



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR
CURSO DE CIÊNCIAS AMBIENTAIS

YASMIN GIRÃO FERREIRA

**ESTUDO E PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS ANAMMOX PARA APLICAÇÃO EM
TRATAMENTO DE EFLUENTES DE AQUICULTURA**

FORALEZA

2020

YASMIN GIRÃO FERREIRA

ESTUDO E PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS ANAMMOX PARA APLICAÇÃO EM
TRATAMENTO DE EFLUENTES DE AQUICULTURA

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Ambientais.

Orientador: Prof. Dr. Oscarina Viana de Sousa.

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

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

- F444e Ferreira, Yasmin Girão.
Estudo e prospecção de bactérias anammox para aplicação em tratamento de efluentes de aquicultura /
Yasmin Girão Ferreira. – 2020.
45 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do
Mar, Curso de Ciências Ambientais, Fortaleza, 2020.
Orientação: Profa. Dra. Oscarina Viana de Sousa.
1. Bactérias aerotolerantes. 2. Atalho no ciclo do nitrogênio. 3. Compostos nitrogenados. I. Título.
CDD 333.7
-

YASMIN GIRÃO FERREIRA

ESTUDO E PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS ANAMMOX PARA APLICAÇÃO EM
TRATAMENTO DE EFLUENTES DE AQUICULTURA

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Ciências Ambientais do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Ambientais.

Aprovada em: 28 / 10 / 2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr^a. Oscarina Viana de Sousa (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

Dr^a. Marina Teresa Torres Rodríguez
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

A minha querida mãe, Evaneide,
que sempre será minha melhor amiga.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser meu melhor amigo, minha fortaleza e meu guia.

À minha amada mãe, Evaneide Girão (*in memoriam*), por ter passado para mim todo o seu amor, fé, alegria e, principalmente, força e coragem para ir atrás dos meus sonhos. Todas as minhas conquistas eu dedico a você, te amarei pra sempre.

Ao meu pai, Alcides Gerardi, por sempre acreditar e investir em mim, e nunca medir esforços para me ajudar. Ao meu irmão, Ytalo Girão, por sempre me dar as melhores risadas nos momentos que eu mais preciso, por sempre me incentivar a buscar meus sonhos e por me alimentar com as melhores comidas. Amo vocês!

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Oscarina Viana Sousa, pelo amor, carinho, confiança, ensinamentos, conselhos e por sempre estar disposta a me ajudar tanto na vida acadêmica como na vida pessoal. Obrigada por ser essa profissional e pessoa incrível, sempre me espelharei na senhora.

À Crisinha (Dr^a. Cristiane Teles), por passar todo o seu conhecimento de rotina no laboratório e na bancada (a senhora é o coração do laboratório), por todos os conselhos, risadas e por ser meu alicerce no momento mais difícil da minha vida.

À Dr^a. Marina Torres por ter me acolhido como neta, pelos conselhos pessoais, por abraçar meus projetos no laboratório e me ajudar sem medidas. E, principalmente, por ter me incentivado e me ajudado na escrita científica.

À minha mãe de laboratório, Dr^a. Jessica Lucinda, que me adotou e sempre me tratou com muito amor e carinho. Obrigada por ter me apoiado em todas as fases desse trabalho, pelos ensinamentos, paciência, compreensão, conversas e risadas (ajuda Luciano!).

À Anna Luisa, Jade Abreu e Patrícia Carneiro, por terem me ajudado em vários momentos dos meus experimentos, e também pelas conversas, brincadeiras e risadas.

À Prof^a. Dr^a. Gleire por todos os momentos de risadas, por sempre estar disposta a tirar minhas dúvidas, me orientar na bancada e me acompanhar para fazer as coletas no açude.

À equipe do LAMAP (Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado), por terem me ajudado e por tornar o ambiente mais divertido: Àlef Vasconcelos, Alexandra Sampaio, Ana Paula, Ariele Rodrigues, Daniel Borges, Danyela Soares, Eliziane Alexandre, Eduarda Torres, Evelyne Alves, Gabriela Moura, Gabriel Bezerra, Igor Dantas, Isaias Farias, Janaína Silva, Jessica Costa, Jhones Lima, João Pedro, Larissa Nunes, Mariana Franco, Márcio Ivis, Raquel Soares, Regia Liliane, Robério Mires, Thereza Martins, Vitoria Regia, Vladila Oliveira, Yasmin Marques.

À Ana Paula, minha parceira de laboratório, que sempre me ajudou na bancada do laboratório quando eu gritava socorro e também na vida pessoal. À Gabrielle Tavares, pelos conselhos, ensinamentos e por ser tão amorosa comigo e com minha mãe. À Virgínia Eduarda, por me alimentar com os melhores bolos, por me acompanhar nas brincadeiras e por ser tão única e adorável. Ao Matheus Campos, por sempre estar disposto a me ajudar e escutar minha tagarelice. À Evelyne Alves, Lia Salete e Karol Braga por todos os momentos engraçados e de parceria. Vocês tornaram meus 4 anos e meio de curso mais leve, divertido e prazeroso. Obrigada por tanto amor e carinho.

À minha turma de 2016.1, por vivermos grandes alegrias e aventuras nas aulas de campos, e por sempre estarem dispostos a ajudar.

Às minhas amigas Ester Freitas e Juliana Carlos, que apesar da distância sempre estiveram comigo, me apoiando, me incentivando, me dando conselhos, amor e força pra continuar. E, principalmente, por me escutarem, mesmo sem entenderem, sobre as bactérias.

Às minhas queridas tias do coração, Leoni Araújo, Francinete Ferreira, Mazé Cavalcante, Lúcia Franco, Edilza Sales, Marlene Monteiro, Ana Lúcia e Eliete Alves que cuidam de mim como se fosse uma filha e me incentivam a ir atrás dos meus sonhos.

Aos professores da Universidade Federal do Ceará (UFC) que contribuíram na minha formação acadêmica, profissional e pessoal: Adilson Gandu, Afrânio de Araújo, Ana Maria, Cristina Almeida, Danielle Garcez, Eduardo Lacerda, Fábio de Oliveira, Geraldo Ferreira, Juliana Barros, Kamila Mendonça, Marcelo Moro, Marcelo Soares, Michael Barbosa, Marcus Vinicius, Rivelino Cavalcante, Sandra Santaella, Oscarina Viana.

Ao CNPQ pela concessão da bolsa da pesquisa.

“A vida é uma corrida que não se corre sozinho. E vencer não é chegar, é aproveitar o caminho sentindo o cheiro das flores e aprendendo com as dores causadas por cada espinho.”

Bráulio Bessa

RESUMO

A oxidação anaeróbica de amônio (anammox) é uma via microbiana que pode remover simultaneamente o amônio e o nitrito por meio de bactérias que fazem um atalho no ciclo do nitrogênio. Essas bactérias possuem potencial na mitigação de ambientes poluídos, incluindo o tratamento de efluentes da aquicultura que são ricos de compostos nitrogenados. Considerando esses fatos, o objetivo dessa pesquisa foi realizar prospecção e isolamento de bactérias aerotolerantes com atividade anammox em ecossistema aquático continental (EAC) como base para desenvolvimento de processo biotecnológico, para melhoraria da qualidade do efluente de cultivo de organismos aquáticos através da redução do nitrogênio amoniacal total. Foram coletadas amostras de água e de sedimento em três pontos do Açude Santo Anastácio (Fortaleza – CE). Essas amostras foram enriquecidas com um caldo mineral seletivo para bactérias anammox (M1) e postas em jarra de anaerobiose por sete dias. Após diluições, as amostras foram inoculadas por meio da técnica *Pour Plate* em meio de cultura seletivo para anammox (M2) e outro meio não seletivo (M3). A partir disso, foi realizado Contagem Padrão em Placa (CPP), isolamento, e coloração de Gram. Foi verificado que o crescimento das unidades formadoras de colônias (UFC) bacterianas foi maior a partir das amostras inoculadas no meio M3. Além disso, tanto no meio M2 quanto no M3, as amostras de sedimento apresentaram maior quantidade de bactérias: $2,22 \times 10^5$ UFC/g e $7,15 \times 10^6$ UFC/g, respectivamente. Foram isoladas 27 estirpes bacterianas, utilizando o critério de serem aerotolerantes e com crescimento em até cinco dias. Das estirpes identificadas, 74% foram isoladas do meio M2 e 26% do meio M3. A maioria das estirpes apresentou morfologia de bastonetes Gram-positivos e foram isoladas das amostras de sedimento.

Palavras-chaves: Bactérias aerotolerantes. Atalho no ciclo do nitrogênio. Compostos nitrogenados.

ABSTRACT

Anaerobic oxidation of ammonium (anammox) is a microbial pathway that can simultaneously remove ammonium and nitrite through bacteria that take a shortcut in the nitrogen cycle. These bacteria have the potential to mitigate polluted environments, including the treatment of aquaculture effluents that are rich in nitrogenous compounds. Considering these facts, the objective of this research was to carry out prospection and isolation of aerotolerant bacteria with anammox activity in continental aquatic ecosystem (CAE) as a basis for biotechnological process development, to improve the quality of the effluent from aquatic organisms through the reduction of total ammoniacal nitrogen. Water and sediment samples were collected at three points of the Santo Anastácio Dam (Fortaleza - CE). These samples were enriched with a selective mineral broth for anammox bacteria (M1) and placed in an anaerobic jar for seven days. After dilutions, the samples were inoculated using the Pour Plate technique in anammox selective culture medium (M2) and another non-selective medium (M3). Then, Standard Plate Counting (SPC), isolation, and Gram staining were performed. It was witnessed that the growth of bacterial colony-forming units (CFU) was higher in the samples inoculated in the M3 medium. Also, in both M2 and M3 media, the sediment samples had the highest amount of bacteria: $2,22 \times 10^5$ CFU/g and $7,15 \times 10^6$ CFU/g, respectively. Twenty-seven bacterial strains were isolated, using the criterion of being air tolerant and growing in up to five days. Of the strains identified, 74% were isolated from the M2 medium and 26% from the M3 medium. Most strains showed Gram-positive rod morphology and were separate from sediment samples.

Keywords: Air-tolerant bacteria. Shortcut in the nitrogen cycle. Nitrogen compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo microbiológico do nitrogênio, incluindo o processo anammox.....	21
Figura 2 – Compartimento celular das bactérias anammox.....	23
Figura 3 – Área de localização dos pontos de coletas de sedimento e da água (Açude Santo Anastácio – Fortaleza – CE).....	27
Figura 4 – Fluxograma do processamento das amostras de sedimento e de água.....	30
Figura 5 – Fluxograma que representa a técnica de coloração de Gram.....	31

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Quantidade de bactérias aerotolerantes crescidas no meio M2, por pontos de coletas.....	33
Gráfico 2 – Quantidade de bactérias aerotolerantes crescidas no meio M3, por pontos de coletas.....	34
Gráfico 3 – Frequência dos isolados bacterianos de acordo com a morfologia e característica de parede celular.....	35
Gráfico 4 – Frequência dos isolados bacterianos de acordo com a morfologia e característica de parede celular isoladas do meio de cultura M2.....	36
Gráfico 5 – Frequência dos isolados bacterianos de acordo com a morfologia e característica de parede celular isoladas do meio de cultura M3.....	36
Gráfico 6 – Distribuição dos isolados de acordo com a morfologia e Gram em relação ao tipo de amostra (sedimento e água).....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição do meio cultura usado no enriquecimento das bactérias anammox.....	28
Tabela 2 – Composição do meio de cultura para o isolamento e purificação das bactérias.....	29
Tabela 3 – Quantificação de bactérias aerotolerantes isoladas de amostras de sedimento e água do açude Santo Anastácio, Fortaleza – CE.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
CPP	Contagem Padrão em Placas
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EAC	Ecossistema Aquático Continental
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
LAMAP	Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado
M1	Meio de Cultura 1
M2	Meio de Cultura 2
M3	Meio de Cultura 3
RNA	Ácido Ribonucleico
UFC	Unidade Formadora De Colônia

LISTA DE SÍMBOLOS

CaCl_2	Cloreto 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
C	Celsius
FeSO_4	Sulfato de Ferro
g/l	Grama por litro
H_3BO_3	Ácido Bórico
KH_2PO_4	Fosfato Monopotássico
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de Magnésio
mL	Mililitro
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de Magnésio
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de Manganês
N_2	Nitrogênio
NaCl	Cloreto de Sódio
NaHCO_3	Bicarbonato de Sódio
NaNO_2	Nitrito de Sódio
NH_4Cl	Cloreto de Amônio
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de Níquel
NO	Óxido Nítrico
N_2O	Óxido Nitroso
NO_2^-	Nitrito
NH_3	Amônia
NO_3^-	Nitrato
NH_4^+	Amônia Ionizada
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de Zinco
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivos gerais	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3 REFERENCIAL TEÓRICO	20
3.1 Impactos de resíduos de cultivo da aquicultura no ambiente	20
3.2 O ciclo do nitrogênio e suas formas presentes no ambiente aquático.....	21
3.3 Bactérias anammox	22
3.4 Papel das bactérias anammox no tratamento de efluentes	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Local da coleta	26
4.2 Procedimento da coleta	28
4.3 Análises microbiológicas	28
4.3.1 Meios de cultura utilizados.....	28
4.3.2 Processamento das amostras	29
4.3.3 Identificação morfotintorial	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1 Contagem padrão em placa	32
5.2 Caracterização morfotintorial das bactérias	34
6 CONCLUSÃO.....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da aquicultura no Brasil ocorre devido ao clima favorável e a disponibilidade dos recursos hídricos naturais, como grandes bacias hidrográficas, litoral extenso e grande número de espécies aquáticas de água doce e água salgada (SIQUEIRA, 2018). Entretanto, a atividade aquícola causa impactos ambientais negativos devido ao grande volume de água utilizado e aos efluentes gerados que são ricos em nutrientes que podem prejudicar os corpos hídricos receptores, caso não haja um tratamento adequado antes da liberação.

As águas residuais resultantes do cultivo de animais destinados à alimentação são abundantes em nutrientes, como nitrogênio e fósforo, matéria orgânica, organismos patogênicos, compostos recalcitrantes provenientes de medicamentos (HENRY-SILVA; CAMARGO, 2018; SINGH *et al.*, 2015). O descarte desses efluentes sem tratamento adequado resulta em consequências adversas para o ecossistema receptor. Além disso, a qualidade da água no viveiro pode tornar-se tóxica com a rápida acumulação de nitrogênio amoniacal total (NAT) devido à alta taxa de excreção metabólica dos animais e resíduos de ração depositados, causando efeitos negativos para o sistema ecológico e para a própria atividade (HOPKINS *et al.*, 1995; PAEZ-OSUNA *et al.*, 1998).

Assim, tem-se investido em novas tecnologias para a melhoria e adequação desse agronegócio de forma a trazer desenvolvimento econômico sem pôr em risco a qualidade ambiental tornando a atividade ambientalmente sustentável. Os processos biológicos de tratamento são os mais empregados na remoção de nitrogênio de águas residuárias devido ao seu menor custo de operação. De maneira geral, o tratamento biológico tem por objetivo potencializar os processos que ocorrem na natureza (TATSI *et al.*, 2003).

Para a remoção biológica dos compostos nitrogenados dos efluentes existem vários processos como: nitrificação, desnitrificação e anammox. A oxidação anaeróbica de amônio (anammox) é uma via microbiana na qual, em condições anóxicas, bactérias fazem um atalho no ciclo do nitrogênio, convertendo a amônia em nitrogênio atmosférico usando o nitrito como aceptor final de elétrons (FLECK; TAVARES; EYNG, 2015). Esse processo apresenta uma alternativa mais sustentável, econômica e vantajosa de remover nitrogênio dos efluentes dentre os outros processos mais tradicionais (VAN HULLE, 2010). As vantagens são: maior taxa de remoção de nitrogênio, menores custos operacionais e utilização de espaços menores.

Diante desses benefícios, a presente pesquisa possui a finalidade de realizar prospecção e isolamento de bactérias anammox aerotolerantes como proposta de desenvolvimento de processo biotecnológico para mitigar os efeitos das águas residuais geradas na atividade da aquicultura.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar prospecção e isolamento de bactérias aerotolerantes com atividade anammox em ecossistema aquático continental (EAC) como base para desenvolvimento de processo biotecnológico, capaz de melhorar a qualidade do efluente de cultivo de organismos aquáticos através da redução do nitrogênio amoniacal total, contribuindo para desenvolvimento econômico e ambiental da atividade aquícola.

2.2 Objetivos específicos

- Otimizar protocolo de detecção e isolamento de bactérias aerotolerantes com atividade anammox;
- Quantificar bactérias anammox utilizando meio seletivo e não seletivo; em pontos distintos em amostras ambientais do açude santo Anastácio;
- Isolar e caracterizar as estirpes bacterianas anammox aerotolerantes.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Impactos de resíduos de cultivo da aquicultura no ambiente

Atualmente, uma parte das fazendas de aquicultura inclui tratamentos químicos, físicos e/ou biológicos dos efluentes para que eles possam ser lançados no ambiente de acordo com os padrões estabelecidos na legislação ambiental, ou para serem circulados e reutilizados no sistema de cultivo (Wang *et al.*, 2018). O desenvolvimento dessa prática sem um tratamento prévio do efluente, pode devastar áreas de manguezal, destruir vegetação costeira, causar danos ecológicos aos estuários, como diminuição da quantidade de oxigênio dissolvido, eutrofização, destruição de habitats de espécies nativas, contaminação e alteração ou perda da biodiversidade aquática (TANCREDO *et al.*, 2011; HERBECK *et al.*, 2013; FLECK, TAVARES, EYNNING, 2015; OLIVEIRA; SOUSA; SOBRAL, 2017).

Os resíduos da aquicultura provêm principalmente da ração não consumida e excretada na forma de amônia pelas brânquias ou nas fezes (CRAB *et al.*, 2007; TOVAR *et al.*, 2000; MERIAC *et al.*, 2014). De acordo com Gichana *et al.* (2018), nos peixes apenas 1/3 dos nutrientes da ração são digeridos e convertidos em proteína animal, enquanto o restante é excretado no ambiente. Portanto, as águas de cultivo de organismos aquáticos estão associadas a elevada concentração de sólidos suspensos e de nutrientes (amônia, nitrito e nitrato), e isso impacta negativamente nos solos e nas águas que os recebem, causando eutrofização, aumento de turbidez da água, assoreamento e influência na adequação das águas residuais para reutilização (DU *et al.*, 2015; KUMAR; LIN, 2010). Além disso, nos sistemas de cultivos o acúmulo desses compostos nitrogenados, que são altamente tóxicos, causa a morte de peixes e/ou camarões (Wang *et al.*, 2019), ocasionando prejuízos zootécnicos e econômicos.

Substâncias antimicrobianas e químicas vêm sendo utilizadas pelos produtores como tratamento para manter a qualidade da água, para prevenir doenças que afetam os organismos cultivados e aumentar a produção nos viveiros. Entretanto, o uso destes antimicrobianos pode causar o aumento da resistência de organismos patogênicos e atingir rios e lagos, provocando um desequilíbrio ambiental e afetando a saúde humana (ELER; MILANI, 2007).

Novas tecnologias estão sendo testadas e implantadas para a produção da aquicultura e para a remoção de compostos nitrogenados das águas residuais de viveiros,

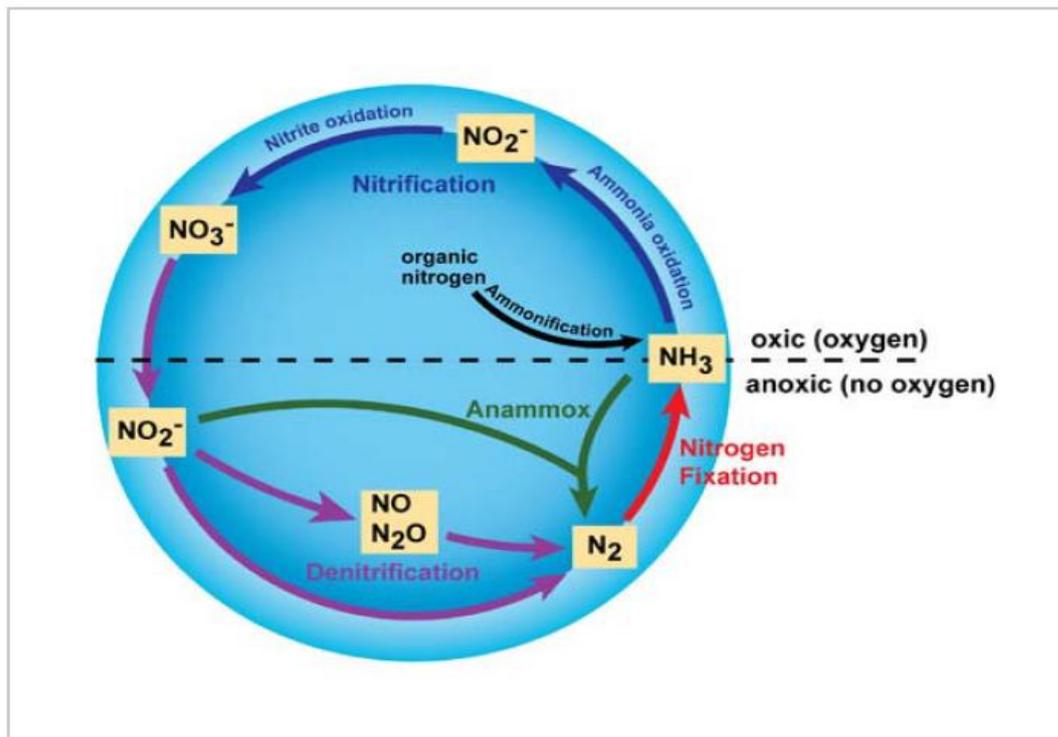
antes de serem lançados no corpo receptor. Pode-se citar a aplicação de processos como probióticos, bioflocos, nitrificação, desnitrificação e oxidação anaeróbia da amônia (anammox), que são utilizados para remover nitrogênio dos efluentes (DAVEREY *et al.*, 2013).

3.2 O ciclo do nitrogênio e suas formas presentes no ambiente aquático

O nitrogênio (N_2) é o quarto elemento mais abundante na biomassa celular, e compõe estruturas orgânicas, como as proteínas e os ácidos nucleicos, DNA e RNA (STEIN; KLOTZ, 2016). No ambiente, o N_2 existe em diferentes formas: amônia (NH_3), nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-). A amônia é o componente mais abundante nos efluentes da aquicultura, pois é o produto mais comum no metabolismo protéico de organismos aquáticos (JIMÉNEZ-OJEDA; COLLAZOS-LASSO; ARIAS-CASTELLANOS, 2018).

No ciclo do nitrogênio (FIGURA 1), os microrganismos estão presentes em todas as etapas e são responsáveis pela transformação do nitrogênio no ecossistema aquático. As principais etapas de transformações do ciclo do nitrogênio são: fixação, nitrificação, desnitrificação, anammox e amonificação.

Figura 1 – Ciclo microbiológico do nitrogênio, incluindo o processo anammox.



A fixação do nitrogênio é um processo enzimático, no qual o N_2 é convertido em nitrogênio biologicamente disponível, como a amônia (NH_3) (BERNHARD, 2010). Essa etapa é fundamental para a obtenção de fonte de nitrogênio para os compostos químicos complexos dos organismos. Entretanto, a presença da ligação tripla ($N\equiv N$) na fixação do nitrogênio requer a atuação de microrganismos que possuam a enzima nitrogenase para romper essa ligação (VIEIRA, 2017). De acordo com Martinez-Romero (2006) o Domínio Bacteria e o Domínio Archae possuem os genes que codificam essa enzima.

A nitrificação envolve duas etapas de conversão dos compostos nitrogenados. A primeira é a nitrificação, no qual microrganismos oxidam a amônia (NH_3) em nitrito (NO_2^-). E a segunda é a nitratação, que na presença de oxigênio os microrganismos oxidam nitrito (NO_2^-) em nitrato (NO_3^-) (JIMÉNEZ-OJEDA; COLLAZOS-LASSO; ARIAS-CASTELLANOS, 2018). As bactérias que participam da nitrificação dividem-se e em dois grupos: bactérias oxidadoras da amônia e bactérias oxidadoras de nitrito (VIEIRA, 2017).

Na desnitrificação, o nitrato pode ser reduzido a óxido nitroso (N_2O), óxido nítrico (NO) e N_2 , e, por serem gases, podem ser facilmente perdidos no ambiente. Esse processo é benéfico no tratamento de esgotos pois reduz a carga de nitrogênio fixado no efluente, e, assim, diminui o crescimento de algas nas águas do corpo receptor (MADIGAN *et al.*, 2016).

O processo anammox é um atalho no ciclo do nitrogênio, no qual bactérias anaeróbias oxidam a amônia em nitrogênio molecular, utilizando o nitrito como aceptor de elétrons, produzindo nitrogênio gasoso (VAN LOOSDRECHT, 2017). Essa atividade é importante para o ciclo do nitrogênio marinho, uma vez que 50% da perda de nitrogênio nos ambientes marinhos e oceânicos ocorre por meio da oxidação de bactérias anaeróbias oxidadoras de amônia (JETTEN *et al.*, 2009; HU *et al.*, 2011).

Na amonificação ocorre a formação de amônia livre (NH_3) ou ionizada (NH_4^+), por meio de bactérias que hidrolisam compostos nitrogenados provenientes de excretas de animais ou de restos de animais (HO, 2018).

3.3 Bactérias anammox

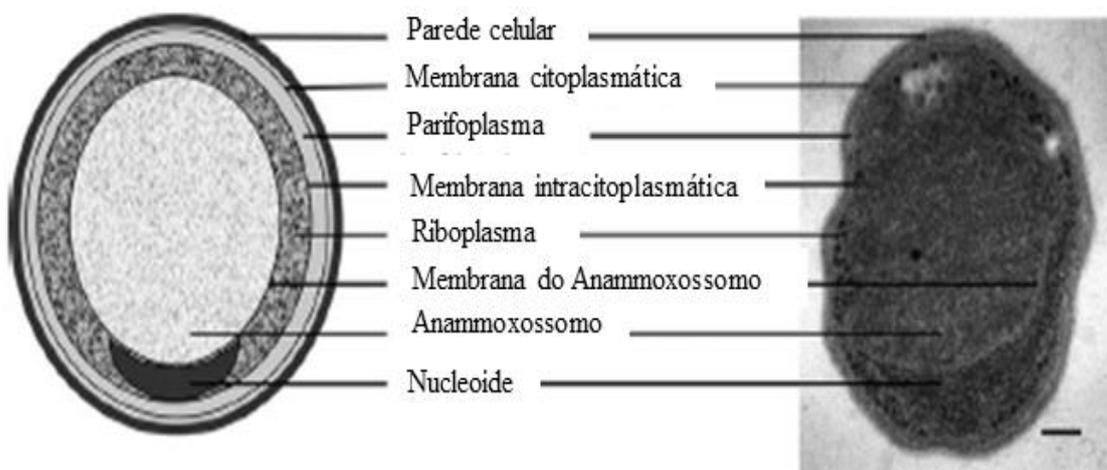
As bactérias com atividade anammox foram descritas primeiramente por Strous *et al.* (1999) que conseguiram purificar fisicamente células anammox em testes

laboratoriais. A primeira bactéria anammox foi denominada *Candidatus Brocadia anammoxidans* (KARTAL; KELTJENS; JETTEN, 2008).

Essas bactérias são quimiolitotóxicas, anaeróbicas e possuem tempo de crescimento lento, de duas semanas (KALLISTOVA *et al.*, 2016; VAN TEESELING *et al.*, 2015). São autotróficas, entretanto, diferentes das bactérias oxidantes de amônia aeróbicas, elas fixam o gás carbônico por meio de uma via de acetil-CoA, que é amplamente distribuída em determinadas bactérias e arqueias autotróficas anaeróbicas (MADIGAN *et al.*, 2016). Além disso, na transformação de amônio e nitrito para gás nitrogênio, as bactérias anammox não precisam de uma fonte externa de carbono, como o metanol (HAUCK *et al.*, 2016).

Os organismos anammox possuem particularidades estruturais raras ou únicas, uma delas é o compartimento celular específico anamoxossomo (FIGURA 2), que compreende 50-70% do volume total das células (KARTAL; KELTJENS; JETTEN, 2008). Nessa estrutura, exclusivamente, ocorre o processo anammox e estão situadas todas as enzimas catabólicas das bactérias anammox, que são: hidrazina desidrogenase (HDH), hidroxilamina oxidorreductase (HOX), nitrito oxidoreductase (NRX), hidrazina sintase (HZS) (NEUMANN *et al.*, 2014; ALMEIDA *et al.*, 2015).

Figura 2 – Compartimento celular das bactérias anammox.



Fonte: Adaptado de NIFTRIK *et al.*, 2004.

Na esquerda: desenho esquemático. Na direita: seção fina criossustituída de *Candidatus Brocadia anammoxidans* visto por microscopia eletrônica de transmissão.

As bactérias anammox podem ser encontradas em ambientes marinhos hipersalinos e profundos, em lagos, rios, estuários, em ecossistemas terrestres como pântanos, aquífero poroso contaminado, solo agrícola, sistemas artificiais e naturais com

zonas sem oxigênio (ZHANG *et al.*, 2007; HUMBERT *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2012; ZHU *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2017). As descobertas dessas bactérias indicam que elas podem ter um amplo habitat ambiental e ser responsável por produzir N₂ a partir de ecossistemas naturais e ser a principal fonte de nitrogênio para a atmosfera (BURGIN; HAMILTO, 2007; KARTAL; KUENEN; VAN LOOSDRECHT, 2010; WANG *et al.*, 2015).

Apesar das bactérias anammox serem anaeróbias, foi identificada atividade anammox em reatores de estações de tratamento de águas residuais com oxigênio dissolvido superior a 5,0 mg/L na água bruta (LIU *et al.*, 2008; JARDIN, HENNERKES, 2012; JIA *et al.*, 2012; ZHENG *et al.*, 2016; XIA *et al.*, 2019). Portanto, esses estudos apontam que as bactérias anammox podem ser aerotolerantes.

3.4 Papel das bactérias anammox no tratamento de efluentes

A remoção dos compostos nitrogenados das águas residuais da aquicultura é importante pois protege os ecossistemas aquáticos, sendo fundamental para lugares com fragilidade hídrica, como o Ceará. A tecnologia anammox é utilizada principalmente para a remoção desses compostos nos efluentes, no qual minimiza impactos significativos no ambiente natural e melhora as condições gerais de saúde da população humana.

Por remover altas concentrações de amônia e nitrito da água sem produzir óxido nítrico e ser altamente eficiente e ecológica, a reação anammox, quando comparada com os processos de nitrificação e desnitrificação, é considerada a primeira opção para o tratamento de água residuais (JIMÉNEZ, COLLAZOS-LASSO, ARIAS-CASTELLANOS, 2018). Este processo além de reduzir o consumo de oxigênio e o custo com aeração, ele controla e reduz a emissão de gases do efeito estufa como, por exemplo, o CO₂, no qual este é consumido como carbono inorgânico pelas bactérias anammox (GAO; TAO, 2011).

A aquicultura utiliza a tecnologia anammox por meio de reatores com diferentes configurações e, muitas vezes, adicionam a nitrificação parcial ao processo (VLAEMINCK *et al.*, 2009; LIN *et al.*, 2020). Esse processo possui alta eficiência, podendo remover cerca de 89% do nitrogênio das águas residuais e transformando-o em nitrogênio gasoso (RUSCALLEDA *et al.*, 2010). Entretanto, sua aplicação e industrialização é difícil pois essas bactérias possuem uma taxa de crescimento lenta (tempo de duplicação de aproximadamente 11 dias), não estão disponíveis em culturas puras e podem ser inibidas sob condições de alta concentração de

oxigênio dissolvido (OD) (STROUS *et al.*, 1998; PERSSON *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2017; ÇELEN-ERDEM, 2020).

O primeiro relato da presença de bactérias anammox nos sistemas de aquicultura foi realizado por Tal *et al.* (2006). Eles conseguiram identificar as células anammox tanto por microscopia quanto pelo isolamento de sequências genéticas, e medir a atividade anammox a partir de um biofiltro desnitrificante de um sistema de aquicultura marinha em recirculação (TAL *et al.*, 2006). Van Kessel *et al.* (2010) foram os primeiros a provar a existência de bactérias anammox em cultivos de aquicultura de água doce, por meio de dados moleculares. Em ambos os estudos foi detectado baixa densidade populacional nos biofiltros dos sistemas, provavelmente isso ocorre devido ao fato que as bactérias anammox são anaeróbias e por isso crescem melhor nos compartimento onde há menos aeração (VAN KESSEL *et al.*, 2011; VAN KESSEL *et al.*, 2010).

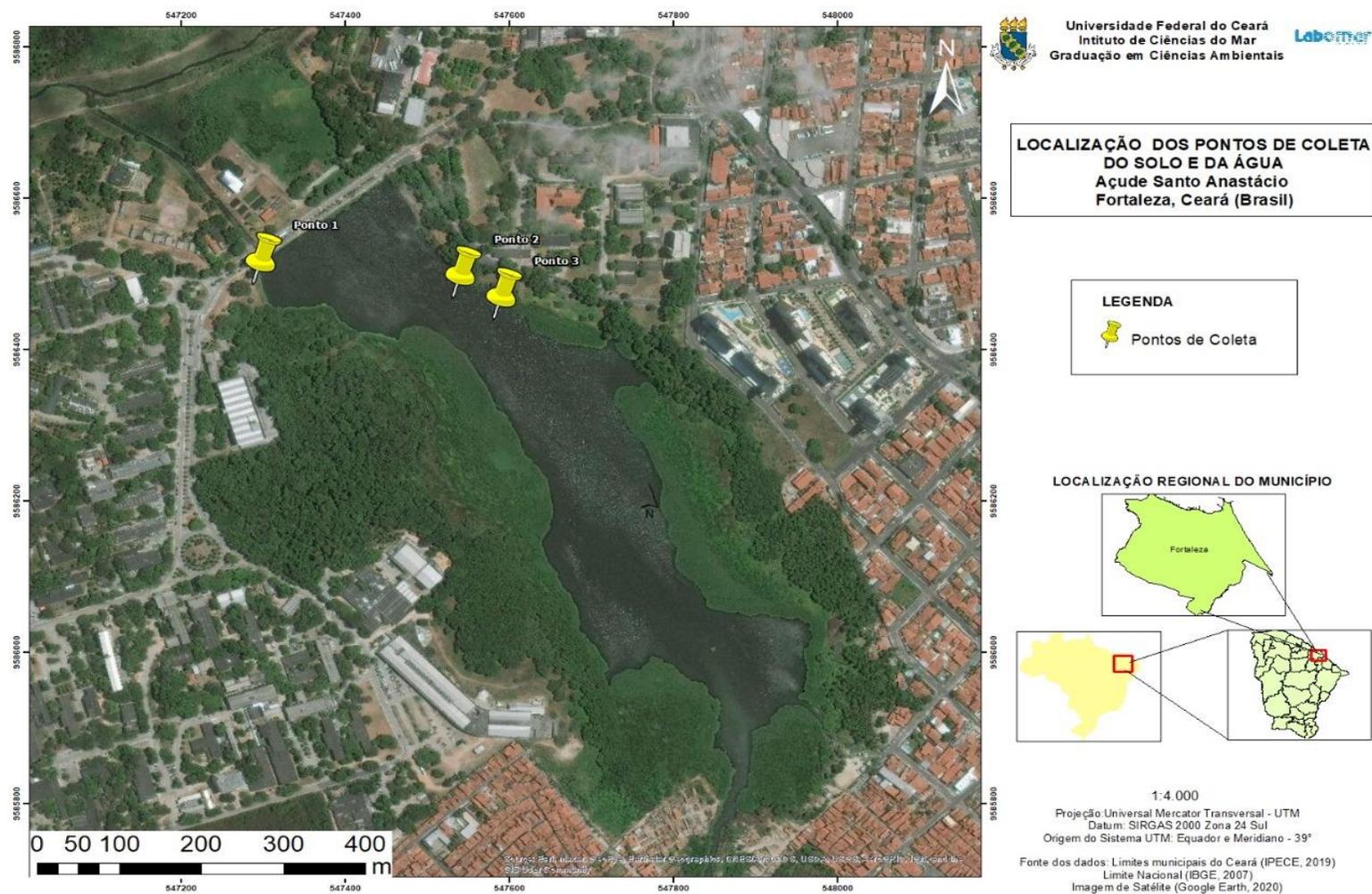
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local da coleta

O açude Santo Anastácio está localizado no Campus Universitário do Pici da UFC (Fortaleza – CE) e pertence a bacia do Rio Maranguapinho. É abastecido pela Lagoa da Parangaba, que é alvo de lixos, efluentes, dejetos, resíduos de fontes pontuais (indústrias, domicílios) e fontes difusas (deposição atmosférica de poluentes, infiltração) (ARAÚJO; NETO; BECKER, 2016; VASCONCELOS; VIEIRA; FONTELES-FILHO, 2008). Além disso, o açude possui alta densidade de macrófitas aquáticas e recebe diretamente efluentes clandestinos que influenciam no aumento da eutrofização, nas baixas concentrações de oxigênio e na morte de peixes (SÁNCHEZ-BOTERO *et al.*, 2014).

As bactérias anammox, por serem anaeróbias, são encontradas em ambientes eutrofizados, com baixas concentrações de oxigênio. Tendo em vista essas características, foram coletadas amostras de água e sedimento em três pontos do açude Santo Anastácio, Fortaleza (CE) (FIGURA 3), em dezembro de 2019. Durante a amostragem foi observada a presença de macrófitas aquáticas nos três pontos de coleta, sem detecção de chuva.

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



Fonte: Autora

4.2 Procedimento da coleta

As amostras de água foram coletadas com garrafas âmbar de um litro esterilizadas, totalmente preenchidas de água para evitar o mínimo de oxigênio. Para as amostras de sedimento foi utilizado o coletor de solo e armazenadas em sacos plásticos. Todas as amostras foram acondicionadas em um isopor e imediatamente conduzidas ao Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LAMAP) do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR), para realizar as análises microbiológicas das amostras.

4.3 Análises microbiológicas

4.3.1 Meios de cultura utilizados

O meio de cultura utilizado para o cultivo de bactérias anammox (M1) foi um meio mineral composto por elementos traços, elaborado por Qin e Zhou (2009) (TABELA 1).

Tabela 1 – Composição do meio cultura usado no enriquecimento das bactérias anammox (M1).

Meio mineral		Microelementos	
Substâncias	Concentração (g/L)	Substâncias	Concentração (g/L)
KH ₂ PO ₄	0,027	EDTA	0,0005
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,3	FeSO ₄	0,0005
CaCl ₂	0,136	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,0004
NaHCO ₃	0,5	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,00025
NH ₄ Cl	0,11	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,0001
NaNO ₂	0,15	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).

Para o isolamento e purificação das bactérias foram utilizados dois meios de cultura. Um foi uma solução composta por elementos traços mais ágar (M2) (TABELA 2) elaborado por Qin e Zhou (2009). E o outro meio de cultura foi o Ágar peptona (M3).

Tabela 2 – Composição do meio de cultura para o isolamento e purificação das bactérias (M2).

Substâncias	Concentração (g/L)
NH ₄ Cl	1,0
NaNO ₂	0,5
Glucose	1,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5
KH ₂ PO ₄	0,7
CaCl ₂	0,3
NaCl	0,2
NaHCO ₃	0,5
Ágar	17,0

Fonte: Adaptado de Qin e Zhou (2009).

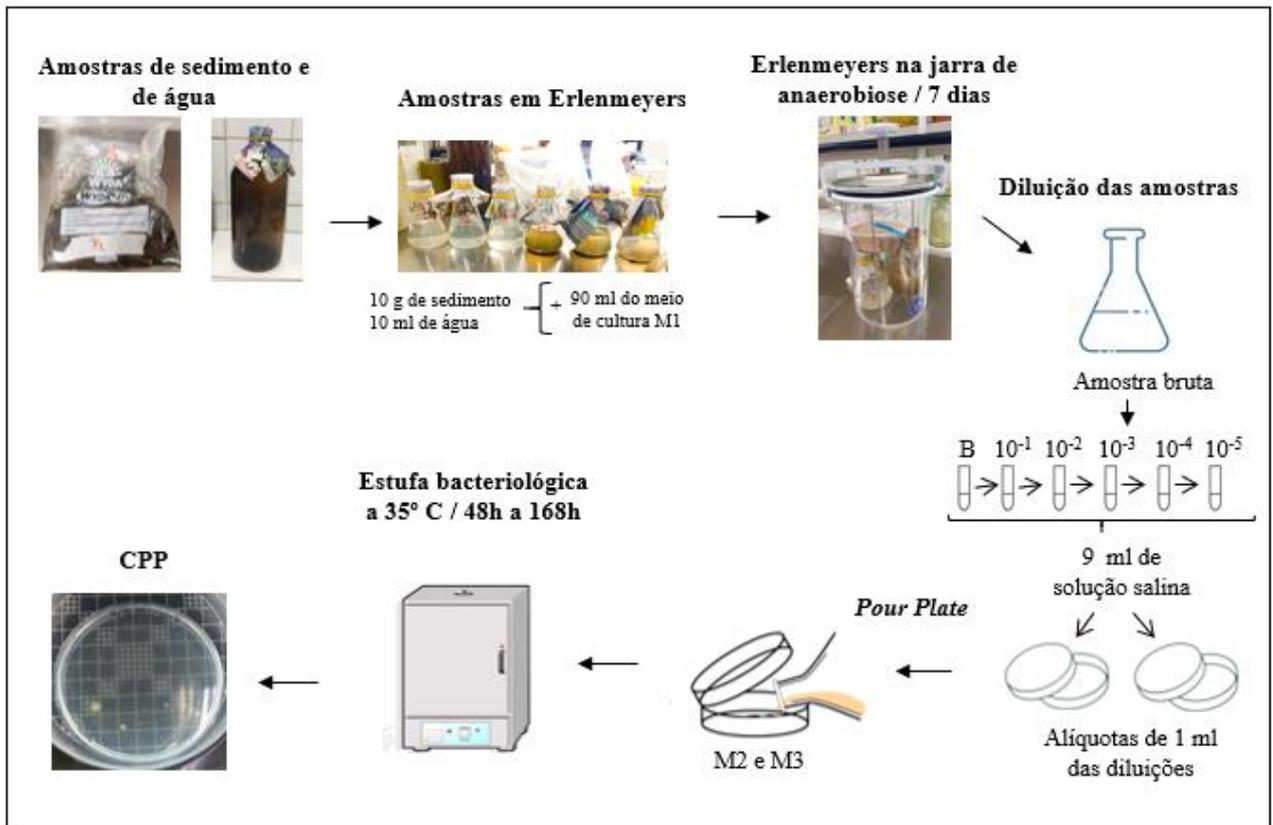
O valor do pH dos meios de culturas M1 e M2 foram ajustados com NaHCO₃ para cerca de 7,6.

4.3.2 *Processamento das amostras*

Para o processamento das amostras, 10 g de sedimento e 10 ml de água de cada um dos três pontos de coleta foram homogeneizadas, separadamente, em erlenmeyers com 90 ml do meio M1 para o enriquecimento das bactérias anammox. Em seguida, os erlenmeyers foram colocados em jarras de anaerobiose (PERMUTION) por 7 dias.

Após este período, foram feitas diluições seriadas da primeira diluição até a 10⁻⁵ em solução salina 0,85%, de cada ponto. Por meio da técnica *Pour Plate*, alíquotas de 1 ml das diluições foram inoculadas em placa de Petri, em duplicata, e cobertas separadamente pelos meios de cultura (M2) e (M3), incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 48h (M3), 120h e 168h (M2). A quantificação bacteriana foi realizada por meio da aplicação do método de Contagem padrão em placas (CPP), considerando as placas que apresentarem valores de contagens entre 25 e 250 unidades formadoras de colônias (UFC) (DOWNES; ITO, 2001) (FIGURA 4).

Figura 4 – Fluxograma do processamento das amostras de sedimento e de água.



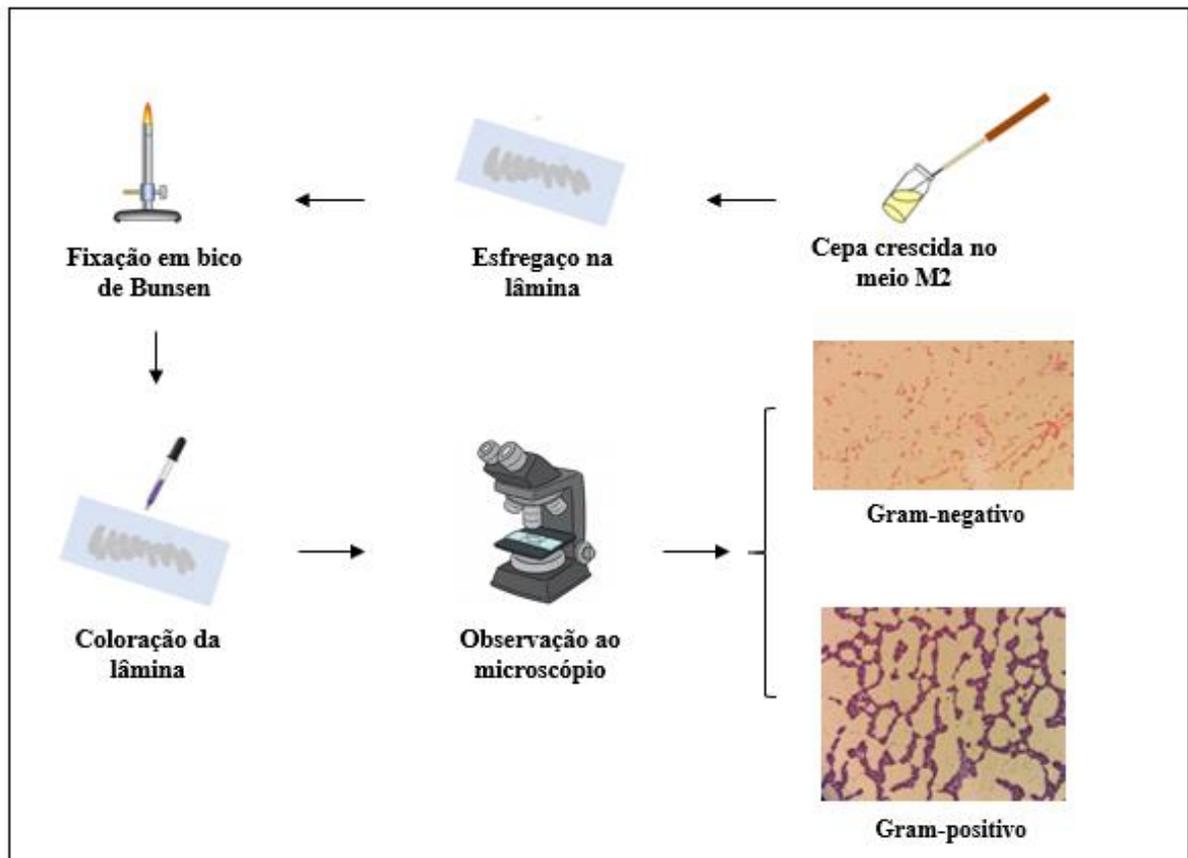
Fonte: Autora.

Para o isolamento das colônias de bactérias em tubos, foi utilizado o meio M2 e incubadas em estufa a 35°C por 5 dias.

4.3.3 Identificação morfolotintorial

A análise da morfologia e da estrutura da parede celular das bactérias foi realizada pela técnica de coloração de Gram, que permite identificar e diferenciar as bactérias em dois grandes grupos: Gram positivas ou Gram negativas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). A metodologia está representada na Figura 5.

Figura 5 – Fluxograma que representa a técnica de coloração de Gram.



Fonte: Autora

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Contagem padrão em placa

Na Tabela 3 têm-se o resultado da densidade populacional das bactérias aerotolerantes que foram cultivadas no meio de cultura seletivo para bactérias anammox (M2) e no meio não seletivo (M3). No meio M2, a amostra de sedimento coletado em P1 apresentou a maior quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC) ($2,22 \times 10^4$). No meio M3, a amostra de sedimento de P3 teve a maior quantidade de bactérias expressas em UFC/g ($7,15 \times 10^6$).

Tabela 3 – Quantificação de bactérias aerotolerantes isoladas de amostras de sedimento e água do açude Santo Anastácio, Fortaleza – CE.

Meios de cultura	Amostras	Pontos	Bactérias aerotolerantes
M2	Água (UFC/mL)	P1	$1,85 \times 10^3$
		P2	$7,25 \times 10^1$
		P3	$9,3 \times 10^1$
	Sedimento (UFC/g)	P1	$2,22 \times 10^4$
		P2	$7,55 \times 10^2$
		P3	$3,6 \times 10^2$
M3	Água (UFC/mL)	P1	$3,1 \times 10^6$
		P2	$3,4 \times 10^6$
		P3	$4,95 \times 10^6$
	Sedimento (UFC/g)	P1	$2,95 \times 10^5$
		P2	$1,67 \times 10^6$
		P3	$7,15 \times 10^6$

Fonte: Autora.

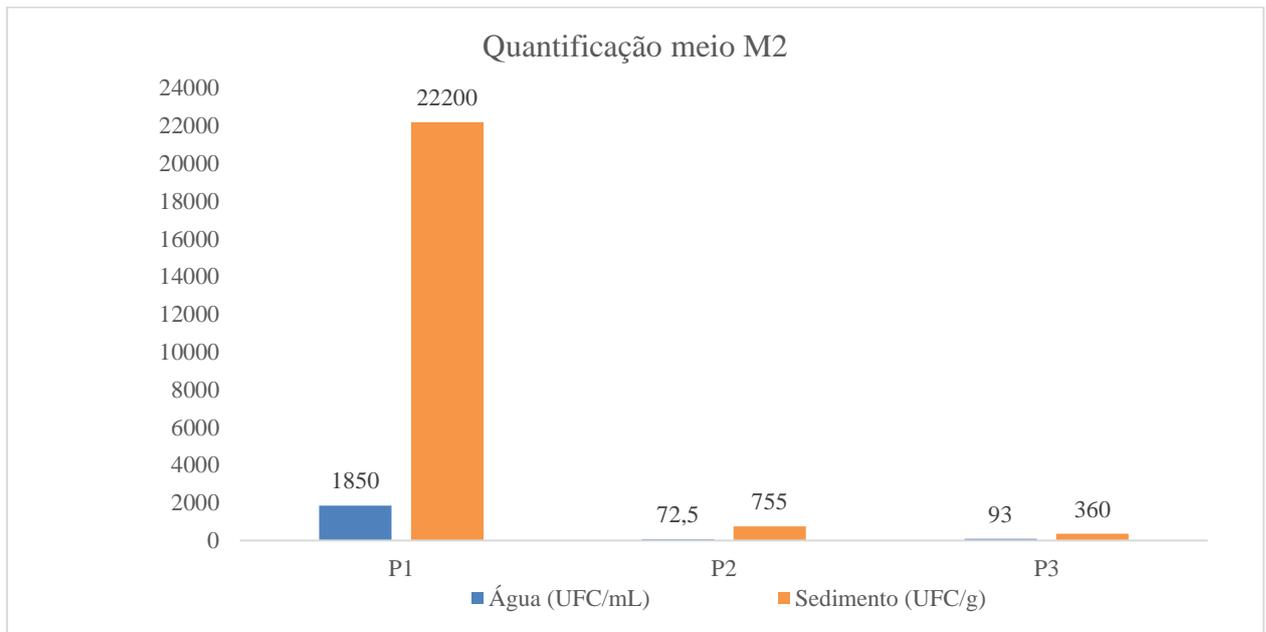
O crescimento das unidades formadoras de colônias bacterianas foi maior a partir das amostras inoculadas no meio M3, por ser um meio de cultura não seletivo e, portanto, podem crescer vários grupos de bactérias. No meio M2 o crescimento de UFC foi menor por ser um meio seletivo para o crescimento de bactérias anammox cujo crescimento é mais lento em comparação a outras bactérias.

Em relação ao crescimento bacteriano no meio M2, as matrizes água e sedimento apresentaram diferença observável na quantificação. A contagem de bactérias por grama de sedimento foi maior que aquela registrada a partir das amostras de água. Isso pode ser explicado pelas condições que os solos possuem como, por exemplo, altas concentrações de amônio e baixas concentrações de oxigênio, que são cruciais para a

ocorrência das bactérias anammox (JETTEN *et al.*, 2009). Zhao *et al.* (2017) coletaram 10 amostras de sedimentos de dois lagos poluídos na China (Lago Donghu e Lago Nanhu) e encontraram bactérias anammox em todos os pontos de amostragem, afirmando que as anammox existem amplamente em sedimentos altamente poluídos.

A distribuição das bactérias aerotolerantes nos pontos de coletas do açude Santo Anastácio foi bem variável (GRÁFICOS 1 e 2). No meio M2, as amostras de sedimento apresentaram as maiores contagens de unidades formadoras de colônias bacterianas nos três pontos. E o ponto 1 foi o que apresentou maior quantidade de bactérias, tanto no sedimento quanto na água (GRÁFICO 1).

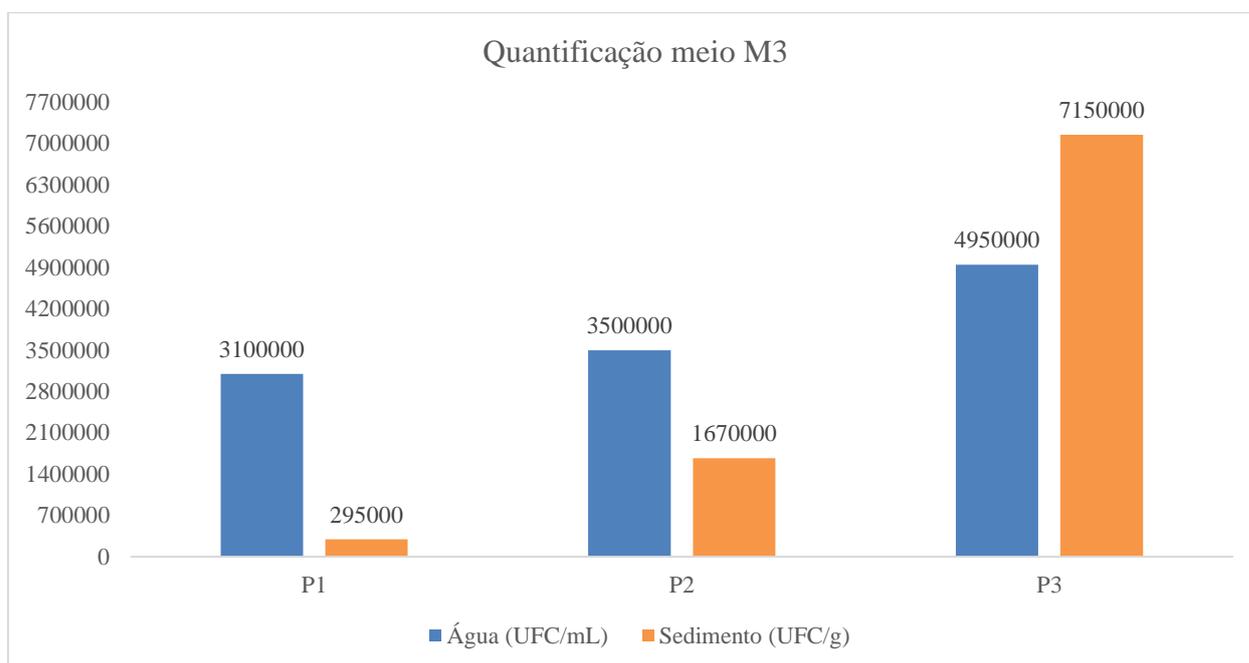
Gráfico 1 – Quantidade de bactérias aerotolerantes crescidas no meio M2, por pontos de coletas.



Fonte: Autora.

No meio M3, o ponto 3 foi o que apresentou maior crescimento de bactérias (UFC), tanto na água como no sedimento. No ponto 1 e 2, as amostras de água apresentaram maior quantidade de colônias em relação às amostras de sedimento (GRÁFICO 2).

Gráfico 2 – Quantidade de bactérias aerotolerantes crescidas no meio M3, por pontos de coletas.



Fonte: Autora.

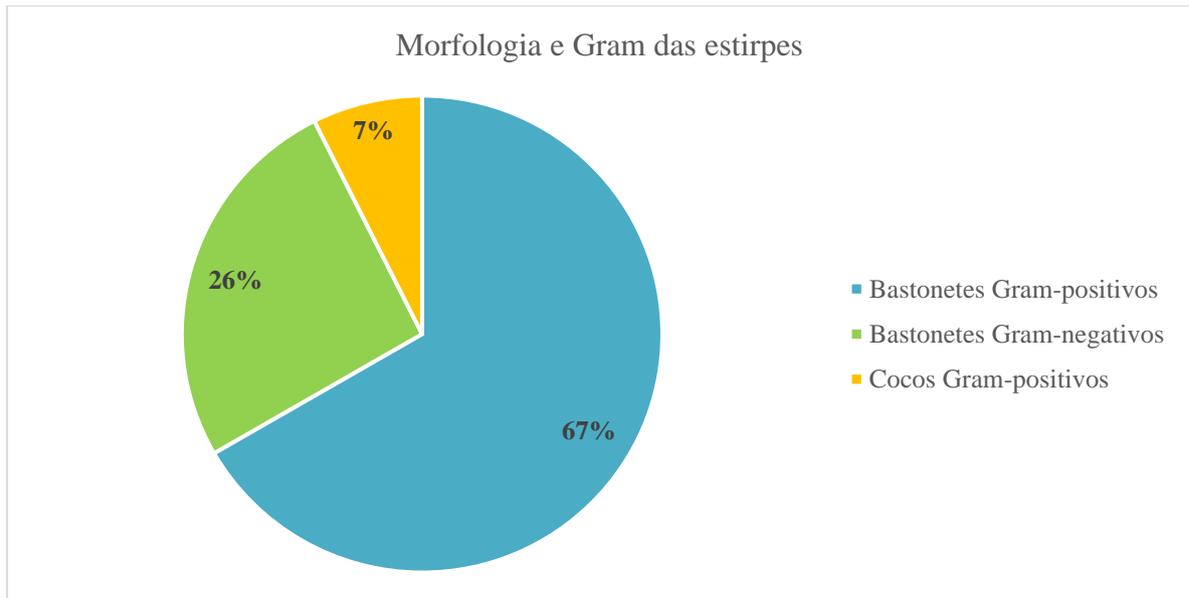
Estudos afirmam que fatores como temperatura, carbono orgânico total, potencial redox e disponibilidade de substrato de amônio e nitrito, influenciam na distribuição e abundância das bactérias anammox em ambientes de água doce e na aquicultura (DANG *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2012; HOU *et al.*, 2013; SHEN *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2016; NAIR *et al.*, 2020). No presente trabalho não foram feitas medições desses elementos, mas pressupõe-se que eles tenham influenciado na variação das unidades formadoras de colônias entre os três pontos de coleta do açude Santo Anastácio.

5.2 Caracterização morfotintorial das bactérias

Foram isoladas 27 estirpes das amostras de sedimento e de água do açude Santo Anastácio. O critério utilizado foi selecionar as estirpes aerotolerantes e as que tivessem crescimento em até 5 dias. Além disso, muitas estirpes escolhidas inicialmente não tiveram crescimento quando foram isoladas em ambiente aerado e outras demoraram meses para crescerem. Portanto, não houve representantes de todos os pontos da coleta.

A maioria das estirpes isoladas apresentaram morfologia de bastonetes Gram-positivos (67%), seguido por bastonetes Gram-negativos (26%) e cocos Gram-positivos (7%) (GRÁFICO 3).

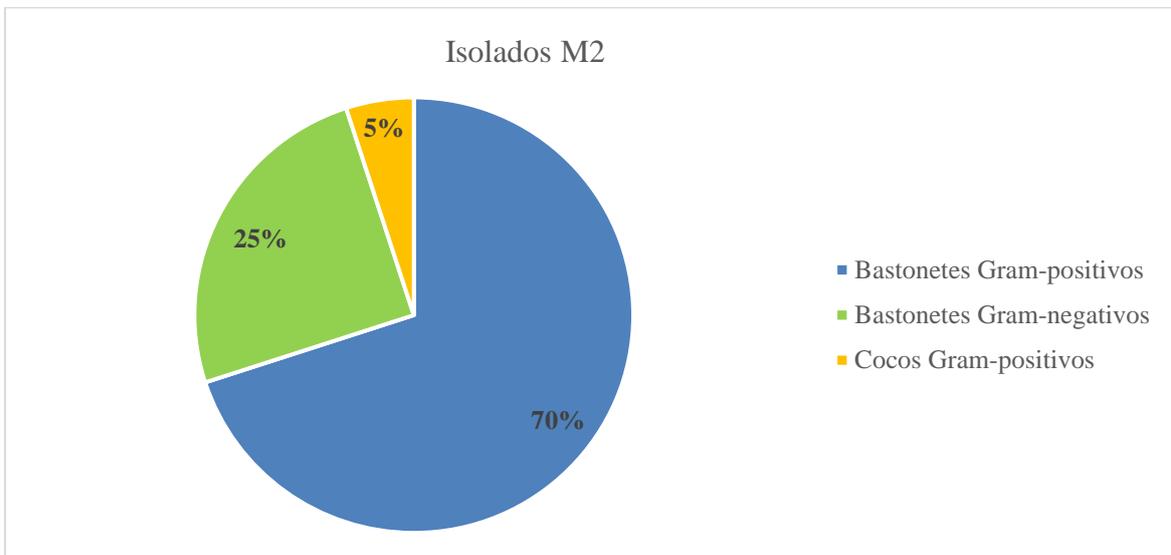
Gráfico 3 – Frequência dos isolados bacterianos de acordo com a morfologia e característica de parede celular.



Fonte: Autora.

Das 27 estirpes, 20 (74%) estirpes foram isoladas do meio de cultura seletivo para as bactérias anammox (M2) e 7 (26%) do meio de cultura não seletivo (M3). Em se tratando da coloração de Gram e da morfologia das estirpes isoladas no M2, 14 (70%) estirpes são bastonetes Gram positivos, 6 (25%) são bastonetes Gram negativos e 1 (5%) são cocos Gram positivos (GRÁFICO 4).

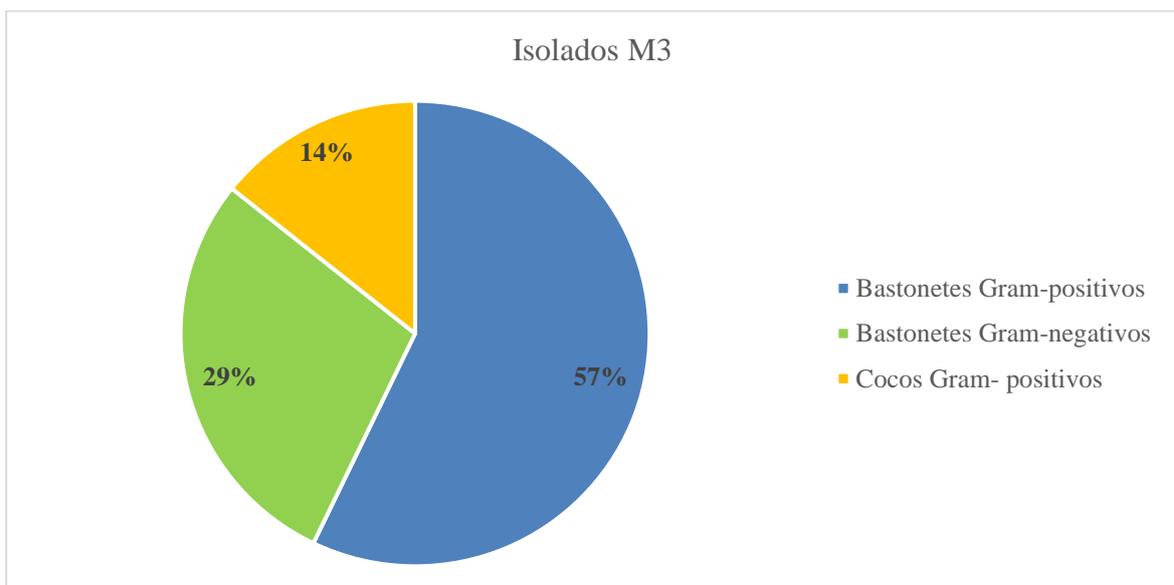
Gráfico 4 – Frequência dos isolados bacterianos de acordo com a morfologia e característica de parede celular isoladas do meio de cultura M2.



Fonte: Autora.

Em relação às estirpes isoladas do meio M3, 4 (57%) estirpes são bastonetes Gram positivos, 2 (29%) são bastonetes Gram negativos e 1 (14%) é cocos Gram positivo (GRÁFICO 5).

Gráfico 5 – Frequência dos isolados bacterianos de acordo com a morfologia e característica de parede celular isoladas do meio de cultura M3.



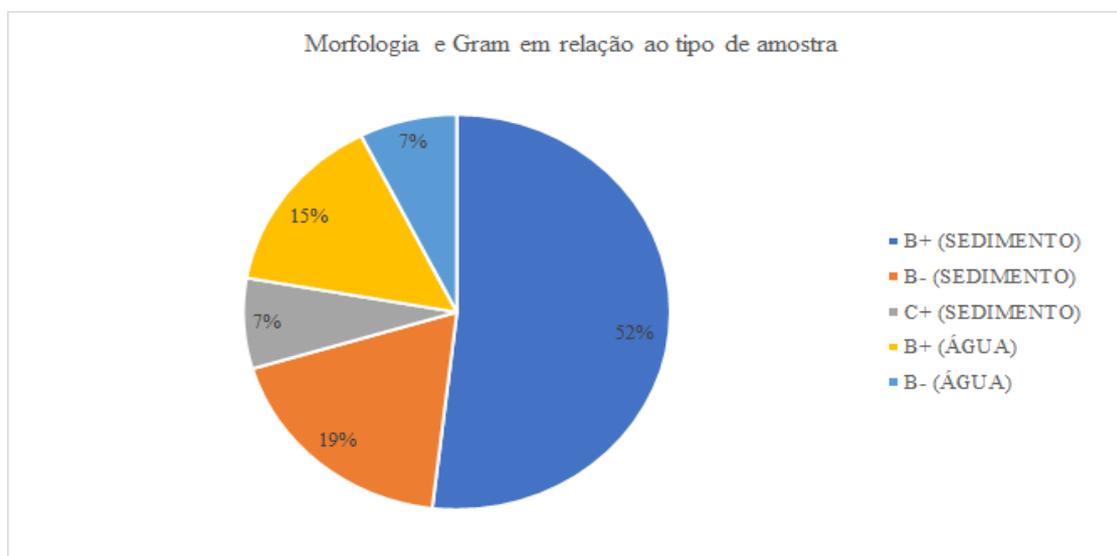
Fonte: Autora.

Segundo a literatura, as bactérias anammox possuem formas irregulares ou de cocos e são Gram-negativas (VAN NIFTRIK *et al.*, 2004; VAN TEESELING *et al.*, 2015). Santos *et al.* (2010) identificaram, em um reator anaeróbio com biofilme, células microbianas anammox no formato de cocos por meio de microscopia eletrônica de varredura. No presente trabalho, de todas as estirpes isoladas, nenhuma apresentou morfologia de cocos Gram-negativa, mostrando que essas estirpes com potencial atividade anammox apresentaram maior diversidade, em relação a morfologia e ao Gram, do que as estirpes anammox identificadas nas bibliografias.

Qin e Zhou (2009) comprovaram que as bactérias anammox podem ser encontradas em diferentes gêneros bacterianos, ao detectar atividade anammox em bactérias do gênero *Pseudomonas* sp, isoladas de um biorreator de manta de lodo anaeróbico ascendente (UASB). Até então, pesquisadores tinham classificado as bactérias anammox em apenas cinco gêneros: *Candidatus Kuenenia*, *Candidatus Brocadia*, *Candidatus Anammoxoglobus*, *Candidatus Jetteniae* *Candidatus Scalindua* (KARTAL; KELTJENS; JETTEN, 2008).

A representação da distribuição dos isolados de acordo com a morfologia e Gram em relação ao tipo de amostra (sedimento e água) está disposto no gráfico 6. Setenta e oito por cento (78%) das estirpes foram isoladas do sedimento, e vinte dois por cento (22%) da água.

Gráfico 6 – Distribuição dos isolados de acordo com a morfologia e Gram em relação ao tipo de amostra (sedimento e água).



Fonte: Autora.

B+: Bastonetes Gram-positivos; B-: Bastonetes Gram-negativos; C+: Cocos Gram-positivos.

As estirpes Gram-negativas, característica das bactérias anammox (VAN TEESELING *et al.*, 2015), foram mais frequentes nas amostras de sedimento do que da água. Shen *et al.* (2016) detectaram a presença e a atividade de bactérias anammox em sedimentos de tanques de aquicultura de água doce e este processo contribuiu com uma perda total de 2,1–10,9 gN/m² de N₂ por ano. Esse estudo mostrou que é possível isolar bactérias anammox de sedimentos e empregá-las na aquicultura para a remoção de amônia e nitrito.

Apesar da representatividade dos isolados das amostras de água ser menor nessa pesquisa, Zhang *et al* (2017) e Xia *et al.* (2019) indicam que bactérias anammox podem ocorrer em sólidos suspensos de águas doces oxícas, por meio de microambientes de baixo oxigênio em volta/no sólido suspenso. Além disso, Xia *et al.* (2019) apontou que a taxa de anammox aumentou com a concentração de sólidos suspensos na água e com a diminuição da partícula, sendo significativamente correlacionada positivamente com a abundância bacteriana de anammox ($p < 0,01$).

6 CONCLUSÃO

Foi verificada a eficiência na otimização do protocolo para o isolamento e identificação morfofotintorial de bactérias anammox no ambiente (água e sedimento) degradado, poluído e eutrofizado de um EAC, o Açude Santo Anastácio.

As bactérias isoladas no meio M2 e M3 possuem potencial da atividade anammox, pois inicialmente foram isoladas no meio de cultura específico para o crescimento e enriquecimento das bactérias desse grupo (M1), em jarra de anaerobiose. Além disso, a maioria das estirpes foram isoladas das amostras de sedimento, mostrando que essa matriz em lagos/açudes eutrofizados apresenta grande potencial para o isolamento de bactérias anammox.

Estes são os primeiros resultados de detecção de bactérias com potencial atividade anammox em corpos hídricos do Brasil e fornecem uma base para o isolamento de bactérias anammox no ambiente natural.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, N. M. *et al.* Immunogold localization of key metabolic enzymes in the anammoxosome and on the tubule-like structures of *Kueneniastuttgartiensis*. **Journal of Bacteriology**, v. 197, 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.
- BERNHARD, A. The Nitrogen Cycle: Processes, Players, and Human Impact. **Nature Education Knowledge**, v. 3, 2010.
- BURGIN, A. J.; HAMILTON, S. K. Have we overemphasized the role of denitrification in aquatic ecosystems? A review of nitrate removal pathways. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 5, n. 2, p. 89-96, 2007.
- ÇELEN-ERDEM, İ. Evaluation of Sludge Digester Effluent as Feeding Solution for the Enrichment of Anammox Bacteria. **CLEAN–Soil, Air, Water**, v. 48, n. 3, 2020.
- CRAB, R. *et al.* Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. **Aquaculture**, v. 270, p. 1-14, 2007.
- DANG, H. *et al.* Environmental factors shape sediment anammox bacterial communities in hypernutrified Jiaozhou Bay, China. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 21, p. 7036-7047, 2010.
- DAVEREY, A. *et al.* Partial nitrification and anammox process: A method for high strength optoelectronic industrial wastewater treatment. **Water Research**, v. 47, p. 2929-2937, 2013.
- DOWNES M. P.; ITO, K. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. **APHA**. 4th. edition. Washington, DC, 2001.
- DU, R. *et al.* Advanced nitrogen removal from wastewater by combining anammox with partial denitrification. **Bioresource Technology**, v. 179, p. 497-504, 2015.
- ELER, M. N; MILANI, T. J. Métodos de estudos de sustentabilidade aplicados a aquicultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p. 33-44, 2007.
- 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.
- GAO, D.W; TAO, Y. Versatility and application of anaerobic ammoniumoxidizing bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**., v 91, p. 887–894, 2011
- GICHANA, Z. M. *et al.* Waste management in recirculating aquaculture system through bacteria dissimilation and plant assimilation. **Aquaculture International**, v. 26, n. 6, p. 1541-1572, 2018.

HAUCK, M. *et al.* Removing nitrogen from wastewater with side stream anammox: What are the trade-offs between environmental impacts?. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 107, p. 212-219, 2016.

HENRY-SILVA, G. G.; CAMARGO, A. F. M. Impacto das atividades de aquicultura e sistemas de tratamento de efluentes com macrófitas aquáticas–relato de caso. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 34, n. 1, p. 163-173, 2018.

HERBECK, L. S. *et al.* Effluent, nutrient and organic matter export from shrimp and fish ponds causing eutrophication in coastal and back-reef waters of NE Hainan, tropical China. **Continental Shelf Research**, v. 57, p. 92-104, 2013.

Ho, Y. Nitrogen Cycle: Impact on Global Environment. **International Journal for Empirical Education and Research**, v. 2, n. 13, p. 42-52, 2018.

HOPKINS, J. S. *et al.* Environmental impacts of shrimp farming with special reference to the situation in the continental US. **Estuaries**, v. 18, p. 25-42, 1995.

HOU, L. *et al.* Anaerobic ammonium oxidation (anammox) bacterial diversity, abundance, and activity in marsh sediments of the Yangtze Estuary. **Journal of Geophysical Research: Biogeosciences**, v. 118, n. 3, p. 1237-1246, 2013.

HU, B. L. *et al.* Anaerobic ammonium oxidation (anammox) in different natural ecosystems. **Biochemical Society Transactions**, v. 39, p. 1811-1816, 2011.

HUMBERT, S. *et al.* Molecular detection of anammox bacteria in terrestrial ecosystems: distribution and diversity. **ISME Journal**, v. 4, p. 450–454, 2010.

JARDIN, N.; HENNERKES, J. Full-scale experience with the deammonification process to treat high strength sludge water—a case study. **Water Science and Technology**, v. 65, n. 3, p. 447-455, 2012.

JETTEN, M. S. M. *et al.* Biochemistry and molecular biology of anammox bacteria. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 44, p. 65–84, 2009.

JIA, L. *et al.* Effect of organic carbon on nitrogen conversion and microbial communities in the completely autotrophic nitrogen removal process. **Environmental Technology**, v. 33, n. 10, p. 1141-1149, 2012.

JIMÉNEZ-OJEDA, Y. K.; COLLAZOS-LASSO, L. F.; ARIAS-CASTELLANOS, J. A. Dynamics and use of nitrogen in Biofloc Technology-BFT. **AAFL Bioflux**, v. 11, n. 4, p. 1107-1129, 2018.

KALLISTOVA, A. Y. *et al.* Role of Anammox Bacteria in Removal of Nitrogen Compounds from Wastewater. **Microbiology**, v. 85, n. 2, p. 140–156, 2016.

KARTAL, B.; KELTJENS, J. T.; JETTEN, M. S. M. The metabolism of anammox. **Encyclopedia of Life Sciences**, 2008.

- KARTAL, B.; KUENEN, J. G.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Sewage Treatment with Anammox. **Science**, v, 328, n. 5979, p. 702-703, 2010
- KUMAR, M.; LIN, J. Co-existence of anammox and denitrification for simultaneous nitrogen and carbon removal—strategies and issues. **Journal of Hazardous Materials**, 178, p. 1–9, 2010.
- LIN, L. *et al.* Individual and combined effect of salinity and nitrite on freshwater Anammox bacteria (FAB). **Water Research**, v. 169, p. 114931, 2020.
- 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.
- MADIGAN, M. T. *et al.* **Microbiologia de Brock**. 14.ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2016.
- MARTINEZ-ROMERO, E. Dinitrogen-fixing prokaryotes. In: DWORKIN, M. *et al.* (Ed.). **The Prokaryotes**. Berlin: Springer, v. 2, p. 798-817, 2006.
- MERCIAC, A. *et al.* Dietary carbohydrate composition can change waste production and biofilter load in recirculating aquaculture systems. **Aquaculture**, v. 420, p. 254–261, 2014.
- NAIR, R. R. *et al.* Anaerobic ammonia-oxidizing bacteria in tropical bioaugmented zero water exchange aquaculture ponds. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-12, 2020.
- NEUMANN, S. *et al.* Isolation and characterization of a prokaryotic cell organelle from the anammox bacterium *Kuenenia stuttgartiensis*. **Molecular Microbiology**, v. 94, n. 4, p. 794-802, 2014.
- OLIVEIRA, J. D.; SOUZA, R.; SOBRAL, I. S. A Carcinicultura marinha e seus impactos no manguezal do vaza-barris em São Cristóvão – SE. **REDE - Revista Eletrônica do PRODEMA**, v. 11, n. 1, 2017.
- PAEZ-OSUNA, F.; GUERRERO-GALVAN S. R.; RUIZ-FERNANDEZ A. C. The environmental impact of shrimp aquaculture and the coastal pollution in Mexico. **Marine Pollution Bulletin**, v. 36, p. 65–75, 1998.
- PEREIRA, A. D. *et al.* Microbial communities in anammox reactors: a review. **Environmental Technology Reviews**, v. 6, n. 1, p. 74-93, 2017.
- PERSSON, F. *et al.* Structure and composition of biofilm communities in a moving bed biofilm reactor for nitrification–anammox at low temperatures. **Bioresource Technology**, v. 154, p. 267-273, 2014.
- 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.

- 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.
- 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.
- SANTOS, C. E. D. *et al.* Remoção anaeróbia de nitrogênio amoniacal por meio de reator com cultura fixa em meio suporte operando em bateladas sequenciais. **Engenharia Ambiental - Espírito Santo do Pinhal**, v. 7, n. 2, p. 190-203, 2010.
- SINGH, A. *et al.* UV and hydrogen peroxide treatment restores changes in innate immunity caused by exposure of fish to reuse water. **Water Research**, v. 71, p. 257-273, 2015.
- SHEN, L. *et al.* Broad distribution of diverse anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in Chinese agricultural soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 19, p. 6167-6172, 2013.
- SHEN, L. *et al.* Evidence for anaerobic ammonium oxidation process in freshwater sediments of aquaculture ponds. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 2, p. 1344-1352, 2016.
- SIQUEIRA, T. V. Aquicultura: a nova fronteira para produção de alimentos de forma sustentável. **Revista BNDES**, v. 25, n. 49, p. 119-170, 2018.
- STEIN, L. Y.; KLOTZ, M. G. The nitrogen cycle. **Current Biology**, v. 26, n. 3, p. 94-98, 2016.
- STROUS, M. *et al.* The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, n. 5, p. 589-596, 1998.
- STROUS *et al.* Missing lithotroph identified as new planctomycete. **Nature**, v. 400, n. 6743, p. 446-449, 1999.
- TAL, Y.; WATTS, J. E. M.; SCHREIER, H. J. Anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria and associated activity in fixed-film biofilters of a marine recirculating aquaculture system. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 2896-2904, 2006.
- TANCREDO, K. R. *et al.* Impactos ambientais da carcinicultura brasileira. In: **3rd International Workshop Advances in Cleaner Production: Cleaner Production Initiatives and Challenges for a Sustainable World**. Universidade Paulista, São Paulo. p. 18-20, 2011.
- TATSI, A. A. *et al.* Coagulation-flocculation pretreatment of sanitary landfill leachates, **Chemosphere**, v. 53, p. 737-744, 2003.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

- TOVAR, A. *et al.* Environmental impacts of intensive aquaculture in marine Waters. **Water Resource**, v. 34, n. 1, p. 334-342, 2000.
- VAN HULLE, S. W. H. *et al.* Engineering aspects and practical application of autotrophic nitrogen removal from nitrogen rich streams. **Chemical Engineering Journal**, v. 162, n. 1, p. 1-20, 2010.
- VAN KESSEL, M. A. H. J. *et al.* Biodiversity of N-cycle bacteria in nitrogen removing moving bed biofilters for freshwater recirculating aquaculture systems. **Aquaculture**, v. 306, n. 1-4, p. 177-184, 2010.
- 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 LOOSDRECHT, M. C. M. Remoción Innovadora de Nitrógeno. *In*: VÁZQUEZ, C. M. L.; MÉNDEZ, G. B.; GARCÍA, H. A.; CARRILLO, F. J. C. **Tratamiento Biológico de Águas Residuales: Principios, Modelación y Diseño**. V. 16, p. 157 – 171, 2017.
- 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, p. 6878, 2015.
- VASCONCELOS, F. R.; VIEIRA, R. H. S. F.; FONTELES-FILHO, A. A. Balneabilidade das águas do açude santo anastácio (fortaleza-ceará). **Boletim Técnico Científico do CEPNOR**, v. 8, n. 1, p. 21-26, 2008.
- VIEIRA, R. F. Ciclo do Nitrogênio em Sistemas Agrícolas. 21. ed. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, 2017.
- VLAEMINCK, S. E. *et al.* Granular biomass capable of partial nitrification and anammox. **Water Science and Technology**, v. 59, n. 3, p. 609-617, 2009.
- WANG, S. *et al.* Anammox bacterial abundance, activity, and contribution in riparian sediments of the Pearl River Estuary. **Environmental Science & Technology**, v. 46, n. 16, p. 8834-8842, 2012.
- WANG, Shuailong. *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, Shanyun. *et al.* Anaerobic ammonium oxidation in traditional municipal wastewater treatment plants with low-strength ammonium loading: widespread but overlooked. **Water Research**, v. 84, p. 66-75, 2015.
- WANG, J. H. *et al.* Metagenomic analysis of antibiotic resistance in coastal industrial mariculture systems. **Bioresource Technology**, v. 253, p. 235–243, 2018.

- WANG, J. H. *et al.* Proliferation of antibiotic resistance genes in coastal recirculating mariculture system. **Environmental Pollution**, v. 248, p. 462-470, 2019.
- WU, Y. *et al.* Molecular detection of novel anammox bacterial clusters in the sediments of the shallow freshwater Lake Taihu. **Geomicrobiology Journal**, v. 29, n. 9, p. 852-859, 2012.
- 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.
- YANG, Y. *et al.* Temporal and spatial dynamics of sediment anaerobic ammonium oxidation (Anammox) bacteria in freshwater lakes. **Microbial Ecology**, v. 73, n. 2, p. 285-295, 2017.
- ZHANG, Y. *et al.* Diversity and abundance of aerobic and anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in freshwater sediments of the Xinyi River (China). **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 9, p. 2375-2382, 2007.
- ZHANG, Y. *et al.* Effects of environmental factors on anammox bacterial community structure in sediments of a freshwater aquaculture farm, Yangcheng Lake. **Geomicrobiology Journal**, v. 33, n. 6, p. 479-487, 2016.
- 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.
- ZHAO, J. *et al.* Distribution and diversity of anammox bacteria in two eutrophic lakes in Wuhan City, China. **Fundamental and Applied Limnology/ Archiv für Hydrobiologie**, v. 190, n. 3, p. 183-187, 2017.
- ZHENG, Z. *et al.* Nitrogen removal via simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification (SNAD) process under high DO condition. **Biodegradation**, v. 27, n. 4-6, p. 195-208, 2016.
- ZHU, G. *et al.* Hotspots of anaerobic ammonium oxidation at land freshwater interfaces. **Nature Geoscience**, v. 6, n. 2, p.103-107, 2013.