

II-186 – COMPARAÇÃO DE MÉTODOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS OXIDADORAS DE AMÔNIA E NITRITO PRESENTES EM SISTEMAS DE LODOS ATIVADOS

Ana Paula Campos⁽¹⁾

Bióloga pela UFMG. Mestre em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos (SMARH) pela UFMG.

Eduardo Carvalho Silva⁽¹⁾

Biólogo pela UFMG. Bolsista AT do CNPq no projeto FINEP, desenvolvido no DESA/UFMG.

Renata Cortês⁽¹⁾

Estudante de Biologia da PUC-Betim. Bolsista IC do CNPq no projeto FINEP, desenvolvido no DESA/UFMG.

Juliana Calábria de Araújo⁽¹⁾

Bióloga pela UFRJ. Doutora em Hidráulica e Saneamento pela EESC/USP. Professora Associada do DESA/UFMG.

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: campos1984@hotmail.com

RESUMO

A remoção de nitrogênio amoniacal é um aspecto importante do tratamento de águas residuárias, e geralmente é realizado por bactérias nitrificantes, tendo como principais representantes os gêneros *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* que oxidam, respectivamente, o íon amônio a nitrito e posteriormente, o nitrito a nitrato. A quantificação desses grupos é de extrema importância para o monitoramento de sistemas biológicos de tratamento projetados para promover a nitrificação. Neste trabalho bactérias nitrificantes presentes em amostras de lodos ativados foram quantificadas por meio de dois métodos diferentes: a técnica dependente de cultivo-Tubos múltiplos (NMP) e a técnica de biologia molecular-hibridação *in situ* fluorescente (FISH). Os resultados de ambas as técnicas foram comparados e analisados estatisticamente, evidenciando as vantagens e desvantagens de cada uma. Os resultados sugerem que há uma tendência de se obter valores diferentes (maiores ou menores) para bactérias oxidadoras de amônia (*Nitrosomonas*) pela técnica do NMP em comparação com FISH. Não obstante, a análise estatística desses dados revelou que, a diferença de quantificação encontrada entre as técnicas não foi estatisticamente significativa (à um nível de significância de 5%), indicando que ambas podem ser usadas para a quantificação das oxidadoras de amônia. Para as oxidadoras de nitrito não foi possível realizar esta comparação, uma vez que os gêneros que estavam sendo determinados em cada uma das técnicas eram diferentes (provavelmente *Nitrobacter* no NMP, e no FISH *Nitrospira*). Sendo assim, as técnicas de NMP e FISH se mostraram métodos relativamente simples, práticos e adequados para quantificação de microrganismos nitrificantes em amostras provenientes de sistemas de tratamento de águas residuárias, com vantagens e limitações inerentes a cada técnica. A escolha da técnica dependerá, portanto, dos equipamentos e recursos disponíveis em cada laboratório, bem como do nível de informação que se deseja obter, uma vez que com o FISH pode-se quantificar os diferentes gêneros de oxidadoras de amônia e nitrito e pelo NMP a quantificação é geral, não tendo a indicação de qual gênero está presente.

PALAVRAS-CHAVE: Bactérias oxidadoras de amônia, bactérias oxidadoras de nitrito, NMP, FISH e Lodos Ativados.

INTRODUÇÃO

A amônia é um composto importante, e às vezes pode ser tóxico ao ambiente, presente em diversos efluentes industriais e domésticos. No esgoto doméstico a concentração de nitrogênio amoniacal está em torno de 35 mg N-NH₄⁺. L⁻¹, que é extremamente baixa quando comparada com outros efluentes ricos em nitrogênio, tais como efluentes de indústria frigorífica (170 mg N-NH₄⁺. L⁻¹, REGINATTO *et al.*, 2005), ou efluentes de coqueria

(300 mg N-NH₄⁺ · L⁻¹mg). A remoção de nitrogênio é um aspecto importante do tratamento de águas residuárias, e geralmente é realizado por processos microbiológicos tais como nitrificação e desnitrificação. As bactérias nitrificantes, tendo como principais representantes aquelas pertencentes aos gêneros *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* são responsáveis, respectivamente, pela oxidação do íon amônio (NH₄⁺) a nitrito (NO₂⁻) e posteriormente, oxidação do nitrito a nitrato (NO₃⁻). Tendo em vista a importância ambiental destes microrganismos, torna-se relevante a quantificação dos mesmos, inclusive para monitorar sistemas biológicos de tratamento desenvolvidos para promover a nitrificação.

Tradicionalmente, as bactérias nitrificantes vêm sendo quantificadas através do método convencional dependente de cultivo (Tubos múltiplos ou técnica do Número Mais Provável - NMP), apesar da possibilidade desse método subestimar essa população devido às características dessas bactérias de formarem aglomerados, e/ou da diferença de cultivo entre as diferentes espécies de oxidadoras de amônia. O método do NMP permite estimar a densidade da população microbiana sem contagem individual das células ou colônias. Microbiologistas frequentemente estimam o tamanho das populações com base na maior diluição na qual o crescimento pode ser obtido. Então, se o crescimento foi observado na diluição 10⁻⁴, mas não na 10⁻⁵, o número de células viáveis é estimado estar entre 10⁴ e 10⁵. O teste de várias alíquotas de uma série de diluições sucessivas, junto com cálculos estatísticos e interpolações, fornece estimativas muito mais precisas (ALEXANDER, 1982 *apud* KIELING, 2004). Além disso, este método detecta e estima diferentes grupos de microrganismos nas amostras. Pressupõe-se que na incubação de cada tubo, que recebeu o inóculo, os microrganismos irão apresentar crescimento acarretando mudanças características no meio de cultura. Como ocorrem resultados negativos em alguns dos tubos, o NMP do microrganismo na amostra analisada pode ser estimado a partir do número e da distribuição de tubos que apresentaram reação positiva.

A técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) é um método direto para contagem de células, que consiste na utilização de sondas de oligonucleotídeos marcadas com corante fluorescente e complementares a uma determinada região do RNAr 16S. Cada célula ativa contém entre 10³ e 10⁵ ribossomos e parte desses, são os RNAs ribossomais. Algumas regiões dos RNAs ribossomais estão acessíveis para a hibridação, indicando que é possível ligar a sonda, complementar à uma certa região do RNAr 16S. Dependendo das sondas utilizadas, o FISH pode ser usado para detectar microrganismos de diferentes níveis filogenéticos (diferentes grupos funcionais e diferentes gêneros). Para a hibridação *in situ* fluorescente, o alvo das sondas marcadas é o RNAr 16S ou 23S. Dessa forma a intensidade do sinal obtido pela hibridação, com sondas que se ligam ao RNAr, é dependente da atividade metabólica da célula no momento da fixação, e portanto, da taxa de crescimento da célula.

Assim sendo, a análise *in situ* de populações bacterianas pela técnica de FISH é mais apropriada para a análise de bactérias fisiologicamente ativas, ou seja, aquelas encontradas em ambientes ricos em nutrientes (como sistemas de tratamento de águas residuárias, por exemplo), quando comparado com aquelas que crescem em ambientes pobres em nutrientes (como solo). Devido à grande especificidade da interação da sonda com o RNAr alvo, o limite de detecção da técnica é de 10³ a 10⁴ células por ml (AMANN *et al.*, 1995). O FISH vem sendo amplamente empregado para a quantificação de bactérias nitrificantes, tanto oxidadoras de amônia quanto de nitrito em diferentes sistemas de tratamento.

O objetivo deste trabalho foi o de quantificar bactérias nitrificantes presentes em amostras de lodo aeróbio (oriundo de um sistema de lodos ativados), por meio das técnicas de tubos múltiplos (NMP) e FISH. Os resultados foram comparados e analisados estatisticamente, evidenciando as vantagens e desvantagens de cada uma das técnicas para aplicação na área de saneamento.

MATERIAIS E MÉTODOS

Com o objetivo de se comparar técnicas distintas de quantificação de bactérias nitrificantes, presentes em sistemas de tratamento de águas residuárias, foram realizadas 15 coletas de amostras de lodo, provenientes do tanque de aeração do sistema de Lodos Ativados da ETE ARRUDAS - COPASA que trata esgoto doméstico da cidade de Belo Horizonte – MG. Posteriormente, essas amostras foram submetidas às técnicas do Número Mais Provável (NMP) e hibridação *in situ* fluorescente (FISH). Cerca de 2 litros de amostra de lodo foram coletadas em frascos de plástico hermeticamente fechados. As coletas foram realizadas em diferentes épocas no período de abril de 2008 a dezembro de 2009.

TUBOS MÚLTIPLOS OU NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP)

Neste trabalho foi adotado o método proposto por Alexander & Clark (1982) para análise de solos, o qual foi adaptado para análise de lodos, de acordo com Kieling (2004). Uma alíquota de 100,0 ml da amostra de lodo aeróbio foi macerada em frasco contendo 50,0 g de pérolas de vidro, sob agitação manual por 20 minutos e diluída em água de diluição (K_2HPO_4 0,2M, KH_2PO_4 0,2M), por meio de diluição seriada.

Para quantificação das bactérias oxidadoras de amônia e das oxidadoras de nitrito, foram utilizados os meios de cultura amônia-carbonato e nitrito-carbonato, respectivamente. Foram feitas quintuplicatas de cada diluição. Após três semanas de incubação à 28°C foi feita a leitura dos tubos utilizando o reagente de Griess-Ilosvay e o Reagente de Nitrato. De acordo com o número de tubos que apresentaram resultados positivos nas cinco repetições de cada diluição consultou-se a tabela de Número Mais Provável (NMP) (Tabela do *Standard Methods*, 2005), encontrando o valor de NMP/ml de amostra inoculada.

HIBRIDAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

Para a preparação das amostras e posterior hibridação foi seguido o protocolo de Amann *et al.* (1995). Cerca de 2,0 ml de amostra do lodo ativado foi fixada em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio (PBS 130mM NaCl, 7mM Na_2HPO_4 , 3mM NaH_2PO_4 ; pH 7.2) e posteriormente hibridada com as sondas descritas na tabela 1, na qual é apresentada ainda a concentração de formamida e de solução de NaCl utilizada para cada uma delas e sua respectiva especificidade.

Após a hibridação as amostras foram coradas com solução de DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) a 10µg/ml, e observadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX-50) equipado com câmera colorida refrigerada (QcolorR5C). Após a contagem, foi feita uma estimativa do número total de células por ml de amostra e ainda do número de células hibridadas por ml.

Tabela 1: Sondas de oligonucleotídeos utilizadas no FISH.

Sonda	Especificidade	Sequência 5' → 3'	%FA ^a	NaCl (mM) ^b	Referência
Nso 190	A maioria das oxidadoras de amônia, da subclasse β <i>Proteobacteria</i> , incluindo <i>Nitrosomonas</i>	CGATCCCCTGCTTTTCTCC	30	112	Mobarry <i>et al.</i> (1996)
NIT 3	<i>Nitrobacter spp.</i>	CCTGTGCTCCATGCTCCG	40	56	Wagner <i>et al.</i> (1996)
Ntspa662	Gênero <i>Nitrospira</i>	GGAATTCCGCGCTCCTCT	35	80	Daims <i>et al.</i> (2000)

^a: concentração de formamida usada no tampão de hibridação.

^b: concentração de NaCl usada no tampão de lavagem.

ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Na comparação do número de bactérias nitrificantes nas amostras, determinadas por Tubos múltiplos (NMP) e FISH, foi aplicado o “teste T de Wilcoxon” para amostras pareadas, que é um equivalente do “teste t de Student” para dados com distribuição não-normal. Como tais contagens foram preparadas a partir de uma mesma amostra de lodos ativados a suposição do pareamento se aplica, apesar das metodologias serem distintas. A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o software STATISTICA 6.1 (StatSoft, Inc., 2003). Nesta análise foi adotado um nível de significância (α) igual a 5%.

RESULTADOS

A comparação dos resultados da quantificação de bactérias oxidadoras de amônia e de nitrito em 15 amostras de lodo aeróbio, obtidos através das técnicas de Tubos Múltiplos e FISH, é apresentada na Tabela 2 e na Figura 1. Pode-se verificar que com a técnica de FISH foi encontrado um número maior de bactérias *Nitrosomonas*

por ml de lodo (da ordem de 10^1 a 10^2 células a mais por ml) em seis das 15 amostras analisadas, quando comparado com o valor encontrado pela técnica de Tubos Múltiplos.

Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Konuma *et al.* (2001) e Schmidt *et al.* (2002). Neste último trabalho, os autores verificaram pelo FISH um número maior de bactérias *Nitrosomonas* por ml de lodo (da ordem de 10^1 a 10^2), quando comparado com os valores encontrados pelo NMP, o que poderia indicar que a técnica dos Tubos Múltiplos subestima a quantidade de bactérias na amostra. Além disso, o trabalho de Schmidt *et al.* (2002) mostrou que bactérias *Nitrosomonas* quantificadas pelo NMP, tendo resultados da ordem de 10^2 e 10^3 células/ml, não foram detectadas pelo FISH, o que também ocorreu no presente trabalho com as bactérias do gênero *Nitrobacter* em 14 amostras analisadas (Tabela 2).

Não obstante, na amostra LA07 a determinação de oxidadoras de amônia (preferencialmente *Nitrosomonas*) tanto pela técnica de Tubos múltiplos (NMP) quanto por FISH apresentou resultado na mesma ordem de grandeza. Já o grupo de amostras de LA08 a LA15 apresentaram valores de bactérias *Nitrosomonas* (determinados por NMP) superiores (cerca de 3 a 8 ordens de grandeza maior) em relação aos valores obtidos pela técnica de FISH (com a sonda Nso190). Sendo assim, foi possível perceber que houve uma tendência de se obter valores maiores para bactérias nitrificantes (do gênero *Nitrosomonas*) pela técnica dos Tubos Múltiplos em comparação com FISH se repetiu em oito amostras de lodos ativados coletadas em diferentes épocas.

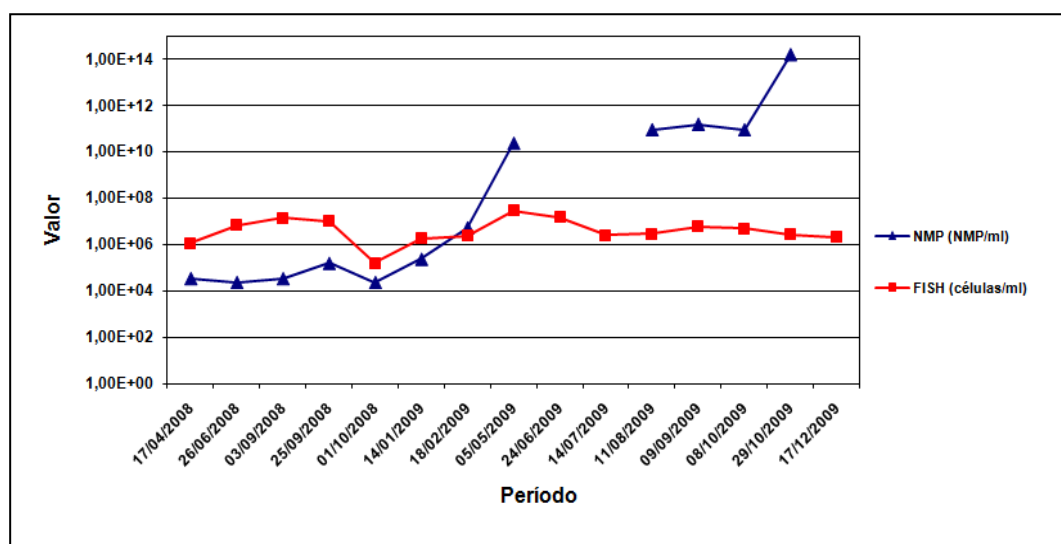


Figura 1: Comparação da quantificação de bactérias oxidadoras de amônia (*Nitrosomonas*) pelas técnicas de NMP e FISH.

Para verificar se a diferença de quantificação encontrada (entre as técnicas) era estatisticamente significativa, utilizou-se o “teste T de Wilcoxon” para amostras pareadas. Após a realização do teste, a hipótese H_0 para *Nitrosomonas* não pode ser rejeitada, uma vez que foi encontrado um valor de p maior que 0,05 ($p = 0,272096$). Portanto, para um universo amostral de 12 amostras por grupo, para *Nitrosomonas*, o teste sugeriu, que não houve diferença estatística significativa entre as contagens de bactérias nitrificantes do gênero *Nitrosomonas* realizadas pelos dois métodos (FISH e Tubos múltiplos). Portanto, para a determinação de bactérias oxidadoras de amônia, os métodos de quantificação de FISH e de Tubos Múltiplos são equivalentes estatisticamente à um nível de significância de 5%, tendo como ressalva o fato de que o universo amostral contemplou 12 amostras.

Tabela 2: Comparação dos resultados das técnicas de Tubos Múltiplos (NMP) e FISH para quantificação de bactérias Nitrificantes (oxidadoras de amônia e de nitrato).

Amostra e Data da coleta	NMP <i>Nitrosomonas</i> (NMP/ml)	FISH com Nso 190 (Células/ml) (<i>Nitrosomonas</i>)	NMP <i>Nitrobacter</i> (NMP/ml)	FISH com Nit3 (Células/ml) (<i>Nitrobacter</i>)	FISH com Ntspa 662 (Células/ml) (<i>Nitrospira</i>)
LA01-17/04/08	$3,5 \times 10^4$	$1,21 \times 10^6$ ($\pm 6,96 \times 10^5$)**	$2,4 \times 10^3$	ND	ND
LA02-26/06/08	$2,4 \times 10^4$	$6,93 \times 10^6$ ($\pm 1,16 \times 10^6$)	$2,2 \times 10^3$	ND	ND
LA03-03/09/08	$3,5 \times 10^4$	$1,45 \times 10^7$ ($\pm 6,46 \times 10^6$)	$2,8 \times 10^4$	ND	ND
LA04-25/09/08	$1,6 \times 10^5$	$1,04 \times 10^7$ ($\pm 2,01 \times 10^6$)	$3,5 \times 10^4$	ND	ND
LA05-01/10/08	$2,4 \times 10^4$	$6,80 \times 10^6$ ($\pm 1,11 \times 10^6$)	$1,6 \times 10^5$	ND	ND
LA06-14/01/09	$2,4 \times 10^5$	$1,88 \times 10^6$ ($\pm 3,23 \times 10^5$)	$9,2 \times 10^4$	ND	ND
LA07-18/02/09	$5,4 \times 10^6$	$2,51 \times 10^6$ ($\pm 5,32 \times 10^5$)	$>1,6 \times 10^7$	$4,59 \times 10^6$ ($\pm 3,20 \times 10^6$)	$1,50 \times 10^7$ ($\pm 3,51 \times 10^6$)
LA08-05/05/09	$2,4 \times 10^{10}$	$2,97 \times 10^7$ ($\pm 5,67 \times 10^6$)	$2,8 \times 10^7$	ND	$2,70 \times 10^7$ ($\pm 1,28 \times 10^6$)
LA09-24/06/09	$>1,6 \times 10^{11}$	$1,51 \times 10^7$ ($\pm 8,44 \times 10^6$)	$1,6 \times 10^{11}$	ND	$3,48 \times 10^7$ ($\pm 3,63 \times 10^6$)
LA10-14/07/09	$>1,6 \times 10^{10}$	$2,55 \times 10^6$ ($\pm 8,43 \times 10^6$)	$1,7 \times 10^9$	ND	$3,22 \times 10^7$ ($\pm 4,35 \times 10^6$)
LA11-11/08/09	$9,2 \times 10^{10}$	$2,98 \times 10^6$ ($\pm 5,16 \times 10^6$)	$4,0 \times 10^8$	ND	$4,43 \times 10^7$ ($\pm 5,64 \times 10^6$)
LA12-09/09/09	$1,6 \times 10^{11}$	$6,20 \times 10^6$ ($\pm 1,87 \times 10^6$)	$3,5 \times 10^9$	ND	$3,16 \times 10^7$ ($\pm 3,23 \times 10^6$)
LA13-08/10/09	$9,2 \times 10^{10}$	$5,12 \times 10^6$ ($\pm 1,40 \times 10^6$)	$1,2 \times 10^7$	ND	$1,60 \times 10^7$ ($\pm 1,45 \times 10^6$)
LA14-29/10/09	$1,6 \times 10^{14}$	$2,71 \times 10^6$ ($\pm 4,02 \times 10^5$)	$2,4 \times 10^{13}$	ND	$3,03 \times 10^7$ ($\pm 9,01 \times 10^5$)
LA15-17/12/10	$>1,6 \times 10^{13}$	$2,21 \times 10^6$ ($\pm 1,16 \times 10^6$)	$1,6 \times 10^8$	ND	$2,32 \times 10^7$ ($\pm 3,51 \times 10^6$)

LA - Lodos Ativados

ND - não detectado, nenhuma célula apresentou sinal com estas sondas. Esse resultado significa que estes gêneros podem estar ausentes, ou presentes, mas abaixo do limite de detecção da técnica (10^3 a 10^4 células / ml).

**Os valores entre parênteses representam o desvio-padrão de três contagens diferentes.

É importante ressaltar ainda, que devido ao fato das contagens das amostras LA09, LA10 e LA15 terem ultrapassado o limite máximo da tabela do Número Mais Provável (NMP) esses resultados não foram plotados na figura 1, mas apresentados na tabela 2. A figura 2, por sua vez, apresenta um exemplo de resultado positivo obtido da hibridação com a sonda Nso190, específica para a maioria das oxidadoras de amônia, da subclasse β *Proteobacteria*, incluindo *Nitrosomonas*.

Por meio da técnica de FISH, foi possível verificar também que as 15 amostras apresentaram número total de células por ml bastante próximo (resultado não mostrado), o que é um indício de que os valores obtidos são confiáveis uma vez que as quinze amostras foram oriundas do mesmo reator, porém de períodos diferentes. Entretanto, o número de células hibridadas (com a sonda Nso190) variou consideravelmente, de 0,05 a 1,55 %. Esta diferença pode ser decorrente da variação da atividade nitrificante no reator (em diferentes períodos). O sistema de lodos ativados da ETE ARRUDAS - COPASA não foi projetado, originalmente, para nitrificar, mas alguma nitrificação ocorre nesse sistema. Em reator com atividade nitrificante intensa, Jurestchko *et al.* (1998) verificaram através do FISH que as bactérias oxidadoras de amônia compreendiam de 10 a 20% do total de células.

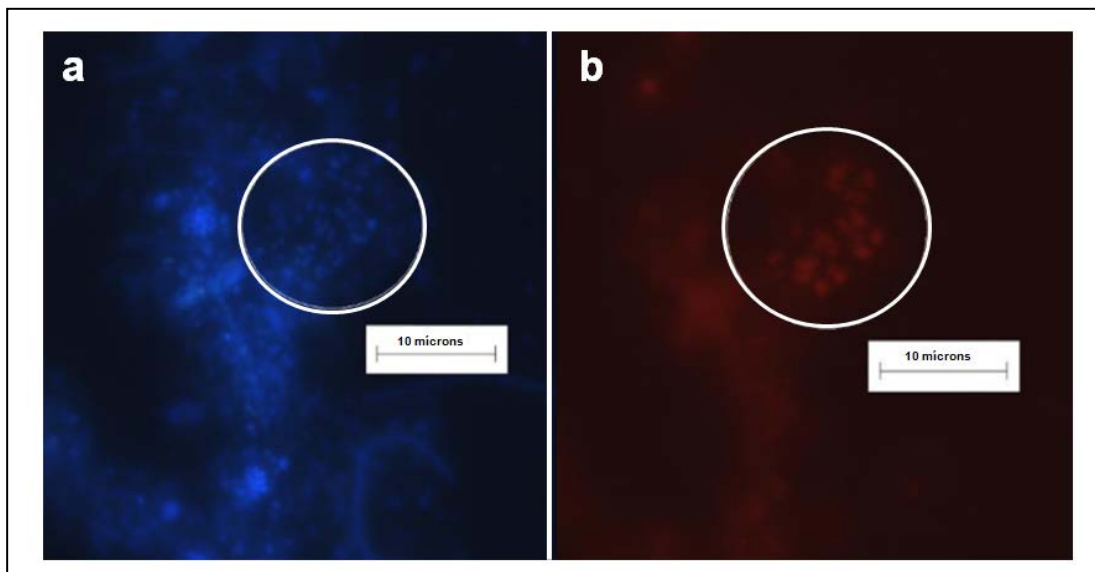


Figura 2: Análise de FISH das bactérias oxidadoras de amônia. Células coradas com DAPI (a) e células hibridadas com a sonda Nso190 (específica para a maioria das oxidadoras de amônia, *Nitrosomonas*)(b).

Com relação às bactérias oxidadoras de nitrito, não foi possível realizar a comparação entre as duas técnicas, pois verificou-se que estavam sendo quantificados grupos (gêneros) diferentes de bactérias oxidadoras de nitrito em cada uma delas. A técnica do NMP quantifica aquelas oxidadoras de nitrito capazes de crescer no meio de cultura utilizado, geralmente *Nitrobacter* é o gênero predominante neste meio e, portanto, é o mais conhecido. Pela Tabela 2, pode-se verificar que com a sonda específica para *Nitrobacter* este gênero foi detectado pela técnica de FISH somente na amostra LA07, indicando ausência destas células ou presença abaixo do limite de detecção da técnica nas 14 amostras restantes. A figura 3 apresenta o único resultado positivo obtido da hibridação com a sonda NIT3, específica para *Nitrobacter*. Posteriormente, quando foi aplicada a sonda específica para *Nitrospira* (Ntspa662), verificou-se a presença dessas células em 9 das 15 amostras de lodo analisadas (Tabela 2). Esses resultados indicam, portanto, que foram determinados diferentes gêneros de bactérias oxidadoras de nitrito nas amostras por cada uma das técnicas e, portanto, a comparação entre as mesmas não se aplica.

Esse resultado é interessante e coerente, e reflete as diferenças inerentes a cada técnica. O NMP está quantificando as oxidadoras de nitrito capazes de crescer no meio de cultura específico (portanto, diferentes gêneros de oxidadoras de nitrito poderiam crescer, dentre eles *Nitrobacter*). Segundo a literatura, como *Nitrospira* cresce muito lentamente comparado à *Nitrobacter*, raramente o primeiro gênero é recuperado a partir das técnicas tradicionais de cultivo. Por outro lado, a técnica de FISH se baseia na contagem direta com as sondas específicas para cada gênero de oxidadoras de nitrito (como *Nitrobacter* e *Nitrospira*), portanto, a soma das porcentagens de hibridação obtidas com cada sonda específica refletiria mais precisamente o número de oxidadoras de nitrito presente numa amostra. Vale ressaltar que no presente trabalho não foram utilizadas as sondas específicas para os outros gêneros de oxidadoras de nitrito (como por exemplo *Nitrospira*).

Não obstante, os resultados obtidos nesse trabalho, para bactérias oxidadoras de nitrito, por meio da técnica de FISH estão de acordo com aqueles obtidos por Jurestchko *et al.* (1998). Os autores verificaram para as oxidadoras de nitrito, em um sistema de lodos ativados tratando esgoto industrial com concentração alta de amônia (5.000 mg/L), que 9% do total de células hibridaram com a sonda para *Nitrospira*, enquanto que células de *Nitrobacter* não foram detectadas (ou estavam presentes abaixo do limite de detecção do FISH), indicando que nesse sistema células do gênero *Nitrospira* foram as responsáveis pela oxidação do nitrito à nitrato. Outros autores (WAGNER *et al.*, 1996) também reportaram baixa atividade *in situ* de *Nitrobacter* em vários sistemas nitrificantes naturais e em sistemas de engenharia. Na realidade tem-se observado que as espécies de *Nitrospira* descritas até o momento crescem muito devagar em cultura pura quando comparado com *Nitrobacter* spp. (JURESTCHKO *et al.*, 1998). Assim, especula-se que a importância de *Nitrobacter* na oxidação de nitrito (no ambiente e em sistemas de engenharia) tenha sido superestimada já que esse foi o gênero mais comumente encontrado. Vários trabalhos usando técnicas moleculares (baseados na extração de DNA e análise de seqüências de DNAr 16S) vêm encontrando predominância de *Nitrospira* em sistemas

nitrificantes. Portanto, não é estranho que em 93% dos casos nas amostras de lodos ativados da ETE ARUDAS - COPASA, analisadas no presente trabalho, não foram detectadas células do gênero *Nitrobacter*, mas sim *Nitrospira*.

É importante salientar que apesar do NMP poder subestimar o número real de bactérias nitrificantes na amostra, esta técnica pode ser realizada em qualquer laboratório de microbiologia, não necessitando de equipamentos e reagentes caros. Já o FISH, apesar de também ser relativamente simples, requer equipamentos mais sofisticados, bem como o custo de cada sonda marcada com composto fluorescente é elevado, o que pode dificultar a realização para muitos laboratórios. Uma provável razão para a diferença entre os números encontrados deve-se ao fato da técnica de NMP ser um método dependente do cultivo, e, portanto, quantificam-se aquelas células que conseguiram crescer ou que se adaptaram ao meio de cultura. Aquelas de difícil cultivo não crescerão. Já o FISH é um método direto, independente do cultivo, e, portanto, fornece uma quantificação mais real das bactérias presentes na amostra. Porém, o limite de detecção desta técnica é de cerca de 10^3 a 10^4 células/ml (AMANN *et al.*, 1995), portanto, populações que estejam abaixo desse valor na amostra podem não ser detectadas.

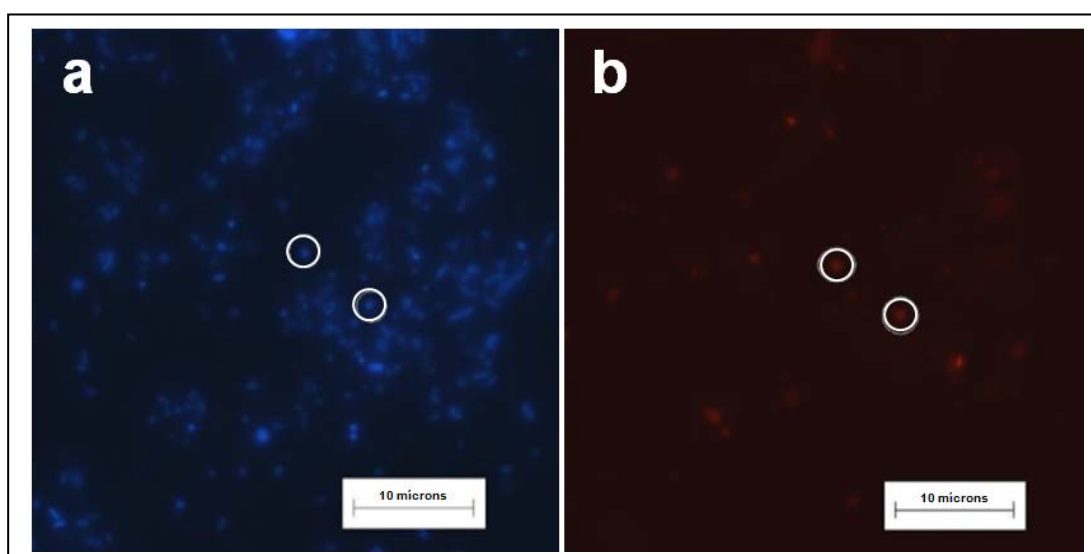


Figura 3: Análise de FISH das bactérias oxidadoras de nitrito. Células coradas com DAPI (a) e células hibridadas com a sonda NIT3 (específica para *Nitrobacter spp.*)(b).

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos sugerem que houve uma tendência de se obter valores diferentes (maiores ou menores) para bactérias oxidadoras de amônia (do gênero *Nitrosomonas*) pela técnica dos Tubos Múltiplos em comparação com FISH. Uma provável razão para a diferença entre os números encontrados deve-se ao fato da técnica de NMP ser um método dependente do cultivo, e, portanto, quantificam-se aquelas células que conseguiram crescer ou que se adaptaram ao meio de cultura, já as de difícil cultivo não crescerão. Já o FISH é um método direto, independente do cultivo, e, portanto, fornece uma quantificação mais próxima da realidade das bactérias presentes na amostra. Porém, o limite de detecção desta técnica é de 10^3 a 10^4 células/ml (AMANN *et al.*, 1995), assim, populações que estejam abaixo desse valor na amostra podem não ser detectadas. Não obstante, a análise estatística desses dados revelou que, a diferença de quantificação encontrada entre as técnicas não foi estatisticamente significativa (à um nível de significância de 5%), indicando que ambas podem ser usadas para a determinação da abundância de bactérias oxidadoras de amônia.

A comparação entre as técnicas para a quantificação de bactérias oxidadoras de nitrito não foi possível de ser realizada, uma vez que os gêneros que estavam sendo determinados em cada uma delas eram diferentes (provavelmente *Nitrobacter* no NMP, e no FISH *Nitrospira*) e, portanto, a comparação entre os métodos não se aplicava. Sendo assim, as técnicas de NMP e FISH se mostraram métodos relativamente simples, práticos e adequados para quantificação de microrganismos nitrificantes em amostras provenientes de sistemas de tratamento de águas residuárias, com vantagens e limitações inerentes a cada técnica. É importante ressaltar

ainda, que o sistema de lodos ativados da ETE ARUDAS - COPASA não foi projetado para nitrificar, porém os resultados encontrados nesse trabalho sugerem que alguma nitrificação ocorre nesse sistema.

Em suma, a escolha da técnica para quantificação das bactérias nitrificantes dependerá, portanto, dos equipamentos e recursos disponíveis em cada laboratório, bem como do nível de informação que se deseja obter, uma vez que com o FISH pode-se quantificar os diferentes gêneros de oxidadoras de amônia e nitrito e pelo NMP a quantificação é geral, não tendo a indicação de qual gênero está presente.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pelo CNPq, FAPEMIG, e FINEP. Os autores agradecem também o apoio da COPASA em fornecer o lodo ativado proveniente da ETE ARUDAS - COPASA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AWWA/APHA/WEF. *Standard Methods for Examination of Water and Waste water*, 21º ed . Washington American Public Health Association. American Water Works Association, Water Pollution Control Federation, Washington, DC, 2005.
2. ALEXANDER, M.; CLARK, F. E.; "Nitrifying bacteria". In C. A. Black (ed.), *Methods of soil analysis*, part 2. Chemical and microbiological properties. *American Society of Agronomy*. Madison, Wis, pp. 1477 – 1483, 1982.
3. AMANN, R., LUDWIG, W., SCHLEIFER, K.; Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology Reviews*. 59, p.143- 169, 1995.
4. DAIMS, H., NIELSEN, P., NIELSEN, J.L., JURETSCHKO, S., WAGNER, M., Novel *Nitrospira*-like bacteria as dominant nitrite-oxidizers in biofilms from wastewater treatment plants: diversity and *in situ* physiology. *Water Sci. Technol.* 41: 85-90, 2000.
5. JURETSCHKO, S., TIMMERMAN, G., SCHMID, M., SCHLEIFER, K.-H., POMMERING-RÖSER, A., KOOPS, H.-P. AND WAGNER, M., Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3042-3051, 1998.
6. KIELING, D.D.; Estudo da remoção biológica de nitrogênio a partir de lodo nitrificante cultivado em meio autotrófico sob condições anóxicas. Dissertação (Mestrado). Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos - Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.
7. KONUMA S., SATO H., MINO T., MATSUO T. Comparison of enumerations methods for ammonia-oxidizing bacteria. *Water Science and Technology*, 43(1)107 – 114, 2001.
8. MOBARRY, B.K., WAGNER, M., URBAIN, V., RITTMAN, B.E., STAHL, D.A., Phylogenetic probes for analysing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 2156-2162, 1996.
9. REGINATTO, V., TEIXEIRA, R.M., PEREIRA, F., SCHMIDELL, W., FURIGO Jr, A, MENES, R., ETCHEBEHERE, C., SOARES, H.M. Anaerobic ammonium oxidation in a bioreactor treating slaughterhouse wastewater. *Brazilian J. of Chemical Engineering* 22, N.4: 593-600, 2005.
10. SCHMIDT, I.; HERMELINK, C.; PAS-SCHOONEN, K.; STROUS, M. ; CAMP, H.; KUENEN, J. G.; JETTEN, M. S. M.; Anaerobic Ammonia Oxidation in the Presence of Nitrogen Oxides (NOx) by Two Different Lithotrophs. *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, p. 5351–5357, 2002.
11. WAGNER, M., RATH, G., KOOPS, H.P., FLOOD, J., AMANN, R., In situ analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. *Water Sci. Technol.* 34, 237-244, 1996.