



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS

YASMIN GIRÃO FERREIRA

**BACTÉRIAS ANAERÓBIAS OXIDADORAS DE AMÔNIO (ANAMMOX)
AEROTOLERANTES ISOLADAS EM SEDIMENTOS EUTROFIZADOS**

FORTALEZA

2024

YASMIN GIRÃO FERREIRA

BACTÉRIAS ANAERÓBIAS OXIDADORAS DE AMÔNIO (ANAMMOX)
AEROTOLERANTES ISOLADAS EM SEDIMENTOS EUTROFIZADOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais da Universidade Federal do Ceará. Área de concentração: Ciência, tecnologia e gestão costeira e oceânica.

Orientadora: Prof. Dr^a. Oscarina Viana de Sousa.

Co-orientador: Prof. Dr. Michael Barbosa Viana.

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F1b FERREIRA, YASMIN GIRÃO.
BACTERIAS ANAERÓBIAS OXIDADORAS DE AMÔNIO (ANAMMOX) AEROTOLERANTES
ISOLADAS EM SEDIMENTOS EUTROFIZADOS / YASMIN GIRÃO FERREIRA. – 2024.
90 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, Fortaleza, 2024.

Orientação: Profa. Dra. Oscarina Viana de Sousa.

Coorientação: Prof. Dr. Michael Barbosa Viana .

1. Enzima hidrazina sintase. 2. Aerotolerantes. 3. Ciclo do nitrogênio. 4. Atalho. I. Título.

CDD 551.46

YASMIN GIRÃO FERREIRA

BACTÉRIAS ANAERÓBIAS OXIDADORAS DE AMÔNIO (ANAMMOX)
AEROTOLERANTES ISOLADAS EM SEDIMENTOS EUTROFIZADOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais da Universidade Federal do Ceará. Área de concentração: Ciência, tecnologia e gestão costeira e oceânica.

Aprovada em: xx/xx/xxxx.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra^a. Oscarina Viana de Sousa (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Michael Barbosa Viana (Coorientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr^a. Jéssica Lucinda Saldanha Da Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra^a. Renata Albuquerque Costa
Centro Universitário UNINTA

A Deus.

A minha querida e doce mãe, Evaneide.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me emparar, me guiar e me amar em todos os momentos.

Ao meu anjinho do céu que eu chamo de mãe, Evaneide Girão (*in memorian*), por todo amor, direcionamento e fortaleza que você me dá todos os dias, mesmo estando no céu. Sinto você e o seu amor todos os dias no meu coração. E todas as minhas conquistas eu dedico a você, te amarei pra sempre.

Ao meu pai, Alcides Gerardi, por acreditar em mim, me ajudar nas coletas e me socorrer sempre com uma carona.

Ao meu irmão e melhor amigo, Ytalo Girão, por ser o meu suporte de força e amor nessa caminhada meio caótica. Por sempre aflorar o meu melhor lado, por arrancar as melhores risadas de mim e por ser o melhor cozinheiro do mundo. Te amo muito!

À minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Oscarina Viana Sousa, por acreditar em mim e no projeto, e pela paciência, ensinamentos, conselhos e pela disposição em me ajudar tanto na vida acadêmica como na vida pessoal.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Michael Barbosa Viana, pela disposição em ajudar e tirar as dúvidas.

À Dra. Cristiane Teles, por ter me ajuda na coleta do açude, por sempre estar disposta a ajudar na bancada, por todos os conselhos, risadas e trocas de conhecimentos.

À Prof^ª. Dr^ª. Gleire, por me acompanhar e ajudar na coleta do manguezal, pela disposição em tirar minhas dúvidas, pelos momentos de partilhas e risadas.

À Dr^ª. Jessica Lucinda, por sempre estar disposta a me orientar e aconselhar na execução desse trabalho. Obrigada também por todo amor, carinho e momentos de alegria ao seu lado.

À Dr^ª. Marina Torres, minha parceira de bancada, obrigada por todos os conselhos pessoais e acadêmicos, por me ajudar sem medidas, por compartilhar as melhores histórias e por sempre me incentivar a buscar as melhores coisas.

À Ma. Anna Luisa, Dra. Vladilla Oliveira e Dr. Rafael Rocha por toda a paciência e ensinamentos na biologia molecular.

Ao Junior Ferreira, por ter me ajudado bastante com as análises estatísticas. Obrigada também pelos momentos de risadas no laboratório.

As minhas amigas, Anna Luisa, Gabriela Moura, Regia Leiliana, Vitoria Sousa, pela companhia nos momentos difíceis dos experimentos, por tornarem os momentos de trabalho

mais alegres e suportáveis. Pela troca de conhecimentos, experiências e desesperos. Valorizo profundamente a amizade que compartilhamos.

A todos os integrantes do LAMAP (Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado), por toda a ajuda fornecida para a conclusão desse trabalho e por tornarem o ambiente mais agradável.

Ao Laboratório de Biogeoquímica Costeira, por todo o apoio e auxílio na realização das análises químicas dos sedimentos.

À minha amiga Juliana Carlos, pela sua ótima companhia, por sempre estar disposta a me escutar sobre minhas bactérias, por me ajudar nos momentos de ansiedade e incertezas. Às minhas amigas, Virginia Eduarda e Lia Salette, pelas trocas de experiências do mestrado, pelas confidências da vida pessoal e pelas risadas que com vocês sempre são garantidas. Amo vocês!

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Marinhas Tropicais, pela troca de experiência e conhecimentos durante esse período acadêmico.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa da pesquisa.

“Então, eu acho que somos quem somos por várias razões. E talvez nunca conheçamos a maior parte delas. Mas mesmo que não tenhamos o poder de escolher quem vamos ser, ainda podemos escolher aonde iremos a partir daqui. Ainda podemos fazer coisas. E podemos tentar ficar bem com elas.” (Stephen Chbosky, 1999).

RESUMO

O processo de conversão de amônio em gás nitrogênio (N₂), por ação de bactérias anaeróbia de amônio (anammox), juntamente com a redução de nitrito, é um importante caminho para a remoção de nitrogênio de águas residuárias e de vários ecossistemas aquáticos naturais. Esse processo é muito utilizado em estações de tratamento de efluentes para acelerar a remoção de nitrogênio. O papel desse grupo de bactérias nos ambientes naturais vem sendo estudado e entendido ao longo dos últimos anos, entretanto, pouco ainda se sabe sobre sua ocorrência em ambientes aquáticos no Brasil. Diante disso, o presente estudo teve o objetivo de detectar a presença e isolar bactérias anammox aerotolerantes em sedimentos de ambientes aquáticos eutrofizados. Foram coletadas amostras de sedimentos de dois ambientes aquáticos no município de Fortaleza (CE): Manguezal de Sabiaguaba (MS) e Açude Santo Anastácio (ASA). A partir dessas amostras foram feitas análises quantitativas das BAA, com posterior isolamento, seleção e caracterização de bactérias funcionais. Inicialmente, as amostras de sedimento foram enriquecidas em um caldo mineral seletivo composto para favorecer o crescimento de bactérias anammox e incubadas em jarra de anaerobiose por 14 dias. Após esse período, as amostras enriquecidas foram submetidas a diluições seriadas, inoculadas por meio da técnica *pour plate* em placas de petri no meio de cultura sólido seletivo para anammox e em outro meio não seletivo (Ágar peptona), com posterior incubação em estufa bacteriológica a 35°C por até 5 dias. As unidades formadoras de colônias foram determinadas pela técnica de Contagem Padrão em Placas (CPP). Etapas para caracterização das estirpes individualmente compreenderam: isolamento, purificação, técnica de coloração de Gram, teste de eficiência para a remoção de amônia e nitrito, perfis de antagonismo. Em seguida, foram formados consórcios bacterianos e construídas curvas de crescimento. A detecção genética da atividade anammox entre os isolados bacterianos foi feita pela amplificação do gene *hzs*, utilizando o par de *primers* *hzsA_526F/_1857R*. Com base nessa estratégia metodológica, foi possível isolar 100 bactérias aerotolerantes, dentre elas, 4 bactérias com atividade anammox, nos sedimentos de manguezal e de uma lagoa artificial; montar 11 consórcios anammox eficientes na conversão de compostos nitrogenados na presença e ausência de oxigênio, e com crescimento eficaz em efluente sintético. Esses resultados são uma contribuição importante para entendimento e futuras aplicações desse grupo bacteriano como tecnologia para tratamento de efluentes com alta carga de amônia e nitrito.

Palavras-chaves: Enzima hidrazina sintase; Aerotolerantes; Ciclo do nitrogênio; Atalho.

ABSTRACT

The process of converting ammonium into nitrogen gas (N₂), through the action of anaerobic ammonium bacteria (anammox), together with the reduction of nitrite, is an important path for removing nitrogen from wastewater and various natural aquatic ecosystems. This process is widely used in effluent treatment plants to accelerate nitrogen removal. The role of this group of bacteria in natural environments has been studied and understood over the last few years, however, little is still known about their occurrence in aquatic environments in Brazil. Therefore, the present study aimed to detect the presence and isolate aerotolerant anammox bacteria in sediments from eutrophicated aquatic environments. Sediment samples were collected from two aquatic environments in the municipality of Fortaleza (CE): Manguezal de Sabiaguaba (MS) and Açude Santo Anastácio (ASA). Quantitative analyzes of BAA were carried out from these samples, with subsequent isolation, selection and characterization of functional bacteria. Initially, sediment samples were enriched in a selective mineral broth composed to promote the growth of anammox bacteria and incubated in an anaerobic jar for 14 days. After this period, the enriched samples were subjected to serial dilutions, inoculated using the plate technique in petri dishes in solid culture medium selective for anammox and in another non-selective medium (peptone agar), with subsequent incubation in a bacteriological oven at 35°C for up to 5 days. Colony forming units were determined using the Standard Plate Count (SPC) technique. Steps for characterizing the strains individually included: isolation, purification, Gram staining technique, efficiency test for ammonia and nitrite removal, antagonism profiles. Then, bacterial consortia were formed and growth curves were constructed. The genetic detection of anammox activity among bacterial isolates was carried out by amplification of the hzs gene, using the primer pair hzsA_526F/_1857R. Based on this methodological strategy, it was possible to isolate 100 aerotolerant bacteria, including 4 bacteria with anammox activity, in mangrove sediments and an artificial lagoon; assemble 11 anammox consortia efficient in converting nitrogenous compounds in the presence and absence of oxygen, and with effective growth in synthetic effluent. These results are an important contribution to the understanding and future applications of this bacterial group as a technology for treating effluents with high ammonia and nitrite loads.

Keywords: Hydrazine synthase enzyme; Aerotolerant; Nitrogen cycle; Shortcut.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	-	Principais transformações no ciclo do nitrogênio.....	24
Figura 2	-	Compartimento intracelular das bactérias anammox	25
Figura 3	-	Área de localização dos pontos de coletas de sedimento (Açude Santo Anastácio – Fortaleza CE)	33
Figura 4	-	Área de localização dos pontos de coletas de sedimento (Manguezal Sabiaguaba – Fortaleza – CE)	35
Figura 5	-	Fluxograma do processamento das amostras de sedimento.....	40
Figura 6	-	Fluxograma que representa a técnica de coloração de Gram.....	41
Figura 7	-	Fluxograma que representa a metodologia do teste de eficiência com o método Griess-ilosvay.....	44
Figura 8	-	Fluxograma do teste de antagonismo.....	45
Figura 9	-	Fluxograma da formação dos consórcios e crescimento microbiano.....	47
Figura 10	-	Colônias de bactérias escolhidas para o isolamento, e crescidas em placa de petri contendo meio de cultura ágar peptona e ágar anammox (M2).....	52
Figura 11	-	Diagrama de Venn representando o número das bactérias isoladas do ASA e MS que apresentaram resultado positivo para a conversão de compostos nitrogenados na presença de oxigênio.....	54
Figura 12	-	Diagrama de Venn representando o número das bactérias isoladas do ASA e MS que apresentaram resultado positivo para a conversão de compostos nitrogenados na ausência de oxigênio e na presença de oxigênio.....	55
Figura 13	-	Resultados positivos das bactérias eficientes na conversão de amônia e nitrito no teste Griess-Ilosvay.....	56
Figura 14	-	Teste de antagonismo pela técnica de estrias cruzadas.....	58
Figura 15	-	Painel das curvas de crescimento de todos os consórcios microbianos testados.....	65

Figura 16 – Detecção de bactérias anammox pelo Gel de eletroferose de amostras submetidas a PCR com *primer* gene-específico *hzs*, confirmando a presença do gene anammox em bactérias detectadas..... 69

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Porcentagem total das estirpes de acordo com a morfologia e a característica celular dos dois ambientes estudados (ASA e MS)..... 53
- Gráfico 2 - Resultado do teste de pós-hoc de Dunn que detalha a diferença significativa entre os consórcios microbianos compostos por bactérias anammox..... 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	-	Composição dos meios de cultura usados no enriquecimento das bactérias anammox (M1) e no isolamento e purificação das bactérias (M2)	39
Tabela 2	-	Parâmetros físico-químicos das amostras nos pontos estudados	49
Tabela 3	-	Média do número de bactérias aerotolerantes nas amostras de sedimento do manguezal da Sabiaguaba e do Açude Santo Anastacio (Fortaleza – CE), inoculadas em dois diferentes meios de cultura.....	51
Tabela 4	-	Resultado do teste de antagonismo entre as cepas eficientes na conversão de nitrogênio na presença e ausência de oxigênio.....	59
Tabela 5	-	Resultado do teste de antagonismo entre as cepas eficientes apenas na ausência de oxigênio.....	60
Tabela 6	-	Composição dos 11 consórcios bacterianos formados a partir do teste de antagonismo.....	61
Tabela 7	-	Caracterização morfológica e dos esporos das bactérias que compõem os consórcios microbianos.....	62
Tabela 8	-	Caracterização das bactérias anammox aerotolerantes que apresentaram o gene-específico <i>hzs</i>	70

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Elementos traços e quantidades compostas aos meios seletivos utilizados na quantificação dos componentes bacterianos pertencentes ao ciclo do nitrogênio.....	42
Quadro 2 – Quantidades de elementos traços compondo os meios de cultura seletivos.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anammox	Oxidação Anaeróbia de Amônia
ASA	Açude Santo Anastácio
CPP	Contagem Padrão em Placas
CaCl_2	Cloreto de cálcio
CaCO_3	Carbonato de cálcio
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de cobalto
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de cobre
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
FeSO_4	Sulfato de ferro
H_2O	Água
H	Hidrogênio
H_3BO_4	Ácido bórico
HZS	Hidrazina sintase
LAMAP	Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado
KH_2PO_4	Fosfato monopotássico
K_2HPO_4	Fosfato dipotássico
KNO_2	Nitrito de potássio
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de Magnésio
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de Manganês
M1	Meio de cultura composto por elementos traços
M2	Meio de cultura composto por elementos traços mais ágar
NaHCO_3	Bicarbonato de sódio
NaNO_2	Nitrito de sódio
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Molibdato de sódio
NH_4Cl	Cloreto de amônio
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Sulfato de amônio
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de níquel
N_2	Gás nitrogênio
NO	Óxido nítrico
NO_2^-	Nitrito

NO_3^-	Nitrato
Zn	Zinco
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de zinco

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
g	Gramma
mL	Mililitro
+	Positivo
-	Negativo
UFC/g	Unidades formadora de colônia por grama
UFC/mL	Unidades formadora de colônia por mililitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	OBJETIVO	23
2.1	Objetivo geral	23
2.2	Objetivos específicos	23
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
3.1	Bactérias anammox	24
3.2	Utilização de bactérias anammox no tratamento de águas residuárias	27
3.3	Fatores que influenciam no crescimento das bactérias anammox	28
3.4	Interferentes da atividade anammox	29
3.5	Deteção de bactérias anammox	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1	Área de estudo	32
4.1.1	<i>Açude Santo Anastácio</i>	32
4.1.2	<i>Manguezal Sabiaguaba</i>	34
4.2	Coleta das amostras	36
4.3	Propriedades físico-químicas do solo	36
4.3.1	Fósforo total (FT)	36
4.3.2	Carbono Orgânico Total (COT)	37
4.3.3	Nitrogênio Total (NT)	38
4.4	Análises microbiológicas	39
4.4.1	<i>Meios de cultura utilizados</i>	39
4.4.2	<i>Processamento das amostras</i>	39
4.4.3	<i>Isolamento microbiano</i>	41
4.4.4	<i>Identificação Morfotintorial</i>	41
4.4.5	Teste de eficiência das bactérias na conversão de nitrogênio	42
4.4.6	Teste de antagonismo bacteriano (<i>in vitro</i>)	44
4.4.7	Formação dos consórcios bacterianos e curva de crescimento	46
4.4.8	Deteção de genes funcional em bactérias anammox	47
4.4.8.1	<i>Extração do DNA total</i>	47
4.4.8.2	<i>Amplificação do DNA por PCR</i>	48
4.5	Análise estatística	48

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1	Parâmetros físico-químicos das amostras de sedimento	49
5.2	Quantificação microbiana (Contagem Padrão em Placas).....	50
5.3	Isolamento e caracterização morfológica das bactérias	51
5.4	Teste de eficiência das bactérias na conversão de nitrogênio.....	54
5.5	Teste de antagonismo.....	57
5.6	Formação dos consórcios.....	61
5.7	Curva de Crescimento.....	63
5.8	Amplificação do DNA.....	69
6	CONCLUSÃO.....	72
6.1	Considerações finais.....	73
	REFERÊNCIAS	74

1 INTRODUÇÃO

O nitrogênio é um nutriente essencial para o crescimento dos organismos, entretanto, sua presença excessiva na água (na forma de amônia, nitrito ou nitrato), causada por atividades antropogênicas, é um dos mais sérios problemas ambientais globais (LIU; HU; GUO, 2019; TAN *et al.*, 2019; ZHENG *et al.*, 2019). Os despejos de águas residuárias em ecossistemas aquáticos, sem tratamento prévio e ricos em compostos nitrogenados, podem causar problemas ecológicos como eutrofização, contaminação da água, contaminação ou morte da biota aquática, proliferação de algas, precipitação ácida e aquecimento global (CHEN *et al.*, 2023; ZHENG *et al.*, 2019). Assim, é de fundamental importância investigar processos biológicos para a remoção de nitrogênio, mediado por microrganismos, para a melhoria da qualidade de águas residuárias e, conseqüentemente, dos corpos d'água que recebem esses efluentes.

Durante décadas, acreditou-se que a nitrificação/desnitrificação fossem os principais processos biológicos de remoção de nitrogênio em ambientes naturais e em estações de tratamento de esgotos. Entretanto, a partir de 1995, essa concepção vem mudando gradualmente com a descoberta das bactérias anaeróbias oxidadoras de amônio (anammox) em um reator desnitrificante de leito fluidizado (MULDER *et al.*, 1995; ZHANG *et al.*, 2020). Durante o processo anammox, esse grupo de bactérias utilizam amônio e nitrito como substrato para realizar a remoção de nitrogênio (NIE *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2020). Desde então, as bactérias anammox tornaram-se *hotspot* de pesquisa devido ao seu potencial de eficiência e economia durante o tratamento de compostos nitrogenados de águas residuárias (ZUO *et al.*, 2020; GONG *et al.*, 2021).

Esse grupo bacteriano tem sido utilizado em reatores biológicos para o tratamento de águas residuárias com alta concentração de nitrogênio, podendo remover cerca de 89% dos compostos nitrogenados e reduzir as emissões de gases de efeito estufa, como gás carbônico e óxido nitroso (KARTAL; KUENEN; VAN LOOSDRECHT, 2010; MIAO *et al.*, 2019; RUSCALLEDA *et al.*, 2010; TALAN; TYAGI; DROGUI, 2021; XIE; JI; ZANG, 2017).

A salinidade e o oxigênio são os principais inibidores do processo anammox, entretanto, são poucas as informações sobre a tolerância da bactéria anammox a esses parâmetros (DSANE *et al.*, 2021a; ZHANG; OKABE, 2020). Portanto, estudar os efeitos dessas variáveis é muito importante para entender o papel das bactérias anammox em ambientes aquáticos salinos e/ou óxicos, e na área de tratamento de efluentes, uma vez que a maioria das fontes de águas residuárias têm altos teores de sais (DSANE *et al.*, 2021a).

Apesar das bactérias anammox serem identificadas como anaeróbias estritas (STROUS *et al.*, 1999), estudos apontam que elas desempenham seu importante papel nas reduções de nitrogênio em ambientes naturais óxicos, como lagos e rios de água doce (SCHUBERT *et al.*, 2006; VAN KESSEL *et al.*, 2011; XIA *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2017). Além disso, bactérias anammox foram detectadas em zonas aeróbias, com oxigênio dissolvido (OD) até 8 mg L⁻¹, de reatores de estações de tratamento de efluentes e com contribuições significativas para a remoção de nitrogênio (LIU *et al.* 2008; WANG *et al.* 2015).

Em ecossistemas aquáticos eutrofizados, caracterizados pelo aumento significativo de nutrientes como nitrogênio (nas formas de amônio e nitrito) e fósforo, as condições tornam-se altamente propícias para o desenvolvimento das bactérias anammox (TRINH *et al.*, 2021; ZHAO *et al.*, 2019). Essas bactérias desempenham um papel crucial na remoção de nitrogênio em lagos eutróficos, apresentando a capacidade de transformar aproximadamente 13–40% dos compostos nitrogenados presentes em gás nitrogênio (ZHANG *et al.*, 2023). Este processo assume uma relevância notável na dinâmica desses ambientes, destacando a contribuição significativa das bactérias anammox para a mitigação dos impactos decorrentes do excesso de nutrientes.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Detectar a presença e isolar bactérias anammox aerotolerantes em sedimentos de ambientes aquáticos eutrofizados.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Parâmetros físico-químicos das amostras de sedimento;
- ✓ Quantificar e selecionar bactérias aerotolerantes com potencial atividade anammox;
- ✓ Testar a eficiência das bactérias, *in vitro*, na conversão de amônia e nitrito em gás nitrogênio;
- ✓ Montar consórcios bacterianos com potencial uso para o tratamento de efluentes;
- ✓ Montar curvas de crescimento dos consórcios microbianos;
- ✓ Detectar geneticamente a atividade anammox através de iniciadores específicos para gene funcional *hzs* entre os isolados bacterianos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Bactérias anammox

Bactérias anaeróbias oxidantes de amônio (anammox) são autotróficas e desempenham um papel importante no ciclo do nitrogênio criando um “atalho” (FIGURA 1), pois convertem a amônia em nitrogênio atmosférico usando o nitrito como acceptor final de elétrons (AL-HAZMI *et al.*, 2023; FLECK; TAVARES; EYNG, 2015; YANG *et al.*, 2020b), conforme mostrado na Equação 1 (MAGYAR *et al.*, 2021).

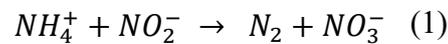
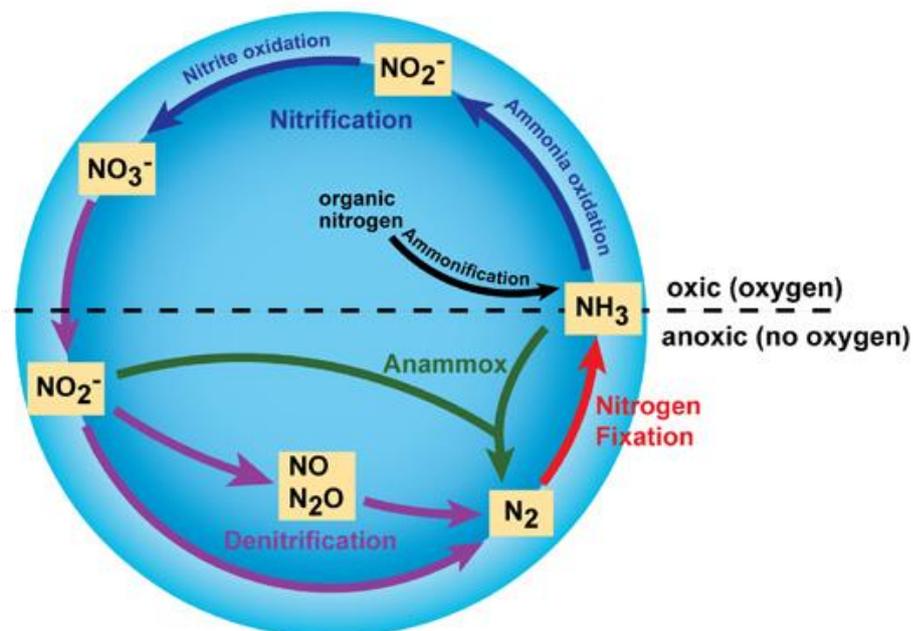


Figura 1 - Principais transformações no ciclo do nitrogênio.

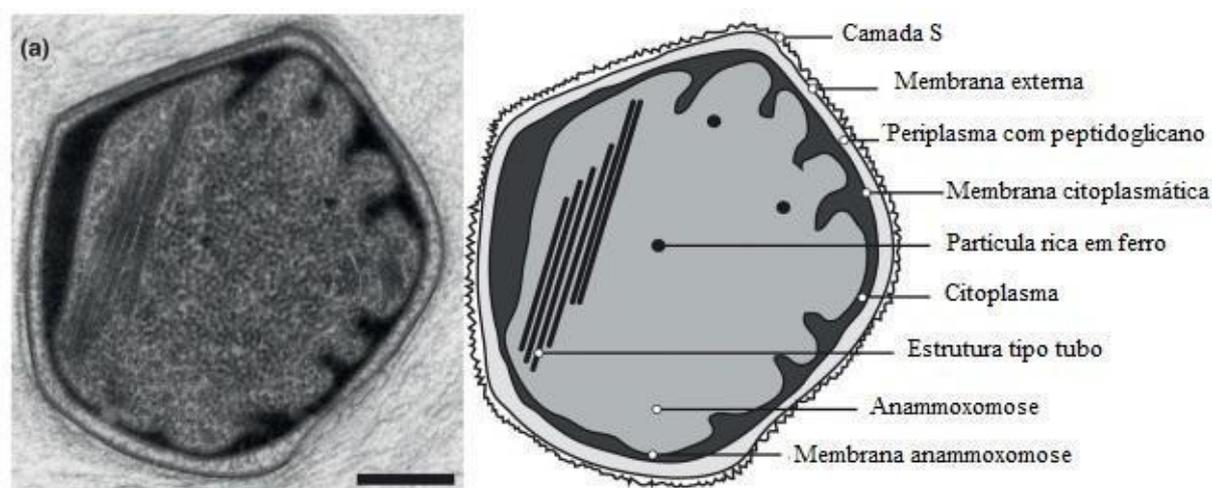


Fonte: BERNHARD, 2010.

O processo anammox acontece em um compartimento intracelular irregular e único, delimitado por membrana, chamado anammoxossomo (FIGURA 2) (PEETERS; VAN NIFTRIK, 2019), local onde realiza-se o metabolismo catabólico e se localizam as principais enzimas metabólicas (ALMEIDA *et al.*, 2015; PENG *et al.*, 2022). Alguns autores definem as

bactérias anammox como Gram-negativas e com morfologia irregular ou de cocos (VAN NIFTRIK *et al.*, 2004; VAN TEESELING *et al.*, 2015; VAN TEESELING *et al.*, 2018). Além disso, elas possuem crescimento lento em cultivos de biorreatores, com tempo de duplicação variando de uma a várias semanas, sendo o tempo de 1 a 5 dias o período mais rápido de duplicação relatado (LOTTI *et al.*, 2015; PEETERS; VAN NIFTRIK, 2019; ZHANG *et al.*, 2015).

Figura 2 - Compartimento intracelular das bactérias anammox.



Fonte: Adaptado de Peeters e Van Niftrik (2019).

As bactérias anammox podem ser detectadas em uma diversidade de ambientes geograficamente e biogeoquimicamente distintos, como zonas oceânicas mínimas de oxigênio (BANDEKAR; RAMAIAH; MEENA, 2018; LAM *et al.*, 2009), oceanos (BRIN; GIBLIN; RICH, 2017; DALSGAARD; THAMDRUP; CANFIELD, 2005), águas subterrâneas (MOORE *et al.*, 2011), rios (CHEN *et al.*, 2019; FU *et al.*, 2019; XIA *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2020), estuários (ZHENG *et al.*, 2020), lagos naturais de água doce (SCHUBERT *et al.*, 2006) e solos (XI *et al.*, 2016). Além de ambientes anóxicos, as bactérias anammox também podem ser encontradas em ambientes naturais óxicos, como lagos e rios de água doce (XIA *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2017), e, portanto, podem ser aerotolerantes.

Apesar de alguns estudos denominarem essa comunidade microbiana como microaerotolerantes em vez de anaeróbias estritas (JENSEN *et al.*, 2008; LAM *et al.*, 2009; STROUS *et al.*, 1997), poucos são os estudos atuais que analisam a ocorrência das bactérias anammox aerotolerantes em ambientes naturais óxicos. Portanto, é de suma importância que essas bactérias tolerantes ao ar sejam investigadas, para entender o comportamento de crescimento e a eficiência na perda de nitrogênio, para promover a redução da eutrofização de

ecossistemas aquáticos e para aplicação em estações de tratamento de esgoto (ZHANG *et al.*, 2020).

Até agora, o processo anammox conhecido é mediado por bactérias pertencentes ao filo Planctomycetes e possuem 9 gêneros: *Brocadia*, *Kuenenia*, *Anammoxoglobus*, *Jettenia*, *Scalindua*, *Anammoximicrobium*, *Anammoxibacter*, *Bathyanammoxibius* e *Loosdrechtii* (LITTI *et al.*, 2023). Nenhuma dessas bactérias anammox foi isolada como culturas puras tradicionais, o que resulta em todas elas possuírem o status taxonômico de '*Candidatus*' (ZHANG *et al.*, 2017). Além dos gêneros mencionados, é possível a existência de novos grupos não descritos de bactérias anammox, pois há indícios de sua presença em pesquisas ambientais (SUAREZ *et al.*, 2022). O avanço de novas técnicas biomoleculares também promete contribuir significativamente para descobertas relacionadas à fisiologia e ecologia das bactérias anammox (CHEN *et al.*, 2023).

Estabelecendo as relações entre os gêneros anammox e seus habitats, observa-se que *Brocadia*, *Kuenenia* e *Loosdrechtii* predominam principalmente em lodos ativados de estações de tratamento de resíduos industriais. Por outro lado, *Anammoxoglobus*, *Jettenia* e *Scalindua* estão predominantemente associados a sistemas de tratamento de resíduos anaeróbios, bem como a bacias de água doce ou marinhas. Embora esses três últimos gêneros ocorram com menos frequência em lodos ativados de biorreatores industriais e laboratoriais, sua presença ainda é registrada nesses ambientes (PIMENOV *et al.*, 2022; TRINH *et al.*, 2021; YANG *et al.*, 2021). *Anammoximicrobium* é comumente encontrada em solos agrícolas (NIE *et al.*, 2018; ZHENG *et al.*, 2020), enquanto *Anammoxibacter* é encontrada em biofilme submarino de fiordes (SUAREZ *et al.*, 2022). Por fim, as *Bathyanammoxibius* podem ser localizadas em águas subterrâneas, sedimentos marinhos, água do mar, sedimentos de água doce e solo (ZHAO; BIDDLE; JØRGENSEN, 2022).

Diversos estudos indicaram que o processo anammox desempenha um papel significativo, respondendo por até 13% da produção de nitrogênio em lagoas de água doce e mais de 50% em rios e ecossistemas marinhos (KUYPERS *et al.*, 2005; SCHUBERT *et al.*, 2006). Além disso, as bactérias anammox são amplamente prevalentes e ativas em uma ampla variedade de características químicas e litologias de aquíferos. Demonstram eficiência na remoção de amônia e nitrito, tanto de fontes naturais quanto derivados da agricultura, operando efetivamente em diversas concentrações de oxigênio (MOSLEY *et al.*, 2022).

3.2 Utilização de bactérias anammox no tratamento de águas residuárias

A amônia é um importante poluente do nitrogênio presente nas águas residuárias municipais e agrícolas que são lançadas nos corpos hídricos (SU *et al.*, 2023; ZHU *et al.*, 2021). Para os peixes, a toxicidade da amônia se apresenta como diminuição do desempenho no crescimento, alterações histopatológicas, respostas inflamatórias, estresse oxidativo e mortalidade (BENLI; KÖKSAL; ÖZKUL, 2008; JIANG *et al.*, 2022; LI *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2019; ZHANG, *et al.*, 2018). Além disso, altos níveis de amônia na água podem causar problemas que colocam em risco a saúde humana devido à ingestão de peixes contaminados e à ingestão de água contaminada, e também impacta negativamente o ecossistema aquático, devido ao crescimento excessivo de algas e cianobactérias que diminuem a concentração de oxigênio podendo causar a morte da vida aquática (KARRI; SAHU; CHIMMIRI; 2018). Portanto, o tratamento de águas residuárias com altas concentrações de amônia é de suma importância para o meio ambiente e para a saúde humana, e por isso vem ganhando grande atenção em relação aos limites de descargas e regulações rigorosas por agências ambientais que colocam pressão para as indústrias e as estações de tratamento de águas residuárias (ETEs) de todo o mundo explorarem métodos mais sustentáveis para diminuir a amônia das águas residuárias (TANG *et al.*, 2017; KARRI *et al.*, 2018).

O processo biológico de oxidação anaeróbica de amônio (anammox) tem recebido ampla importância como um recurso de tratamento de águas residuárias promissor, ecologicamente correto e energeticamente eficiente (ALI; OKABE, 2015; ZHANG *et al.*, 2017). Em 2014, existiam mais de 100 instalações anammox em escala real em todo o mundo (LACKNER *et al.*, 2014; RAJPUT *et al.*, 2023), atualmente existem mais de 150 instalações de nitrificação parcial-anammox, tornando a tecnologia anammox bem estabelecida (KOUBA *et al.*, 2022).

Esse processo apresenta muitas vantagens quando comparado os métodos biológicos convencionais de nitrificação/desnitrificação, como alta eficiência, custo-benefício, diminuição de 50% da demanda de oxigênio e 100% de fontes de carbono orgânico, menor produção de gás associada ao aquecimento global e menor produção de lodo em biorreatores (DU *et al.*, 2021; TAN; SHUAI, 2015; QIU *et al.*, 2021).

No entanto, a aplicação da tecnologia anammox apresenta algumas limitações devido à complexidade das águas residuárias e sensibilidade das bactérias a vários parâmetros ambientais, como salinidade (JIN *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2019). Os efluentes contendo nitrogênio de alta resistência normalmente contêm altos teores de sais como, por exemplo, as

águas residuárias de aquicultura, indústria de couro, indústria de petróleo, tintura têxtil, produtos químicos e farmacêuticos (KARTAL *et al.*, 2006; LU *et al.*, 2019; MA *et al.*, 2012).

Pesquisadores descobriram que bactérias anammox marinhas podem contribuir melhor para uma alta taxa de remoção de nitrogênio em águas residuárias salinas (WEI *et al.*, 2015; WEI *et al.*, 2016; YOKOTA *et al.*, 2018). Além disso, sabe-se que a presença de substâncias poliméricas extracelulares microbianas (EPS) nas bactérias facilita o tratamento de efluentes contendo alto teor de sal (DSANE *et al.*, 2021b; FANG *et al.*, 2018). Esses resultados sugerem que o processo anammox tem um bom potencial para tratar efluentes salinos, mas é necessário que haja mais informações sobre a adaptação ao sal das culturas anammox de água marinha e doce (JEONG *et al.*, 2020; MALOVANYYY *et al.*, 2015).

3.3 Fatores que influenciam no crescimento das bactérias anammox

A distribuição biogeográfica das comunidades bacterianas anammox é influenciada por parâmetros ambientais, como temperatura, pH, salinidade e oxigênio (ALI *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2021; PARK *et al.*, 2015; VAN DER STAR *et al.*, 2008).

A salinidade é o fator chave que regula a inibição, composição e distribuição da comunidade bacteriana anammox (DSANE *et al.*, 2021b; HUANG *et al.*, 2021; ZHENG *et al.*, 2016). Altas concentrações de sais podem inibir o processo anammox, o que pode afetar a pressão osmótica das células, levando a redução da atividade microbiana nos ambientes naturais e artificiais (LI *et al.*, 2018; ZHU *et al.*, 2020). Além disso, a salinidade também pode impactar na abundância da comunidade microbiana presente nesse processo (DU *et al.*, 2021).

O oxigênio já foi considerado o principal inibidor do processo anammox, entretanto alguns estudos já comprovaram que o efeito inibidor do oxigênio sobre essas bactérias pode ser reversível (OSHIKI; SATOH; OKABE, 2016; ZHANG; OKABE, 2020). Essa tolerância ao ar acontece devido à biomassa ou sólidos suspensos presentes na água oxigênica, que criam microsítios subóxicos/anóxicos para as bactérias anammox realizarem suas funções na conversão de nitrogênio (LIU *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2017; ZHANG; OKABE, 2020).

A temperatura é um parâmetro importante que afeta a atividade metabólica e a abundância relativa de espécies das bactérias anammox (GUO *et al.*, 2013; XIE *et al.*, 2021). A faixa de temperatura mesófila entre 35 e 40° C é considerada como a temperatura ideal para a maioria das espécies de anammox em um sistema de tratamento de efluentes (TOMASZEWSKI; CEMA; ZIEMBIŃSKA-BUCZYŃSKA, 2017). Apesar disso, alguns estudos identificaram que essas bactérias podem se adaptar a condições extremas de

temperatura, como ambientes pluviais e de água doce perto de 0° C e a ambientes de fontes termais que atingem até 60 a 80° C (BYRNE *et al.*, 2009; ZHU *et al.*, 2015).

O pH é um indicador crítico que afeta a sensibilidade, o crescimento e metabolismo bacteriano anammox, e pode ser usado para avaliar o desempenho dos biorreatores ao manter a eficiência de remoção de nitrogênio e estabilidade da biomassa (DOSTA *et al.*, 2008; KARASUTA *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2014; XIE *et al.*, 2021). Normalmente, quando o pH ambiental está fora do intervalo ideal, o desempenho metabólico da cultura anammox em biorreatores é diminuído significativamente (ZHANG *et al.*, 2021).

O pH entre 6,7 e 8,3 garante a fisiologia e atividade das bactérias anammox, enquanto o intervalo de 7,5 e 8,0 pode resultar no desempenho ideal da atividade desses microrganismos (WAKI *et al.*, 2010; XIE *et al.*, 2021).

Concentrações elevadas de carbono orgânico podem resultar em efeitos adversos na abundância e atividade de microrganismos funcionais em sistemas anammox, impactando a eficiência da remoção de nitrogênio nesses sistemas (ZHANG *et al.*, 2021). Os possíveis mecanismos associados ao efeito inibitório do carbono orgânico no processo anammox incluem a competição externa com bactérias heterotróficas e a inibição da conversão da via metabólica (JIN *et al.*, 2012; TRINH *et al.*, 2021).

O nitrogênio total é um fator limitante para o crescimento das bactérias anammox, que afetam a abundância, eficiência de conversão e composição da comunidade de bactérias anammox em sedimentos superficiais, águas residuárias e ambientes eutrofizados (WU *et al.*, 2021). Além disso, altas cargas de fosforo total em ecossistemas aquáticos pode resultar em concentrações minerais excessivamente altas e afetar negativamente a atividade das bactérias anammox (MA *et al.*, 2021).

3.4 Interferentes da atividade anammox

O desempenho do processo anammox em estações de tratamento de águas residuárias (ETEs) além de ser afetado por parâmetros ambientais (temperatura, oxigênio, pH, salinidade), é frequentemente impactado por poluentes como, por exemplo, metais pesados, nano partículas, antibióticos (FAN *et al.*, 2021; JIN *et al.*, 2012).

Os metais pesados tornaram-se uma das influências mais críticas sobre anammox nas ETEs, devido às suas características de biodegradação dura e fácil acumulação (LIU *et al.*, 2020; XU *et al.*, 2019). Os efeitos inibitórios desses metais podem mostrar grandes variações em águas residuárias e contaminadas, isso vai depender da viabilidade da biomassa, das

concentrações dos metais pesados e o transporte transmembranar. De acordo com Bi *et al.* (2014) a deterioração da atividade da enzima bruta das bactérias e, assim, a diminuição da taxa de remoção de nitrogênio no sistema anammox, ocorre devido ao acúmulo de metais pesado no interior da célula anammox (MAK *et al.*, 2018).

Os antibióticos existem frequentemente em águas residuárias farmacêuticas, de suínos, lamas municipais, que também são caracterizadas por altas concentrações de compostos orgânicos e amônia (LIANG *et al.*, 2015). Alcançar a remoção eficiente simultânea de antibióticos e nitrogênio tóxico é urgente para o tratamento de efluentes, e o processo anammox tem sido considerado para essa operação (FAN *et al.*, 2021). Alguns estudos demonstraram que a atividade anammox foi inibida por antibióticos (SHI *et al.*, 2017; YANG; ZHANG; JIN 2013). Já Rahman *et al.* (2018) e Suto *et al.* (2017) relataram que o processo anammox foi realizado com sucesso no tratamento de efluentes de suinocultura (GAMÓN; CEMA; ZIEMBIŃSKA-BUCZYŃSKA, 2021). Portanto, é necessário que haja mais pesquisas abrangentes sobre o impacto dos antibióticos nesse processo de biooxidação.

3.5 Detecção de bactérias anammox

O enriquecimento eficiente de culturas puras de bactérias anammox tem sido um grande desafio para sua aplicação prática no tratamento de águas residuais, devido às suas taxas de crescimento extremamente lentas, rendimentos de biomassa relativamente baixos e oxigênio e altas concentrações de nitrito (FU *et al.*, 2023; KARTAL *et al.*, 2007). Diante disso, os métodos independentes mais amplamente utilizados para detecção e identificação de bactérias anammox em diversos ambientes incluem hibridização fluorescente *in situ* (FISH), reação em cadeia da polimerase (PCR) e metagenômica (GAO *et al.*, 2023; SCHMID *et al.*, 2005; SUAREZ *et al.*, 2022).

Os protocolos FISH, embora demandem esforço considerável para aplicação rotineira e possam apresentar desafios em amostras ambientais devido à interferência de uma matriz complexa, são frequentemente utilizados na detecção de bactérias anammox (THIRD *et al.*, 2001). Proporcionando uma visão direta sobre a abundância, morfologia e distribuição desses organismos, esse método permanece valioso em pesquisas e análises específicas (DAI *et al.*, 2019; DING *et al.*, 2020; JETTEN *et al.*, 2005).

A análise metagenômica tem sido utilizada para examinar as composições comunitárias e o potencial metabólico das bactérias anammox em diversos ecossistemas, resultando na contínua descoberta de novas linhagens dessas bactérias (PARK *et al.*, 2017;

YANG *et al.*, 2020a). Entretanto, o custo elevado e a ineficácia dessa tecnologia para amostras complexas, devido à baixa abundância e ao crescimento lento das bactérias anammox, limitam sua aplicação efetiva (YANG *et al.*, 2020b).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) representa uma técnica molecular eficiente, na qual ocorre a síntese de milhões de cópias de novas cadeias de DNA complementares ao modelo original por meio da amplificação (KUMWIMBA *et al.*, 2020). Além disso, a técnica de PCR fornece um método fácil, essencial e amplamente acessível (CAI *et al.*, 2020). O gene 16S rRNA foi reconhecido por muito tempo como o biomarcador mais comum e amplamente utilizado (JUNIER *et al.*, 2010). Contudo, *primers* direcionados a genes funcionais, como o da hidrazina sintase (HZS), também têm sido empregados devido à sua alta especificidade e habilidade de refletir a atividade funcional (LI; GU, 2011; ZHOU *et al.*, 2018).

A utilização do gene *hzs* como biomarcador molecular é altamente adequado para a confirmação da atividade anammox em bactérias, considerando a hidrazina sintase como uma enzima única dessas bactérias e limitante da taxa no contexto da via anammox (XU *et al.*, 2021). Esta enzima desempenha um papel crucial no metabolismo do anammox ao catalisar a conversão de óxido nítrico e amônio em hidrazina (MOSLEY *et al.*, 2022). Considerando os resultados obtidos nas aplicações práticas, Yang *et al.* (2020b) identificaram que o conjunto de *primers* *hzsA_526F/hzsA_1857R* foi o mais eficaz para análises da comunidade bacteriana anammox na maioria das amostras.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas amostras de sedimento de dois ambientes no município de Fortaleza: Açude Santo Anastácio (ASA) e Manguezal de Sabiaguaba (MS).

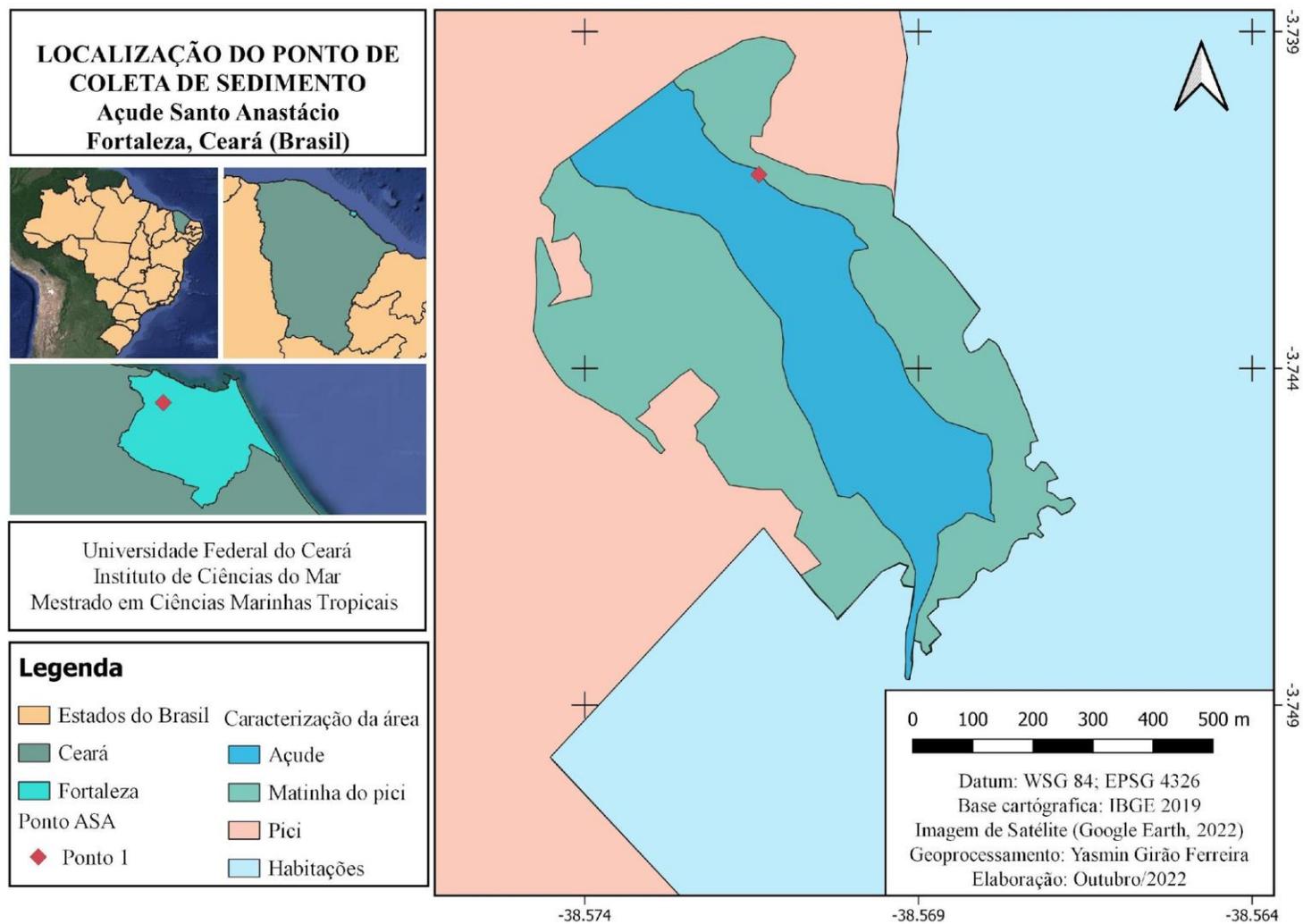
4.1 Área de estudo

4.1.1 Açude Santo Anastácio

O açude Santo Anastácio é um reservatório urbanizado pertencente a bacia do Rio Maranguapinho, sendo sua maior parte, cerca de 42% da área inundada, localizada no Campus Universitário do Pici da UFC (Fortaleza – CE) (SÁNCHEZ-BOTERO *et al.*, 2014). O açude encontra-se situado em uma zona de clima Tropical Quente Sub-úmido, com pluviosidade anual de 1338,0 (mm), temperatura média entre 26° a 28° (C°), com período chuvoso de janeiro a maio (IPECE, 2017). E sob um relevo plano, com o solo composto basicamente por lama (60%) e areia fina (25%), e com grande quantidade de macrófitas aquáticas (MELO, 2017; SOARES, 2003).

O açude é abastecido pela Lagoa da Parangaba, que é um corpo hídrico poluído, alvo de dejetos industriais e domésticos (BORGES, 1978). Além disso, o açude recebe interferência direta de esgotos clandestinos, lançamento direto de resíduos sólidos na sua margem e efluentes domésticos da população ribeirinha. Esses impactos causam assoreamento, contaminação; e a diminuição do oxigênio dissolvido da água e aumento de nutrientes (fósforo e nitrogênio), provocando eutrofização do ecossistema. Isso afeta a biodiversidade da fauna, flora e microbiota local, e a população ribeirinha que utiliza o açude para pesca (ARAÚJO; NETO; BECKER, 2016).

Figura 3 – Área de localização dos pontos de coletas de sedimento (Açude Santo Anastácio– Fortaleza – CE).



Fonte: Autora.

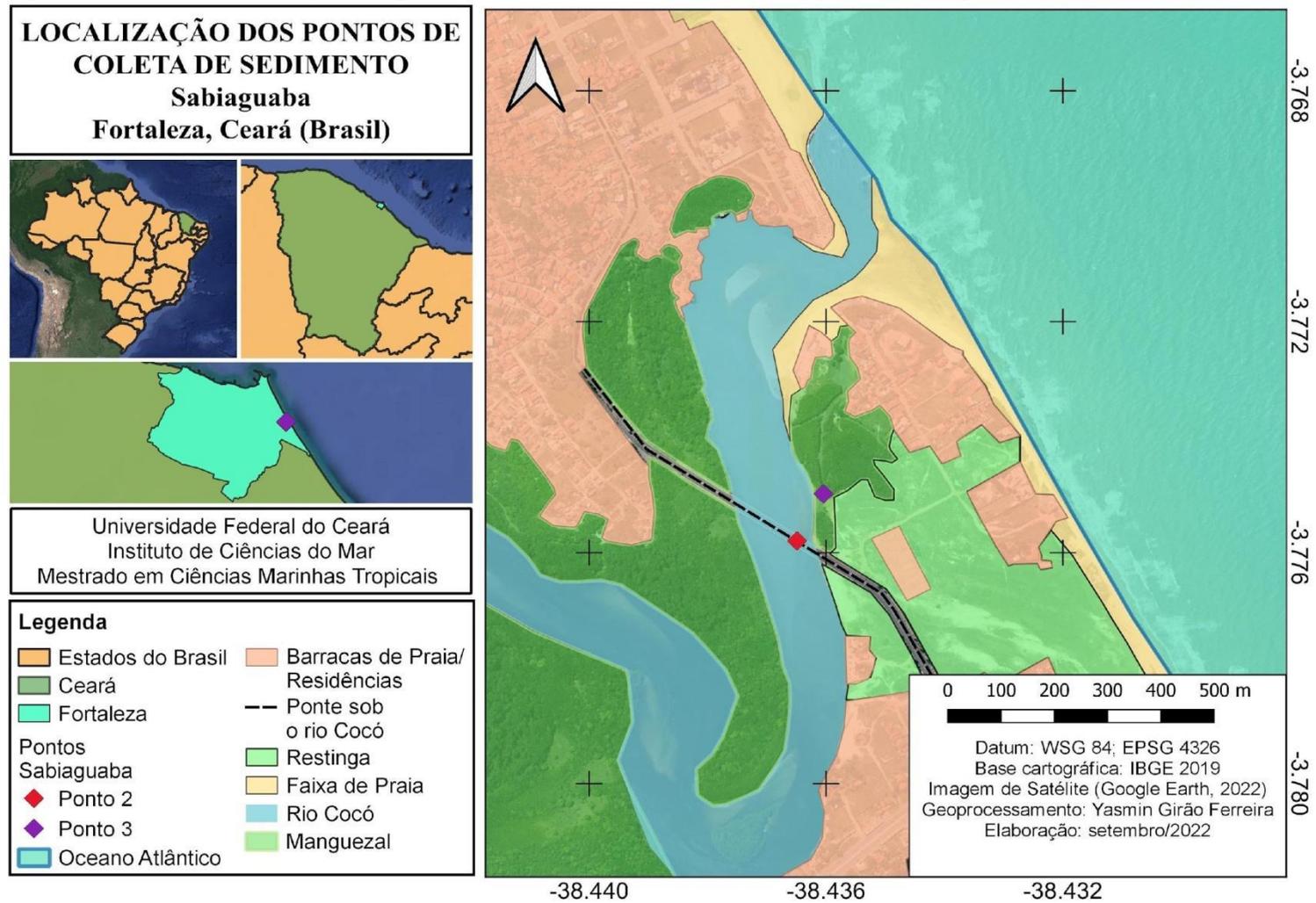
4.1.2 Manguezal Sabiaguaba

A área de estudo localiza-se no bairro da Sabiaguaba, em Fortaleza – CE, litoral leste da cidade e corresponde a região de manguezal do Rio Cocó. Esta área apresenta uma temperatura média anual em torno de 26°C; com um clima quente e úmido, em função da elevada precipitação; e semiárido, devido à forte evaporação (SOUZA; SILVA; VASCONCELOS, 2011). As principais espécies vegetais arbóreas presentes nesse ecossistema são: o mangue-vermelho (*Rhizophora mangle*), o mangue branco (*Laguncularia racemosa*), mangue-preto (*Avicennia germinans* e *Avicennia schaueriana*) e o mangue-botão (*Conocarpus erecta*). Essa vegetação desempenha papel de proteção contra inundações, impactos das marés e serve como habitat natural de várias espécies (FORTALEZA, 2010).

O manguezal está inserido na Área de Proteção Ambiental (APA) de Sabiaguaba, no qual foi instituído pelo Poder Público Municipal por meio do Decretos 11.987, em fevereiro de 2006 (BARROS *et al.*, 2021). Apesar de ser protegida por amplas legislações, essa área não recebe atenção socioambiental merecida. E é submetida a intensos processos de degradação associados ao intenso fluxo de turistas, a especulação imobiliária, ao lançamento de efluentes domiciliares e resíduos sólidos no rio, a construção de barracas, casas, condomínios pontes e avenidas sobre o rio Cocó (FREIRES, 2014).

Além de descaracterizar a paisagem, esses impactos resultam no assoreamento do rio, no desmatamento da vegetação de mangue, na impermeabilização do solo, na contaminação da água e do solo, na contaminação do lençol freático, na poluição dos rios, na destruição do habitat de diversas espécies da fauna local, na redução da biodiversidade da fauna e flora, na eutrofização do rio (LOPES *et al.*, 2019).

Figura 4 – Área de localização dos pontos de coletas de sedimento (Manguezal Sabiaguaba – Fortaleza – CE).



Fonte: Autora.

4.2 Coleta das amostras

Os sedimentos coletados estavam submersos e foram coletados até uma profundidade de 30 cm usando um amostrador manual. Em seguida armazenados em sacos de PVC e transportadas sob refrigeração até o Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LAMAP). Uma parte das amostras de sedimento foi refrigerada para análises físico-químicas de pH, temperatura, carbono, nitrogênio e fósforo, e a outra parte foi utilizada para o processamento imediato das análises microbiológicas.

No Açude Santo Anastácio, as amostras foram coletadas em um ponto na margem do corpo hídrico, no dia 24 de junho (período de estiagem) de 2022. No manguezal da Sabiaguaba, as amostras foram coletadas no dia 26 de julho (período de estiagem) de 2022 e em dois pontos.

4.3 Propriedades físico-químicas do solo

A temperatura foi medida *in situ* usando um termômetro (INCOTERM). A salinidade foi estimada usando um refratômetro de marca ATAGO S/MILL. O pH foi medido em uma suspensão de 1,0:2,5 solos/águas (g/mL) usando um medidor de pH de marca MARCONI-PA 200P. (CLAESSEN, 1997).

Os compostos químicos como fósforo, carbono e nitrogênio foram medidos no Laboratório de Biogeoquímica Costeira.

4.3.1 Fósforo total (FT)

O fósforo total foi determinado seguindo a metodologia adaptada de Berner & Rao (1994). A análise foi realizada em três etapas: calcinação, extração ácida com HCl 1,0M e leitura em espectrofotômetro de duplo feixe (AJX - 6100 PC) com comprimento de onda de 880 nm. O fósforo total, portanto, é quantificado por espectrofotometria que relaciona a concentração com absorvância através da Lei de Lambert-Beer.

Com base nos dados obtidos da absorvância, foi construído uma curva de calibração de absorvância versus concentração de sulfato, para obter, através de regressão linear, a equação da reta, que está descrita abaixo.

$$y = Ax \pm B$$

$$\rightarrow ABS = AC \pm B$$

$$\rightarrow C = \frac{ABS - B}{A} \quad (2)$$

Onde:

Y = Absorbância medida no equipamento (ABS)

A = Coeficiente angular da equação da reta

B = Coeficiente linear da equação da reta

X = Concentração (C)

Caso exista diluição multiplicar pelo fator de diluição.

4.3.2 Carbono Orgânico Total (COT)

Para a determinação de carbono total do sedimento foi utilizado o método baseado na oxidação do dicromato (YEOMANS; BREMNER, 1988). A matéria orgânica do sedimento foi oxidada com uma solução de $K_2Cr_2O_7$ 0,167 mol L⁻¹, sob aquecimento de 170 °C em um bloco digestor. Em seguida, o excesso de dicromato foi titulado com solução de sulfato ferroso amoniacal.

Foram feitos 6 brancos controles nas mesmas condições, mas sem amostras de sedimento. No qual, 3 foram levados à digestão e os outros três permaneceram sem aquecimento, em temperatura ambiente. O branco controle não aquecido é fundamental para o cálculo do total de dicromato perdido no aquecimento sem amostra.

A porcentagem de carbono orgânico é calculada com base no volume da solução de Sal de Mohr gasto na titulação da amostra (V), do branco aquecido (Vba) e do branco não aquecido (Vbn), conforme as equações:

$$A = \frac{(Vba - Vam) \times (Vbn - Vba)}{Vbn} + (Vba - Vam) \quad (3)$$

Onde:

Vba = volume gasto na titulação do branco controle com aquecimento.

Vbn = volume gasto na titulação do branco controle sem aquecimento.

Vam = volume gasto na titulação da amostra.

$$\text{CO (dag} \cdot \text{Kg}^{-1}) = \frac{A \times \text{concentração do sulfato ferroso} \times 3 \times 100}{\text{peso da amostra (mg)}} \quad (4)$$

Onde:

3 = resultado da relação entre número de mols de Cr_2O_7^- que reagem com Fe^{2+} (1/6), multiplicado pelo número de mols de Cr_2O_7^- que reagem com o C^0 (3/2), multiplicado pela massa atômica do carbono (12).

100 = fator de conversão de unidade ($\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1}$ para $\text{dag} \cdot \text{kg}^{-1}$).

4.3.3 Nitrogênio Total (NT)

A determinação do NT foi realizada utilizando a metodologia adaptada de Bremner e Mulvaney (1982) e Tedesco *et al* (1995). Esse método baseia-se na conversão do nitrogênio orgânico contido na amostra em íon amônio (NH_4^+) por digestão sulfúrica e a digestão desse em meio alcalino (destilação).

A digestão sulfúrica da amostra é feita em bloco digestor com a adição de uma mistura digestora (Na_2SO_4 , CuSO_4 e selênio metálico). O produto da digestão foi colocado no destilador de Kjeldahl com a adição de hidróxido de sódio e ácido bórico. Após a destilação, foi coletado 40 mL do destilado e foi feita a titulação com HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$. O volume titulado foi definido quando a solução mudou a coloração de verde para róseo.

Os valores de NT foram calculados de acordo com a equação abaixo.

$$\text{N (dag} \cdot \text{Kg}^{-1}) = \frac{(V_{am} - V_{br}) \times [H^+] \times 1,4}{\text{peso da amostra (g)}} \quad (5)$$

Onde:

V_{am} = volume de HCl gasto na titulação da amostra;

V_{br} = volume de HCl gasto na titulação do branco;

$[H^+]$ = concentração real de ácido clorídrico (mol/L)

1,4 = peso equivalente de nitrogênio (14) dividido por 10 (conversão de unidade de g/kg em dag/kg).

4.4 Análises microbiológicas

4.4.1 Meios de cultura utilizados

Para o cultivo de bactérias anammox foi utilizado um caldo mineral composto por elementos traços (M1). Para o isolamento e purificação das bactérias foram utilizados dois meios de cultura: o primeiro é uma solução composta por elementos traços mais ágar (M2) e o segundo meio de cultura foi o Ágar peptona (M3). Os meios M1 e M2 foram elaborados de acordo com Qin e Zhou (2009) e estão descritos na Tabela 1. O pH dos três meios de cultura (M1, M2 e M3) foram ajustados com uma solução de NaHCO₃ para cerca de 7,6.

Tabela 1 – Composição dos meios de cultura usados no enriquecimento das bactérias anammox (M1) e no isolamento e purificação das bactérias (M2).

M1		M2	
Substâncias	Concentração (g/L)	Substâncias	Concentração (g/L)
KH ₂ PO ₄	0,027	NH ₄ Cl	1,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,3	NaNO ₂	0,5
CaCl ₂	0,136	Glucose	1,5
NaHCO ₃	0,5	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5
NH ₄ Cl	0,11	KH ₂ PO ₄	0,7
NaNO ₂	0,15	CaCl ₂	0,3
EDTA	0,0005	NaCl	0,2
FeSO ₄	0,0005	NaHCO ₃	0,5
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,0004	Ágar	17,0
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,00025	-	-
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,0001	-	-
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0,0002	-	-
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,00024	-	-
H ₃ BO ₄	0,000014	-	-

Fonte: Adaptado de Qin e Zhou (2009).

4.4.2 Processamento das amostras

Seguindo a metodologia de Ferreira (2020), 10g das amostras de sedimento foram homogeneizadas, separadamente, em Erlenmeyers contendo 90mL do meio M1, e colocadas em jarra de anaerobiose (PERMUTION) por 14 dias com um sequestrador de oxigênio, em temperatura ambiente. Após este período foram feitas 5 diluições seriadas em solução salina

0,85% e alíquotas foram inoculadas pela técnica de *Pour Plate* em placas de Petri contendo os meios M2 e Ágar Peptona (M3), em triplicata. As placas foram incubadas em estufas bacteriológicas a 35°C/5 dias. Após o período de incubação, o crescimento nos meios de cultura foi usado na quantificação bacteriana por meio do método de Contagem Padrão de Placas, conforme mostrado na Equação 5 (DOWNES; ITO, 2001).

$$UFC/mL = \frac{M \times D}{V} \quad (6)$$

Onde:

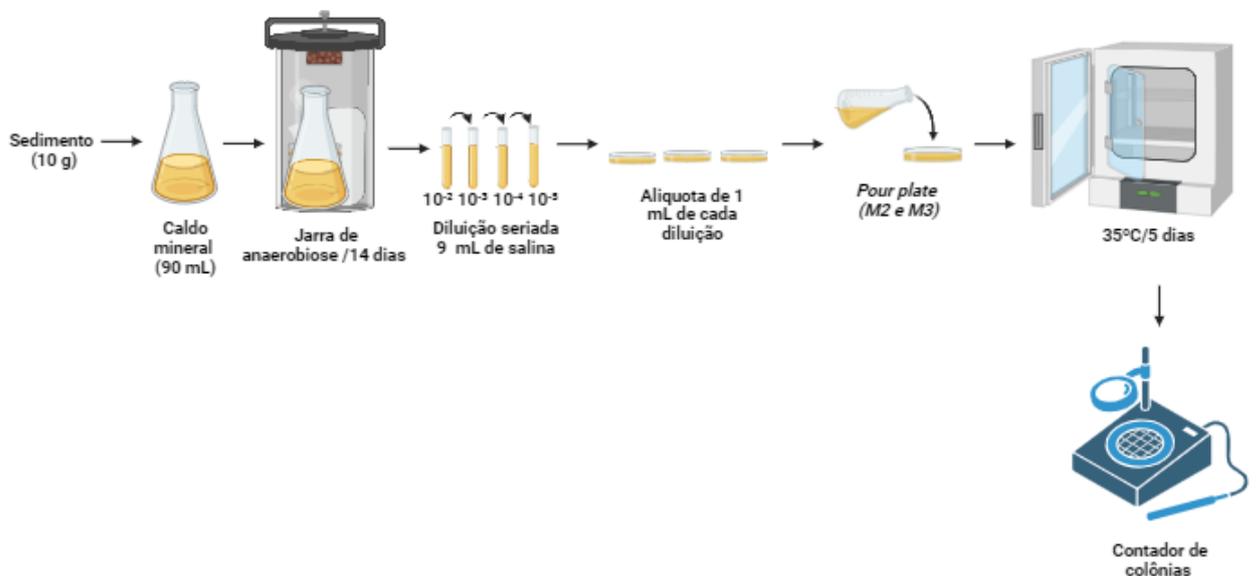
M: Média das colônias obtidas em placas da mesma diluição;

V: Volume inoculado nas placas;

D: Inverso da diluição inoculada, referente às placas onde foram obtidas as contagens.

O Fluxograma dessa metodologia está representada na Figura 5.

Figura 5 – Fluxograma do processamento das amostras de sedimento.



Fonte: Autora.

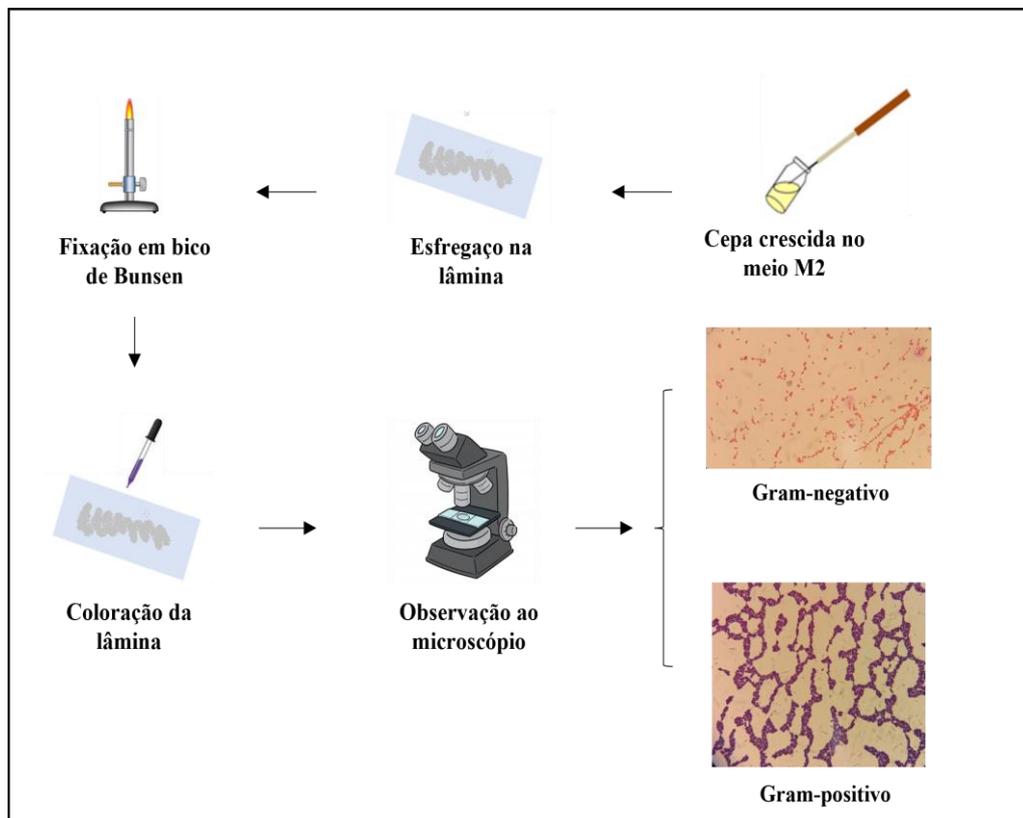
4.4.3 Isolamento microbiano

A partir do crescimento nos meios de culturas (M2 e M3) foram selecionadas 80 colônias do Açude Santo Anastásio, sendo 40 colônias isoladas do meio M2 e 40 do meio M3. No Manguezal da Sabiaguaba também foram selecionadas 80 colônias, (40 do meio M2 e 40 do M3). O critério para repicar e isolar essas colônias foram as que apresentaram uma pigmentação coloridas, brancas ou transparentes; formas diferentes (esféricas, estreladas, fusiformes, planas); e que fossem aerotolerantes, ou seja, as colônias que cresceram no meio ou no final do meio de cultura, longe do oxigênio. As estirpes foram armazenadas em tubos de ensaio contendo o meio M2, para serem utilizadas nos próximos testes microbiológicos.

4.4.4 Identificação Morfotintorial

A análise da morfologia e da estrutura da parede celular das bactérias anammox aerotolerantes foi realizada pela técnica de coloração de Gram (FIGURA 6) (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Figura 6 – Fluxograma que representa a técnica de coloração de Gram.



4.4.5 Teste de eficiência das bactérias na conversão de nitrogênio

Para testar a eficiência das bactérias na transformação de amônia e nitrito em gás nitrogênio (N₂), foi realizado um teste *in vitro* utilizando dois meios de cultura seletivo para o crescimento de bactérias autotróficas e nitrificantes; e o reagente revelador Griess-Ilosvay, conhecido internacionalmente para detectar íons nitritos. A composição do meio de cultura utilizado neste teste está descrita no Quadro 1, de acordo com Marín *et al.* (2014).

Quadro 1 – Elementos traços e quantidades compostas aos meios seletivos utilizados na quantificação dos componentes bacterianos pertencentes ao ciclo do nitrogênio.

Compostos (g/L)	Meio nitrito (bactérias oxidadoras de nitrito)	Meio amônia (bactérias oxidadoras de amônia)
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	0,5
KNO ₂	0,01	-
KH ₂ PO ₄	0,027	0,027
K ₂ HPO ₄	1,0	1,0
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,03	0,03
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1	0,3
CaCO ₃	1,0	7,5
CaCl ₂	0,3	0,01
Elementos traços	1 mL	1 mL

Fonte: Marín *et al.* (2014).

A composição da solução de elementos traços usados para preparar os meios de cultura, para cada 1 litro, está descrita no quadro abaixo.

Quadro 2 – Quantidades de elementos traços compondo os meios de cultura seletivos.

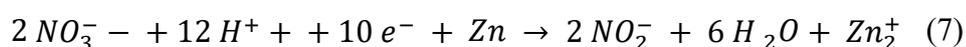
Compostos (g/L)	Elementos traços
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,1
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,02
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,002
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,1
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,02

Fonte: Marín *et al.* (2014).

As bactérias pré-selecionadas nos testes anteriores foram diluídas em solução salina 0,85% e o inóculo ajustado de acordo com a escala de McFarland (0,5), com a finalidade de atingir a concentração celular de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Em seguida, alíquotas de 200 µL foram inoculadas em tubos de ensaios contendo 2 mL do meio nitrito. Os tubos com meio nitrito foram incubados em dois ambientes diferentes: 1) em estufa bacteriológica a 35 °C; 2) em jarra de anaerobiose em temperatura ambiente. A incubação ocorreu simultaneamente nos dois ambientes, por um período de 14 dias. Os tubos com meio amônia e nitrito foram incubados apenas em estufa bacteriológica em aerobiose (FIGURA 7).

Passado o período de incubação, o reagente Griess-Ilosvay foi adicionado as culturas bacterianas (VARGAS-MAYA *et al.*, 2021). Nesse processo, o nitrito reage com a sulfanilamida em um ambiente ácido, resultando na formação de um composto diazo que, por sua vez, reage com o cloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina (NED), originando um composto de coloração rosa intensa (FABRIS; JOÃO; BORGES, 2020). Portanto, a presença de uma coloração rosa nos tubos de ensaio indicou a presença de nitrito, sendo o teste negativo para a conversão de nitrito em nitrato (NO₃-) ou gás nitrogênio (N₂). Se a coloração continuar transparente, significa que o teste deu positivo e o nitrito foi reduzido a NO₃⁻ ou N₂.

Após o resultado positivo, foi adicionado uma pequena quantidade de zinco em pó, se o nitrato estiver presente no tubo, na presença do zinco ele será reduzido a nitrito e o meio ficará rosa. A equação de redução de nitrato em nitrito utilizando o zinco como redutor está descrito na equação abaixo.



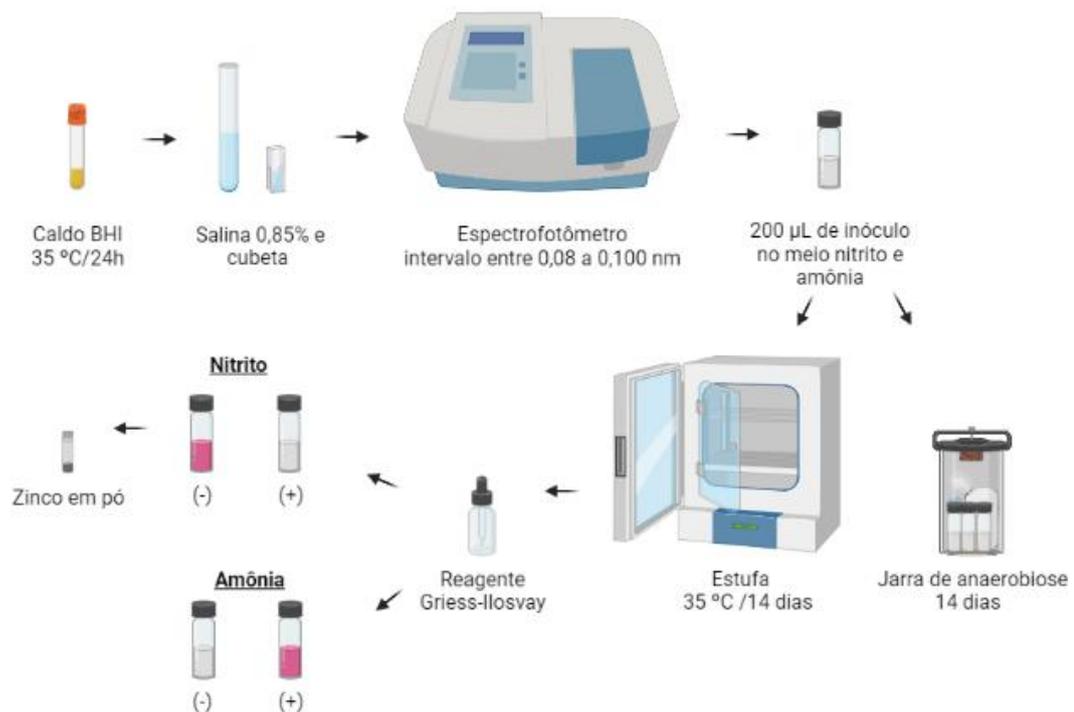
Após a adição de zinco, se o nitrato não foi reduzido em nitrito, isso sugere que não houve a formação de nitrato, e o nitrito foi convertido em outro composto como NO ou N₂

(SAHANA *et al.*, 2023; ZHANG *et al.*, 2007). A equação abaixo representa a conversão de nitrito em gás nitrogênio usando o Zn como agente redutor.



O Fluxograma dessa metodologia está representada na Figura 7.

Figura 7 – Fluxograma que representa a metodologia do teste de eficiência com método Griess-Illosvay.



Fonte: Autora.

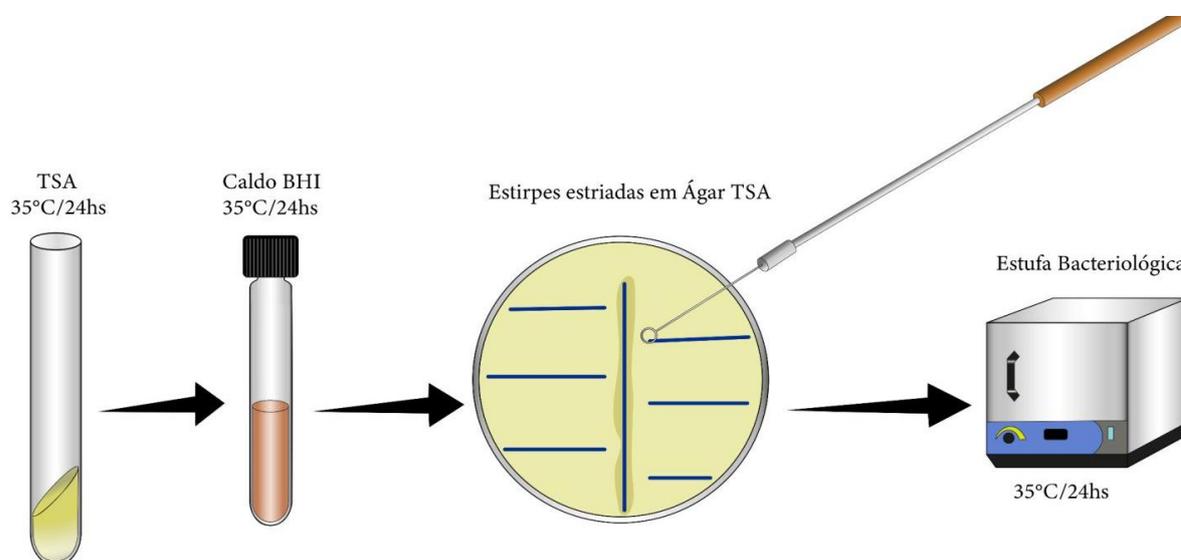
4.4.6 Teste de antagonismo bacteriano (*in vitro*)

As estirpes selecionadas do teste de eficiência de conversão de amônia a nitrito e a gás nitrogênio, foram submetidas ao teste de antagonismo, com o objetivo de montar diferentes consórcios microbianos com antagonismo negativo. As estirpes foram separadas em dois grupos para a realização desse teste. No grupo 1 foram testadas as cepas eficientes na conversão de nitrogênio na presença de oxigênio. No grupo 2, as cepas eficientes apenas na ausência de oxigênio.

Para o teste de antagonismo seguiu-se a metodologia, com adaptações, da técnica de estrias cruzadas (*Cross streak*) (YOSHIDA *et al.*, 2009). As culturas bacterianas foram inoculadas em *Caldo Brain Heart Infusion* (BHI) e incubadas a 35° C por 24h. A partir do crescimento das estirpes, foi feita uma estria vertical no centro da placa com o meio de cultura *Ágar Trypic Soy* (TSA), e em seguida foram feitas estrias horizontais e perpendiculares à estria central, com uma distância de aproximadamente 0,5 cm. Depois de estriadas, as placas foram incubadas em estufa a 35° C por 24h.

O fluxograma da metodologia está representado na Figura 8.

Figura 8 – Fluxograma do teste de antagonismo.



Fonte: Oliveira (2019).

O teste foi dividido em três etapas. A primeira, para os grupos de estirpes bacterianas que conseguiram converter nitrato em N_2 na presença e na ausência de oxigênio. A segunda, para os grupos que fizeram a conversão apenas na ausência de oxigênio. E a terceira, para os grupos que fizeram a conversão apenas na presença de oxigênio.

O resultado do antagonismo entre as cepas testadas foi considerado positivo (+) quando foi encontrada inibição do crescimento entre as cepas horizontais associadas às cepas verticais, e negativo (-) quando não apresentaram inibição do crescimento próximas umas das outras, ultrapassando 0,5 cm e sem formação de halo entre eles. Cepas exibindo antagonismo negativo foram as melhores candidatas para formar consórcios.

4.4.7 Formação dos consórcios bacterianos e curva de crescimento

Para a formação dos consórcios bacterianos foram considerados os resultados dos testes de eficiência de conversão dos compostos nitrogenados e atividade antagônica negativa. Inicialmente, as estirpes foram renovadas em ágar TSA e levadas à estufa bacteriológica a 35°C por 24h. Após esse período foram inoculadas, separadamente, em salina 0,85% e ajustadas à Escala de MacFarland 0,5, fazendo uso de espectrofotômetro na faixa de absorvância de 0,08 a 0,100 nm (correspondendo aproximadamente uma concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL).

Em seguida, os consórcios foram construídos com alíquotas de 1mL de cada estirpe bacteriana em tubos falcon estéreis contendo caldo mineral (M1) com volume final total de 40mL (meio de cultura + estirpes). Os tubos foram colocados em estufa bacteriológica por um período de 30 dias a 35° C.

Para acompanhar a curva de crescimento, foram retiradas alíquotas de 1mL da amostra de cada consórcio para a leitura de crescimento bacteriano no espectrofotômetro, durante esses 30 dias. A partir do início foram feitas leituras nos tempos 0h, 2h, 4h, 6h, 19h e 24h. Depois, as leituras foram feitas com 3, 4, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 20 e 30 dias. Foi usado um controle negativo contendo caldo mineral (M1) sem o inóculo bacteriano. O experimento foi realizado em triplicata.

O fluxograma da metodologia está representado na Figura 9.

Figura 9 – Fluxograma da formação dos consórcios e crescimento microbiano



Fonte: Autora.

4.4.8 Detecção de genes funcional em bactérias anammox

4.4.8.1 Extração do DNA total

Foi realizada a identificação genética das estirpes pertencentes aos consórcios microbianos e das estirpes que apresentaram resultado positivo na conversão de amônia e nitrito. Essas culturas microbianas foram inoculadas em caldo BHI e incubadas a 35° C por 24-48h. Após esse período, foi retirada uma alíquota de 2 mL do inóculo e transferida para microtubos. O kit comercial utilizado para a extração do DNA total foi o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) de acordo com as instruções do fabricante.

A eficiência do protocolo foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1%. Para isso, foi preparado um mix contendo 2µL do corante Blue Juice, 1 µL do GelRed™ (500x) e 5 µL da amostra de DNA extraído. Cada mix foi colocado no poço de gel de agarose e submetido à corrida a 120V/30min. O tampão utilizado foi o Tris-EDTA (45 mM; pH 7,8 [1 mM EDTA]). Após a corrida o gel foi registrado em equipamento de fotodocumentação digital (Kodak® EDAS290).

4.4.8.2 Amplificação do DNA por PCR

Após a extração do DNA total, foi feita a amplificação do gene *hzs*, utilizando o par de *primers* *hzsA_526F* (5' - TAYTTTGAAGGDGACTGG - 3') e *hzsA_1857R* (5'-AAABGGYGAATCATARGGC - 3') (YANG *et al.*, 2020b; HARHANGI *et al.*, 2012). O protocolo térmico de amplificação consistiu nas seguintes etapas: 5 min a 96 °C, depois 35 ciclos de 1 min a 95 °C, seguidos de 1 min a 48°C e 2 min a 72°C, e uma extensão de 8 min a 72°C (RUSS, *et al.*, 2013).

A identificação e a dimensão dos produtos de amplificação foram determinadas por meio da análise visual comparativa dos pares de bases do DNA verificados e das faixas do marcador de peso molecular de 1KB. Esse processo foi conduzido utilizando eletroforese em gel de agarose a 1,0% em tampão TAE, com uma voltagem de 70 V, corrente de 300 mA, e potência de 120 W, durante 30 minutos. A confirmação da detecção positiva ocorreu ao observar uma banda de DNA com aproximadamente 1331 pares de bases, correspondendo ao tamanho esperado.

4.5 Análise estatística

A análise estatística dos dados da curva de crescimento foi conduzida com o auxílio do software R. Inicialmente, a normalidade dos dados foi verificada por meio do teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965), enquanto a homogeneidade das variâncias foi avaliada pelo teste não paramétrico de Levene (LEVENE, 1960).

Para verificar se existiam diferenças estatisticamente significativas nas medianas dos grupos de consórcios anammox, empregou-se o teste de Kruskal-Wallis (KRUSKAL; WALLIS; 1952). Este teste não paramétrico foi aplicado devido à falta de conformidade dos dados com a distribuição normal ($p > 0,05$).

A seguir, para identificar quais pares de grupos apresentavam diferenças significativas, procedeu-se com o teste de Dunn (DUNN, 1964), um teste pós-hoc de comparação múltipla pareada. Os resultados obtidos com o teste de Dunn foram posteriormente ajustados utilizando o método de Holm (HOLM, 1979), visando controlar a taxa global de erro tipo I durante as comparações múltiplas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Parâmetros físico-químicos das amostras de sedimento

A tabela 2 mostra o resultado dos parâmetros físico-químicos registrados do Açude Santo Anastácio e do Manguezal da Sabiaguaba.

Tabela 2 - Parâmetros físico-químicos das amostras nos pontos estudados.

Locais da coleta	Pontos	pH	Temperatura (°C)	Salinidade (g/L)	COT (%)	NT (g/Kg)	FT (µg/g)
Açude Santo Anastácio	1	6,84	28	0	0,37 ± 0,04	0,12 ± 0,01	19,32 ± 0,048
Manguezal Sabiaguaba	2	7,52	25	5	0,11 ± 0,05	0,02 ± 0,01	48 ± 3,05
	3	7,96	27	5	1,90 ± 0,23	0,51	94,82 ± 74,06

Fonte: Autora. Nota: Os valores de Carbono Orgânico Total (COT), Nitrogênio Total (NT) e Fósforo Total (FT) representam a média ± desvio padrão.

Em relação ao açude, o pH do solo foi identificado como mais ácido (6,84). Em concordância com o presente estudo, Zhu *et al.* (2015) provaram a presença e atividade das bactérias anammox em rios com pH entre 3,88 e 8,91. A salinidade apresentou um valor igual a 0 e, devido a isso, o açude pode ser classificado como um corpo receptor de água doce, em função da sua salinidade estar abaixo de 0,5‰ (BRASIL, 2005).

No manguezal, o pH do solo estava mais básico, com 7,52 no ponto 2 e 7,6 no ponto 3. Esses valores de pH são ótimos para o crescimento de bactérias anammox, uma vez que estudos indicam que a faixa ideal de pH é próxima a 8,0 (CAO *et al.*, 2021; TOMASZEWSKI; CEMA; ZIEMBIŃSKA-BUCZYŃSKA, 2017). A salinidade registrada foi de 5 g/L, um valor aceitável para o desempenho das bactérias anammox (YA *et al.*, 2021).

A temperatura dos dois ambientes apresentou uma variação entre 25 a 28° C. Apesar da temperatura ideal de crescimento ser de 35 a 40 °C (LI *et al.*, 2023), em ambientes naturais as bactérias anammox podem sobreviver a uma ampla faixa de temperaturas (-5 a 80 °C) (LE *et al.*, 2022; SOBOTKA; ZHAI; MAKINIA, 2021). Cepas específicas de Anammox, como *Ca. Kuennia*, *Ca. Brocadia* e *Ca. Jettenia*, exibem a capacidade de crescimento em águas residuais a 10°C, sugerindo que as bactérias anammox empregadas no processo de tratamento de águas residuais têm o potencial de prosperar em temperaturas mais baixas (WANG *et al.*, 2022; TOMASZEWSKI *et al.*, 2017).

Os valores de nitrogênio total registrados variaram de 0,02 a 0,51 g/Kg, sendo consideravelmente baixos em comparação com as descobertas de Hu *et al.* (2022). Nesse estudo, os pesquisadores analisaram a estrutura da comunidade e a abundância das bactérias anammox em sedimentos eutrofizados do Lago Tangxun, na China, com o objetivo de compreender os efeitos dos fatores ambientais sobre essas bactérias. A análise de sete amostras de sedimentos revelou uma faixa de nitrogênio total entre 4,0 e 9,9 g/Kg. Observou-se uma correlação positiva significativa entre a abundância das bactérias anammox e os níveis de nitrogênio total, amônia, nitrito e matéria orgânica.

A variação na concentração de COT foi observada entre 0,11 e 1,90, valores que se mostram relativamente baixos em comparação aos resultados obtidos em sedimentos de um lago na China. Neste último estudo, foi identificada a presença de bactérias anammox em sedimentos com uma faixa de COT que variava de 7,9 a 10% (DING *et al.*, 2022). Além disso, Meiyun *et al.* (2018) constatou que o carbono orgânico tem o potencial de inibir as bactérias anammox no sedimento de lagoas, ao mesmo tempo em que estimula o crescimento das bactérias desnitrificantes.

O fósforo total apresentou uma variação entre 19,32 a 94,82 µg/g. Chen *et al.* (2019) analisaram a influência de determinados nutrientes, como o fósforo total, sob a abundância e diversidade das bactérias anammox nos sedimentos rio Yangtze, na China, com o total de 23 amostragem ao longo do rio. Neste trabalho, o fósforo total apresentou uma variação entre 42 e 1120 µg/g, não exibindo influência significativa na abundância e diversidade bacteriana anammox.

5.2 Quantificação Microbiana (Contagem padrão em placa)

Na tabela 3 têm-se o resultado da densidade populacional das bactérias anammox aerotolerantes, isoladas de um ambiente de água doce (ponto 1) e ambiente de água salina (pontos 2 e 3), cultivadas em um meio de cultura seletivo para bactérias anammox (M2) e outro meio não seletivo, Ágar peptona (M3).

Tabela 3 – Média do número de bactérias aerotolerantes nas amostras de sedimento do Manguezal da Sabiaguaba e do Açude Santo Anastácio (Fortaleza – CE), inoculadas em dois diferentes meios de cultura.

Locais da coleta	Pontos	Meios de cultura	Bactérias aerotolerantes (UFC/g)
Açude Santo Anastácio	1	M2	$2,1 \times 10^4 \pm 37,07$
		M3	$4,9 \times 10^6 \pm 10,01$
Manguezal Sabiaguaba	2	M2	$1,6 \times 10^2 \pm 2,64$
		M3	$5,0 \times 10^5 \pm 13,42$
Manguezal Sabiaguaba	3	M2	$5,6 \times 10^2 \pm 25,57$
		M3	$2,2 \times 10^5 \pm 21,07$

Fonte: Autora.

Nos 3 pontos de coleta, o crescimento bacteriano foi maior a partir das amostras inoculadas no meio não seletivo M3. E menor nas amostras do meio seletivo M2, por ser um meio composto por reagentes que permitem o crescimento apenas de alguns microrganismos, como as anammox.

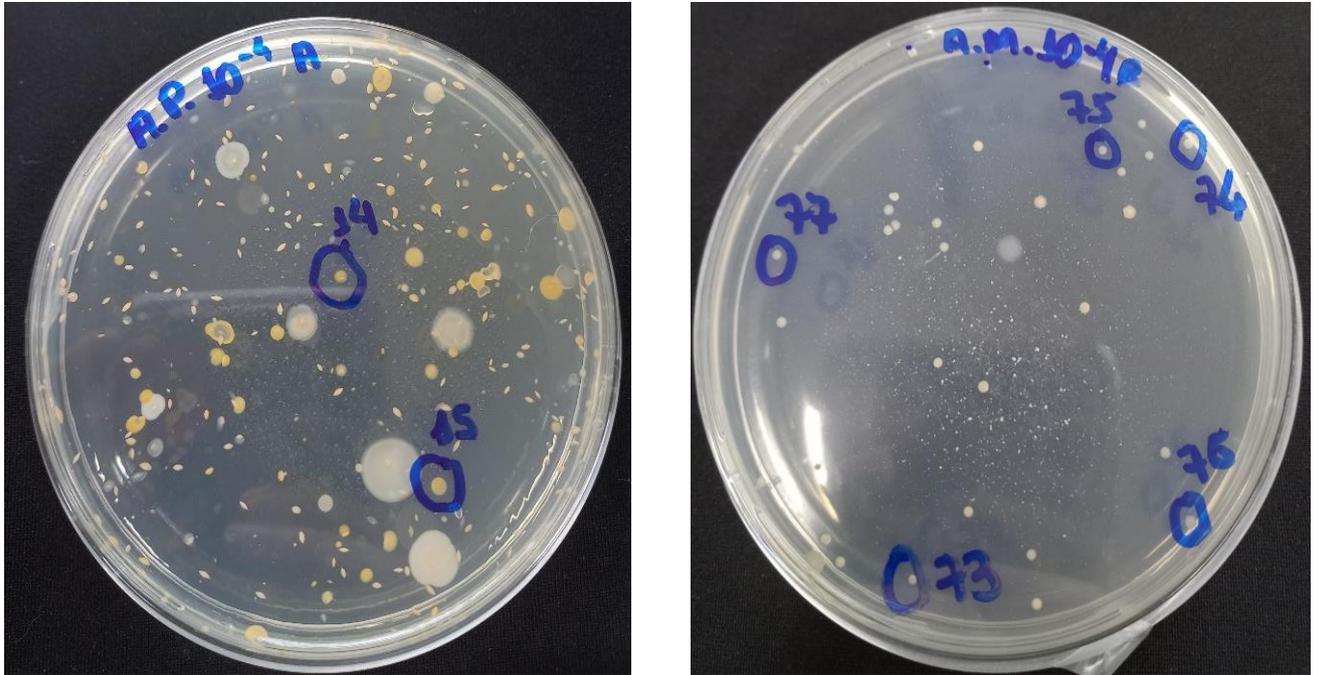
As maiores contagens das bactérias foram registradas nas amostras inoculadas em meio de cultura não seletivo no açude Santo Anastácio (Ponto 1) e no manguezal (Ponto 2). Esses valores maiores são esperados, uma vez que o meio Ágar peptona é elaborado para permitir o crescimento de um amplo espectro de microrganismos, permitindo uma visão ampla da microbiota cultivável nas amostras analisadas.

Nas amostras de manguezal pode-se observar contagens menores dos grupos bacterianos. Nesse caso, a salinidade do ambiente pode ser a responsável pela menor contagem de UFC por grama de sedimento. Estudos apontam redução da atividade bacteriana anammox devido a elevada concentração de sais (JEONG *et al.*, 2020; PARK *et al.*, 2021).

5.3 Isolamento e caracterização morfofotintorial das bactérias

Do total de 160 estirpes isoladas, 100 estirpes conseguiram ser cultivadas em tubos de ensaio com meio seletivo para anammox (M2), com o crescimento em até 1 dia. A Figura 10 demonstra algumas dessas estirpes que foram isoladas das placas de petri e inoculadas em tubos de ensaio.

Figura 10 – Colônias de bactérias escolhidas para o isolamento, e crescidas em placa de petri contendo meio de cultura ágar peptonato e ágar anammox (M2).

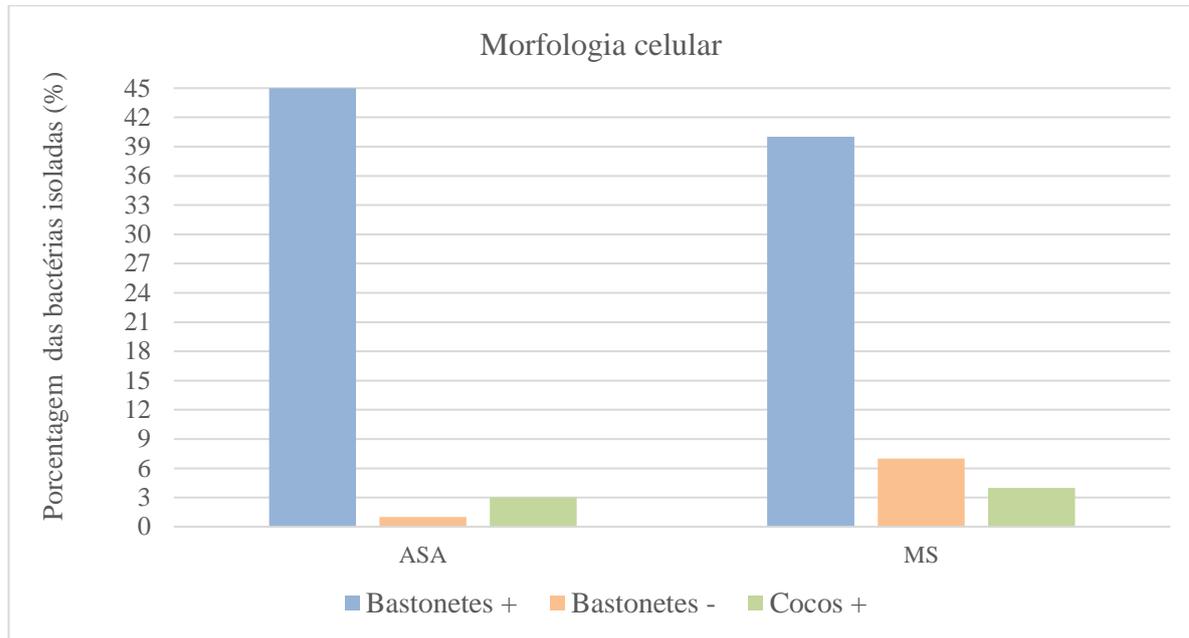


Fonte: Autora.

Das 100 estirpes, 49 (49%) foram isoladas das amostras de sedimento do açude Santo Anastácio (ASA) e 51 (51%) do manguezal da Sabaguaba. Em se tratando da morfologia e coloração de Gram as estirpes bacterianas isoladas do ASA, 45 (92%) são bastonetes Gram-positivos, 1 (2%) é Gram-negativa e 3 (6%) são cocos Gram-positivos (GRÁFICO 1).

Em relação às estirpes isoladas do MS, 40 (78%) são bastonetes Gram-positivos, 7 (14%) são bastonetes Gram-negativos e 4 (8%) são cocos Gram-positivos.

Gráfico 1 – Porcentagem total das estirpes de acordo com a morfologia e a característica celular dos dois ambientes estudados (ASA e MS).



Fonte: Autora. ASA: Açude Santo Anastácio. MS: Manguezal da Sabiaguaba.

Apesar da bibliografia identificar as bactérias anammox como Gram-negativas (LI *et al.*, 2022; TRINH *et al.*, 2021), a maioria das estirpes isoladas apresentou morfologia de bastonetes Gram-positivos (85%), seguido por bastonetes Gram-negativos (8%) e cocos Gram-positivos (7%). Isso mostra que essas estirpes com potencial atividade anammox apresentam maior diversidade do que os grupos anammox identificados na literatura.

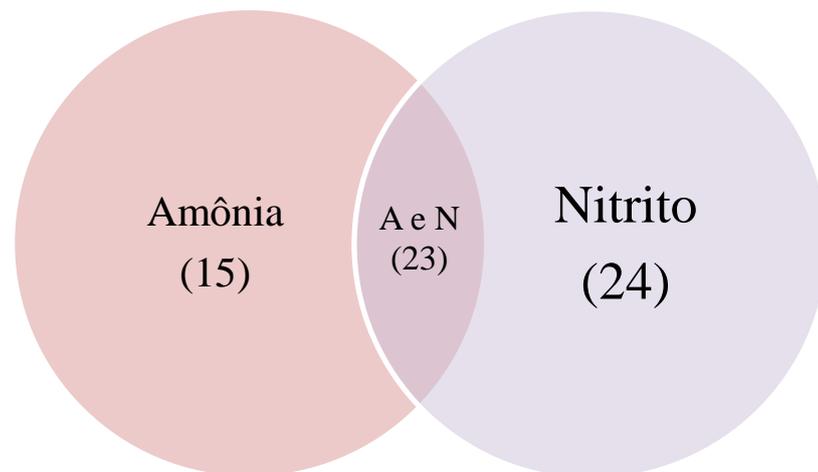
Conforme documentado na literatura, as bactérias anammox costumam apresentar morfologias típicas, incluindo formas irregulares e de cocos (WU *et al.*, 2022). Recentemente, Du, Peng e Cao (2022) realizaram observações em um reator Anammox-UASB, empregado para a remoção de nitrogênio de águas residuais, e notaram a presença de lodo granular anammox contendo diversas bactérias com diferentes formatos, incluindo cocos, bacilos e filamentosos. Esses achados sugerem que as bactérias anammox podem assumir diversas morfologias além da forma de cocos, ampliando o entendimento sobre sua diversidade morfológica. No presente estudo, foram identificadas bactérias no formato de cocos e bastonetes (bacilos).

5.4 Teste de eficiência das bactérias na conversão de nitrogênio

Das 100 estirpes avaliadas, um total de 23 estirpes demonstraram capacidade positiva na conversão tanto de amônia (A) em nitrito e de nitrito (N) em gás nitrogênio, sob condições de aerobiose.

Sob condições aeróbias, 15 estirpes converteram amônia em nitrito, enquanto 24 estirpes apresentaram habilidade de converter nitrito em gás nitrogênio. Vinte e duas estirpes foram capazes de fazer essas duas conversões (FIGURA 11). Esse resultado fomenta mais ainda a teoria que as bactérias anammox podem ser aerotolerantes e eficientes na conversão de compostos nitrogenados em gás nitrogênio na presença de oxigênio (YANG *et al.*, 2022).

Figura 11 – Diagrama de Venn representando o número das bactérias isoladas do ASA e MS que apresentaram resultado positivo para a conversão de compostos nitrogenados na presença de oxigênio.



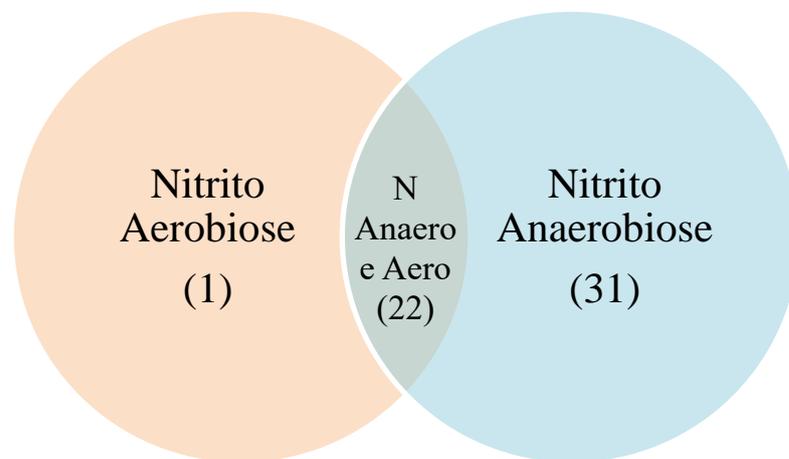
Fonte: Autora. A: Amônia; N: Nitrito.

Em relação à tolerância ao oxigênio, as bactérias anammox marinhas demonstram uma maior resistência e apresentam mecanismos de desintoxicação de oxigênio mais eficazes do que as espécies de água doce (OKABE *et al.*, 2023). Esses resultados contrastam com as descobertas do estudo atual, no qual foram isoladas 11 cepas do Açude Santo Anastácio e 11 do manguezal da Sabiaguaba que conseguem fazer as conversões de compostos nitrogenados que as bactérias anammox fazem na presença de oxigênio.

Quando avaliada a eficiência em condições da conversão do nitrito em aerobiose e anaerobiose, 22 estirpes exibiram resultados positivos na conversão de nitrito em gás

nitrogênio. Além disso, 31 estirpes demonstraram sucesso na conversão de nitrito em gás nitrogênio (N₂) em anaerobiose, com apenas uma estirpe conseguindo converter exclusivamente o nitrito em condições de aerobiose. Os resultados podem ser visualizados na Figura 12.

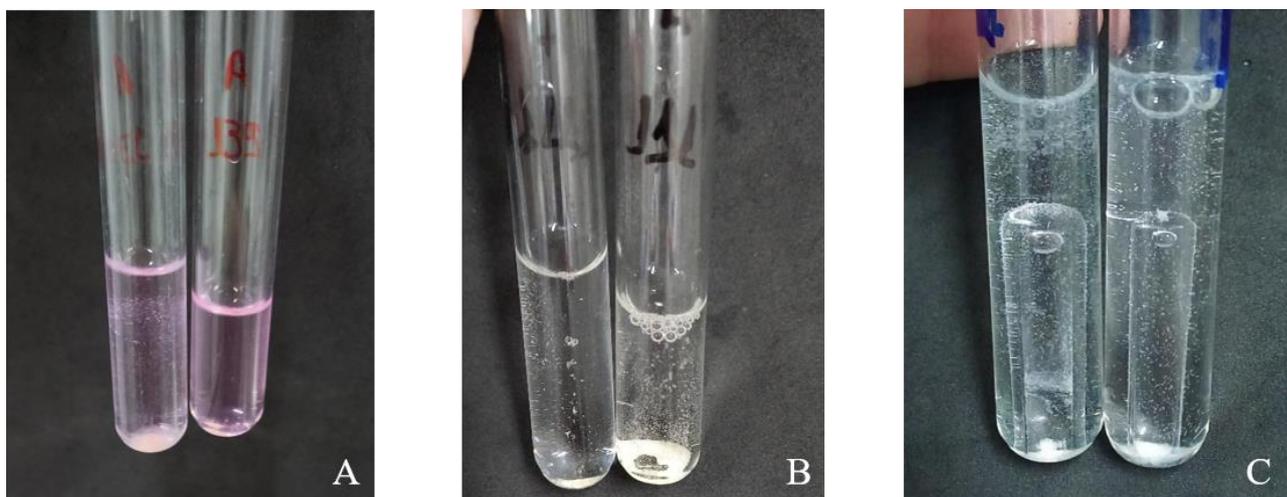
Figura 12 – Diagrama de Venn representando o número das bactérias isoladas do ASA e MS que apresentaram resultado positivo para a conversão de compostos nitrogenados na ausência de oxigênio.



Fonte: Autora. N: Nitrito. Anaero: Anaerobiose. Aero: Aerobiose.

Na figura 13 estão ilustrados os resultados do teste de Griess-Ilosvay, no qual mostra os resultados positivos para a conversão de amônia em nitrito, e a conversão de nitrito em gás nitrogênio.

Figura 13 – Resultados positivos das bactérias eficientes na conversão de amônia e nitrito no teste Griess-Ilosvay.



Fonte: Autora. A: Estirpe positiva para conversão de amônia a nitrito. B: Estirpe positiva pra conversão de nitrito a gás na presença de O₂. C: Estirpe positiva para conversão de nitrito em gás na ausência de O₂.

A reação de Griess, que tem sido empregada desde 1879, é uma técnica de análise química de coloração mais amplamente utilizada para a detecção de íons amônia e íons nitrito. (ZHANG *et al.*, 2023; XIONG *et al.*, 2016). Esse método não fornece uma identificação direta do nitrato, apenas do nitrito. Portanto, é necessário realizar a redução do nitrato para nitrito por meio de um agente redutor apropriado, como o zinco metálico (JAYAWARDANE *et al.*, 2014). Quando o nitrato está presente, essa reação resulta em uma coloração rosa em torno do zinco, indicando a redução do nitrato a nitrito. Por outro lado, a ausência de coloração denota a não formação de nitrato, sugerindo que o nitrito não está mais presente na amostra e, portanto, pode ter sido reduzido a NO, NH₃ e N₂ (JÁUREGUI; CASTILLO, 2017; PEPPER; GERBA, 1995). Diante disso, a ausência de uma resposta positiva nos testes de nitrito após a reação com zinco é uma forte indicação de que o nitrito foi convertido em gás nitrogênio (N₂).

A reação química que exemplifica a adição de zinco e redução de nitrito em nitrogênio gasoso está descrita abaixo.



No presente estudo, os tubos que apresentaram resultados positivos na conversão do nitrito mantiveram-se transparentes após a adição do zinco, indicando que o nitrito não foi transformado em nitrato, mas sim em outro composto nitrogenado. Além disso, observou-se a formação de gás, possivelmente gás nitrogênio, como ilustrado na Figura 13 (B e C).

Além do teste de Griess, para verificar a conversão do nitrito em gás nitrogênio, é fundamental empregar técnicas analíticas como cromatografia gasosa, espectrometria de massa e espectrofotometria no infravermelho. Essas técnicas têm a capacidade de identificar e quantificar gases, incluindo o N₂, com alta precisão. (HATTORI *et al.*, 2020; ZHAO *et al.*, 2020).

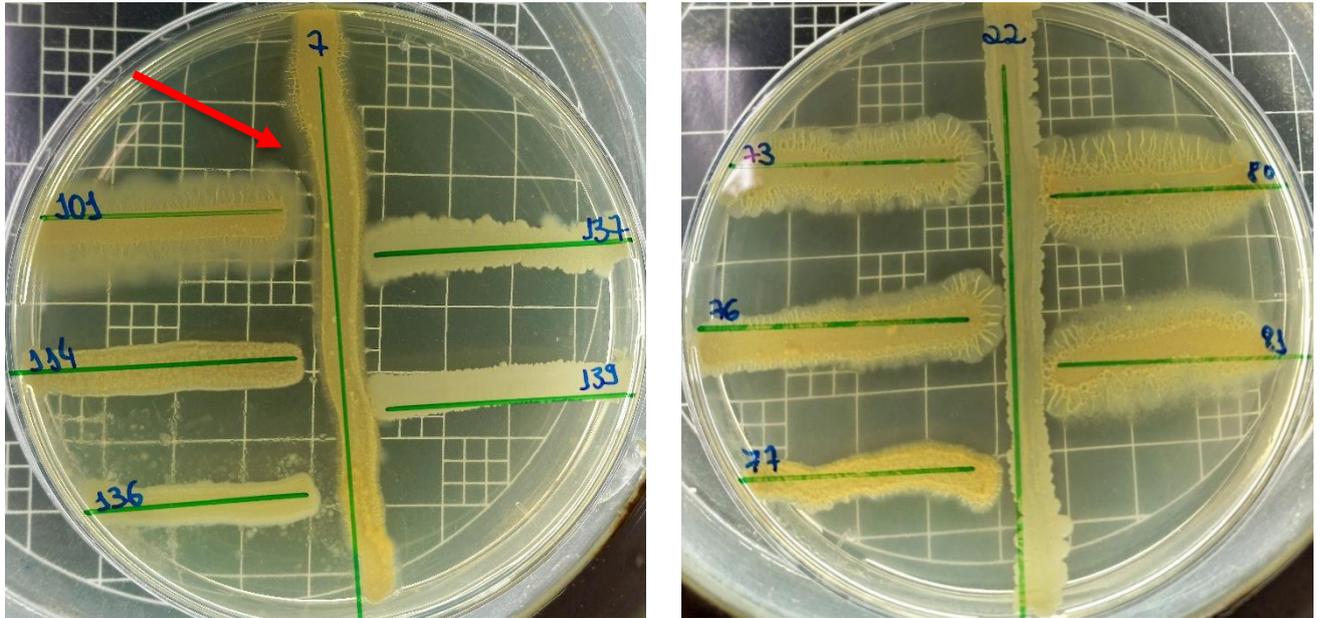
O nitrito e a amônia representam os poluentes mais comuns e amplamente presentes em ecossistemas de água doce e costeiros (HOWARTH *et al.*, 2000). Essa prevalência deriva da disseminação generalizada de fertilizantes químicos e da carência de métodos eficazes de tratamento para os poluentes de nitrogênio presentes em águas residuais industriais e domésticas (YUAN *et al.*, 2023). Portanto, torna-se essencial identificar esses compostos tóxicos, compreender as transformações que eles sofrem e, por fim, eliminá-los por meio de processos biológicos, com as bactérias anammox demonstrando notável eficácia nessa tarefa.

5.5 Teste de antagonismo

O ensaio de antagonismo bacteriano foi conduzido utilizando-se dois grupos distintos. O Grupo 1 consistiu de 43 estirpes, todas elas proficientes na conversão de amônia e nitrito em N₂, tanto sob condições aeróbias quanto anaeróbias. O Grupo 2 foi composto por 34 estirpes que demonstraram habilidade na conversão de amônia e nitrito apenas em condições de ausência de oxigênio.

A avaliação do potencial antagonismo entre as bactérias foi realizada por meio de ensaios em placas de Petri (FIGURA 14). A atividade antagônica foi classificada como positiva (+) quando se observou a inibição do crescimento com o surgimento de halos, ou quando houve um distanciamento evidente entre as cepas dispostas de forma central e perpendicular. Por outro lado, a atividade foi categorizada como negativa (-) quando não ocorreu inibição do crescimento, e as cepas entraram em contato direto ou ficaram sobrepostas umas às outras.

Figura 14 – Teste de antagonismo pela técnica de estrias cruzadas.



Fonte: Autora.

O antagonismo bacteriano refere-se à competição entre diferentes espécies de bactérias, em que uma espécie é capaz de limitar o crescimento da outra por meio da produção de substâncias antimicrobianas ou outros mecanismos (DUKARE; PAUL, 2018). Na Figura 14, é possível observar essa dinâmica entre as estirpes 7 e 101, onde se destaca uma zona de inibição de crescimento conhecida como halo, que evidencia o efeito inibitório dessa interação.

Nas tabelas 4 e 5, pode-se observar o resultado dos testes intercruzados de todas as estirpes bacterianas dos grupos 1 e 2.

Tabela 5 – Resultado do teste de antagonismo entre as cepas eficientes na ausência de oxigênio.

*	18	32	49	51	53	56	62	63	66	67	88	102	104	105	106	107	108	109	111	116	118	119	120	121	122	125	126	128	129	132	133	134	145	152		
18	*																																			
32	-	*																																		
49	-	+	*																																	
51	+	-	+	*																																
53	+	+	-	+	*																															
56	-	+	+	+	+	*																														
62	-	-	-	+	+	-	*																													
63	-	+	-	+	+	-	+	*																												
66	+	+	+	+	-	+	+	+	*																											
67	-	+	+	+	-	-	+	+	-	*																										
88	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	*																									
102	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	*																								
104	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	*																							
105	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	*																						
106	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	*																					
107	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	*																				
108	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	*																			
109	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	*																		
111	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	*																	
116	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	*																
118	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*															
119	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*														
120	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*													
121	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*											
122	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
125	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
126	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
128	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
129	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
132	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
133	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
134	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
145	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
152	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		

Fonte: Autora.

5.6 Formação dos consórcios

Por meio da análise de antagonismo, as estirpes bacterianas que apresentaram resultados negativos foram selecionadas para um potencial uso na formação de consórcios. Foram selecionados 11 consórcios (TABELA 6), para uma avaliação *in vivo* visando a construção da curva de crescimento. O critério adotado para a formação dos consórcios foi a inclusão de três ou mais estirpes, todas pertencentes ao mesmo grupo.

Tabela 6 – Composição dos 11 consórcios bacterianos formados a partir do teste de antagonismo.

Consórcio (C)	Cepas	Grupo
C1	22A, 70A, 139M	Eficientes na presença de O ₂
C2	23A, 141M, 142M	
C3	7A, 31A, 99M, 142M	
C4	38A, 84M, 137M	
C5	68A, 70A, 137M	
C6	39A, 44A, 99M	
C7	88M, 108M, 133M	Eficientes na ausência de O ₂
C8	88M, 145M, 108M	
C9	56A, 62A, 88M, 104M	
C10	56A, 88M, 108M, 133M	Eficientes na presença de O ₂
C11	44A, 68A, 70A, 139M	

Fonte: Autora. A: Bactérias isoladas do Açude Santo Anastácio; M: Bactérias isoladas do Manguezal da Sabiaguaba.

Na Tabela 7 encontra-se a caracterização morfotintorial e a presença de esporos das bactérias que compõem os consórcios microbianos. Destas bactérias, apenas a bactéria 139 apresentou como gram-negativa e apenas a bactéria 141 com morfologia de cocos.

Tabela 7 - Caracterização morfológica e dos esporos das bactérias que compõem os consórcios microbianos.

Cepa	Morfologia	Gram	Esporos
7	Bastonetes	+	+
22	Bastonetes	+	+
23	Bastonetes	+	+
31	Bastonetes	+	-
38	Bastonetes	+	+
39	Bastonetes	+	+
44	Bastonetes	+	+
56	Bastonetes	+	+
62	Bastonetes	+	-
68	Bastonetes	+	-
70	Bastonetes	+	-
84	Bastonetes	+	+
88	Bastonetes	+	+
99	Bastonetes	+	-
104	Bastonetes	+	+
108	Bastonetes	+	+
133	Bastonetes	+	-
137	Bastonetes	+	+
139	Bastonetes	-	-
141	Cocos	+	-
142	Bastonetes	+	+
145	Bastonetes	+	-

Fonte: Autora.

Os consórcios microbianos têm sido amplamente empregados nos processos de tratamento de águas residuais devido à sua maior adaptabilidade a diferentes ambientes em comparação com cepas individuais. Isso é possível graças ao equilíbrio dinâmico mantido por meio das complexas interações entre as células, o que torna o sistema mais resiliente e estável frente às variações ambientais (MCCARTY; LEDESMA-AMARO, 2019; ZHANG; LU; WANG, 2023). Além disso, os consórcios microbianos são mais eficazes na realização de tarefas como a metabolização de compostos complexos e a condução de reações com múltiplas etapas. Algumas dessas atividades não podem ser executadas por um único microrganismo, tornando o uso de consórcios microbianos essencial (SANTOYO *et al.*, 2021).

Os grupos C1, C2, C3, C4, C5, C6 e C11 destacam-se como os consórcios mais versáteis para aplicação em biorreatores, pois foram capazes de converter amônia e nitrito em

gás na presença de oxigênio. Isso está em conformidade com as descobertas de estudos anteriores, como os de Liu *et al.* (2008) e Shao *et al.* (2023), que observaram que consórcios anammox têm a capacidade de se adaptar a águas residuais contendo oxigênio dissolvido e/ou microaeração.

Os grupos C7, C8, C9 e C10 são os consórcios que devem desempenhar suas funções em biorreatores anaeróbios devido à sua resistência ao oxigênio dissolvido (OD). Além disso, existem evidências de possíveis diferenças significativas na sensibilidade e tolerância ao oxigênio entre espécies, como sugerido anteriormente por Zhang *et al.* (2022) e Yan *et al.* (2012). Uma estratégia para aplicar esses consórcios em reatores com baixas concentrações de oxigênio envolve a presença de microrganismos coexistentes ou aeróbios que podem proteger os consórcios anammox da exposição ao oxigênio, seja através da formação de agregados microbianos ou biofilmes (OKABE *et al.*, 2023)

As bactérias anammox tendem a formar bioagregados, como biofilmes ou grânulos anammox, que aumentam a retenção de biomassa, desenvolvem resistência contra fatores ambientais e influenciam na formação de consórcios microbianos (ALI *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2020; XU *et al.*, 2022). Além disso, alguns estudos trazem que os consórcios bacterianos não são formados apenas por bactérias anammox puras e estão sempre associadas a bactérias do filo *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Armatimonadetes* e *Actinobacteria* (HUO *et al.*, 2020; ZHAO *et al.*, 2019; ZHAO *et al.*, 2018).

5.7 Curva de Crescimento

As curvas de crescimento descrevem a densidade das populações celulares em cultura líquida ao longo do tempo, geralmente sendo obtidas por meio da medição da densidade óptica (DO) das populações celulares (RAM *et al.*, 2019). Com o propósito de analisar o desenvolvimento e o metabolismo dos 11 consórcios, quando inoculados em meio líquido M1 (simulando um efluente sintético) sob condições de aerobiose, procedeu-se à construção das curvas de crescimento para cada consórcio. Estas curvas foram geradas com base na variação do crescimento microbiano ao longo do tempo, calculadas a partir das médias aritméticas de triplicatas.

Na Figura 15, são retratadas as características de crescimento dos consórcios. Notavelmente, nenhum deles seguiu a curva típica com fases de lag, crescimento exponencial, estacionária e declínio ao longo do experimento. Em vez disso, observou-se uma redução seguida por um aumento na concentração de células. É importante ressaltar que esses consórcios

demonstraram interações positivas, o que significa que a interação entre as espécies dentro de cada consórcio beneficiou a taxa de crescimento de ambas as populações, e nenhum deles evidenciou a fase de declínio (SANTOYO *et al.*, 2021).

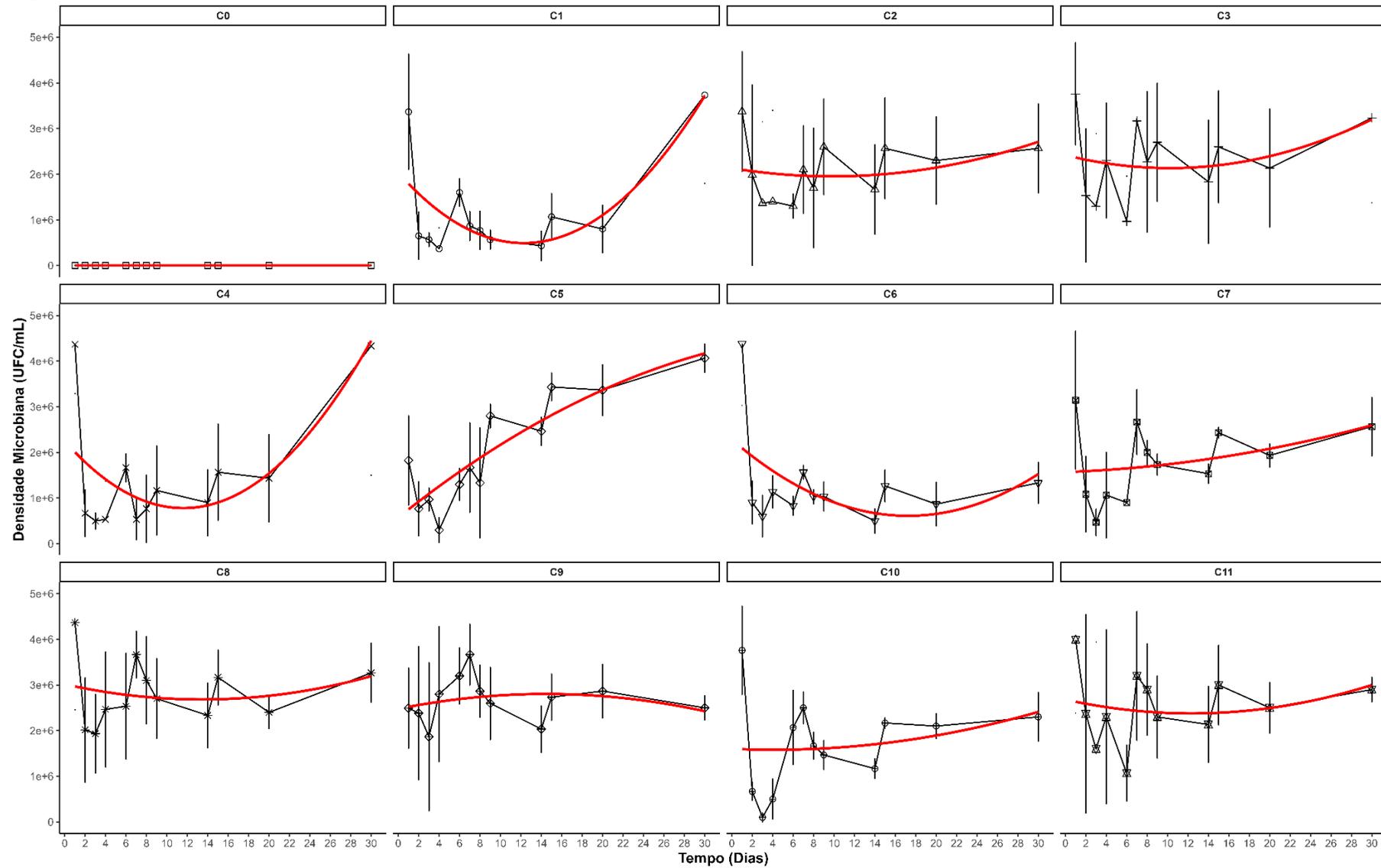
O consórcio C5 se destacou ao exibir uma curva de crescimento exponencial, sendo o consórcio que alcançou o maior pico de crescimento no 30º dia, com o resultado da mediana de 4.000.000 UFC/mL. Em seguida, o consórcio C1 obteve o segundo maior aumento microbiano no último dia do experimento, com um resultado de 3.100.000 UFC/mL. Por outro lado, o consórcio C6 apresentou o menor crescimento entre todos os consórcios no 30º dia, com um resultado de 1.300.000 UFC/mL.

Além disso, foi notado que a maioria dos consórcios apresentou um aumento mais significativo no crescimento a partir do 15º dia. Isso pode ser atribuído ao fato de que as bactérias anammox têm um tempo de crescimento relativamente lento e, possivelmente, também é influenciado pelas condições de oxigênio (ZHENG *et al.*, 2023).

Os consórcios C2, C3, C7, C8 e C10 foram os que apresentaram curva de crescimento mais semelhantes, apresentando uma pequena queda no crescimento seguido por um aumento nos últimos dias de experimentos. Os consórcios C1 e C4 se assemelharam também, apresentando seus maiores picos de quedas de crescimento no dia 4 e maiores crescimento no dia 30.

Os consórcios C9 e C10 registraram as maiores reduções no crescimento microbiano do dia 20 ao dia 30, contrariando os resultados dos outros consórcios que experimentaram um aumento durante esse período. Isso pode ter sido ocasionado pela dificuldade das bactérias que compõem esses consórcios em metabolizar os nutrientes presentes no efluente sintético em um ambiente aeróbio, o que resultou em um crescimento menos eficaz.

Figura 15 – Painel das curvas de crescimento de todos os consórcios microbianos testados.



Fonte: Autora.

Os consórcios formados por bactérias eficientes na conversão de nitrogênio na presença de oxigênio, foram os que obtiveram maior crescimento populacional ao longo do experimento (C1, C4, C5). A maioria das estirpes (56%) que compõe esses consórcios foi isolada das margens rasas do Açude Santo Anastasio. Em um estudo conduzido por Van Duc *et al.* (2018), foi constatada a presença de bactérias Anammox em sedimentos de uma lagoa rasa usada para a aquicultura em águas abertas, onde o fornecimento de oxigênio dissolvido era realizado por arejadores mecânicos e a luz solar tinha fácil penetração. Esses resultados sugerem a possibilidade de aplicação desses consórcios Anammox não apenas em biorreatores aeróbios, mas também em contextos relacionados à aquicultura.

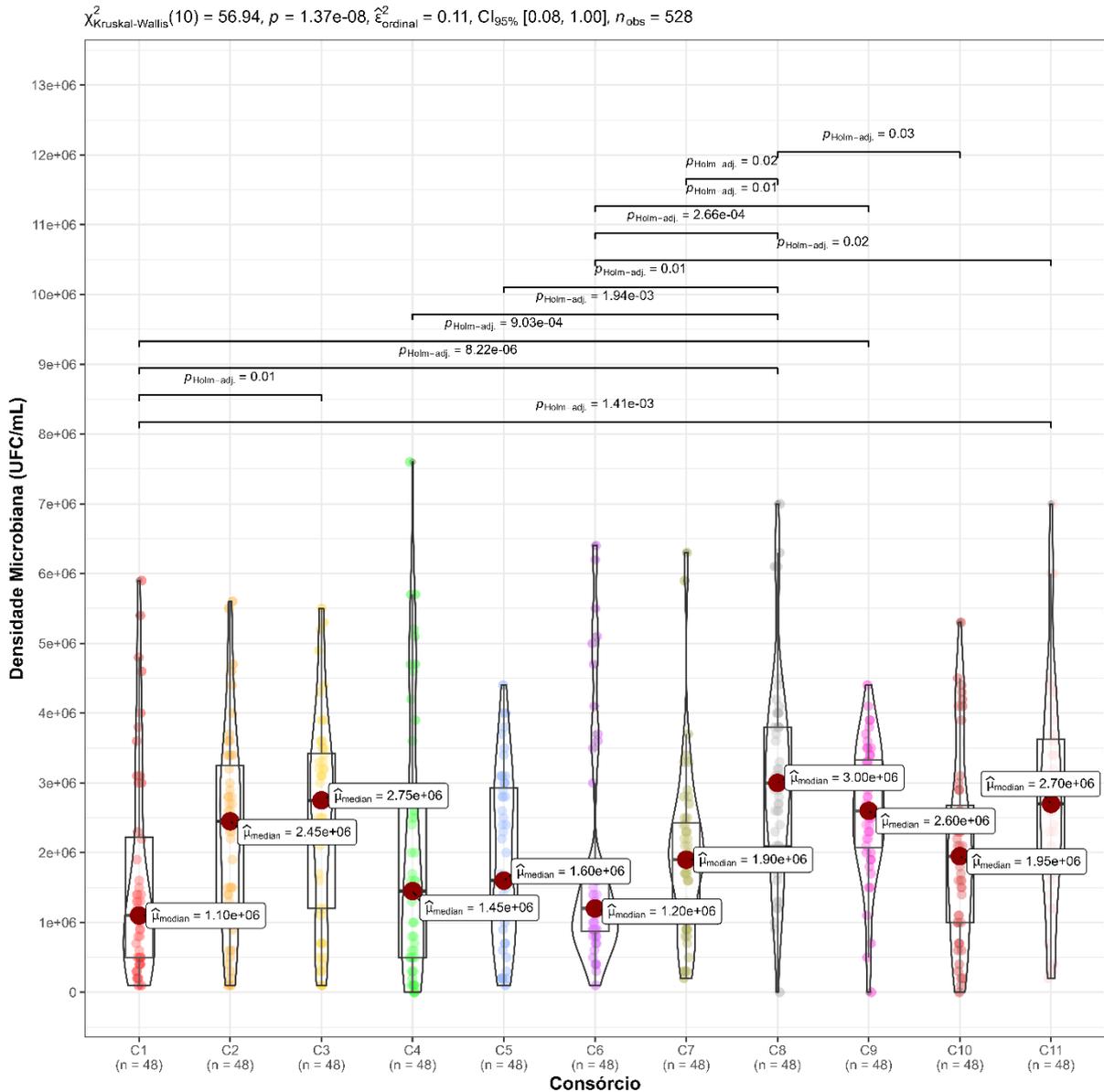
Os consórcios que demonstraram eficiência na ausência de oxigênio também apresentaram um aumento notável na concentração celular ao longo dos 30 dias na presença de oxigênio. No entanto, não foi possível avaliar a eficácia desses consórcios na conversão de nitrogênio. Ji *et al.* (2022) observaram que as bactérias anammox, como *Ca. Kuenenia*, possuem a capacidade potencial de crescimento mixotrófico, o que significa que podem se nutrir tanto de forma autotrófica quanto heterotrófica em condições microaeróbicas. Isso indica que essas bactérias têm a capacidade de lidar com a presença de oxigênio e, possivelmente, de realizar a desintoxicação do oxigênio para sobreviver em ambientes com essa condição (Ji *et al.*, 2019).

Todos os consórcios são indicados para aplicação em biorreatores, especialmente no reator tipo CANON, que possibilita a remoção de nitrogênio por meio da reação anammox e a nitrificação parcial (REN *et al.*, 2022). A tecnologia CANON possibilita a coexistência de microrganismos aeróbios oxidantes de amônio e microrganismos anaeróbios oxidantes de amônio na mesma configuração de biomassa granular no reator, sob condições de oxigênio constantes (com concentrações microaeróbicas) simultaneamente (GONZALEZ-MARTINEZ *et al.*, 2018). Além disso, o CANON é o processo anammox com mais pesquisas e aplicações no mundo (WANG *et al.*, 2019).

Conforme o teste de Kruskal-Wallis, foi identificada uma diferença estatisticamente significativa entre os consórcios anammox ($p > 0,05$), com uma magnitude moderada dessa diferença. Posteriormente, o teste de pós-hoc de Dunn foi conduzido para analisar quais consórcios apresentaram diferenças entre si (GRÁFICO 2). O consórcio C2 foi o único que não apresentou diferença quando comparado com os outros consórcios.

O Gráfico 2 aborda os pares de consórcios que apresentaram diferença significativa entre eles.

Gráfico 2 – Resultado do teste de pós-hoc de Dunn que detalha a diferença significativa entre os consórcios microbianos compostos por bactérias anammox.



Fonte: Autora.

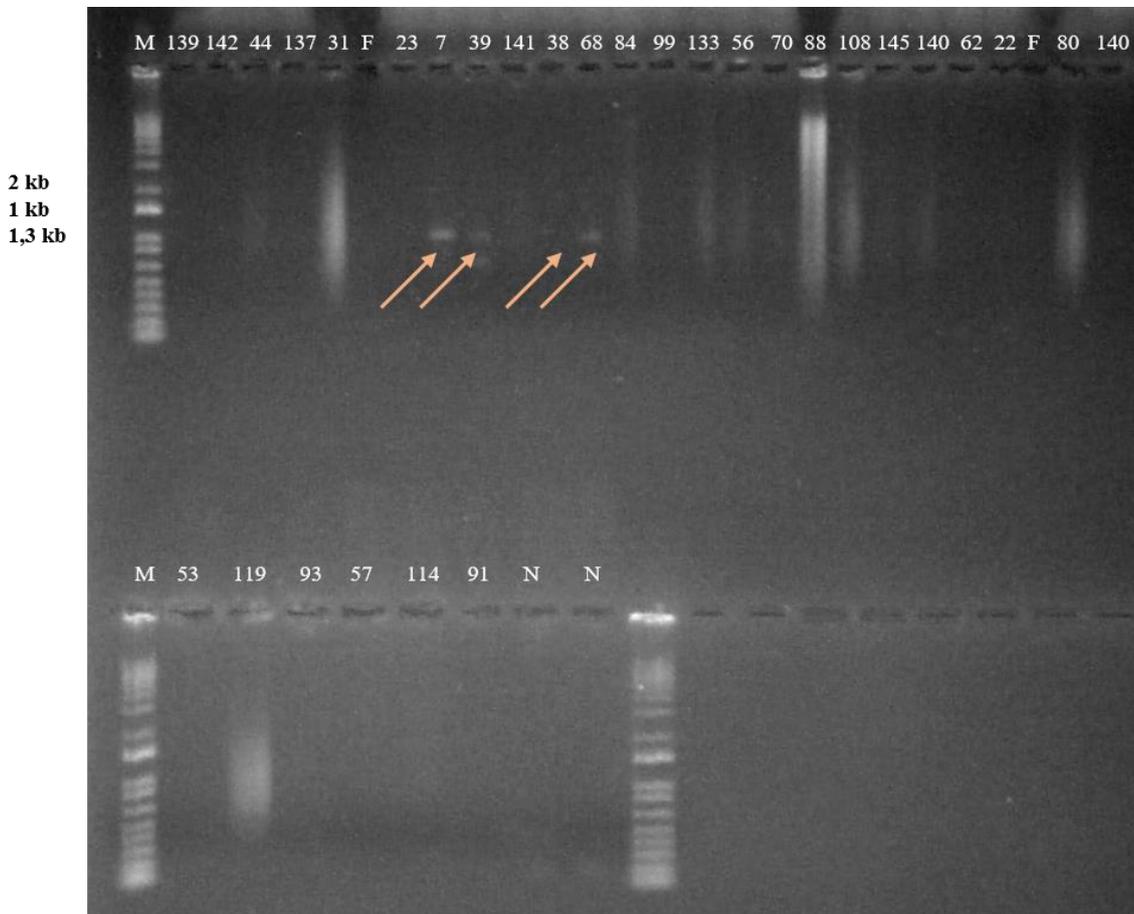
Ao comparar os pares de consórcios que demonstraram diferenças significativas, os consórcios C1 e C3, C5 e C8, C6 e C9, C6 e C11, C7 e C8, C8 e C10, foram aqueles que exibiram um valor p mais próximo de 0,05. Importante destacar que os pares C8 e C10, foram os que apresentaram a menor diferença significativa, com um valor de p de 0,025, o que pode ser atribuído à sua inclusão no mesmo grupo de condições de conversão de nitrogênio em anaerobiose. Além disso, os consórcios C6 e C11, demonstraram as menores diferenças dentro do grupo de bactérias eficientes na presença de oxigênio, com o valor de $p = 0,02$.

O consórcio C1 sobressaiu ao exibir diferenças significativas em comparação com a maioria dos outros consórcios, notadamente C3, C8, C9 e C11. É importante destacar que as maiores discrepâncias foram notadas entre os consórcios C1 e C8, seguido por C1 e C9, bem como entre C6 e C8. Essas diferenças provavelmente se devem às suas afiliações a grupos distintos, visto que C1 e C6 demonstram eficácia na presença de oxigênio, enquanto C8 e C9 apresentam desempenho na ausência do mesmo. Os valores de p correspondentes foram de $8,22 \times 10^{-6}$, 0,0009 e 0,0002, respectivamente.

5.8 Amplificação do DNA

Foram selecionadas as estirpes pertencentes aos consórcios microbianos e aquelas que demonstraram a conversão bem-sucedida de amônia e nitrito em gás para serem submetidas à extração de DNA e subsequente amplificação por PCR. No total, 30 estirpes foram incluídas nesse processo. A Figura 16 exibe os resultados da amplificação por PCR, indicando a presença do gene responsável pela enzima hidrazina sintase (*hzsA*) em 4 das estirpes examinadas.

Figura 16 - Gel de eletroforese de amostras submetidas a PCR com *primer* gene-específico *hzs*, confirmando a presença do gene anammox em bactérias detectadas.



Fonte: Autora. M: Marcador. F: Poço Furado. N: Controle Negativo

As estirpes 7, 39, 38 e 68 amplificaram com uma banda fraca no tamanho de 1331 pb no marcador, correspondente ao tamanho do fragmento gerado pelo anelamento do *primer* *hzsA* 526f/*hzsA* 1857r, confirmando o papel metabólico dessas bactérias (FIGURA 16). Esse par de biomarcador funcional foi escolhido por ser considerado confiável para a detecção de anammox por técnica de PCR e o melhor para análises de comunidade bacteriana anammox na

maioria das amostras ambientais (YANG *et al.*, 2020b; YANG *et al.*, 2018).

Na Tabela 8 encontra-se a caracterização dessas estirpes. Todas as estirpes apresentaram uma morfologia de bastonetes positivos, sendo a cepa 68 a única que não apresentou esporos. Além disso, todas as estirpes foram capazes de converter amônia em nitrito e, subsequentemente, nitrito em gás nitrogênio na presença de oxigênio. De acordo com o presente estudo, Oshiki, Satoh e Okabe (2016) também observaram tolerância ao oxigênio em várias culturas de enriquecimento de bactérias anammox. Esses resultados evidenciam uma considerável flexibilidade ecofisiológica nas bactérias anammox (YANG *et al.*, 2022).

Tabela 8 - Caracterização das bactérias anammox aerotolerantes que apresentaram o gene específico *hzs*.

Cepa	Morfologia	Gram	Esporos	Conversão de nitrogênio na presença de oxigênio
7	Bastonetes	+	+	+
38	Bastonetes	+	+	+
39	Bastonetes	+	+	+
68	Bastonetes	+	-	+

Fonte: Autora.

Esse resultado confirma que essas 4 bactérias são anammox, uma vez que até o momento as únicas bactérias conhecidas capazes de produzir a enzima funcional hidrazina sintase (HZS) são as bactérias anammox (VERSANTVOORT *et al.*, 2023). Esse é um resultado relevante e significativo, uma vez que de acordo com a literatura as bactérias anammox não podem ser cultivadas em laboratório (ZHAO *et al.*, 2023). Os dados demonstram a presença e a expressão desse gene em bactérias cultivadas em ambientes aeróbios, desafiando as expectativas convencionais e fornecendo novas perspectivas sobre a fisiologia dessas bactérias.

Assim, a descoberta do gene anammox em bactérias cultivadas em ambientes aeróbios não só amplia o conhecimento da biologia microbiana, como também proporciona possibilidades de aprimorar a eficiência dos processos de tratamento biológicos e contribuir para a preservação ambiental.

Para confirmar a amplificação do gene *hzs* nessas bactérias, é necessário realizar o sequenciamento das amostras. Além disso, é preciso realizar a PCR com um *primer* universal e subsequente sequenciamento para identificar os gêneros e espécies das quatro bactérias positivas. Isso é importante porque essas bactérias podem pertencer a gêneros diferentes, além das anammox previamente identificadas na literatura. Um estudo realizado por Qin e Zhou

(2009) demonstrou que as bactérias anammox podem ser encontradas em outros gêneros bacterianos, incluindo *Pseudomonas* sp. Eles isolaram essas bactérias de um biorreator de manta de lodo anaeróbico ascendente (UASB) e detectaram atividade anammox.

As quatro cepas que testaram positivo para o gene exclusivo das anammox foram obtidas do Açude Santo Anastácio, enquanto nenhuma delas foi isolada do Manguezal da Sabiaguaba. Em geral, parece não haver uma forte relação entre a localização das amostras e a diversidade das bactérias anammox, uma vez que essas bactérias são comumente encontradas com uma ampla distribuição em ambientes marinhos e de água doce. (ZHOU *et al.*, 2018).

A ausência de amplificação das bactérias pelo biomarcador do gene *hzsA* pode ser atribuída a diversas possibilidades. Isso inclui a insuficiência de material de DNA disponível para a amplificação, a utilização exclusiva de um biomarcador direcionado ao gene *hzsA* para detectar a enzima, considerando que existem outros dois genes, *hzsB* e *hzsC*, que também codificam a hidrazina sintase (GUO *et al.*, 2022; YANG *et al.*, 2020b). Portanto, é possível que outras bactérias do presente estudo sejam anammox, mas para confirmar isso, seria necessário utilizar *primers* direcionados aos genes 16S rRNA, *hzsB* e *hzsC*. Além disso, otimizar o processo de extração de DNA antes da realização da PCR pode ser fundamental para obter resultados mais conclusivos, como, por exemplo, quantificar a concentração e pureza do DNA por espectrofotometria (TODOROVIC *et al.*, 2020).

6 CONCLUSÃO

As maiores contagens microbianas foram registradas nas amostras inoculadas em meio de cultura não seletivo no açude Santo Anastácio (Ponto 1) e no manguezal (Ponto 2), respectivamente, indicando uma elevada quantificação microbiana ($4,9 \times 10^6 \pm 10,01$ e $5,0 \times 10^5 \pm 13,42$) nesses ambientes eutrofizados e com presença de oxigênio.

Foi possível isolar bactérias anammox aerotolerantes com morfologia de bastonetes (gram-negativas e gram-positivas) e cocos, sendo a maioria das estirpes bastonetes gram-positivas. Este resultado representa um avanço significativo, uma vez que as bactérias anammox eram consideradas apenas gram-negativas.

Um total de vinte e três (23) bactérias demonstraram a capacidade de converter amônia em nitrito e nitrito em gás nitrogênio na presença de oxigênio. Isso sugere que essas bactérias exibem atividade anammox, são eficientes em condições aeróbias, possuindo mecanismos de tolerância aerodinâmica e uma diversidade metabólica.

Foi possível selecionar estirpes com relações antagônicas negativas e eficiência na conversão de amônia e nitrito em gás nitrogênio. A partir desses resultados, foi viável a formação de consórcios microbianos com potencial para otimizar o tratamento de esgotos contendo elevadas cargas de amônia e nitrito em biorreatores, principalmente em sistemas do tipo CANON.

O desenvolvimento microbiano dos 11 consórcios foi representado nas curvas de crescimento, nas quais foi possível observar um aumento no crescimento das bactérias em efluente sintético (*in vitro*) a partir do 15º dia. O consórcio C5 se destacou ao apresentar um crescimento mais exponencial, sendo o consórcio com a maior concentração celular registrada no último dia do experimento (30º dia).

A detecção do marcador genético funcional *hzsA*, exclusivo de bactérias anammox, em quatro isolados bacterianos aerotolerantes reforçou os resultados baseados em características fenotípicas. Essa descoberta tem o potencial de ampliar o entendimento sobre a ecologia e diversidade das bactérias do grupo anammox em diferentes matrizes e condições ambientais e pode ter implicações significativas na pesquisa biotecnológica, na melhoria de processos de tratamento de águas residuais em condições aeróbicas e na conservação de recursos naturais.

6.1 Considerações finais

Embora este trabalho aborde resultados significativos, há questões que requerem atenção no futuro. Portanto, foram sugeridos potenciais soluções para abordar essas questões:

1. Confirmar a composição do gás produzido pelas bactérias, especificamente se é gás nitrogênio, por meio de detector de condutividade térmica, espectrometria de massa e espectrofotometria no infravermelho;
2. Avaliar a capacidade de formação de biofilme das estirpes;
3. Realizar ensaios de PCR utilizando *primers* gene-específicos para os genes *hzs* e 16S rRNA em todas as cepas bacterianas examinadas neste trabalho;
4. Conduzir o sequenciamento genético para obter uma compreensão mais completa da estrutura genética das bactérias que foram feitas ampliações;
5. Aplicar essas bactérias em um biorreator do tipo CANON, para a remoção de compostos nitrogenados de águas residuais.

REFERÊNCIAS

AL-HAZMI, H. E. *et al.* Combined partial denitrification/anammox process for nitrogen removal in wastewater treatment. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 11, n. 1, p. 108978, 2023.

ALI, M.; OKABE, S. Anammox-based technologies for nitrogen removal: advances in process start-up and remaining issues. **Chemosphere**, v. 141, p. 144-153, 2015.

ALI, M. *et al.* Aggregation ability of three phylogenetically distant anammox bacterial species. **Water Research**, v. 143, p. 10-18, 2018.

ALMEIDA, N. M. *et al.* Immunogold localization of key metabolic enzymes in the anammoxosome and on the tubule-like structures of *Kuenenia stuttgartiensis*. **Journal of Bacteriology**, v. 197, n. 14, p. 2432-2441, 2015.

ARAÚJO, G. M.; NETO, I. E. L.; BECKER, H. Estado trófico em reservatório urbano raso – estudo de caso: açude santo anastácio, Fortaleza (CE). **AIDIS**, v. 9, n. 2, p. 212 – 228, 2016.

BANDEKAR, M.; RAMAIAH, N.; MEENA, R. M. Diversity and abundance of denitrifying and anammox bacteria from the Arabian Sea oxygen minimum zone. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v. 156, p. 19-26, 2018.

BARROS, F. P. *et al.* The natural ecomuseum of mangrove: Educational and reforestation actions. **Brazilian Applied Science Review**, v. 5, n. 1, p. 482-497, 2021.

BERNHARD, A. The Nitrogen Cycle: Processes, Players, and Human Impact. **Nature Education Knowledge**, v. 3, 2010.

BENLI, A. Ç. K.; KÖKSAL, G.; ÖZKUL, A. Sublethal ammonia exposure of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.): Effects on gill, liver and kidney histology. **Chemosphere**, v. 72, n. 9, p. 1355-1358, 2008.

BERNER, R. A.; RAO, J. Phosphorus in sediments of the Amazon River and estuary: Implications for the global flux of phosphorus to the sea. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 58, n. 10, p. 2333-2339, 1994.

BI, Z. *et al.* Fast start-up of Anammox process with appropriate ferrous iron concentration. **Bioresource Technology**, v. 170, p. 506-512, 2014.

BORGES, J. L. **Exames Químico e Bacteriológico do Açude Santo Anastácio, em Fortaleza, Ceará, Brasil.** Dissertação apresentada ao Departamento de Engenharia de Pesca do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como parte das exigências para obtenção do título de Engenheiro de Pesca, 14pp., Fortaleza, 1978.

Brasil – CONAMA, 2005. **Resolução n.º 357, de 17 de março de 2005.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília

BREMNER, J. M.; MULVANEY, C. S. Nitrogen-Total. In: *Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties*, Page, A.L., Miller, R.H. and Keeney, D.R. Eds., American Society of Agronomy, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, 595-624, 1982.

BRIN, L. D.; GIBLIN, A. E.; RICH, J. J. Similar temperature responses suggest future climate warming will not alter partitioning between denitrification and anammox in temperate marine sediments. **Global CHANGE BIOLOGY**, v. 23, n. 1, p. 331-340, 2017.

BYRNE, N. *et al.* Presence and activity of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria at deep-sea hydrothermal vents. **The ISME journal**, v. 3, n. 1, p. 117-123, 2009.

CAI, M. *et al.* Bias of marker genes in PCR of anammox bacteria in natural habitats. **Plos One**, v. 15, n. 10, p. e0239736, 2020.

CAO, X. *et al.* Evaluation of nitrogen removal and N₂O emission in a novel anammox coupled with sulfite-driven autotrophic denitrification system: Influence of pH. **Journal of Cleaner Production**, v. 321, p. 128984, 2021.

CLAESSEN, M. E. C. **Manual de métodos de análise de solo**. Embrapa Solos-Docmentos (INFOTECA-E), 1997.

CHEN, F. *et al.* Recent developments in anammox-based membrane bioreactors: A review. **Science of the Total Environment**, v. 857, p. 159539, 2023.

CHEN, L. *et al.* Anammox response to natural and anthropogenic impacts over the Yangtze River. **Science of the Total Environment**, v. 665, p. 171-180, 2019.

CHEN, X. *et al.* A review of anammox metabolic response to environmental factors: Characteristic and mechanisms. **Environmental Research**, p. 115464, 2023.

DAI, F. *et al.* Microbial characteristics of nitrifiers, denitrifiers and anammox bacteria on different support media to treat space mission wastewater. **Journal of Environmental Management**, v. 232, p. 943-951, 2019.

DALSGAARD, T.; THAMDRUP, B.; CANFIELD, D. E. Anaerobic ammonium oxidation (anammox) in the marine environment. **Research in Microbiology**, v. 156, n. 4, p. 457-464, 2005.

DING, B. *et al.* Feammox is more important than anammox in anaerobic ammonium loss in farmland soils around Lake Taihu, China. **Chemosphere**, v. 305, p. 135412, 2022.

DING, C. *et al.* 16S rRNA gene-based primer pair showed high specificity and quantification accuracy in detecting freshwater Brocadiales anammox bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 96, n. 3, p. fiae013, 2020.

DSANE, V. F. *et al.* Saline conditions effect on the performance and stress index of anaerobic ammonium oxidizing (anammox) bacteria. **Chemosphere**, v. 267, p. 129227, 2021a.

- DSANE, V. F. *et al.* From freshwater anammox bacteria (FAB) to marine anammox bacteria (MAB): A stepwise salinity acclimation process. **Science of the Total Environment**, v. 796, p. 148753, 2021b.
- DOSTA, J. *et al.* Short-and long-term effects of temperature on the Anammox process. **Journal of Hazardous Materials**, v. 154, n. 1-3, p. 688-693, 2008.
- DOWNES, M. P.; ITO, K. **Compendium of Methods for The Microbiological Examination of Foods**. 4. ed. Washington: APHA, 2001. 676 p.
- DU, R; PENG, Y.; CAO, S. Insights into size-fractionated anammox granules presented with refractory organics from municipal wastewater-driven partial denitrification to improve the synergy of anammox and denitrification. **Journal of Cleaner Production**, v. 378, p. 134526, 2022.
- DU, T. *et al.* Unraveling the role of salinity in anammox-based nitrogen removal processes via data analysis from the literature and experimental validation. **Environmental Science: Water Research & Technology**, v. 7, n. 12, p. 2295-2306, 2021.
- DUKARE, A.; PAUL, S. Effect of chitinolytic biocontrol bacterial inoculation on soil microbiological activities and Fusarium population in rhizosphere of Pigeon pea (*Cajanus cajan*). **Annals of Plant Protection Sciences**, v. 26, n. 1, p. 98-103, 2018.
- DUNN, O. J. Multiple comparisons using rank sums. **Technometrics**, v. 6, n. 3, p. 241-252, 1964.
- FABRIS, B. T.; JOÃO, J. J.; BORGES, E. M. Quantificação de nitrito em água utilizando um scanner de mesa. **Revista Virtual de Química**, v. 12, p. 569-582, 2020.
- FAN, N. S. *et al.* Resistance genes and extracellular proteins relieve antibiotic stress on the anammox process. **Water Research**, v. 202, p. 117453, 2021.
- FANG, F. *et al.* Effect of high salinity in wastewater on surface properties of anammox granular sludge. **Chemosphere**, v. 210, p. 366-375, 2018.
- FERREIRA, Y. G. **Estudo e prospecção de bactérias anammox para aplicação em tratamento de efluentes de aquicultura**. 2020. 45 f. Monografia (Graduação em Ciências Ambientais) – Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2020.
- FLECK, L.; TAVARES, M. H. F.; EYNG, E. Remoção Biológica de Nitrogênio em Efluentes Líquidos: Uma Revisão. **Revista Eixo**, v. 4, n. 2, p. 77-88, 2015.
- FORTALEZA. Prefeitura Municipal de Fortaleza (PMF). **Plano de Manejo das Unidades de Conservação Parque Natural Municipal das Dunas de Sabiaguaba (PNMDS) e Área de Proteção Ambiental (APA) de Sabiaguaba**. Fortaleza, 2010, 304p.
- FREIRES, E. V. Análise socioambiental do entorno do estuário do Rio Cocó – Fortaleza / Ceará. **Revista eletrônica em gestão, educação e tecnologia ambiental**. V. 18, n. 4, 2014.

FU, L. *et al.* Shifts in the anammox bacterial community structure and abundance in sediments from the Changjiang Estuary and its adjacent area. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 383-396, 2019.

FU, Y. *et al.* Advances in the Efficient Enrichment of Anammox Bacteria. **Water**, v. 15, n. 14, p. 2556, 2023.

GAMONĆ, F.; CEMA, G.; ZIEMBIŃSKA-BUCZYŃSKA, A. The influence of antibiotics on the anammox process—a review. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-17, 2021.

GAO, P. *et al.* An evaluation of different detection methods for anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria inhabiting the oil reservoir systems. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 177, p. 105536, 2023.

GONG, Q. *et al.* Anammox bacteria enrich naturally in suspended sludge system during partial nitrification of domestic sewage and contribute to nitrogen removal. **Science of The Total Environment**, v. 787, p. 147658, 2021.

GONZALEZ-MARTINEZ, A. *et al.* New concepts in anammox processes for wastewater nitrogen removal: recent advances and future prospects. **FEMS microbiology letters**, v. 365, n. 6, p. fny031, 2018.

GUO, J. *et al.* The regulation and control strategies of a sequencing batch reactor for simultaneous nitrification and denitrification at different temperatures. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 59-67, 2013.

GUO, M. *et al.* Bamboo charcoal addition enhanced the nitrogen removal of anammox granular sludge with COD: performance, physicochemical characteristics and microbial community. **Journal of Environmental Sciences**, v. 115, p. 55-64, 2022.

HARHANGI, H. R. *et al.* Hydrazine synthase, a unique phylomarker with which to study the presence and biodiversity of anammox bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 3, p. 752-758, 2012.

HATTORI, M. *et al.* Solid solution for catalytic ammonia synthesis from nitrogen and hydrogen gases at 50 C. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 2001, 2020.

HOLM, S. A simple sequentially rejective multiple test procedure. **Scandinavian Journal of Statistics**, p. 65-70, 1979.

HOWARTH, R. W. *et al.* Nutrient pollution of coastal rivers, bays, and seas. **Issues in Ecology**, n. 7, p. 1-16, 2000.

HUANG, X. *et al.* Probing the dynamics of three freshwater Anammox genera at different salinity levels in a partial nitrification and Anammox sequencing batch reactor treating landfill leachate. **Bioresource Technology**, v. 319, p. 124112, 2021

- HU, J. *et al.* SSthe coexistence and diversity of Candidatus methylomirabilis oxyfera-like and anammox bacteria in sediments of an urban eutrophic lake. **International Microbiology**, p. 1-13, 2022.
- HUO, T. *et al.* Metabolic acclimation of anammox consortia to decreased temperature. **Environment International**, v. 143, p. 105915, 2020.
- IPECE. INSTITUTO DE PESQUISA E ESTRÁTEGIA ECONÔMICA DO CEARÁ. **Perfil Básico Municipal 2017**. Fortaleza: IPECE, 2017.
- JÁUREGUI, S.; CASTILLO, H. R. Efecto de la concentración de inóculo de un consorcio bacteriano nativo en la degradación de los nitratos de vinaza de una destilería de alcohol. **Agroindustrial Science**, v. 7, n. 2, p. 57-66, 2017.
- JAYAWARDANE, B. M. *et al.* Microfluidic paper-based analytical device for the determination of nitrite and nitrate. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 15, p. 7274-7279, 2014.
- JENSEN, M. M. *et al.* Rates and regulation of anaerobic ammonium oxidation and denitrification in the Black Sea. **Limnology and Oceanography**, v. 53, n. 1, p. 23-36, 2008.
- JEONG, D. *et al.* Shift in bacterial community structure in response to salinity in a continuous anaerobic ammonium oxidation (anammox) reactor. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 147, p. 104873, 2020.
- JETTEN, M. *et al.* Anammox organisms: enrichment, cultivation, and environmental analysis. **Methods in Enzymology**, v. 397, p. 34-57, 2005.
- JI, X. *et al.* Metagenomics and metatranscriptomics analyses reveal oxygen detoxification and mixotrophic potentials of an enriched anammox culture in a continuous stirred-tank reactor. **Water Research**, v. 166, p. 115039, 2019.
- JI, X. *et al.* The organics-mediated microbial dynamics and mixotrophic metabolisms in anammox consortia under micro-aerobic conditions. **Journal of Environmental Management**, v. 324, p. 116262, 2022.
- JIANG, H. *et al.* Chlorogenic acid attenuates inflammation, oxidative stress, apoptosis and protects head kidney macrophage of yellow catfish from ammonia toxicity. **Aquaculture Research**, v. 53, n. 1, p. 168-177, 2022.
- JIN, R. *et al.* The inhibition of the Anammox process: a review. **Chemical Engineering Journal**, v. 197, p. 67-79, 2012.
- JIN, R. C. *et al.* The inhibition of the Anammox process: a review. **Chemical Engineering Journal**, v. 197, p. 67-79, 2012.
- JUNIER, P. *et al.* Phylogenetic and functional marker genes to study ammonia-oxidizing microorganisms (AOM) in the environment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 425-440, 2010.

KARASUTA, C. *et al.* Effect of hydraulic retention time on effluent pH in anammox bioreactors: Characteristics of effluent pH and pH as an indicator of reactor performance. **Journal of Environmental Management**, v. 280, p. 111716, 2021.

KARRI, R. R.; SAHU, J. N.; CHIMMIRI, V. Critical review of abatement of ammonia from wastewater. **Journal of Molecular Liquids**, v. 261, p. 21-31, 2018.

KARTAL, B. *et al.* Adaptation of a freshwater anammox population to high salinity wastewater. **Journal of Biotechnology**, v. 126, n. 4, p. 546-553, 2006.

KARTAL, B. *et al.* Candidatus “Anammoxoglobus propionicus” a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 39-49, 2007.

KARTAL, B.; KUENEN, J. G.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Sewage Treatment with Anammox. **Science**, v. 328, n. 5979, p. 702-703, 2010.

KOUBA, V. *et al.* Physiology of anammox adaptation to low temperatures and promising biomarkers: A review. **Bioresource Technology**, v. 349, p. 126847, 2022.

KRUSKAL, W. H.; WALLIS, A. Use of ranks in one-criterion variance analysis. **Journal of the American Statistical Association**, v. 47, n. 260, p. 583-621, 1952.

KUMWIMBA, M. N. *et al.* Anammox-based processes: How far have we come and what work remains? A review by bibliometric analysis. **Chemosphere**, v. 238, p. 124627, 2020.

KUYPERS, M. M. M. *et al.* Massive nitrogen loss from the Benguela upwelling system through anaerobic ammonium oxidation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 18, p. 6478-6483, 2005.

LACKNER, S. *et al.* Full-scale partial nitritation/anammox experiences—an application survey. **Water Research**, v. 55, p. 292-303, 2014.

LAM, P. *et al.* Revising the nitrogen cycle in the Peruvian oxygen minimum zone. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 12, p. 4752-4757, 2009.

LE, L. *et al.* Influence of temperature on anammox reaction and microbial diversity in a bio-carriers reactor under mainstream conditions. **Environmental Technology & Innovation**, v. 25, p. 102178, 2022.

LEVENE, H. Robust tests for equality of variances. **Contributions to Probability And Statistics**, p. 278-292, 1960.

LI, J. *et al.* Insights into nitrogen removal from seawater-based wastewater through marine anammox bacteria under ampicillin stress: Microbial community evolution and genetic response. **Journal of Hazardous Materials**, v. 424, p. 127597, 2022.

LI, J. *et al.* Is anammox a promising treatment process for nitrogen removal from nitrogen-rich saline wastewater?. **Bioresource technology**, v. 270, p. 722-731, 2018.

- LI, M. *et al.* Ammonia toxicity in the yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*): The mechanistic insight from physiological detoxification to poisoning. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 102, p. 195-202, 2020.
- LI, Y. *et al.* Spatial variability pattern of the anaerobic ammonia-oxidizing bacterial community across a salinity gradient from river to ocean. **Ecotoxicology**, p. 1-11, 2020.
- LI, Y. *et al.* Anaerobic ammonium oxidation (anammox) is the main microbial N loss pathway in alpine wetland soils of the Qinghai-Tibet Plateau. **Science of The Total Environment**, v. 787, p. 147714, 2021.
- LI, W. *et al.* Improved nitrogen removal performance by enhanced denitrification/anammox as decreasing temperature for municipal wastewater treatment. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 190, p. 106869, 2023.
- LIANG, Y. *et al.* Performance and influence factors of completely autotrophic nitrogen removal over nitrite (CANON) process in a biofilter packed with volcanic rocks. **Environmental Technology**, v. 36, n. 8, p. 946-952, 2015.
- LITTI, Y. *et al.* Metagenomic Evidence of a Novel Anammox Community in Cold Aquifer with Extreme Nitrogen Pollution. **SRRN**, 2023.
- LIU, S. *et al.* Evaluation of oxygen adaptation and identification of functional bacteria composition for anammox consortium in non-woven biological rotating contactor. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 8273-8279, 2008.
- LIU, T.; HU, S.; GUO, J. Enhancing mainstream nitrogen removal by employing nitrate/nitrite-dependent anaerobic methane oxidation processes. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 39, n. 5, p. 732-745, 2019.
- LIU, T. *et al.* Acceleration of denitrification in turbid rivers due to denitrification occurring on suspended sediment in oxic waters. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 9, p. 4053-4061, 2013.
- LIU, Y. *et al.* Competitive adsorption of heavy metals by anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) consortia. **Chemosphere**, v. 258, p. 127289, 2020.
- LOPES, P. D. P. *et al.* Ocupações irregulares no parque natural municipal de dunas da Sabiaguaba, Fortaleza, Ceará. **Revista da Casa da Geografia de Sobral (RCGS)**, v. 21, n. 2, p. 1321-1332, 2019.
- LOTTI, T. *et al.* Faster through training: the anammox case. **Water Research**, v. 81, p. 261-268, 2015.
- LU, H. *et al.* A holistic analysis of ANAMMOX process in response to salinity: from adaptation to collapse. **Separation and Purification Technology**, v. 215, p. 342-350, 2019.
- MA, C. *et al.* Impacts of transient salinity shock loads on Anammox process performance. **Bioresource Technology**, v. 112, p. 124-130, 2012.

- MA, H. *et al.* Efficient phosphorus recovery by enhanced hydroxyapatite formation in a high loading anammox expanded bed reactor at 15° C. **Chemical Engineering Journal**, v. 425, p. 130636, 2021.
- MAGYAR, P. M. *et al.* Nitrogen isotope effects can be used to diagnose N transformations in wastewater anammox systems. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 7850, 2021.
- MAK, C. Y.; LIN, J. G.; BASHIR, M. J. K. An overview of the effects of heavy metals content in wastewater on anammox bacteria. **Advances Environmental Studies**, v. 2, n. 1, p. 61-70, 2018.
- MALOVANYY, A. *et al.* Ammonium removal by partial nitritation and Anammox processes from wastewater with increased salinity. **Environmental Technology**, v. 36, n. 5, p. 595-604, 2015.
- MARÍN, J. C. *et al.* Nitrobacterias em reatores biológicos rotativos de controle (CBC) de três câmaras bajo diferentes cargas orgânicas. **Revista Tecnocientífica URU**, v. 2012, n. 2, p. 71-82, 2012.
- MCCARTY, N. S.; LEDESMA-AMARO, R. Synthetic biology tools to engineer microbial communities for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 181-197, 2019.
- MEIYUN, G. A. O. *et al.* Effects of organic carbon for denitrification and anaerobic ammonium oxidation in sediments of aquaculture pond. **Chinese Journal of Environmental Engineering**, v. 12, n. 1, p. 49-56, 2018.
- MELO, C. I. H. **A pesca e os pescadores artesanais urbanos: um estudo de caso sobre a percepção ambiental no Açude Santo Anastácio (Fortaleza/CE)**. 2017. 55 f. Monografia (Graduação em Oceanografia) - Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.
- MIAO, L. Recent advances in nitrogen removal from landfill leachate using biological treatments—A review. **Journal of Environmental Management**, v. 235, p. 178-185, 2019.
- MOORE, T. A. *et al.* Prevalence of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in contaminated groundwater. **Environmental Science & Technology**, v. 45, n. 17, p. 7217-7225, 2011.
- MOSLEY, O. E. *et al.* Metabolic diversity and aero-tolerance in anammox bacteria from geochemically distinct aquifers. **Msystems**, v. 7, n. 1, p. e01255-21, 2022.
- MULDER, A. *et al.* Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 16, n. 3, p. 177-183, 1995.
- NIE, S. *et al.* Nitrogen loss by anaerobic oxidation of ammonium in rice rhizosphere. **The ISME Journal**, v. 9, n. 9, p. 2059-2067, 2015.
- NIE, S. *et al.* Response of activity, abundance, and composition of anammox bacterial community to different fertilization in a paddy soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 54, n. 8, p. 977-984, 2018.

OKABE, S. *et al.* Oxygen tolerance and detoxification mechanisms of highly enriched planktonic anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria. **ISME communications**, v. 3, n. 1, p. 45, 2023.

OLIVEIRA, R. L. S. **Prospecção de bactérias na microbiota de solos com capacidade de produção de energia**. 2019. 64 f. TCC - Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Ambientais) – Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

OSHIKI, M.; SATOH, H.; OKABE, S. Ecology and physiology of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 9, p. 2784-2796, 2016.

PARK, H. *et al.* Differentiation in the microbial ecology and activity of suspended and attached bacteria in a nitrification-anammox process. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 112, n. 2, p. 272-279, 2015.

PARK, H. *et al.* Discovery and metagenomic analysis of an anammox bacterial enrichment related to Candidatus “Brocadia caroliniensis” in a full-scale glycerol-fed nitrification-denitrification separate centrate treatment process. **Water Research**, v. 111, p. 265-273, 2017.

PARK, M. *et al.* Correlation of microbial community with salinity and nitrogen removal in an anammox-based denitrification system. **Chemosphere**, v. 263, p. 128340, 2021.

PEETERS, S. H.; VAN NIFTRIK, L. Trending topics and open questions in anaerobic ammonium oxidation. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 49, p. 45-52, 2019.

PENG, M. *et al.* Insight into the structure and metabolic function of iron-rich nanoparticles in anammox bacteria. **Science of The Total Environment**, v. 806, p. 150879, 2022.

PEPPER, I. L.; GERBA, C. P.; BRENDENCKE, Jeffrey W. Environmental microbiology: a laboratory manual. **Academic Press**, 1995.

PIMENOV, N. V. *et al.* Introduction of Exogenous Activated Sludge as a Way to Enhance the Efficiency of Nitrogen Removal in the Anammox Process. **Microbiology**, v. 91, n. 4, p. 356-363, 2022.

QIN, Y.; ZHOU, S. Isolation and Identification of Bacteria in the Anammox Activated Sludge. In: **Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, p. 278-281, 2009.

QIU, Sh. *et al.* Sludge fermentation liquid addition attained advanced nitrogen removal in low C/N ratio municipal wastewater through short-cut nitrification-denitrification and partial anammox. **Frontiers of Environmental Science & Engineering**, v. 15, n. 2, p. 1-10, 2021.

RAHMAN, M. M. *et al.* Effects of long-term pig manure application on antibiotics, abundance of antibiotic resistance genes (ARGs), anammox and denitrification rates in paddy soils. **Environmental Pollution**, v. 240, p. 368-377, 2018.

RAJPUT, D. *et al.* Applications of autotrophic ammonia oxidizers in bio-geochemical cycles. **Chemical Engineering Journal**, p. 144318, 2023.

- RAM, Y. *et al.* Predicting microbial growth in a mixed culture from growth curve data. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 29, p. 14698-14707, 2019.
- REN, Z. *et al.* A review of anammox-based nitrogen removal technology: From microbial diversity to engineering applications. **Bioresource Technology**, v. 363, p. 127896, 2022.
- RUSS, L. *et al.* Presence and diversity of anammox bacteria in cold hydrocarbon-rich seeps and hydrothermal vent sediments of the Guaymas Basin. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 219, 2013.
- RUSCALLEDA, M. *et al.* The effect of urban landfill leachate characteristics on the coexistence of anammox bacteria and heterotrophic denitrifiers. **Water Science and Technology**, v. 61, n. 4, p. 1065-1071, 2010.
- SAHANA, T. *et al.* NO Generation from Nitrite at Zinc (II): Role of Thiol Persulfidation in the Presence of Sulfane Sulfur. **ACS Organic & Inorganic Au**, 2023.
- SÁNCHEZ-BOTERO, J. I. *et al.* Fish assemblage of the Santo Anastácio reservoir (Ceará state, Brazil). **Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo**, v. 40, n. 1, p. 1-15, 2014.
- SANTOYO, G. *et al.* Plant growth stimulation by microbial consortia. **Agronomy**, v. 11, n. 2, p. 219, 2021.
- SHAO, Y. *et al.* Genome-centered metagenomics illuminates adaptations of core members to a partial Nitritation–Anammox bioreactor under periodic microaeration. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1046769, 2023.
- SHI, Z. *et al.* Long-term effects of oxytetracycline (OTC) on the granule-based anammox: process performance and occurrence of antibiotic resistance genes. **Biochemical Engineering Journal**, v. 127, p. 110-118, 2017.
- SCHMID, M. C. *et al.* Biomarkers for in situ detection of anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 4, p. 1677-1684, 2005.
- SCHUBERT, C. J. *et al.* Anaerobic ammonium oxidation in a tropical freshwater system (Lake Tanganyika). **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 10, p. 1857-1863, 2006.
- SOARES, F. A. **Assoreamento de bacia urbana: estudo de caso do açude Santo Anastácio**, Fortaleza, Ceará. 2003. 151 f.: Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental, Fortaleza-CE, 2003.
- SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, v. 52, n. 3/4, p. 591-611, 1965.
- SOBOTKA, D.; ZHAI, J.; MAKINIA, J. Generalized temperature dependence model for anammox process kinetics. **Science of The Total Environment**, v. 775, p. 145760, 2021.

SOUZA, L. S. F.; SILVA, E. V.; VASCONCELOS, F. P. As UCs de Sabiaguaba (Fortaleza-Ceará, Brasil): diagnóstico geambiental e propostas de gestão e manejo. **Revista Geográfica de América Central**, v. 2, p. 1-17, 2011.

STROUS, M. *et al.* Effects of aerobic and microaerobic conditions on anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 6, p. 2446-2448, 1997.

STROUS *et al.* Missing lithotroph identified as new planctomycete. **Nature**, v. 400, n. 6743, p. 446-449, 1999.

SU, Y. *et al.* Rapid enrichment of anammox bacteria and transformation to partial denitrification/anammox with nitrification/denitrification sludge. **Science of the Total Environment**, v. 856, p. 158973, 2023.

SUAREZ, C. *et al.* Metagenomic evidence of a novel family of anammox bacteria in a subsea environment. **Environmental Microbiology**, v. 24, n. 5, p. 2348-2360, 2022.

SUTO, R. *et al.* Anammox biofilm in activated sludge swine wastewater treatment plants. **Chemosphere**, v. 167, p. 300-307, 2017.

TALAN, A.; TYAGI, R. D.; DROGUI, P. Critical review on insight into the impacts of different inhibitors and performance inhibition of anammox process with control strategies. **Environmental Technology & Innovation**, v. 23, p. 101553, 2021.

TANG, C. *et al.* Removal of nitrogen from wastewaters by anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) using granules in upflow reactors. **Environmental Chemistry Letters**, v. 15, p. 311-328, 2017.

TAN, E. *et al.* Organic matter decomposition sustains sedimentary nitrogen loss in the Pearl River Estuary, China. **Science of the Total Environment**, v. 648, p. 508-517, 2019.

TAN, D. T.; SHUAI, D. Research highlights: Advances and challenges in developing mainstream anammox treatment. **Environmental Science: Water Research & Technology**, v. 1, n. 5, p. 546-549, 2015.

TEDESCO, M. J. *et al.* **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2.ed. Porto Alegre, RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174p. (Boletim Técnico de Solos, 5).

THIRD, K. A. *et al.* The CANON system (completely autotrophic nitrogen-removal over nitrite) under ammonium limitation: interaction and competition between three groups of bacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 24, n. 4, p. 588-596, 2001.

TODOROVIĆ, D. *et al.* Formalin fixation of human healthy autopsied tissues: The influence of type of tissue, temperature and incubation time on the quality of isolated DNA. **Serbian Journal of Experimental and Clinical Research**, v. 21, n. 4, p. 307-315, 2020.

TOMASZEWSKI, M.; CEMA, G.; ZIEMBIŃSKA-BUCZYŃSKA, A. Influence of temperature and pH on the anammox process: a review and meta-analysis. **Chemosphere**, v. 182, p. 203-214, 2017.

- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.
- TRINH, H. P. *et al.* Recent developments of the mainstream anammox processes: Challenges and opportunities. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 4, p. 105583, 2021.
- VAN DER STAR, W. R. L. *et al.* The membrane bioreactor: a novel tool to grow anammox bacteria as free cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 286-294, 2008.
- VAN DUC, L. *et al.* High growth potential and nitrogen removal performance of marine anammox bacteria in shrimp-aquaculture sediment. **Chemosphere**, v. 196, p. 69-77, 2018.
- VAN KESSEL, M. A. H. J. *et al.* Anammox bacteria in different compartments of recirculating aquaculture systems. **Biochemical Society Transactions**, v. 39, p. 1817-1821, 2011.
- VAN NIFTRIK, L. A. *et al.* The anammoxosome: an intracytoplasmic compartment in anammox bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 233, n. 1, p. 7-13, 2004.
- VAN TEESELING, M. C. F. *et al.* Anammox Planctomycetes have a peptidoglycan cell wall. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 1-6, 2015.
- VAN TEESELING, M. C. F. *et al.* Characterization of the first planctomycetal outer membrane protein identifies a channel in the outer membrane of the anammox bacterium *Kuenenia stuttgartiensis*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1860, n. 3, p. 767-776, 2018.
- VARGAS-MAYA, *et al.* Refinement of the Griess method for measuring nitrite in biological samples. **Journal of Microbiological Methods**, v. 187, p. 106260, 2021.
- VERSANTVOORT, W. *et al.* Spectroscopic insights into the mechanism of anammox hydrazine synthase. **BioRxiv**, p. 2023.01. 22.525020, 2023.
- WAKI, M. *et al.* Rate determination and distribution of anammox activity in activated sludge treating swine wastewater. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 8, p. 2685-2690, 2010.
- WANG, H. *et al.* Underlying mechanisms of ANAMMOX bacteria adaptation to salinity stress. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 46, n. 5, p. 573-585, 2019.
- WANG, L. *et al.* Challenges, solutions and prospects of mainstream anammox-based process for municipal wastewater treatment. **Science of The Total Environment**, v. 820, p. 153351, 2022.
- WANG, S. *et al.* Comparative analysis of two 16S rRNA gene-based PCR primer sets provides insight into the diversity distribution patterns of anammox bacteria in different environments. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 19, p. 8163-8176, 2015.

WANG, Y.; GU, J. Effects of allylthiourea, salinity, and pH on ammonia/ammonium-oxidizing prokaryotes in mangrove sediment incubated in laboratory microcosms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 7, p. 3257-3274, 2014.

WANG, W. *et al.* Dissolved oxygen microelectrode measurements to develop a more sophisticated intermittent aeration regime control strategy for biofilm-based CANON systems. **Chemical Engineering Journal**, v. 365, p. 165-174, 2019.

WANG, W. *et al.* Characterization of stratified EPS and their role in the initial adhesion of anammox consortia. **Water Research**, v. 169, p. 115223, 2020.

WEI, Q. Y. *et al.* Comparative study on HRT and nitrogen concentration effects on enhancement of nitrogen removal by marine anammox bacteria (MAB). **Journal of Water and Environment Technology**, v. 13, n. 2, p. 119-130, 2015.

WEI, Q. *et al.* Nitrogen removal properties in a continuous marine anammox bacteria reactor under rapid and extensive salinity changes. **Chemosphere**, v. 148, p. 444-451, 2016.

WU, J. *et al.* Diversity of anammox bacteria and contribution to the nitrogen loss in surface sediment. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 142, p. 227-234, 2019.

WU, P. *et al.* Novel insights into Anammox-based processes: A critical review. **Chemical Engineering Journal**, v. 444, p. 136534, 2022.

XIA, X. *et al.* Occurrence of anammox on suspended sediment (SPS) in oxic river water: Effect of the SPS particle size. **Chemosphere**, v. 235, p. 40-48, 2019.

XI, D. *et al.* Contribution of anammox to nitrogen removal in two temperate forest soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 15, p. 4602-4612, 2016.

XIE, H.; JI, D.; ZANG, L. Effects of inhibition conditions on anammox process. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, p. 012149, 2017.

XIE, F. *et al.* Enhancing nitrogen removal performance of anammox process after short-term pH and temperature shocks by coupling with iron-carbon micro-electrolysis. **Journal of Cleaner Production**, v. 289, p. 125753, 2021.

XIONG, Y. *et al.* A miniaturized fiber-optic colorimetric sensor for nitrite determination by coupling with a microfluidic capillary waveguide. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, p. 3413-3423, 2016.

XU, D. *et al.* Dimension effect of anammox granule: Potential vs performance. **Science of The Total Environment**, v. 795, p. 148681, 2021.

XU, J. *et al.* Anaerobic ammonium oxidation (anammox) promoted by pyrogenic biochar: Deciphering the interaction with extracellular polymeric substances (EPS). **Science of The Total Environment**, v. 802, p. 149884, 2022.

XU, L. Z. J. *et al.* Adaption and restoration of anammox biomass to Cd (II) stress: Performance, extracellular polymeric substance and microbial community. **Bioresource Technology**, v. 290, p. 121766, 2019.

YA, T. *et al.* Successional dynamics of molecular ecological network of anammox microbial communities under elevated salinity. **Water Research**, v. 188, p. 116540, 2021.

YAN, J. *et al.* Mimicking the oxygen minimum zones: stimulating interaction of aerobic archaeal and anaerobic bacterial ammonia oxidizers in a laboratory-scale model system. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 12, p. 3146-3158, 2012.

YANG, G.; ZHANG, Q.; JIN, R. Changes in the nitrogen removal performance and the properties of granular sludge in an Anammox system under oxytetracycline (OTC) stress. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 65-71, 2013.

YANG, Y. *et al.* Two identical copies of the hydrazine synthase gene clusters found in the genomes of anammox bacteria. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 132, p. 236-240, 2018.

YANG, Y. *et al.* Complex microbial nitrogen-cycling networks in three distinct anammox-inoculated wastewater treatment systems. **Water Research**, v. 168, p. 115142, 2020a.

YANG, Y. *et al.* Specific and effective detection of anammox bacteria using PCR primers targeting the 16S rRNA gene and functional genes. **Science of The Total Environment**, v. 734, p. 139387, 2020b.

YANG, Y. *et al.* Discovery of a new genus of anaerobic ammonium oxidizing bacteria with a mechanism for oxygen tolerance. **Water Research**, v. 226, p. 119165, 2022.

YANG, Y. *et al.* Activities and metabolic versatility of distinct anammox bacteria in a full-scale wastewater treatment system. **Water Research**, v. 206, p. 117763, 2021.

YEOMANS, J. C.; BREMNER, J. Michael. A rapid and precise method for routine determination of organic carbon in soil. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 19, n. 13, p. 1467-1476, 1988.

YOKOTA, N. *et al.* High-rate nitrogen removal from waste brine by marine anammox bacteria in a pilot-scale UASB reactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 3, p. 1501-1512, 2018.

YOSHIDA, K. *et al.* A novel convenient method for high bacteriophage titer assay. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 53, p. 315-6, 2009.

YUAN, J. *et al.* A practical FeP nanoarrays electrocatalyst for efficient catalytic reduction of nitrite ions in wastewater to ammonia. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 325, p. 122353, 2023.

ZHANG, D. *et al.* Ecological interactions and the underlying mechanism of anammox and denitrification across the anammox enrichment with eutrophic lake sediments. **Microbiome**, v. 11, n. 1, p. 82, 2023.

ZHANG, F. *et al.* Unexpected selective photocatalytic reduction of nitrite to nitrogen on silver-doped titanium dioxide. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 9, p. 3756-3761, 2007.

ZHANG, J. *et al.* Improving the resistance of Anammox granules to extreme pH shock: The effects of denitrification sludge EPS enhanced by a fluctuating C/N ratio cultivation on granules. **Science of the Total Environment**, v. 763, p. 144610, 2021.

ZHANG, L. *et al.* Maximum specific growth rate of anammox bacteria revisited. **Water Research**, v. 116, p. 296-303, 2017.

ZHANG, L.; OKABE, S. Ecological niche differentiation among anammox bacteria. **Water Research**, v. 171, p. 115468, 2020.

ZHANG, M. *et al.* Presumptive Identification of Nitrite by Griess Reagent Test Strips–Case reports of fatal poisoning with sodium nitrite. **Journal of Analytical Toxicology**, p. bkad038, 2023.

ZHANG, M. *et al.* Nitrogen loss by anaerobic ammonium oxidation in a mangrove wetland of the Zhangjiang Estuary, China. **Science of the Total Environment**, v. 698, p. 134291, 2020.

ZHANG, M. *et al.* Effects of acute ammonia toxicity on oxidative stress, immune response and apoptosis of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* and the mitigation of exogenous taurine. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 79, p. 313-320, 2018.

ZHANG, Q. *et al.* Microbial dynamics reveal the adaptation strategies of ecological niche in distinct anammox consortia under mainstream conditions. **Environmental Research**, v. 215, p. 114318, 2022.

ZHANG, S. *et al.* Both microbial abundance and community composition mattered for N₂ production rates of the overlying water in one high-elevation river. **Environmental Research**, v. 189, p. 109933, 2020.

ZHANG, S. *et al.* Potential roles of anaerobic ammonium oxidation (anammox) in overlying water of rivers with suspended sediments. **Biogeochemistry**, v. 132, n. 3, p. 237-249, 2017.

ZHANG, T. *et al.* Microbial physiology and interactions in anammox systems with the intermittent addition of organic carbons. **Bioresource Technology**, v. 319, p. 124226, 2021.

ZHANG, W.; LU, Y.; WANG, M. Comparison of Degradation of Lignin-containing Wastewaters in the Presence of Different Microbial Consortia. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 37, n. 2, p. 107-121, 2023.

ZHANG, W. *et al.* Growth performance, physiological response and histology changes of juvenile blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala* exposed to chronic ammonia. **Aquaculture**, v. 506, p. 424-436, 2019.

ZHANG, Z. *et al.* A novel strategy for accelerating the recovery of an anammox reactor inhibited by copper (II): EDTA washing combined with biostimulation via low-intensity ultrasound. **Chemical Engineering Journal**, v. 279, p. 912-920, 2015.

ZHAO, P. *et al.* Mode-phase-difference photothermal spectroscopy for gas detection with an anti-resonant hollow-core optical fiber. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 847, 2020.

ZHAO, R.; BIDDLE, J. F.; JØRGENSEN, S. L. Introducing *Candidatus Bathyanammoxibiaceae*, a family of bacteria with the anammox potential present in both marine and terrestrial environments. **ISME Communications**, v. 2, n. 1, p. 42, 2022.

ZHAO, Y. *et al.* Metagenomic insights into functional traits variation and coupling effects on the anammox community during reactor start-up. **Science of the total environment**, v. 687, p. 50-60, 2019.

ZHAO, Y. *et al.* Insight into the aggregation capacity of anammox consortia during reactor start-up. **Environmental science & technology**, v. 52, n. 6, p. 3685-3695, 2018.

ZHAO, Y. *et al.* Potential bacterial isolation by dosing metabolites in cross-feedings. **Water Research**, v. 231, p. 119589, 2023.

ZHAO, Z. *et al.* Ladderane records over the last century in the East China sea: Proxies for anammox and eutrophication changes. **Water Research**, v. 156, p. 297-304, 2019.

ZHENG, Y. *et al.* Shifts in the community structure and activity of anaerobic ammonium oxidation bacteria along an estuarine salinity gradient. **Journal of Geophysical Research: Biogeosciences**, v. 121, n. 6, p. 1632-1645, 2016.

ZHENG, Y. *et al.* A novel method for immobilizing anammox bacteria in polyurethane foam carriers through dewatering. **Journal of Water Process Engineering**, v. 53, p. 103738, 2023.

ZHENG, Y. *et al.* Dynamics and environmental importance of anaerobic ammonium oxidation (anammox) bacteria in urban river networks. **Environmental Pollution**, v. 254, p. 112998, 2019.

ZHENG, Y. *et al.* Anaerobic ammonium oxidation (anammox) bacterial diversity, abundance, and activity in sediments of the Indus Estuary. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 243, p. 106925, 2020.

ZHOU, Z. *et al.* Practical applications of PCR primers in detection of anammox bacteria effectively from different types of samples. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, p. 5859-5871, 2018.

ZHU, G. *et al.* Occurrence, activity and contribution of anammox in some freshwater extreme environments. **Environmental Microbiology Reports**, v. 7, n. 6, p. 961-969, 2015.

ZHU, T. *et al.* Electrostimulation enhanced ammonium removal during Fe (III) reduction coupled with anaerobic ammonium oxidation (Feammox) process. **Science of The Total Environment**, v. 751, p. 141703, 2021.

ZHU, W. *et al.* Enhancement of pollutants removal from saline wastewater through simultaneous anammox and denitrification (SAD) process with glycine betaine addition. **Bioresource Technology**, v. 315, p. 123784, 2020.

ZUO, F. *et al.* In situ startup of a full-scale combined partial nitrification and anammox process treating swine digestate by regulation of nitrite and dissolved oxygen. **Bioresource Technology**, v. 315, p. 123837, 2020.