

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

ALICE CHIAPETTI BOLSAN

**PROSPECÇÃO DE BACTERÍOFAGOS PARA O CONTROLE DE BACTÉRIAS
HETEROTRÓFICAS E NITRATANTES NO PROCESSO DE DESAMONIFICAÇÃO
EM EFLUENTES RICOS EM NITROGÊNIO**

**DOIS VIZINHOS
2023**

ALICE CHIAPETTI BOLSAN

**PROSPECÇÃO DE BACTERÍOFAGOS PARA O CONTROLE DE BACTÉRIAS
HETEROTRÓFICAS E NITRATANTES NO PROCESSO DE DESAMONIFICAÇÃO
EM EFLUENTES RICOS EM NITROGÊNIO**

**Prospecting bacteriophages for the control of heterotrophic bacteria and
nitratants in the deammonification process in nitrogen-rich effluents**

Trabalho de Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientadora: Prof. Dr^a. Marina Celant De Prá

Coorientadora: Prof. Dr^a. Naiana Cristine Gabiatti

Coorientador: Prof. Dr. Airton Kunz

DOIS VIZINHOS

2023



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Ponta Grossa



ALICE CHIAPETTI BOLSAN

**PROSPECÇÃO DE BACTERIÓFAGOS PARA O CONTROLE DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS
E NITRATANTES NO PROCESSO DE DESAMONIFICAÇÃO EM EFLUENTES RICOS EM
NITROGÊNIO**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestra Em Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Biotecnologia.

Data de aprovação: 08 de Fevereiro de 2023

Marina Celant De Pra, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Deborah Catharine De Assis Leite, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Fabiane Goldschmidt Antes, Doutorado - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Suínos e Aves - Santa Catarina

Naiana Cristine Gabiatti, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 08/02/2023.

Dedico esse trabalho ao meu tio Eliseu, que de algum lugar continua vibrando pelas
minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares, em especial, aos meus pais, Avanildo e Dirlei, minha irmã, Aline, Saio e minha vó Wilma, pelo apoio, dedicação, confiança, amor e paciência dispensados a mim. Muito obrigada por vocês existirem!

A minha orientadora, profa. Dra. Marina Celant De Prá, por acreditar no meu trabalho, por estar sempre presente, pela credibilidade, ensinamentos e orientação. A minha coorientadora profa. Dra. Naiana Cristine Gabiatti, pela paciência, inspiração, confiança, pelas inúmeras mensagens trocadas e por todo ensinamento repassado. Ao meu coorientador prof. Dr Airton Kunz, por ter acreditado em mim, pelas conversas e todo conhecimento construído ao longo dos anos.

À Embrapa Suínos e Aves, pela disposição dos recursos e espaço físico necessários para o desenvolvimento do trabalho. Aos analistas Fabiane, Adriana e Alexandre, pelo suporte na realização das análises.

A todos os meus amigos e colegas que passaram pelo Laboratório de Experimentação e Análises Ambientais da Embrapa Suínos e Aves. Em especial, a Gabriela, Bruno, Camila e João pelo apoio na realização das análises e experimentos, pelos conselhos, ensinamentos, momentos de descontração, pelas palavras de incentivo e pela amizade.

Aos amigos de longa data e aos que conheci ao longo dessa jornada, que sempre estiveram ao meu lado (mesmo de longe) nos momentos de choro e alegria: Alexandre, Duda, Heloisa, Gabi, Allan, Ana, Schu e Ceci!

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR/Dois Vizinhos e ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia pela contribuição para o aprendizado. Ao Laboratório de Biotecnologia Ambiental e Alimentos (LABIA) e o Laboratório de Bioprocessos (LAPRO) pela estrutura para o desenvolvimento do trabalho. À CAPES (processo 88887.601592/2021-00), pela concessão da bolsa. A Fundação Araucária (termo 27.2020) e ao CNPq (processo 422986/2021-6), pelo apoio financeiro concedido à pesquisa.

A todos os meus amigos e familiares que direta ou indiretamente auxiliaram e não foram citados acima.

A todos, **MUITO OBRIGADA!!**

RESUMO

Carbono e nitrogênio são elementos presentes em moléculas orgânicas e inorgânicas e constituem compostos poluentes presentes em efluentes de setores como agroindústrias, agropecuários, frigoríficos, dentre outros e quando não tratados ou manejados corretamente, afetam o meio ambiente e a saúde humana. A digestão anaeróbia é uma tecnologia já consolidada para tratamento de efluentes com alta concentração de carbono orgânico, porém, nesse processo, o digestato gerado apresenta uma baixa relação C/N. Uma alternativa promissora para o tratamento desses efluentes com altas concentrações de nitrogênio é a desamonificação, que utiliza bactérias oxidadoras de amônia (BOA) e Anammox em sua rota metabólica. Entretanto, um problema enfrentado no processo de desamonificação é o aparecimento de microrganismos indesejados, como é o caso de bactérias oxidadoras de nitrito (BON) e heterotróficas, que crescem nesse meio e acabam afetando o processo de remoção de nitrogênio e inibindo as bactérias funcionais responsáveis pela desamonificação. As estratégias operacionais baseadas em parâmetros de processo (engenharia) são limitadas e não conseguem inibir a atividade das espécies indesejadas. Visando o controle dessas bactérias, o objetivo desse trabalho foi isolar bacteriófagos com capacidade antimicrobiana contra bactérias oxidadoras de nitrito e heterotróficas. Amostras de lodo biológico proveniente de um sistema de nitrificação/desnitrificação e de um decantador pós processo de desamonificação, foram utilizadas para isolamento de BON e heterotróficas. Para o isolamento das bactérias heterotróficas, uma amostra de esgoto foi coletada e utilizada para isolar um bacteriófago que infectasse uma cepa previamente isolada. Os resultados foram positivos e mostraram que a espécie isolada foi *Pseudomonas monteilii*. Para confirmação da presença de fagos utilizou-se o ensaio de dupla camada de ágar; o teste de espectro de hospedeiro e eficiência de plaqueamento foi realizado para aferir a capacidade infectante do fago. A concentração final do estoque purificado de fagos foi de $1,2 \times 10^{10}$ PFU/ml, sendo satisfatória para o objetivo em questão. Após, foram realizados testes de inibição em cultura líquida do hospedeiro, onde o fago isolado mostrou uma maior eficiência de inibição a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 1 e 0,1. Quanto ao isolamento de BON, a cepa isolada foi identificada como pertencente ao gênero *Nitrobacter* e concentrações na faixa de 100 a 300 mgNaNO₂ L⁻¹ foram ideais para o crescimento dessas bactérias. No entanto, verificou-se uma dificuldade de crescimento dessas bactérias em meio sólido, impedindo a prospecção de um fago específico. Estima-se que com os resultados deste trabalho seja possível realizar o processo de desamonificação em efluentes contendo concentrações de carbono, sem que o mesmo seja inibitório para o sistema.

Palavras-chave: efluente; fagos; anammox; tratamento biológico de efluentes; remoção biológica de nitrogênio.

ABSTRACT

Carbon and nitrogen are elements in organic and inorganic molecules and constitute pollutant compounds in effluents from sectors such as agribusiness, livestock, and meat-packing plants, among others. Not treated or managed correctly affects the environment and human health. Anaerobic digestion is an already consolidated technology for treating effluents with a high concentration of organic carbon; however, the generated digestate presents a low C/N ratio. A promising alternative for treating these effluents with high nitrogen concentrations is deammonification, which uses ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and Anammox in its metabolic pathway. However, a problem faced in the deammonification process is the appearance of unwanted microorganisms, such as nitrite-oxidizing bacteria (NOB) and heterotrophic bacteria, which grow in this medium and end up affecting the nitrogen removal process and inhibit the functional bacteria responsible for the deammonification. Operational strategies based on process parameters (engineering) are limited and cannot inhibit the activity of the undesired species. Aiming to control these bacteria, this work sought to isolate bacteriophages with antimicrobial capacity against nitrite-oxidizing and heterotrophic bacteria. Samples of biological sludge from a nitrification/denitrification system and from a decanter after deammonification were used to isolate NOB and heterotrophic bacteria. To isolate heterotrophic bacteria, a sewage sample was collected and used to isolate a bacteriophage that infected a previously isolated strain. The results were positive and showed that the isolated species was *Pseudomonas monteilii*. The double-layer agar assay was used to confirm the presence of phages; the host spectrum and plating efficiency test were performed to gauge the infective ability of the phage. The final concentration of the purified phage stock was 1.2×10^{10} PFU/ml, satisfactory for the purpose at hand. Afterward, inhibition tests were performed in the liquid host culture, where the isolated phage showed a higher inhibition efficiency at a multiplicity of infection (MOI) of 1 and 0.1. As for the isolation of BON, the isolated strain was identified as belonging to the genus Nitrobacter and concentrations in the range of 100 to 300 mgNaNO₂ L⁻¹ were ideal for the growth of these bacteria. However, there was difficulty in growing these bacteria on solid medium, preventing the prospection of a specific phage. It is estimated that with the results of this study, it is possible to perform the deammonification process in effluents containing carbon concentrations without inhibiting to the system.

Keywords: wastewater; phages; anammox; biological wastewater treatment; biological nitrogen removal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Reações envolvidas no ciclo do nitrogênio	18
Figura 2 - Efeito da temperatura sobre as bactérias oxidadoras de amônia e nitrito.	23
Figura 3 - Representação esquemática do sistema experimental do reator Nitrammox®	25
Figura 4 - Representação esquemática de um bacteriófago	28
Figura 5 - Diferentes morfologias de bacteriófagos divididos conforme tipos de ácidos nucleicos: ssDNA (DNA de fita simples), dsDNA (DNA de fita dupla), ssRNA (RNA de fita simples), dsRNA (RNA de fita dupla).....	32
Figura 6 - Fatores que interferem a efetividade do uso de fagos para biocontrole....	34
Figura 7 - Esquema do isolamento de bactéria e bacteriófago	38
Figura 8 - Esquema do enriquecimento de linhagens bacteriana heterotróficas	39
Figura 9 - Metodologia para isolamento e identificação da cepa bacteriana	40
Figura 10 - Esquema experimental e imagem do reator contínuo	42
Figura 11 - Sistema experimental batelada utilizado no enriquecimento de bactérias oxidadoras de nitrito	43
Figura 12 - Preparo do estoque heterogêneo.....	46
Figura 13 - Processo de isolamento de bacteriófagos	47
Figura 14 - Consumo de nitrato pelas bactérias heterotróficas ao longo dos dias	51
Figura 15 - Colônias de <i>Pseudomonas</i> isoladas a partir do cultivo em batelada	54
Figura 16 – Resultado obtido na plataforma <i>Blast</i> do NCBI	54
Figura 17 - Placas de lise	58
Figura 18 - Espectro de hospedeiro demonstrado pelo halo transparente na placa .	60
Figura 19 - Placas de lise observadas na última diluição	61
Figura 20 - Placas de lise observadas na última diluição pós concentração e purificação	62
Figura 21 - Curva de crescimento em etapa única ao longo de 8 horas	63
Figura 22 - Curva de crescimento em etapa única posterior à 24h	64
Figura 23 - Teste de sensibilidade a antibióticos com a cepa isolada.....	56
Figura 24 - Acompanhamento das espécies nitrogenadas no sistema batelada – 100 mgNaNO ₂ L ⁻¹	67
Figura 25 - Acompanhamento das formas nitrogenadas sistema batelada – 300 mgNaNO ₂ L ⁻¹	68
Figura 26 - Acompanhamento das espécies nitrogenadas sistema batelada –1000 mgNaNO ₂ L ⁻¹	69
Figura 27 - Acompanhamento das espécies nitrogenadas no sistema contínuo.....	70
Figura 28 - Acompanhamento dos parâmetros operacionais no sistema contínuo ...	70
Figura 29 – Resultado do estriamento das bactérias oxidadoras de nitrito (sistema batelada) em meio sólido e amplificação das colônias por meio de RT-PCR	72
Figura 30 – Resultado do estriamento das bactérias oxidadoras de nitrito (sistema batelada) ágar Noble e amplificação das colônias por meio de RT-PCR.....	73
Figura 31 - Crescimento das bactérias oxidadoras de nitrito em dupla camada	75

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Teste de resistência à antibióticos	57
------------------------------------------------------	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do meio sintético para bactérias heterotróficas	39
Tabela 2 - Composição do meio sintético utilizado para enriquecimento de bactérias oxidadoras de nitrito	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AL – Amônia livre

Anammox - Acrônimo do Inglês *Anaerobic ammonium oxidation*

ANL – Ácido nitroso livre

BHDA – Bactérias heterotróficas desnitrificantes aeróbias

BOA – Bactérias oxidadoras de amônia

BON – Bactéria oxidadoras de nitrito

MOI – Multiplicidade de infecção

NP – Nitrificação parcial

OD – Oxigênio dissolvido

PFU – Unidades formadoras de placa de lise

PCA – *Plate Count Agar*

TRH – Tempo de retenção hidráulica

SMB - *Salt-magnesium buffer*

LISTA DE SÍMBOLOS

NaNO_2	Nitrito de sódio
NH_4^+	Íon Amônio
NO_2^-	Íon Nitrito
NO_3^-	Íon Nitrato
N_2	Nitrogênio gasoso
NH_3	Amônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Objetivos	17
1.1.1 Objetivo geral	17
1.1.2 Objetivos específicos.....	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 Impacto ambiental do nitrogênio	18
2.2 Processos biológicos para remoção de nitrogênio	19
2.2.2 Anammox/Desamonificação	20
2.2.2.1 Nitrificação Parcial.....	21
2.2.2.1.1 <i>pH, amônia livre e ácido nitroso livre</i>	22
2.2.2.1.2 <i>Temperatura</i>	23
2.2.2.1.3 <i>Oxigênio dissolvido (OD)</i>	24
2.3 Reator Nitrammox®	24
2.4 População microbiana em sistemas de desamonificação	26
2.5 Bacteriófagos	28
2.6 Desafio no uso de bacteriófagos como ferramentas de biocontrole	34
3 MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 Enriquecimento, isolamento, cultivo e manutenção de cepas bacterianas 38	
3.1.1 Enriquecimento de linhagens bacterianas de BHDA – Cultivo em batelada ..	38
3.1.2 Isolamento e identificação de Linhagens Bacterianas de BHDA.....	40
3.1.2.1 Teste de sensibilidade a antibióticos	41
3.1.3 Enriquecimento de linhagens bacterianas de BON – Sistema contínuo	42
3.1.4 Enriquecimento de linhagens bacterianas de BON – Sistema batelada	43
3.1.5 Isolamento e identificação molecular de linhagens bacterianas de BON	44
3.2 Obtenção dos bacteriófagos	45
3.2.1 Preparação do Estoque Heterogêneo de bacteriófagos.....	45
3.2.2 Isolamento dos bacteriófagos.....	46
3.2.3 Purificação dos bacteriófagos	47
3.3 Caracterização do bacteriófago isolado	48
3.3.1 Espectro de hospedeiro e eficiência de plaqueamento (EOP)	48
3.3.2 Teste de inibição bacteriana em cultura líquida	48
3.4 Métodos analíticos	49
3.4.1 Nitrito e Nitrato	49
3.4.2 pH.....	49
3.4.3 Oxigênio dissolvido	49
3.4.4 Sólidos suspensos totais, fixos e voláteis.....	50

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1 Ativação e produção de bactérias BHDA	51
4.1.1 Enriquecimento e caracterização de BHDA em cultivo batelada.....	51
4.1.2 Isolamento de linhagens BHDA e identificação	53
4.1.3 Teste de antibiograma.....	55
4.2 Isolamento do bacteriófago para BHDA	58
4.2.1 Espectro de hospedeiro e eficiência de plaqueamento para BHDA	59
4.2.2 Purificação dos fagos	61
4.2.3 Inibição em cultura líquida para BHDA.....	63
4.3 Ativação e produção de bactérias BON	66
4.3.1 Enriquecimento de linhagens bacterianas de BON – Sistema batelada	66
4.3.2 Enriquecimento de linhagens bacterianas de BON – Sistema contínuo	70
4.3.3 Isolamento de linhagens bacterianas de BON e identificação.....	71
4.4 Isolamento do bacteriófago para BON	74
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	77
6 PERSPECTIVAS FUTURAS	78
REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO

Bacteriófagos ou fagos são vírus que parasitam bactérias (KWIATEK; PARASION; NAKONIECZNA, 2020), sendo considerados os parasitas celulares mais abundantes na biosfera (NAUREEN *et al.*, 2020). Estima-se que existem 10^{31} partículas de bacteriófagos distribuídas nos mais diversos ambientes do planeta, sendo esse número dez vezes maior do que as bactérias (MANN, 2005).

Os bacteriófagos possuem principalmente duas formas de replicação: lítica e lisogênica, sendo que bacteriófagos virulentos adotam um ciclo de replicação lítica (BATINOVIC *et al.*, 2019). A reprodução viral ocorre dentro da bactéria, causando sua lise e liberando novas partículas virais com potencial de se ligar a novas células bacterianas. No ciclo lisogênico, o material genético do bacteriófago é integrado ao genoma do hospedeiro e permanece como um prófago, replicando-se concomitantemente com a duplicação do genoma da bactéria hospedeira (HOWARD-VARONA *et al.*, 2017). O prófago segue o ciclo lisogênico até que as condições do hospedeiro se tornem adversas, fazendo com que este entre no ciclo reprodutivo lítico, tornando-se virulento (DOSS *et al.*, 2017).

Nas estações de tratamento efluentes, as bactérias desempenham um papel essencial, sendo as principais responsáveis pela conversão biológica de nutrientes, como é o caso do nitrogênio (KIM *et al.*, 2016). No entanto, algumas espécies podem ser problemáticas, causando competição com os organismos que realizam os processos de conversão e remoção, prejudicando o processo globalmente.

Dado que as concentrações de bacteriófagos são estimadas em aproximadamente $10^8 - 10^9 \text{ mL}^{-1}$ nesse ambiente (DU *et al.*, 2021), esse vírus podem ser uma alternativa viável para combater bactérias indesejadas (MATHIEU *et al.*, 2019). Esses vírus têm mostrado potencial para controlar problemas em estações de tratamento de efluentes, como redução da formação de espuma causada por microrganismos (NIELSEN; SINGLETON, 2021); desidratabilidade e digestibilidade do lodo após o processo aeróbio (WITHEY *et al.*, 2005), aumentando a disponibilidade de substrato para posterior tratamento anaeróbio, combate a bactérias patogênicas (TAGLIAFERRI; JANSEN; HORZ, 2019) e redução da competição entre bactérias indesejadas e populações microbianas funcionalmente importantes (RUNA *et al.*, 2021).

Processos como a desamonificação (nitrificação parcial + oxidação anaeróbia da amônia (Anammox)) propõem a remoção de nitrogênio de forma inovadora, destacando-se por alcançar maiores eficiências e reduzir custos no tratamento de efluentes concentrados com baixa relação C/N. A desamonificação consiste na conversão do nitrogênio amoniacal utilizando dois grupos microbianos: as bactérias oxidadoras de amônia (BOA) para gerar nitrito que, em combinação com o nitrogênio amoniacal residual, servirão como substrato ao processo Anammox subsequente (WEISSBACH *et al.*, 2017). Almeja-se nesse processo que as BOAs oxidem parte do amônio (NH_4^+) em nitrito (NO_2^-), produzindo assim substrato para as Anammox, que irão produzir ao final nitrato (NO_3^-) e nitrogênio gasoso (N_2) (GIUSTINIANOVICH *et al.*, 2018).

Para obter sucesso na aplicação em grande escala dessa tecnologia é necessário ter o equilíbrio entre as comunidades bacterianas, visto que se almeja a predominância de determinadas bactérias em detrimento de outras. No processo de desamonificação é comum o aparecimento de bactérias oxidadoras de nitrito (BON) e bactérias heterotróficas desnitrificantes aeróbias (BHDA), sendo que o aumento dessas populações pode levar ao colapso do sistema, afetando a eficiência global de remoção de nitrogênio. As BON exigem NO_2^- e oxigênio, e caso estejam presentes no meio podem interromper o processo de desamonificação devido à competição por oxigênio com as BOA e por NO_2^- com as Anammox. Além disso, as BHDA podem crescer no meio em função do remanescente de carbono presente no digestato, que devido a sua velocidade de duplicação, podem suprimir as bactérias Anammox.

Atualmente, o controle desses microrganismos é realizado através da manipulação de parâmetros operacionais do processo, como vazão de ar, temperatura, pH, entre outros. No entanto, a diversidade de bactérias envolvidas nesses processos é alta, e ao modificar um parâmetro, visando desfavorecimento de certa espécie, pode-se acabar favorecendo outra, a qual não é almejada. Dessa forma, o controle do processo através de parâmetros operacionais tem apresentado fragilidades, sendo este um dos grandes desafios não resolvidos para consolidar as tecnologias existentes.

Nos últimos anos, o Grupo de Pesquisa em Gerenciamento e Tratamento de Resíduos – GETRAT em conjunto com a Embrapa Suínos e Aves vêm estudando o processo de desamonificação. Trabalhos estudando a concepção (CHINI *et al.*,

2016, 2020), a otimização do processo de desamonificação (BONASSA *et al.*, 2021; DE PRÁ *et al.*, 2016a), a interferência de compostos inibidores (CHINI *et al.*, 2019) já foram desenvolvidos. Recentemente, uma nova tecnologia foi desenvolvida pelo grupo (DE PRÁ *et al.*, 2021) e está em fase de *scale-up* tratando efluentes da suinocultura (VENTURIN, 2022). Problemas operacionais devido ao desequilíbrio dos microrganismos vêm acontecendo em função do crescimento descontrolado de BON e BHDA, fazendo surgir a hipótese deste trabalho: os bacteriófagos são capazes de controlar o crescimento de bactérias BON e BHDA em processo de desamonificação, visando melhor estabilidade no processo global de remoção de nitrogênio?

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Isolar e caracterizar bacteriófagos de interesse para controle biológico de bactérias oxidadoras de nitrito (BON) e bactérias heterotróficas desnitrificantes aeróbias (BHDA) visando sua aplicação em sistemas de tratamento de efluentes que operam processos de desamonificação.

1.1.2 Objetivos específicos

- Promover o enriquecimento dos gêneros *Nitrobacter* e *Pseudomonas* em reatores contendo comunidade microbiana de bactérias oxidadoras de nitrito e bactérias heterotróficas;
- Isolar as linhagens bacterianas de oxidadoras de nitrito e heterotróficas aeróbias desnitrificantes, possibilitando o isolamento do bacteriófago de interesse;
- Isolar os bacteriófagos que infectam as respectivas linhagens demonstrando sua capacidade de controle desses organismos;
- Realizar a caracterização dos bacteriófagos isolados para avaliar a atividade fágica;
- Demonstrar o potencial dos bacteriófagos isolados na inibição do crescimento das linhagens bacterianas em questão através de testes de inibição em cultivo líquido.

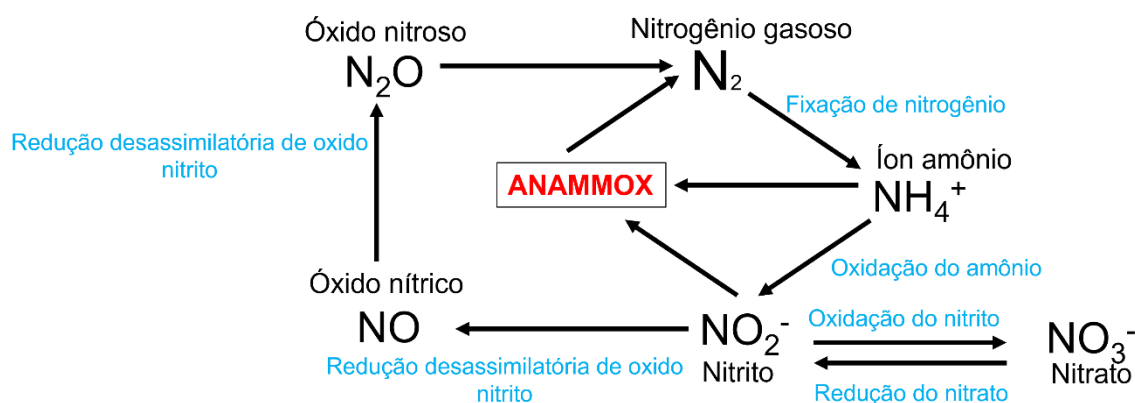
2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Impacto ambiental do nitrogênio

O nitrogênio é um nutriente essencial para a vida, pois faz parte das moléculas proteicas e ácidos nucleicos, sendo fundamental para as estruturas e processos bioquímicos que definem a vida. A maior parte do nitrogênio da Terra existe sob a forma de nitrogênio gasoso, constituindo 78% do ar atmosférico. O N_2 é quimicamente inerte e não pode ser usado diretamente como fonte de N, exceto por algumas espécies de bactérias fixadoras deste elemento (MADIGAN *et al.*, 2016).

Na natureza, este elemento pode estar em diversas formas e estados de oxidação, sendo mais frequentemente encontrado na forma de amônia (NH_3) ou íon amônio. Este último pode ser convertido por microrganismos a nitrito, nitrato e subsequente a nitrogênio gasoso. Na Figura 1, são apresentados os diferentes estados oxidados e/ou reduzidos em que o nitrogênio pode ser encontrado no meio ambiente, em decorrência das ações de diferentes microrganismos e seu ciclo biogeoquímico.

Figura 1 – Reações envolvidas no ciclo do nitrogênio



Fonte: Bonassa *et al.*, (2021) (Adaptado)

O excesso de compostos nitrogenados no meio ambiente é decorrente em grande maioria pelo uso excessivo de fertilizantes, gerando impactos ambientais em corpos hídricos, como a eutrofização, que afeta negativamente a biota aquática (MANASA; MEHTA, 2021). Também, pode estar presente em efluentes que utilizam

o nitrogênio em seus sistemas produtivos, como indústrias de gelatina, frigoríficos e setores agropecuários, como é o caso da suinocultura, bovinocultura e avicultura.

Além de afetar o meio ambiente, as formas nitrogenadas podem prejudicar a saúde humana. O nitrato, pode gerar metahemoglobinemia (síndrome do bebê azul), proveniente da redução do NO_3^- à NO_2^- , e consequente oxidação do Fe^{2+} à Fe^{3+} , formando metahemoglobina que é incapaz de se ligar ao oxigênio dissolvido, dessa forma, impedindo as trocas gasosas no organismo humano (BEDNAREK; SZKLAREK; ZALEWSKI, 2014; BRUNATO; GARZIERA; BRIGUGLIO, 2003)

Outros efeitos prejudiciais à saúde humana, incluem problemas respiratórios (GUPTA *et al.*, 2022), tumores em crianças (FORMAN, 2004), defeitos congênitos e alteração de bases nitrogenadas do DNA (causado por compostos N-nitrosos, como N-nitroso-demetilamina)(WARD *et al.*, 2005). Além deste, o nitrito quando combinado com aminas secundárias, forma nitrosaminas que apresentam poder mutagênico e carcinogênico (LAVANYA *et al.*, 2018).

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), estabelece através das Resolução n° 357, de 17 de março de 2005, e seu complemento Resolução n° 430, de 13 de maio de 2011 (CONAMA, 2011), as condições e padrões de lançamento de efluentes. Essas resoluções limitam o lançamento de efluentes contendo compostos de nitrogênio quanto a concentração de nitrogênio amoniacal ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$) em 20 mg L^{-1} , assim sendo, as empresas precisam atender esses requisitos para lançar seus efluentes em corpos hídricos receptores.

Os esforços para atender tal requisito se concentram em tecnologias baratas, eficientes e robustas por isso, pesquisas voltadas para remoção biológica de N, buscam, além de processos que visem a remoção de nitrogênio, também a melhoria da eficiência, redução de custos e estratégias de otimização. Aliando isso a novos processos, sobre as rotas já existentes e novos grupos de microrganismos que possuam rotas metabólicas para trabalharem em consórcio, e que toleram altas concentrações deste nutriente.

2.2 Processos biológicos para remoção de nitrogênio

Algumas tecnologias foram desenvolvidas ao longo dos anos para a remoção de compostos nitrogenados utilizando princípios físico-químicos ou biológicos.

Dentre os processos biológicos o processo baseado em nitrificação e desnitrificação tem sido o mais utilizado. Na nitrificação as BOA oxidam o amônio a nitrito (nitritação) e posteriormente as BON convertem o nitrito a nitrato (nitratização). Na ausência de oxigênio, nitrito e nitrato podem ser reduzidos a nitrogênio gasoso pelas bactérias desnitrificantes (desnitrificação); ou retornar a amônio por microrganismos dissimilatórios de NO_2^- e NO_3^- (HOLLAS *et al.*, 2019).

Porém, apesar da boa eficiência, o processo demanda um consumo relativamente alto de energia, pois depende de aeração do sistema na etapa de nitrificação. Isto encarece o processo, tornando-o encarecedor, principalmente para ser instalado em empresas de pequeno ou médio porte (SANT'ANNA JR, 2011)

Alguns processos alternativos à nitrificação/desnitrificação, como o Anammox, propõem a remoção do nitrogênio por via autotrófica. Esta rota utiliza ao invés do nitrato como aceptor final de elétrons, o nitrito, quesito que conseqüentemente proporciona economia de oxigênio e energia para oxidação do amônio. Além deste, o processo de desamonificação, que combina o processo de nitrificação parcial e Anammox, também vem se destacando, visando sua aplicação em efluentes como baixa relação C/N.

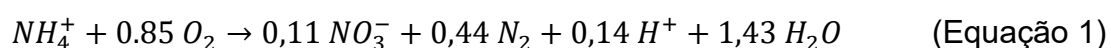
2.2.2 Anammox/Desamonificação

O processo Anammox é rota no ciclo natural do nitrogênio, uma vez que as bactérias convertem amônio e nitrito em gás nitrogênio. Este ciclo é autotrófico, ou seja, não consome oxigênio e não necessita de uma fonte de carbono orgânico. O uso de bactérias Anammox pode ser uma alternativa sustentável para o tratamento de efluentes com baixa relação C/N, após o processo de digestão anaeróbia, para a remoção de nitrogênio amoniacal. Comparado às convencionais nitrificação/desnitrificação, a economia com custos operacionais pode alcançar até 60%, enquanto a emissão de CO_2 é reduzida significativamente (VAN DER STAR *et al.*, 2014).

Para que o processo Anammox possa ser aplicado a efluentes com baixa relação C/N é necessária uma etapa anterior de nitrificação parcial, na qual metade do nitrogênio amoniacal presente no efluente é convertido a nitrito proporcionando assim as condições estequiométricas requeridas pelo processo. A combinação pode ser realizada em dois reatores diferentes, um para o processo de nitrificação parcial

e outro para o Anammox, ou também em um único reator, no qual ocorre uma simbiose entre as culturas de bactérias com atividade de oxidação da amônia e Anammox. Este processo combinado (nitrificação parcial + Anammox) é chamado de desamonificação (LI *et al.*, 2017).

O processo de desamonificação em reator único consiste na oxidação parcial da amônia a nitrito sob condição de oxigênio limitado e, subsequentemente, a conversão deste nitrito juntamente com o amônio remanescente a nitrogênio gasoso, vide Equação 1 (CHINI *et al.*, 2016).



A reação global descrita na Equação 1 deve ocorrer em condições limitadas de oxigênio, sendo necessário que as bactérias aeróbias oxidadoras de amônia consumam todo oxigênio do meio, em virtude de os microrganismos envolvidos no processo Anammox serem reversivelmente inibidos por baixas concentrações deste (GE *et al.*, 2015). Devido ao controle requerido, algumas dificuldades quanto ao estabelecimento desses processos são encontradas, principalmente em se tratando de longos períodos de operação. Estudos realizados por Fux *et al.*, (2002) relatam que a eficiência global de eliminação do nitrogênio foi limitada pelo processo de nitrificação em processos de desamonificação (FUX *et al.*, 2002). Por isso, os próximos tópicos irão tratar de forma pontual sobre as estratégias disponíveis para atingir a fase estacionária desse processo.

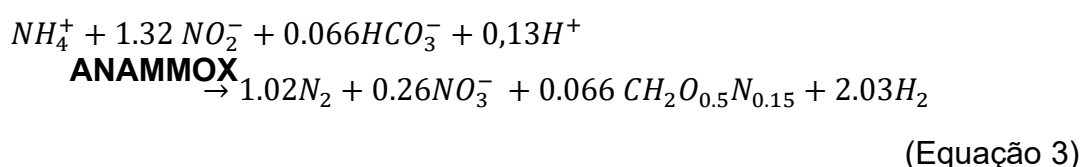
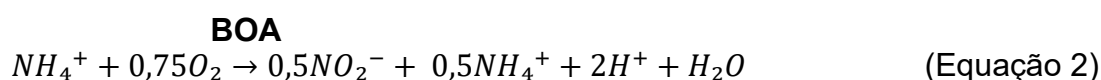
2.2.2.1 Nitrificação Parcial

Processos de nitrificação parcial (NP) fundamentam-se na oxidação parcial da amônia a nitrito, baseando-se na seleção e favorecimento de bactérias oxidadoras de amônia. Este mecanismo funciona como um pré-tratamento para produção de efluentes suplementados em nitrito, quesito que do ponto de vista estequiométrico (equação 2) alia-se as características ideais para alimentação de reatores com atividade Anammox (AUGUSTO; CAMILOTI; SOUZA, 2018).

Na rota convencional de nitrificação, as BOA oxidam o nitrogênio amoniacal a nitrito, sendo que frequentemente essa etapa ocorre pela ação das bactérias do

gênero *Nitrossomonas*, seguido da ação das bactérias oxidadoras de nitrito que o oxidam a nitrato, destacando-se aqui bactérias do gênero *Nitrobacter* e *Nitrospira* (WU *et al.*, 2021).

A quantidade de amônia oxidada, deve ser controlada, a fim de que seja mantido uma parcela desta na forma residual. É desejável que apenas 50% do nitrogênio amoniaco seja oxidado a nitrito, conforme observa-se na estequiometria de NP (Equação 2), para que assim os requisitos estequiométricos da reação Anammox (Equação 3) sejam igualmente atendidos (STROUS *et al.*, 1998).



O favorecimento das BOA em detrimento das BON deve ser objetivado para que a máxima geração de nitrito seja obtida e, para isso, alguns parâmetros físicos podem ser utilizados, como pH, amônia livre (AL), ácido nitroso livre (ANL), temperatura e oxigênio dissolvido (LIU *et al.*, 2020).

2.2.2.1.1 pH, amônia livre e ácido nitroso livre

O pH é um parâmetro de grande importância, visto que rege o equilíbrio das formas nitrogenadas. As concentrações de AL e ANL podem ocasionar efeito inibitório no processo de nitrificação, essas concentrações dependem do pH, temperatura e das concentrações de substrato (amônio e nitrito) (DE PRÁ *et al.*, 2016).

A formação de amônia no sistema é favorecida em condições de pH maior que 7,0, isto é, uma vantagem para as BOA sobre as BON, visto que a atividade das BOA depende da concentração de amônia no sistema. Entretanto, a presença de amônia livre no sistema pode afetar e inibir a atividade dos dois grupos microbianos. Sabe-se que em concentrações de AL na faixa de 10 a 150 mgNH₃ L⁻¹, não afetam as BOA, entretanto as BON são sensíveis a esse composto, sendo inibidas em concentrações de 0,1 a 10 mgNH₃ L⁻¹ (LIANG *et al.*, 2011). Assim, em

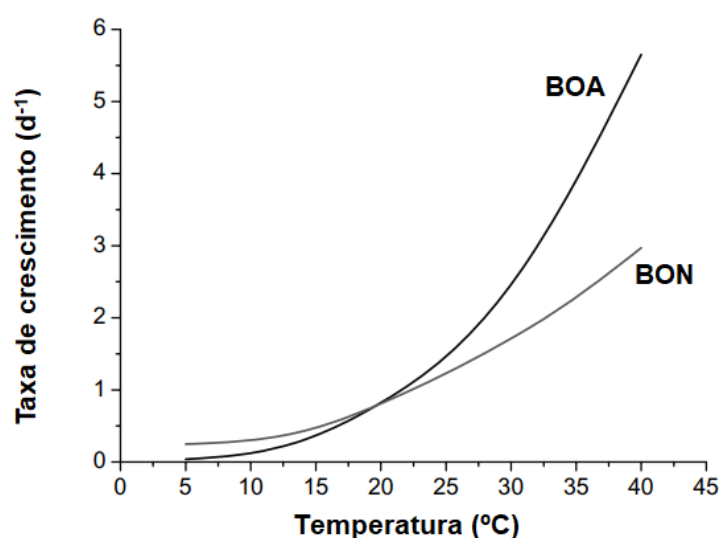
concentrações maiores que 150 mg L^{-1} ambos os grupos bacterianos são inibidos, ocasionando um acúmulo de nitrogênio amoniacal no sistema, já em concentrações abaixo de 10 mg L^{-1} apenas as BON são inibidas, de forma que o nitrito irá se acumular no sistema.

Da mesma forma, à medida que os valores de pH são reduzidos, o equilíbrio é deslocado para acréscimo nas concentrações de ANL. Esse composto pode ocasionar inibição da nitrificação em concentrações que vão de $0,22$ a $2,8 \text{ mg L}^{-1}$ (A. C. ANTHONISEN *et al.*, 1976). Quanto a valores ótimos de pH, as BOA apresentam maior atividade em valores na faixa de $7,9$ a $8,2$; enquanto as BON são favorecidas em pH próximo da neutralidade, na faixa de $7,2$ a $7,9$. Em pH inferior a $6,0$ ambas apresentam queda na atividade (ALLEMAN, 1985).

2.2.2.1.2 Temperatura

A taxa de crescimento das BOA e BON oscilam em função da temperatura. As BOAs apresentam maior atividade em temperaturas acima de $25 \text{ }^\circ\text{C}$, enquanto as BON, tem sua atividade elevada em temperaturas mais baixas (média de 25°C) (JIA *et al.*, 2018). Na Figura 2, observa-se o efeito da temperatura sobre a taxa de crescimento dos dois grupos microbianos, sendo notável que em temperaturas mais altas o crescimento das BOA é favorecido.

Figura 2 - Efeito da temperatura sobre as bactérias oxidadoras de amônia e nitrito



Fonte: Zhu *et al.*, (2008) (Adaptado)

2.2.2.1.3 Oxigênio dissolvido (OD)

As bactérias envolvidas no processo de nitrificação são aeróbias, dessa forma, utilizam o oxigênio como acceptor final de elétrons. Para que a completa oxidação de um quilograma de nitrogênio ocorra (forma de amônia), 4,6 quilogramas de oxigênio são necessários. As BOA exigem uma quantidade menor de oxigênio OD quando comparadas as BON, isso quer dizer, que quando as BON são submetidas a baixas concentrações de OD, elas têm sua atividade reduzida, visto a baixa sensibilidade que apresentam a este composto (HEWAWASAM *et al.*, 2017)

Valores de OD inferiores a $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ inibem a atividade de ambos os grupos de bactérias, enquanto em valores maiores que $2,5 \text{ mg L}^{-1}$, a nitrificação parcial pode ser convertida a completa nitrificação, ou seja, o nitrito é oxidado até nitrato (ZOPPAS *et al.*, 2016). O consumo de oxigênio para as BOA é na ordem de $0,3 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ e de $1,1 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ para as BON (MA *et al.*, 2015).

Observa-se assim que a vantagem das BOA sobre as BON prevalece em ambientes onde se tem uma baixa concentração de OD, podendo esse, ser uma estratégia de seleção de oxidadoras de amônia e restrição das oxidadoras de nitrito, objetivando maior acúmulo de nitrito no sistema.

As estratégias operacionais abordadas possuem fragilidades e podem ocasionar problemas em plantas reais de tratamento. Por isso, medidas alternativas de controle biológico se mostram promissoras.

2.3 Reator Nitrammox ®

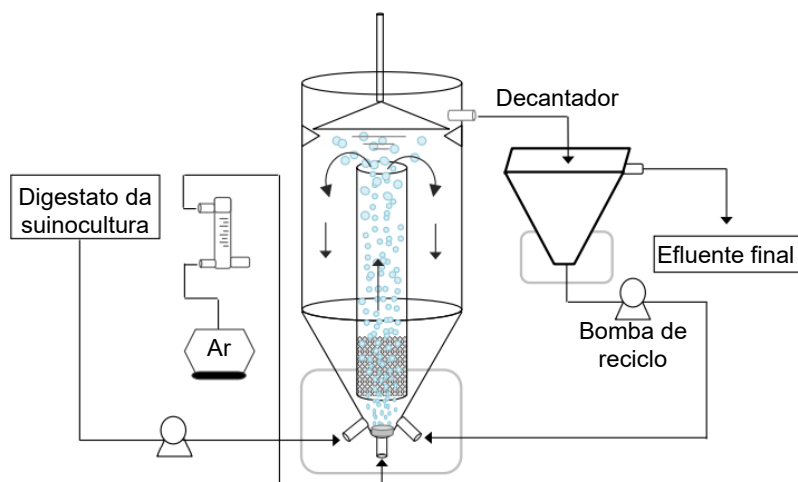
Nos últimos anos a técnica de remoção de nitrogênio usando o processo Anammox tornou-se uma das opções mais inovadoras para o tratamento biológico de águas residuais. Desde a identificação de bactérias que têm a capacitância de oxidar diretamente o íon amônio em gás nitrogênio na década de 1990, uma nova maneira de remover o nitrogênio de vários tipos de águas residuais tornou-se disponível. Desde então, muitas tecnologias foram desenvolvidas e consideradas quanto à sua aplicabilidade em águas residuais reais, e algumas já foram ampliadas (STROUS *et al.*, 1998).

As plantas de desamonificação em sua maioria se configuram por operarem em estágio único, resultando em maior economia e sustentabilidade ao processo (DE PRÁ *et al.*, 2016b). Quanto ao tipo de reator, 50% das plantas apresentam reatores do tipo batelada sequencial (PICHEL *et al.*, 2021). Algumas também incluem configurações com biofilme de leito móvel, reator anaeróbio de fluxo ascendente, leito fixo e reator granuloso expandindo de leito de lodo (CHINI *et al.*, 2019; GU *et al.*, 2020; NIU *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2013). Contudo, alguns entraves tecnológicos são notáveis nesses reatores, visto que, não foram desenvolvidos exclusivamente para operar com o processo de desamonificação, levando em conta as características das bactérias envolvidas no processo. Entre esses entraves, cita-se: zonas mortas, limitação na transferência de oxigênio, problemas de retenção de biomassa no sistema, longos períodos para partida do processo, cisalhamento dos grânulos e complexidade no controle operacional (DE PRÁ *et al.*, 2021).

Uma nova configuração de reator foi criada para tratar efluentes com alto teor de nitrogênio amoniacal com base nos problemas operacionais desses reatores e nas peculiaridades fisiológicas das bactérias Anammox e BOA. O reator NITRAMMOX® (Patente nº BR 20 2019 000.395 8, EMBRAPA., 2018) foi criado para operar em um único estágio, resultando em menores custos operacionais e maior simplicidade. Em um procedimento de estágio único, as duas bactérias responsáveis pelo processo de desamonificação são favorecidas, evitando problemas com lavagem de biomassa, inibição de OD e cisalhamento de grânulos. O sistema experimental está apresentado na Figura 3.

O NITRAMMOX® foi validado em escala de laboratório com volume de 8 litros, (DE PRÁ, 2017). O reator foi desenvolvido para operar em uma única etapa de desamonificação, visando favorecer ambos os grupos de bactérias responsáveis pelo processo (oxidadoras de amônia e Anammox), a alimentação do sistema ocorre de forma contínua e apresenta agitação pneumática objetivando a agitação e homogeneização no interior do reator, sendo que a idealização dele se baseia nos conceitos de reator *airlift* acoplado a um separador trifásico.

Figura 3 - Representação esquemática do sistema experimental do reator Nitrammox®



Fonte: De Prá (2017)

O protótipo está em fase de transferência de tecnologia, e apesar de bons resultados apresentados em escala de bancada, alguns entraves foram encontrados durante a fase de *scale-up*. Dentre esses problemas, destaca-se a formação de biofilme nas paredes do reator NITRAMMOX® e decantadores ocasionado por bactérias nitrificantes e heterotróficas, sendo este, um problema relatado com alta frequência (VENTURIN, 2022). Observa-se que mesmo com os avanços na engenharia do reator, a população microbiana indesejada segue sendo um problema, por isso, o uso de fagos juntamente com a tecnologia NITRAMMOX®, mostra-se interessante do ponto de vista econômico e de eficiência na remoção global de N.

2.4 População microbiana em sistemas de desamonificação

O processo de desamonificação aplicado a efluentes que apresentam baixa relação C/N se mostra promissor, porém, esses efluentes podem apresentar um remanescente de carbono, que não é utilizado no metabolismo das bactérias Anammox e gera crescimento de bactérias competidoras de substrato.

As bactérias heterotróficas, em sua maioria, são aeróbias facultativas. Na presença de oxigênio, utilizam o oxigênio como aceptor final de elétrons. Já em ambiente anóxico utilizam nitrato ou nitrito, consumindo matéria orgânica, como doador de elétrons, para obtenção de energia e fontes de carbono. Se forem

heterotróficas anaeróbias utilizam o carbono orgânico como aceptor de elétrons (VAN LOOSDRECHT; JETTEN, 1998)

As BHDA apresentam alta taxa de crescimento, sendo que o tempo de duplicação celular pode ser de aproximadamente 15 a 30 minutos em algumas espécies. As enzimas necessárias para o uso de NO_3^- e NO_2^- são formadas rapidamente em condições anóxicas (GERARDI, 2006). As bactérias heterotróficas presentes em sistemas de desamonificação, pertencem a diferentes filos sendo as mais comuns as pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, e *Thiobacillus*, (GABRIEL BITTON, 2005; SANT'ANNA JR, 2011). Para cultivo das BHDA, objetivou-se o isolamento do gênero *Pseudomonas*, pois apresentam grande predominância nos sistemas de desamonificação (DU *et al.*, 2020; VIANCELLI *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2021)

As bactérias oxidadoras de nitrito convertem o NO_2^- em NO_3^- , onde o nitrito é remanescente do metabolismo das bactérias oxidadoras de amônia é posteriormente utilizado pelas Anammox. Porém ao favorecer as BON o nitrito será convertido em nitrato, consumindo o nitrito para o metabolismo das Anammox, além de que a presença de nitrato pode ser fonte de substrato ou aceptor de elétrons para BHDA. Sendo assim, é importante controlar as BON, para que não se sobressaiam no sistema. Algumas oxidadoras de nitrito, em fase exponencial de crescimento, apresentam um rápido tempo de geração, de 8 a 12 horas, podendo variar entre espécies (SPIECK; LIPSKI, 2011).

As características físico-químicas das águas residuais podem variar em função do processo produtivo e da origem, por isso, em função da composição do efluente o processo de tratamento pode se apresentar mais ou menos eficiente (KUNZ *et al.*, 2019). Visando a remoção do nitrogênio presente nos efluentes com baixa relação C/N, não é possível generalizar uma única estratégia para seleção somente das BOA, visto as diferenças fisiológicas entre as BON e BHDA. O uso de parâmetros operacionais pode ser falho, uma vez que ao favorecer um grupo microbiano (BOA) em detrimento de outro (BHDA e BON), pode-se afetar negativamente organismos não alvos. Assim o uso de bacteriófagos se mostra interessante, uma vez que são vírus de alta especificidade, causando lise somente da bactéria alvo.

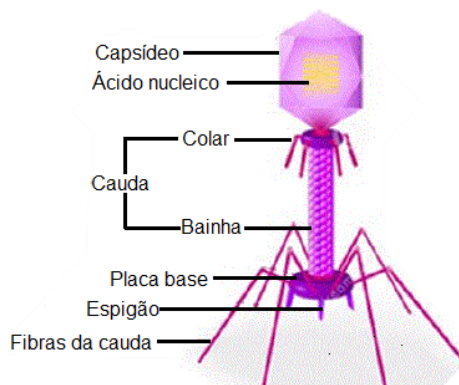
Em sistemas de tratamento de águas residuais, os bacteriófagos são organismos numerosos e diversos. O uso de bacteriófagos em estações de tratamento, podem se relacionar ao controle microbiano de espécies não desejáveis, tanto patogênicas, como as que afetam o sistema de remoção de nutrientes, entre estas, cita-se as causadoras de espuma e as filamentosas, que geram um aumento de lodo e as BON e BHDA, objeto de estudo deste trabalho.

2.5 Bacteriófagos

Os vírus apresentam constituição não celular e são parasitas intracelulares obrigatórios, dessa forma, se diferem das bactérias. Estão entre os organismos mais diversos e numerosos da Terra, sendo relatados pela primeira vez no final do século 19 (HUSSAIN *et al.*, 2021). O material genético dos vírus pode ser composto de DNA ou RNA, a organização da fita pode ser simples ou dupla, linear ou circular e segmentada ou não. O capsídeo é a capa proteica que protege o material genético dos vírus, outros apresentam um envelope, formado por uma camada de proteínas e lipídeos adicionais, que também serve de proteção (MADIGAN *et al.*, 2016). Na Figura 4 é possível observar uma representação esquemática de um bacteriófago.

Os bacteriófagos foram descritos pela primeira vez em 1917, por Felix D'Herelle. A descoberta ocorreu em virtude da observação de filtrados de esgoto, onde o pesquisador identificou um agente capaz de eliminar as bactérias pertencentes ao gênero *Shigella*, causadoras da doença disenteria, atribuindo ao final, a natureza viral desse agente (BRÜSSOW, 2013).

Figura 4 - Representação esquemática de um bacteriófago



Fonte: Mansour, (2018) (Adaptado)

Por volta de 1910, D'Hérelle, já havia identificado um fenômeno igual ao anterior, ele observou que a doença que ocorreu entre as tropas francesas era causada pelo gênero *Bacillus*, detectado em fezes de pessoas doentes. Em seus experimentos, espalhou essa bactéria sob placas de Petri, contendo meio ágar, para posteriormente isolá-las. Através disso ele observou que, enquanto as bactérias cresciam e cobriam a superfície da placa, também surgiam algumas manchas circulares onde não ocorria crescimento, as quais ele denominou *taches vierges* (placas de lise). A partir destes resultados, D'Hérelle, atribuiu o fenômeno a ação à um grupo de vírus que veio a denominá-los de bacteriófagos, nome que sugere “vírus que comem as bactérias” (SULAKVELIDZE; ALAVIDZE; MORRIS, 2001).

Numerosas outras investigações no campo da medicina foram realizadas, depois que D'Hérelle demonstrou no primeiro experimento com humanos que a injeção de fagos contra a infecção bacteriana tinha resultados muito favoráveis. Medicamentos terapêuticos com fagos como o principal agente ativo contra a mais ampla diversidade de infecções estavam sendo produzidos por corporações privadas. A maior parte do mundo ocidental parou de produzir medicamentos fágicos comerciais devido à eficácia duvidosa de vários tratamentos com fagos e ao desenvolvimento de antibióticos. No entanto, a Europa Oriental e a antiga União Soviética continuaram a usar fagos para fins médicos (MYELNIKOV, 2018).

Bactérias patogênicas resistentes a antibióticos tornaram-se uma séria ameaça à saúde pública, especialmente para idosos, crianças e pessoas com sistema imunológico comprometido (ASLAM *et al.*, 2018; VENTOLA, 2015). A situação torna-se ainda mais preocupante devido ao aumento de até 1.000 vezes na resistência a biocidas de vários microrganismos comumente utilizados (CORNELISSEN *et al.*, 2011).

Pseudomonas é um dos gêneros Gram-negativos mais frequentemente isolados em diversos casos de infecção, causando problemas sérios, sendo a espécie *Pseudomonas aeruginosa* uma das espécies mais problemáticas no âmbito da resistência antimicrobiana. Esta bactéria tem uma capacidade inata de aderir a superfícies e formar biofilmes virulentos, tornando-os persistentes e particularmente difíceis de erradicar (LANGENDONK; NEILL; FOTHERGILL, 2021).

Ao contrário do desenvolvimento de resistência aos antibióticos quimioterápicos por parte das bactérias, os bacteriófagos estão constantemente

evoluindo para contornar as barreiras impostas pelo hospedeiro à infecção. Isto leva a um equilíbrio evolutivo permitindo a proliferação tanto dos agentes infecciosos quanto de seus hospedeiros (LOC CARRILLO *et al.*, 2005).

Ao infectar a bactéria, os bacteriófagos podem se reproduzir de duas formas; através do ciclo lítico ou lisogênico. No ciclo lítico, o bacteriófago causa lise e destruição do hospedeiro, através da liberação de novas partículas virais com potencial de ligação a novas células bacterianas. Na forma lisogênica, o material genético dos bacteriófagos é integrado ao genoma da bactéria hospedeira, permanecendo num estado de repouso, conhecido como prófago. Esse material replica-se de forma concomitante à duplicação do genoma da bactéria hospedeira (MATHIEU *et al.*, 2019).

Na literatura ainda são descritos outros dois tipos de ciclo: pseudolisogênico e crônico. Alguns fagos virulentos têm a capacidade de mudar seu ciclo lítico para um ciclo pseudolisogênico, no qual o fago não se integra necessariamente ao DNA do hospedeiro (ciclo lisogênico) e nem causa a lise celular (ciclo lítico) (CENENS *et al.*, 2013). Um exemplo disso, é quando o fago infecta uma célula enquanto ela esporula. Apesar de não ser expresso em células com esporos, o DNA do fago parece ser mantido como DNA livre no endósporo em crescimento (GABIATTI *et al.*, 2018). Já o ciclo crônico, ocorre quando uma célula bacteriana é infectada e a progênie viral é constantemente liberada por brotamento ou extrusão sem causar a lise celular do hospedeiro (SIEIRO *et al.*, 2020).

O ciclo de fagos líticos, os quais são de maior interessa na aplicação para controle de crescimento bacteriano, pode se dividir em quatro etapas principais (SALMOND; FINERAN, 2015; YOUNG, 2013):

1. Adsorção: Começa com o vírus procurando um hospedeiro vivo e, quando o faz, aderindo à superfície da célula bacteriana. A adsorção ocorre como resultado do fago reconhecer e se adaptar a um "receptor", que é uma molécula específica. Acredita-se que esse processo controle a especificidade do hospedeiro do fago, que por sua vez depende dos tipos e características estruturais dos receptores encontrados na superfície da célula bacteriana (BERTOZZI SILVA; STORMS; SAUVAGEAU, 2016). Além de serem fortemente influenciadas pela forma e composição da parede celular da superfície celular do hospedeiro, a natureza

dessas moléculas receptoras varia dependendo dos vários grupos taxonômicos (LETAROV; KULIKOV, 2017).

Dentro dos grupos bioquímicos mais comum de receptores estão as proteínas da superfície, polissacarídeos e lipopolissacarídeos. A acessibilidade e a distribuição espacial da molécula receptora na superfície celular, bem como sua presença ou ausência, afetam a eficácia com que o fago infecta o hospedeiro (LETAROV; KULIKOV, 2018). Um dos critérios originais que define a cinética da infecção do fago é a interação única entre a proteína do fago que se liga ao receptor e o próprio receptor na superfície da célula bacteriana (DĄBROWSKA, 2019).

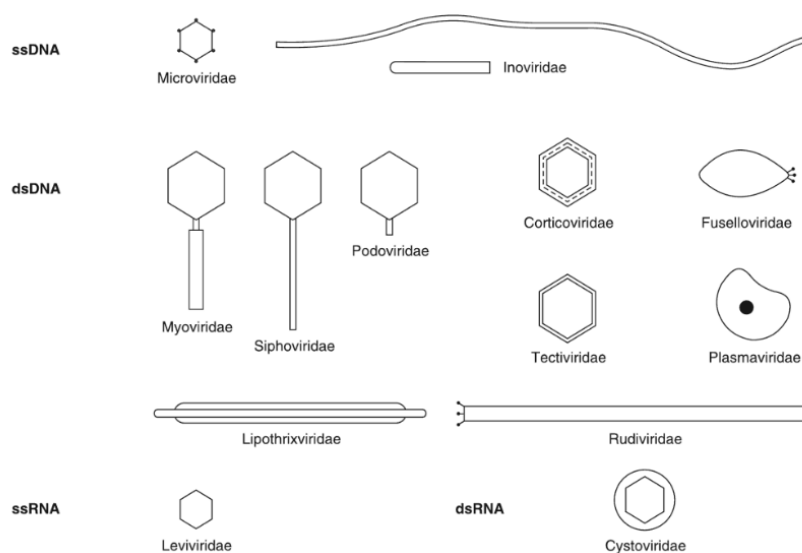
Além disso, um dos mecanismos principais de resistência de bactérias frente aos fagos, ocorre pela alteração da disponibilidade de seus receptores, ou somente, bloqueando o acesso dos fagos a eles. Por outro lado, também foi observado que os fagos têm a capacidade de serem mais flexíveis em sua capacidade de adsorção, incluindo a expansão de seu espectro de hospedeiros com base na disponibilidade de receptores alternativos (ERIKSEN; MITARAI; SNEPPEN, 2020).

2. Injeção do ácido nucleico: A penetração do ácido nucleico ocorre após enzimas “perfurarem” a parede bacteriana, sendo estas, produzidas principalmente, nas fibras da cauda do fago. O capsídeo permanece no exterior da célula, à medida que o ácido nucleico é inserido para o interior da célula (CLOKIE *et al.*, 2011).
3. Maturação: Através dos mecanismos de síntese da própria célula infectada, ocorre a produção e montagem de novas partículas virais. Já no interior da bactéria, ocorre a síntese das primeiras proteínas, sendo essas, voltadas para o “desligamento” dos sistemas da própria bactéria e a imediata replicação do genoma do fago. As proteínas expressas na sequência são envolvidas na formação das novas partículas virais e na lise do hospedeiro. Por fim, tem-se a montagem da cabeça e cauda do fago seguida do empacotamento do seu genoma (DOSS *et al.*, 2017).
4. Lise: Nessa etapa ocorre a saída da progênie viral, através da lise celular, dando início a busca por um novo hospedeiro. Mesmo durante a fase de maturação do fago ocorre a expressão dos genes que codificam para proteínas líticas

preparando-se, desta forma, para uma eventual liberação das partículas virais formadas (YOUNG; GILL, 2015).

Os bacteriófagos exibem morfologia ampla, disposta em um capsídeo viral, com formato de icosaedro, podendo conter DNA (nesse caso de fita dupla ou simples) ou RNA. A disposição das proteínas em torno do material genético, é utilizada como forma de diferenciar os bacteriófagos, podendo ser classificado em icosaédricos, helicoidais ou filamentosos. A estrutura é definida pelas proteínas de envelope, que possuem como função proteger o material genético; além disso, a estrutura da cauda possui receptores que são responsáveis por reconhecer sítios de ligação nas bactérias alvo (CLARK; MARCH, 2006). Na Figura 5 é mostrado a classificação dos bacteriófagos conforme sua morfologia e tipo de ácido nucleico.

Figura 5 - Diferentes morfologias de bacteriófagos divididos conforme tipos de ácidos nucleicos: ssDNA (DNA de fita simples), dsDNA (DNA de fita dupla), ssRNA (RNA de fita simples), dsRNA (RNA de fita dupla).



Fonte: Ackermann (2009)

A relação entre os bacteriófagos e seus respectivos hospedeiros impacta de forma direta o equilíbrio ambiental, em decorrência da mortalidade das bactérias seletivas (PARMAR *et al.*, 2018). Quando essa relação é alterada, podem ocorrer mudanças nos ciclos do nitrogênio e do carbono, e alteração nos processos industriais, como, a produção de alimentos e medicamentos destinado à saúde

humana. Sendo assim, compreender a interação entre bacteriófagos e bactérias é relevante, tanto no quesito ambiental quanto clínico (MADIGAN *et al.*, 2016).

O controle do crescimento microbiano se faz importante em ambientes como sistemas de tratamento biológico de efluentes (Anammox/desamonificação), em que se deseja a predominância de determinado grupo bacteriano em relação a outro. Isso também é requerido em processos de remoção de nutrientes por lodo ativado, destacando o processo de nitrificação. A competição biológica também é observada nesses processos, em que as bactérias oxidadoras de amônia e oxidadoras de nitrito podem afetar o processo (BURGESS *et al.*, 2002).

A boa decantabilidade do lodo biológico se mostra vital ao equilíbrio e eficiência final do processo de remoção de nutrientes. O excessivo número de bactérias filamentosas, é um problema operacional comum e recorrente, desencadeando o fenômeno de *bulking* e formação excessiva de espuma (MADONI; DAVOLI; GIBIN, 2000). O equilíbrio correto entre bactérias formadoras de flocos e os microrganismos filamentosos responsáveis pelos problemas com a separação de sólidos, é necessário. No entanto, nenhum dos métodos são totalmente adequados. A desinfecção, por exemplo, pode resultar na mortalidade de grupos funcionais importantes, como as nitrificantes.

Os bacteriófagos podem ser aplicados nesses sistemas visando o controle dessas bactérias indesejadas (LIU *et al.*, 2015). Em um trabalho desenvolvido por Liu *et al.*, (2017), observou-se uma redução das bactérias nitrificantes das famílias Nitrosomonadaceae e Nitrospiraceae, enquanto uma maior abundância de *contigs* virais (segmentos de sequências de DNA contíguas), foi observada, o que implica que a lise mediada por bacteriófagos pode reduzir a nitrificação em estações de tratamento de efluentes (LIU *et al.*, 2017). Em outro estudo, observou-se um aumento na concentração de NO_2^- no efluente, tal fato ocorreu após a dosagem de bacteriófagos isolados de águas residuais (ZHANG; HUNT; HU, 2013b).

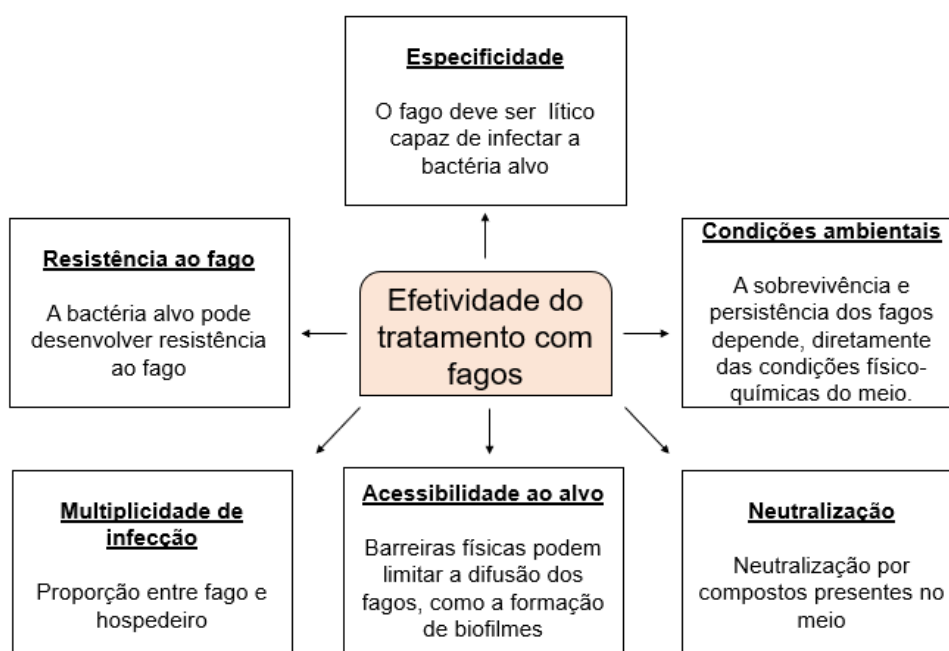
O uso de bacteriófagos como agentes antimicrobianos, tende a ser um método eficaz e promissor, mostrando vantagens quando comparado com outros métodos. Os bacteriófagos são autolimitantes, ou seja, somente se replicam na presença da bactéria hospedeira, podem ser administrados em dose única e não promovem efeitos paralelos indesejáveis (CLOKIE *et al.*, 2011).

2.6 Desafio no uso de bacteriófagos como ferramentas de biocontrole

A efetividade do tratamento de fagos como agentes de biocontrole, é um dos aspectos mais importantes. Para tal, é necessário mais do que apenas isolar o fago para o organismo almejado, é preciso garantir que todo o processo de aplicação, desde dosagem até a adsorção do fago nos receptores certos e a continuação de seu ciclo lítico sejam conduzidos de forma eficiente.

Os fatores apresentados na Figura 6 são passíveis de ocorrerem em um reator biológico de desamonificação, por isso, entender como o fago se comporta frente a estes aspectos é importante, visando sua eficácia no combate a bactérias indesejáveis no sistema.

Figura 6 - Fatores que interferem a efetividade do uso de fagos para biocontrole



Fonte: Ly-Chatain, (2014) (Adaptado)

A replicação do bacteriófago *in situ* depende da capacidade deste sobreviver em situações adversas e proteger seu genoma. Para que ocorra a reprodução, o fago precisa acessar livremente o hospedeiro para iniciar o processo de infecção tornando a bactéria uma unidade formadora de progênie (PRINCIPI; SILVESTRI; ESPOSITO, 2019). A eficiência da infecção pode ser influenciada por vários fatores, incluindo condições físico-químicas (pH, temperatura, íons etc.); a presença de

barreiras físicas que dificultem o acesso ao alvo; concentração viral (proporção bacteriófago-bactéria); especificidade na lise e infecção da bactéria alvo; e resistência bacteriana (LY-CHATAIN, 2014).

Fatores físico-químicos referentes ao ambiente, como, temperatura, acidez, salinidade, pH e a presença de determinados íons, afetam a ocorrência, viabilidade e manutenção dos bacteriófagos, sendo causadores da inativação desses vírus, por danos causados à sua estrutura física, perda lipídica e/ou mudanças na estrutura do DNA (JOŃCZYK-MATYSIAK *et al.*, 2019)

Embora os fagos possam sobreviver em quase todos os ambientes da Terra e sejam resistentes a muitas situações prejudiciais, vários estudos revelaram que, mesmo que possam sobreviver, seu ciclo reprodutivo ainda pode ser significativamente afetado. Em pH menor que 4,5 a proliferação de muitos fagos é limitada e, dependendo da duração da exposição, mesmo níveis de pH ligeiramente mais altos podem tornar as partículas virais inativas (JOŃCZYK *et al.*, 2011).

A temperatura é outro fator crucial para a sobrevivência dos fagos. Em temperaturas abaixo do ideal, menos material genético do fago penetra na célula hospedeira bacteriana; portanto, é menos provável que participe da fase de multiplicação (JOŃCZYK-MATYSIAK *et al.*, 2019) . Temperaturas mais altas podem estender a duração do período de incubação (TEY *et al.*, 2009). Além disso, a temperatura determina a ocorrência, viabilidade e armazenamento dos fagos.

A atividade lítica da endolisina LysH5 (ativa contra *Staphylococcus aureus*) foi melhor em pH 7,0 e 37°C, e foi sensível a altas temperaturas (OBESO *et al.*, 2008). A endolisina CP25L do bacteriófago *Clostridium perfringens* manteve-se estável a 4°C durante vários meses, mesmo após incubação durante 30 minutos a 37°C ou 45°C. No entanto, a atividade lítica foi totalmente eliminada por incubação a 65°C por 30 minutos, 42°C durante a noite ou pasteurização a 72°C por 20 segundos (GERVASI *et al.*, 2014). Semelhante, à endolisina de *Pseudomonas aeruginosa*, foi altamente estável, uma vez que manteve sua atividade máxima após 1 hora de incubação a 80°C e só foi totalmente inativada após 40 minutos a 100°C (GUO *et al.*, 2017). Entender como os fagos se comportam frente aos fatores ambientais, é importante quando se objetiva sua aplicação em escala real.

A proporção entre o vírus e a bactéria alvo é determinada pelo termo MOI (multiplicidade de infecção), que condiz à quantidade de fagos adicionada por célula durante a infecção (ABEDON, 2016). Em teoria, o fago é adicionado ao sistema em

quantidades suficientes para infectar e provocar morte celular de toda população microbiana já existente em um curto espaço de tempo. O tratamento em prática, implica na adição de menores quantidade iniciais de fago, o qual irá se replicar ao mesmo tempo que começa a lise das bactérias alvo, conforme o ciclo lítico do vírus for acontecendo (HASSAN *et al.*, 2021). Para determinar corretamente o MOI, é preciso levar em consideração o ciclo de replicação e a resistência frente as condições ambientais do meio onde será aplicado do fago.

A infecção ao alvo inicia pela ligação do bacteriófago a receptores específicos na superfície das bactérias, sendo a especificidade umas das características mais importantes. Alguns fagos possuem baixo espectro de infecção, enquanto outros são de amplo espectro, o que resulta em infectar muitas cepas de bactérias de espécies únicas ou múltiplas (WITTEBOLE; DE ROOCK; OPAL, 2014). É justamente esta especificidade em relação ao hospedeiro um fator fundamental no sucesso no uso de fagos para controle biológico (MATHIEU *et al.*, 2019).

Os fagos não se locomovem de forma independente, já que não possuem mecanismos para tal, seu transporte no meio depende de sua adsorção aos organismos presentes. Isso se torna um fator limitante à atividade dos bacteriófagos uma vez que se for adsorvido a um receptor impróprio, é provável que isso influencie negativamente sua difusão pelo meio (LOC-CARRILLO; ABEDON, 2011). A difusão de fagos também é afetada pelos biofilmes, isso se dá pela fase de crescimento do hospedeiro. Células bacterianas ativas crescem o processo de difusão do fago no biofilme, pois, eles aumentam a proliferação proporcionalmente ao crescimento, enquanto células mortas adsorvem grande número de fagos e, assim, interferem na difusão (AMANKWAH; ABDUSEMED; KASSA, 2021).

A resistência por parte da bactéria é outro aspecto relevante, capaz de impedir que o fago complete seu ciclo lítico. É comum que em ambientes naturais as bactérias apresentem múltiplas barreiras anti-fagos (EGIDO *et al.*, 2022). Este é um processo natural que mantém o equilíbrio ecológicos nos ecossistemas. Um dos mecanismos de defesa desenvolvido pelas bactérias é bloquear os receptores de fagos na superfície celular. Isso ocorre através da criação de fatores que se liguem aos sítios das moléculas receptoras ou de adaptações na estrutura tridimensional das moléculas (SEED *et al.*, 2012). As matrizes extracelulares também são mecanismos que impedem o acesso dos fagos aos receptores, servindo de barreiras

físicas de proteção não apenas contra fagos, com outros fatores de risco (SHENG; YU; LI, 2010).

A bactéria pode também impedir a entrada do DNA do fago após ele se ligar ao receptor, isso se dá por proteínas que conferem imunidade a bactéria através do bloqueio da entrada do fago (ROSTØL; MARRAFFINI, 2019). Sistemas de modificação, restrição ou sistemas CRISPR-Cas das bactérias, também degradam determinadas sequências do DNA do fago impedindo a continuação do ciclo lítico. Além disso, em situações extremas, a bactéria utiliza do sistema abortivo de infecção, o qual promove a morte do fago, porém, resulta na morte da própria bactéria (ABEDON, 2017).

Para enfrentar os mecanismos que conferem resistência à infecção por fagos, pode-se utilizar de um coquetel de bacteriófagos, comumente utilizado em ambientes com maior variedade de espécies bacterianas (PRINCIPI; SILVESTRI; ESPOSITO, 2019). Em um estudo conduzido por Liu *et al.*, (2015), quatro bacteriófagos foram isolados de um sistema de lodos ativados. Um coquetel usando os quatro fagos reduziu significativamente o gênero *Gordonia* (responsável pela geração de espuma em estações de tratamento de efluentes), resultando em um processo dez vezes mais satisfatório do que reatores sem nenhum tratamento (LIU *et al.*, 2015b).

Considerando a multiplicidade de fatores que interferem direta ou indiretamente na eficiência do uso de fagos para controle microbiano nos mais diversos ambientes, incluindo sistemas de tratamento de efluentes, fica clara a necessidade de desenvolver tecnologias que garantam a eficácia do tratamento.

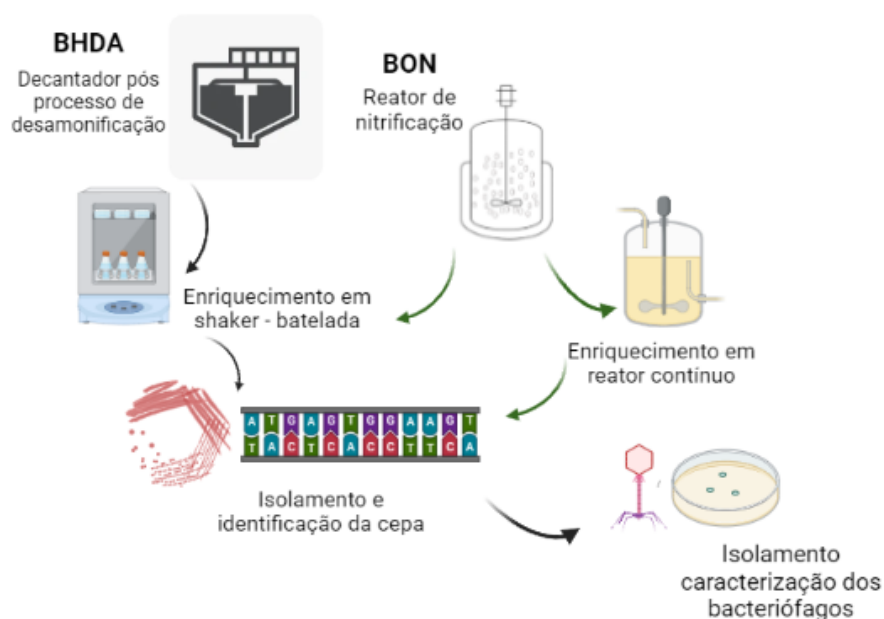
3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Experimentação e Análises Ambientais (LEAA) da Embrapa Suínos e Aves, unidade descentralizada da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, Concórdia/SC, no Laboratório de Biotecnologia Ambiental e Alimentos (LABIA) e no Laboratório de Bioprocessos (LAPRO) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná/Campus Dois Vizinhos.

3.1 Enriquecimento, isolamento, cultivo e manutenção de cepas bacterianas

Na Figura 7 é apresentado o esquema experimental desse trabalho, elucidando isolamento e caracterização das bactérias e bacteriófago. Na sequência cada etapa será descrita com mais detalhes.

Figura 7 - Esquema do isolamento de bactéria e bacteriófago



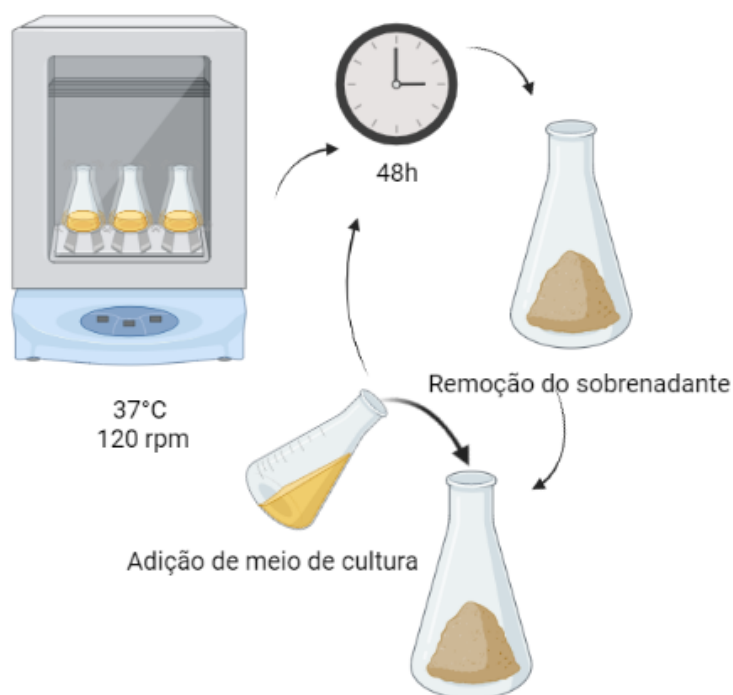
Fonte: Autoria própria (2023)

3.1.1 Enriquecimento de linhagens bacterianas de BHDA – Cultivo em batelada

Para cultivo de linhagens de BHDA, utilizou-se do meio líquido à base nitrato de sódio e acetato de sódio, conforme observado na Tabela 1 (ZHAO *et al.*, 2018). O

crescimento aeróbio, foi realizado em incubadora *shaker* (Solab - SL-222) à 37°C e 120 rpm, sendo que o inóculo utilizado foi proveniente de um decantador pós processo de desamonificação (alimentado com efluente suíno pós processo de biodigestão anaeróbia). O cultivo foi realizado em erlenmeyer de 200 mL de volume útil, sendo a proporção de inóculo de 30% (v/v). A troca do meio de cultura foi realizada a cada 48 horas, sendo que se aguardava a completa decantação do lodo, retirava-se o sobrenadante e completava-se o volume até 200 mL, como observado na Figura 8.

Figura 8 - Esquema do enriquecimento de linhagens bacteriana heterotróficas



Fonte: Autoria própria (2023)

Tabela 1 - Composição do meio sintético para bactérias heterotróficas (continua)

Nutriente	Concentração (g L ⁻¹)
NaNO ₃	0,2
CH ₃ COONa	0,2
KH ₂ PO ₄	1,24
K ₂ HPO ₄	4,78
NaCl	4
Solução de elementos traço	3 mL L ⁻¹

Tabela 1 – Composição do meio sintético para bactérias heterotróficas (conclusão)

Solução de elementos traço	Concentração (g L ⁻¹)
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3
MnSO ₄ ·H ₂ O	3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	3
CaCl ₂	0,6
H ₃ BO ₃	1,12
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,3

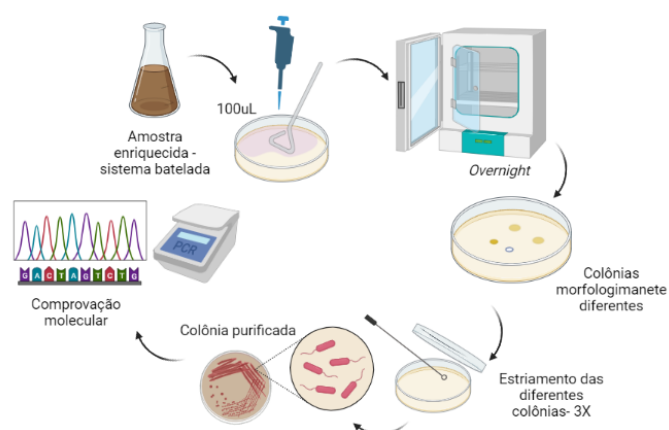
*Variável conforme aumento da concentração

Fonte: Zhao *et al.*, (2018) (Adaptado)

3.1.2 Isolamento e identificação de Linhagens Bacterianas de BHDA

Para o isolamento de linhagens de BHDA por meio de cultivo sólido, através de plaqueamento, foi utilizado *Plate Count Agar* (PCA) (Kasvi), na camada ágar base. Realizou-se a técnica de espalhamento da amostra bruta enriquecida (proveniente do cultivo em batelada). Após cultivo *overnight* (12 horas) diferenciou-se morfologicamente as colônias, posterior a isso, as diferentes colônias foram coletadas e estriadas. Repetiu-se o processo por 3 vezes, a fim de se garantir a especificidade e purificação da colônia. Na Figura 9 está descrito o esquema experimental de isolamento e identificação da cultura bacteriana.

Figura 9 - Metodologia para isolamento e identificação da cepa bacteriana



Fonte: Autoria própria (2023)

A extração de DNA a partir das colônias bacterianas que crescerem em meio sólido seletivo, foi realizada com a utilização do Kit Comercial PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (DIAS BIERHALS *et al.*, 2020). Após a extração, o DNA foi submetido a técnica de amplificação de PCR16s, utilizando o Termociclador Modelo Veriti 96-Well Thermal Cycler, contendo as reações de 25 µL: 2,5 µL de Tampão 10X, 0,3 µL de Taq (5U/µL), 1µL de MgCl₂ (Promega – 25 mM), 2 µL de cada primer (27F-5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' e 1492R- 5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3') (DOS SANTOS *et al.*, 2019), 1µL de dNTP (2mM), 3µL de DNA (10ng/µL) e 13,2 µL de água para completar os 25 µL. As condições da PCR foram de 5 minutos a 94°C, seguidos de 30 ciclos de: 95 °C por 1 minutos, 57 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto.

Em seguida, a concentração do DNA foi aferida por meio de espectrofotometria e em gel agarose (1,5%), a fim de se verificar a integridade do material genético utilizado. O sequenciamento de Sanger foi realizado em sequenciador ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Os resultados foram analisados no programa Phred/Phrap/Consed/Polyphred para verificação da qualidade e montagem das sequências, a fim de identificar a espécie isolada.

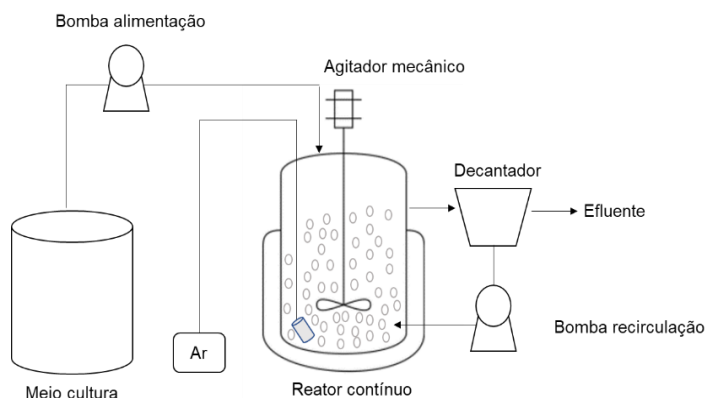
3.1.2.1 Teste de sensibilidade a antibióticos

A sensibilidade da cepa isolada a diferentes antibióticos foi testada a partir do método de difusão segundo Kirby-Bauer (BEARGIE; BRACKEN; RILEY, 1965). O antibiograma de difusão de disco foi realizado utilizando-se sete antimicrobianos da fabricante Cecon, sendo estes e suas respectivas concentrações: Penicilina 10U.L; Ciprofloxacina – 5mcg; Gentamicina – 10mcg; Levofloxacina – 5mcg; Cloranfenicol – 30mcg; Vancomicina – 30mcg e Azitromicina – 15mcg. Com um *swab* estéril realizou-se a inoculação da bactéria, a qual estava em cultura líquida em concentração média de 10⁸ UFC mL⁻¹ na superfície do ágar *Mueller-Hinton*. Realizou-se a aplicação dos discos com auxílio de uma pinça estéril. Todos os discos foram pressionados suavemente para o contato total com a superfície do ágar. As placas foram incubadas a 37°C por um período de 24 horas. Posteriormente, o diâmetro do halo de inibição foi medido com auxílio de uma régua.

3.1.3 Enriquecimento de linhagens bacterianas de BON – Sistema contínuo

Para o cultivo em meio líquido em sistema contínuo das BON, utilizou-se um reator de 4 litros, com tempo de retenção hidráulica (TRH) de 11 horas, sendo alimentado continuamente com meio sintético à base de nitrito de sódio (NaNO_2), à uma concentração de $100 \text{ mgNaNO}_2 \text{ L}^{-1}$, conforme Tabela 1. O reator operou com agitação mecânica, controle de temperatura (25°C) e sistema de aeração (2 a $3 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$). A vazão de alimentação e recirculação (4,5 vezes) foi controlada por bomba peristáltica. O reator foi inoculado com 30% de lodo (com atividade específica de $2,5 \text{ mgNaNO}_2/\text{gSSVh}$) oriundo de um reator nitrificante operando em escala plena com o processo de nitrificação/desnitrificação, que trata efluente suinícola proveniente de um sistema de biodigestão anaeróbia. Um esquema experimental pode ser observado na Figura 10.

Figura 10 - Esquema experimental e imagem do reator contínuo



Fonte: Autoria própria (2023)

O acompanhamento das concentrações das espécies nitrogenadas permite inferir a presença das oxidadoras de nitrito no sistema. Para monitoramento do processo, analisou-se a entrada de nitrito, e a saída de nitrito e nitrato do sistema.

3.1.4 Enriquecimento de linhagens bacterianas de BON – Sistema batelada

Para o cultivo batelada em meio líquido das bactérias do gênero *Nitrobacter*, utilizou-se como meio reacional erlenmeyer (JOSSERAND; CLEYET-MAREL, 1979). O cultivo foi realizado em *shaker* (Lucadema – Luca-222), com temperatura e agitação controlada, sendo 25°C e 150 rpm, respectivamente. O sistema foi alimentado com o meio sintético à base de nitrito de sódio, em diferentes concentrações, em duplicata (100; 300 e 1000 mg de $\text{NaNO}_2 \text{ L}^{-1}$), conforme Tabela 2. A troca do meio de cultura foi realizada a cada 48 horas, sendo que se aguardava a completa decantação do lodo, retirava-se o sobrenadante e completava-se o volume até 200 ml. O inóculo foi obtido de duas fontes: (i) a partir de uma amostra de um biorreator em escala laboratorial de nitrificação/desnitrificação (lodo i), alimentado com efluente da suinocultura e; (ii) do reator contínuo descrito no item 3.1.3 (lodo ii). A proporção de inóculo foi de 30% (v/v). Para monitoramento do processo, quantificou-se as concentrações de entrada e a saída de nitrito e nitrato do sistema.

Figura 11 - Sistema experimental batelada utilizado no enriquecimento de bactérias oxidadoras de nitrito



Fonte: Autoria própria (2023)

Tabela 2 - Composição do meio sintético utilizado para enriquecimento de bactérias oxidadoras de nitrito

Nutriente	Concentração (g L⁻¹)
NaNO ₂	0,49*
K ₂ HPO ₄	0,5
NaCl	0,3
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
MnSO ₄ .H ₂ O	0,002
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,005
KH ₂ PO ₄	0,25

***Variável conforme a concentração desejada**

Fonte: ATCC (American Type Culture Collection)

3.1.5 Isolamento e identificação molecular de linhagens bacterianas de BON

Para a etapa de isolamento, utilizou-se cultivo sólido, através de plaqueamento em ágar Noble (JOSSERAND; CLEYET-MAREL, 1979), em temperatura de 28°C (BOCK; SUNDERMEYER-KLINGER; STACKEBRANDT, 1983). O plaqueamento em meio sólido foi realizado utilizando-se alíquotas do sistema em batelada, pois foi o que melhor apresentou resultados de conversão de nitrito em nitrato. Após o crescimento, as colônias foram selecionadas e plaqueadas por estriamento novamente para garantir sua purificação.

Para a comprovação da espécie isolada, utilizou-se da técnica de RT-PCR. Para isso, extraiu-se DNA das colônias do meio sólido a partir de lise térmica (DIAS BIERHALS *et al.*, 2020). A técnica foi realizada no equipamento *7500 Fast Real-Time* da Thermo Fisher, contendo reações de 15 µL: 7,5 µL de SYBR Green (Promega), 1 µL de cada primer (Nitro-1198F; 5'- TCACCCAGTCGCTGACC-3' e Nitro 1423R; 5'- TCACCCAGTCGCTGACC-3') (GRAHAM *et al.*, 2007), 2 µL de DNA e 3,5 µL de água ultrapura para completar a reação. As seguintes configurações de ciclos foram utilizadas: Um ciclo inicial de desnaturação a 95 °C por 2 minutos, trinta ciclos a 95°C por 15 s, 58 °C por 15 s, 1 minuto a 60 °C, 95 °C por 30 s e a última etapa foi de 15 s a 60 °C.

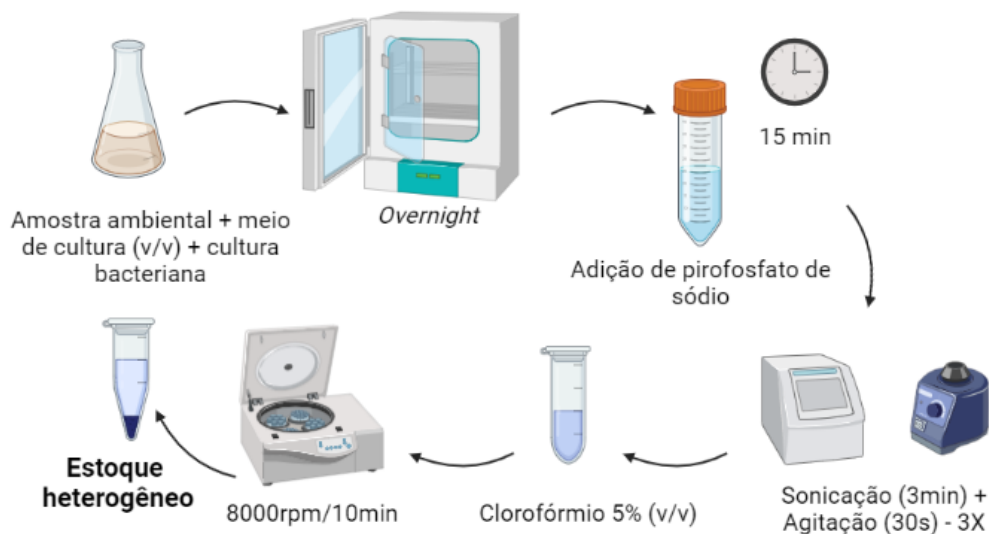
3.2 Obtenção dos bacteriófagos

3.2.1 Preparação do Estoque Heterogêneo de bacteriófagos

Para tentativa de isolamento dos bacteriófagos cujo alvo são as cepas de BON utilizou-se de amostras provindas de reatores biológicos de nitrificação, que tratam efluente suinícola, provindo do processo de biodigestão anaeróbia. Junto ao meio base de nitrito de sódio (Tabela 1) misturou-se porções de efluente em uma proporção de 1:1 (v/v), juntamente com a cultura de bactérias hospedeiras, sendo essa, enriquecida durante à noite, a 28°C e agitação de 160 rpm. Para bacteriófagos cujos as BHDA são hospedeiras, utilizou-se uma amostra de esgoto, coletado no sistema de esgoto da UTFPR/Dois Vizinhos. Uma alíquota do esgoto foi misturada com caldo nutritivo em uma proporção de 1:1 (v/v), juntamente com a cultura bacteriana e enriquecimento *overnight* (14 horas), a 37 °C e agitação de 160 rpm (GABIATTI, 2018).

Posterior a isso, foi realizada a adição de pirofosfato de sódio até que se atingisse a concentração final de 5mM, seguidos de 15 minutos de incubação protegido da luz, a temperatura ambiente. Em seguida, a suspensão passou por 30 segundos de agitação e 3 minutos de sonicação, repetidos 3 vezes (DANOVARO; MIDDELBOE, 2010). Então, 1 mL foi transferido para um microtubo, onde se adicionou 5% (v/v) de clorofórmio. O conteúdo foi centrifugado à 10000 rpm por 8 minutos e o sobrenadante foi coletado em um novo microtubo para posteriores ensaios. Na Figura 12 é possível observar resumidamente o passo a passo do preparo do estoque heterogêneo.

Figura 12 - Preparo do estoque heterogêneo



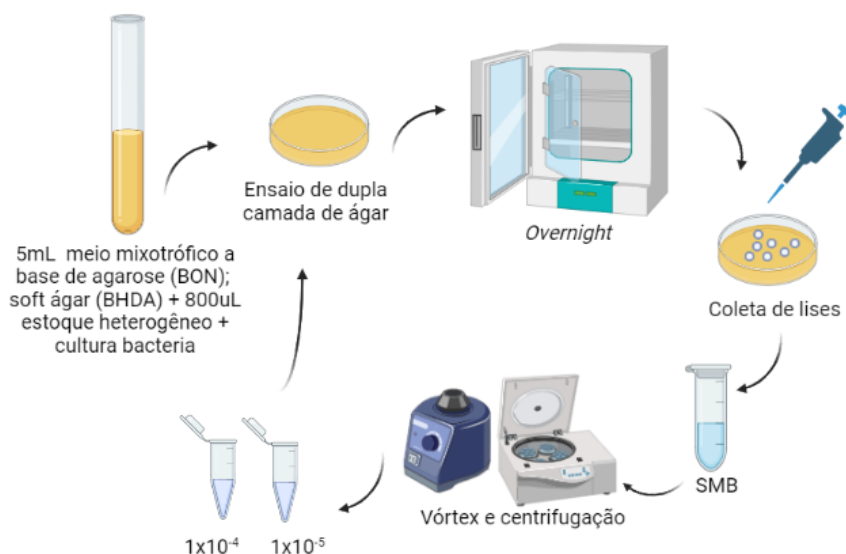
Fonte: Autoria própria (2023)

3.2.2 Isolamento dos bacteriófagos

Para plaqueamento do sobrenadante, utilizou-se o método de dupla camada de ágar (ADAMS, 1959), sendo que meio mixotrófico a base de agarose (para cada 1000 mL de água destilada - 0,2 g NaNO_2 , 0,15 g extrato de levedura e 0,2 g de peptona) (SPIECK; LIPSKI, 2011) foi utilizado na camada superior para as BON. Para as BHDA utilizou-se *soft ágar* (4 g de triptona bacteriana, 3,6 g de ágar, 2 g KCl e 400 mL de água destilada) na camada superior.

O teste de dupla camada de ágar permite o contato fago-hospedeiro localizado em um ambiente limitado (Placa de Petri) contendo duas camadas de ágar, uma sobre a outra. A camada inferior é preparada como meio suporte ao crescimento bacteriano contendo de 1 a 1,5% de ágar. A camada superior contém o mesmo meio com menor concentração de ágar (0,4 a 0,6%) comumente chamado de *soft ágar* (ABEDON; YIN, 2009), sendo esse misturado com a bactéria hospedeira e despejado na camada inferior, resultando no chamado “tapete” microbiano. Na Figura 13 é possível observar o processo de isolamento dos fagos.

Figura 13 - Processo de isolamento de bacteriófagos



Fonte: Autoria própria (2023)

Alíquotas de 800 µL do estoque heterogêneo de fagos foram inoculados em 5mL de meio (mixotrófico para as BON e *soft* ágar para as BHDA, já contendo cerca de 500µL de uma cultura da bactéria hospedeira e disposto em banho quente, a 45 °C. Em seguida o meio foi vertido sobre o ágar base, permitindo sua solidificação e então as placas de BON e BHDA foram incubadas a 28 °C e 37 °C respectivamente (GABIATTI, 2018). No dia seguinte, a presença de placas de lise foi observada.

As lises observadas para as BHDA foram coletadas com o auxílio de uma ponteira e transferidos para um microtubo contendo SMB (*Salt-magnesium buffer*) - 5,8 g de NaCl, 1,2 g de MgSO₄, 50 mL de Tris HCl pH 7,5 (1M), 0,1g de gelatina incolor e 1L de água destilada). Após, a solução passou por agitação em vórtex e centrifugação à 8000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi diluído em série em SMB (1:10) até a concentração de 10^{-4} e 10^{-5} , onde foram feitos novos ensaios de dupla camada de ágar com estas diluições, seguidos de à 37°C *overnight* (12 horas).

3.2.3 Purificação dos bacteriófagos

O bacteriófago isolado foi purificado através de três plaqueamentos sucessivos, com seleção de placas de lise únicas em cada um, de acordo com procedimento padrão (SAMBROOK *et al*, 1989). Em uma nova etapa de

concentração adicionou-se polietilenoglicol 8000 (PEG-8000) na concentração de 10% (p/v) com incubação a 4 °C durante 24 horas (COLOMBET *et al.*, 2007)

Os estoques finais dos bacteriófagos isolados foram enumerados através da contagem de placas de lise em placa de dupla camada de ágar (unidade formadora de placa/mL), mantidos a 4 °C em SMB e periodicamente renovados através de enriquecimento com o hospedeiro de produção (GABIATTI, 2018).

3.3 Caracterização do bacteriófago isolado

3.3.1 Espectro de hospedeiro e eficiência de plaqueamento (EOP)

O *Drop Spot Test* é o primeiro passo na determinação de quais bactérias o fago é capaz de infectar (KUTTER, 2009). Nessa etapa, uma gota (10 µL) da suspensão de fagos foi depositada na camada superior de uma placa de dupla camada de ágar, onde a bactéria foi adicionada ao *soft ágar* e incubada *overnight* (12 horas). O EOP refere-se ao número de placas de lise referente a uma determinada bactéria hospedeira. O teste determina a eficiência do plaqueamento do fago.

3.3.2 Teste de inibição bacteriana em cultura líquida

Testes em cultivo líquido foram realizados com o intuito de demonstrar o potencial inibitório dos bacteriófagos no crescimento das bactérias hospedeiras. Estes experimentos também são uma forma de confirmar o espectro de hospedeiros de um bacteriófago. Os experimentos, em batelada, foram conduzidos em placas de 96 poços onde a densidade ótica (OD600) foi monitorada. Cada poço foi inoculado com a bactéria em fase de crescimento exponencial, em uma concentração próxima a 10⁸ UFC/ml. Diferentes multiplicidades de infecção, que são as concentrações relativas entre bacteriófagos e bactérias, foram testadas (1, 0,1 e 0,01).

O leitor de placas Victor Nivo™ PerkinElmer foi configurado com os seguintes parâmetros: 600 nm, 37 °C, 8 horas de processo, com agitação de 2s antes das leituras, as quais serão realizadas a cada 30 min desde o tempo zero.

3.4 Métodos analíticos

3.4.1 Nitrito e Nitrato

Na determinação de NO_2^- optou-se por utilizar o método colorimétrico em um sistema de análise por injeção em fluxo adaptado de Rice *et al.*, (2016). Para tanto, utilizou-se um sistema multicanal FIALab – 2500 com cabos de fibra óptica (SMA 200 mm) que ligam a célula de reação ao espectrofotômetro (Ocean-optics S2000 – escala óptica de 200 a 850 nm). Como carreador foi utilizada água destilada e como reagente colorimétrico uma solução contendo sulfanilamida, ácido ortofosfórico e n-1-naftiletilenodiamina dihidracloreto, sendo todos reagente grau P.A. Exclusivamente para a determinação de N-NO_3^- utilizou-se uma coluna com aproximadamente 5,0 g de cádmio para redução do NO_3^- a NO_2^- e uma solução de cloreto de amônio e EDTA sal dissódico como reagente tampão. A quantificação é feita plotando-se os resultados de absorvância obtida para as amostras na curva de calibração construída com a leitura de soluções padrão de concentração conhecida dos analitos. A faixa de trabalho utilizada foi de 0,1 a 2,0 e 0,1 a 3,0 mg L^{-1} para N-NO_2^- e N-NO_3^- , respectivamente.

3.4.2 pH

As determinações de pH foram realizadas com potenciômetro da marca HANNA, modelo HI8424 com eletrodo de pH e calibrado segundo os procedimentos descritos por Rice *et al.*, (2016), com soluções tampão de pH 7,0 e 4,0 da marca Merck.

3.4.3 Oxigênio dissolvido

As determinações de oxigênio dissolvido foram realizadas com medidor de oxigênio dissolvido, da marca YSI, modelo 200A EcoSense.

3.4.4 Sólidos suspensos totais, fixos e voláteis

Para a determinação de sólidos suspensos utilizou-se metodologia descrita em Rice *et al.*, (2016). As amostras foram filtradas em um filtro de 0,45 µm utilizando um cadinho de Gooch, secas em estufa a 105 °C por uma hora para determinação de sólidos suspensos totais (SST) e calcinadas em mufla a 550 °C por 30 minutos para a determinação de sólidos suspensos fixos (SSF). Os sólidos suspensos voláteis (SSV) foram determinados por diferença entre SST e SSF.

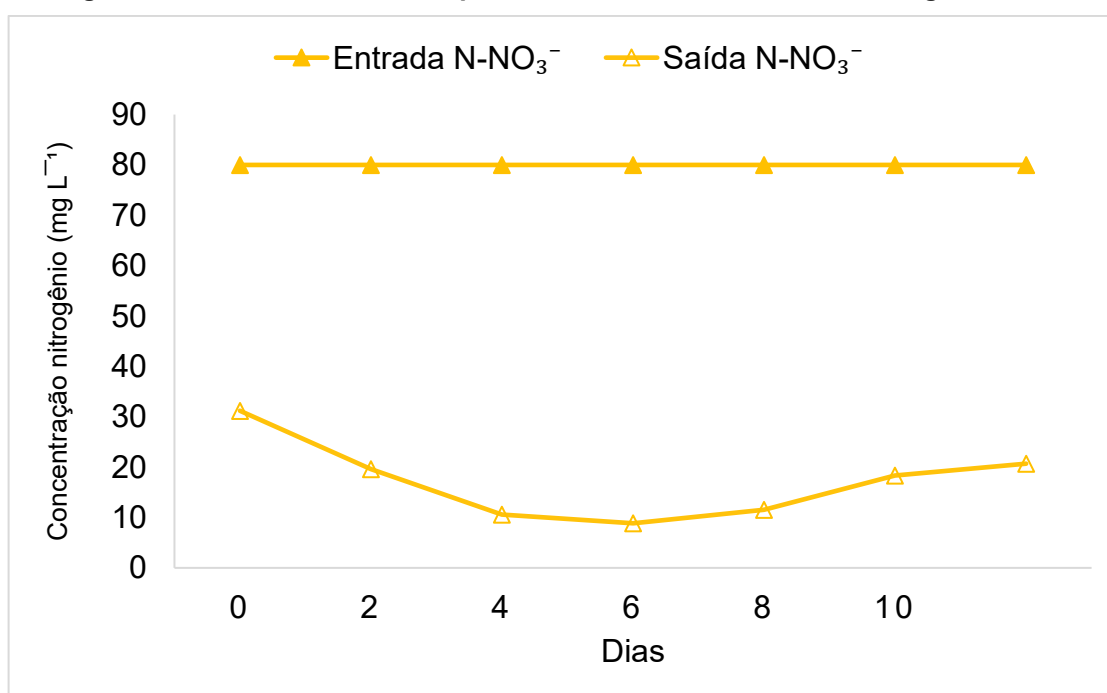
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ativação e produção de bactérias BHDA

4.1.1 Enriquecimento e caracterização de BHDA em cultivo batelada

Visando o isolamento de uma bactéria heterotrófica aeróbia desnitrificante, utilizou-se como substratos principais carbono orgânico e nitrato. Isso porque a desnitrificação aeróbia refere-se à desnitrificação realizada por desnitrificadores aeróbios na presença de oxigênio, onde o oxigênio e o nitrato são utilizados simultaneamente como aceptores de elétrons (YANG *et al.*, 2020). Na Figura 14 pode-se observar o consumo de nitrato ao longo da batelada experimental.

Figura 14 - Consumo de nitrato pelas bactérias heterotróficas ao longo dos dias



Fonte: Autoria própria (2023)

Para acelerar o enriquecimento e favorecer a predominância de espécies heterotróficas aeróbias, optou-se por utilizar como inóculo lodo de um decantador pós reator de desamonificação, no qual, já era esperado que se tivesse presença desses organismos. Diferentes ambientes já foram reportados como local de isolamento dessas bactérias, como lagoas, solos, sedimentos de rios, lodos ativados etc. Os exemplos incluem *Acinetobacter junii* e *Klebsiella pneumonia* de lodos

ativados (LI *et al.*, 2019; PADHI *et al.*, 2013; RAJTA *et al.*, 2020), *Paracoccus denitrificans* isolados de águas residuais (MEDHI *et al.*, 2017), diferentes cepas de *Pseudomonas stutzeri* foram isoladas de estação de tratamento de efluentes (ZHAO *et al.*, 2018), lodos ativados (QING *et al.*, 2018) e reservatórios de água (HUANG *et al.*, 2015; KANG *et al.*, 2018).

A saída média de nitrato durante o experimento foi de $17,25 \pm 7,75 \text{ mg L}^{-1}$, representando um consumo de 79,5%. Bactérias heterotróficas apresentam um baixo tempo de duplicação (CUA; STEIN, 2014; HEYLEN *et al.*, 2006), o que culminou em um baixo tempo de enriquecimento no presente estudo. Zhao *et al.* (2018), ao isolar uma *Pseudomonas stutzeri* (isolada de um sistema de tratamento de efluentes suinícola) obteve uma eficiência de remoção de 97,9%. Já a espécie *Paracoccus denitrificans* ATCC 35512 reduziu 27% do nitrato adicionado a N_2 na presença de oxigênio (SU; TAKAYA; SHOUN, 2014). Em um estudo desenvolvido por Zhang *et al.*, (2019), a cepa *Pseudomonas mendocina* isolada de um *wetland*, removeu 95,6% do nitrato quando inoculada em um efluente de estação de tratamento de esgoto (ZHANG *et al.*, 2019b).

A relação C/N é outro ponto fundamental para o isolamento das BHDA, sendo essa, uma medida da proporção de doador de elétrons para acceptor. Se houver menos carbono presente, o fluxo de elétrons é incapaz de fornecer a energia necessária para o crescimento celular. No entanto, um aumento na taxa de desnitrificação é relativamente limitado se a quantidade de carbono orgânico estiver acima da concentração ideal (RAJTA *et al.*, 2020).

No presente trabalho, a relação C/N foi de 2,5 (200 mg L^{-1} de acetato de sódio e 80 mg L^{-1} de nitrato de sódio). Estudos relatam que relações C/N variando de 2,6 a 6 permitiram a redução completa do nitrato (CHIU; CHUNG, 2003; VAN RIJN; TAL; SCHREIER, 2006), entretanto, outros trabalhos relatam que a relação C/N ideal para a maioria das bactérias heterotróficas está na faixa de 8 a 10 (JOO; HIRAI; SHODA, 2006; KIM *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2018).

Em uma relação C/N de 9, utilizando a cepa *Pseudomonas putida*, a remoção de nitrato foi de 57,6% em comparação a concentração inicial de 114,5 mg L^{-1} (WANG *et al.*, 2007). Já Mohan *et al.*, (2016), utilizando como fonte de inóculo lodo ativado de um tanque de aeração, trabalharam com uma relação C/N de 1,5. Essa, foi considerada ótima para a desnitrificação de efluentes com nitrato, tendo o acetato como fonte de carbono (KRISHNA MOHAN *et al.*, 2016). Zhao *et al.*, (2010) e He *et*

al., (2018) relataram uma relação C/N de 15 para a maior taxa de remoção de nitrato por *Bacillus sp.* e *Pseudomonas taiwanensis* respectivamente, usando glicose (HE *et al.*, 2018; ZHAO; HE; ZHANG, 2010). Zhang *et al.*, (2019) utilizando a cepa *Pseudomonas putida* ZN1, concluíram que a relação C/N de 16 com citrato como fonte de carbono era mais propícia para a remoção de nitrogênio (ZHANG *et al.*, 2019a).

A relação C/N utilizada nesse trabalho foi satisfatória para o isolamento de uma cepa desnitrificante heterotrófica aeróbia, entretanto, poderia se obter uma maior porcentagem de conversão de nitrato, caso o valor da relação carbono viesse a aumentar e/ou outra fonte de carbono fosse escolhida. Como observado, diferentes valores são reportados na literatura, esses valores variam conforme a espécie da bactéria e a fonte de carbono escolhida.

4.1.2 Isolamento de linhagens BHDA e identificação

Pseudomonas é um gênero imensamente diverso mostrando uma grande variedade de habilidades metabólicas, uma ampla distribuição ecológica e adaptabilidade a uma variedade de nichos ambientais (DODD, 2014). São aeróbias, com metabolismo respiratório onde o oxigênio é o aceptor final de elétrons, móveis por um ou mais flagelos polares e bastonetes retos a curvos com 1,5 a 5,0 μm de comprimento e 0,5 a 1,0 μm de diâmetro, além de serem quimiorganotróficos (COUSIN, 1999). Na Figura 15 é possível observar as colônias isoladas do lodo do decantador pós processo de desamonificação.

Para isolamento de uma cepa de *Pseudomonas*, utilizou-se meio à base de peptona, cloreto de magnésio, sulfato de potássio, irgasan e ágar. O irgasan serviu como um agente antibactericida aos demais microrganismos presentes no lodo, pois, as *Pseudomonas* são resistentes ao fármaco (CHUANCHUEN *et al.*, 2001; HUANG *et al.*, 2016). Após isolamento e comprovação do isolado, a cultura passou a ser cultivada em meio PCA. A morfologia desse gênero é caracterizada por colônias grandes, opacas e planas com margens irregulares e colônias de odor distintamente frutado.

Figura 15 - Colônias de *Pseudomonas* isoladas a partir do cultivo em batelada



Fonte: Autoria própria (2023)

A fim de identificar a espécie na colônia isolada, a técnica de PCR16s e sequenciamento de Sanger foram empregadas. A sequência amplificada (Apêndice A) mostrou 99,83% de identidade com a cepa *Pseudomonas monteilii* (CIP 104883) como observado na Figura 16.

Figura 16 – Resultado obtido na plataforma *Blast* do NCBI

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy				
Sequences producing significant alignments								
<input checked="" type="checkbox"/> select all 100 sequences selected		Download		Select columns				
		Show 100						
		GenBank	Graphics	Distance tree of results				
		MSA Viewer						
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas monteilii strain CIP 104883 16S ribosomal RNA, partial sequence	Pseudomonas monteilii	2226	3403	100%	0.0	99.83%	1517	NR_024910.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas monteilii strain NBRC 103158 16S ribosomal RNA, partial sequence	Pseudomonas monteilii	2222	3394	100%	0.0	99.75%	1462	NR_114224.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas plecoglossicida strain NBRC 103162 16S ribosomal RNA, partial sequence	Pseudomonas plecoglo...	2215	3392	100%	0.0	99.67%	1462	NR_114226.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas monteilii strain CIP 104883 16S ribosomal RNA, partial sequence	Pseudomonas monteilii	2215	3381	100%	0.0	99.59%	1503	NR_112073.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas plecoglossicida strain FPC951 16S ribosomal RNA, partial sequence	Pseudomonas plecoglo...	2215	3392	100%	0.0	99.67%	1498	NR_024662.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas taiwanensis DSM 21245 strain BCRC 17751 16S ribosomal RNA, partial sequence	Pseudomonas taiwanen...	2215	3387	100%	0.0	99.67%	1469	NR_116172.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas entomophila L48 16S ribosomal RNA, partial sequence	Pseudomonas entomop...	2204	3370	100%	0.0	99.50%	1526	NR_102854.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas putida strain ATCC 12633 16S ribosomal RNA, partial sequence	Pseudomonas putida	2194	3333	100%	0.0	99.34%	1492	NR_114479.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas putida strain NBRC 14164 16S ribosomal RNA, partial sequence	Pseudomonas putida	2194	3333	100%	0.0	99.34%	1462	NR_113651.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas putida strain ICMP 2758 16S ribosomal RNA, partial sequence	Pseudomonas putida	2193	3331	100%	0.0	99.34%	1371	NR_114794.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas oryzihabitans strain L-1 16S ribosomal RNA, partial sequence	Pseudomonas oryzihabi...	2193	3326	100%	0.0	99.34%	1527	NR_025881.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas entomophila L48 16S ribosomal RNA, partial sequence	Pseudomonas entomop...	2189	3353	100%	0.0	99.17%	1515	NR_115336.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas aestus strain CMAA1215 16S ribosomal RNA, partial sequence	Pseudomonas aestus	2187	3376	100%	0.0	99.26%	1526	NR_169429.1

Fonte: NCBI (National Center for Biotechnology Information)

Essa cepa foi identificada primeiramente em amostras clínicas (ELOMARI *et al.*, 1997), porém, desde então raramente foi isolado dessa fonte (FERREIRA *et al.*, 2011). A maioria dos isolados são ambientais, incluindo cepas resistentes do ambiente hospitalar. Embora seja considerado um colonizador e patógeno potencial, seu status como patógeno humano não é claro (SHARIFF; BERI, 2017).

P. monteilli está intimamente relacionada com *Pseudomonas putida* (BOGAERTS *et al.*, 2011). *P. Putida* é capaz de realizar nitrificação heterotrófica e desnitrificação aeróbia podendo remover eficientemente amônia, nitrato e nitrito (XU *et al.*, 2017), além de remover outros poluentes (CHEN *et al.*, 2016; JOHN; RAJAN, 2022).

Até o momento nenhum fago de *P.monteilli* foi relatado na literatura, entretanto, já se tem relatos de fagos para *P.putida* (CORNELISSEN *et al.*, 2011; DELFAN *et al.*, 2012; QUESADA; SORIANO; ESPINOSA-URGEL, 2012). Vale ressaltar que fagos dessas duas espécies amplamente relacionadas, recebem menos foco em comparação com fagos que infectam outras *Pseudomonas*, devido aos impactos clínicos e econômicos que essas outras espécies têm sobre os seres humanos (MAGILL *et al.*, 2017).

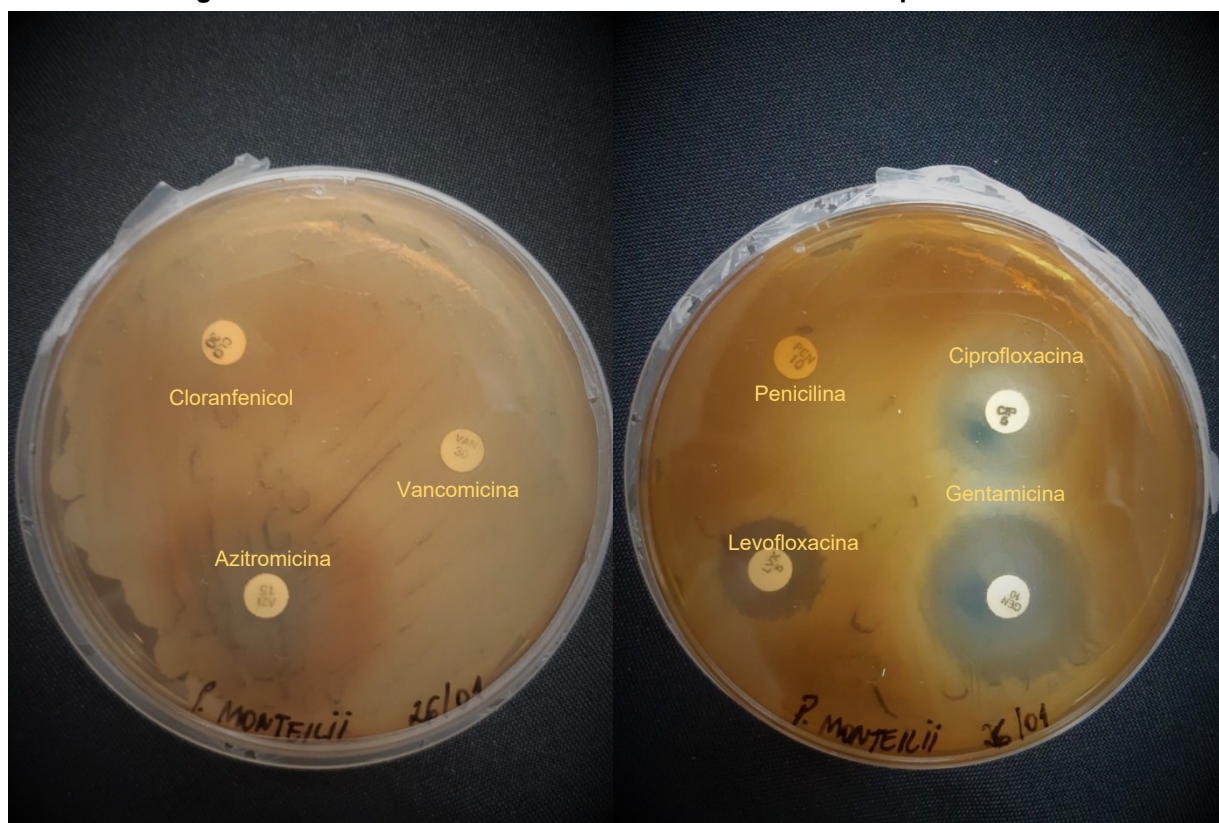
Muitos dos trabalhos que abordam a microbiologia em processos de desamonificação, o discutem em nível de filo e gênero comumente (AL-HAZMI *et al.*, 2021; KIM *et al.*, 2023; PODMIRSEG *et al.*, 2022). O gênero *Pseudomonas* pertencem ao filo Proteobacteria, sendo esse comumente relatado como principal causador de consumo heterotrófico nos sistemas de desamonificação (BONASSA *et al.*, 2022; CHINI *et al.*, 2019, 2020). Apesar de não haver relatos da espécie aqui isolada em processos de desamonificação, reitera-se a importância de que a predominância desse gênero é alta. Esse estudo é uma prova de conceito, vale ressaltar ainda que a comunidade microbiana presente nos sistemas de desamonificação, varia em função do tipo de efluente tratado e condições operacionais.

4.1.3 Teste de antibiograma

Um dos maiores problemas de saúde pública no século XXI é a resistência microbiana aos antibióticos. Acredita-se que bactérias resistentes a antibióticos sejam responsáveis por 23.000 mortes anuais nos Estados Unidos e 25.000 na

Europa. A situação é semelhante em todo o mundo, e até mesmo pior em países subdesenvolvidos, onde a alta taxa de doenças infecciosas é associada à rápida emergência de resistência microbiana (O'NEILL, 2016). Na Figura 23 é possível observar o teste de sensibilidade aos antibióticos da cepa *Pseudomonas monteilii*.

Figura 17 - Teste de sensibilidade a antibióticos com a cepa isolada



Fonte: Aatoria própria (2023)

Pseudomonas monteilii apresentou resistência contra 4 fármacos aqui testados, penicilina, vancomicina, azitromicina e cloranfenicol. Os antibióticos β -lactâmicos, incluindo penicilina e cloranfenicol, contêm um anel β -lactâmico em suas estruturas moleculares. Essa classe de antibióticos bloqueia a biossíntese da parede celular bacteriana, visando as proteínas de ligação à penicilina. A azitromicina apresenta bons resultados no combate a *Pseudomonas aeruginosa* quando combinada com outros fármacos (VERMA; VERMA, 2013), entretanto, a bomba de efluxo *MexCD-OprJ* confere resistência à azitromicina durante a formação do biofilme (PANG *et al.*, 2019). Já a vancomicina não é a primeira escolha para o

tratamento dos casos de *P. aeruginosa*, mas sua alta prescrição ocasionava a ocorrência de níveis excessivos de resistência (AHMADI *et al.*, 2016).

No Quadro 1, estão resumidos os dados encontrados a partir dos antibióticos testados contra a cepa isolada.

Quadro 1 - Teste de resistência à antibióticos

Antimicrobiano	Medida do halo	Sensível	Resistente
Gentamicina	8mm	X	
Ciprofloxacina	6mm	X	
Levofloxacina	4mm	X	
Penicilina			X
Vancomicina			X
Azitromicina			X
Cloranfenicol			X

Fonte: Autoria própria (2023)

Uma maior sensibilidade foi observada com o antibiótico gentamicina (halo de inibição maior), seguido de ciprofloxacina e levofloxacina, sendo esses reportados como principais agentes antimicrobianos de *Pseudomonas* (PACHORI; GOTHALWAL; GANDHI, 2019).

Os principais mecanismos de defesa empregados pela *P. aeruginosa* contra o ataque de antibióticos geralmente podem ser divididos em resistência intrínseca, adquirida e adaptativa. A baixa permeabilidade da membrana externa, o desenvolvimento de bombas de efluxo que expõem antibióticos da célula e a síntese de enzimas inativadoras de antibióticos são todos componentes da resistência intrínseca da *P. aeruginosa* (PANG *et al.*, 2019). A resistência adquirida pode ser alcançada por transferência horizontal de genes de resistência ou alterações mutacionais (BREIDENSTEIN; DE LA FUENTE-NÚÑEZ; HANCOCK, 2011). A resistência adaptativa envolve a formação de biofilme onde serve como uma barreira de difusão para limitar o acesso do antibiótico às células bacterianas (DRENKARD, 2003).

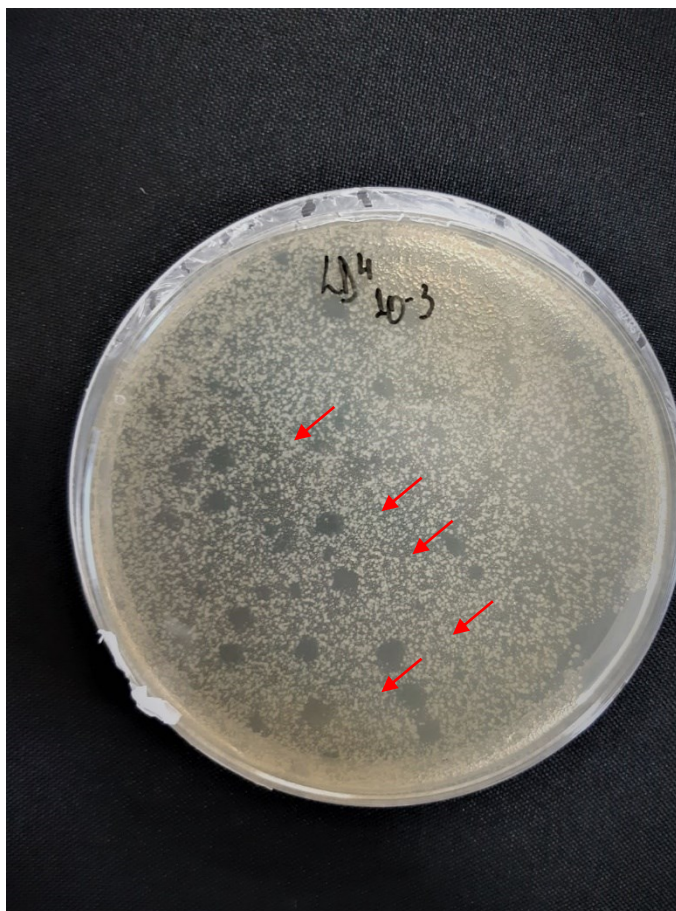
Comumente os trabalhos relatam a resistência em *Pseudomonas aeruginosa*, mas entender como isso se estende para outras espécies é importante do ponto de vista de saúde pública. Nesse caso o objetivo não é aplicar um antibiótico em um

reator de desamonificação, pois, afetaria outras espécies funcionais. Os resultados aqui encontrados servem para caracterizar a espécie isolada, e expandir seu controle em outros setores da sociedade.

4.2 Isolamento do bacteriófago para BHDA

Após enriquecimento da amostra de esgoto, o ensaio de dupla camada foi realizado para avaliar a possível presença de fagos. Na Figura 17 é possível observar a formação das placas de lise (halos transparentes), sendo indicativo da liberação da progênie de um fago.

Figura 18 - Placas de lise



Fonte: Autoria própria (2023)

O conhecimento sobre a morfologia de placas é necessário no estudo do comportamento do vírus. O aparecimento de zonas claras, é indicativo da presença de bacteriófagos de ciclo lítico (virulentos), enquanto placas turvas indicam a

presença de bacteriófagos de ciclo lisogênico (temperados) (JURCZAK-KUREK *et al.*, 2016).

Os bacteriófagos sobrevivem onde seus hospedeiros bacterianos são encontrados; assim, existem em quase todos os ambientes. O esgoto é um lugar favorável para a proliferação de diversas bactérias e bacteriófagos. O esgoto é um dos meios mais receptivos para o crescimento de fagos, pois, possui grande quantidade de material orgânico e não orgânico para a proliferação de hospedeiros bacteriano e isolamento de fagos (ALHARBI; ZIADI, 2021).

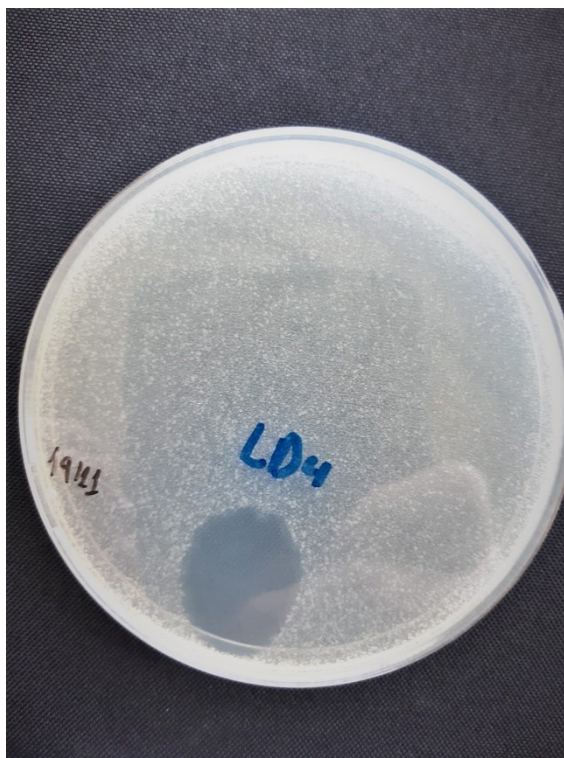
Em estudo desenvolvido por Jurczak-Kurek *et al.*, (2016) uma coleção de 83 bacteriófagos foram isolados de esgotos urbanos e capazes de se propagar em diferentes hospedeiros bacterianos (60 infectando *Escherichia coli*, 10 infectando *Pseudomonas aeruginosa*, 4 infectando *Salmonella enterica*, 3 infectando *Staphylococcus sciuri* e 6 infectado *Enterococcus faecalis*) (JURCZAK-KUREK *et al.*, 2016). Em uma estação de tratamento de águas residuais na Índia, o isolamento de fagos abordou o problema da formação de espuma (KHAIRNAR *et al.*, 2014), que é causada principalmente por bactérias filamentosas. Os fagos isolados interromperam o crescimento de uma ampla variedade de espécies filamentosas de *Nocardia*. Um estudo *in vitro* foi conduzido para avaliar a multiplicidade de hospedeiros de um único fago de *P. aeruginosa*, obtido de esgoto contra 34 cepas bacterianas. Aproximadamente seis cepas foram sensíveis: *P. aeruginosa*-37, *P. aeruginosa*-2995, *P. aeruginosa*-2949, *P. aeruginosa*-2941, *A.xylooxidans* e *E.coli* CR-061 (JAMAL *et al.*, 2017). Segundo Aghaee *et al.*, (2021) o esgoto e os ambientes contaminados por esgoto são as fontes mais confiáveis para isolamento de fagos de *Pseudomonas* (AGHAEE *et al.*, 2021).

4.2.1 Espectro de hospedeiro e eficiência de plaqueamento para BHDA

O espectro de hospedeiro é definido como a variedade de hospedeiros que um bacteriófago pode lisar (KUTTER, 2009). De fato, o espectro do hospedeiro é um aspecto crucial da fagoterapia, bem como da ecologia dos bacteriófagos. A maioria dos fagos descobertos até agora tende a ser monovalente ou tem um pequeno espectro de hospedeiros, infectando apenas algumas cepas de bactérias da mesma espécie.

O fago isolado no presente estudo teve seu espectro de hospedeiro analisado com a *Pseudomonas* isolada e, também, com a cepa de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium* e *Escherichia coli*. Entretanto, o fago mostrou-se capaz de infectar somente a cepa heterotrófica desnitrificante aeróbia, como demonstrado na Figura 18.

Figura 19 - Espectro de hospedeiro demonstrado pelo halo transparente na placa



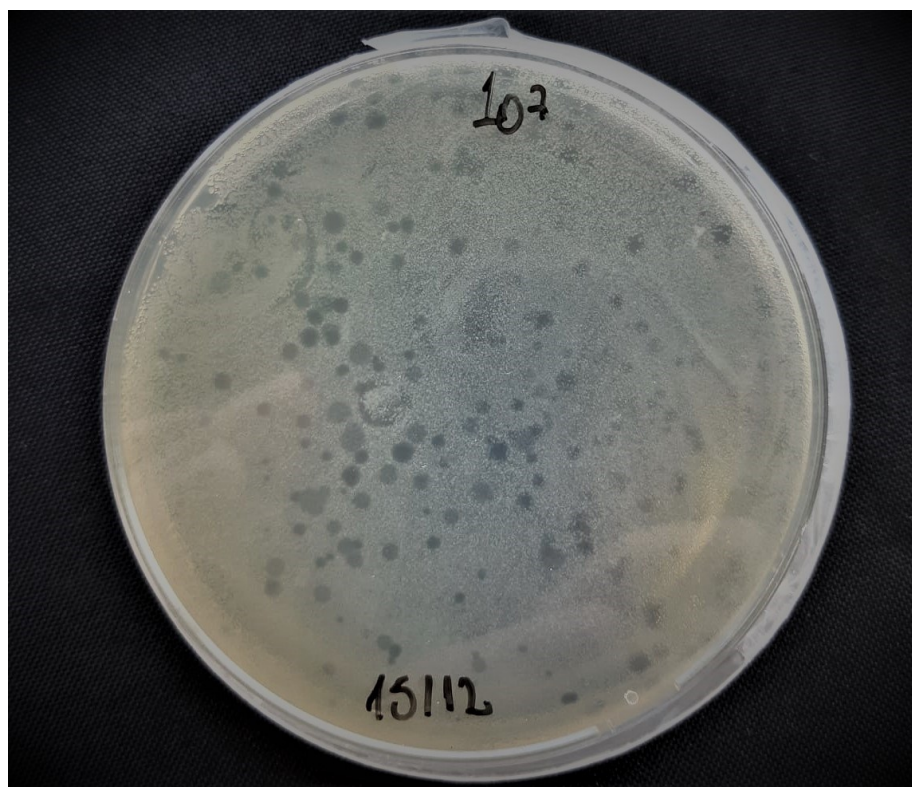
Fonte: Autoria própria (2023)

De acordo com uma revisão da literatura publicada em 2020, *P. aeruginosa*-2995, *P. aeruginosa*-2949, *P. aeruginosa*-3007, *P. aeruginosa*-3098, *P. aeruginosa*-3117 e *P. aeruginosa*-3088 eram todos suscetíveis ao fago MA-1, que foi isolado de águas residuais (ADNAN *et al.*, 2020). Esses achados sugerem que as células de *P. aeruginosa* e o desenvolvimento de biofilmes relacionados podem ser eliminados pelo fago MA-1; no entanto, pode ser melhor usar uma combinação de fagos para prevenir a resistência. Em outro estudo, os pesquisadores utilizaram uma mistura de bacteriófagos, phSE-5 e ELY-1, isolados de uma rede de esgoto. O coquetel de fagos foi usado para tratar enterobactérias patogênicas, sendo estas, *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*. A mistura de fagos exibiu maior atividade lítica contra *S. typhimurium* do que contra *E. coli* (COSTA *et al.*, 2019).

A alta eletividade do fago em relação a um hospedeiro pode se tornar uma estratégia mais viável sob condições de baixa diversidade de hospedeiros e alta densidade. No entanto, foi demonstrado que fagos menos específicos funcionam melhor em situações com populações microbianas variadas e conexões interespecíficas complexas (YU *et al.*, 2017).

Sendo assim, a eficiência de plaqueamento foi performada com o fago isolado e ensaios de dupla camada realizados para posterior contagem de placas de lise. Na Figura 19 é possível observar as placas de lise.

Figura 20 - Placas de lise observadas na última diluição



Fonte: Autoria própria (2023)

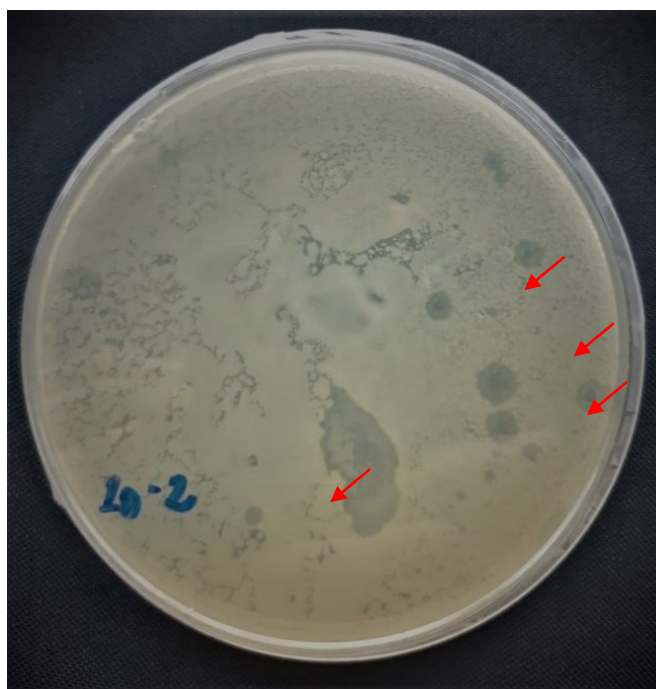
A última concentração que apresentou halos foi a de 10^{-7} , onde foi contabilizada 120 placas de lises. Sendo assim, obteve-se $1,2 \times 10^{10}$ PFU/mL (unidades formadoras de placa de lise/mL).

4.2.2 Purificação dos fagos

Diferentes métodos para purificação de fagos podem ser empregados, Burdin *et al.*, (2014) cita cromatografia, ultrafiltração e centrifugação. Além disso, os

autores utilizam três métodos alternativos: amplificação em fermentador, amplificação em um sistema descartável (*wave bag*) e concentração pelo polietilenoglicol (BOURDIN *et al.*, 2014). No isolamento de um fago para atuar no combate de *Pseudomonas aeruginosa*, os autores utilizaram PEG8000 junto com centrifugação em gradiente de densidade a 135000xg, por 42 horas a 4 °C (GAVRIC; KNEZEVIC, 2021). Na Figura 20 observa-se as lises presentes na diluição de 10^{-2} , sendo contabilizadas uma média de 13 lises, representando uma concentração de $1,3 \times 10^{-5}$ PFU/mL.

Figura 21 - Placas de lise observadas na última diluição pós concentração e purificação



Fonte: Aatoria própria (2023)

A salinidade é um fator ambiental que pode afetar a atividade fágica. No presente estudo, utilizou-se a metodologia de purificação e concentração dos fagos com a adição de NaCl e PEG, entretanto observou-se uma redução na formação de placas de lise posteriormente a essa etapa.

Diferentes relatos são encontrados na literatura de como os sais afetam a atividade dos bacteriófagos. Em soluções altamente concentradas de NaCl, os fagos de *Pseudomonas* (wy e ps1) apresentaram menor persistência. A viabilidade do fago ps1 foi reduzida em 99% quando diluída em 4 mol/L de NaCl, mas a viabilidade do fago wy foi reduzida apenas em 26% (WHITMAN; MARSHALL, 1971). A durabilidade

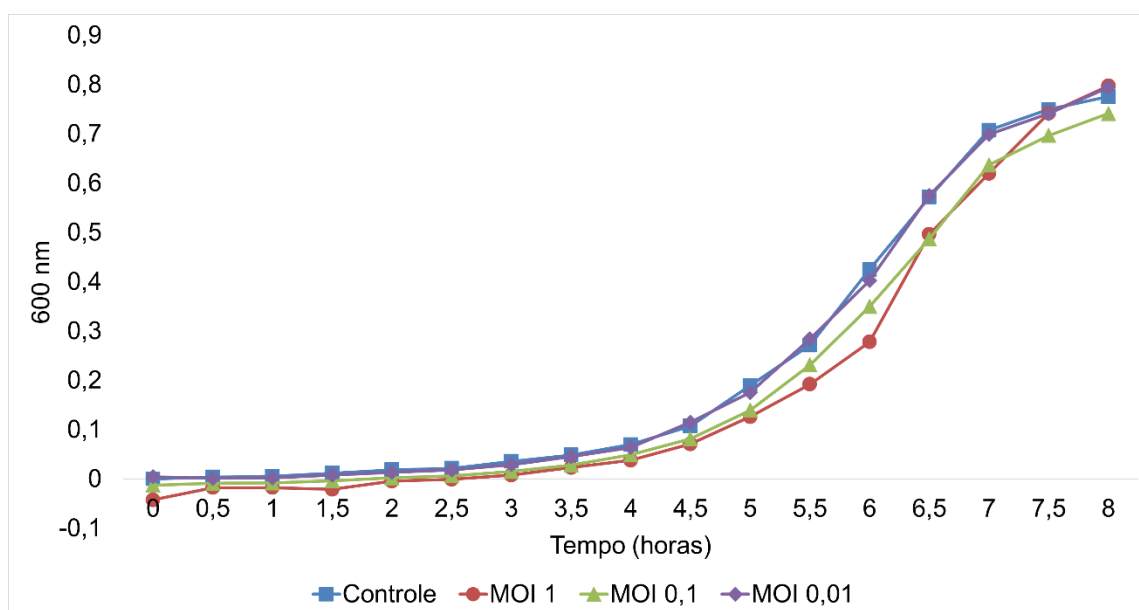
de cinco bacteriófagos também foi examinada por Hidaka (1971) em meios contendo vários sais inorgânicos. Ele relatou que em meio contendo 0,5% de NaCl todos os fagos foram inativados (HIDAKA, 1971).

Para teste em cultura líquida, um estoque na concentração de $8,1 \times 10^{-9}$ PFU/mL foi obtido com as lises resultantes de 3 plaqueamentos consecutivos, visto que o método proposto para purificação não foi efetivo. Objetivando uma maior concentração de partículas virais, novos testes com diferentes concentrações de NaCl devem ser realizados, de forma a obter a melhor condição para o bacteriófago isolado.

4.2.3 Inibição em cultura líquida para BHDA

O teste de inibição de cultura líquida é um ensaio de crescimento bacteriano em meio líquido, onde a cultura líquida do hospedeiro é utilizada como controle e o fago e seu hospedeiro são empregados em vários MOIs. A proporção de fagos para bactérias, sendo apenas os fagos que se ligarem e infectarem bactérias é definida como MOI (ABEDON, 2016). Na Figura 21 é possível observar o teste de inibição em cultura líquida nos MOIs de 1, 0,1 e 0,01.

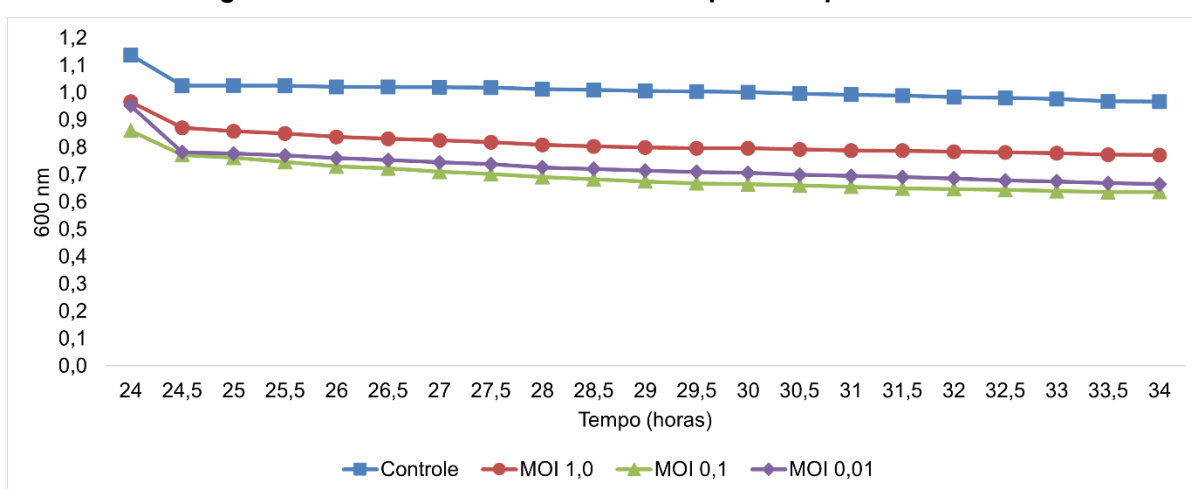
Figura 22 - Curva de crescimento em etapa única ao longo de 8 horas



Fonte: Autoria própria (2023)

Ao ser adicionado em cultura líquida pura do hospedeiro, o fago reduziu o crescimento da bactéria quando comparado à cultura controle. No MOI de 1 o efeito inibitório foi observado ao longo de 7,5 horas de incubação, já no MOI de 0,1 o controle do hospedeiro se manteve ao longo das 8 horas. Resultados não tão expressivos foram observados no MOI de 0,01 (onde a concentração viral é menor em relação a concentração de bactérias), podendo se observar o crescimento quase inerente ao controle.

Figura 23 - Curva de crescimento em etapa única posterior à 24h



Fonte: Autoria própria (2023)

Em função de problemas de energia recorrentes, optou-se por fazer uma extensão do ensaio após um período sem medição, como observado na Figura 22. Este é a continuidade da cinética após um período sem incubação e medição da absorbância. Mesmo para estes MOIs mais baixos, é possível observar que o fago manteve uma certa inibição do crescimento (afinal, após 24 horas percebe-se que o controle parte de um OD maior) e, ao voltar com as condições controladas da cinética, ainda é possível ver uma queda mais acentuada quando há presença dos fagos em relação ao controle.

O fato de ainda se observar essa lise fágica, pode ser decorrente do período latente, o qual caracteriza-se pela acumulação intracelular de fagos, sendo o período mínimo que leva desde a adsorção dos fagos a uma célula hospedeira até a lise do hospedeiro com liberação da progênie do vírus. Alguns autores também o abordam como “tempo de lise” (GABIATTI, 2018).

Burst size é o número médio de fagos libertados por célula hospedeira infectada e está ligado à fecundidade do fago. O *burst size* e o tempo latente, sofrem grande influência conforme o tipo de hospedeiro e sua taxa de crescimento específico, a composição do meio de crescimento e a temperatura de incubação

Em um estudo desenvolvido por Sharma *et al.*, (2021), observou-se uma redução de 90% na contagem bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* em um MOI de 1, enquanto 52% de redução foi observada em um MOI de 0,1. Porém mesmo em MOIs mais baixos os autores obtiveram uma redução significativa na contagem bacteriana em relação ao controle, sendo 42% e 37% de diminuição nos MOIs 0,01 e 0,001 respectivamente (SHARMA *et al.*, 2021). Já em outro estudo, objetivando o controle de *P. aeruginosa*, os resultados demonstraram que um MOI de 100, foi a melhor relação para inibir e suprimir eficientemente o crescimento ao longo do período de 12 horas (WANNASRICHAN *et al.*, 2022). Em testes com camundongos infectados também com *P. aeruginosa* e tratados com fagos, observou-se uma sobrevivência de 100% e os animais não apresentaram sinais de infecção em MOIs de 10 e 100 (ARUMUGAM *et al.*, 2022).

Observa-se que em maiores concentrações a efetividade do fago também aumenta. Estudos já relatam uma correlação positiva entre altas dosagens de fagos (10^7 - 10^9 PFU) (DĄBROWSKA, 2019; NILSSON, 2019) e a eficácia do tratamento (JEON; PARK; YONG, 2019). Portanto, MOIs maiores devem ser testados com o fago aqui isolado, a fim de melhor conhecer sua eficácia.

Esse trabalho é um estudo de prova de conceito que tem limitações, visto que, até o momento os resultados não podem ser comparados diretamente com o controle de bactérias heterotrófica através de parâmetros operacionais. Os processos de desamonificação são ecossistemas complexos, com uma comunidade microbiana variada. Assim sendo, outros interferentes devem ser avaliados, por exemplo, temperatura, pH, OD, espécies bacterianas predominantes (Anammox e BOA) para entender como o fago atua de fato no controle das bactérias indesejáveis. Contudo, os fagos se apresentam como uma potencial ferramenta biológica para o controle dessas espécies indesejadas, podendo acarretar bons resultados de remoção de nitrogênio.

4.3 Ativação e produção de bactérias BON

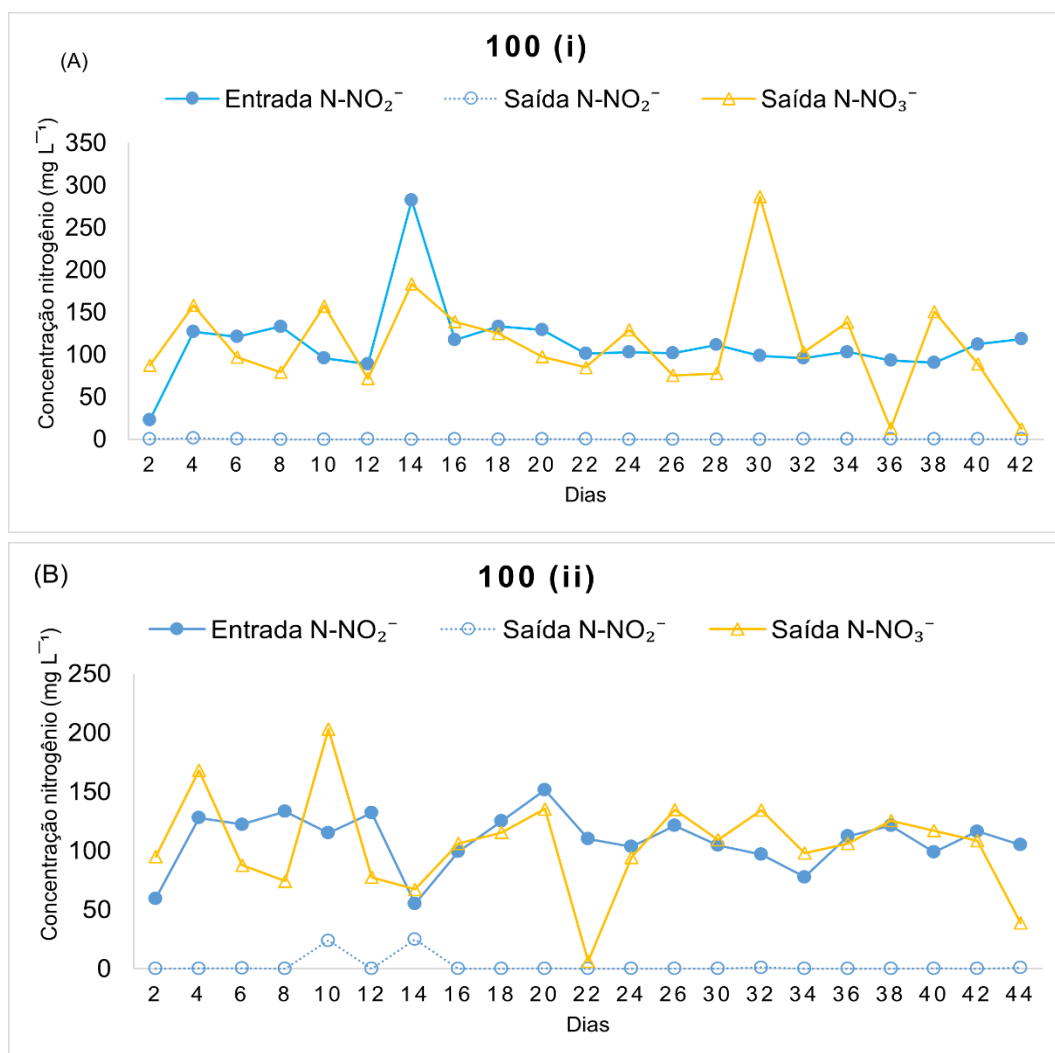
4.3.1 Enriquecimento de linhagens bacterianas de BON – Sistema batelada

Na Figura 24, estão apresentados os gráficos para a concentração de 100 mg $\text{mgNaNO}_2 \text{ L}^{-1}$. Na Figura 24A – lodo (i) (que operou com lodo proveniente do biorreator em escala laboratorial de nitrificação/desnitrificação) a entrada média de nitrito do sistema foi de $113,42 \pm 45,27 \text{ mg L}^{-1}$, enquanto a saída manteve-se abaixo $1,25 \text{ mg L}^{-1}$. O sistema apresentou uma saída de nitrato de $112,20 \pm 59,46 \text{ mg L}^{-1}$ ao longo do período experimental, representando 98,92% de conversão de nitrito a nitrato.

Na Figura 24B – lodo (ii) (que operou com lodo proveniente do reator contínuo) a entrada média de nitrito foi de $109,18 \pm 22,74 \text{ mg L}^{-1}$, enquanto a saída ficou abaixo de $25,11 \text{ mg L}^{-1}$, a saída de nitrato apresentou média de $108,9 \pm 39 \text{ mg L}^{-1}$, representando uma remoção de 99,7% de conversão de nitrito a nitrato. Como abordado anteriormente, as BON oxidam o nitrito a nitrato, dessa forma, a presença de nitrato no sistema é indicativo de atividade dessas bactérias. Vale ressaltar que os lodos utilizados como inóculo, não eram culturas puras, dessa forma, ao longo das coletas houve um favorecimento desse grupo bacteriano, visto que a reação estequiométrica do processo é 1:1.

Em estudo desenvolvido por Boon & Laudelout (1962), a inibição por substrato pelo gênero *Nitrobacter spp.*, foi observada no valor de $110 \text{ mgNaNO}_2 \text{ L}^{-1}$ (BOON; LAUDELOUT, 1962). Outros autores relataram a inibição em uma faixa que varia de $12\text{-}18 \text{ mgNaNO}_2 \text{ L}^{-1}$ (PROSSER, 1989). Em estudo desenvolvido por GRUNDITZ; DALHAMMAR, (2001), bactérias do gênero *Nitrobacter* foram isoladas de um sistema de lodo ativado de uma estação de tratamento de águas residuais. Para isolamento, utilizaram o um método de diluição em série e nitrito de sódio na concentração de 50 mg L^{-1} , sendo que a nitrificação foi observada até a diluição 10^7 (GRUNDITZ; DALHAMMAR, 2001). Em estudo desenvolvido por Sorokin *et al.*, (1998), durante o enriquecimento, o nitrito foi inibitório em concentrações superiores a 690 mg L^{-1} . (SOROKIN *et al.*, 1998). Ressaltasse que poucos são os estudos que isolaram bactérias oxidadoras de nitrito de sistemas de tratamento de efluentes, sendo que a maioria dos autores, isolaram a partir de amostras de solo, ou obtinham a cultura purificada, dessa forma, diferentes condições de cultivo são reportadas.

Figura 24 - Acompanhamento das espécies nitrogenadas no sistema batelada – 100 mgNaNO₂ L⁻¹



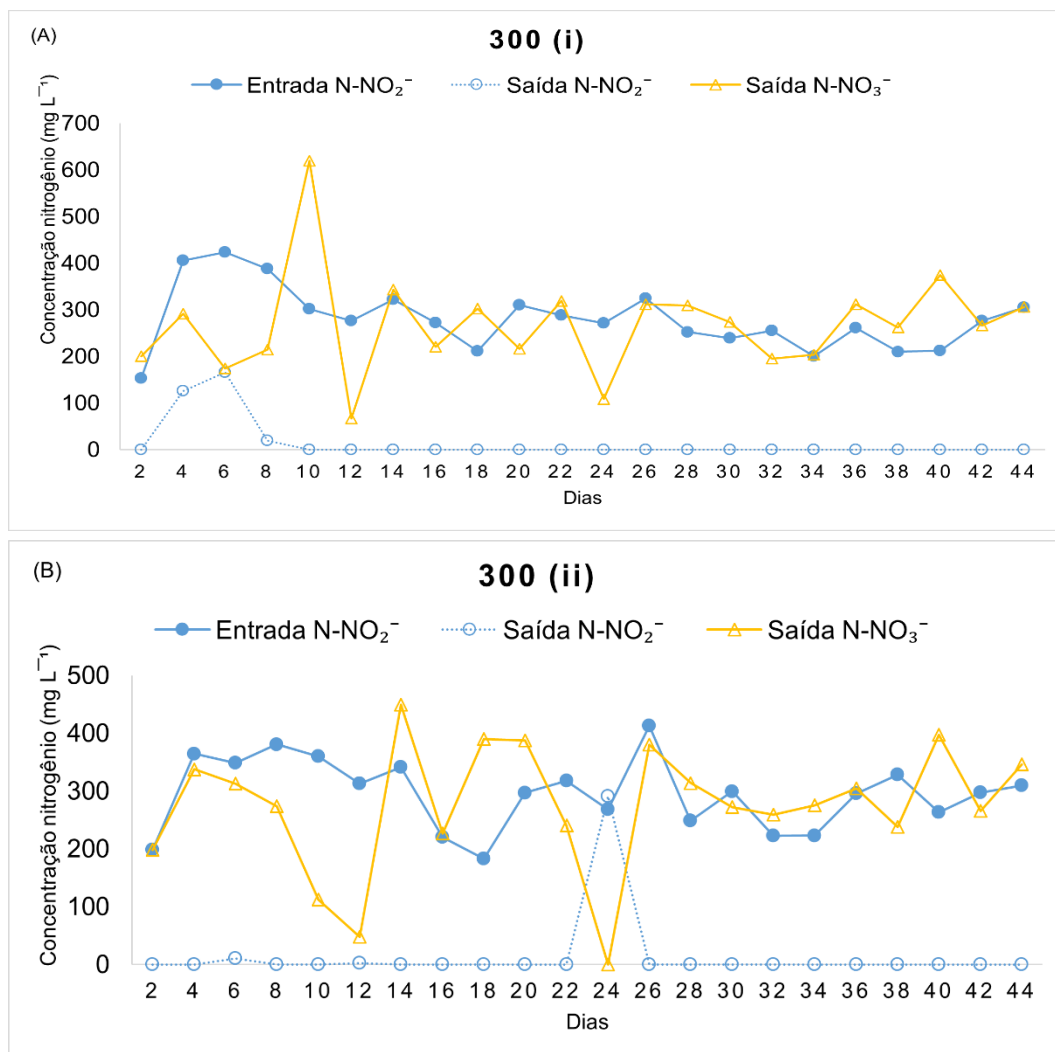
Concentração de 100 mgNaNO₂ L⁻¹; sendo que: (A) – lodo i – proveniente do biorreator em escala laboratorial de nitrificação/desnitrificação, e; (B) – lodo ii - proveniente do reator contínuo.

Fonte: Autoria própria (2023)

Na Figura 25, são apresentados os gráficos para a concentração de 300 mgNaNO₂ L⁻¹. Na Figura 24A a entrada média de nitrito foi de 279,11 ± 67 mg L⁻¹. Durante os 3 primeiros dias de experimento, houve um aumento na saída de nitrito, vindo a normalizar posteriormente, sendo que a saída de nitrito ficou abaixo de 19,37 mg L⁻¹ durante o restante do período experimental. A saída de nitrato apresentou média de 268,16 ± 108,78 mg L⁻¹, representando uma conversão de 95,07% de nitrito.

Para o lodo do reator contínuo (Figura 25B), a entrada de nitrito teve média de $295,30 \pm 61,45 \text{ mg L}^{-1}$, enquanto a saída manteve-se abaixo de $10,8 \text{ mg L}^{-1}$, salvo no dia 24, em que um aumento foi detectado, possivelmente em função de um erro analítico. A saída de nitrato apresentou média de $274,24 \pm 111,28 \text{ mg L}^{-1}$, correspondendo a 92,8% de conversão de nitrito.

Figura 25 - Acompanhamento das formas nitrogenadas no sistema batelada – $300 \text{ mgNaNO}_2 \text{ L}^{-1}$



Concentração de $300 \text{ mgNaNO}_2 \text{ L}^{-1}$; sendo que: (A) – lodo i – proveniente do biorreator em escala laboratorial de nitrificação/desnitrificação, e; (B) – lodo ii - proveniente do reator contínuo.

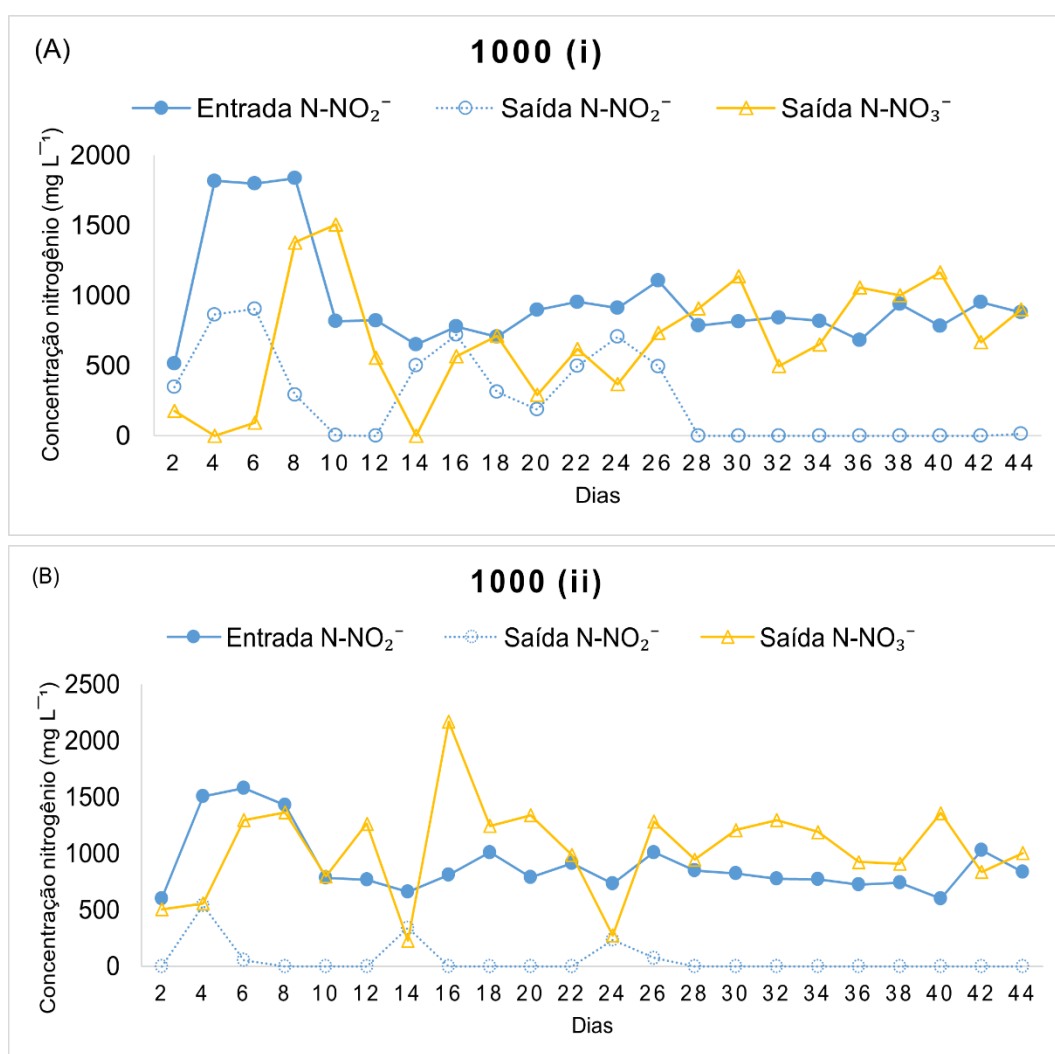
Fonte: Autoria própria (2023)

Na Figura 26A a entrada média de nitrito foi de $960,11 \pm 369,3 \text{ mg L}^{-1}$, enquanto a saída teve média de $266,29 \pm 317,3 \text{ mg L}^{-1}$. A saída de nitrito oscilou durante as 13 primeiras coletas, vindo a normalizar em seguida. A saída de nitrato

apresentou média de $682,1 \pm 425,6 \text{ mg L}^{-1}$, ocasionando uma conversão de nitrito a nitrato de 71,04%.

Para o lodo do reator contínuo (Figura 26B), a entrada de nitrito teve média de $899,15 \pm 273,43 \text{ mg L}^{-1}$, enquanto a saída de nitrito teve média de $56,77 \pm 138,5 \text{ mg L}^{-1}$. A saída de nitrato apresentou média de $1045,92 \pm 425,9 \text{ mg L}^{-1}$. Uma possível explicação para elevada produção de nitrato é que possa ter ocorrido a morte celular dos microrganismos, resultando na liberação do composto, além de que, quando era feita a troca do meio, não era possível retirar totalmente o remanescente de nitrato, visto que este estava presente intrinsecamente no lodo.

Figura 26 - Acompanhamento das espécies nitrogenadas sistema batelada – $1000 \text{ mgNaNO}_2 \text{ L}^{-1}$



Concentração de $1000 \text{ mgNaNO}_2 \text{ L}^{-1}$; sendo que: (A) – lodo i – proveniente do biorreator em escala laboratorial de nitrificação/desnitrificação, e; (B) – lodo ii - proveniente do reator contínuo.

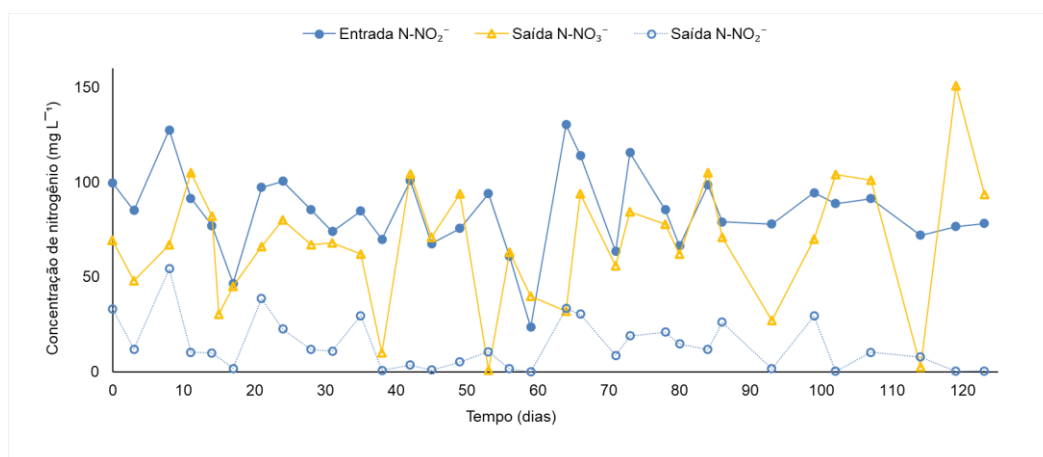
Fonte: Autoria própria (2023)

Observa-se que em concentrações superiores a $300 \text{ mg NaNO}_2 \text{ L}^{-1}$ para o lodo ii, as bactérias apresentaram menor atividade, visto a menor conversão do nitrito em nitrato. O crescimento em $100 \text{ mg NaNO}_2 \text{ L}^{-1}$ foi o que apresentou melhores resultados, e por isso foi o lodo utilizado nas etapas de crescimento em meio sólido.

4.3.2 Enriquecimento de linhagens bacterianas de BON – Sistema contínuo

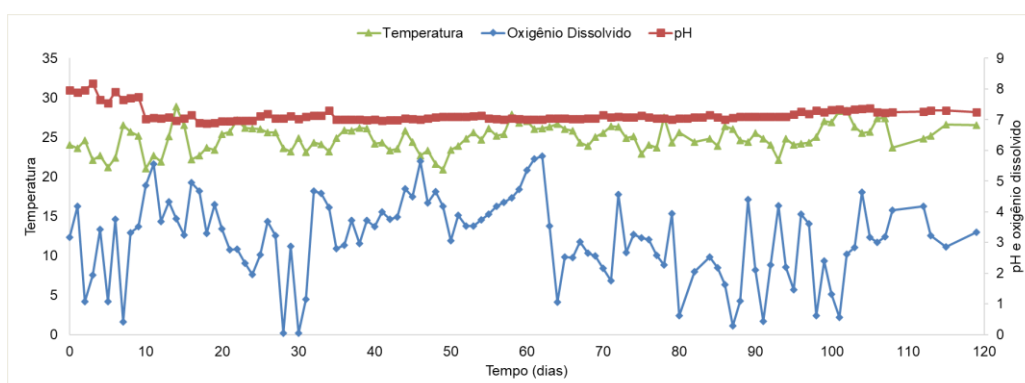
Os resultados do acompanhamento das concentrações das espécies nitrogenadas do afluente e efluente do reator contínuo é mostrado na Figura 27. A entrada média de nitrito no sistema foi de $84,67 \pm 21,47 \text{ mg L}^{-1}$, enquanto a saída teve média de $14,31 \pm 13,59 \text{ mg L}^{-1}$. A saída de nitrato apresentou média de $67,76 \pm 32,36 \text{ mg L}^{-1}$, representando uma conversão de 80% de nitrito.

Figura 27 - Acompanhamento das espécies nitrogenadas no sistema contínuo



Fonte: Autoria própria (2023)

Figura 28 - Acompanhamento dos parâmetros operacionais no sistema contínuo



Fonte: Autoria própria (2023)

Os parâmetros operacionais como oxigênio dissolvido, temperatura e pH são importantes quando busca-se selecionar um conjunto de bactérias oxidadoras de nitrito. O pH ótimo de crescimento das *Nitrobacter* é próximo a neutralidade (CIUDAD *et al.*, 2005), dessa forma, o meio foi tamponado até pH 7, apresentando média de $7,15 \pm 0,23$, como observado na Figura 28.

O oxigênio é um fator importante na conversão de mais ou menos nitrito no sistema, visto a sensibilidade das BON à baixas concentrações de oxigênio (ZOPPAS; BERNARDES; MENEGUZZI, 2018). A média de oxigênio dissolvido durante o período experimental foi de $3,13 \pm 1,30 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$, podendo inferir assim, que as bactérias não sofreram inibição frente ao composto. Observa-se, entretanto, que em alguns dias o oxigênio dissolvido teve uma queda brusca (30º dia), conseqüentemente a isso nos dias posteriores, ocorre a queda na produção de nitrato, ou seja, não havia oxigênio dissolvido para oxidar todo o nitrito a nitrato. A temperatura para crescimento ótimo das BON é na faixa de 20-25 °C (NOCKO, 2009), durante o experimento a temperatura média foi de $24,9 \pm 1,23^\circ\text{C}$, sendo favorável para o crescimento e seleção da BON.

Apesar dos bons resultados dos parâmetros operacionais, observa-se que em alguns dias, a saída de nitrato do sistema, foi menor que a entrada de nitrito, isso pode ter ocorrido em função do baixo TRH, inferindo que o período não era suficiente para consumo de todo o nitrito. Quando comparado com o sistema batelada, no reator contínuo não ocorreu descarte de biomassa, isso era observado no sistema batelada, em função de que algumas partículas de lodo flotavam e acabavam sendo descartadas juntamente com o sobrenadante.

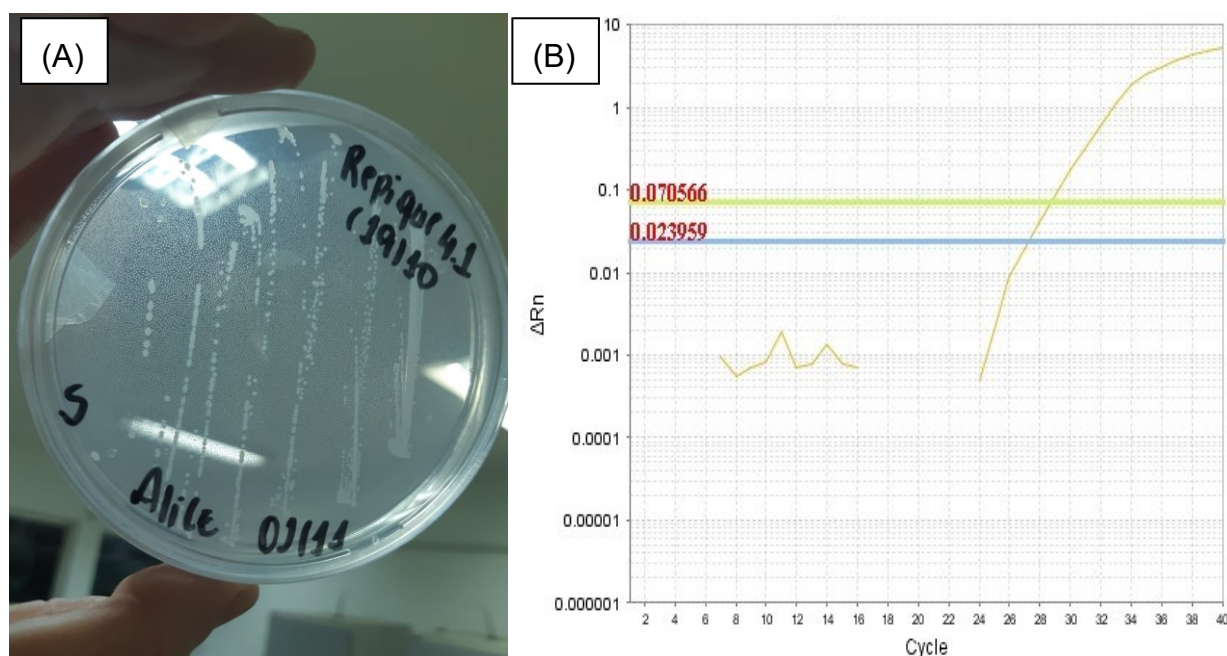
4.3.3 Isolamento de linhagens bacterianas de BON e identificação

Os procedimentos de plaqueamento direto de bactérias oxidadoras de nitrito são difíceis, pois, mesmo quando apenas substratos inorgânicos são usados, uma pequena quantidade de material orgânico fornecida por meio da inoculação com uma amostra ambiental permite o crescimento de organismos heterotróficos que crescem mais rapidamente. Técnicas de enriquecimento em série de longo prazo que envolvem enriquecimento da amostra, enriquecimento inicial da cultura,

enriquecimento final, isolamento em ágar e verificações rigorosas de pureza são uma maneira de resolver esse problema (PEPPER; GERBA; GENTRY, 2015).

Em meio sólido o aparecimento de pequenas colônias indica a presença de bactérias oxidadoras de nitrito, geralmente as colônias permanecem menores que 1 milímetro. As colônias podem ser acastanhadas brilhantes com um contorno arredondado após incubação por várias semanas. Para *Nitrospira*, agarose (13 g/L) é usado em vez de ágar e colônias acastanhadas irregulares aparecem após 1–3 meses (SPIECK; LIPSKI, 2011). Ademais, Sorokin *et al.*, (1998) descreve que o aparecimento das colônias ocorreu somente após 14 dias e que estas apresentavam cor amarelo pálido. Colônias velhas (1-2 meses de incubação) apresentaram coloração acastanhada e outras colônias apresentaram forma cônica com base larga, além de colônias achatadas e convexas. Na Figura 29A é possível observar o crescimento das colônias proveniente do sistema batelada na concentração de $100 \text{ mgNaNO}_2 \text{ L}^{-1}$ (i – lodo proveniente do reator contínuo).

Figura 29 – Resultado do estriamento das bactérias oxidadoras de nitrito (sistema batelada) em meio sólido e amplificação das colônias por meio de RT-PCR



***(A) – Crescimento em meio sólido - mixotrófico; (B) – Amplificação por meio de RT-PCR**

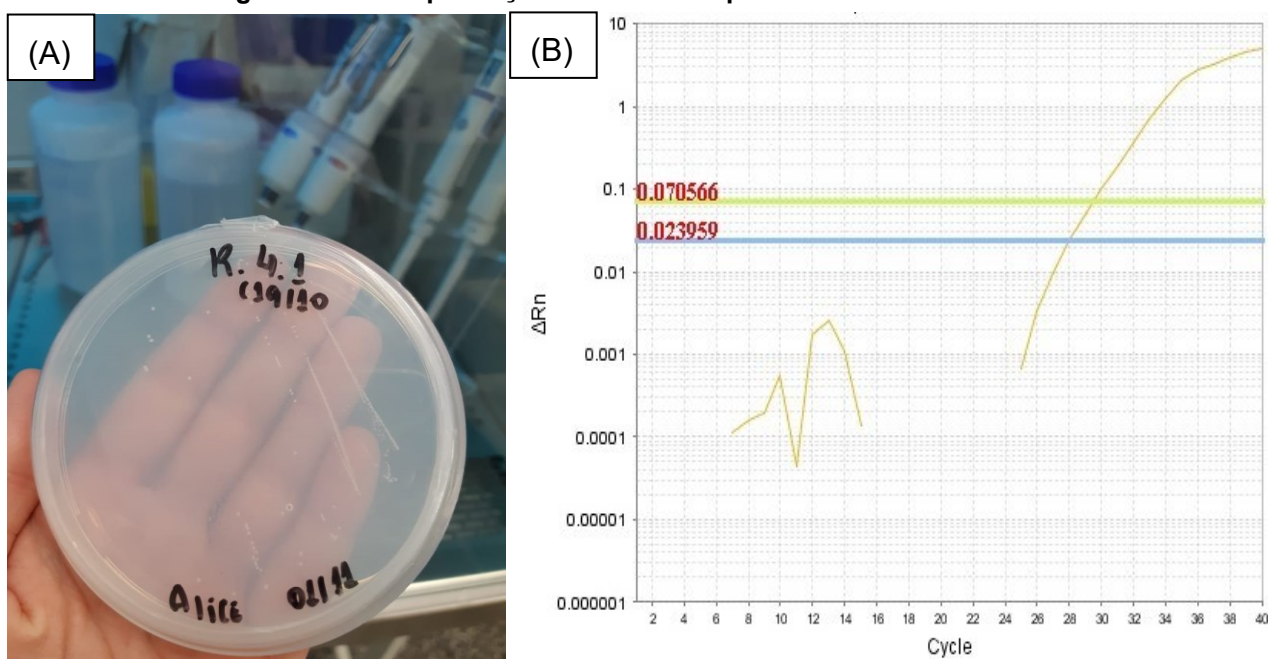
Fonte: Autoria própria (2023)

Na Figura 29A observa-se o crescimento em meio mixotrófico, é possível observar que as colônias cresceram em maior quantidade e com maior tamanho

quando comparado a Figura 30A (ágar Noble). Isso, pode ter ocorrido em função do meio mixotrófico apresentar uma maior quantidade de nutrientes (além de nitrito de sódio, o meio foi formulado com extrato de levedura e peptona) quando comparado ao ágar Noble.

Para comprovar o efetivo isolamento de um gênero oxidante de nitrito, utilizou-se da técnica de RT-PCR. Observa-se nas Figuras 29B e 30B o gráfico de amplificação das colônias que cresceram em meio mixotrófico e Noble, respectivamente, sendo ambas positivas para o gênero *Nitrobacter*. No presente trabalho a RT-PCR foi utilizada como um método qualitativo, podendo ser usada em diversas aplicações, incluindo o monitoramento da dinâmica populacional e avaliação da abundância microbiana em condições particulares (KIM; LIM; LEE, 2013; TAYLOR *et al.*, 2019).

Figura 30 – Resultado do estriamento das bactérias oxidadoras de nitrito (sistema batelada) ágar Noble e amplificação das colônias por meio de RT-PCR



***(A) – Crescimento em meio sólido - Noble; (B) – Amplificação por meio de RT-PCR**

Fonte: Autoria própria (2023)

Visando entender como otimizar o desempenho de uma planta parcialmente nitrificante, Huang *et al.*, (2010) avaliaram a dinâmica da abundância de *Nitrospira* e *Nitrobacter* durante o período de 1 ano usando RT-qPCR, sendo suas contribuições relativas à oxidação de nitrito avaliadas (HUANG *et al.*, 2010). A

técnica é utilizada também para monitoramento de plantas de tratamento em escala real.

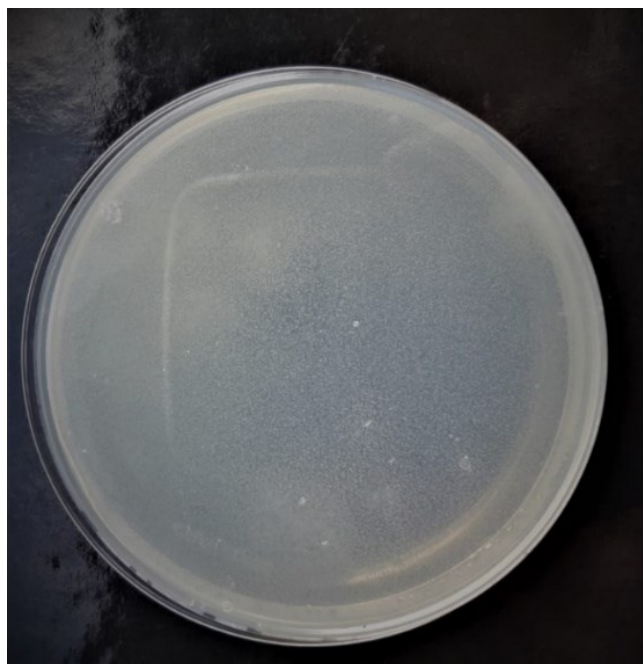
Nitrobacter e *Nitrospira* são comumente encontradas em sistema de lodo ativado nitrificantes, e, a técnica de RT-qPCR é uma ferramenta importante para detecção desses organismos (HARMS *et al.*, 2003; METCH *et al.*, 2019). A técnica molecular representa uma ferramenta prática e confiável para detectar bactérias nitrificantes no meio ambiente. Esta técnica pode especialmente ser aplicada como um método de triagem rápida para estudos em que muitas amostras ambientais devem ser monitoradas quanto a diferenças na composição das bactérias nitrificantes (REZAEI *et al.*, 2013).

4.4 Isolamento do bacteriófago para BON

No ágar superior, a difusão permite que as bactérias cresçam completamente pelo “tapete” e os fagos se liguem a estas. As amostras contendo fagos, são adicionadas ao topo da segunda camada e secas ou diretamente misturadas com a bactéria e o *soft ágar* (KARAM AZIZ *et al.*, 2020). A presença de um fago é dada pelo aparecimento de manchas claras ou placas no “tapete” microbiano (ÁCS; GAMBINO; BRØNDSTED, 2020).

No presente estudo, não foi possível observar a formação das placas de lise, essa dificuldade se deu principalmente pelo crescimento não uniforme da bactéria, conforme observado na Figura 31.

Figura 31 - Crescimento das bactérias oxidadoras de nitrito em dupla camada



Fonte: Aatoria própria (2023)

Segundo Serwer et al., (2007), uma alternativa caso o fago não formar placas claramente visíveis é substituir o ágar por agarose, mesmo em menor concentração (0,2%), pois fagos maiores se difundem melhor em um ambiente amolecido (SERWER *et al.*, 2007). A agarose foi utilizada na camada superior, porém em uma concentração de 1% (m/v), uma alternativa seria então a utilização de menor concentração de agarose. Além disso, a adição de íons divalentes (CaCl_2 e MgCl_2) também podem facilitar a formação de placas por meio do auxílio à adsorção do fago ao receptor bacteriano (SERWER *et al.*, 2004).

Em um estudo publicado por Choi *et al.*, (2010), uma cepa de *Nitrospira multiformis* foi detectada, contendo dois prófagos. Estes foram ativados em certas situações de estresse, como exposição a produtos químicos, baixo pH e alta temperatura. Depois de passar por esses processos, observou-se que a replicação do bacteriófago ocorreu e levou a um aumento da abundância do vírus e, conseqüentemente, à diminuição do número de *N. multiformis* e menor atividade nitrificante (CHOI; KOTAY; GOEL, 2010).

Mesmo não sendo possível isolar um fago que combata diretamente BON, uma alternativa é explorar a interação de inibição de outra bactéria em função da bactéria almejada. Isso foi observado em um estudo, onde um bacteriófago foi usado para remover *P. aeruginosa* em sistemas de filtragem de águas residuais e avaliar o

impacto deste fago na comunidade de bactérias nitrificantes. Embora a concentração de amônia estivesse abaixo do limite de detecção, a concentração de NO_2^- no efluente aumentou substancialmente após a dosagem do bacteriófago (ZHANG; HUNT; HU, 2013a). Isso indica que as espécies de BON são mais sensíveis às alterações causadas pelo tratamento com bacteriófagos quando comparadas às BOA, pois convertem amônia em nitrito. Este estudo sugere um possível bacteriófago polivalente, atuando contra *P. aeruginosa* e cepas bacterianas de NOB. O fago atuaria combatendo uma cepa patogênica, além de reduzir a atividade de NOB.

Embora nenhum bacteriófago específico para *Nitrobacter* tenha sido relatado, estudos mostram a capacidade desses vírus de perturbar os ecossistemas onde as nitrificantes são encontradas. A dificuldade de cultivo desse gênero em meio sólido, pode ser o possível motivo da escassez de trabalhos nessa área, para tanto mais estudos devem ser realizados acerca de otimizar o crescimento dessa bactéria em meio sólido.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A bactéria heterotrófica desnitrificante aeróbia foi isolada de um decantador pós processo de desamonificação, sendo identificada como *Pseudomonas monteilii*. Já o isolamento do fago foi realizado a partir de uma amostra de esgoto. A concentração final do estoque de fagos foi de $1,2 \times 10^{10}$ PFU/mL. Nos testes de inibição em cultura líquida do hospedeiro, o fago isolado mostrou uma maior eficiência de inibição a uma multiplicidade de infecção de 1 e 0,1.

Em suma, os sistemas de tratamento de efluentes suinícolas são fontes para isolamento de bactérias oxidadoras de nitrito, do gênero *Nitrobacter* além de que, concentrações na faixa de 100 - 300 mgNaNO₂ L⁻¹ são ideais para o crescimento dessas bactérias, visto a boa remoção alcançada. Contudo, não foi possível observar lise fágica, devido à dificuldade de crescimento da bactéria em meio sólido.

Vale ressaltar ainda, que o trabalho aqui proposto é inovador, sendo que ainda não se tem relatos semelhantes na literatura. Visto as vantagens oferecidas pelos fagos, esse método de controle de espécies indesejadas nos sistemas de desamonificação poderia otimizar a remoção de nitrogênio amoniacal.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Visando a aplicabilidade do fago isolado em processos de desamonificação, teste de resistência frente a fatores ambientais (pH, temperatura, OD etc.) e sequenciamento genômico são fundamentais para caracterizar e entender o comportamento desse vírus.

Além disso, pretende-se testar a eficiência do fago isolado em sistemas complexos, os mais próximos possíveis dos reatores de desamonificação e, posteriormente, em próprios reatores e verificar se a aplicação dos fagos, a médio e longo prazo, pode trazer ganhos no processo e melhoria na eficiência. Sendo este, um passo importante a se tomar, quando se objetiva a passagem de um sistema *in vitro* para *in vivo*. Ainda é desafiador determinar a infecção por bacteriófagos fora das condições de laboratório porque os sistemas de tratamento biológico possuem microbiota complexa com muitos hospedeiros potenciais, que podem não corresponder ao ambiente reproduzido *in vitro*.

Mais estudos são necessários, a fim de encontrar métodos alternativos para o crescimento de bactérias do gênero *Nitrobacter* em meio sólido, visto a dificuldade de formação de “tapete” microbiano apresentado por essas bactérias.

REFERÊNCIAS

- ANTHONISEN, A.C.; *et al.* Inhibition of Nitrification by Ammonia and Nitrous Acid on JSTOR. **Water Pollution Control Federation**, [S. l.], p. 835–852, 1976.
- ABEDON, S.T. Phage therapy dosing: The problem(s) with multiplicity of infection (MOI). **Bacteriophage**, [S. l.], v. 6, n. 3, p. e1220348, 2016.
- ABEDON, S. T. Phage “delay” towards enhancing bacterial escape from biofilms: a more comprehensive way of viewing resistance to bacteriophages. **AIMS Microbiology**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 186, 2017.
- ABEDON, S.T.; YIN, J. Bacteriophage Plaques: Theory and Analysis. **Bacteriophages** p. 161–174. DOI: 10.1007/978-1-60327-164-6_17.
- ÁCS, N; GAMBINO, M; BRØNDSTED, L. Bacteriophage Enumeration and Detection Methods. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 11, 2020.
- ACKERMANN, H. Phage Classification and Characterisation. **Bacteriophages Methods and Protocols**, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions, [s. l.], v. 501, p. 127–140, 2009.
- ADAMS, M. **Bacteriophages**. New York: Interscience Publishers, 1959.
- ADNAN, M.; *et al.* Isolation and characterization of bacteriophage to control multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* planktonic cells and biofilm. **Biologicals**, [S. l.], v. 63, p. 89–96, 2020.
- AGHAEI, B. L.; *et al.* Sewage and sewage-contaminated environments are the most prominent sources to isolate phages against *Pseudomonas aeruginosa*. **BMC Microbiology**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 132, 2021.
- AHMADI, K.; *et al.* Vancomycin-Resistant *Pseudomonas Aeruginosa* in the Cases of Trauma. **Medical Archives** [S. l.], v.70, n.1, p.57-60, 2016.
- ALHARBI, N. M.; ZIADI, M. M. Wastewater as a fertility source for novel bacteriophages against multi-drug resistant bacteria. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [S. l.], v. 28, n. 8, p. 4358–4364, 2021.
- AL-HAZMI, H.; Achieving efficient and stable deammonification at low temperatures—experimental and modeling studies. **Energies**, [S. l.], v. 14, n. 13, p. 3961, 2021.
- ALLEMAN, J. E. Elevated Nitrite Occurrence in Biological Wastewater Treatment Systems. **Water Science and Technology**, [S. l.], v. 17, n. 2–3, p. 409–419, 1985.
- AMANKWAH, S.; ABDUSEMED, K.; KASSA, T. Bacterial Biofilm Destruction: A Focused Review On The Recent Use of Phage-Based Strategies With Other Antibiofilm Agents. **Nanotechnology, Science and Applications**, [S. l.], v. Volume 14, p. 161–177, 2021.

ARUMUGAM, S. N.; Antibacterial efficacy of lytic phages against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections in bacteraemia mice models. **BMC Microbiology**, [S. l.], v. 22, n. 1, p. 1–7, 2022.

ASLAM, B.; *et al.* Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. **Infection and Drug Resistance**, [S. l.], v. 11, p. 1645, 2018.

AUGUSTO, M. R.; CAMILOTI, P. R.; SOUZA, T.S. Fast start-up of the single-stage nitrogen removal using anammox and partial nitritation (SNAP) from conventional activated sludge in a membrane-aerated biofilm reactor. **Bioresource technology**, [S. l.], v. 266, p. 151–157, 2018.

BATINOVIC, S.; *et al.* Bacteriophages in Natural and Artificial Environments. **Pathogens 2019, Vol. 8, Page 100**, [S. l.], v. 8, n. 3, p. 100, 2019.

BEARGIE, R. A.; BRACKEN, E. C.; RILEY, H. D. Micromethod (Spot-Plate) Determination of In Vitro Antibiotic Susceptibility. **Applied Microbiology**, [S. l.], v. 13, n. 2, p. 279–280, 1965.

BEDNAREK, A.; SZKLAREK, S.; ZALEWSKI, M. Nitrogen pollution removal from areas of intensive farming—comparison of various denitrification biotechnologies. **Ecohydrology & Hydrobiology**, [S. l.], v. 14, n. 2, p. 132–141, 2014.

BERTOZZI S, J.; STORMS, Z; SAUVAGEAU, D. Host receptors for bacteriophage adsorption. **FEMS Microbiology Letters**, [S. l.], v. 363, n. 4, p. 2, 2016.

BOCK, E.; SUNDERMEYER-KLINGER, H.; STACKEBRANDT, E. New facultative lithoautotrophic nitrite-oxidizing bacteria. **Arch Microbiol**, [S. l.], v. 136, p. 281–284, 1983.

BOGAERTS, P.; *et al.* IMP-13-producing *Pseudomonas monteilii* recovered in a hospital environment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S. l.], v. 66, n. 10, p. 2434–2435, 2011.

BONASSA, G.; *et al.* Performance and microbial features of Anammox in a single-phase reactor under progressive nitrogen loading rates for wastewater treatment plants. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 107028, 2022.

BONASSA, G.; *et al.* A new kinetic model to predict substrate inhibition and better efficiency in an airlift reactor on deammonification process. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 319, p. 124158, 2021.

BOON, B.; LAUDELOUT, H. Kinetics of nitrite oxidation by *Nitrobacter winogradskyi*. **Biochemical Journal**, [S. l.], v. 85, n. 3, p. 440–447, 1962.

BOURDIN, G.; *et al.* Amplification and purification of T4-Like *Escherichia coli* phages for phage therapy: From laboratory to pilot scale. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 80, n. 4, p. 1469–1476, 2014.

- BREIDENSTEIN, E. B. M.; DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C.; HANCOCK, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. **Trends in Microbiology**, [S. l.], v. 19, n. 8, p. 419–426, 2011.
- BRUNATO, F.; GARZIERA, M. G.; BRIGUGLIO, E. A severe methaemoglobinemia induced by nitrates: a case report. **European journal of emergency medicine : official journal of the European Society for Emergency Medicine**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 326–330, 2003.
- BRÜSSOW, H. Bacteriophage-host interaction: from splendid isolation into a messy reality. **Current opinion in microbiology**, [S. l.], v. 16, n. 4, p. 500–506, 2013.
- BURGESS, J. E.; *et al.* Dinitrogen oxide detection for process failure early warning systems. **Water Science and Technology**, [S. l.], v. 45, n. 4–5, p. 247–254, 2002.
- CENENS, W.; *et al.* Phage–host interactions during pseudolysogeny: Lessons from the *Pid/dgo* interaction. **Bacteriophage**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. e25029, 2013.
- CHEN, D. Z.; *et al.* A newly isolated *Pseudomonas putida* S-1 strain for batch-mode-propanethiol degradation and continuous treatment of propanethiol-containing waste gas. **Journal of hazardous materials**, [S. l.], v. 302, p. 232–240, 2016.
- CHINI, A.; *et al.* Evaluation of deammonification reactor performance and microorganisms community during treatment of digestate from swine sludge CSTR biodigester. **Journal of Environmental Management**, [S. l.], v. 246, p. 19–26, 2019.
- CHINI, A.; *et al.* Process performance and anammox community diversity in a deammonification reactor under progressive nitrogen loading rates for swine wastewater treatment. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 311, p. 123521, 2020.
- CHINI, Angélica.; *et al.* Recirculation and Aeration Effects on Deammonification Activity. **Water, Air, & Soil Pollution** 2016 227:2, [S. l.], v. 227, n. 2, p. 1–10, 2016.
- CHIU, Y. C.; CHUNG, M. S. Determination of optimal COD/nitrate ratio for biological denitrification. **International Biodeterioration & Biodegradation**, [S. l.], v. 51, n. 1, p. 43–49, 2003.
- CHOI, J.; KOTAY, S. M.; GOEL, R. Various physico-chemical stress factors cause prophage induction in *Nitrosospira multiformis* 25196- an ammonia oxidizing bacteria. **Water Research**, [S. l.], v. 44, n. 15, p. 4550–4558, 2010.
- CHUANCHUEN, R.; *et al.* Cross-Resistance between Triclosan and Antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* Is Mediated by Multidrug Efflux Pumps: Exposure of a Susceptible Mutant Strain to Triclosan Selects *nfxB* Mutants Overexpressing *MexCD-OprJ*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 45, n. 2, p. 428, 2001.
- CIUDAD, G.; *et al.* Partial nitrification of high ammonia concentration wastewater as a part of a shortcut biological nitrogen removal process. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 40, n. 5, p. 1715–1719, 2005.

CLARK, J. R.; MARCH, J. B. Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials. **Trends in biotechnology**, [S. l.], v. 24, n. 5, p. 212–218, 2006.

CLOKIE, J. R.; *et al.* Phages in nature. **Bacteriophage**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 31–45, 2011.

COLOMBET, J.; *et al.* Virioplankton ‘pegylation’: Use of PEG (polyethylene glycol) to concentrate and purify viruses in pelagic ecosystems. **Journal of Microbiological Methods**, [S. l.], v. 71, n. 3, p. 212–219, 2007.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA, 2011.

CORNELISSEN, A.; *et al.* The T7-Related *Pseudomonas putida* Phage ϕ 15 Displays Virion-Associated Biofilm Degradation Properties. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 6, n. 4, p. e18597, 2011.

COSTA, P.; *et al.* Efficiency of Single Phage Suspensions and Phage Cocktail in the Inactivation of *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*: An In Vitro Preliminary Study. **Microorganisms** 2019, Vol. 7, Page 94, [S. l.], v. 7, n. 4, p. 94, 2019.

COUSIN, M. A. PSEUDOMONAS | Introduction. **Encyclopedia of Food Microbiology**, [S. l.], p. 1864–1867, 1999.

CUA, L. S.; STEIN, L. Y. Characterization of denitrifying activity by the alphaproteobacterium, *Sphingomonas wittichii* RW1. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 5, n. AUG, p. 404, 2014.

DAŁBROWSKA, K. Phage therapy: What factors shape phage pharmacokinetics and bioavailability? Systematic and critical review. **Medicinal Research Reviews**, [S. l.], v. 39, n. 5, p. 2000, 2019.

DANOVARO, R; MIDDELBOE, M. Separation of free virus particles from sediments in aquatic systems. *Em: Manual of Aquatic Viral Ecology*. [s.l.] : American Society of Limnology and Oceanography, 2010. p. 74–81

DE PRÁ, M. C.; *et al.* Kinetic models for nitrogen inhibition in ANAMMOX and nitrification process on deammonification system at room temperature. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 202, p. 33–41, 2016. a.

DE PRÁ, M.C.; *et al.* Novel one-stage reactor configuration for deammonification process: Hydrodynamic evaluation and fast start-up of NITRAMMOX® reactor. **Biochemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 171, p. 108005, 2021.

DELFAN, A. S.; *et al.* Screening of Novel Bacteriophage Infection in *Pseudomonas putida* Isolated From Potato Disease. **Jundishapur Journal of Microbiology**, [S. l.], v. 5, n. 4, p. 550–554, 2012.

DIAS BIERHALS, N.; *et al.* Extração de DNA genômico bacteriano: uma comparação de métodos comerciais e in house. **Saúde (Santa Maria)**, [S. l.], v. 46, n. 2, 2020.

DODD, C. E. R. PSEUDOMONAS | Introduction. **Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition**, [S. l.], p. 244–247, 2014

DOSS, J.; *et al.* A Review of Phage Therapy against Bacterial Pathogens of Aquatic and Terrestrial Organisms. **Viruses** 2017, Vol. 9, Page 50, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 50, 2017.

DRENKARD, E. Antimicrobial resistance of Pseudomonas aeruginosa biofilms. **Microbes and Infection**, [S. l.], v. 5, n. 13, p. 1213–1219, 2003.

DU, B.; *et al.* Responses of bacterial and bacteriophage communities to long-term exposure to antimicrobial agents in wastewater treatment systems. **Journal of Hazardous Materials**, [S. l.], v. 414, p. 125486, 2021.

DU, S.; *et al.* Distinct microbial communities and their networks in an anammox coupled with sulfur autotrophic/mixotrophic denitrification system. **Environmental Pollution**, [S. l.], v. 262, p. 114190, 2020.

EGIDO, J. E.; *et al.* Mechanisms and clinical importance of bacteriophage resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 46, n. 1, p. 1–16, 2022.

ELOMARI, M.; *et al.* Pseudomonas monteilii sp. nov., isolated from clinical specimens. **International Journal of Systematic Bacteriology**, [S. l.], v. 47, n. 3, p. 846–852, 1997.

ERIKSEN, R. S.; MITARAI, N.; SNEPPEN, K. On Phage Adsorption to Bacterial Chains. **Biophysical Journal**, [S. l.], v. 119, n. 9, p. 1896–1904, 2020.

FERREIRA, L.; *et al.* Microorganisms direct identification from blood culture by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, [S. l.], v. 17, n. 4, p. 546–551, 2011.

FORMAN, D. Commentary: Nitrites, nitrates and nitrosation as causes of brain cancer in children: epidemiological challenges. **International journal of epidemiology**, [S. l.], v. 33, n. 6, p. 1216–1218, 2004

FUX, C.; *et al.* Biological treatment of ammonium-rich wastewater by partial nitritation and subsequent anaerobic ammonium oxidation (anammox) in a pilot plant. **Journal of Biotechnology**, [S. l.], v. 99, n. 3, p. 295–306, 2002.

GABIATTI, N. C. **Isolamento, caracterização e incorporação de fagos polivalentes em esporos bacterianos para uso em controle biológico**. 2018. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/194381>.

GABIATTI, N. C.; *et al.* Bacterial endospores as phage genome carriers and protective shells. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 84, n. 18, p. 1186–1204, 2018.

GAVRIC, D; KNEZEVIC, P. Optimized Method for Pseudomonas aeruginosa Integrative Filamentous Bacteriophage Propagation. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 12, 2021.

GE, S.; *et al.* Detection of nitrifiers and evaluation of partial nitrification for wastewater treatment: A review. **Chemosphere**, [S. l.], v. 140, p. 85–98, 2015.

GERARDI, Michael H. **Wastewater bacteria**. [S. l.], p. 255, 2006.

GERVASI, T.; *et al.* Expression and delivery of an endolysin to combat Clostridium perfringens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 98, n. 6, p. 2495, 2014.

GIUSTINIANOVICH, E. A.; *et al.* Influence of biomass acclimation on the performance of a partial nitrification-anammox reactor treating industrial saline effluents. **Chemosphere**, [S. l.], v. 194, p. 131–138, 2018.

GRAHAM, D. W.; *et al.* Experimental demonstration of chaotic instability in biological nitrification. **The ISME Journal** 2007 1:5, [S. l.], v. 1, n. 5, p. 385–393, 2007.

GRUNDITZ, C.; DALHAMMAR, G. Development of nitrification inhibition assays using pure cultures of nitrosomonas and nitrobacter. **Water Research**, [S. l.], v. 35, n. 2, p. 433–440, 2001.

GU, W.; *et al.* Anammox bacteria enrichment and denitrification in moving bed biofilm reactors packed with different buoyant carriers: Performances and mechanisms. **Science of The Total Environment**, [S. l.], v. 719, p. 137277, 2020.

GUO, M *et al.* A novel antimicrobial endolysin, LysPA26, against Pseudomonas aeruginosa. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 8, n. FEB, 2017.

GUPTA, R. K.; *et al.* Role of heterotrophic nitrifiers and aerobic denitrifiers in simultaneous nitrification and denitrification process: a nonconventional nitrogen removal pathway in wastewater treatment. **Letters in Applied Microbiology**, [S. l.], v. 74, n. 2, p. 159–184, 2022.

HARMS, G.; *et al.* Real-Time PCR Quantification of Nitrifying Bacteria in a Municipal Wastewater Treatment Plant. **Environmental Science & Technology**, [S. l.], v. 37, n. 2, p. 343–351, 2003.

HASSAN, Ahmad Y.; *et al.* The Age of Phage: Friend or Foe in the New Dawn of Therapeutic and Biocontrol Applications? **Pharmaceuticals**, [S. l.], v. 14, n. 3, p. 1–36, 2021.

- HE, T.; *et al.* Removal of Nitrate in Simulated Water at Low Temperature by a Novel Psychrotrophic and Aerobic Bacterium, *Pseudomonas taiwanensis* Strain J. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2018, 2018.
- HEWAWASAM, C.; *et al.* Oxygen transfer dynamics and nitrification in a novel rotational sponge reactor. **Biochemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 128, p. 162–167, 2017.
- HEYLEN, K.; *et al.* Cultivation of Denitrifying Bacteria: Optimization of Isolation Conditions and Diversity Study. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 72, n. 4, p. 2637, 2006.
- HIDAKA, T. Isolation of Marine Bacteriophages from Sea Water. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, [S. l.], v. 37, n. 12, p. 1199, 1971.
- HOLLAS, C. E.; *et al.* Modified Ludzack-Ettinger system role in efficient nitrogen removal from swine manure under high total suspended solids concentration. **International Journal of Environmental Science and Technology**, [S. l.], v. 16, n. 3, p. 7715–7726, 2019.
- HOWARD-VARONA, C.; *et al.* Lysogeny in nature: mechanisms, impact and ecology of temperate phages. **The ISME Journal 2017 11:7**, [S. l.], v. 11, n. 7, p. 1511–1520, 2017.
- HUANG, T. L.; *et al.* Nitrogen Removal Characteristics of a Newly Isolated Indigenous Aerobic Denitrifier from Oligotrophic Drinking Water Reservoir, *Zoogloea* sp. N299. **International Journal of Molecular Sciences 2015, Vol. 16, Pages 10038-10060**, [S. l.], v. 16, n. 5, p. 10038–10060, 2015.
- HUANG, Y. H.; *et al.* Functional characterization of triclosan-resistant enoyl-acyl-carrier protein reductase (fabV) in *pseudomonas aeruginosa*. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 7, n. NOV, p. 1903, 2016.
- HUANG, Z.; *et al.* Influence of physicochemical and operational parameters on *Nitrobacter* and *Nitrospira* communities in an aerobic activated sludge bioreactor. **Water Research**, [S. l.], v. 44, n. 15, p. 4351–4358, 2010.
- HUSSAIN, W.; *et al.* Bacteriophage-based advanced bacterial detection: Concept, mechanisms, and applications. **Biosensors and Bioelectronics**. Elsevier Ltd
- JAMAL, M.; *et al.* Isolation and characterization of a bacteriophage and its utilization against multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*-2995. **Life Sciences**, [S. l.], v. 190, p. 21–28, 2017.
- JEON, J; PARK, J. H; YONG, D. Efficacy of bacteriophage treatment against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in *Galleria mellonella* larvae and a mouse model of acute pneumonia. **BMC Microbiology**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 1–14, 2019.

JIA, W.; *et al.* Response of greenhouse gas emissions and microbial community dynamics to temperature variation during partial nitrification. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 261, p. 19–27, 2018.

JOHN, R; RAJAN, A. P. *Pseudomonas putida* APRRJVITS11 as a potent tool in chromium (VI) removal from effluent wastewater. **Preparative biochemistry & biotechnology**, [S. l.], v. 52, n. 2, p. 163–170, 2022.

JOŃCZYK, E.; *et al.* The influence of external factors on bacteriophages—review. **Folia Microbiologica**, [S. l.], v. 56, n. 3, p. 191, 2011.

JOŃCZYK-MATYSIAK, E.; *et al.* Factors determining phage stability/activity: challenges in practical phage application. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, [S. l.], v. 17, n. 8, p. 583–606, 2019.

JOO, H. S; HIRAI, M; SHODA, M. Piggery wastewater treatment using *Alcaligenes faecalis* strain No. 4 with heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. **Water Research**, [S. l.], v. 40, n. 16, p. 3029–3036, 2006.

JOSSERAND, A.; CLEYET-MAREL, J. C. Isolation from soils of *Nitrobacter* and evidence for novel serotypes using immunofluorescence. **Microbial ecology**, [S. l.], v. 5, n. 3, p. 197–205, 1979.

JURCZAK-KUREK, A.; *et al.* Biodiversity of bacteriophages: morphological and biological properties of a large group of phages isolated from urban sewage. **Scientific Reports** [S. l.], v. 6, 2016.

KANG, P. L.; *et al.* Denitrification Characteristics and Community Structure of Aerobic Denitrifiers from Lake and Reservoir Sediments. **Huan Jing Ke Xue**, [S. l.], v. 39, n. 5, p. 2431–2437, 2018.

KARAM AZIZ, R.; *et al.* Bacteriophage Enumeration and Detection Methods. **Frontiers in Microbiology** [S. l.], p. 23, 2020.

KHAIRNAR, K.; *et al.* Isolation and Characterization of Bacteriophages Infecting *Nocardioforms* in Wastewater Treatment Plant. **Biotechnology Research International**, [S. l.], v. 2014, p. 1–5, 2014.

KIM, J; LIM, J; LEE, C. Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: Applications and considerations. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 31, n. 8, p. 1358–1373, 2013.

KIM, J.; *et al.* Feeding strategy for single-stage deammonification to treat moderate-strength ammonium under low free ammonia conditions. **Science of The Total Environment**, [S. l.], v. 857, p. 159661, 2023.

KIM, Mia.; *et al.* Aerobic Denitrification of *Pseudomonas putida* AD-21 at Different C/N Ratios. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [S. l.], v. 106, n. 5, p. 498–502, 2008.

KIM, M. S.; *et al.* Disintegration of Waste Activated Sludge by Thermally-Activated Persulfates for Enhanced Dewaterability. **Environmental Science & Technology**, [S. l.], v. 50, n. 13, p. 7106–7115, 2016.

KRISHNA M, T. V.; *et al.* Effect of C/N ratio on denitrification of high-strength nitrate wastewater in anoxic granular sludge sequencing batch reactors. **Ecological Engineering**, [S. l.], v. 91, p. 441–448, 2016.

KUTTER, E. Phage host range and efficiency of plating. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, [S. l.], v. 501, p. 141–149, 2009.

KWIATEK, M.; PARASION, S.; NAKONIECZNA, A. Therapeutic bacteriophages as a rescue treatment for drug-resistant infections – an *in vivo* studies overview. **Journal of Applied Microbiology**, [S. l.], v. 128, n. 4, p. 985–1002, 2020.

LANGENDONK, R. F.; NEILL, D. R.; FOTHERGILL, J. L. The Building Blocks of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Implications for Current Resistance-Breaking Therapies. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [S. l.], v. 11, p. 307, 2021.

LATOCHESKI, E. C.; *et al.* Nitrospira in wastewater treatment: applications, opportunities and research gaps. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology 2022 21:4**, [S. l.], v. 21, n. 4, p. 905–930, 2022.

LAVANYA, J.; *et al.* Direct electron transfer of hemoglobin at nitrogen incorporated reduced graphene oxide obtained by radio frequency ammonia plasma treatment. **Sensors and Actuators B: Chemical**, [S. l.], v. 255, p. 536–543, 2018.

LETAROV, A. V.; KULIKOV, E. E. Adsorption of Bacteriophages on Bacterial Cells. **Biochemistry. Biokhimiia**, [S. l.], v. 82, n. 13, p. 1632–1658, 2017.

LETAROV, A. V.; KULIKOV, E. E. Adsorption of bacteriophages on bacterial cells. **Biochemistry (Moscow) 2017 82:13**, [S. l.], v. 82, n. 13, p. 1632–1658, 2018.

LI, D.; *et al.* Isolation and Nitrogen Removal Characteristics of an Aerobic Heterotrophic Nitrifying-Denitrifying Bacterium, *Klebsiella* sp. TN-10. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S. l.], v. 188, n. 2, p. 540–554, 2019.

LI, J.; *et al.* Effect of low COD/N ratios on stability of single-stage partial nitrification/anammox (SPN/A) process in a long-term operation. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 244, p. 192–197, 2017.

LIANG, Z.; *et al.* A control strategy of partial nitrification in a fixed bed biofilm reactor. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 102, n. 2, p. 710–715, 2011

LIU, M.; *et al.* Bacteriophages of wastewater foaming-associated filamentous *Gordonia* reduce host levels in raw activated sludge. **Nature Publishing Group**, [S. l.], 2015. a.

LIU, R.; *et al.* Bacteriophage ecology in biological wastewater treatment systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 105, n. 13, p. 5299–5307, 2021.

LIU, R.; *et al.* Phage-host associations in a full-scale activated sludge plant during sludge bulking. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 101, n. 16, p. 6495–6504, 2017.

LIU, S.; *et al.* Genomic insights into metabolic potentials of two simultaneous aerobic denitrification and phosphorus removal bacteria, *Achromobacter* sp. GAD3 and *Agrobacterium* sp. LAD9. **FEMS Microbiology Ecology**, [S. l.], v. 94, n. 4, 2018.

LIU, X.; *et al.* Partial nitrification-reactor configurations, and operational conditions: Performance analysis. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [S. l.], v. 8, n. 4, p. 103984, 2020.

LOC CARRILLO, C.; *et al.* Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 71, n. 11, p. 6554–6563, 2005.

LOC-CARRILLO, C; ABEDON, S.T. Pros and cons of phage therapy. **Bacteriophage**, [S. l.], v. 1, n. 2, p. 111, 2011.

LY-CHATAIN, M. H. The factors affecting effectiveness of treatment in phages therapy. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 5, 2014.

MA, B.; *et al.* Suppressing Nitrite-oxidizing Bacteria Growth to Achieve Nitrogen Removal from Domestic Wastewater via Anammox Using Intermittent Aeration with Low Dissolved Oxygen. **Scientific Reports 2015 5:1**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 1–9, 2015.

MADIGAN, M. T.; *et al.* **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre.

MADONI, P; DAVOLI, D; GIBIN, G. Survey of filamentous microorganisms from bulking and foaming activated-sludge plants in Italy. **Water Research**, [S. l.], v. 34, n. 6, p. 1767–1772, 2000.

MAGILL, D.; *et al.* Pf16 and phiPMW: Expanding the realm of *Pseudomonas putida* bacteriophages. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 12, n. 9, p. e0184307, 2017.

MANASA, R. L.; MEHTA, A. Current perspectives of anoxic ammonia removal and blending of partial nitrifying and denitrifying bacteria for ammonia reduction in wastewater treatment. **Journal of Water Process Engineering**, [S. l.], v. 41, p. 102085, 2021.

MANN, N. H. The Third Age of Phage. **PLoS Biology**, [S. l.], v. 3, n. 5, p. e182, 2005.

MANSOUR, Nahla M. Bacteriophages are natural gift, could we pay further attention! **Food Microbiol**, [S. l.], v. 2, n. 1, 2018.

- MATHIEU, J.; *et al.* Going Viral: Emerging Opportunities for Phage-Based Bacterial Control in Water Treatment and Reuse. **Accounts of Chemical Research**, [S. l.], v. 52, n. 4, p. 849–857, 2019.
- MEDHI, K.; *et al.* Investigating the nitrification and denitrification kinetics under aerobic and anaerobic conditions by *Paracoccus denitrificans* ISTOD1. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 242, p. 334–343, 2017.
- METCH, J. W.; *et al.* Insights gained into activated sludge nitrification through structural and functional profiling of microbial community response to starvation stress. **Environmental Science: Water Research & Technology**, [S. l.], v. 5, n. 5, p. 884–896, 2019.
- MYELNIKOV, D. An Alternative Cure: The Adoption and Survival of Bacteriophage Therapy in the USSR, 1922–1955. **Journal of the History of Medicine and Allied Sciences**, [S. l.], v. 73, n. 4, p. 385–411, 2018.
- NAUREEN, Z.; *et al.* Bacteriophages presence in nature and their role in the natural selection of bacterial populations. **Acta Bio Medica : Atenei Parmensis**, [S. l.], v. 91, n. Suppl 13, p. 1–13, 2020.
- NIELSEN, P. H.; SINGLETON, C. M. Parasitic bacteria control foam formation. **Nature Microbiology**, [S. l.], v. 6, n. 6, p. 701–702, 2021.
- NILSSON, A. S. Pharmacological limitations of phage therapy. **Uppsala Journal of Medical Sciences**, [S. l.], v. 124, n. 4, p. 218–227, 2019.
- NIU, Q.; *et al.* Process stability and the recovery control associated with inhibition factors in a UASB-anammox reactor with a long-term operation. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 203, p. 132–141, 2016.
- NOCKO, L. M. Remoção de carbono e nitrogênio em reator de leito móvel submetido à aeração intermitente. [S. l.], 2009.
- OBESO, J.M.; *et al.* Lytic activity of the recombinant staphylococcal bacteriophage PhiH5 endolysin active against *Staphylococcus aureus* in milk. **International journal of food microbiology**, [S. l.], v. 128, n. 2, p. 212–218, 2008.
- O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations the review on antimicrobial resistance chaired. [S. l.], 2016.
- PACHORI, P; GOTHALWAL, R; GANDHI, P. Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. **Genes & Diseases**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 109–119, 2019.
- PADHI, S.K.; *et al.* Characterisation of heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying *Klebsiella pneumoniae* CF-S9 strain for bioremediation of wastewater. **International Biodeterioration & Biodegradation**, [S. l.], v. 78, p. 67–73, 2013.

PANG, Z.; *et al.* Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 37, n. 1, p. 177–192, 2019.

PARMAR, K.; *et al.* An Insight into Phage Diversity at Environmental Habitats using Comparative Metagenomics Approach. **Current microbiology**, [S. l.], v. 75, n. 2, p. 132–141, 2018.

PEPPER, I; GERBA, C; GENTRY, T. **Environmental Microbiology**. [s.l.] Elsevier, 2015. DOI: 10.1016/C2011-0-05029-9.

PICHEL, A.; *et al.* Is the ammonia stripping pre-treatment suitable for the nitrogen removal via partial nitrification-anammox of OFMSW digestate? **Journal of Hazardous Materials**, [S. l.], v. 403, p. 123458, 2021.

PODMIRSEG, S.; *et al.* Microbial response on the first full-scale DEMON® biomass transfer for mainstream deammonification. **Water Research**, [S. l.], v. 218, p. 118517, 2022.

PRINCIPI, N; SILVESTRI, E; ESPOSITO, S. Advantages and Limitations of Bacteriophages for the Treatment of Bacterial Infections. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], v. 10, 2019.

PROSSER, J. I. Autotrophic nitrification in bacteria. **Advances in microbial physiology**, [S. l.], v. 30, n. C, p. 125–181, 1989.

QING, H.; *et al.* Novel heterotrophic nitrogen removal and assimilation characteristic of the newly isolated bacterium *Pseudomonas stutzeri* AD-1. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [S. l.], v. 126, n. 3, p. 339–345, 2018.

QUESADA, J M.; SORIANO, M.I ; ESPINOSA-URGEL, M. Stability of a *Pseudomonas putida* KT2440 Bacteriophage-Carried Genomic Island and Its Impact on Rhizosphere Fitness. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 78, n. 19, p. 6963–6974, 2012.

RAJTA, A.; *et al.* Role of heterotrophic aerobic denitrifying bacteria in nitrate removal from wastewater. **Journal of Applied Microbiology**, [S. l.], v. 128, n. 5, p. 1261–1278, 2020.

REZAEI, A.; *et al.* Molecular identification of nitrifying bacteria in activated sludge. **J. Mater. Environ. Sci**, [S. l.], v. 4, n. 5, p. 601–604, 2013.

ROSTØL, J. T.; MARRAFFINI, L. (Ph)ighting phages – how bacteria resist their parasites. **Cell host & microbe**, [S. l.], v. 25, n. 2, p. 184, 2019.

RUNA, V.; *et al.* Bacteriophages in Biological Wastewater Treatment Systems: Occurrence, Characterization, and Function. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 12, 2021.

SALMOND, G. P. C.; FINERAN, P. C. A century of the phage: past, present and future. **Nature reviews. Microbiology**, [S. l.], v. 13, n. 12, p. 777–786, 2015.

SANT'ANNA JR, G. L. Tratamento biológico de efluentes: fundamentos e aplicações. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, [S. l.], v. 16, n. 2, p. IV–IV, 2011.

SANTOS, H. R. M.; *et al.* A 16S rDNA PCR-based theoretical to actual delta approach on culturable mock communities revealed severe losses of diversity information. **BMC Microbiology**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 1–14, 2019.

SEED, K. D.; *et al.* Phase Variable O Antigen Biosynthetic Genes Control Expression of the Major Protective Antigen and Bacteriophage Receptor in *Vibrio cholerae* O1. **PLoS Pathogens**, [S. l.], v. 8, n. 9, p. e1002917, 2012.

SERWER, P.; *et al.* Propagating the missing bacteriophages: A large bacteriophage in a new class. **Virology Journal**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 1–5, 2007.

SERWER, P.; *et al.* Improved isolation of undersampled bacteriophages: finding of distant terminase genes. **Virology**, [S. l.], v. 329, n. 2, p. 412–424, 2004.

SHARIFF, M; BERI, K. Exacerbation of bronchiectasis by *Pseudomonas monteilii*: A case report. **BMC Infectious Diseases**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 1–4, 2017.

SHARMA, S.; *et al.* Isolation and characterization of a lytic bacteriophage against *Pseudomonas aeruginosa*. **Scientific Reports 2021 11:1**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 1–22, 2021.

SHENG, G; YU, H; LI, X. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 28, n. 6, p. 882–894, 2010.

SIEIRO, C.; *et al.* A Hundred Years of Bacteriophages: Can Phages Replace Antibiotics in Agriculture and Aquaculture? **Antibiotics 2020, Vol. 9, Page 493**, [S. l.], v. 9, n. 8, p. 493, 2020.

SOROKIN, D.; *et al.* Isolation and characterization of a novel facultatively alkaliphilic Nitrobacter species, *N. alkalicus* sp. nov. **Archives of Microbiology**, [S. l.], v. 170, n. 5, p. 345–352, 1998.

SPIECK, E; LIPSKI, A. Cultivation, growth physiology, and chemotaxonomy of nitrite-oxidizing bacteria. **Methods in enzymology**, [S. l.], v. 486, n. C, p. 109–130, 2011.

STROUS, M.; *et al.* The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology 1998 50:5**, [S. l.], v. 50, n. 5, p. 589–596, 1998.

SU, F; TAKAYA, N; SHOUN, H. Nitrous Oxide-forming Codenitrification Catalyzed by Cytochrome P450_{nor}. **OUP**, [S. l.], v. 68, n. 2, p. 473–475, 2014.

SULAKVELIDZE, A.; ALAVIDZE, Z.; MORRIS, J. Bacteriophage therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 45, n. 3, p. 649–659, 2001.

TAGLIAFERRI, T.L; JANSEN, M; HORZ, H. Fighting Pathogenic Bacteria on Two Fronts: Phages and Antibiotics as Combined Strategy. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [S. l.], v. 9, 2019.

TAYLOR, S. C.; *et al.* The Ultimate qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time. **Trends in Biotechnology**, [S. l.], v. 37, n. 7, p. 761–774, 2019.

TEY, B. T.; *et al.* Production of fusion m13 phage bearing the di-sulphide constrained peptide sequence (C-WSFFSNI-C) that interacts with hepatitis B core antigen. **African Journal of Biotechnology**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 268–273, 2009.

VAN DER S.; *et al.* Application of the Anammox Process. *Em: Nitrification*. Washington, DC, USA: ASM Press, 2014. p. 237–263.

VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; JETTEN, M. S. M. Microbiological conversions in nitrogen removal. **Water Science and Technology**, [S. l.], v. 38, n. 1, p. 1–7, 1998.
VAN RIJN, Jaap; TAL, Yossi; SCHREIER, Harold J. Denitrification in recirculating systems: Theory and applications. **Aquacultural Engineering**, [S. l.], v. 34, n. 3, p. 364–376, 2006.

VENTOLA, C. L. The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. **Pharmacy and Therapeutics**, [S. l.], v. 40, n. 4, p. 277, 2015.

VENTURIN, B. Tratamento do digestato oriundo da digestão anaeróbia de efluente da suinocultura em uma unidade piloto do reator nitrammox. [S. l.], 2022.

VERMA, Y.K; VERMA, M.K. CT gene modulate differential expression of chitinase gene under variant habitats in *Vibrio cholerae*. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 20–25, 2013.

VIANCELLI, A.; *et al.* Bacterial biodiversity from an anaerobic up flow bioreactor with ANAMMOX activity inoculated with swine sludge. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [S. l.], v. 54, n. 5, p. 1035–1041, 2011.

WANG, P.; *et al.* Characterization of efficient aerobic denitrifiers isolated from two different sequencing batch reactors by 16S-rRNA analysis. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [S. l.], v. 103, n. 6, p. 563–567, 2007.

WANG, T.; *et al.* Start-up and long-term operation of the Anammox process in a fixed bed reactor (FBR) filled with novel non-woven ring carriers. **Chemosphere**, [S. l.], v. 91, n. 5, p. 669–675, 2013.

WANNASRICHAN, W.; *et al.* Phage-resistant *Pseudomonas aeruginosa* against a novel lytic phage JJ01 exhibits hypersensitivity to colistin and reduces biofilm production. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 13, p. 3863, 2022.

- WARD, M. H.; *et al.* Workgroup Report: Drinking-Water Nitrate and Health—Recent Findings and Research Needs. **Environmental Health Perspectives**, [S. l.], v. 113, n. 11, p. 1607–1614, 2005.
- WEISSBACH, M.; *et al.* A proposed nomenclature for biological processes that remove nitrogen. **Environmental Science: Water Research and Technology**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 10–17, 2017.
- WHITMAN, P. A.; MARSHALL, R. T. Characterization of two psychrophilic *Pseudomonas* bacteriophages isolated from ground beef. **Applied microbiology**, [S. l.], v. 22, n. 3, p. 463–468, 1971.
- WITHEY, S.; *et al.* Bacteriophages—potential for application in wastewater treatment processes. **Science of The Total Environment**, [S. l.], v. 339, n. 1–3, p. 1–18, 2005.
- WITTEBOLE, X; DE ROOCK, S; OPAL, S. M. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. **Virulence**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 226, 2014.
- WU, J.; *et al.* A successful start-up of an anaerobic membrane bioreactor (AnMBR) coupled mainstream partial nitrification-anammox (PN/A) system: A pilot-scale study on in-situ NOB elimination, AnAOB growth kinetics, and mainstream treatment performance. **Water Research**, [S. l.], v. 207, p. 117783, 2021.
- XU, Y.; *et al.* Nitrogen Removal Characteristics of *Pseudomonas putida* Y-9 Capable of Heterotrophic Nitrification and Aerobic Denitrification at Low Temperature. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2017, 2017.
- YANG, J.; *et al.* A critical review of aerobic denitrification: Insights into the intracellular electron transfer. **Science of The Total Environment**, [S. l.], v. 731, p. 139080, 2020.
- YANG, X. R.; *et al.* Anammox Bacteria Are Potentially Involved in Anaerobic Ammonium Oxidation Coupled to Iron(III) Reduction in the Wastewater Treatment System. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 12, p. 2459, 2021.
- YOUNG, R. Phage lysis: do we have the hole story yet? **Current opinion in microbiology**, [S. l.], v. 16, n. 6, p. 790–797, 2013.
- YOUNG, R; GILL, J. J. Phage therapy redux — What is to be done?: Bacteriophage biology should move beyond a model system to support human health. **Science (New York, N.Y.)**, [S. l.], v. 350, n. 6265, p. 1163, 2015.
- YU, P.; *et al.* Control of Antibiotic-Resistant Bacteria in Activated Sludge Using Polyvalent Phages in Conjunction with a Production Host. **Environmental Science & Technology Letters**, [S. l.], v. 4, n. 4, p. 137–142, 2017.
- ZHANG, N.; *et al.* Nitrogen removal by a metal-resistant bacterium, *Pseudomonas putida* ZN1, capable of heterotrophic nitrification–aerobic denitrification. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, [S. l.], v. 94, n. 4, p. 1165–1175, 2019. a.

ZHANG, W.; *et al.* Characterization of Aerobic Denitrifying Bacterium *Pseudomonas mendocina* Strain GL6 and Its Potential Application in Wastewater Treatment Plant Effluent. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [S. l.], v. 16, n. 3, 2019. b.

ZHANG, Y; HUNT, H. K.; HU, Z. Application of bacteriophages to selectively remove *Pseudomonas aeruginosa* in water and wastewater filtration systems. **Water Research**, [S. l.], v. 47, n. 13, p. 4507–4518, 2013. a.

ZHAO, B.; *et al.* Characterization of an aerobic denitrifier *Pseudomonas stutzeri* strain XL-2 to achieve efficient nitrate removal. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 250, p. 564–573, 2018.

ZHAO, B; HE, Y. L; ZHANG, X. F. Nitrogen removal capability through simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by *Bacillus* sp. LY. **Environmental Technology**, [S. l.], v. 31, n. 4, p. 409–416, 2010.

ZHU, G.; *et al.* Biological removal of nitrogen from wastewater. **Reviews of environmental contamination and toxicology**, [S. l.], v. 192, p. 159–195, 2008

ZOPPAS, F.M; BERNARDES, A.M; MENEGUZZI, A. Parâmetros operacionais na remoção biológica de nitrogênio de águas por nitrificação e desnitrificação simultânea. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 29–42, 2018.

**APÊNDICE A –
Sequência de nucleotídeos**

GAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCCGGATTA
GCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTA ACTGGTCTGAG
AGGATGATCAGTCACACTGGA ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGC
AGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGT
GTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGT
AAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCT
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGG
GCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTTGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTC
AACCTGGGA ACTGCATCCAAA ACTGGCAAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTG
GAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCG
AAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCA
AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTT
GGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGG
AGTACGGCCGCAAGGTTAAA ACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCG
GTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGAC
ATGCAGAGA ACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGA ACTCTGACACAGGT
GCTGCATGGCTGTTCGTCAGCTCGTGTTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAAC
GAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGCACTCTAAGGAG
ACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCC
CTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAGAGGGTTGCCAA
GCCGCGAGGTGGAGCTAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCT
GCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGC
GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCC