



**Uso da Técnica de FISH para
Identificação de Comunidades
Microbianas no Tratamento de Efluentes**

JASMIM MUNIZ RODRIGUES DIAS

Projeto Final em Engenharia Química

Orientadores

Professora Isabelli Dias Bassin, D.Sc.

Professor João Paulo Bassin, D.Sc.

Fevereiro de 2023

USO DA TÉCNICA DE FISH PARA IDENTIFICAÇÃO DE COMUNIDADES MICROBIANAS NO TRATAMENTO DE EFLUENTES

Jasmim Muniz Rodrigues Dias

Projeto Final em Engenharia de Química submetida ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de graduação

Aprovado por:

Ivaldo Itabaiana Jr, D. Sc.

Camila Pesci Pereira, D. Sc.

Orientado por:

Isabelli Dias Bassin, D. Sc.

João Paulo Bassin, D. Sc.

Rio de Janeiro, RJ - Brasil

Fevereiro de 2023

Dias, Jasmim Muniz Rodrigues.

Uso da técnica de FISH para identificação de comunidades microbianas no tratamento de efluentes/ Jasmim Muniz Rodrigues Dias. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2022.

xii, 66 p.; il.

(Projeto Final) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2023.

Orientadores: Isabelli Dias Bassin e João Paulo Bassin

1. FISH. 2. Efluentes. 3. Tratamento. 4. Projeto Final. (Graduação –UFRJ/EQ). 5. Isabelli Dias Bassin e João Paulo Bassin I. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, meus amigos, por todo apoio, paciência, compreensão na finalização de mais um sonho

What doesn't kill you makes you stronger

AGRADECIMENTOS

À minha mãe por ser meu porto seguro, minha força e minha estrela guia. Obrigada por nunca ter soltado a minha mão e poder comemorar essa vitória junto comigo.

Ao meu pai, hoje nossa estrela, que me deu fé que esse dia chegaria e me fez ser perseverante nas minhas escolhas.

À minha prima, Larissa, por não ter largado a minha mão e por comemorar cada vitória ao longo da minha vida.

Aos meus avós por toda paciência e suporte, não conseguiria sem o apoio de vocês.

À minha orientadora, Professora Isabelli, por anos já estar na minha vida e encarar esse desafio junto comigo.

Ao meu orientador, Professor João Paulo, pela oportunidade de trabalhar com a técnica de FISH e todo apoio para as análises durante meus longos anos de Iniciação Científica.

À todos os meus amigos pela força de sempre e pelos aprendizados que recebo de cada um nos momentos bons e difíceis.

Ao Labpol e Cenabio, toda família dos dois laboratórios, que permitiram inúmeras análises realizadas, com a utilização dos equipamentos e materiais na obtenção dos resultados e artigos promissores. O meu muito obrigada por tudo ! Em especial ao professor Fernando que me ensinou tudo para perfomar no microscópio, aprendendo cada vez mais com esse grande mestre.

Ao Renato e Reynel, guardiões dos reatores, obrigada por conseguirmos tantas conquistas com as pesquisas realizadas.

Resumo do Projeto Final apresentada à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Engenheira Química.

USO DA TÉCNICA DE FISH PARA IDENTIFICAÇÃO DE COMUNIDADES MICROBIANAS NO TRATAMENTO DE EFLUENTES

Jasmim Muniz Rodrigues Dias
Fevereiro de 2023

Orientadores: Prof. Isabelli Dias Bassin, Doutora e
Prof. João Paulo Bassin, Doutor

O aumento da poluição nos recursos hídricos intensificou o despejo de nutrientes, como fósforo e nitrogênio, que são precursores para eutrofização, causando problemas ambientais. Através do tratamento biológico de efluentes é possível removê-los por meio da comunidade bacteriana, utilizando os processos metabólicos e, posteriormente, destinando corretamente aos corpos hídricos. Os estudos das comunidades microbianas presentes nos sistemas de tratamento permitiram realizar melhorias para aumentar o desempenho do mesmo. O presente estudo realizou uma análise dos microrganismos presentes em dois tipos de reatores, Reator de Leito Móvel com Biofilme (MBBR) e o Lodo Granular Aeróbio (LGA), através da técnica de FISH e quantificação via Python Jupyter. Pode-se observar que o reator MBBR apresentou maior quantidade de bactérias oxidadoras de amônio (BOA) em detrimento as bactérias oxidadoras de nitrito (BON), por causa do tipo de suporte utilizado, carga aplicada e inibição através das conversões parciais. Por outro lado, no LGA houve maior concentração de BON em um dos regimes do reator e de microrganismos indesejados (GAO – bactérias acumuladoras de glicogênio). A combinação da ciência da computação e da biologia molecular proporcionaram a quantificação dos microrganismos e interpretações dos sistemas biológicos presentes.

Abstract of the Final Project presented to School of Chemistry as a partial fulfillment of the requirements for the conclusion of the course of Chemical Engineering.

USO DA TÉCNICA DE FISH PARA IDENTIFICAÇÃO DE COMUNIDADES MICROBIANAS NO TRATAMENTO DE EFLUENTES

Jasmim Muniz Rodrigues Dias
February, 2023

Advisor: Prof. Isabelli Dias Bassin, Phd and
Prof. João Paulo Bassin, Phd

The increase in pollution in water resources has intensified the discharge of nutrients, such as phosphorus and nitrogen, which are precursors for eutrophication, causing environmental problems. Through the biological treatment of effluents, it is possible to remove them through the bacterial community, using metabolic processes and, subsequently, correctly throwing them into water. Carrying out studies of the presence of microbial communities in treatment systems make it possible to make improvements to increase their performance. The present study carried out an analysis of the microorganisms present in types of reactors, Biofilm Moving Bed Reactor (MBBR) and Aerobic Granular Sludge (LGA), using the FISH technique and quantification by Python Jupyter. It can be seen that the MBBR reactor had a higher amount of Ammonia-oxidizing bacteria (AOB) than nitrite-oxidizing bacteria (NOB), due to the type of support used, applied load, and inhibition through partial conversions. On the other hand, in the LGA there was a higher concentration of BON in one of the reactor regimes and of undesirable microorganisms (GAO - glycogen-accumulating organisms). The combination of computer science and molecular biology provided the quantification of microorganisms and interpretations of current biological systems.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	4
2.1 Objetivos gerais.....	4
2.2 Objetivos específicos.....	4
3. Revisão Bibliográfica	5
3.1 Remoção Biológica de Nitrogênio.....	7
3.1.1 Nitrificação	9
3.3.1.1. Organismos envolvidos na Nitrificação	10
Bactérias Oxidadoras de Amônio (BOA)	10
Bactérias Oxidadoras de Nitrito (BON).....	11
3.1.2 Desnitrificação	11
3.2 Remoção de Fósforo	15
3.3.2.1 Organismos envolvidos na Remoção Biológica de Fósforo	19
Bactérias Acumuladoras de Fósforo (PAO).....	19
Bactérias Acumuladoras de Glicogênio (GAO)	20
3.3 Técnica de FISH e suas aplicações.....	21
3.3.1 Identificação de microrganismos em Reatores Biológicos para o tratamento de efluente.....	25
Reator de Leito Móvel com Biofilme (Moving Bed Biofilm Reactor - MBBR)	25
Lodo Granular Aeróbio (LGA).....	28
4. Metodologia.....	35
4.1 Técnica de FISH.....	35
4.2 Reatores utilizados	39
4.2.1 Reator de leito móvel com biofilme (MBBR)	39
4.2.2 Lodo Granular Aeróbio (LGA).....	40
5. Resultados.....	42
5.1 Reator de leito móvel com biofilme (MBBR)	42
5.2 Lodo Granular Aeróbio (LGA)	47
6. Conclusão.....	51
7. Referências	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo do Nitrogênio (Adaptado de YE e THOMAS, 2001)	8
Figura 2: Processos de nitrificação e desnitrificação. (Fonte: CAO, 2018 apud METCALF & EDDY, 2016)	8
Figura 3: Metabolismo dos organismos acumuladores de fósforo (Adaptado de CASTELLANOS, 2020)	17
Figura 4: Diferença entre A) Lodo Floculento e B) Lodo Granular aeróbio (GUIMARÃES apud WINKLER et al. 2013)	18
Figura 5: Esquemática da divisão na técnica de FISH (SANZ e KOCHLING, 2007)	22
Figura 6: Representação esquemática da ligação de oligonucleotídeos. Adaptado de (PERNTHALER, GIOCKNER, et al., 2001)	23
Figura 7: Funcionamento do Reator Aeróbico (a) e do Reator Anóxico (b). Adaptado de Madan, Madan e Hussain, 2022	26
Figura 8: Diferentes tipos de Biomídias para MBBR, AnoxKaldnes K1 (a) e Mutag biochip (b) (BASSIN, DIAS, et al., 2016).....	26
Figura 9: Remoção de Nitrogênio no Lodo Granular. Adaptado de Nancharaiah, Y. V. e Reddy, G. K. (2018).....	30
Figura 10: Esquema das principais conversões ocorrendo em paralelo na estrutura dos grânulos aeróbios (BASSIN, 2012).....	32
Figura 11: Etapas realizadas para hibridização in situ por fluorescência.....	35
Figura 12: (1) Armazenamento da amostra; (2) Preparo da Lâmina; (3) Verificação no microscópio do biofilme presente.....	36
Figura 13: Reator (a) R1 Suporte não poroso AnoxKaldnes K1; (b) R2 Suporte Poroso Mutag Biochip. Fonte: Autoria própria	39
Figura 14: Reator utilizado para o Lodo granular aeróbio (Fonte: Adaptado de Castellanos, et al., 2021)	41
Figura 15: Imagem obtida para sonda BOA do reator R1 MBBR.....	43
Figura 16: Imagem obtida para sonda BON do reator R1 MBBR.....	43
Figura 17: Imagem obtida para sonda BOA (a) e BON (b) do reator R2 MBBR	44
Figura 18: Percentual de BON em detrimento a BOA nos reatores nitrificantes em cada regime do estudo.....	45
Figura 19: Resultado obtido no Python Jupyter para o Lodo Granular Aeróbico	47
Figura 20: Percentual de PAO, GAO, BOA e BON no LGA nos regimes analisados	48
Figura 21: Imagens microscópicas FISH de amostras do LGA mostrando as comunidades bacterianas com os marcadores fluorescente: EUBmix (verde) em (a) e (b); EUBmix (vermelho) em (c) e (d); vermelho: a) PAOs (regime 1) e b) PAOs (regime 2); verde: c) GAOs (regime 1).....	49
Figura 22: Imagens microscópicas FISH de amostras do LGA mostrando as comunidades bacterianas com os marcadores fluorescente: EUBmix (verde) em (a) e (b); EUBmix (vermelho) em (c) e (d); vermelho: a) BOAs (regime 1) e b) BOAs (regime 2); verde: c) BONs (regime 1).....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Definição dos tipos de processos biológicos em função da via metabólica (CAO, 2014).....	5
Tabela 2: Exemplos de sistemas de biomassa em suspensão ou aderida. (Fonte: (BASSIN e DEZOTTI, 2008)	6
Tabela 3: Misturas utilizadas com as principais sondas e grupos alvo	24
Tabela 4: Sondas oligonucleotídicas utilizadas e grupo microbiano alvo	37
Tabela 5: Resultados médios do monitoramento físico-químico para os reatores R1 e R2 (VALÉRIO, DIAS, et al., 2020).....	40
Tabela 6: Condições experimentais do reator batelada sequenciador de lodo granular aeróbico (LGA)	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGV - Ácido graxo volátil

BOA - Bactérias oxidadoras de amônio

BON - Bactérias oxidadoras de nitrito

ETE – Estação de tratamento de efluentes

FISH – Hibridização de fluorescência *in situ*

GAO – Bactérias acumuladores de glicogênio, do inglês *glycogen-accumulating organisms*

MBBR - *Moving Bed Biofilm Reactor* – traduzido Reator de Leito Móvel com Biofilme

MBR - Biorreatores com membranas

LGA – Lodo Granular Aeróbio

PAO – Bactérias acumuladores de fósforo, do inglês *polyphosphate-accumulating organisms*

PAC - Plano de Aceleração do Crescimento

PlanSab - Plano Nacional de Água e Saneamento

RBS - Reatores de batelada sequencial

1. Introdução

O aumento da poluição dos recursos hídricos, através do despejo inadequado de efluentes, resulta em níveis maiores de nutrientes como carbono (C), fósforo (P) e nitrogênio (N) nos corpos hídricos. O consumo de oxigênio, a eutrofização e a toxicidade do meio são alguns dos efeitos gerados, além dos impactos imensuráveis das formas de vidas presentes (VIEIRA e HENKES, 2013).

Os sistemas de tratamento de águas residuárias são comumente utilizados de forma a diminuir o excesso de poluentes orgânicos e nutrientes despejados, e junto disso, micropoluentes que podem causar efeitos maléficos à saúde humana (MICHAEL *et.al*, 2013). Por isso, o investimento e os benefícios ajudam na melhoria das condições de toda esfera populacional.

O conceito de tratamento de águas e efluentes está em constante mudança, visto o crescimento das economias circulares. Além disso, a maioria das atividades, humanas e industriais, produzem resíduos que são despejados de forma incorreta nos recursos hídricos (WWAP, 2017). Assim, estudos para estabelecer o destino final dos efluentes, tem como objetivo diminuir a poluição hídrica e gerar melhor qualidade de vida para a população, além de estar presente dentro dos Objetivos Sustentáveis. Conseqüentemente, a eficácia do gerenciamento acarretará em uma redução de doenças transmitidas por vetores, trazendo benefícios econômicos diretos e indiretos (WHO, 2018).

De acordo com o relatório do *The World Bank* (2018), o Brasil, por ser um país extenso, apresenta elevada discrepância no acesso ao saneamento básico e água tratada, seja na área rural ou na área urbana. Alguns planos como o Plano Nacional de Água e Saneamento (PlanSab), tem como objetivo alcançar 99% no quesito de abastecimento de água e até 92% para serviços de saneamento. Entretanto, por causa das crises políticas e econômicas, esse tipo de investimento sofreu grande queda, mesmo com o PAC (Plano de Aceleração do Crescimento) afetando diretamente a qualidade de vida da população.

Para contornar esse cenário, a reutilização de águas residuárias e seu tratamento relacionam tanto benefícios ambientais como sociais e de saúde (FAO, 2010). Em comparação com outros métodos, destacam-se as vantagens de custos mais baixos e poluição secundária reduzida, além da possibilidade de utilização de diferentes meios de oxigenação (SPONZA e ULUKÖY, 2005).

O tratamento de efluentes, dependendo do grau de remoção de poluentes a ser atingido, pode ser dividido em tratamento preliminar, primário, secundário e terciário. O tratamento preliminar tem como objetivo a remoção dos sólidos grosseiros em suspensão onde utiliza mecanismos físicos, como gradeamento e sedimentação, para proteger as etapas subsequentes. O tratamento primário além de remover os sólidos sedimentáveis, também remove parte da matéria orgânica através dos tratamentos físicos. Já o secundário caracterizado pelos tratamentos biológicos, é constituído por reatores biológicos capazes de remover grande parte da matéria orgânica e nutrientes presentes como o P e N. Esses reatores reproduzem os fenômenos naturais que ocorreriam no corpo hídrico receptor. O tratamento terciário, nem sempre empregado, é capaz de remover os nutrientes e matéria orgânica que não foram tratados, além de poluentes presentes e desinfecção do esgoto (METCALF & EDDY, 2003).

O tratamento biológico de efluentes pode ser classificado em aeróbios, e anaeróbio. Nos sistemas aeróbios, os microrganismos fazem uso do oxigênio dissolvido para converter a biomassa complexa orgânica em compostos mais simples, CO₂ e H₂O. Os processos de tratamento aeróbio são normalmente empregados para efluentes que apresentam elevada carga orgânica, obtendo alta eficiência. Enquanto isso, vem crescendo o estudo biotecnológico no tratamento anaeróbio para que haja maior recuperação e utilização dos recursos enquanto se controla a poluição (YEOH, 1995; SEGHEZZO *et al.*, 1998).

Para a remoção biológica de nitrogênio presente em efluentes, é indispensável que ocorra os processos nitrificação e desnitrificação, sendo realizadas por uma microbiota funcional relacionada ao ambiente bioquímico, aeróbio e anóxico. Caso haja alta concentração de amônia livre, por exemplo, poderá impactar os microrganismos presentes e, conseqüentemente, a eficiência do sistema de remoção (CHERN *et al.*, 2001).

Já na remoção biológica de fósforo, o processo principal baseia-se no enriquecimento dos organismos acumuladores de fosfato, de modo que consigam acumular quantidades suficientes de polifosfato no interior de suas células e, assim, aumentar a remoção de P. Entretanto, o desempenho inadequado observado em sistemas piloto e em escala real apresenta-se como oportunidades de otimização na operação. Dessa forma, estratégias em busca de minimização de microrganismos indesejáveis e a busca por recuperações mais sustentáveis e econômicas são indispensáveis para aumentar a potencial da remoção de fósforo (IZADI *et al.*, 2020).

O uso de técnicas de biologia molecular associada ao tratamento biológico de efluentes possibilita a identificação de populações específicas da comunidade microbiana no seu habitat natural, sem a necessidade do cultivo celular. Por isso, sua aplicação estende-se desde flocos, presentes em lodos ativados, até biofilmes, em sistemas MBBR, de forma a aumentar a eficácia do sistema e evitar possíveis flutuações (SANZ e KÖCHLING, 2007).

A técnica de biologia molecular por hibridização de fluorescência *in situ* – FISH, é caracterizada por avaliar, identificar e localizar a comunidade bacteriana, sem a necessidade de cultivo celular. A utilização de sondas baseadas em uma sequência específica de DNA permite que ocorra a hibridização e o reconhecimento de sequências características de rRNA (BASSIN, 2012).

No contexto de tratamento de águas residuárias, este trabalho visa avaliar a comunidade microbiana presente em diferentes tipos de reatores através da técnica de FISH, permitindo avaliar o desempenho do reator. Dessa forma, essa combinação irá melhorar o entendimento dos microrganismos, além de observar as competições existentes e o papel dos mesmos.

2. Objetivos

2.1 Objetivos gerais

Analisar a comunidade microbiana presente em reatores biológicos operados para remoção de carga orgânica e nutrientes usando técnica de biologia molecular (FISH).

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a biomassa presente em reatores com biofilme e lodo granular ;
- Quantificar a população microbiana presente em um mesmo reator operado em diferentes condições;
- Obter imagens das comunidades bacterianas presentes no tratamento de efluente investigado;
- Fazer uma análise comparativa entre os resultados obtidos nas análises de biologia molecular em detrimento performance do sistema.

3. Revisão Bibliográfica

O mecanismo de tratamento de águas residuárias, quando realizado pela via biológica, é caracterizado pelos processos que são capazes de reproduzir as condições naturais que ocorrem nos corpos d'água depois que os despejos são lançados. No meio que é lançado, a matéria orgânica presente sofre o processo de degradação biológica, resultando em produtos mineralizados inertes por meio de mecanismos naturais. Essa realidade também está presente nas estações de tratamento, porém, têm-se a tecnologia que é introduzida e auxilia atingir melhores resultados. Dessa forma, os processos de degradação biológica são realizados em condições controladas e em taxas mais elevadas, para aumento de sua produtividade (VON SPERLING, 1996).

Os processos biológicos empregados atualmente no tratamento de águas residuárias podem ocorrer de forma aeróbia, anaeróbia, facultativa ou combinações que podem ser realizadas. A Tabela 1 descreve a definição de cada processo. Tais processos podem ser operados em reatores com diferentes tipos de crescimento biológico, podendo ser suspenso ou aderido, com fluxo contínuo ou intermitente, e a hidráulica, pode ser mistura completa, fluxo disperso ou fluxo de pistão.

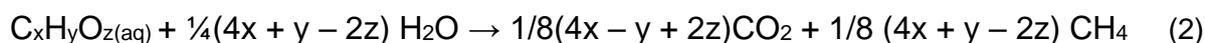
Tabela 1: Definição dos tipos de processos biológicos em função da via metabólica (CAO, 2014)

Função Metabólica	Definição
Aeróbio	Processo que utiliza o oxigênio molecular como principal acceptor de elétrons na oxidação de compostos orgânicos em compostos mais estáveis.
Anaeróbio	Processo que, na ausência de oxigênio molecular, promove a transformação de compostos complexos em produtos simples como metano e gás carbônico.
Anóxico	Processo, que na ausência de oxigênio molecular, utiliza o nitrato como principal acceptor de elétrons na remoção biológica de nitrogênio.
Facultativo	Processo biológico em que os microrganismos podem funcionar na presença ou ausência de oxigênio molecular.
Combinado	Processo biológico de tratamento formado pela combinação dos processos aeróbios, anaeróbios ou anóxicos agrupados em conjunto para atingir um objetivo de tratamento específico.

Para a remoção da matéria orgânica presente nos tratamentos, os microrganismos convertem os compostos orgânicos em CO₂ e H₂O. A reação global simplificada pode ser descrita pela Equação 1 onde demonstra a estequiometria para os compostos orgânicos ao passarem pela metabolização aeróbia (CAO, 2014).



Já para o metabolismo anaeróbio, essa degradação pode ser realizada por diferentes grupos de bactérias e arqueas em diferentes etapas. A Equação 2, então, expressa a estequiometria simplificada para o composto orgânico a ser degradado por via anaeróbia.



Dessa forma os tratamentos biológicos serão capazes de simular essas condições naturais, tendo todo controle para aumentar sua performance e conseguir melhores resultados. Assim, para atingir os resultados pode-se utilizar a biomassa em suspensão, que é amplamente realizada para biorreatores de lodos ativados, lagoa aerada agitada, biorreatores com membranas (MBR) e reatores de batelada sequencial (RBS). Outra forma para biomassa fixa são os biodiscos, leitos fixos submersos e de leito expandido exemplificados na Tabela 2.

Tabela 2: Exemplos de sistemas de biomassa em suspensão ou aderida. (Fonte: (BASSIN e DEZOTTI, 2008)

Biomassa em Suspensão	Biomassa Aderida
Lodo Ativado	Leito Fluidizado
Lagoa Aerada Agitada	Biodiscos
Biorreatores a Membranas (MBR)	Leito Expandido (MBBR)
Reatores de Batelada Sequencial (RBS)	Leitos Fixos Submersos

3.1 Remoção Biológica de Nitrogênio

O nitrogênio pode apresentar-se de diversas formas nos corpos receptores, seja como nitrogênio orgânico, amoniacal, nitrito e nitrato. O lançamento desse nutriente, em geral, origina-se de diversas fontes difusas e fontes pontuais residenciais e industriais. Essas fontes são compostas principalmente de nitrogênio orgânico (particulado e solúvel) e nitrogênio amoniacal.

O tratamento de efluentes contendo compostos nitrogenados vem sendo amplamente utilizado pelo grande aumento de nutrientes nos corpos hídricos, bem como o aumento da urbanização e industrialização, de forma a minimizar a eutrofização.

Entre as alternativas mais utilizadas para a remoção de nitrogênio de efluentes, destaca-se o tratamento biológico, que inclui a nitrificação e desnitrificação. A nitrificação, processo no qual a amônia será convertida a nitrato, ocorre em duas etapas em condições de aerobiose mediada por bactérias autotróficas. Na primeira etapa, denominada nitritação, ocorrerá a conversão de amônia até nitrito mediada pelas bactérias oxidadoras de amônio (BOA) e, posteriormente, na segunda etapa, denominada nitratação, o nitrito será convertido a nitrato pelas bactérias oxidadoras de nitrito (BON). A desnitrificação ocorre em ambiente anaeróbio em condições anóxicas, no qual o nitrato formado na nitrificação será convertido a nitrogênio gasoso pela ação de bactérias heterotróficas (ZOPPAS *et al.*, 2016).

A Figura 1 representa o ciclo de nitrogênio, no qual as reações de nitrificação e desnitrificação podem ser observadas. Nesse processo, a nitrificação pode ser traduzida como etapa limitante do processo para remover o nitrogênio, sendo também, a etapa mais estudada e importante para o entendimento no surgimento de novos processos de tratamento. Dois grupos de bactérias serão protagonistas nas etapas de conversão. Primeiro, são as responsáveis pela nitritação, ou seja, ocorrerá a oxidação da amônia a nitrito, passando pelo composto intermediário, hidroxilamina (NH_2OH). Na segunda etapa, o outro grupo converterá nitrito em nitrato, etapa de nitratação (METCALF e EDDY, 1991). Quando ocorre situações limitantes de oxigênio, a redução do nitrito gerando óxido nítrico ou amônia pode ser realizada. O nitrito produzido também pode ser convertido a nitrato através de oxidantes de nitrito.

A comunidade microbiana, responsável pelo processo de nitrificação consistirá nos oxidantes de amônia e nitrito (YE e THOMAS, 2001).

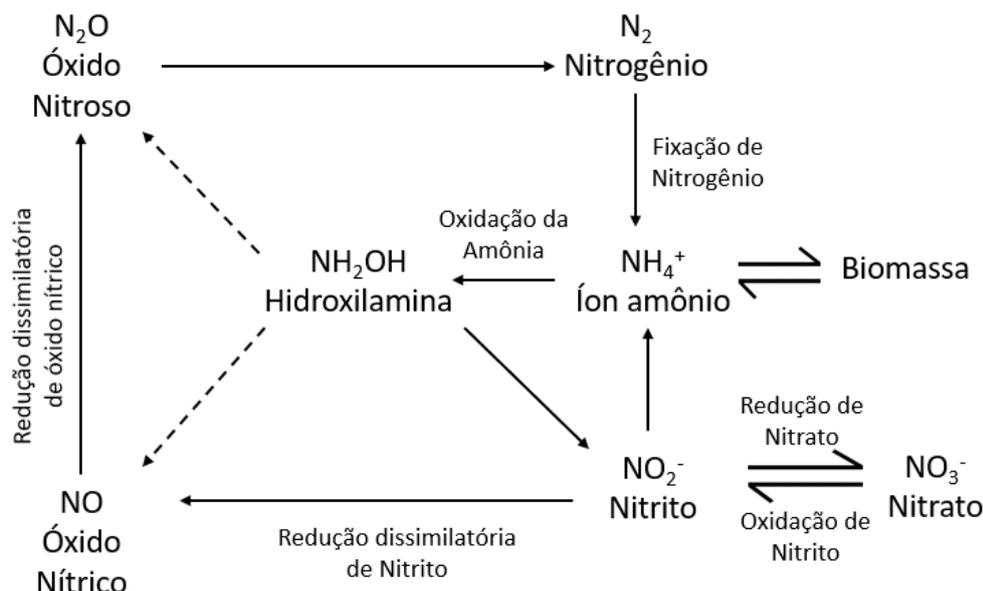


Figura 1: Ciclo do Nitrogênio (Adaptado de YE e THOMAS, 2001)

Os processos também podem estar associados pela presença de bactérias autotróficas e heterotróficas, bem como qual ambiente estará disponível para seu crescimento, seja ele aeróbio ou anóxico. A Figura 2 apresenta as diferenças entre as etapas de Nitrificação e Desnitrificação, diferenciando a quantidade de mol requerida de cada componente com o tipo de bactéria para ocorrer sua conversão. A quantidade de substrato presente tanto para crescimento celular como o carbono orgânico, além do oxigênio presente no meio, é distinta para que seja favorecida uma etapa em detrimento a outra.

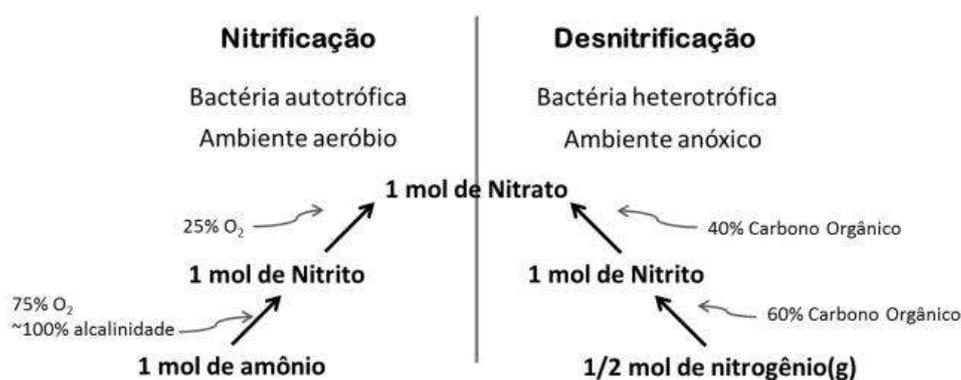
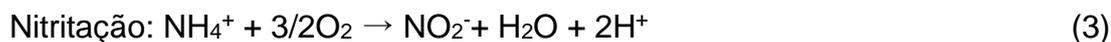


Figura 2: Processos de nitrificação e desnitrificação. (Fonte: METCALF & EDDY, 2016 apud CAO, 2018)

3.1.1 Nitrificação

O processo de nitrificação é autotrófico e caracterizado pela utilização de dióxido de carbono (carbono inorgânico) pelos microrganismos para a síntese celular. Quando comparado ao rendimento celular por unidade de substrato que é metalizado dos processos heterotróficos, observa-se um rendimento inferior (OLIVEIRA, 2008). Conhecer, então, as reações presentes no meio facilita no entendimento do processo e como evitar sua inibição para aumentar as conversões realizadas pela comunidade microbiana.

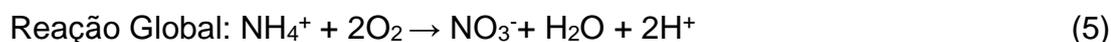
O processo de nitrificação ocorre quando o íon amônio (NH_4^+) é, primeiramente, oxidado a NO_2^- (Equação 3) – através das bactérias autotróficas oxidadoras de Amônio (BOA), caracterizando o processo de nitritação. Dentro das bactérias responsáveis por oxidar a amônia em nitrito encontra-se os gêneros: *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* e *Nitrospiras* (ZOPPAS *et al.*, 2016; METCALF *et al.*, 2003).



Depois disso, ocorre a conversão de nitrito a nitrato (Equação 4) – pelas bactérias autotróficas oxidadoras de nitrito (BON), como mostrado nas reações abaixo (MASSARA *et al.*, 2017). Nessa segunda etapa, estão presentes os gêneros: *Nitrospira*, *Nitrobacter*, *Nitrospina* e *Nitrococcus* (ZOPPAS *et al.*, 2016; METCALF *et al.*, 2008).



A reação global é descrita na Equação 5, mostrando que há liberação de 2 mols de H^+ capazes de acidificar o meio caso não ocorra correção do pH. Para as bactérias presentes, o acompanhamento da remoção do biorreator junto com a presença dos grupos microbianos estará ligado diretamente a sua eficiência.



A nitrificação pode ser inibida caso haja aplicação de elevadas cargas orgânicas que irão proporcionar crescimentos dos microrganismos heterotróficos, competidores de oxigênio e nutrientes com os microrganismos autotróficos nitrificantes no meio (SCHIMIDT *et al.*, 2000).

A taxa de nitrificação também é afetada por fatores limitantes como pH e temperatura. Quando em elevadas temperaturas, seu processo torna-se mais dinâmico, visto que tem maior consumo de oxigênio e alcalinidade, já que ocorre maior liberação de H⁺ e ocorre uma redução no pH. Durante o processo de crescimento, a comunidade bacteriana produz compostos que podem alterar o meio cultivado, como consequência de metabólitos que podem ser alcalinos ou ácidos, como por exemplo, as bactérias nitrificantes e sua modificação da alcalinidade (CAMPOS *et. al*, 2006; GERARDI, 2006). Para ter uma maximização das conversões, o pH deve estar mais alcalino, entre 7 e 9, sendo essa a faixa de pH ótimo (METCALF & EDDY, 2003).

Em baixas temperaturas, as bactérias nitrificantes tem diminuição de sua atividade. Metcalf & Eddy (2003) reportam que a temperatura ideal para a atividade bacteriana compreende entre 25 a 35°C. Para a digestão aeróbica e nitrificação, o processo é interrompido quando a temperatura sobe para 50°C. Quando a temperatura decresce para 5°C as bactérias autotróficas nitrificantes tornam-se praticamente inativas.

3.3.1.1. Organismos envolvidos na Nitrificação

Bactérias Oxidadoras de Amônio (BOA)

O processo nitrificante é realizado por bactérias autotróficas, ou seja, capazes de utilizar carbono inorgânico (CO₂) para a síntese celular. Essas bactérias são aeróbias e caracterizam pela utilização de oxigênio como acceptor final de elétrons (METCALF & EDDY, 1991). Dentre essas bactérias presentes, encontra-se as oxidadoras de amônio (BOA) que são responsáveis por converter a amônia a nitrato para que seja usado posteriormente pelo segundo grupo como substrato.

Dentre as linhagens presentes destaca-se *Nitrosomonas oligotropha*, *N. europaea*/*Nitrosococcus mobilis* e *Nitrosomonas communis* são majoritariamente presentes e, podem ser utilizadas na confecção de oligonucleotídeos para as

análises, por exemplo. Também há o crescimento de *Nitrosospira spp.* que pode ser favorecido em condições particulares, como baixo pH e baixa temperatura, também em ETEs industriais (KOOPS *et al.*, 2006; SIRIPONG e RITTMANN, 2007).

Bactérias Oxidadoras de Nitrito (BON)

Junto com as bactérias oxidadoras de amônio, esse grupo de bactérias nitrificantes, as BON, ambas oxidantes, são autotróficas, quimiolitotróficas e aeróbios obrigatórios. O grupo de oxidadoras de nitrito é mais diversos que as BOAs contendo quatro diferente gêneros: *Nitrobacter* com *Alphaproteobacteria*, *Nitrococcus* com *Deltaproteobacteria*, *Nitrospina* com *Betaproteobacteria*, e *Nitrospira* com filo separado *Nitrospirae* (TESKE *et al.*, 1994; EHRICH *et al.*, 1995, DAIMS *et al.*, 2000)

Seu crescimento possui um rendimento menor quando comparado aos microrganismos heterotróficos, onde normalmente coexistem em um mesmo lodo ativado e sistemas de biofilme. Além disso, possuem alta sensibilidade aos fatores ambientais, como por exemplo pH, temperatura e oxigênio dissolvido, tendo seu crescimento mais lento (OKABE *et al.*, 2011).

3.1.2 Desnitrificação

Na etapa de desnitrificação ocorrerá a redução biológica do nitrato para o nitrogênio gasoso, posterior ao processo de nitrificação. Essa etapa ocorre quando o meio possui uma baixa disponibilidade de oxigênio molecular, fazendo com que as bactérias desnitrificantes utilizem o nitrato e diversas formas de nitrogênio como receptores de elétrons no processo de respiração (TONETTI *et al.*, 2013).

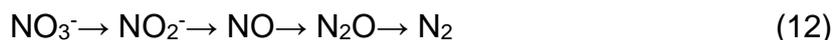
A desnitrificação pode ser descrita como uma respiração anóxica onde os elétrons, originados por exemplo da matéria orgânica, hidrogênio molecular ou compostos de enxofre reduzidos, serão transferidos para compostos de nitrogênio oxidados em vez de oxigênio para que possa fazer a regeneração da energia que a bactéria precisa, o ATP. Essa etapa ocorrerá a redução do nitrogênio oxidado a gás nitrogênio, em condições anóxicas pelas bactérias heterotróficas (METCALF & EDDY, 1991).

Dentre os microrganismos heterotróficos que podem realizar a desnitrificação encontram-se os gêneros: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Spirillum*, *Vibrio* e outras. As espécies da *Pseudomonas* são as mais comuns e utilizam diversos componentes como hidrogênio, metanol e carboidratos para realizar a conversão e crescimento celular (METCALF & EDDY, 2003).

O processo de desnitrificação é exemplificado pelas equações 8, 9, 10 e 11. Primeiro ocorrerá a redução do nitrito em nitrato e posteriormente a oxido nítrico, oxido nitroso, finalizando com o nitrogênio gasoso, que será liberado para atmosfera.



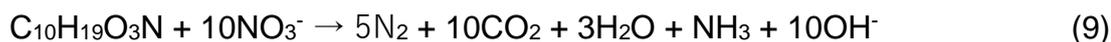
Pode-se reduzir as equações até a Equação 12:



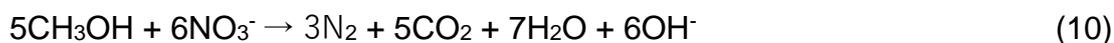
Dentre os fatores chaves no processo de desnitrificação, destaca-se a faixa de temperatura ótima entre 35°C a 50°C capaz de inferir no crescimento microbiano e na velocidade de remoção de nitrato (BARNES & BLISS, 1983 apud VON SPERLING, 1997). Microrganismos desnitrificantes podem tolerar uma faixa de pH de 6 a 9. Como há um aumento do pH pela utilização no processo de desnitrificação, não há necessidade de adição de ácido externo para o controle do pH visto que as bactérias nitrificantes aguentam essa variação (DINÇER e KARGI, 2000).

A estequiometria das reações irá depender diretamente de qual fonte de carbono está sendo utilizada. Entretanto, é comumente utilizado a fórmula $\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{O}_3\text{N}$ para representar a matéria biodegradável proveniente do esgoto doméstico (METCALF & EDDY, 2003). As Equações 9, 10 e 11 representam os diferentes doadores de elétrons que podem ser utilizados para que o nitrato seja reduzido.

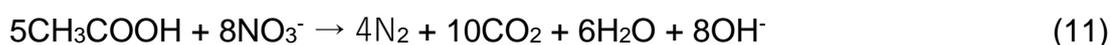
Esgoto:



Metanol:



Ácido acético:



Em todas as equações, independentemente de ser proveniente do esgoto, metanol ou ácido acético, é produzido hidroxila que ajuda a manter a alcalinidade do meio. Esse aumento de alcalinidade é compensado pelo consumo dos mesmo em sistemas combinados com a nitrificação (VON SPERLING, 1996).

O funcionamento do ecossistema global das bactérias desnitrificantes pode sofrer interferências por causa da condições ambientais, como temperatura, pH, oxigênio dissolvido no meio, concentração de nitrato, fonte de carbono utilizada, presença de substâncias tóxicas e alta intensidade de luz (BARAK *et al.*, 1998; BASSIN, 2012).

A temperatura ideal de crescimento para a desnitrificação está na faixa de 0-50°C, sendo mais favorável em torno de 35°C. Para o pH, a faixa ótima compreende entre 7-9 caindo expressivamente as taxas de desnitrificação fora dessa faixa (GRADY JR *et al.*, 2011). Esses parâmetros necessitam de controle para países que possuem altas temperaturas de modo a ocorrer a conversão e não serem inibidos.

Por esses microrganismos utilizarem para metabolizar prontamente o substrato biodegradável em condições anóxicas, o oxigênio dissolvido tem capacidade de inibir a síntese de enzimas desnitrificantes e sua atividade. Para favorecer a metabolização do nitrato em detrimento ao oxigênio, as concentrações de oxigênio dissolvido (OD) deve ser minimizada evitando a aeração dos efluentes e aumento da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) (EPA, 2007).

O aumento do tempo de retenção hidráulica pode permitir que a população bacteriana consiga degradar o substrato orgânico, levando a uma alta eficiência de remoção de nitrato. Em contrapartida, também é responsável pela alta liberação de

carbono orgânico dissolvido e amônia. Wang e Chu (2016) obtiveram uma eficiência de remoção de nitrato superior de 96% com TRH de 6,6 dias, com uma taxa de fluxo de 18mL/h comparado com o TRH de 1,6 dias que diminuiu para 66%, uma taxa de fluxo de 66mL/h.

As maiores taxas de desnitrificação podem ser obtidas utilizando como precursor os ácidos graxos, visto que a desnitrificação consiste em um processo lento sendo suportada pelo decaimento celular. Um fato curioso é a limitação de carbono que leva em acúmulo de produtos intermediários, como NO_2 e N_2O (BASSIN, 2012).

Dado os mecanismos realizados pelos microrganismos, para conseguir uma maior produtividade a configuração dos processos biológicos de tratamento de esgoto precisa haver uma combinação entre os ambientes anóxicos e aeróbios de acordo com as seguintes modalidades (OLIVEIRA, 2008):

- Pré-desnitrificação, sendo fonte de carbono proveniente de esgoto bruto;
- Pós-desnitrificação, sendo a fonte de carbono proveniente da etapa de respiração endógena;
- Reatores em batelada (operação intermitente).

A combinação pode ser empregada em reatores de Lodo Ativado e também outros tipos como MBBR, por exemplo. Assim, não só os parâmetros químicos e cinéticos são levados em consideração, mas a utilização da microbiologia junto com a ciência da computação irá entender a comunidade microbiana presente, importante nas tomadas de decisão.

3.2 Remoção Biológica de Fósforo

O fósforo é um dos nutrientes amplamente encontrados nos esgotos e lixiviados em diferentes formas. Fosfatos, polifosfatos e ortofosfatos são comuns em esgotos domésticos, em decorrência do uso de produtos de limpeza. Esse componente é também utilizado como fertilizante e seu transporte do solo para os ambientes aquáticos, tanto por escoamento superficial como subsuperficial, podendo resultar em condições nutricionais favoráveis ao crescimento fora do normal de fito e zooplâncton, além das plantas aquáticas. O aumento exagerado desses organismos causa aumento na demanda de oxigênio, alteração do pH, turbidez da água, liberação de toxinas, causando mortandade de peixes e animais (LOURES , *et al.*, 2004).

A remoção de fósforo, nos processos biológicos convencionais utilizados para o tratamento de águas residuárias, é influenciada pelas condições operacionais. Para as bactérias heterotróficas presente nos tratamento de lodo ativado, a composição típica de fósforo é de 1,5 a 2%. Entretanto, muitas bactérias são capazes de armazenar fósforo, através de suas células em forma de energia através dos polifosfato, contendo de 20 a 30% em base seca (METCALF & EDDY, 2003).

A quantidade de fósforo presente em esgoto bruto varia de 4 a 12 mg/L com uma contribuição per capita de 0,7 a 2,0 g/hab.d (VON SPERLING, 2005). Essa concentração necessita de tratamento e soluções viáveis para evitar o despejo direto nos corpos hídricos. Além disso, diferente da remoção biológica de nitrogênio, a de fósforo depara-se com concorrentes como os processos físico-químicos, como a precipitação química, utilizada como complemento ou de modo isolado em tratamentos de efluentes.

Dentre as alternativas biológicas para remoção de fósforo têm-se a absorção por microrganismos que estão imobilizados em géis de polissacarídeos, ou até mesmo sem imobilização, podendo utilizar sistemas de lodos ativados ou microalgas para que tenha uma melhor remoção do fósforo. A principal tendência é a utilização de um tratamento terciário de forma a otimizar a remoção criando sistemas híbridos anaeróbios-anóxicos-aeróbios para remoção de nitrogênio e fósforo (FERREIRA, 2014).

Para aumentar a eficiência do processo de remoção de fósforo, surge como alternativa os EBPR (*Enhanced biological phosphorus removal*). Esse termo

diferencia a forma convencional que é conduzida em condições particulares e na presença de microrganismos com capacidade de acumular esse composto químico.

Os processos EBPR são projetados para comunidades de microrganismos em sólidos suspensos com a capacidade de armazenar fósforo de forma intracelular variando de 3 a 5 % em base seca. Posteriormente, a remoção de resíduos utilizando lodo ativado, por exemplo, pode produzir eficiências de remoção na faixa de 80 a 90%. Mesmo que haja alguma controvérsia quanto a real composição bacteriana dessas comunidades de microrganismos, geralmente eles são conhecidos como organismos acumuladores de fósforo (PAOs). Dentre as subpopulações bacterianas inclui *Accumulibacter* e *Rhodocyclaceae*. O processo EBPR baseia-se no fornecimento de uma zona anaeróbica com um amplo suprimento da demanda bioquímica de oxigênio. A matéria orgânica, então, é fermentada na zona anaeróbica para criar uma fonte de ácidos graxos voláteis (AGVs), principalmente acetato e propionato, que por sua vez servirão de fonte para PAOs (MINESSOTA POLLUTION CONTROL AGENCY, 2006).

Em ambientes aeróbios ou anóxicos, os PAOs conseguem armazenar fosfato na forma de polifosfato intracelular, tendo a retirada de P da fase líquida por meio da remoção desses microrganismos no lodo presente. Diferente de outras comunidades microbianas, os PAOs são também capazes de absorver carbono na forma de ácidos graxos voláteis em condições de anaerobiose e posteriormente armazenar como polímeros de carbono, os polihidroxicanoatos (PHAs) (OEHMEN, LEMOS, *et al.*, 2007).

Durante a fase aeróbia ou anóxica, quando há o esgotamento do substrato, os PAOs utilizam PHA armazenado como substrato e fonte de energia para realizar seu crescimento, manutenção celular, síntese de glicogênio e absorção de fosfato presente no meio para restabelecer a *pools* de polifosfato dentro das células (WENTZEL, LOTTER, *et al.*, 1991). Observa-se um rápido crescimento bacteriano nesta fase, a absorção de fosfato é maior do que a liberação de fosfato durante a fase anaeróbica e, por consequência, há uma efetiva remoção deste nutriente do meio. A remoção biológica detalhada do fósforo mecanismos são representados na Figura 3

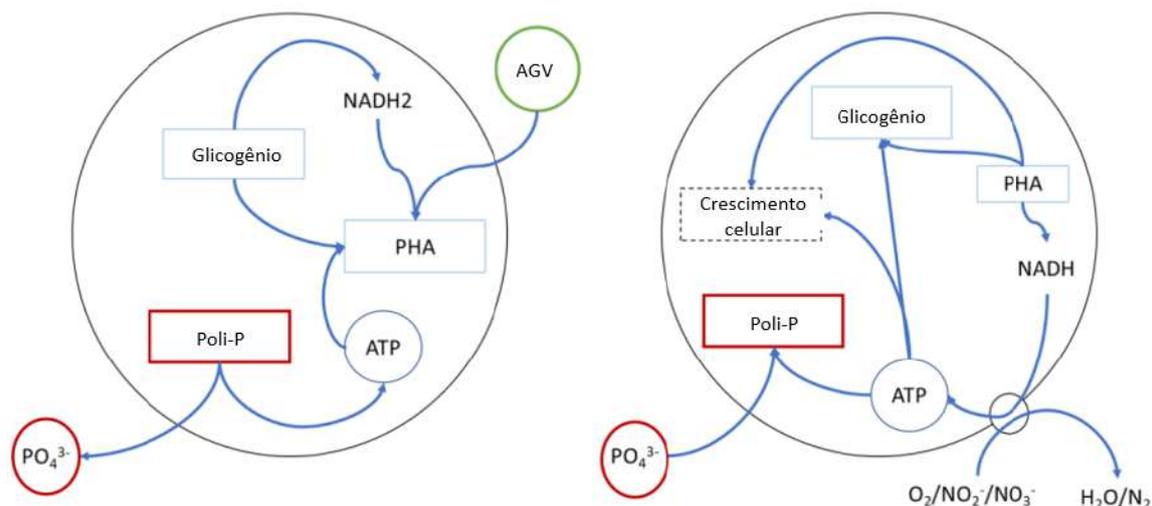


Figura 3: Metabolismo dos organismos acumuladores de fósforo (Adaptado de CASTELLANOS, 2020)

Os fosfatos estão presentes com a maior disponibilidade e podem ser assimilados pelas bactérias existentes no sistema de remoção de fósforo. Barnard (1976) aponta uma pré-condição necessária para a remoção de fosfatos nesses sistemas onde o licor misto ou o lodo de retorno do subfluxo do clarificador permanece em condição de anaerobiose. Assim, os fosfatos seriam liberados para o líquido, seguido de um período de aeração durante o qual os fosfatos seriam precipitados ou absorvidos pela comunidade microbiana presente. A presença de nitratos pode levar a um maior valor de potencial de oxidação-redução acima do valor mínimo, onde seria necessário para garantir as condições de anaerobiose criada.

Os processos de nitrificação que ocorrem no lodo granular é realizada pelos mesmos mecanismos explicitados, com a presença das BOAs e BONs para oxidação do amônio em nitrito, depois em nitrato na presença de oxigênio. Pode haver a presença de arqueas oxidadoras de amônia (AOA) que são responsáveis por converter a amônia em nitrito (GUIMARÃES, 2017).

Outro grupo microbiano que pode estar presente são os GAOs (Organismos Acumuladores de Glicogênio) que são capazes de capturar AGVs e converter em PHA. Entretanto, não são capazes de liberar fósforo e capturar em condições aeróbicas. Assim, não são capazes de contribuir com a remoção, competindo com os PAOs e sendo indesejáveis para o sistema de EBPR (SOUZA, 2017).

Dessa forma, sabe-se que os GAOs são favorecidos em condições de anaerobiose e causa mudanças na performance do reator que está sendo operado.

A Figura 4 mostra a diversidade de grupos microbianos presentes em Lodo Floculento e o Lodo Granular. Assim, dependendo das condições físico-químicas e conhecendo os microrganismos presentes, pode-se maximizar o crescimento de uns em detrimento ao de outros.

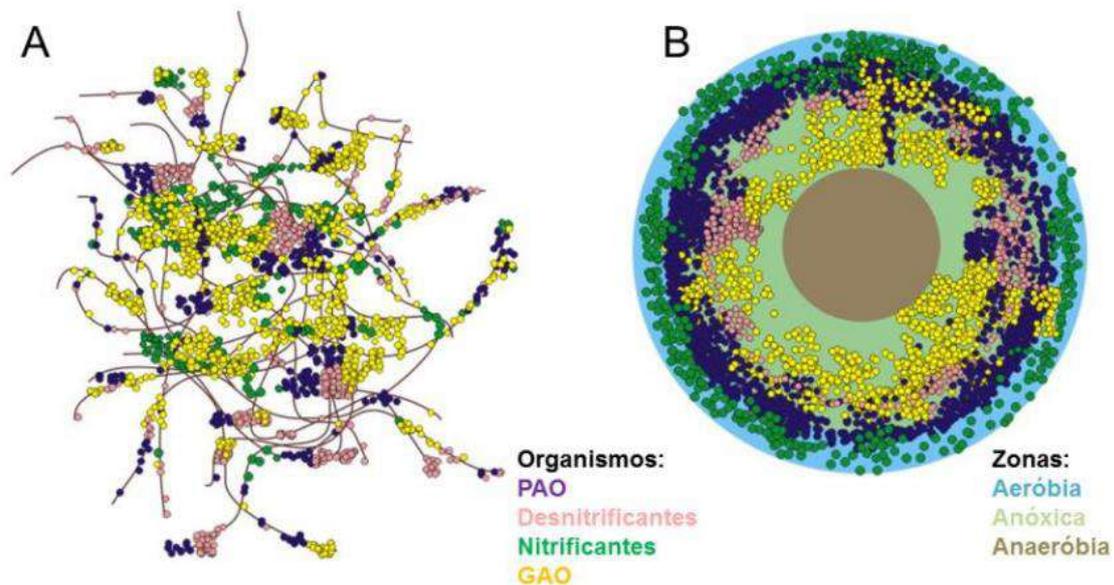


Figura 4: Diferença entre A) Lodo Floculento e B) Lodo Granular aeróbio (GUIMARÃES apud WINKLER et al. 2013)

De acordo com Gerardi (2006), alguns problemas operacionais, em unidades de tratamento biológicas, para pH abaixo de 6,8 podem ser observados como:

- Diminuição da atividade enzimática bacteriana;
- Possível aumento de ácido sulfídrico (H_2S);
- Inibição do processo de nitrificação;
- Dificuldade para formação dos flocos;
- Crescimento indesejado de fungos filamentosos.

Já para valores para pH acima de 7,2, podem incluir também a diminuição da atividade enzimática e nitrificação, bem como a interrupção da formação dos flocos, tendo aumento considerável na produção de amônia. Além disso, o pH também influencia no grau de ionização dos substratos, resíduos tóxicos e nutrientes, junto do transporte para as células e organelas das bactérias. Como resultado de variações de pH, destaca-se uma atividade bacteriana indesejada e o tratamento ineficiente.

No tratamento secundário de efluentes, o oxigênio dissolvido desempenha um papel importante e limitante na eficiência da aeração através do processo de transferência de massa. O controle desse parâmetro pode inferir no tipo de rota metabólica a ser realizada pelos microrganismos, bem como a eficiência do tratamento a ser realizado. Em lodos ativados e granulares, por exemplo, necessita-se de um suprimento suficiente capaz de manter o consórcio bacteriano, para que realize os processos de oxidação e suas atividades metabólicas (CHERN et. al, 2000).

Carlos e colaboradores (2009) concluíram que em baixas temperaturas, o crescimento de PAOs são os microrganismos dominantes, visto que ocorrerá a inibição das GAOs em temperaturas em torno de 10°C, independente do pH e da disponibilidade de carbono. Já em temperaturas moderadas, de 20°C, a presença de propionato e acetato como fonte de carbono também favoreceu o crescimento de PAO frente a GAO. Já em temperaturas mais elevadas, como 30°C, observou-se maior proliferação de GAO. Dessa forma, a temperatura pode ser utilizada para obter uma seleção de um grupo bacteriano.

3.2.1 Organismos envolvidos na Remoção Biológica de Fósforo

Bactérias Acumuladoras de Fósforo (PAO)

As PAOs (Bactérias Acumuladoras de Fósforo) participam tanto do processo aeróbio quanto do anaeróbio, já que podem metabolizar utilizando produtos diversos de armazenamento que inclui polifosfato, o acúmulo de glicogênio e polihidroxialcanoatos (PHAs), sendo particularmente o poli- β -hidroxibutirato (PHB). O processo realizado pelas PAOs é feito nas fases aeróbia e anóxica, por meio do armazenamento do PHA e sua posterior metabolização. Assim, o fornecimento de energia de forma a ter a absorção e reposição de armazenamento de polifosfato e carbono, também será precursor para o processo de síntese do glicogênio e outros componentes celulares (SCHULER e XIAO, 2008).

Dentre as bactérias mais importantes e comumente encontradas na maioria das ETE com uso de EBPR, observa-se o gênero *Accumulibacter* e da família das *Rhodocyclaceae* estando na subclasse 2 das *Betaproteobacteria*. Vale ressaltar que nenhum desses microrganismos foram cultivados através de uma cultura pura, assim,

em condições anaeróbias, ácidos graxos com cadeia curta são os precursores para a síntese de PHA. Posteriormente, com condições aeróbias, terão capacidade de obter energia e síntese de polifosfatos (NIELSEN *et. al*, 2009).

Bactérias Acumuladoras de Glicogênio (GAO)

Pela variedade de comunidades microbianas dentro de um mesmo reator, as bactérias acumuladoras de glicogênio GAOs podem competir com as PAOs em sistemas anaeróbio:aeróbio de EBPR em certas condições operacionais. Consequentemente, são mais eficientes para assimilar substratos anaerobiamente quando alimentadas com efluentes contendo glicose, mas também acetato. Embora, ambas as bactérias produzam polifosfatos, as GAOs podem metabolizá-los em condições aeróbias para formação de glicogênio (SEVIOUR *et al.*, 2003).

O gênero mais encontrado nas ETE é o *Competibacter* dentro da *Gammaproteobacteria*, referindo também como grupo GB, sendo esses identificados de forma mais abundante em grande escala. As mais comuns espécies dentro desse gênero são *Candidatus Competibacter phosphatis*, muitas vezes abreviado como *Competibacter*. Observa-se essa espécie principalmente em reatores de laboratórios, mas já foram relatadas em escala real de EBPR com abundância de até 10% do biovolume celular total (NIELSEN *et al.*, 2009).

3.3 Técnica de FISH e suas aplicações

O método de FISH (*fluorescence in situ hybridization*) é amplamente utilizado para identificação de vários tipos de células, inclusive para identificação dos microrganismos envolvidos no tratamento de águas residuárias. Em comparação com métodos dependentes de cultivo, a identificação de microrganismos por FISH é mais fácil, dependendo do uso correto das sondas para o que está analisando (DOMAÑSKA, RIEDEL, *et al.*, 2014). Essa técnica é expandida em diferentes tipos de reatores mostrando excelente eficácia na identificação dos microrganismos presentes.

O protocolo de FISH é dividido em 5 principais etapas (ORMECI e LINDEN, 2008):

1. Preparação da amostra;
2. Fixação;
3. Imobilização;
4. Hibridização;
5. Observação no microscópio fluorescente.

Primeiro, prepara-se a amostra. A segunda etapa, de fixação, é realizada com a finalidade de aumentar a permeabilidade da célula e permitir que ocorra a penetração da sonda, para que não ocorra a lise celular durante a hibridização. Posteriormente, na imobilização, as células serão aplicadas sobre uma lâmina de microscópio e desidratadas em séries de soluções de etanol. Na etapa de hibridização, haverá a penetração da sonda nas células presentes e ocorrerá a ligação específica no oligonucleotídeo marcado para as sequências complementares de ácidos nucleicos da amostra. Por fim, a sonda ligada será visualizada sob um microscópio fluorescente (ORMECI e LINDEN, 2008). A Figura 5 representa o passo a passo para a detecção da luminosidade dos microrganismos.

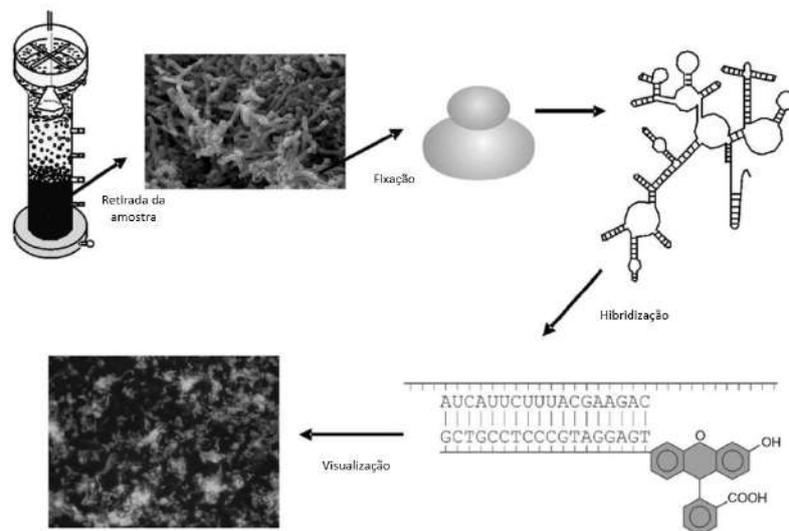


Figura 5: Esquemática da divisão na técnica de FISH (SANZ e KOCHLING, 2007)

As características morfológicas são identificadas dos microrganismos pela ferramenta de FISH, necessitando que existam sondas pré-existentes com a informação genética que está sendo analisada. Devido a disponibilidade de sondas moleculares especiais, a identificação dos microrganismos será baseada na sequência do material genético que é complementar a sequência de RNA ou DNA. As sequências de RNA irão anexar as sequências complementares do material genético da bactéria a ser detectada durante a análise. Por causa da molécula fluorescente ligada ao ácido, ao utilizar o microscópio, esses microrganismos ficarão bem visíveis por causa de sua fluorescência emitida (DOMAÑSKA, *et al.*, 2014).

Segundo Amann *et al.* (1990b), devido às razões históricas e técnicas, os maiores conjuntos de dados presentes das sequências completas são para os rRNAs 5S e 16S. Mesmo que ambos tenham provado serem valiosos para estudos determinativos, filogenéticos e ambientais, o maior conteúdo de informação das espécies estão descritas pelo rRNA. Na Figura 6, pode-se observar uma representação do que seriam as sondas e como se comportam durante a análise. Através de uma sequência específica, as sondas irão ligar-se a sequência alvo presente nas bactérias e, pela luminosidade incidida, terão a coloração específica para a identificação.

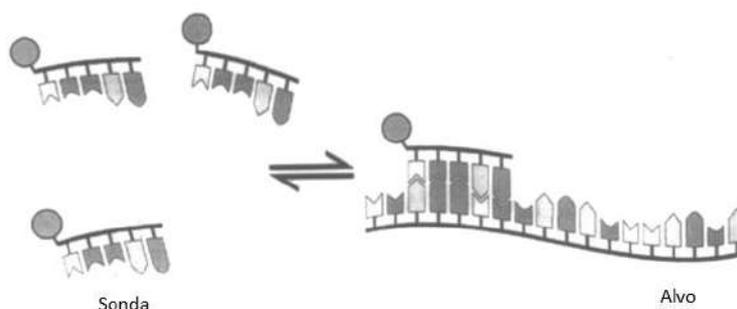


Figura 6: Representação esquemática da ligação de oligonucleotídeos. Adaptado de (PERNTHALER, GIOCKNER, et al., 2001)

Essa técnica auxilia na investigação de um conjunto completo de cromossomos de uma amostra, na qual é fixada em uma lâmina de vidro e depois é exposta a uma “sonda” - pequeno pedaço de DNA purificado marcado com um corante fluorescente, após a incidência do feixe luminoso. Assim, a sonda marcada com essa fluorescência encontra-se então ligada à sua sequência correspondente dentro do conjunto de cromossomos presentes. Com o uso de uma microscopia especial, o cromossomo e a localização subcromossômica onde a sonda fluorescente foi ligada, pode ser vista (NIH, 2023).

Após a sonda estar em contato com sequência de interesse, o resultado pode ser uma baixa intensidade da fluorescência das bactérias, representando um problema ainda a ser resolvido. Pernthaler *et al.* (2001) descrevem como um problema ainda não resolvido e a dificuldade da utilização de citometria de fluxo para a contagem direta das células, para avaliação da quantidade presente sem a necessidade de contagem por cultivo.

As principais sondas utilizadas podem ser descritas pela Tabela 3 com seu nome comumente utilizado e o grupo alvo microbiano.

Tabela 3: Misturas utilizadas com as principais sondas e grupos alvo

Mistura	Sondas	Grupo Alvo
EUBmix	EUB 338 I	Maioria das bactérias
	EUB 338 II	<i>Planctomycetes</i>
	EUB 338 III	Verrucomicrobiales
PAOmix	PAO 462	
	PAO 651	
	PAO 846	<i>Accumulibacter</i>
	ACC-I-444	
	ACC-II-444	
GAOmix	GAO Q431	<i>Candidatus</i>
	GAO Q989	<i>Competibacter phosphatis</i>
	Neu 653	Maioria halofílicos e halotolerantes
BOAmix	Nse 1472	<i>Nitrosomonas spp.</i>
	Nso 1225	<i>Nitrosomonas</i>
	Nmv	Oxidadores de amônia β -proteobacteria
	Nso 190	<i>Nitrosococcus mobilis</i> (Nitrosomonas) lineage
	Nit 1035	Oxidadores de amônia β -proteobacteria
BONmix	Ntspa 662	<i>Nitrobacter spp</i>
		Gênero Nitrospira

Microscopicamente, os objetos corados com DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol dihidroclorídrico) também podem hibridizar com a sonda geral EUBmix dependendo da época e região analisada. Além disso, os novos microrganismos têm maior dificuldade de serem identificados pela sonda geral.

Dentre as vantagens da utilização da técnica de FISH tem-se (SANZ e KOCHLING, 2007):

- Sondas rápidas e de fácil manuseio com ampla disponibilidade;
- Visualização direta dos microrganismos sem necessidade de cultivo;
- Qualitativo, mas pode ser agregada outras técnicas para quantificação;
- Detecção diferencial/preferencial de microrganismos presentes ativos;
- Apto para utilização rotineira, não necessitando de pessoal altamente treinado, apenas conhecimento em microscopia básica.

Já as desvantagens presentes são (SANZ e KOCHLING, 2007):

- Conhecimento *a priori* do ecossistema a ser analisado e dos microrganismos com maior probabilidade de serem detectados - pode haver a necessidade do uso combinado com outras técnicas;
- Caso um microrganismo específico tiver que ser detectado e quantificado, deve-se conhecer sua sequência de rRNA - se a sonda correspondente ainda não estiver no portfólio;
- O desenho específico e restritivo para a sonda de um determinado grupo microbiano pode não ser possível, especialmente se for aplicado alguns critérios metabólicos, por exemplo;
- A otimização e projeto das condições de hibridização de uma nova sonda é dificultada pela necessidade de uma experiência e dedicação, sendo que nem sempre os resultados são satisfatórios;
- Quantificação apresenta erros, podendo ser subjetiva ou complexa;
- Análise estrutural de lodos granulares ou biofilmes requerem um microscópio confocal e uma análise de imagem, aumentando o custo da técnica.

Dessa forma, entender a análise e conseguir quantificar os microrganismos, serão os pontos chaves para evitar flutuações nos biorreatores. A expansão da técnica de FISH para o tratamento de águas residuárias ampliou o entendimento da comunidade microbiana além de permitir a descoberta de novas linhagens que podem auxiliar na remoção do nutriente de interesse ou de algum poluente existente.

3.3.1 Identificação de microrganismos em Reatores Biológicos para o tratamento de efluente

Reator de Leito Móvel com Biofilme (Moving Bed Biofilm Reactor - MBBR)

No reator de leito móvel cm biofilme (MBBR) a biomassa fica aderida nos suportes, denominados *biocarriers* ou biomedias, que são colocados dentro do reator, apresentando diferentes configurações, sendo a mais comum feita de cilindro oco de plásticos. Os biofilmes, então, irão se desenvolver dentro dos *biocarriers* de polietileno com alta densidade, entre 0,95-0,98 g/cm³ (MADAN *et al.*, 2022).

A Figura 7 demonstra o funcionamento do MBBR em condição aeróbia (a) e anóxica (b). Nos processos com a presença de oxigênio, aeróbios, a agitação causada durante o processo de aeração permite que haja a movimentação das peças que contém os biofilmes. Enquanto nos outros processos, que não terão as bolhas de ar para causar essa movimentação, é necessário a utilização de agitadores mecânicos.

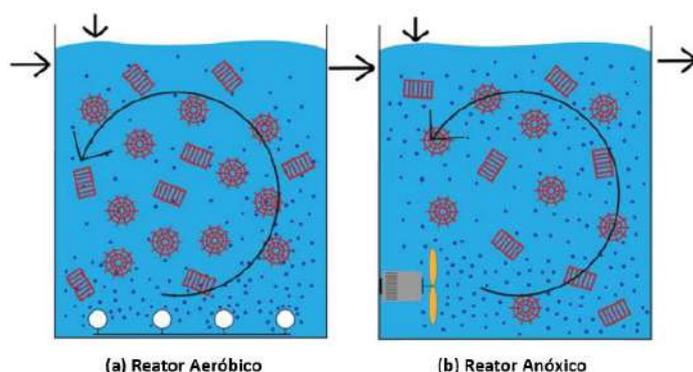


Figura 7: Funcionamento do Reator Aeróbico (a) e do Reator Anóxico (b). Adaptado de Madan, Madan e Hussain, 2022

As diferentes geometrias presentes no mercado irão diferenciar a retirada de amostra para a técnica de FISH uma vez que as biomedias *Anox Kaldnes K1* em MBBR, por exemplo - que possuem espaços ocios, tendem facilitar a remoção da biomassa em detrimento da *Mutag Biochip*, que possuem uma superfície porosa onde os microrganismos se depositam. Esse fator também está ligado com a eficiência do sistema e as características de tratamento a serem buscadas. As diferentes geometrias podem ser observadas na Figura 8.



Figura 8: Diferentes tipos de Biomédias para MBBR, *AnoxKaldnes K1* (a) e *Mutag biochip* (b) (BASSIN, DIAS, et al., 2016)

Diversos estudos analisam a comunidade microbiana presente relacionando com os aspectos de carga e características dos reatores utilizando a técnica de FISH. Em seguida, serão abordados artigos que fizeram os projetos pilotos e quantificaram a comunidade microbiana presente, com os principais aspectos descritos.

Abzazou *et al.* (2016) realizaram um estudo de uma planta piloto com MBBR para o processo de nitrificação no tratamento de águas residuárias com alto teor de amônia, com tempo de retenção hidráulica (TRH) de cerca de 40h a uma temperatura de 31°C. O suporte utilizado foi o *AnoxKaldnes K1* em MBBR e a coloração utilizada para todas as bactérias foi o DAPI. A técnica de FISH foi combinada com um método de desagregação dos flocos revelando um papel importante das *biomedias* para suporte das BOAs, tendo na maior parte dos suportes, domínio claro de BOA, β -proteobactérias. A atividade metabólica dos microrganismos nitrificantes da planta estava diretamente relacionada com a abundância baseada na presença significativa, sendo 87,9% ($\pm 22,2\%$) de BOA e 67,6% ($\pm 35,5\%$) de BON presente nos biofilmes. O parâmetro crítico de análise foi o TRH, de 20 a 37h, para a atividade metabólica da BOA e a frequência presente de BON na planta, que houve maior relação com a abundância dos mesmos.

Outro trabalho foi de Almstrand *et al.* (2013), que analisaram a distribuição espacial de populações presentes no MBBR, onde a partir do suporte do biofilme, deduziram possíveis diferenças na Ecofisiologia e na diferenciação de microrganismos. A análise de coagregação mostrou que na planta piloto nitrificante, o subclasse II de *N. oligotropha* teve uma maior agregação perto de *Nitrospira* do que o subclasse I de *N. oligotropha*, indicando consideráveis diferenças ecofisiológicas a serem levadas em consideração entre esses subgrupos filogeneticamente próximos. A fim de quantificar as abundâncias populacionais em diferentes níveis, foi utilizado um software de edição de imagem para cortar de forma manual as imagens do biofilme crioseccionado, já corado com FISH, em pedaços fatiados. As imagens foram analisadas e a quantificação das populações microbianas foi feita em cada fatia. Deve-se levar em consideração que não se pode apenas cortar as imagens em faixas horizontais retas, visto que as superfícies da maioria dos biofilmes têm um contorno irregular complexo e não tem padrões paralelos às bordas da imagem. Foi desenvolvido assim, uma ferramenta automatizada, *Slicer*. Essa abordagem permitiu inferir que a distribuição vertical da sublinhagem I de *Nitrospira* e dois grupos de

células semelhantes a *N. oligotropha* possuíam características diferentes e tinham variações entre os sistemas analisados.

A pesquisa realizada por Biswas e Turner (2012) investigou a composição da comunidade microbiana presente em duas estações de tratamento municipais utilizando MBBR (*Anox Kaldnes K1*) em Wellington, Nova Zelândia. Foram coletadas amostras de biofilme e biomassa durante 12 meses, encontrando microrganismos da comunidade bacteriana e das arqueas. As análises de FISH indicaram diferenças morfológicas nas *Deltaproteobacteria* detectadas nas duas plantas, revelando um agrupamento distinto entre a Delta e membros das *Methanosarcinales*, que foram as únicas arqueas detectadas e estavam presentes em baixa abundância (<5%), utilizando as sondas EUB338 (Eubacteria), MSMX860 (*Methanosarcinales*), DELTA495a (maioria *Deltaproteobacteria* e *Gemmatimonadetes*) e cDELTA495a (Competidor da DELTA495a). As estimativas de biovolume das *Deltaproteobacteria* resultantes mostraram uma maior amostra de biofilme de uma das ETEs, por receber resíduos domésticos e industriais, sendo também influenciada pela infiltração de água do mar. Os resultado das comunidades suspensas de ambas as plantas foram diversas e dominadas por grupos aeróbicos das *Gammaproteobacteria* e *Betaproteobacteria*.

Todos os artigos mostraram a presença da técnica de FISH para identificar os principais grupos microbianos. Junto desse conhecimento, aliado a que tipo de biorreator está sendo operado, quais condições presentes e como é operado, pode-se ter parâmetros importantes para aumentar a performance das bactérias e não ocorrer um impacto brusco na operação. Um pré-tratamento pode ser realizado, por exemplo, de forma que quando o efluente for direcionado aos biorreatores, a quantidade de matéria orgânica e nutrientes não prejudique a comunidade microbiana presente. Outro ponto é como realizar a análise do biofilme, para que mantenha sua integridade. A criogenia é um dos precursores para manter as características originais e também analisar se a presença das bactérias é mais interna ou externa.

Lodo Granular Aeróbio (LGA)

Os sistemas biológicos presentes no tratamento de esgotos no Brasil são baseados em tecnologias mais antigas que, em sua grande maioria, ocupam muito espaço, como o lodo ativado. Isso é devido a necessidade de sedimentadores e as

baixas concentrações de sólidos presentes no lodo, com flexibilidade à carga aplicada e as baixas capacidades de conversão (0,5-2,0 kg DQO/m³-d), que são características negativas para utilização dos processos tradicionais (DEZOTTI, SANT'ANNA JR. e BASSIN, 2011). Além disso, torna-se inviável a construção em locais com espaço limitado pela necessidade de grandes áreas. (ROBERTI, 2018).

O desenvolvimento de novas tecnologias permitiu o aparecimento de sistemas de tratamento mais compactos, mais eficientes e com capacidade maior de tratamento. Estes sistemas são alternativas presentes para suprir as necessidades dos tratamentos tradicionais de biomassa suspensa em decorrência da sua versatilidade e possibilidade de utilizar em menores áreas para sua implantação (BASSIN, 2012).

O desenvolvimento recente da tecnologia denominada Lodo granular aeróbio, uma tecnologia de tratamento desenvolvida recentemente, utiliza um biofilme onde a biomassa fica automobilizada, permitindo seu funcionamento sem a necessidade de meio de suporte. Nesse processo de lodo granular, as bactérias se agregam em forma de grânulos ao invés de flocos, como ocorre no sistema de lodos ativados. Diferentemente dos processos que usam biofilme, por não precisar do suporte, os microrganismos são encontrados automobilizados em uma matriz de exopolissacarídeos que são liberados por eles mesmos, contribuindo para diminuição dos altos custos com investimento (BASSIN, 2012).

Os grânulos presentes nos reatores são cultivados em batelada em reatores de batelada sequencial (RBS). Assim, essa operação é dividida em ciclos temporais onde terão a fase de enchimento, reação ou aeração, sedimentação, descarte e repouso. Esse sistema pode gerar uma economia de até 60% de energia em detrimento ao reator tradicional de lodos ativados com alimentação contínua. Além disso, o processo pode ser realizado em apenas um tanque, gerando economia de área de instalação para o tratamento de efluentes (DUTTA e SARKAR, 2015).

Cada grânulo presente no sistema é uma enorme metrópole de microrganismos que contém milhões de bactérias individuais. Os RBS são um design modificado do processo de lodo ativado convencional e tem sido amplamente utilizado nos tratamentos de efluentes municipais e industriais. Seu *start* pode ser dado por auto adesão microbiana. Outro ponto é que as bactérias provavelmente não irão

agregar de forma natural, devido as forças eletrostáticas presentes que são repulsivas e as interações de hidratação entre elas (LIU e TAY, 2004).

Em um sistema de Lodo Granular Aeróbio é possível realizar todas as reações biológicas com o objetivo de remoção da matéria orgânica, nitrogênio e fósforo em apenas um reator (RUBIM, 2021). A Figura 9 permite observar a existência de uma zona externa aeróbia e de uma zona interna anaeróbia/anóxica no interior dos grânulos no lodo granular aeróbio. Dessa forma, os processos biológicos que ocorrem nesse sistema são capazes de remover a matéria orgânica carbonácea e nitrogenada visto que podem ocorrer simultaneamente no mesmo reator e realizar o processo de nitrificação e desnitrificação, além da remoção de fósforo.

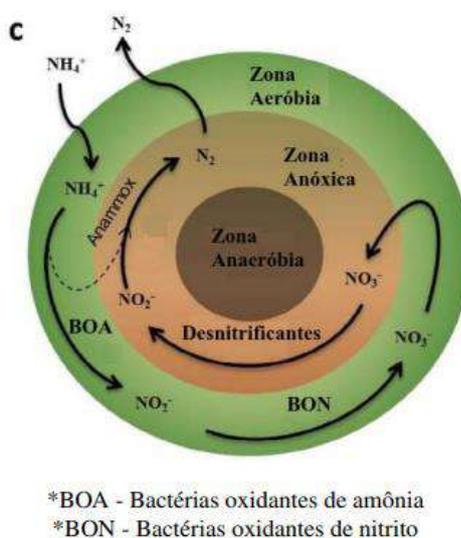


Figura 9: Remoção de Nitrogênio no Lodo Granular. Adaptado de Nancharaiah, Y. V. e Reddy, G. K. K. (2018).

Nas regiões mais externas do grânulo haverá a proliferação das bactérias nitrificantes heterotróficas, de forma que ocorra a degradação da matéria orgânica e o processo de nitrificação. O nitrato produzido na nitrificação na camada externa irá, então, para o processo de desnitrificação na parte mais interna do grânulo, liberando nitrogênio gasoso. Dessa forma, a remoção de nitrogênio no LGA ocorre via nitrificação/desnitrificação simultânea por relacionar zonas ambientais existentes no grânulo. Assim, é necessário verificar a maturação dos grânulos para não comprometer sua atividade no tratamento de efluentes (SILVA, 2021).

Diferentes estratégias foram estudadas por Chen *et al.* (2011) para remoção de nitrogênio através de grânulos aeróbios com tamanho médio de 1,5 mm e 0,7 mm em RBS. Com uma operação anóxico/óxico (AO) alternado sem controle de oxigênio

dissolvido (OD), a eficiência de remoção de N inorgânico total foi de 67,8-71,5%. Por outro lado, controlando a condição AO a 2mg/L, a eficiência atingida foi de 75-80,4%. Então o controle do OD com alimentação gradual do efluente pode aumentar ainda mais a eficiência, sem depender do tamanho dos grânulos presentes.

Já na remoção de fósforo, durante a fase anaeróbia de conversão os PAO – organismos acumuladores de fosfato, irão coletar fontes de carbono biodegradáveis, como os ácidos graxos voláteis (AGVs), intracelularmente em formato dos polihidroxicarboxilatos (PHAs). Tipicamente, os PHAs são encontrados na forma de poliβ-hidroxiacetato (PHB), sendo utilizado para finalidades catabólicas e anabólicas caso esteja em forma de acetado e seja a fonte de carbono para essa finalidade pelas PAOs. Parte do glicogênio presente na célula também será utilizado para acumular PHA. De forma simultânea à assimilação de ácido acético/propiónico, ocorrerá também a liberação de ortofosfato no meio (CAMPOS, 2019).

Na etapa aeróbia, os PAOs irão absorver o ortofosfato que está contido no meio e utilizar o PHA armazenado, oxidando-o e proporcionando energia e fonte de carbono. Também é produzido glicogênio durante o metabolismo do PHA e a energia disponibilizada será utilizada para formar as ligações de polifosfato em células estocadas de forma que o ortofosfato solúvel será removido da solução e incorporado em polifosfatos, internamente à célula bacteriana. Posteriormente, o crescimento celular também ocorrerá devido sua utilização das PHA. Então, a biomassa com elevada carga estocada de polifosfato será responsável pela remoção de fósforo (CAMPOS, 2019).

A Figura 10 exemplifica um esquema simplificado das principais conversões que ocorrem na estrutura do lodo granular aeróbio em paralelo. Durante o regime de alimentação anaeróbio, não ocorre estratificação do biofilme e todo o grânulo no reator é mantido em condições anaeróbias. Os processos simultâneos que ocorrem durante a fase aeróbia, degradação de matéria orgânica, nitrificação, desnitrificação e remoção de fósforo, torna complicado a identificação das rotas específicas de conversão que estão ocorrendo (BASSIN, 2012).

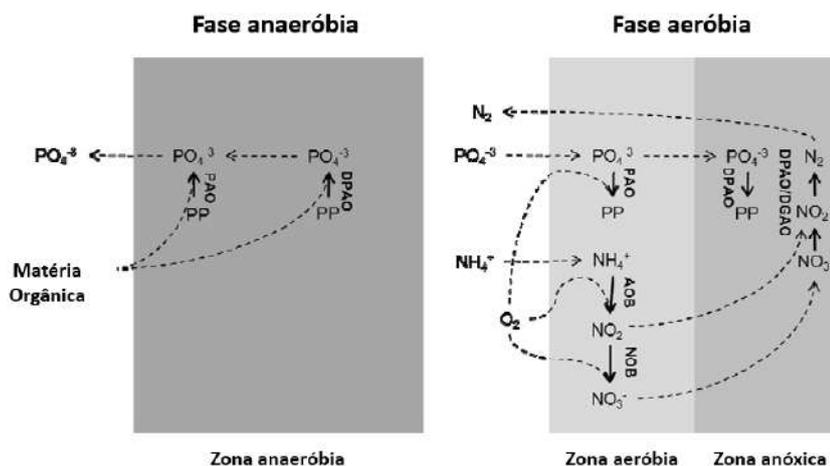


Figura 10: Esquema das principais conversões ocorrendo em paralelo na estrutura dos grânulos aeróbios (BASSIN, 2012)

Um dos maiores problemas presentes nos reatores de lodo granular para a remoção de fósforo está ligada pela competição entre PAO e organismos acumuladores de glicogênio (GAO). Esses últimos competem pelo carbono orgânico com a PAO durante a fase de anaerobiose. Já as GAOs obtêm a energia (ATP) e seu potencial de redução do glicogênio para metabolizar os AGV em condições anaeróbias e, também, armazenar PHA. Posteriormente na fase de aerobiose, PHA será oxidado, de modo que leve a restauração das reservas de glicogênio e, conseqüentemente, o crescimento celular. Os GAO não contribuem para a remoção de fosfato nos reatores de lodo granular, visto que no seu metabolismo não há nem liberação nem consumo desse composto, sendo indesejáveis dentro do sistema (BASSIN, 2012).

Dessa forma, conhecer a comunidade microbiana permite entender a performance do reator, visto que se tiver mais GAO do que PAO, a remoção de fósforo será prejudicada. Assim, mecanismos para favorecer um grupo microbiano deve ser realizado para aumentar a capacidade de remoção e produtividade do reator.

O estudo realizado por De Kreuk *et al.* (2005) mostrou que os grânulos mais estáveis e com elevada eficiência de remoção de nutrientes foram obtidos graças a seleção para organismos de crescimento lento, como o PAO. A remoção simultânea da demanda química de oxigênio (DQO), N e P foi possível pela baixa saturação de oxigênio, além do crescimento heterotrófico dentro dos grânulos – DPAO (*denitrifying phosphorus accumulating organisms*). Os resultados sugeriram que o fosfato é

parcialmente removido por precipitação. O monitoramento dos reatores foi realizado em escala de laboratório por um período longo de tempo e mostrou que a eficiência de remoção de N depende muito do diâmetro dos grânulos. A técnica de FISH foi realizada nas camadas finas dos grânulos de modo a determinar a localização dos PAOs misturando sondas PAO462, PAO651 e PAO846, para organismos nitrificantes NSO1225 e NSO190, além da maioria das eubactérias misturando EUB338, EUB338-II e EUB338-III. A técnica mostrou claramente que grânulos cultivados em uma alimentação anaeróbia possuíam uma mistura de PAO heterotrófico e nitrificantes autotróficos nas camadas externas do grânulo e PAO no interior do grânulo. O tamanho médio teve uma oscilação entre 0,4 e 1,8 mm durante 300 dias a uma saturação de 20% de oxigênio.

Outro estudo que utilizou a técnica de FISH foi de Figueroa *et al.* (2008) que analisou a população microbiana dos grânulos aeróbios. Na Fase I (de 0 a 59 dias), diversas sondas gerais foram aplicadas para detecção das principais bactérias envolvidas no processo (EUB338I, Alf1b, Bet42a e sondas Gam42a). As bactérias hibridizadas adequaram-se às classes α -, β -, γ - proteobacteria e representou uma pequena fração em comparação com todos os positivos da sonda EUB338I. Nenhum resultado positivo identificou as sondas específicas para oxidação de amônia para bactérias oxidantes de nitrito Nitrospira e Nitrobacter (BON) (Ntspa712 e Nit3). Esses resultados ratificaram o fato de não ter nenhuma atividade envolvendo amônia e nitrito detectada no reator. Na fase II (60 a 200 dias) do reator, observou-se uma mudança nas populações microbianas, sendo que as populações α - e γ - Proteobacteria permaneceu a mesma, mas ocorreu uma mudança na população de β -Proteobacteria quando a nitrificação começou, relacionada ao fato de a maioria das BOA pertencerem a essa classe analisada. O uso de um sistema de lodo granular aeróbio permitiu suportar as condições salinas das águas residuárias tratadas obtendo completa remoção de matéria orgânica, através dos processos de nitrificação e desnitrificação. A amônia foi, principalmente, oxidada a nitrito. Todavia, o resultado da eficiência do processo de desnitrificação foi limitado a valores entre 20 e 55%.

A fim de identificar as PAOs em detrimento as GAOs, Winkler *et al.* (2011) colheram, durante os experimentos, amostras de lodo granular aeróbio para serem submetidas a análise de FISH. Praticamente todas as células presentes nos grânulos que foram corados pelas sondas de *Accumulibacter* (PAO) ou *Competibacter* (GAO),

indicaram que estes são a maioria da população microbiana formada no lodo. Na primeira fase de 0 a 69 dias (sem distinção de fundo/topo do lodo), a 30°C, foi retirada a amostra no final dessa fase revelando uma maior dominância de GAO, tendo uma menor eficiência de remoção. Para a fase 2 (após 76 dias), metade do lodo foi descartado e o reator foi inoculado com um novo lodo. Nesse momento, a população microbiana era principalmente de PAO, garantindo um ponto de partida igual para competição com a GAO. Isso resultou em um aumento de eficiência instantâneo para remoção de P, mas com diminuição ao longo do tempo. No dia 140 do lodo, verificou-se separadamente a composição da comunidade microbiana. A análise de FISH foi conduzida com estratificação visto que foi observada visualmente a presença das bactérias em ambas as fases. Os resultados de FISH revelaram que o lodo superior continha consideravelmente mais GAOs em detrimento as PAOs que estavam no lodo de fundo, indicando uma segregação entre as partes do reator por esses microrganismos. Com base nisso, a terceira fase (145 dias a 235 dias) foi iniciada, onde o lodo superior foi removido para que favorecesse as PAOs, tendo um aumento na remoção de fósforo para 100%. A utilização de FISH foi necessária para ratificar o aumento expressivo da população de PAO. Por fim, a quarta fase (235 dias a 282 dias) foi performada para mostrar a segregação da composição da comunidade presente, de modo a observar o efeito controlando a altura do lodo a partir de um ponto específico do reator. Nesta fase, removeu-se o lodo da parte inferior, caindo também a eficiência para 36% e as populações microbianas no reator foram dominadas por GAOs.

Dessa forma, a técnica de FISH mostrou-se importante para identificação de um grupo microbiano comparado com o outro de modo a aumentar a eficiência e identificar as características a serem melhoradas nos reatores. Outro ponto é a possibilidade de novas linhagens existentes e possibilidade de novas descobertas.

4. Metodologia

A abordagem da pesquisa teve o foco na análise da comunidade microbiana presente em reatores biológicos para o tratamento de efluentes através da técnica FISH, no Laboratório de Controle de Poluição das Águas (LABPOL/UFRJ). O passo a passo pode ser exemplificado pelo fluxograma da Figura 11. A frequência das análises variou em função cada reator. O tempo entre o preparo das lâminas e a análise das imagens corresponde, em média, a uma semana, demonstrando a rapidez da técnica para diversas aplicações.



Figura 11: Etapas realizadas para hibridização in situ por fluorescência

4.1 Técnica de FISH

Amostras provenientes de dois tipos de reatores: lodo granular aeróbio e MBBR operado exclusivamente para nitrificação foram utilizadas para análise de FISH. Primeiramente, as amostras foram transferidas para um *ependorf* retirando o sobrenadante e macerando a biomassa delicadamente para que não houvesse perda. Posteriormente, a amostra foi centrifugada por 2 minutos a 1400 RPM com adição de tampão fosfato salino 1x em pH 7,2 (PBS). A amostra foi ressuspendida e o procedimento repetido por 3 vezes. Paraformaldeído 4% (v/v) foi adicionado à amostra, seguido de homogeneização e posterior armazenamento em geladeira por 2 horas. Após isso, lavou-se a amostra por mais 3 vezes com PBS 1x. Após todo procedimento, as amostras foram armazenadas em partes iguais de PBS:etanol (98%) a uma temperatura de -20°C até sua utilização.

Para a montagem das lâminas, foi preparada uma solução para microbiológica para fixar a amostra na lâmina utilizando 100mL de água destilada, 0,1g de gelatina microbiológica e 0,01g de $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2$ em uma placa de agitação com aquecimento até sua dissolução. As lâminas foram levadas para estufa até a secagem total a 48°C . Após a secagem, para a confirmação da adesão da biomassa à lâmina, a mesma foi analisada em microscópio óptico. A Figura 12 ilustra o passo a passo do

procedimento, desde o armazenamento da amostra, a lâmina utilizada e a observação do biofilme aderido à lâmina.

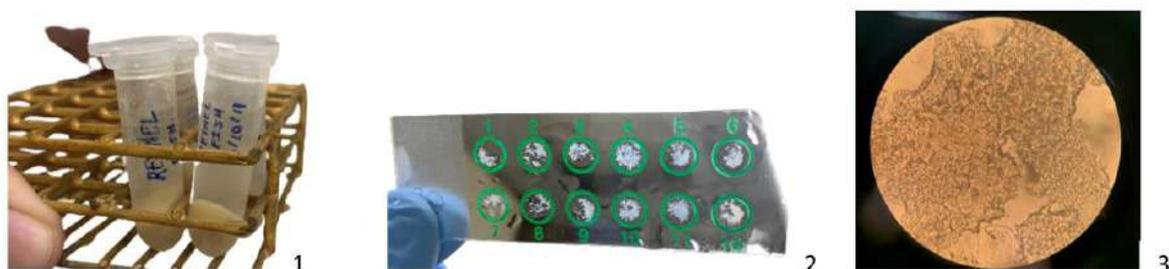


Figura 12: (1) Armazenamento da amostra; (2) Preparo da Lâmina; (3) Verificação no microscópio do biofilme presente

Triplicatas foram realizadas para cada amostra, sendo distribuída em uma lâmina divididas em poços de tamanhos iguais contendo $0,2 \mu\text{L}$. Após a secagem, diferentes concentrações de álcool (50%, 70%, 98%) foram utilizadas para desidratação das amostras. Em seguida, preparou-se o tampão de hibridização, contendo NaCl 5 M, Na₂EDTA 0.5 M, Tris/HCl 1 M, *sodium dodecyl sulfate* (SDS) 10% (v/v) foi misturado com $1 \mu\text{L}$ de sonda. Duas marcações foram utilizadas, verde-fluorescente Alexa Fluor 488 e vermelho-fluorescente Alexa Fluor 594 de modo a identificar os microrganismos quando houvesse a incidência do laser. As sequências utilizadas com os microrganismos alvos estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4: Sondas oligonucleotídicas utilizadas e grupo microbiano alvo

Sonda	Sequência 5'-3'	Grupo Alvo	Mistura	Referência
EUB 338 I	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	Maioria das bactérias		Amann <i>et al.</i> (1990)
EUB 338 II	GCAGCCACCCGTAGGTGT	<i>Planctomycetes</i>	EUBmix	Daims <i>et al.</i> (1999)
EUB 338 III	GCTGCCACCCGTAGGTGT	Verrucomicrobiales		Daims <i>et al.</i> (1999)
PAO 462	CCGTCATCTACWCAGGGTATTAAC	<i>Accumulibacter</i>		Crocetti <i>et al.</i> (2000)
PAO 651	CCCTCTGCCAAACTCCAG	<i>Accumulibacter</i>	PAOmix	Crocetti <i>et al.</i> (2000)
PAO 846	GTTAGCTACGGACTAAAAGG	<i>Accumulibacter</i>		Crocetti <i>et al.</i> (2000)
GAO Q431	TCCCCGCCTAAAGGGCTT	<i>Candidatus</i>		Crocetti <i>et al.</i> (2002)
GAO Q989	TTCCCCGGATGTCAAGGC	<i>Competibacter phosphatis</i>	GAOmix	Crocetti <i>et al.</i> (2002)
Neu 653	CCCCTCTGCTGCACTCTA	Maioria halofílicos e halotolerantes <i>Nitrosomonas spp.</i>		Wagner <i>et al.</i> (1995)
Nse 1472	ACCCAGTCATGACCCCC	<i>Nitrosomonas</i>		Mobarry <i>et al.</i> (1996)
Nso 1225	CGCCATTGTATTACGTGTGA	Oxidadores de amônia β -proteobacteria		Mobarry <i>et al.</i> (1996)
Nmv	TCCTCAGAGACTACGCGG	<i>Nitrosococcus mobilis</i> (<i>Nitrosomonas</i>) lineage	AOBmix	Pommerening-Roser <i>et al.</i> (1996)
Nso 190	CGATCCCCTGCTTTTCTCC	Oxidadores de amônia β -proteobacteria		Mobarry <i>et al.</i> (1996)
Nit 1035	CCTGTCTCCATGCTCCG	<i>Nitrobacter spp</i>		Wagner <i>et al.</i> (1996)
Ntspa 662	GGAATTCCGCGCTCCTCT	Gênero <i>Nitrospira</i>	NOBmix	Daims <i>et al.</i> (2001)

A hibridização foi realizada por 16 horas, após a adição das sondas com os marcadores, em uma câmara escura a uma temperatura de 46°C contendo o tampão de hibridização para permanecer em atmosfera saturada. Após isso, a lâmina foi

mergulhada no tampão de lavagem (NaCl 5 M, Na₂EDTA 0.5 M, Tris/HCl 1 M, *sodium dodecyl sulfate* (SDS) 10% (v/v) para retirar o excesso de sonda (não hibridizada). Finalmente, a lâmina foi lavada em água destilada e seca. Esse procedimento fez uso de Vectashield com DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) para manter a fluorescência após a finalização da hibridização, com posterior armazenamento a -20°C. Para análise e visualização da hibridização foi utilizado microscópio confocal a laser LSM 710, Carl Zeiss, realizado no Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem (CENABIO/UFRJ). As biomassas analisadas foram retiradas do reator em diferentes condições de operação e as análises foram realizadas em triplicata.

Para cada amostra, seis imagens eram obtidas, totalizando 18 imagens em cada lâmina. As imagens foram obtidas através do *Software Black Zeiss*, em formato *czí*, e exportada para o programa Python Jupyter (mostrado no Apêndice I) para evitar a perda de informação. Algumas premissas foram adotadas para quantificação:

1. O total bacteriano presente era representado pela sonda EUBmix;
2. O pixel luminoso era equivalente ao grupo microbiano hibridizado;
3. Aceitável a presença de ruídos por parte do microscópio;
4. Aplicação de filtros para minimização de ruídos;

A quantificação foi realizada para cada sonda específica em detrimento ao total bacteriano presente. Junto disso, a quantidade de laser que incidiu sobre a lâmina permanecia a mesma para manter a média de ruído presente homogênea.

4.2 Reatores utilizados

4.2.1 Reator de leito móvel com biofilme (MBBR)

A comunidade microbiana presente em dois reatores de leito móvel com biofilme (MBBR) realizando, exclusivamente, nitrificação, foi analisada. O reator denominado R1 era preenchido com suporte não poroso *Anox Kaldnes K1*, com uma área superficial de $500\text{m}^2/\text{m}^3$, e o reator R2, com suporte Poroso *Mutag Biochip*, com uma área superficial de $3000\text{m}^2/\text{m}^3$. O tempo de retenção hidráulica (TRH) de ambos reatores foi de 3 horas. Os sistemas foram alimentados com efluente sintético contendo alta carga amoniacal, variando entre 14 a $22\text{g NH}_4^+ - \text{N}/(\text{m}^2.\text{dia})$. A Figura 13 apresenta os reatores analisados.

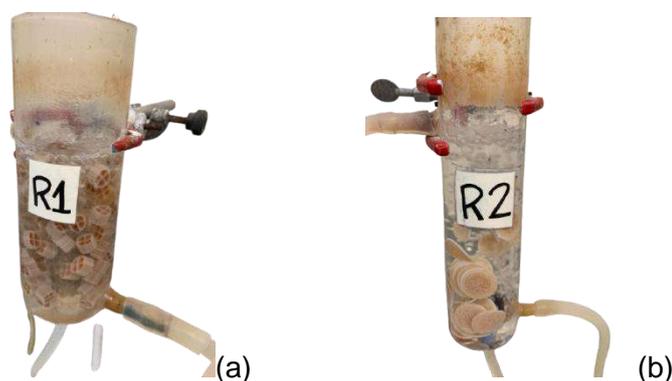


Figura 13: Reator (a) R1 Suporte não poroso *AnoxKaldnes K1*; (b) R2 Suporte Poroso *Mutag Biochip*.
Fonte: Autoria própria

A biomassa retirada para realizar a avaliação pela técnica de FISH não foi similar visto a diferença entre os suportes utilizados. No R1, as peças tinham uma biomassa densa e de fácil acesso, permitindo a sua retirada para a realização da hibridização. Já no R2, por mais que utilizasse técnicas de ultrassom, por exemplo, não foi possível retirar a biomassa do suporte e a biomassa recolhida para análise foi a que estava presente de forma livre no reator, o que pode influenciar a quantidade de microrganismos presentes da comunidade microbiana, não refletindo, necessariamente, o existente no suporte.

As amostras foram recolhidas mensalmente mediante a troca da carga aplicada no reator, avaliando como seria o efeito das bactérias presentes, com ênfase nas bactérias oxidadoras de amônio (BOA), bactérias oxidadoras de nitrito (BON) e total de bactérias presentes. Para a identificação de cada grupo de microrganismos

uma coloração foi utilizada. No caso das bactérias oxidadoras de amônio, como *Nitrosomonas oligotropha*, *N. europaea*, *Nitrosococcus mobilis* e *Nitrosomonas communis* e *Nitrosospira spp*, a sonda apresentava fluorescência vermelha. Já para as bactérias oxidadoras de nitrito, como as do gênero *Nitrosospira* e *Nitrobacter*, sondas com fluorescência verde foram utilizadas. E para a identificação da maioria das bactérias, *Planctomycetes* e *Verrucomicrobiales* utilizou-se a sonda EUBmix e DAPI para todo DNA presente.

A operação dos reatores está descrita na Tabela 5, que apresenta o aumento gradual da carga amoniaca aplicada e o comportamento do sistema em termos de carga removida e cargas de nitrito e nitrato efluente.

Tabela 5: Resultados médios do monitoramento físico-químico para os reatores R1 e R2 (VALÉRIO, DIAS, et al., 2020)

Regime	Carga aplicada (gNH ₄ ⁺ -N/(m ² .d))	Reatores							
		R1				R2			
		Carga removida (gNH ₄ ⁺ -N/(m ² .d))	Carga efluente (gNO ₂ ⁻ -N/(m ² .d))	Carga efluente (gNO ₃ ⁻ -N/(m ² .d))	SAT (g/m ²)	Carga removida (gNH ₄ ⁺ -N/(m ² .d))	Carga efluente (gNO ₂ ⁻ -N/(m ² .d))	Carga efluente (gNO ₃ ⁻ -N/(m ² .d))	SAT (g/m ²)
1	9,12	4,27	2,07	1,48	17,8	3,7	2,76	0,51	4,1
2	17,86	5,43	3,16	1,14	25	4,84	2,75	0,62	3,6
3	21,45	8,24	4,48	1,53	21,2	6,87	2,46	0,85	3,3

*SAT: Sólidos aderidos totais

4.2.2 Lodo Granular Aeróbio (LGA)

As amostras dos grânulos presentes do reator foram removidas durante a fase aerada, para garantir a homogeneidade e a presença de toda comunidade microbiana. O biorreator de LGA foi alimentado com um meio sintético de forma a garantir condições mais controladas, mantendo as características do efluente conforme desejado. As concentrações de afluentes foram de : 400 mg/L de DQO, 50 mg NH₄⁺-N/L, 16 mg PO₄³⁻ - P/L. Levando em consideração a composição do afluente e o TRH a que o LGA foi submetido, as cargas de DQO, nitrogênio e fósforo aplicadas foram de 2,04 kgCOD/(m³d), 0,26 kgNH₄⁺-N/(m³d) e 0,082 kg PO₄³⁻-P/(m³d), respectivamente (CASTELLANOS, DIAS, et al., 2021). A Figura 14 exemplifica o sistema utilizado para operação do reator, sendo as amostras extraídas o reator LGA.

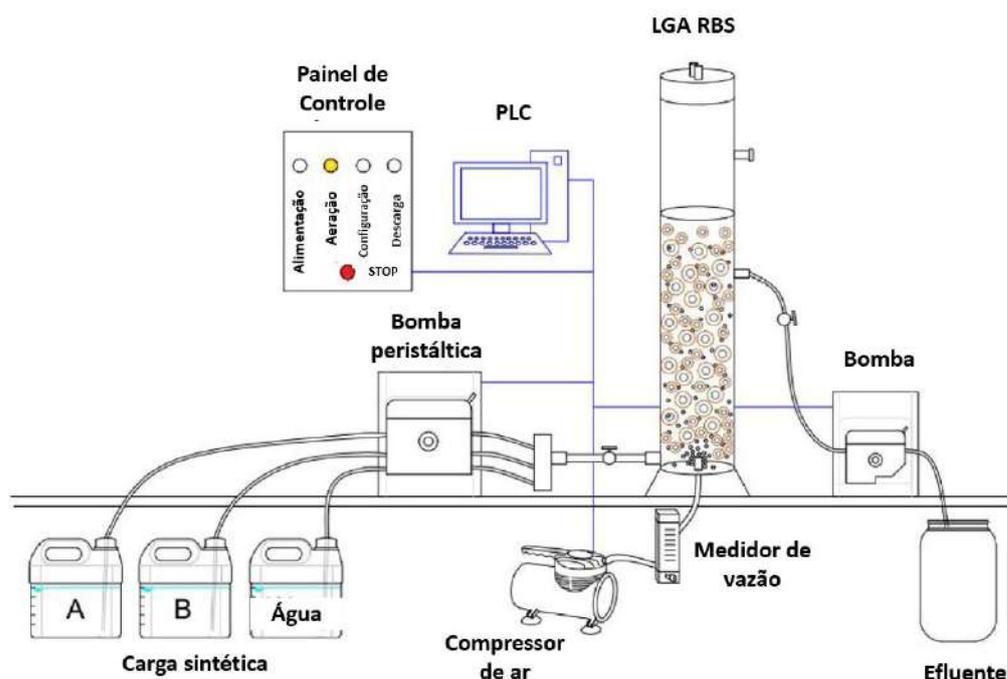


Figura 14: Reator utilizado para o Lodo granular aeróbico (Fonte: Adaptado de Castellanos, et al., 2021)

As condições experimentais do reator estão descritas na Tabela 6, que mostra a idade do lodo e a duração total de cada regime. Os resultados do reator mostraram que a operação sem o controle da idade do lodo, regime 1, alcançou elevada remoção de DQO e amônia, mas houve baixa remoção de fosfato, abaixo de 15%. No regime 2, a quantidade de P liberado por DQO removida e as taxas específicas de absorção de fosfato atingiram valores máximos (0,14 mg P/mgDQO e 11,4 mgPO₄³⁻-P/(gSSV h), respectivamente), enquanto a remoção de DQO, amônio e nitrogênio total atingiu 93%, 97% e 58%, respectivamente.

Tabela 6: Condições experimentais do reator batelada sequenciador de lodo granular aeróbico (LGA)

Condições experimentais	Idade do Lodo (dias)	Duração total (dias)
Regime 1	Não controlada	49
Regime 2	15	128

5. Resultados

A técnica de FISH foi realizada em dois tipos de biorreatores, LGA e MBBR, sendo uma técnica de biologia molecular baseada nas sondas oligonucleotídicas. A sonda de DNA, através da incorporação de um precursor de nucleotídeo mapeado com fluorescência, pode ser marcada diretamente ou indiretamente pela incorporação de um nucleotídeo que contém uma molécula repórter (biotina ou digoxigenina). A molécula repórter irá ligar-se por afinidade a uma molécula marcada por fluorescência depois de ser incorporada ao DNA, e sua especificidade irá permitir a identificação e detecção em qualquer nível taxonômico requerido (DEZOTTI, SANT'ANNA JR. e BASSIN, 2011).

5.1 Reator de leito móvel com biofilme (MBBR)

No reator de MBBR, foram identificados os grupos microbianos BOA e BON, frente as diferentes cargas aplicadas e os suportes utilizados. Com as informações sobre os microrganismos e suas quantidades presentes no sistema foi possível avaliar as remoções de nitrogênio obtidas.

A Figura 15 permite observar a diferença de sondas utilizadas na qual a cor vermelha estava associada a sonda BOA, verde, a EUBmix, caracterizando todas as bactérias e azul associado a DAPI, que identifica todo DNA presente na amostra. As lâminas contendo a biomassa hibridizada foram armazenadas em locais refrigerados, sem luminosidade até a leitura no microscópio. Além disso, foram utilizadas para leitura apenas uma vez, pois o laser presente no microscópio, queima a amostra depois da primeira visualização. As cores foram determinadas pelos marcadores Alexa 488 e 594, distinguindo o grupo microbiano alvo.

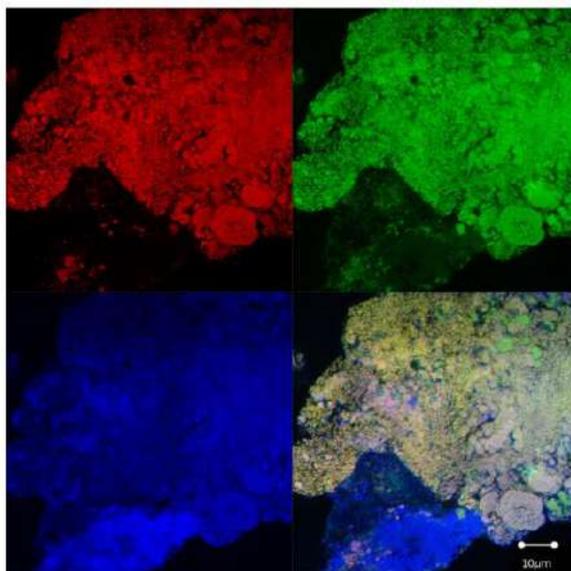


Figura 15: Imagem obtida para sonda BOA do reator R1 MBBR

Na Figura 16 a cor vermelha estava associada a sonda EUBmix e a cor verde, a sonda NOBmix. A cor verde tende a ser mais difícil de visualizar em detrimento a vermelha. Já a azul tem interferência do fundo que é preto, sendo mais fraca por causa do laser incidente utilizado.

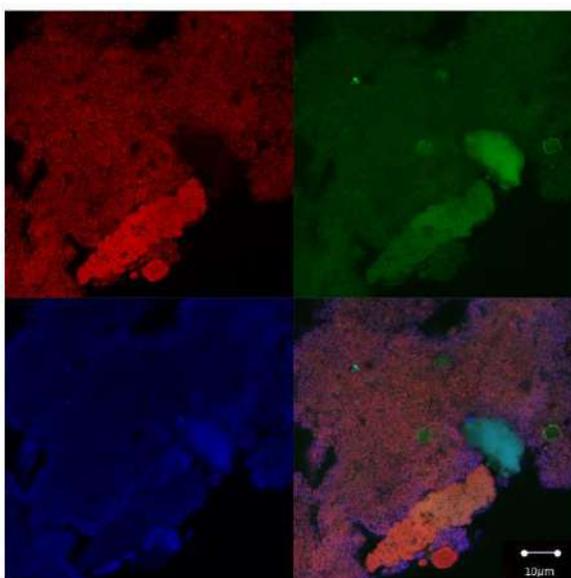


Figura 16: Imagem obtida para sonda BON do reator R1 MBBR

O mesmo foi realizado para o R2, obtendo na Figura 17 (a) os resultados para BOAs e (b) para as BONs. As mesmas sondas foram utilizadas para ambos reatores.

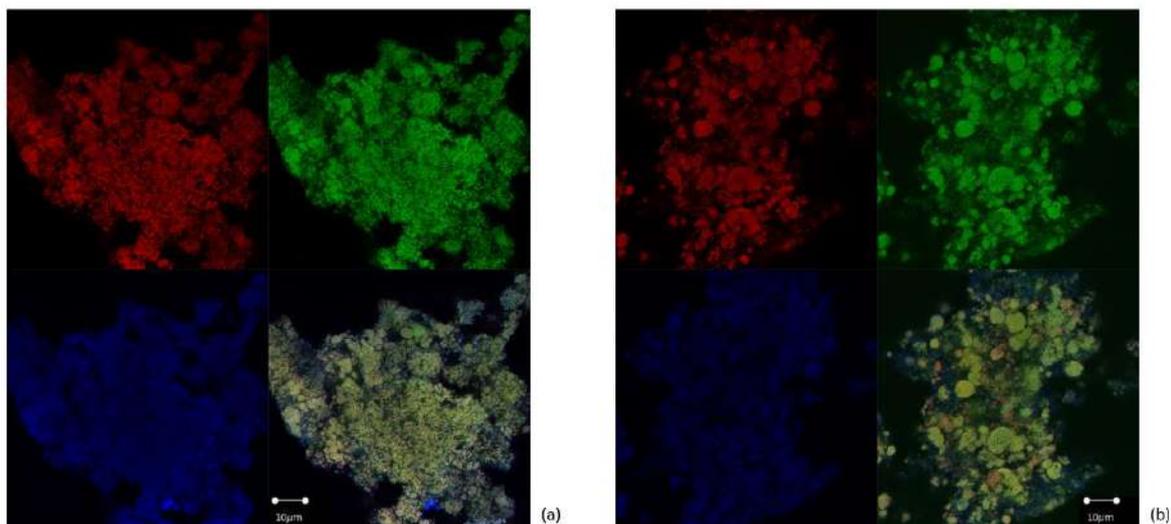


Figura 17: Imagem obtida para sonda BOA (a) e BON (b) do reator R2 MBBR

Após obtenção das imagens, as mesmas foram exportadas para o programa Python no mesmo formato, evitando perda de informação. A quantificação dos microrganismos baseou-se em utilizar a quantidade de bactéria total em detrimento as sondas específicas (CASTELLANOS, DIAS, *et al.*, 2021). Então, foi possível obter a média da quantidade das bactérias de interesse presentes na amostra.

A partir dos resultados obtidos foi possível fazer uma análise da presença de bactérias oxidadoras de nitrito em relação as bactérias oxidadoras de amônia em cada reator. A Figura 18 apresenta os resultados obtidos durante os 3 regimes dos reatores. Apesar dos dois reatores receberem a mesma carga de nitrogênio amoniacal e estarem nas mesmas condições experimentais, pode-se observar que ambos os reatores apresentaram maior presença de BOA em detrimentos das BON visto que o tipo de suporte era diferente e poderia ter um resultado diferente pela dificuldade de extração da biomassa. Uma das possibilidades é a nitrificação parcial bem-sucedida, interrompendo a etapa de nitrificação no estágio de nitrito, promovendo o crescimento das BOA e inibição da atividade das BON (SOLIMAN e ELDYASTI, 2018).

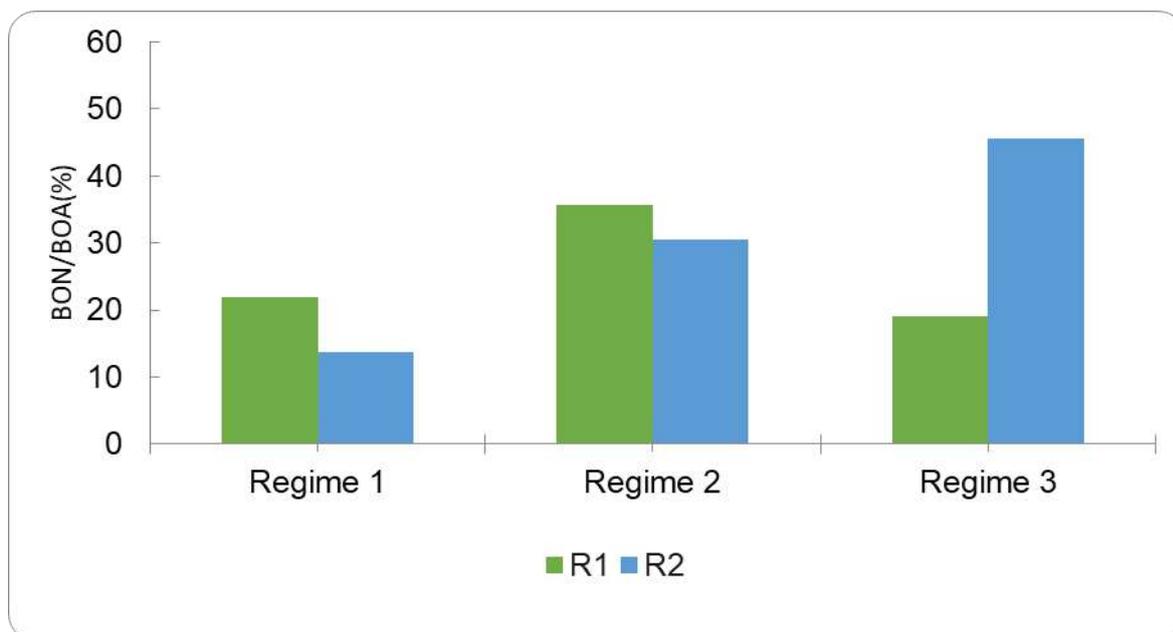


Figura 18: Percentual de BON em detrimento a BOA nos reatores nitrificantes em cada regime do estudo

Além disso, no regime 1 e 2 o percentual de BON nos dois reatores foi muito próxima, com o reator R1 um pouco superior. À medida que a carga nitrogenada aplicada aos reatores foi sendo aumentada em cada regime, observou-se um aumento da presença de BON no reator 2 até ultrapassar o reator 1, no regime 3. O crescimento do biofilme é um dos fatores responsáveis pelas diferentes proporções dos grupos microbianos entre os reatores.

No caso dos suportes *Mutag Biochip* (R2), o biofilme pode se desenvolver internamente e fixado aos poros, garantindo maior resistência aos agentes externos, o que o torna protegido quando exposto a condições não favoráveis, como no caso do regime 3, quando a quantidade de amônia presente no reator pode ser inibitória para os organismos oxidadoras de nitrito (POURBAVARSAAD *et al.*, 2022). Por outro lado, o biofilme mais fino formado nesse suporte permite uma maior assimilação do oxigênio dissolvido pelas BON, favorecendo seu desenvolvimento (VALÉRIO *et al.*, 2020).

O suporte *Anox Kaldnes K1* (R1) teve o crescimento de forma externa aos poros, acarretando na presença de biofilmes mais espessos, com regiões mais internas, que apresentavam um menor acesso ao oxigênio dissolvido no meio e com as regiões externas sujeitas a agentes inibidores (TORRESI *et al.*, 2017; VALÉRIO *et al.*, 2020). Observa-se também a maior concentração de BOA em relação as BONs, sendo que a velocidade de crescimento das bactérias nitrificantes é geralmente baixa,

podendo sofrer limitações pela concentração do oxigênio dissolvido e da temperatura no processo de nitrificação. (ZOPPAS, BERNARDES e MENEGUZZI, 2016)

As análises microbiológicas corroboram com os resultados das análises físico químicas dos reatores (Tabela 2), que mostraram que a remoção da amônia ocorreu pela nitrificação, apresentando um acúmulo de nitrito em ambos reatores. Isso mostra que a etapa de nitrificação, realizada pelas BOA, ocorreu, com conseqüente produção de nitrito, entretanto, não existia quantidade suficiente de BON para converter todo nitrito a nitrato, na etapa de nitratação, e, por isso, houve acúmulo nos dois reatores.

Com o crescente aumento das cargas amoniacais aplicadas, observou-se no R1, durante o regime 2, o aumento na quantidade de microrganismos, visto que havia mais substrato, mas também, uma intensificação no acúmulo de nitrito. Enquanto no regime 3, a diminuição da quantidade de BON favoreceu, ainda mais, o maior acúmulo de nitrito no sistema. Anthonisen *et al.* (1976) cita que concentrações elevadas de substrato podem inibir o crescimento das BON, mais sensíveis e capazes de converter o nitrito a nitrato, justificando o comportamento observado neste último regime para o reator R1.

No reator 2, o aumento da carga de nitrogênio amoniacal aplicada não proporcionou o aumento do nitrito acumulado, apresentando concentração similar nos 3 regimes. Além disso, observou-se um perfil distinto do reator R1 com relação a proporção BON/BOA, no qual houve aumento da quantidade de BON quando a carga amoniacal foi aumentada, o que justifica o acúmulo de nitrito a níveis constantes no sistema.

5.2 Lodo Granular Aeróbio (LGA)

Nas amostras de lodo granular, o enfoque foi rastrear a dinâmica de grupos funcionais microbianos importantes presentes (PAO, GAO, BOA e BON) no reator de LGA em condições operacionais diferentes. Sondas específicas para *Accumulibacter* foram usadas para direcionar PAOs, já que este gênero particular é considerado o principal contribuinte para a remoção de P em sistemas EBPR (Crocetti et al., 2000). Por outro lado, para conseguir identificar os GAOs, foram utilizadas sondas direcionadas de *Competibacter*, sendo importante na avaliação como competidora de PAOs em estudos de sistemas biológicos de efluentes.

A Figura 19 demonstra como os resultados foram extraídos do Python Jupyter. O gráfico com a coloração permite visualizar quais pixels são correspondentes visto que para ser uma bactéria BOA, BON, PAO ou GAO, precisa conter no EUBmix com todas as bactérias presentes na amostra, visto que o programa utiliza o grupo específico em detrimento ao total presente (EUBmix).

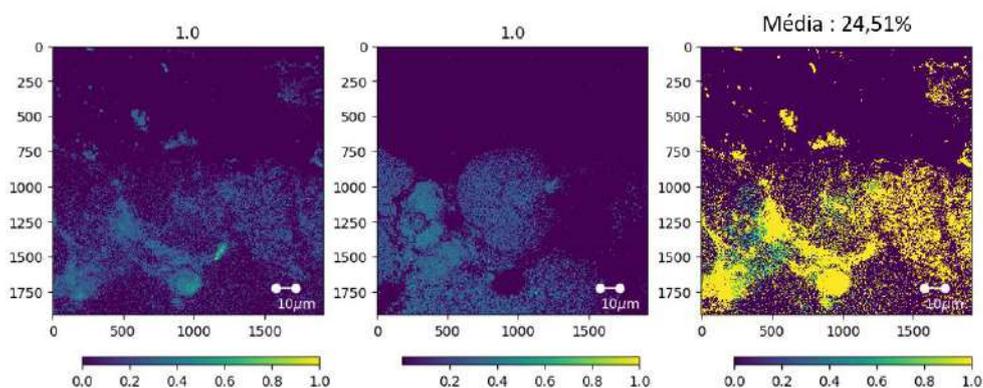


Figura 19: Resultado obtido no Python Jupyter para o Lodo Granular Aeróbio

A Figura 20 compila os resultados obtidos para monitoramento da comunidade microbiana e rastreamento de grupos presentes durante os dois regimes de operação do LGA.

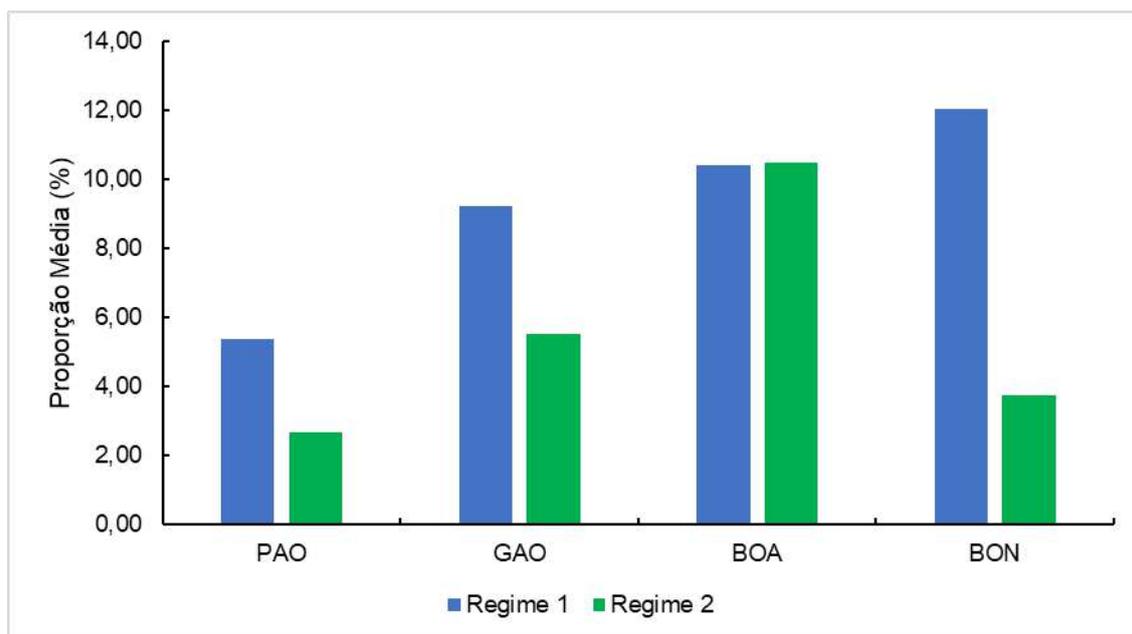


Figura 20: Percentual de PAO, GAO, BOA e BON no LGA nos regimes analisados

Observou-se que a porcentagem de PAOs, relacionados a *Accumulibacter*, dentro do reator na regime 1 foi de 5,5%, enquanto para a regime 2 foi de 2,7%. Era de se esperar que na regime 2 as PAOs tivessem uma maior contribuição uma vez que o desempenho do sistema para a remoção de fósforo nesse regime foi maior. No entanto, este não foi o caso. Deve-se ressaltar que as sondas usadas não tinham como alvo toda a comunidade de PAOs, mas apenas organismos relacionados a *Accumulibacter*. Portanto, outros organismos capazes de realizar as conversões EBPR típicas (NIELSEN et al., 2010, NGUYEN et al., 2011, MIELCZAREK et al., 2013), podem estar presentes na biomassa granular, mas não foram detectados pelas sondas utilizadas neste estudo. Além disso, também foi observado que a proporção de GAOs, relacionados a *Competibacter*, dentro da comunidade bacteriana geral também diminuiu com a redução do tempo de retenção celular, de 9,2% (regime 1) para 5,5% (regime 2). A diminuição desses organismos é favorável para que seja alcançada uma remoção estável de fósforo, já que eles competem com as PAOs pelo substrato, mas não acumulam fosfato, sendo considerados organismos indesejáveis em sistemas EBPR (NIELSEN et al., 2010, MIELCZAREK et al., 2013).

Quando observado no programa Python, percebe-se uma grande camada que não ficou fluorescente, aumentando o ruído das análises e possíveis erros associados. Ao aplicar os filtros para diminuir essa interferência, também há perda daqueles grupos minoritários presentes que não estavam agrupados, ou até mesmo,

o laser remanescente do microscópio. As sondas para hibridização de todas as bactérias precisam ainda serem divididas nos demais grupos, tendo baixas porcentagens em cada análise, novamente, aumentando o erro pela incapacidade de concentrar apenas um grupo microbiano. A Figura 21 representa as imagens obtidas no microscópio confocal a laser para as PAOs e GAOs.

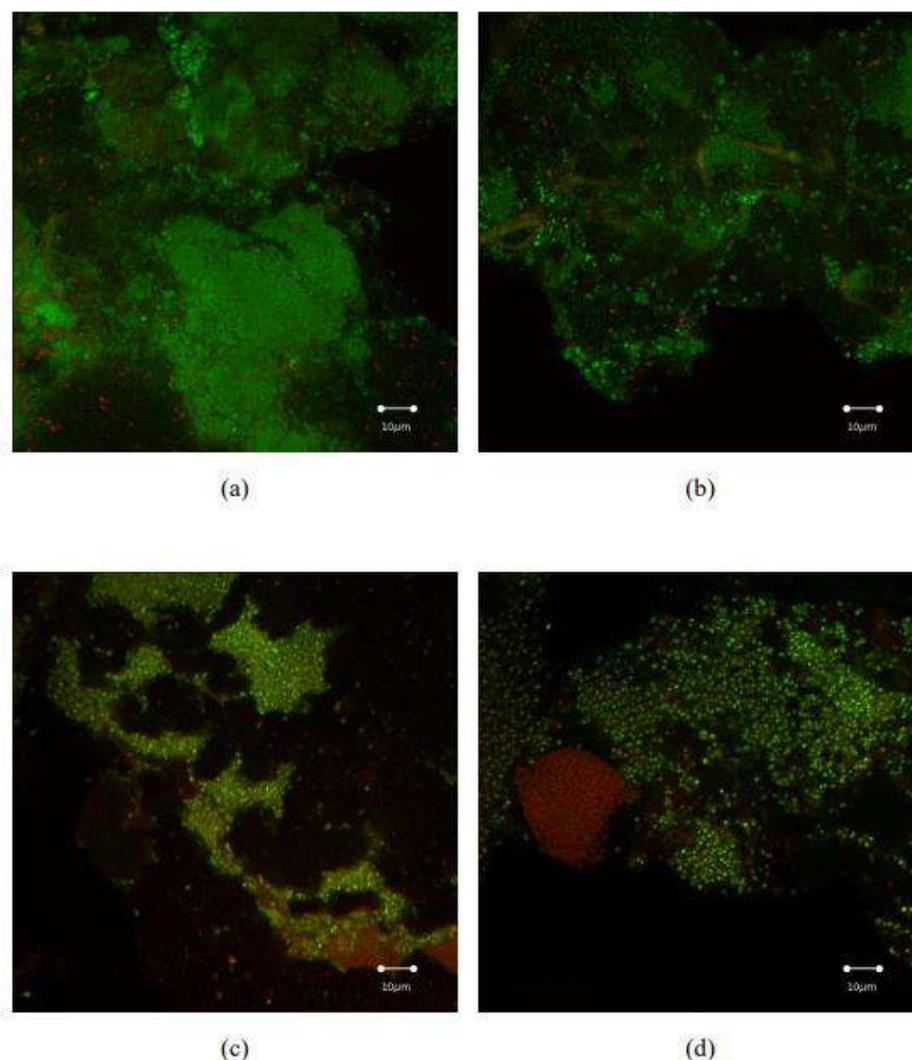


Figura 21: Imagens microscópicas FISH de amostras do LGA mostrando as comunidades bacterianas com os marcadores fluorescente: EUBmix (verde) em (a) e (b); EUBmix (vermelho) em (c) e (d); vermelho: a) PAOs (regime 1) e b) PAOs (regime 2); verde: c) GAOs (regime 1)

Por outro lado, em relação à comunidade BOA no reator, observou-se que a mesma se manteve constante e próxima a 10% para os dois regimes analisados. Além disso, no regime 1 observou-se que a quantidade de BON superou a de BOA, chegando a 12%, mas apresentou uma diminuição drástica no regime 2, atingindo

3,8%. Normalmente, a quantidade de BOA é maior que a de BON, pois o produto do primeiro (nitrito) é o substrato para o segundo. Além disso, BOA obtém mais energia por mol de amônio oxidado do que o BON por meio da oxidação do nitrito, apresentando um maior crescimento (FREITAG *et al.*, 1987). Entretanto, essa desproporção já foi relatada para LGA (WINKLER *et al.*, 2012) que consistem em aglomerados compostos por multicamadas de organismos onde ocorrem muitas conversões simultâneas. Dessa forma, as BONs podem ter acesso não só ao nitrito resultante da oxidação autotrófica de amônia por BOA, mas também ao nitrito resultante da redução do nitrato pelas bactérias desnitrificantes. A Figura 22 ilustra os resultados obtidos para as BOAs e BONs através da técnica de FISH.

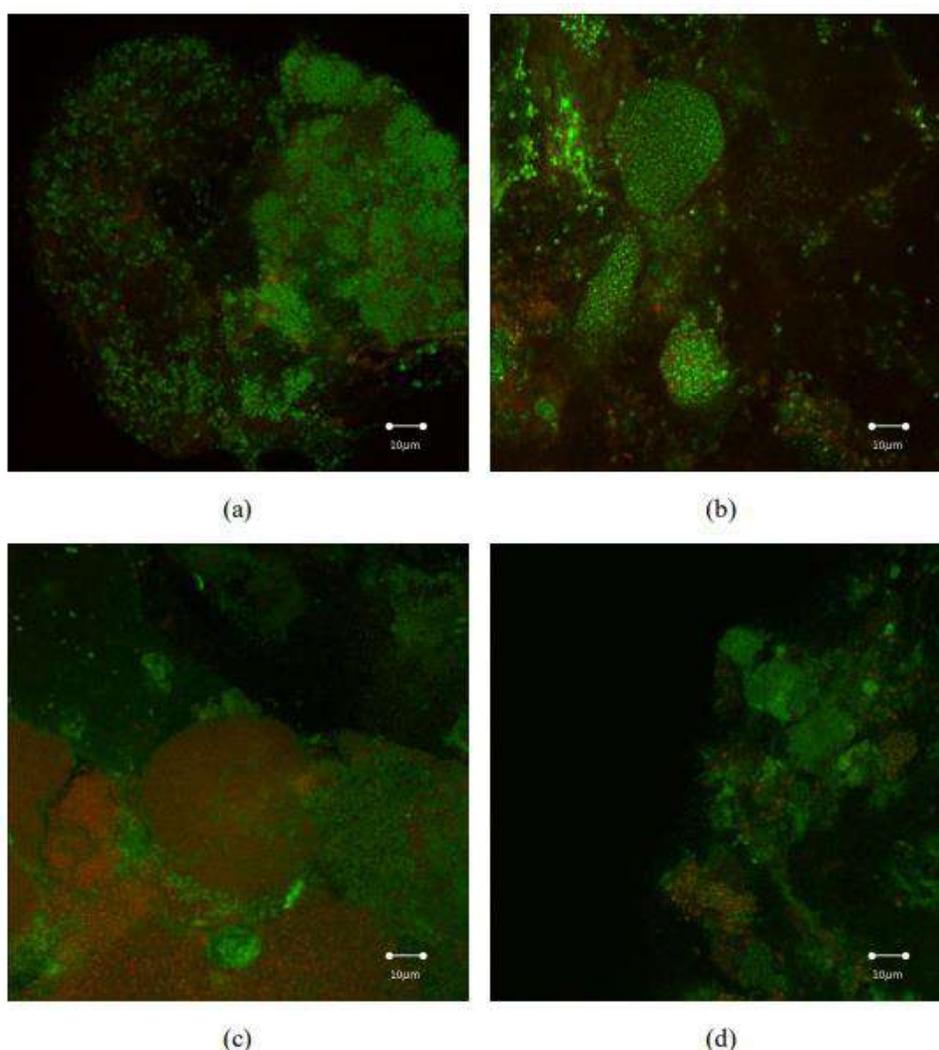


Figura 22: Imagens microscópicas FISH de amostras do LGA mostrando as comunidades bacterianas com os marcadores fluorescente: EUBmix (verde) em (a) e (b); EUBmix (vermelho) em (c) e (d); vermelho: a) BOAs (regime 1) e b) BOAs (regime 2); verde: c) BONs (regime 1)

6. Conclusão

A técnica de FISH permitiu o estudo da diversidade microbiana nos sistemas MBBR e LGA em diferentes regimes. Observou-se que métodos integrados precisam ser aprimorados para que não perca informação devido à ruídos presentes e dificuldade de concentração da amostra, por serem um aglomerado diverso e com características funcionais complexas.

No reator de MBBR, a porcentagem de BOA foi maior que a de BON em todos os regimes analisados. Diferenciando o tipo de *biomedia* utilizado, o tipo *Mutag Biochip* permitiu o crescimento dentro do suporte proporcionando maior proteção contra fatores externos e maior acesso ao oxigênio dissolvido, o que não foi observado no *Anox Kaldnes K1*. Observando pelos regimes, teve um aumento das cargas amoniacais que permitiram o aumento dos microrganismos do R1 no regime 2, pela maior presença de substrato. Em contrapartida, houve também maior acúmulo de nitrito, que aumentou ainda mais no regime 3, com a diminuição da BON. Já no R2, esse aumento da carga aplicada não houve um aumento no nitrito acumulado, mantendo-se parecido nos 3 regimes. A comunidade microbiana presente teve um perfil distinto em cada reator, tendo um aumento significativo no R2 no último regime, justificando a constância de acúmulo de nitrito mesmo com altas cargas aplicadas.

No reator de LGA, a falta de sondas para outros tipos de microrganismos no PAOmix deixou de mapear outros grupos responsáveis pela remoção de fósforo, visto que o reator tinha a sua eficiência elevada. Por outro lado, foi possível identificar os microrganismos indesejados no sistema (GAO) e, quando o tempo de retenção celular foi menor, houve decréscimo na sua porcentagem. Os resultados indicam que tempos de retenção celular menor pode aumentar a eficiência de remoção de fósforo do sistema. Já em relação a quantidade de BOA/BON, pela presença de aglomerados compostos por multicamadas desses microrganismos, as BONs podem ter acesso tanto do nitrito proveniente da oxidação autotrófica de amônia pelas BOAs quanto pela redução de nitrato por meio das bactérias desnitrificantes.

Através da utilização da ciência da computação, com scripts no Python, foi possível, de modo gratuito e sem utilização de grande memória, quantificar as comunidades microbianas mediante a luminosidade do pixel presente. Por mais que o conhecimento da estrutura dos grânulos e lodos estejam mais avançadas, a busca

por novas taxonomias permite avaliar outras particularidades e aprimorar a eficiência dos reatores.

Espera-se que os próximos trabalhos consigam identificar outros parâmetros e melhorias para produção de novas sondas e impedir que a amostra seja perdida durante as lavagens e hibridizações.

7. Referências

ABZAZOU, T, ARAUJO, R M, AUSET, M, SALVADÓ, H. Science of The Total Environment. **Tracking and quantification of nitrifying bacteria in biofilm and mixed liquor of a partial nitrification MBBR pilot plant using fluorescence in situ hybridization.** 1115–1123, 2016.

ALMSTRAND, R, DAIMS, H, PERSSON, F, SÖRENSON, F, HERMANSSON, M. American Society for Microbiology. **New Methods for Analysis of Spatial Distribution and Coaggregation of Microbial Populations in Complex Biofilms,** 5978 - 5987, 2013.

AMANN, R I, BINDER, B J, OLSON, R J, CHISHOLM, S W, STAHL, D A. Applied and Environmental Microbiology. **Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations.** 1919-1925, 1990B.

ANTHONISEN, A C, LOEHR, R C, PRAKASAM, T B S, SRINATH, E G. J. Water Pollut. Control. **Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid.** 835–852, 1976.

BARAK, Y; TAL, Y; VAN RIJN, J. **Light-mediated nitrite accumulation during denitrification by Pseudomonas sp. Strain JR12,** 813-7, 1998.

BARNARD, J L. **A Review of Biological Phosphorus Removal in the Activated Sludge Process,** 1976.

BASSIN, J P. **Remoção Biológica de Nutrientes em Sistemas Compactos e Estudo da Diversidade Microbiana por Técnicas De Biologia Molecular.** Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, p. 209. 2012.

BASSIN, J P, DIAS, I N, CAO, S M S, SENRA, E, LARANJEIRA, Y, DEZOTTI, M. Process Safety and Environmental Protection. **Effect of increasing organic loading rates on the performance of moving-bed biofilm reactors filled with different**

support media: Assessing the activity of suspended and attached biomass fractions, 131-141, 2016.

BASSIN, J P.; DEZOTTI, M. Processos e Técnicas para o Controle Ambiental de Efluentes Líquidos. **Tratamento primário, secundário e terciário de efluentes**, Rio de Janeiro, 2008.

BISWAS, K; TURNER, S J. MICROBIAL ECOLOGY. **Microbial Community Composition and Dynamics of Moving Bed Biofilm Reactor Systems Treating Municipal Sewage**, 855 - 864, 2012.

CAMPOS, C M. M. et al. Ciência e Agrotecnologia. **Desenvolvimento de reator anaeróbio de mantada de lodo (UASB) no tratamento de efluentes da suinocultura em escala laboratorial**, 140-147, 2006.

CAMPOS, H C. G. **Remoção de fósforo em RBS com lodo granular aeróbio tratando esgoto doméstico**. UFPE. Recife, p. 51. 2019.

CAO, M D. S. S. **Remoção biológica de matéria orgânica e nitrogênio de um efluente industrial em sistema de leito móvel com biofilme de dois estágios**. UFRJ. Rio de Janeiro, p. 140. 2014.

CASTELLANOS, R M. **Simultaneous removal of nutrients and endocrine disrupting chemicals by aerobic granular sludge and advanced oxidation processes**. UFRJ. Rio de Janeiro, p. 160. 2020.

CASTELLANOS, R M, DIAS, J M R, BASSIN, I D, DEZOTTI, M, BASSIN, J P. **Effect of sludge age on aerobic granular sludge: Addressing nutrient removal performance and biomass stability**, Process Safety and Environmental Protection, 212–222, 2021.

CHEN, F, LIU, Y, TAY, J, NING, P. **Operational strategies for nitrogen removal in granular sequencing batch reactor**, Journal of Hazardous Materials, 342-348, 2011.

CHEN, X, ZHANG, Q, ZHU, Y, ZHAO, T. **Response of wastewater treatment performance, microbial composition and functional genes to different C/N ratios**

and carrier types in MBBR inoculated with heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria, *Bioresource Technology*, 336, 2021.

CHERN, J; CHOU, S; SHANG, C. **Effects of impurities on oxygen transfer rates in diffused aeration systems**, *Water Research*, 3041-3048, 2001.

CROCETTI, G R, HUGENHOLTZ P, BOND, P L, SCHULER, A, KELLER, J, JENKIS, D, BLACKALL, L L. **Identification of polyphosphate accumulating organisms and design of 16S rRNA-directed probes for their detection and quantitation**, *Applied and Environmental Microbiology*, 1175-1182, 2000.

CROCETTI, G R, BANFIELD J F, KELLER, J, BOND, P L, BLACKALL, L L. **Glycogen-accumulating organisms in laboratory-scale and full-scale wastewater treatment processes**, 3353-3364, 2002.

DAIMS, H, BRÜHL, A, SCHLEIFER, K H, WAGNER, M. **The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set**, *Systematic and Applied Microbiology*, 434-444, 1999.

DAIMS, H, NIELSEN, P H, NIELSEN, J L, JURETSCHKO, S, WAGNER, M. **Novel Nitrospira-like bacteria as dominant nitrite-oxidizers in biofilms from wastewater treatment plants: diversity and in situ physiology**, *Water Sci. Technol*, 85-90, 2000.

DAIMS, H, NILESEN, J L, NIELSEN, P H, SCHLEIFER, K, WAGNER, **In situ characterization of Nitrospira-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants**, *M. Appl Environ Microbiol*, 5273-84, 2001.

DE KREUK, M K.; HEIJNEN, J J.; VAN LOOSDRECHT, M C. M. **Biotechnology and Bioengineering. Simultaneous COD, Nitrogen, and Phosphate Removal by Aerobic Granular Sludge**, 18 Janeiro 2005. 761-769.

DEZOTTI, M; BASSIN, J P. **Tratamento primário, secundário e terciário de efluentes**.

DEZOTTI, M; SANT'ANNA JR., Geraldo L.; BASSIN, J P. **Processos Biológicos Avançados para o tratamento de efluentes e técnicas de biologia molecular para o estudo da diversidade microbiana**. 1ª. ed.

DINÇER, Ali R.; KARGI, Fikret. Enzyme and Microbial Technology. **Kinetics of sequential nitrification and denitrification processes**, 18 Janeiro 2000. 37-42.

DOMAŃSKA, M, RIEDEL, R , ŁOMOTOWSKI, J, STÁNCYK, E. **Fish method for identification of microbes in wastewater distribution systems**, Environmental Engineering and Protection, 2014.

DUTTA, A; SARKAR, S. WATER POLLUTION. **Sequencing Batch Reactor for Wastewater Treatment: Recent Advances**, 2015.

EHRICH, S, BEHRENS, D, LEBEDEVA, E, LUDWIG, W, BOCK, E. Arch. Microbiol. **A new obligately chemolithoautotrophic, nitrite-oxidizing bacterium, Nitrospira moscoviensis Sp-Nov and its phylogenetic relationship**, 16-23, 1995.

EPA. Wastewater Management Fact Sheet. **Denitrifying Filters** , 2007.

FAO. Water Report. **The wealth of waste: The economics of wastewater use in agriculture**, Rome, 2010.

FERREIRA, A L. T. S. **Remoção biológica simultânea de fósforo e nitrogênio de esgoto sanitário em reatores sequenciais em batelada**. UFPE. [S.l.], p. 164. 2014.

FIGUEROA, M, MOSQUERA-CORRAL, A, CAMPOS, J L, MÉNDEZ. **Treatment of saline wastewater in SBR aerobic granular reactors**, Water Science & Technology. 479-485, 2008.

GERARDI, M H. **Wastewater Bacteria**, 2006.

GRADY JR., C P. L. DAIGGER, G T, LOVE, N G, FILIPE, C D M. **Biological Wastewater Treatment**. 3ª. ed, 2011.

GUIMARÃES, L B. **Caracterização microbiológica do lodo granular na remoção de nutrientes e potencial de recuperação de exopolímeros de efluentes em reatores em bateladas sequenciais.** UFSC. [S.l.], p. 261. 2017.

IZADI, P; IZADI, P; ELDYASTI, A. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology volume. **Design, operation and technology configurations for enhanced biological phosphorus removal (EBPR) process: a review,** 561-593, 2020.

KOOPS, H, PURKHOLD U, POMMERENING-ROSER, A, TIMMERMANN, G, WAGNER, M. **The Lithoautotrophic Ammonia-Oxidizing Bacteria,** The Prokaryotes. New York, 778-811, 2006.

LIU, Y; TAY, J. Biotechnology Advances. **State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment,** 533-563, 2004.

LOURES, A P. S., SOARES, A A, MATOS, A T, CECON, P R, PEREIRA, O G, **Remoção de fósforo em sistema de tratamento de esgoto doméstico, por escoamento superficial,** Engenharia Agrícola e Ambiental, 706-714 , 2004.

MADAN, S; MADAN, R; HUSSAIN, A. Applied Water Science. **Advancement in biological wastewater treatment using hybrid moving bed biofilm reactor (MBBR): a review,** 2022.

METCALF & EDDY. **Wastewater engineering:** treatment, disposal and reuse. 3^a. ed, 1991.

METCALF & EDDY. **Wastewater engineering:** treatment and reuse. 4^a. ed., 2003.

MICHAEL, I, RIZZO, L, MCARDELL, C S, MANAIA, C M, MERLIN, C, SCHWARTZ, T, DARGOT, C, FATTA-KASSINOS, D, **Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: A review.,** Water Res. 957-95, 2013.

MIELCZAREK, A T., NGUYEN, H T T, NIELSEN, J L, NILESEN, P H, **Population dynamics of bacteria involved in enhanced biological phosphorus removal in Danish wastewater treatment plants**, Water Res., 1529–1544, 2013.

MINNESOTA POLLUTION CONTROL AGENCY. **Phosphorus Treatment and Removal Technologies**. [S.l.]. 2006.

MOBARRY, B K., WAGNER M, URBAIN, V, RITTMANN, B E, STAHL, D A. **Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria**, Applied and Environmental Microbiology. 2156-2162, 1996.

NANCHARAI AH, Y V.; REDDY, G K. K. **Aerobic granular sludge technology: Mechanisms of granulation and biotechnological applications**, Bioresource Technology. 1128-1143, 2018.

NATIONAL HUMAN GENOME RESEARCH INSTITUTE. NIH. **Fluorescence in situ hybridization (FISH)**, 2023. Disponível em: <<https://www.genome.gov/genetics-glossary/Fluorescence-In-Situ-Hybridization#:~:text=In%20this%20technique%2C%20the%20full,within%20the%20set%20of%20chromosomes.>>>. Acesso em: 01 Fevereiro 2023.

NGUYEN, H, LE, V Q, HANSEN, A A, NIELSEN, J L, NILSEN, P H. Ecol. **High diversity and abundance of putative polyphosphate-accumulating tetrasphaera-related bacteria in activated sludge systems**, FEMS Microbiol, 256–267, 2011.

NIELSEN, P H., MIELCZAREK A T, KRAGELUND, C, NIELSEN, J L, SAUNDERS, A M, KONG, Y, HANSEN, A A, VOLLERTSEN, J. **A conceptual ecosystem model of microbial communities in enhanced biological phosphorus removal plants**, Water Res. 5070–5088, 2010.

NIELSEN, P; DAIMS, H; LEMMER, H. **FISH Handbook for Biological Wastewater Treatment**, 2009

OEHMEN, A, LEMOS, P C, CARVALHO, G, YUAN, Z, KELLER, J, BLACKALL, L L, REIS, M A M. **Advances in enhanced biological phosphorus removal: from micro to macro scale**, Water Research, 2271-300, 2007.

OKABE, S, AOI, Y, SATOH, H, SUWA, Y. **Nitrification in Wastewater Treatment**, 2014.

OLIVEIRA, D V. M. D. **Caracterização dos Parâmetros de Controle e Avaliação de Desempenho de um Reator Biológico com Leito Móvel (MBBR)**. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, p. 91. 2008.

ORMECI, B; LINDEN, K G. J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng. **Development of a fluorescence in situ hybridization protocol for the identification of micro-organisms associated with wastewater particles and flocs**, 1484-1488, 2008.

PERNTHALER, J, GLOCKNER, F, SCHONHUBER, W, AMANN, R.. **Fluorescence in situ Hybridization (FISH) with rRNA-targeted Oligonucleotide Probes**, Academic Press Ltd, 2001.

POMMERENING-ROSER, A; RATH, G; KOOP, H P. Syst. Appl. Microbiol. **Phylogenetic diversity within the genus Nitrosomonas**, 344–351, 1996.

POURBAVARSAAD, M S, JALALIEH, B J, LANDES, N, JACKSON, W A. **Impact of free ammonia and free nitrous acid on nitrification in membrane aerated bioreactors fed with high strength nitrogen urine dominated wastewater**, Journal of Environmental Chemical Engineering, 2022.

RAMDHANI, Ni; KUMARI, S; BUX, F. Water Environment Research. **Distribution of Nitrosomonas-Related AmmoniaOxidizing Bacteria and Nitrobacter-Related NitriteOxidizing Bacteria in Two Full-Scale Biological Nutrient Removal Plants**, 374-381, 2013.

ROBERTI, G. **Partida de um sistema de lodo granular aeróbio em escala plena: avaliação da formação de biomassa e seu desempenho no tratamento biológico**

de esgoto sanitário. Universidade Estadual do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, p. 106. 2018.

RUBIM, C. **Lodo Granular Aeróbio, processo compacto deixa o efluente tratado bem clarificado.** *Revista TAE*, 2021. Disponível em: <<https://www.revistatae.com.br/Artigo/707/lodo-granular-aerobio-processo-compacto-deixa-o-efluente-tratado-bem-clarificado->>. Acesso em: 24 Janeiro 2023.

SANZ, J L.; KOCHLING, T. *Process Biochemistry*. **Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview**, 119–133, 2007.

SANZ, J L.; KÖCHLING, T. *Process Biochemistry*. **Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview**, 119-133, 2007.

SCHIMIDT, I, SLIEKERS, O, SCHIMID, M, BOCK, E, FUERST, J, KUENEN, J G, JETTEN, M S M, STROUS, M. **New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater**, *FEMS Microbiology Reviews*. 481-492, 2003.

SCHMID, M, TWACHTMANN, U, KLEIN, M, STROUS, M, JURETSCHKO, S, JETTEN, M, METZGER, J W, SCHELEIFER, K, WAGNER, M. **Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation**, *Syst Appl Microbiol.*, 93-106, 2000.

SCHULER, A J.; XIAO, Y. *Water Environment Research*. **Predicted Distributed State Effects on Enhanced Biological Phosphorus Removal in a 5-Stage Bardenpho Wastewater Treatment Configuration**, 454-463, 2008.

SEGHEZZO, L, ZEEMAN, G, VAN LIER, J B, HAMELERS, H V M, LETTINGA, G. **A review: The anaerobic treatment of sewage in UASB and EGSB reactors**, *Bioresource Technology*, 175–190, 1998.

SEVIOUR, R J.; MINO, T; ONUKI, M. *FEMS Microbiology Reviews*. **The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems**, 99-127, 2003.

SILVA, M B. **Tratamento biológico com lodo granular aeróbio de efluente de laticínio**. Universidade Federal de Uberlândia. [S.l.], p. 96. 2021.

SIRIPONG, S; RITTMANN, B. Water Research. **Diversity study of nitrifying bacteria in full-scale municipal wastewater treatment plants**, 2007.

SOLIMAN, M; ELDYASTI, A. Rev Environ Sci Biotechnol. **Ammonia-Oxidizing Bacteria (AOB): opportunities and applications—a review**, 285-321, 2018.

SOUZA, V V. T. D. **Avaliação físico-química e microbiológica de um reator em bateladas sequenciais aplicado a esgoto sanitário**. UFPE. [S.l.], p. 68. 2017.

SPONZA, D T.; ULUKÖY, A. Process Biochemistry. **Treatment of 2,4-dichlorophenol (DCP) in a sequential anaerobic (upflow anaerobic sludge blanket) aerobic (completely stirred tank) reactor system**. 3419–3428, 2005.

TESKE, A, ALM, E, REGAN, J M, TOZE, S, RITTMANN, B E, STAHL, D A. **Evolutionary relationship among ammonia-oxidizing and nitrite-oxidizing bacteria**, J. Bacteriol., 6623–6630, 1994.

THE WORLD BANK. Water & Sewerage Sector. **Private Participation in Infrastructure (PPI)**, 2018. Acesso em: 31 Dezembro 2020.

TONETTI, A L. FILHO, B C, GUIMARÃES, J R, FADINI, P S, NICOLAU, C E. **Desnitrificação em um sistema simplificado de tratamento de esgoto**, Engenharia Sanitária Ambiental. 381-392, 2013.

TORRESI, E, POLESEL, F, BESTER, K, CHRISTENSSON, M, SMETS, B F, TRAPP, S, ANDERSEN, H R, PLÓSZ, B G. **Diffusion and sorption of organic micropollutants in biofilms with varying thicknesses**, Water reser. v. 123, 388-400, 2017.

VALÉRIO, R, DIAS, J M R, BASSIN, I D, BASSIN, J P. **Remoção de NH₄⁺-N em sistemas MBBR nitrificantes com cargas críticas de substrato com dois tipos de suportes móveis**, Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Gramado, 2020.

VIEIRA, J S.; HENKES, J A. **Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental. Uma análise nos impactos ambientais causados na lagoa da Conceição pelo despejo de efluentes**, 309-337, 2013.

VON SPERLING, M. **Princípios básicos de tratamento de esgoto**. 2ª. ed., 1996.

VON SPERLING, M. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. In: **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgoto**. 3ª. ed., 2005.

WAGNER, M, RATH, G, AMANN, R, KOOPS, H P, SCHLEIFER K H. **In-situ identification of ammonia-oxidizing bacteria**, Systematic and Applied Microbiology, 251-264, 1995.

WAGNER, M, RATH, G, KOOPS, H P, FLOOD, J, AMANN, R. **In situ analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants**, Water Science and Technology. 237-244, 1996.

WANG, Jianlong; CHU, Libing. *Biotechnology Advances*. **Biological nitrate removal from water and wastewater by solid-phase denitrification process**, 2016.

WENTZEL, M. C., LOTTER, L H, EKAMA, G A, LOEWNTHAL, R E, MARAIS, G V R. **Evaluation of Biochemical Models for Biological Excess Phosphorus Removal**, Water Science and Technology, v. Vol. 23, p. 567-576, 1991.

WHO. World Health Organization and UNHABITAT. **Progress on safe treatment and use of wastewater: piloting the monitoring methodology and initial findings for SDG indicator**, 2018.

WINKLER, M -K. H., BASSIN, J P, KLEEREBEZEM, R, BRUIN, L M M, CAN LOOSDRECHT, M C M, **Selective sludge removal in a segregated aerobic granular biomass system as a strategy to control PAO-GAO competition at high temperatures**, Water Research., 3291-3299, 2011.

WINKLER, M K. H., BASSIN, J P, KLEEREBEZEM, R, SOROKIN, D Y, VAN LOOSDRECHT, M C M. **Unravelling the reasons for disproportion in the ratio of**

AOB and NOB in aerobic granular sludge, Appl Microbiol Biotechnol, 1657–1666, 2012.

WWAP. The Untapped Resource. **The United Nations World Water Development Report 2017: Wastewater**, Paris, 2017.

YE, R W.; THOMAS, S M. Curr Opin Microbiol. **Microbial nitrogen cycles: physiology, genomics and applications**, 307-3012, 2001

YEOH, B G. Post Conference Seminar on Industrial Wastewater Management in Malaysia. **Anaerobic treatment of industrial wastewaters in Malaysia**, 1995.

ZOPPAS, F M.; BERNARDES, A M.; MENEGUZZI, A. Engenharia Sanitaria e Ambiental. **Parâmetros operacionais na remoção biológica de nitrogênio de águas por nitrificação e desnitrificação simultânea**, 29-42, 2016.

Apêndice I

Pacotes de dados utilizados no programa

Pacotes

```
In [17]: #instalação do pacote
pip install czifile

Requirement already satisfied: czifile in c:\users\samsung\anaconda3\anaconda\lib\site-packages (2019.7.2)
Requirement already satisfied: imagecodecs>=2019.5.22 in c:\users\samsung\anaconda3\anaconda\lib\site-packages (from czifile) (2021.3.31)
Requirement already satisfied: tifffile>=2019.7.2 in c:\users\samsung\anaconda3\anaconda\lib\site-packages (from czifile) (2021.4.8)
Requirement already satisfied: numpy>=1.11.3 in c:\users\samsung\anaconda3\anaconda\lib\site-packages (from czifile) (1.20.1)

In [18]: #import packages needed
from czifile import CziFile

##matplotlib inline
%matplotlib qt5

import matplotlib.pyplot as plt
import os
import re
import numpy as np
import czifile
```

Testes utilizados para obter quantificação em porcentagem

Teste

```
In [19]: imageTEST='Renato_F1_N1_NOB_A1_30_001.czi' #<--- NOPE

In [20]: def extract_plane(image_array, plane_number = 0):
#Define functions to extract an image ("extract plane") and visualize an image ("visualize plane")
data = image_array[0,0,plane_number,0,0, :, :, 0]
return data

In [21]: def calculate_data_to_plot(image1, image2):
'''imagem 1 será dividida por imagem 2'''
#chega imagem (matriz) original

#aplica filtro

tolporcento1 = 20 %% #<----- 10% sugerido
tolporcento2 = tolporcento1 %% #<----- melhor se der pra ser igual
tol_denominador1=100/tolporcento1
tol=np.max(image1)/tol_denominador1

image1f=np.where(image1<tol,0,image1)
image1f=image1f/np.max(image1f)

tol_denominador2=100/tolporcento2
tol=np.max(image2)/tol_denominador2
image2f=np.where(image2<tol,1,image2)
image2f=image2f/np.max(image2f)

#aplica comparação matemática (divisão)

data_to_plot = image1f/image2f
```

```

#aplica pós filtro

## maior que 1 vira 1
data_to_plot = np.where(data_to_plot >= 1, 1, data_to_plot) #filtro tudo q for maior do que 1 para ser igual a 1 (maximo teor

## erros de divisão por zero => NaN => zero
data_to_plot = np.nan_to_num(data_to_plot)

return image1f, image2f, data_to_plot

```

```

In [22]: def TESTA(imageTEST):
#testa um arquivo individual e faz um grafico triplo
with cziFile(imageTEST) as czi:
    image_arrays = czi.asarray() #superestrutura czi

NPLANES=2 #<--- NUMERO DE FOTOS TIRADAS

image_planes = [extract_plane(image_arrays, plane) for plane in range(NPLANES)]
#lista de matrizes matriz UINT16

fig = plt.figure(figsize=[12,8])

ax1 = fig.add_subplot(2,3,1)
ax2 = fig.add_subplot(2,3,2)
#ax3 = fig.add_subplot(2,3,3)

ax4 = fig.add_subplot(2,3,4)
ax5 = fig.add_subplot(2,3,5)

ax6 = fig.add_subplot(2,3,6)

cbaxes1 = fig.add_axes([0.15, 0.05, 0.2, 0.01])
cbaxes2 = fig.add_axes([0.42, 0.05, 0.2, 0.01])
cbaxes3 = fig.add_axes([0.7, 0.05, 0.2, 0.01])

image1=image_planes[1] #<----- numerador da divisão "A"
image2=image_planes[0] #<----- denominador da divisão "B"

image1f, image2f, divididas = calculate_data_to_plot(image1,image2)
#"Af, Bf, C=Af/Bf"

m1=ax1.imshow(image1)
ax1.set_title(str(np.max(image1)))

m2=ax2.imshow(image2)
ax2.set_title(str(np.max(image2)))

m4=ax4.imshow(image1f)
ax4.set_title(str(np.max(image1f)))
fig.colorbar(m4,orientation='horizontal', cax = cbaxes1)

m5=ax5.imshow(image2f)
ax5.set_title(str(np.max(image2f)))
fig.colorbar(m5,orientation='horizontal', cax = cbaxes2)

m6=ax6.imshow(divididas)
ax6.set_title('Média='+ '(' +str(round(100*np.mean(divididas),2))+'%')')
fig.colorbar(m6,orientation='horizontal', cax = cbaxes3)

plt.savefig(imageTEST+'_DETALHE.png',dpi=100,bbox_inches='tight')

TESTA(imageTEST)

```

Resultado obtido