominante a partir do 60º dia. No trabalho desenvolvido por Sánchez-Melsió *et al.* (2009) apenas um inóculo, de 13 testados, demonstrou potencial atividade anammox em 3 meses. A atividade desnitrificante foi o único processo observado em todos os demais sistemas até um ano de acompanhamento. Suneethi & Joseph (2011), usando lodo anaeróbio proveniente de biodigestor tratando resíduos de indústria de processamento de vegetais, registraram atividade anammox somente após 70 dias de cultivo, sendo que a estabilização do processo só foi verificada a partir de 140 dias.

O acompanhamento dos inóculos por um período maior de tempo poderá resultar na promoção da atividade anammox em detrimento dos demais processos biológicos, uma vez que genes relacionados ao RNAr 16S das bactérias anammox estiveram presentes nas amostras analisadas.

CONCLUSÕES

Com base no trabalho realizado, concluiu-se que:

Os inóculos diferiram com relação às concentrações de nitrogênio total e carbono (DQO) influenciando no comportamento dos sistemas na conversão de amônia e nitrito.

Os processos biológicos predominantes durante o período experimental (120 dias) foram:

- Culturas em bateladas com inóculo do SFLPARB: nitratação e anammox.
- Culturas em bateladas com inóculo do SFLANF3: anammox e desnitrificação heterotrófica

Os dois inóculos testados apresentaram ampliações de fragmentos de DNA relacionados às bactérias anammox antes e após o enriquecimento para atividade anammox.

Não foi possível definir, dentro do período de estudo, qual inóculo é mais propício para uso em sistemas visando a atividade anammox.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Secretaria de Educação Profissional e Tecnológica pela bolsa de doutorado (Programa PIQDTEC - Edital 02/2008). Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento - CNPq (Edital MCT/CNPq Nº 014/2010 - Universal) e ao Decanato de Pesquisa e Pós-graduação da Universidade de Brasília (Edital DPP 09/2011), pelo apoio financeiro. A professora Dra Cynthia Kyaw, do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, pela colaboração na realização das análises de biologia molecular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APHA, 2005. Standard Methods for the examination of water and of wastewater. By Eaton, A.D.; Clesceri, L.S.; Rice, E.W.; Greenberg, A.E.; Frason, M.A.H. (eds). American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environmental Federation. 21th ed. USA.
2. Araújo, J. C.; Campos, A. P.; Correa, M. M. S.; Silva, E. C., Von Sperling, M.; Chernicharo, C. A. L. Enriquecimento de bactérias anaeróbias oxidadoras de amônia – Anammox. Engenharia Sanitária e Ambiental, 15 (2): 205-212. 2010.
3. Dapena-Mora, A.; Campos, J. L.; Mosquera-Corral, A.; Jetten, M. S. M.; Méndez, R. Stability of the Anammox process in a gas-lift reactor and a SBR. Journal of Biotechnology 110: 159-170. 2004.
4. Jetten, M.; Strous, M. van de Pas-Schoonen, K.; Schalk, J.; van de Graaf, A. A.; Logemann, S.; Muyzer, G.; van Loosdrecht, M. C. C.; Kuenen, J. G. The anaerobic oxidation of ammonium. FEMS Microbiol. Rev. 22: 421-437. 1999.

5. Jin, Ren-Cun; Yang, Guang-Feng; Yu, Jin-Jin, Zheng, Ping. The inhibition of the Anammox process: A review. *Chemical Engineering Journal* 197: 67-79. 2012.
6. Kuai, L.; Verstraete, W. Ammonium removal by the oxygen-limited autotrophic nitrification-denitrification system. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (11): 4500-4506. 1998.
7. Kuenen, Gijs, J. Anammox bacteria: from discovery to application. *Nature* 6: 320-326. 2008.
8. Li-dong, Shen; An-hui, Hu; Ren-cun, Jin; Dong-qing, Cheng, Ping, Zheng; Xiang-yang, Xu; Bao-lan, Hu. Enrichment of bacteria from three sludge sources for the startup of monosodium glutamate industrial wastewater treatment system. *Journal of Hazardous Material* 199-200: 193-199. 2012.
9. Martins, T. H. Enriquecimento de consórcios microbianos em quimiostato sob condições anammox. São Carlos, Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo. 2007. 58p.
10. Mulder, A.; van de Graaf, A. A.; Robertson, L. A.; Kuenen, J. G. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiology Ecology* 16: 177-184. 1995.
11. Neef, A.; Amann, R.; Schlesner, H.; Schleifer, K-H. Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of planctomycetes with 16S rRNA targeted probes. *Microbiology*, 144: 3257-3266. 1998
12. Sánchez-Melsió, A.; Cáliz, 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.
13. Schmid, Markus; Twachtmann, Ulf; Klein, Michael; Strous, Marc; Juretschko, Stefan; Jetten, Mike; Metzger, Jörg W.; Schleifer, Karl-Heinz; Wagner, Michael. Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation. *Systematic and Applied Microbiology* 23 (1): 93-106. 2000.
14. Schierholt Neto, G. F. Desenvolvimento de uma flora de micro-organismos oxidadores anaeróbios de amônia utilizando inóculos provenientes de dejetos suíno. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 99p. 2007.
15. Strou, 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.
16. Suneethi, S.; Joseph, K. Batch culture enrichment of ANAMMOX populations from anaerobic and aerobic seed cultures. *Bioresource Technology*, 102: 585-591. 2011.
17. Terada, A.; Zhou, S.; Hosomi, M. Presence and detection of anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria and appraisal of anammox process for high-strength nitrogenous wastewater treatment: a review. *Clean Techn Environ Policy*. Publicação online: 26 fevereiro de 2011.
18. 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.
19. van de Graaf, A.A.; De Bruijin, P.; Robertson, L.A.; Jetten, M.S.M.; Kuenen, J.G. Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in fluidized bed reactor. *Microbiology* 142: 2187-2196. 1996.
20. Vives, M. T.; Gonzáles, E.; López, H.; Ganigué, R.; Ruscalleda, M.; Balaguer, M.D.; Colprim, J.; Jiménez; Elorduy, M. Clonic: Closing the nitrogen cycle from landfill leachates. A biological process with partial nitrification and anammox followed by thermal dry treatment. *Proceedings Sardinia 2007, Eleventh International Waste Management and Landfill Symposium*. 2007.
21. Tao, Yu; Gao, Da-Wen; Wang, Hao-Yu; Kreuk, M.; Ren, Nan-Qi. Ecological characteristics of seeding sludge triggering a prompt start-up of anammox. *Bioresource Technology* 133: 475-481. 2013.
22. Wang, T.; Zhang, H.; Gao, D.; Yang, F.; Yang, S.; Jiang, T.; Zhang, G. Enrichment of anammox bacteria in seed sludges from different wastewater treating processes and start-up of Anammox process. *Desalination* 271: 193-198. 2011.