

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
Escola de Engenharia  
Programa de Pós-Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos

Thayná Guimarães Silva

**Avaliação de diferentes diluições para aplicação do Processo Anammox na remoção de N-amoniaco de efluente da indústria de fertilizantes**

Belo Horizonte  
2024

Thayná Guimarães Silva

**Avaliação de diferentes diluições para aplicação do Processo Anammox na remoção de N-amoniaco de efluente da indústria de fertilizantes**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito à obtenção do título de Mestre em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos.

Área de concentração: Saneamento

Linha de pesquisa: Tratamento de Águas Residuárias

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Juliana Calábria de Araújo

Belo Horizonte  
2024

S586a	<p>Silva, Thayná Guimarães.  Avaliação de diferentes diluições para aplicação do Processo Anammox na remoção de N-amoniaco de efluente da indústria de fertilizantes [recurso eletrônico] / Thayná Guimarães Silva. – 2024.  1 recurso online (183 f. : il., color.) : pdf.</p>
	<p>Orientadora: Juliana Calábria de Araújo.</p>
	<p>Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia.</p>
	<p>Apêndices e anexos: 175-183.</p>
	<p>Bibliografia: f. 148-174.</p>
	<p>1. Engenharia sanitária – Teses. 2. Saneamento – Teses.  3. Tratamento de efluentes industriais – Teses. 4. Oxidação – Teses.  5. Amônio – Teses. I. Araújo, Juliana Calábria de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia. III. Título.</p>
	<p>CDU: 628(043)</p>



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Escola de Engenharia

Curso de Pós-Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos

"Avaliação de diferentes diluições para aplicação do Processo Anammox na remoção de N-amoniaco de efluente da indústria de fertilizantes"

**THAYNÁ GUIMARÃES SILVA**

Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora constituída pelos Senhores:

Profª JULIANA CALÁBRIA DE ARAÚJO

Profª MIRIAM CRISTINA SANTOS AMARAL MORAVIA

Profª MARCIA HELENA RISSATO ZAMARIOLLI DAMIANOVIC

Aprovada pelo Colegiado do PG SMARH Versão Final aprovada por

Profª. Priscilla Macedo Moura  
Araújo  
Coordenadora

Profª. Juliana Calábria de  
Orientadora

Belo Horizonte, 16 de julho de 2024.

---



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Calabria de Araujo, Professora do Magistério Superior**, em 17/07/2024, às 16:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic, Usuário Externo**, em 17/07/2024, às 16:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Miriam Cristina Santos Amaral Moravia, Professora do Magistério Superior**, em 17/07/2024, às 18:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Coutinho de Paula, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 19/11/2024, às 07:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3365357** e o código CRC **132F3AAE**.

---

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS e à Nossa Senhora Aparecida, por guiarem meus caminhos e me protegerem nessa jornada acadêmica. *“Andar com fé eu vou, que a fé não costuma faiar...”*

À Universidade Federal de Minas Gerais, ao Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, ao Programa de Pós-Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos, pela oportunidade de ingressar e realizar o mestrado. A CAPES, ao CNPq e a FAPEMIG, pelo apoio financeiro concedido.

À professora Juliana Calábria de Araújo, pela oportunidade concedida a mim de ser sua orientanda, pela confiança, pela exímia orientação e por ser exemplo de coragem e resiliência.

Às professoras Miriam Amaral e Márcia Damianovic, pela disponibilidade em examinar este trabalho e contribuírem para o seu enriquecimento.

À Empresa OXI Ambiental, pelo fornecimento do efluente objeto de testes do presente estudo.

Aos meus pais, Tânia e Hamilton, por acreditarem nos meus sonhos e me impulsionarem a sempre realizá-los. Dedico este trabalho a vocês.

Ao meu marido, Adriano, por ser minha âncora, meu incentivo diário, meu exemplo de trabalho, força e inteligência. Me espelho em você!

Aos meus irmãos, Renata e Sérgio, por sempre estarem comigo e me apoiarem nas minhas escolhas e decisões. Aos meus amados sobrinhos, Victinho, Rafinha, Davizoca e Pepê, por trazerem tanta alegria e amor aos dias difíceis e de extrema exaustão.

Aos meus grandes amigos e eternos gestores, Paty e Roberto, por me guiarem com maestria para os caminhos da vida profissional, por despertarem meu senso crítico e me darem base para o enfrentamento deste desafio.

A minha mentora e grande amiga, Doutora Luyara. A você, gratidão por tanto e por tudo. Em nenhuma palavra eu conseguiria expressar o quão valiosa foi a sua ajuda e a sua companhia aos sábados e feriados de laboratório.

À Cíntia, minha querida Cíntia e mamãe do Dani. Obrigada pela paciência, pelo suporte com a biologia molecular, pelos conselhos e pela amizade construída. Você com certeza tornou o processo mais leve.

As minhas IC's Sarinha, Mari, Jully e a minha IC de coração, Ana Luiza, que desempenharam papel crucial nesse projeto e acreditaram nas *anamnox* como eu! Este trabalho é nosso, meninas. Obrigada!

Ao querido amigo Diogo pela solicitude e proatividade de sempre, me auxiliando nas coletas de efluente no CEPTs e nas análises físico-químicas.

A todos os professores do DESA que de alguma maneira contribuíram para este trabalho e com a minha formação acadêmica.

Aos meus amigos de mestrado, Ana Paula, Bruna, Daniel, Diogo, Henrique e Vanessa, por terem feito parte dessa louca e prazerosa jornada comigo.

Aos meus amigos da vida e para a vida, Letícia, Harley, Júlia, Rachel, Tati, Lohanne, Natália, Carina, Luana e Deise, por me ouvirem nos momentos de cansaço, por compreenderem a minha ausência e não largarem a minha mão. Eu amo vocês.

A todos que chegaram comigo até aqui, muito obrigada.

## RESUMO

A oxidação anaeróbia de amônio (anammox) é um dos processos biológicos mais promissores para o tratamento de efluentes ricos em amônio, uma vez que as bactérias com atividade Anammox oxidam o íon amônio diretamente a nitrogênio gasoso, usando o nitrito como acceptor final de elétrons. Dessa forma, o oxigênio não é requerido, proporcionando menor consumo energético e dispensa de fontes externas de carbono. Nesse sentido, os testes com efluentes domésticos e industriais são encorajados na literatura. Contudo, o desenvolvimento de pesquisas e a sua aplicação ao tratamento de efluente da indústria de fertilizantes nitrogenados, assim como a avaliação das melhores condições operacionais dos reatores com atividade anammox não tem sido o alvo principal dos estudos. Esta pesquisa avaliou, em escala laboratorial, o desempenho do processo anammox em reator em batelada sequencial (RBS) por 403 dias, aplicado ao efluente de uma indústria de fertilizantes nitrogenados, contendo, aproximadamente  $10.000\text{mgNH}_4^+/\text{L}$ , testando diferentes diluições e cargas de nitrogênio aplicada. Nesta pesquisa, a diluição do fertilizante nitrogenado em efluente anaeróbio doméstico foi realizada como estratégia, para não inibir o processo, sendo avaliadas 3 diferentes condições: Fase 1 - diluição 1:100, Fase 2 - diluição 1:50, Fase 3 - diluição 1:16,7 de efluente de fertilizante em efluente anaeróbio doméstico, respectivamente, com suplementação de nitrito ao reator. Além dos parâmetros físico-químicos, a comunidade microbiana foi avaliada usando as técnicas de qPCR em tempo real e o sequenciamento massivo do amplicon 16S rRNA. As Fases 1 e 2 apresentaram consumo simultâneo de nitrogênio amoniacal e nitrito, por 101 dias, com elevada eficiência média de remoção de nitrogênio amoniacal (80,69% - Fase 1) (98,06% - Fase 2) e nitrito (85,50% - Fase 1) (99,41% - Fase 2), com cargas de nitrogênio aplicadas de até  $42,75\text{ g.m}^3\text{d}^{-1}$ . Remoção de DQO, subsidiada pelo consórcio microbiano com bactérias desnitrificantes heterotróficas, sem prejuízo para a atividade anammox, também foi observada. Na Fase 3 o processo anammox foi inibido sem indícios de recuperação do desempenho durante o período avaliado. Nas fases 1 e 2 a abundância das bactérias anammox foi de  $3,12 \times 10^8$  e  $4,49 \times 10^8$  cópias/ g de lodo do gene RNAr 16S de anammox, respectivamente. Já no SNG o gênero *Ca. Brocadia* foi identificado em baixa abundância relativa (0,15%), na fase 1. Esta pesquisa revelou a potencialidade do uso do processo anammox para efluentes da indústria de fertilizantes nitrogenados em altas diluições (1:100 e 1:50). A pesquisa também mostrou que a aplicação do processo anammox sob condições diretas de uso foi inviável para menores diluições (1:16,7). O pré-tratamento deste efluente, visando a degradação das altas cargas dos compostos nitrogenados e de outras substâncias com efeito inibitório ao processo, deve ser avaliado como alternativa conjugada ao processo anammox.

Palavras-chave: Anammox; nitrogênio amoniacal; efluente da indústria de fertilizante; bactérias desnitrificantes; *Ca. Brocadia*; RBS.

## ABSTRACT

Anaerobic Ammonium Oxidation (Anammox) is one of the most promising biological processes for the treatment of ammonium-rich effluents, as Anammox-active bacteria oxidize ammonium ions directly to nitrogen gas, using nitrite as the final electron acceptor. In this way, oxygen is not required, leading to lower energy consumption and eliminating the need for external carbon sources. In this context, testing with domestic and industrial effluents is encouraged in the literature. However, the development of research and its application to the treatment of effluent from nitrogen fertilizer industries, as well as the evaluation of the best operational conditions for reactors with Anammox activity, have not been the main focus of studies. This research evaluated, on a laboratory scale, the performance of the Anammox process in a Sequencing Batch Reactor (SBR) for 403 days, applied to effluent from a nitrogen fertilizer industry, containing approximately  $10,000 \text{ mgNH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ , testing different dilutions and nitrogen loading. In this study, dilution of nitrogen fertilizer in domestic anaerobic effluent was used as a strategy to prevent process inhibition, with three different conditions being evaluated: Phase 1 - 1:100 dilution, Phase 2 - 1:50 dilution, Phase 3 - 1:16.7 dilution of fertilizer effluent in domestic anaerobic effluent, respectively, with nitrite supplementation to the reactor. In addition to the physicochemical parameters, the microbial community was evaluated using qPCR techniques in real-time and 16S rRNA amplicon massive sequencing. Phases 1 and 2 showed simultaneous consumption of ammonium nitrogen and nitrite for 101 days, with high average nitrogen removal efficiency (80.69% - Phase 1) (98.06% - Phase 2) and nitrite removal (85.50% - Phase 1) (99.41% - Phase 2), with nitrogen loads of up to  $42.75 \text{ g} \cdot \text{m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$ . COD removal, supported by the microbial consortium with heterotrophic denitrifying bacteria, without compromising Anammox activity, was also observed. In Phase 3, the Anammox process was inhibited with no signs of performance recovery during the assessed period. In Phases 1 and 2, the abundance of Anammox bacteria was  $3.12 \times 10^8$  and  $4.49 \times 10^8$  copies/g of sludge of the 16S rRNA gene of Anammox, respectively. In the SNG, the genus *Ca. Brocadia* was identified at low relative abundance (0.15%) in Phase 1. This study revealed the potential of using the Anammox process for effluents from the nitrogen fertilizer industry at high dilutions (1:100 and 1:50). The study also showed that applying the Anammox process under direct use conditions was unfeasible for lower dilutions (1:16.7). Pre-treatment of this effluent, aiming at the degradation of high loads of nitrogen compounds and other substances with inhibitory effects on the process, should be considered as an alternative combined with the Anammox process.

Keywords: Anammox; ammoniacal nitrogen; fertilizer industry effluente; denitrifying bacteria; *Ca. Brocadia*; RBS.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Cadeia produtiva de fertilizantes .....	21
Figura 3.2 - Processos-chave do ciclo do Nitrogênio .....	31
Figura 3.3 – Reações no anaxossomo .....	39
Figura 4.1 - Fluxo de chegada dos efluentes utilizados no experimento .....	67
Figura 4.2 - RBS em escala de bancada – Laboratório de Microbiologia – DESA/UFMG .....	68
Figura 4.3 - Ciclo operacional do reator RBS .....	69
Figura 5.1 - Dinâmica dos compostos nitrogenados durante o enriquecimento das bactérias anammox no RBS .....	82
Figura 5.2 - Coeficiente estequiométrico do consumo de nitrito/consumo de amônia .....	85
Figura 5.3 - Box-plot do coeficiente estequiométrico Consumo de N-NO <sub>2</sub> - / Consumo de N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> obtidos para o RBS durante os dias 120 e 266 da etapa de enriquecimento .....	86
Figura 5.4 – Dinâmica de remoção dos compostos nitrogenados - enriquecimento .	88
Figura 5.5 - Eficiência de remoção dos compostos nitrogenados - enriquecimento..	89
Figura 5.6 - Dinâmica de remoção dos compostos nitrogenados da Fase 1 .....	91
Figura 5.7 - Concentrações afluente e efluente de amônia e nitrito - Fase 1 .....	92
Figura 5.8 - Carga de nitrogênio total aplicada e removida no RBS– Fase 1.....	93
Figura 5.9 - Coeficiente estequiométrico de consumo de nitrito/consumo de amônia e produção de nitrato/consumo de amônio durante a fase 1 .....	94
Figura 5.10 - Concentração de matéria orgânica (DQO) afluente e efluente no RBS – Fase 1 .....	96
Figura 5.11 - Box-plot da concentração de DQO afluente e efluente no RBS – Fase 1 .....	97
Figura 5.12 - Box-plot da matéria orgânica (DBO) afluente e efluente no RBS – Fase 1 .....	97
Figura 5.13 - Relação de DQO/N no RBS – Fase 1 .....	99
Figura 5.14 - Alcalinidade afluente e efluente do RBS – Fase 1 .....	99
Figura 5.15 - Dinâmica de remoção dos compostos nitrogenados da Fase 2.....	101
Figura 5.16 - Concentrações afluente e efluente de amônia e nitrito - Fase 2 .....	102
Figura 5.17 - Carga de nitrogênio total aplicada e removida no RBS – Fase 2.....	103

Figura 5.18 - Coeficiente estequiométrico de consumo de nitrito/consumo de amônia e produção de nitrato/consumo de amônio durante a fase 2.....	103
Figura 5.19 - Box-plot da concentração de DQO afluente e efluente no RBS – Fase 2 .....	106
Figura 5.20 - Concentração de matéria orgânica (DQO) afluente e efluente no RBS – Fase 2 .....	106
Figura 5.21 - Relação de DQO/N no RBS – Fase 2 .....	107
Figura 5.22 - Alcalinidade afluente e efluente do RBS – Fase 2 .....	109
Figura 5.23 - Dinâmica de remoção dos compostos nitrogenados da Fase 3.....	112
Figura 5.24 - Concentrações afluente e efluente de amônia e nitrito - Fase 3.....	113
Figura 5.25 - Carga de nitrogênio total aplicada e removida no RBS – Fase 3.....	113
Figura 5.26 - Coeficiente estequiométrico de consumo de nitrito/consumo de amônia durante a fase 3 .....	114
Figura 5.27 - Concentração de matéria orgânica (DQO) afluente e efluente no RBS – Fase 3 .....	115
Figura 5.28 – Box-plot da concentração de DQO afluente e efluente no RBS – Fase 3 .....	116
Figura 5.29 - Relação de DQO/N no RBS – Fase 3 .....	117
Figura 5.30 - Alcalinidade afluente e efluente do RBS – Fase 3 .....	118
Figura 5.31 - Dinâmica dos compostos nitrogenados durante as três fases da pesquisa .....	122
Figura 5.32 - Dinâmica da concentração de DQO durante as três fases desta pesquisa .....	123
Figura 5.33 - Concentração de DQO afluente e efluente durante as 3 fases operacionais (Fase 1, 1% de Fert.), (Fase 2, 2% de Fert.) e (Fase 3, 6% de Fert.). .....	124
Figura 5.34 – Eficiência de remoção de DQO durante as 3 fases.....	124
Figura 5.35 - Dinâmica da alcalinidade durante a pesquisa .....	125
Figura 5.36 - Alcalinidade afluente e efluente medidas durante a 3 fases operacionais (Fase 1, 1% de Fert.), (Fase 2, 2% de Fert.) e (Fase 3, 6% de Fert.). .....	126
Figura 5.37 - Estimativa do número de cópias dos genes de bactérias nas fases de enriquecimento e operacionais da pesquisa .....	128

Figura 5.38 - Abundância relativa de bactérias anammox e desnitrificantes em relação ao número total de bactérias, nas fases de enriquecimento e operacional da pesquisa .....	130
Figura 5.39 - Abundância relativa dos filos nas amostras do RBS anammox no tratamento de efluente de fertilizante nitrogenado diluído com efluente anaeróbio doméstico .....	134
Figura 5.40 - Abundância relativa dos gêneros nas amostras do RBS anammox no tratamento de efluente de fertilizante nitrogenado diluído com efluente anaeróbio doméstico .....	137

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Estados de oxidação do nitrogênio.....	29
Tabela 3.2 – Micro-organismos oxidadores de amônia e nitrito .....	33
Tabela 3.3 – Taxonomia das bactérias anammox.....	40
Tabela 3.4 - Comparação dos efeitos de inibição em diferentes estudos utilizando processo Anammox.....	50
Tabela 3.5 - Tratamento de efluentes de fertilizantes sob distintos processos e condições operacionais.....	52
Tabela 3.6 - Compostos com efeitos inibitórios na atividade anammox.....	58
Tabela 4.1 - Condições operacionais do reator UASB.....	65
Tabela 4.2 - Caracterização do efluente anaeróbio doméstico utilizado ao longo do estudo.....	67
Tabela 4.3 - Caracterização do efluente da indústria de fertilizante nitrogenado .....	67
Tabela 4.4 – Concentração dos substratos no meio de cultura – aclimatação.....	70
Tabela 4.5 – Composição do meio mineral autotrófico .....	71
Tabela 4.6 – Composição das soluções de micronutrientes I e II .....	71
Tabela 4.7 – Concentração dos substratos no meio de cultura - enriquecimento do reator.....	72
Tabela 4.8 – Fases do estudo e respectivos parâmetros de análise.....	73
Tabela 4.9 - Parâmetros de interesse da pesquisa .....	74
Tabela 4.10 - Amostras coletadas para a investigação microbiana .....	75
Tabela 4.11 - Concentração dos reagentes utilizados na reação da PCR em tempo real, para um volume final de 20 µL .....	78
Tabela 4.12 - Iniciadores (Primers) utilizados na reação da PCR em tempo real .....	78
Tabela 4.13 - Equações das curvas padrão e eficiências dos ensaios da PCR em tempo real de quantificação absoluta.....	79
Tabela 5.1 - Estatística descritiva do coeficiente estequiométrico obtido durante os dias 120 a 266 da etapa de enriquecimento.....	85
Tabela 5.2 - Estatística descritiva da carga aplicada e removida durante a Fase 1 (1% de fertilizante e 99% de efluente anaeróbio de UASB) .....	93
Tabela 5.3 - Estatística descritiva do coeficiente estequiométrico ( $\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$ ) obtido durante a Fase 1 (1% de fertilizante e 99% de efluente anaeróbio de UASB) .....	94

Tabela 5.4 - Estatística descritiva da concentração de DQO afluente e efluente e da relação DQO/N durante a Fase 1 (1% de fertilizante e 99% de efluente anaeróbio de UASB) .....	98
Tabela 5.5 - Estatística descritiva da carga aplicada e removida durante a Fase 2 (2% de fertilizante e 98% de efluente anaeróbio de UASB) .....	103
Tabela 5.6 - Estatística descritiva do coeficiente estequiométrico ( $\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$ ) obtido durante a Fase 2 (2% de fertilizante e 98% de efluente anaeróbio de UASB) .....	104
Tabela 5.7 - Estatística descritiva da concentração de DQO afluente e efluente e da relação DQO/N durante a Fase 2 (2% de fertilizante e 98% de efluente anaeróbio de UASB) .....	107
Tabela 5.8 - Estatística descritiva da carga aplicada e removida durante a Fase 3 (6% de fertilizante e 94% de efluente anaeróbio de UASB) .....	113
Tabela 5.9 - Estatística descritiva do coeficiente estequiométrico ( $\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$ ) obtido durante a Fase 3 (6% de fertilizante e 94% de efluente anaeróbio de UASB) .....	115
Tabela 5.10 - Estatística descritiva da concentração de DQO afluente e efluente e da relação DQO/N durante a Fase 3 (6% de fertilizante e 94% de efluente anaeróbio de UASB) .....	117
Tabela 5.11 - Estatística descritiva da eficiência de remoção de amônio e nitrito observado no RBS nas 3 fases experimentais.....	121
Tabela 5.12 - Resumo dos principais parâmetros avaliados durante a pesquisa....	127
Tabela 5.13 - Os dez gêneros mais abundantes nas sete amostras da biomassa coletadas, durante tratamento de efluente de fertilizante nitrogenado diluído com efluente anaeróbio doméstico .....	138
Tabela 5.14 - Principais funções, processos e micro-organismos presentes nas fases do RBS durante o tratamento de efluente de fertilizante nitrogenado com efluente anaeróbio doméstico .....	141

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANAMMOX	Anaerobic ammonium oxidation ou Oxidação Anaeróbia do Amônio
BOA	Bactérias Oxidadora de Amônia
BON	Bactérias Oxidadora de Nitrito
CANON	Remoção de Nitrogênio Completamente autotrófica até nitrito
COMAMMOX	Complete Ammonia Oxidation ou Oxidação completa da amônia
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
DBO	Demanda Biológica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
DESA	Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ETE	Estação de tratamento de esgoto
FA	Free Ammonium ou Amônia Livre
FNA	Free Nitrous Acid ou Ácido Nitroso Livre
MDA	Membranas de Destilação a Vácuo
N	Nitrogênio
NT	Nitrogênio Total
OR	Osmose Reversa
PT	Fósforo Total
RBS	Reator em Batelada Sequencial
SBBR	Sequencing Batch Biofilm Reactor ou Reator em Batelada Sequencial de Biofilme
SHARON	Single Reactor System for High Ammonium Removal over Nitrite ou Sistema de reator único para alta remoção de amônio até nitrito
ST	Sólidos Totais
STV	Sólidos Totais Voláteis
TAN	Nitrogênio amoniacal total
TDH	Tempo de Detenção Hidráulico

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	15
2	OBJETIVOS .....	17
2.1	Objetivo Geral .....	17
2.2	Objetivos Específicos.....	17
3	REVISÃO DA LITERATURA .....	18
3.1	Fertilizantes.....	18
3.2	Contexto global de fertilizantes .....	19
3.3	Contexto nacional fertilizantes .....	20
3.4	Produção de fertilizantes.....	21
3.5	Efluente industrial de fertilizantes no meio ambiente .....	22
3.6	Tratamento de efluente da indústria de fertilizantes.....	24
3.7	Tratamento de efluente de fertilizantes nitrogenados .....	25
3.8	Ciclo do Nitrogênio.....	28
3.8.1	Fixação Biológica do Nitrogênio .....	31
3.8.2	Nitrificação.....	32
3.8.3	Redução assimilatória e dissimilatória do nitrato.....	34
3.8.4	Desnitrificação .....	35
3.8.5	Oxidação Anaeróbia do íon Amônio – Anammox .....	36
3.9	Processo Anammox aplicado ao tratamento de efluentes .....	41
3.10	Fatores que influenciam no processo Anammox .....	42
3.10.1	Fornecimento de Oxigênio Dissolvido.....	43
3.10.2	Temperatura .....	44
3.10.3	Matéria Orgânica .....	44
3.10.4	pH .....	47
3.10.5	Configuração do tipo de biomassa.....	47
3.10.6	Íon amônio/amônia livre e nitrito/ácido nitroso livre .....	48
3.11	Processo Anammox aplicado a remoção de compostos nitrogenados de efluentes da indústria de fertilizantes.....	51
3.12	Processo Anammox aplicado a efluentes de alta carga de nitrogênio diluídos com efluente anaeróbio proveniente de reator tratando esgoto doméstico .....	57
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	64
4.1	Efluente utilizado na pesquisa.....	64
4.2	Reator em batelada sequencial.....	68
4.3	Enriquecimento de bactérias anammox .....	69
4.4	Planejamento Experimental .....	72
4.5	Métodos analíticos .....	73

4.6	Investigação da comunidade microbiana .....	75
4.6.1	Extração de DNA.....	76
4.6.2	Quantificação das bactérias do Ciclo do Nitrogênio pela técnica de PCR em tempo real .....	76
4.6.3	Sequenciamento de Nova Geração.....	80
4.7	Análise estatística .....	80
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
5.1	Etapa de enriquecimento .....	81
5.2	Desempenho do reator anammox quando submetido à distintas diluições de efluente de fertilizante e efluente anaeróbio proveniente de reator UASB.....	90
5.2.1	Fase 1 – Operação com adição de 1% de fertilizante .....	90
5.2.2	Fase 2– Operação com adição de 2% de fertilizante .....	101
5.2.3	Fase 3 – Operação com adição de 6% de fertilizante .....	110
5.2.4	Comparação dos resultados obtidos nas Fases 1, 2 e 3.....	119
5.3	Quantificação das bactérias do ciclo do nitrogênio pela técnica de qPCR.....	128
5.4	Dinâmica e composição da comunidade microbiana no tratamento do efluente da indústria de fertilizantes nitrogenados.....	132
5.4.1	Diversidade a nível de filo.....	132
5.4.2	Diversidade em nível de gênero .....	136
6	CONCLUSÕES .....	145
7	IMPLICAÇÕES/PERSPECTIVAS FUTURAS/RECOMENDAÇÕES .....	147
8	REFERÊNCIAS.....	148
	APÊNDICE A – Detalhamento das análises físico-químicas.....	175
	APÊNDICE B – Análises estatísticas .....	181
	ANEXO A – Abundância relativa dos gêneros nas amostras do RBS anammox....	182

## 1 INTRODUÇÃO

A adição de fertilizantes no solo tem sido uma prática comum para aumentar a produtividade agrícola e regular o suprimento daqueles nutrientes herdados naturalmente nos solos, além de compensar a remoção de nutrientes pelas plantas e satisfazer as culturas com alto potencial de crescimento (REEZT, 2017).

Ramírez-García, Gohil e Singh (2019) comentaram que os fertilizantes, todavia, são a principal fonte de efluentes agrícolas por possuírem minerais nutritivos incluindo nitrogênio, fósforo e potássio (N, P, K), que mesmo diante dos benefícios às plantas, quando lançados em ambientes abertos, podem favorecer à eutrofização do ambiente aquático, resultante do enriquecimento anormal de nutrientes nos corpos hídricos. Ainda, as águas residuárias geradas pela indústria de fertilizantes possuem alta carga orgânica não facilmente biodegradável, medida indiretamente em termos de demanda química de oxigênio (DQO) e podem inibir o crescimento de micro-organismos aquáticos (SINGH, SRIVASTAVA, MANDAL, 2015).

Diferentes estudos têm apresentado metodologias de tratamento de efluentes para a indústria de fertilizantes, visando soluções sustentáveis e técnicas para a redução do potencial impacto negativo dos resíduos no meio ambiente (MILLÁN-BECERRO *et al.*, 2022; SARAVANAKUMAR *et al.*, 2022; SINGH, SRIVASTAVA e MANDAL, 2015).

Versando sobre os efluentes das indústrias de fertilizantes nitrogenados, bioprocessos para tratamento de efluentes com alta concentração de nitrogênio tem sido desenvolvidos e usados industrialmente (KAMALI *et al.*, 2019). E, nesse aspecto, a oxidação anaeróbia de amônio (Anammox) é um dos processos mais promissores, pois, as bactérias que são capazes de realizá-lo, oxidam diretamente o íon amônio a nitrogênio gasoso, usando o nitrito como aceptor final de elétrons. Dessa forma, reduz-se a demanda de oxigênio em 60%; implicando em menor consumo energético; e dispensa-se integralmente fontes externas de carbono (IZADI *et al.*, 2023; JAGABA *et al.*, 2021; MADIGAN *et al.*, 2016).

Outros benefícios a sua aplicação referem-se a baixa produção de lodo devido ao longo tempo de duplicação das bactérias anammox (GAMÓN, CEMA E ZIEMBIŃSKA-BUCZYŃSKA, 2021). A literatura tem mencionado taxas de duplicação

de 7 a 14 dias, conforme Jagaba *et al.* (2021), embora Adams *et al.* (2020) tenham relatado valores entre 2 a 5 dias ou ainda, tão baixos quanto 0,17 a 4 dias, reportado por Zhang *et al.* (2017).

O pós-tratamento de efluentes domésticos e de resíduos alimentares utilizando o processo anammox, para diferentes condições operacionais e experimentais tem sido objeto de pesquisas, mostrando-se eficiente para remoção de DQO, nitrito e amônio (CARVALHO *et al.*, 2021; FERNANDES *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2019). Outros autores também investigaram, em escala piloto e laboratorial, o processo anammox aplicado ao tratamento de lixiviado de aterro sanitário; como em Ren *et al.* (2022) e o tratamento de efluente da suinocultura, desenvolvido por Chen *et al.* (2021a).

A tecnologia Anammox (oxidação anaeróbia do amônio) foi testada por Chen *et al.* (2022), Keluskar, Nerurkar e Desai (2013), Verma e Daverey (2024) visando a remoção dos compostos nitrogenados dos efluentes de indústrias de fertilizantes. Todavia, o processo e a aplicação das bactérias com atividade Anammox ao tratamento de efluente da indústria de fertilizantes nitrogenados, assim como a avaliação das melhores condições operacionais dos reatores, não tem sido o alvo principal dos estudos correlacionados ao uso desse sistema. E, até ao presente, sem identificação de pesquisas nacionais correlatas ao tema em questão.

Frente à necessidade de maiores investigações sobre o tratamento do efluente de fertilizantes, em especial aos nitrogenados e, diante de uma perspectiva futura de implementação do processo Anammox em escala real, é importante avaliar as condições ideais de funcionamento do sistema para que este viabilize a remoção de DQO, amônio e nitrito de efluentes industriais. Nesse sentido, o presente estudo investigou a aplicação do processo anammox para a remoção de nitrogênio do efluente da indústria de fertilizantes no reator em batelada sequencial (RBS) com atividade anammox.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

O objetivo dessa pesquisa foi avaliar, em escala laboratorial, o desempenho do processo anammox, por meio de reator em batelada sequencial, aplicado ao efluente de uma indústria de fertilizantes, testando diferentes diluições e cargas de N aplicada.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos, para alcançar o objetivo geral do estudo.

- Avaliar o desempenho do reator anammox na remoção de nitrogênio amoniacal quando submetido a diferentes diluições de efluente industrial e de efluente anaeróbio doméstico;
- Avaliar o desempenho do reator anammox na remoção de DQO quando submetido a diferentes diluições de efluente industrial e de efluente anaeróbio doméstico;
- Identificar as mudanças na comunidade microbiana do reator ao longo das diferentes condições operacionais testadas.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Fertilizantes

Sob a perspectiva da produtividade agrícola, a adição de fertilizantes tem papel importante como reguladora do suprimento de nutrientes herdados naturalmente nos solos. Solos que possuem alta fertilidade natural podem alcançar produtividades significativas mesmo sem a aplicação de fertilizantes, mas podem alcançar produtividades ainda mais substanciais com o fornecimento adicional aos nutrientes limitantes. Nesse sentido, a utilização de fertilizantes, além de suprir o requerimento natural do solo; satisfazendo as culturas com alto potencial de produtividade; também compensa a remoção de nutrientes pelas plantas ou aqueles perdidos pelos mecanismos de lixiviação e volatilização e ainda, aumenta o nível e mantém a fertilidade do solo (REEZT, 2017).

Conforme a Lei nº 6.894, de 16 de dezembro de 1980, os fertilizantes são definidos como “substância mineral ou orgânica, natural ou sintética, fornecedora de um ou mais nutrientes vegetais”. Estes referem-se aos elementos essenciais ou benéficos para o crescimento e produção das plantas, destacando-se os macronutrientes primários; nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), os macronutrientes secundários; cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S); e micronutrientes; boro (B), cloro (Cl), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), molibdênio (Mo), zinco (Zn), cobalto (Co) e silício (Si).

Nesse contexto, a legislação vigente traz as seguintes classificações para os fertilizantes:

a) fertilizante mineral: produto de natureza fundamentalmente mineral, natural ou sintético, obtido por processo físico, químico ou físico-químico, fornecedor de um ou mais nutrientes de plantas;

b) fertilizante orgânico: produto de natureza fundamentalmente orgânica, obtido por processo físico, químico, físico-químico ou bioquímico, natural ou controlado, a partir de matérias-primas de origem industrial, urbana ou rural, vegetal ou animal, enriquecido ou não de nutrientes minerais;

c) fertilizante mononutriente: produto que contém um só dos macronutrientes primários;

d) fertilizante binário: produto que contém dois macronutrientes primários;

e) fertilizante ternário: produto que contém os três macronutrientes primários;  
f) fertilizante com outros macronutrientes: produto que contém os macronutrientes secundários, isoladamente ou em misturas destes, ou ainda com outros nutrientes;

g) fertilizante com micronutrientes: produto que contém micronutrientes, isoladamente ou em misturas destes, ou com outros nutrientes;

h) fertilizante mineral simples: produto formado, fundamentalmente, por um composto químico, contendo um ou mais nutrientes de plantas;

i) fertilizante mineral misto - produto resultante da mistura física de dois ou mais fertilizantes minerais; (Redação dada pelo Decreto nº 8.384, de 2014)

j) fertilizante mineral complexo: produto formado de dois ou mais compostos químicos, resultante da reação química de seus componentes, contendo dois ou mais nutrientes;

l) fertilizante orgânico simples: produto natural de origem vegetal ou animal, contendo um ou mais nutrientes de plantas;

m) fertilizante orgânico misto: produto de natureza orgânica, resultante da mistura de dois ou mais fertilizantes orgânicos simples, contendo um ou mais nutrientes de plantas;

n) fertilizante orgânico composto: produto obtido por processo físico, químico, físico-químico ou bioquímico, natural ou controlado, a partir de matéria-prima de origem industrial, urbana ou rural, animal ou vegetal, isoladas ou misturadas, podendo ser enriquecido de nutrientes minerais, princípio ativo ou agente capaz de melhorar suas características físicas, químicas ou biológicas; e

o) fertilizante organomineral: produto resultante da mistura física ou combinação de fertilizantes minerais e orgânicos (BRASIL, 2004).

### **3.2 Contexto global de fertilizantes**

Como elucidado no Plano Nacional de Fertilizantes 2050 (2022), a produção de insumo agrícola cresce em escala global de acordo com a crescente necessidade de expansão das áreas de plantio no mundo. De acordo com a International Fertilizer Association (2020), o mercado global de fertilizantes NPK demandou por 190, 186,8 e 189,8 milhões de toneladas nos anos de 2018, 2019 e 2020, respectivamente. Em 2020, o nitrogênio foi produzido principalmente na China, na Rússia e nos Estados Unidos, já os fosfatados foram China, Estados Unidos e Marrocos e os potássicos foram no Canadá, Rússia e Bielorrússia (GLOBALFERT, 2021).

A pandemia de Covid-19 e às imposições de sanções econômicas à Bielorrússia (um dos principais fornecedores de fertilizantes potássicos para o Brasil) demonstraram o risco de se depender fortemente da importação de produtos essenciais para a sustentação da agricultura. Contudo, acredita-se que inovações tecnológicas da indústria darão impulso ao mercado, diminuindo a demanda pelos compostos de NPK, como a Amônia verde, fertilizantes com incorporação de matriz orgânica, insumos de origem biológica e agrominerais (BRASIL, 2021).

### **3.3 Contexto nacional fertilizantes**

O Brasil é responsável por aproximadamente 8% do consumo global de fertilizantes, ocupando a quarta posição, atrás da China, Índia e dos Estados Unidos. O principal nutriente aplicado no Brasil é o potássio, com 38%, seguido por fósforo, com 33%, e nitrogênio, com 29% do consumo total de fertilizantes (BRASIL, 2021).

No que tange a produção, o Brasil possui grandes reservas de matérias-primas, como rochas fosfáticas e potássicas, gás natural e micronutrientes, todavia, a produção nacional tem sido insuficiente para suprir a demanda interna, aumentando as taxas de importação do insumo e a vulnerabilidade do país frente às dos preços no mercado mundial. Corroborando com as assertivas, em 2020 foram produzidas 224.000 toneladas de fertilizantes básicos nitrogenados no Brasil (em termos de nitrogênio contido) e no mesmo ano o consumo foi de cerca de 40,5 milhões de toneladas de fertilizantes NPK e aproximadamente 5,3 milhões de toneladas correspondem ao nitrogênio contido (BRASIL, 2021).

A produção nacional de concentrado fosfático, em 2019, foi de 5,3 milhões de t com teor médio do concentrado de 33 a 35%  $P_2O_5$  e a produção de ácido fosfórico tem sido de cerca de 1,1 milhões de t/ano de  $P_2O_5$  contido e de fertilizantes fosfatados entre 1,7 e 2,0 milhões de t/ano de  $P_2O_5$  contido, nos últimos 5 anos. Já a produção de ácido sulfúrico nacional para a indústria de fertilizantes em 2019 foi da ordem de 3,3 milhões de t (BRASIL, 2021).

Sobre o potássio, em 2020 a dependência dos fornecedores externos atingiu 96,4%, sendo necessário importar 6,80 milhões de t de KCl, enquanto a produção foi de 250 mil t de KCl. Desta produção, 89 mil t foram exportadas, enquanto o consumo aparente

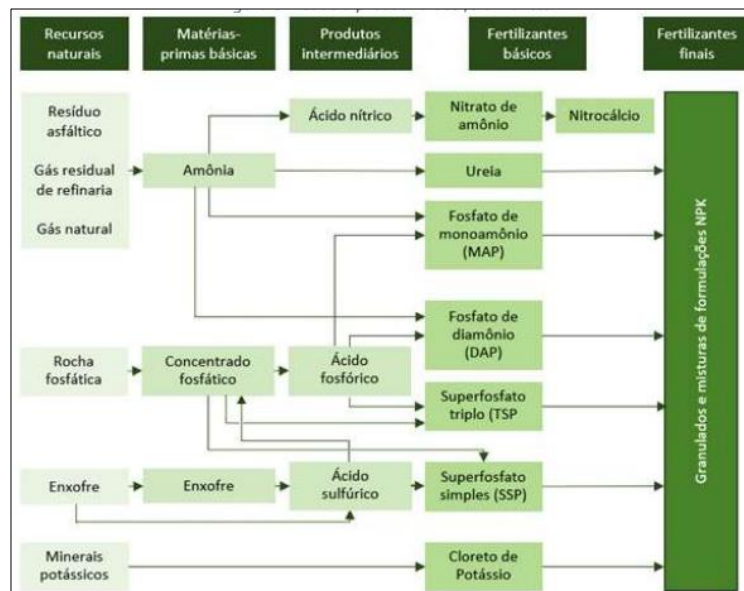
fechou em 6,8 milhões de t de  $K_2O$ . Para 2022, previu-se a produção de 0,3 milhão de t e, para 2035, de 8,7 milhões de t de  $K_2O$  contido (BRASIL, 2021).

### 3.4 Produção de fertilizantes

A indústria de fertilizantes é composta por fábricas de multiprodutos, dos quais aqueles à base de fosfato ou à base de amônia são normalmente produzidos em plantas diferentes. A fabricação de fertilizantes fosfatados compreende a produção de ácido sulfúrico; derivado do enxofre elementar, e ácido fosfórico; derivado da rocha fosfática. Os principais produtos incluem o ácido fosfórico, o superfosfato normal, o superfosfato triplo e o fosfato de amônio. A amônia é produzida utilizando o nitrogênio atmosférico e hidrogênio derivado do gás natural ou ainda, bioprodutos da refinaria do petróleo (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2021).

Como apresentado na Figura 3.1, a cadeia de fertilizantes é complexa e depende das interações com diferentes setores produtivos, como a indústria química, de mineração, de energias e outras.

Figura 3.1 - Cadeia produtiva de fertilizantes



Fonte: Brasil (2010); Brasil (2021)

### 3.5 Efluente industrial de fertilizantes no meio ambiente

A rápida urbanização e industrialização estão se tornando a nova base para o crescimento econômico nacional, ao mesmo tempo que configuram uma fonte emergente de poluição da água e uma ameaça decisiva para perturbar o ecossistema e a homeostase do meio ambiente (GAUR *et al.*, 2020; SARAVANAKUMAR *et al.*, 2022). Nessa seara, o desenvolvimento industrial é considerado a espinha dorsal da economia global e tem-se verificado que as indústrias são contribuintes importantes para a geração excessiva de águas residuárias em diferentes processos produtivos (SINGH; SINGH; KUMAR, 2023).

Á água residuária de efluentes industriais atua como fonte de distintos compostos químicos como cloreto, cromato, fosfato, metais pesados. Notavelmente, alguns efluentes são perigosos, tóxicos; devido à suas propriedades físico-químicas; não biodegradáveis ou persistentes (SARAVANAKUMAR *et al.*, 2022; YADAV *et al.*, 2019). Assim, a distribuição e o lançamento inadequado destes efluentes no ecossistema podem afetar a flora, a fauna e colocar em risco a segurança da saúde pública, sendo os efeitos de toxicidade continuamente apresentados por distintos autores (GUO *et al.*, 2021; OKEREAFOR *et al.*, 2020; POHL *et al.*, 2018; ROY *et al.*, 2015).

No que tange as espécies aquáticas, lançamentos de efluentes industriais mostram alterações na histologia do oócito, indução de doenças ovarianas e inflamação no sistema reprodutivo, aumento da atividade estrogênica e estresse oxidativo, causando interrupção na regulação hormonal endócrina e aumenta da regulação da produção de antioxidantes (SARAVANAKUMAR *et al.*, 2022; YOO; HUR; JUNG, 2019).

Vinoth *et al.* (2021) contribuem para as discussões ao mencionarem que os solos também podem ser contaminados com efluentes industriais, conferindo uma variação na composição do solo, redução da resistência ao cisalhamento e a permeabilidade; envolvendo a construção de edificações menos robustas; e a possibilidade de contaminação do lençol freático devido à lixiviação de metais pesados e perigosos.

Cada lançamento tende a causar algum efeito deletério no ambiente, variando de acordo com os constituintes do efluente e do processo industrial empregado. Nesse

sentido, os efluentes industriais podem ser categorizados dependendo do tipo de indústria de transformação, sendo a primeira categoria a de resíduos inorgânicos (indústria química), a segunda referente aos resíduos de processos orgânicos (têxtil, processamento de alimentos, laticínios, cervejarias e indústrias químicas) e por fim a de resíduos químicos (inseticidas, corantes, ácidos, bases, fabricação de matérias-primas em indústria e os fertilizantes) (SARAVANAKUMAR *et al.*, 2022).

Versando sobre a categoria dos resíduos químicos, em especial os fertilizantes, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (2021) destacou como fluxos de resíduos da cadeia produtiva de fertilizantes o condensado do processo, a purga da torre de resfriamento, a água de lavagem de cristal (em plantas de fertilizantes formulados), a purga do compressor (plantas de amônia), derramamentos e vazamentos, lixiviação por precipitação e o efluente da estação de tratamento.

Efluentes da indústria de fertilizantes químicos contém compostos orgânicos, alcoóis, nitrogênio amoniacal, nitrato, fluoreto (AFFONSO *et al.*, 2020), fósforo, metais pesados como cádmio e sólidos suspensos e dissolvidos (BHANDARI; SOROKHAIBAM; RANADE, 2016; WARMADEWANTHI, IKLAS, DAMAYANTI, 2023).

Ainda, as águas residuárias geradas pela indústria de fertilizantes possuem alta carga orgânica não facilmente biodegradável, medida indiretamente em termos de demanda química de oxigênio (DQO) e podem inibir o crescimento de micro-organismos aquáticos (SINGH, SRIVASTAVA, MANDAL, 2015).

Younas *et al.* (2017) corroboram com as assertivas anteriores, ao mencionarem que as unidades industriais de fertilizantes são o sustentáculo da agricultura, mas estão entre as maiores contribuintes da poluição ambiental por meio da emissão de resíduos gasosos, líquido e sólidos. E mais, junto à indústria farmacêutica, curtimento e tintura, estão continuamente lançando efluentes contendo ânions tóxicos, compostos orgânicos e inorgânicos, gases dissolvidos, pesticidas e metais pesados.

Verifica-se, portanto, que a água é fortemente estressada e poluída por uma variedade de efluentes industriais, precisa ser tratada e protegida por modelos sustentáveis de tratamento de tais efluentes. (SARAVANAKUMAR *et al.*, 2022).

Acerca dos compostos nitrogenados, lançamentos de águas residuárias ricas neste nutriente, nas suas formas orgânicas e inorgânicas, podem causar eutrofização severa e desoxigenação do corpo d'água receptor, como lagos, rios, estuários e águas costeiras (ARORA *et al.* 2021; WIJAYU e SOEDJONO, 2018). O nitrogênio, nos processos bioquímicos de conversão de nitrogênio amoniacal a nitrito e deste a nitrato, implica em consumo de oxigênio dissolvido dos corpos hídricos, podendo afetar a vida aquática e, na forma de amônia livre é diretamente tóxico aos peixes (VON SPERLING, 2014).

Adicionalmente, significativas de íon amônio resultam em redução do oxigênio dissolvido necessário à nitrificação e, em águas com pH elevado, ocorre a conversão no gás amônia, nocivo a algumas espécies de peixes mesmo em concentrações da ordem de 0,5 mg/L (LIBÂNIO, 2018).

Em vista disso, para evitar o lançamento e o despejo de efluentes industriais no ecossistema de forma desregulada, estes devem ser tratados, obedecendo às condições, padrões e exigências dispostos na legislação ambiental. A nível nacional, as indústrias devem atender às diretrizes Resolução CONAMA Nº 430 de 13 de maio de 2011, que dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes em corpos de água receptores. A legislação em questão estabelece o lançamento de efluentes em corpos hídricos com no máximo 20 mg/L de nitrogênio amoniacal total.

### **3.6 Tratamento de efluente da indústria de fertilizantes**

Diferentes estudos tem apresentado metodologias de tratamento de efluentes para a indústria de fertilizantes, visando soluções sustentáveis e técnicas para a redução do potencial impacto negativo dos resíduos no meio ambiente. Podem ser mencionados os processos oxidativos avançados (POA), métodos físico-químicos, as tecnologias por membranas (nanofiltração-NF, osmose reversa-OR, microfiltração-MF, ultrafiltração -UF), métodos biológicos, dentre outros (KAMALI *et al.*, 2019).

Singh, Srivastava e Mandal (2015) utilizaram POA por meio do método de peroxidação catalítica para o tratamento de um efluente da indústria de fertilizantes que continha compostos por nitrogênio e fósforo tóxicos dificilmente degradados por métodos de tratamento físico-químicos e biológicos convencionais. Houve eficiência

de remoção de DQO de 83% na condição ótima do catalisador e o método analítico utilizado (Fourier transform infrared” – FTIR) para análise do efluente confirmou a oxidação dos compostos presentes no fertilizante.

Saravanakumar *et al.* (2022) enfatizam a abordagem de filtração por membrana baseada na estrutura orgânica metálica (Metal Organic Framework – MOF) para remediação de efluentes industriais, incluindo os fertilizantes, em comparação com o processo de remediação tradicional. De acordo com os autores, os filtros híbridos baseados em MOF fornecem maior capacidade de reutilização, melhor adsorção e taxas de remoção superiores, por meio da nanotecnologia, enquanto o processo de remediação tradicional oferece taxas de filtração e estabilidade mais baixas. Outros autores como Ramanayaka *et al.* (2019) reforçam os benefícios da técnica de filtração de membranas, ao explicitar que membranas híbridas MOF peneiram impurezas, por meio de mecanismos como adsorção (complexação, ligação de hidrogênio, interação eletrostática).

Millán-Becerro *et al.* (2022) utilizaram um tratamento químico e confirmaram a eficiência da tecnologia de substratos alcalinos dispersos (DAS) no tratamento passivo de lixiviados ácidos gerados em pilhas de resíduos de fosfocesso da indústria de fertilizantes.

### **3.7 Tratamento de efluente de fertilizantes nitrogenados**

Entre os fertilizantes do grupo NPK (Nitrogênio, Fósforo e Potássio), os nitrogenados são os mais consumidos mundialmente (INTERNATIONAL FERTILIZER ASSOCIATION, 2020). Em consonância, a Organização das Nações Unidas para Alimentação e a Agricultura, conhecidamente como FAO, em seu relatório de 2019 apresenta as tendências mundiais de fertilizantes, em um panorama de 2016 a 2022 que coloca à frente a demanda por fertilizantes nitrogenados no mundo, em milhares de toneladas.

Todos os fertilizantes nitrogenados começam essencialmente com a amônia anidra ( $\text{NH}_3$ ), produzida do ar e gás natural pelo processo de Haber-Bosh, por meio da reação química  $[3\text{H}_2 + \text{N}_2 \rightarrow 2\text{NH}_3]$ , sob condições de alta temperatura e pressão. Além da utilização direta da amônia nídrada, a amônia pode servir de matéria prima na produção de uréia, nitrato de amônio e inclusive na produção de fertilizantes fosfatados, como fosfato de monoamônio (MAP) e fosfato de diamônio (DAP) (REETZ, 2017).

Ainda, Reetz (2017) destaca como fertilizantes nitrogenados mais comuns: amônia anidra, aquamônia (20% a 24% de N), sulfato de amônio  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ , ureia (46% de N), nitrofosfato (concentrações variadas), nitrato de amônio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), nitrato de amônio-uréia (UAN – 28% de N) e cianamida cálcica (18% de N).

Nesse contexto, o nitrogênio amoniacal está presente em vários tipos de efluentes, como explicitado por Santos *et al.* (2019), e diversos são os mecanismos de tratamento de efluentes sejam estes domésticos, efluentes de suinocultura, sistemas de aquacultura, refinaria de petróleo, ou ainda, na produção de fertilizantes.

Santos *et al.* (2019) investigaram a influência de alguns parâmetros na eletrooxidação (processo eletrolítico) do Nitrogênio Amoniacal Total (TAN), utilizando um efluente real; coletado das instalações de armazenamento e manuseio de fertilizantes, no porto de Tubarão, no Espírito Santo – Brasil; e um reator eletrolítico em batelada indivisível com recirculação de eletrodos de  $\text{Ti/RuO}_2$ . O porto recebe diferentes produtos como MAP, DAP, Uréia, Cloreto de Potássio e esse tipo de efluente costuma ter altas concentrações de nitrogênio amoniacal, devendo ser processado para atingir o limite permitido para lançamento. O TAN diminuiu com o aumento do tempo de eletrólise para todas as densidades de corrente e concentrações de cloreto investigadas. A concentração dos íons nitrato aumentou após a degradação completa do TAN, e portanto, a eletrólise deve ser interrompida após 90% da degradação do TAN. Assim, é possível tratar um efluente real contendo alta concentração de TAN e íons cloreto em solução, pela técnica de eletrólise, sem tratamento prévio e ainda evitar a formação de nitrato.

As técnicas de membranas de destilação a vácuo (VMD) e osmose reversa (OR) foram testadas por Tagliabue *et al.* (2021), em escala laboratorial, com efluente de uma indústria de fertilizantes da Itália. O tratamento por VMD foi avaliado e constatou-se

que técnica pode ser aplicada com sucesso e todas as membranas testadas forneceram destilados de alta qualidade com um nível de contaminante inferior aos limites italianos, contudo, com um pH ácido, que pode ser ajustado por neutralização. A OR também apresentou boas retenções, na faixa de 97% para sulfato, fosfato e nitrogênio amoniacal e menores retenções (83-87%) para demais parâmetros. Uma comparação entre as estratégias indicou que a MD é mais vantajosa por permitir fluxos mais altos, melhores retenções e possuir menor tendência de incrustação.

Bioprocessos para tratamento de efluentes com alta concentração de nitrogênio tem sido desenvolvidos e usados industrialmente. Dois reatores em batelada sequencial (RBS), por meio de um processo biológico Anóxico-Aeróbio foram testados para o tratamento do efluente de uma indústria de fertilizante fosfatado e de uma indústria de laticínios, sendo observadas remoções significativas (90%) de carbono orgânico dissolvido (COD) em ambos os efluentes. Desnitrificação quase completa (90% em ambos os reatores) foi observada junto com a remoção de fosfato (JENA *et al.*, 2020).

Pham e Bui (2020) investigaram a capacidade da microalga verde, *Scenedesmus sp.* de remover nitrogênio e fósforo, bem como demanda química de oxigênio (DQO) e demanda biológica de oxigênio (DBO<sub>5</sub>) para o tratamento do efluente de uma planta de fertilizantes no Vietnã, a Phu My Fertilizer Wastewater Plant. Diferentes concentrações de microalgas de 10 mg/L a 60 mg/L foram usadas para avaliar a taxa de crescimento, a produção de biomassa e a habilidade de remoção. A alga cresceu bem no efluente, com taxa de crescimento de 0,3 a 0,38/dia e produziu até 70,2 mg/L de biomassa. A espécie de alga foi capaz de remover nitrogênio amoniacal (93%), nitrato (84%), fosfato (97%), fósforo total (96%) e DBO<sub>5</sub> (84%). A formação de biofloculação melhorou a remoção de nutrientes, DQO e DBO<sub>5</sub> do efluente e os resultados indicaram que a autofloculação de microalgas pode ser usada como uma abordagem mais prática para o tratamento de efluentes, usando microalgas para eliminar a eutrofização.

Jorquera *et al.* (2014) avaliaram o uso da tecnologia Anammox (processo de oxidação anaeróbia de amônio) combinado com processos físico-químicos, por meio de balanços de massa, energia e exergia para tratamento do efluente de fertilizante nitrogenado de uma indústria localizada em Camaçari, na Bahia-Brasil. A indústria

produz um efluente condensado do processo e um efluente da estação de CO<sub>2</sub>, que são tratados na torre de *air stripping*, configurando-se como o sistema atual.

A caracterização físico-química dos fluxos de entrada e saída da torre de *air stripping* foram realizadas laboratorialmente, determinando pH, vazão, temperatura, concentração de nitrogênio amoniacal (mg/L) e metanol (mg/L). Duas potenciais soluções foram avaliadas das quais uma propunha a segregação dos fluxos, usando o Sistema Anammox e a Osmose Reversa para tratar o efluente da estação de CO<sub>2</sub> e a torre para tratar o condensado e a outra eliminava o uso da torre, prevenindo emissões atmosféricas e minimizando a geração de efluentes nitrogenados reativos, propondo o tratamento dos dois efluentes por uma bomba de calor química acoplada ao processo Anammox, seguida de osmose reversa e subsequente geração de vapor. A última proposta apresentou os melhores resultados e evitou emissões atmosféricas de nitrogênio amoniacal e metanol, por meio da utilização do processo biotecnológico (Anammox), além da recuperação do condensado perdido como efluente, para que possa ser reincorporado na produção da rede de vapor, aumentando a eficiência energética e o desempenho ambiental do processo.

O ciclo do Nitrogênio assim como o uso do processo Anammox para tratamento de efluentes, em especial, ao efluente da indústria de fertilizantes serão abordados no tópico seguinte.

### **3.8 Ciclo do Nitrogênio**

O nitrogênio é um elemento químico essencial à vida, por participar da constituição de moléculas orgânicas imprescindíveis à sobrevivência de organismos, de vários compostos biológicos, proteínas, ácidos nucleicos e da constituição celular de micro-organismos sendo considerado um dos elementos mais complexos e biologicamente cruciais, capaz de controlar a composição de espécies marinhas, terrestres e ecossistemas de água doce (VON SPERLING, 2014; MADIGAN *et al.* 2016; VIEIRA, 2017; ARYAL *et al.* 2022).

O volume de nitrogênio disponível é encontrado na natureza em sua maior parte na forma de amônia (NH<sub>3</sub>), nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) ou em gás nitrogênio (N<sub>2</sub>), formas estas inorgânicas. Na atmosfera, o nitrogênio é mais abundante como gás nitrogênio

molecular ( $N_2$ ), respondendo a aproximadamente 78% do gás na atmosfera, todavia, esta forma de nitrogênio é inacessível para muitos organismos, utilizado como uma fonte de nitrogênio por procariotos fixadores de nitrogênio (MADIGAN *et al.* 2016; ARYAL *et al.* 2022).

Os compostos nitrogenados da natureza foram classificados como N-não reativo e N-reativo (Nr). O não reativo é o gás nitrogênio ( $N_2$ ); quimicamente inerte, com uso direto apenas para algumas espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio; e o Nr é toda forma biológica, fotoquímica e radioativamente ativa de compostos de N presentes na atmosfera e biosfera, incluindo as formas oxidadas inorgânicas como óxido nitroso ( $N_2O$ ), nitrato ( $NO_3^-$ ), nitrito ( $NO_2^-$ ) e os compostos orgânicos como ácidos nucleicos, proteínas, ureia e amina (VIEIRA, 2017). Como elucidado por Aryal *et al.* (2022), diferentes processos biogeoquímicos ocorrem na atmosfera e no solo, desencadeando a formação de estados de oxidação e formas químicas de nitrogênio, tornando-o mais acessível a outros organismos. A Tabela 3.1 apresenta os diferentes estados de oxidação do nitrogênio.

**Tabela 3.1 – Estados de oxidação do nitrogênio**

Composto/íon	Fórmula do íon	Estado de Oxidação
Íon nitrato	$NO_3^-$	+5
Dióxido de nitrogênio	$NO_2$ (g)	+4
Íon Nitrito	$NO_2^-$	+3
Óxido nítrico	$NO$ (g)	+2
Óxido nitroso	$N_2O$ (g)	+1
Gás dinitrogênio	$N_2$	0
Hidroxilamina	$NH_2OH$ (aq)	-1
Hidrazina	$N_2H_4$ (aq)	-2
Íon Amônio	$NH_4^+$	-3

Adaptado de Stein & Klotz (2016) e Carvalho (2019)

Em meio aquático o nitrogênio pode ser encontrado na forma de nitrogênio molecular ( $N_2$ ), nitrogênio orgânico (dissolvido ou em suspensão), amônia (livre  $NH_3$  ou ionizada  $NH_4^+$ ), nitrito ( $NO_2^-$ ) e nitrato ( $NO_3^-$ ) e, portanto, pode ser encontrado de várias formas e em diferentes estados de oxidação, variando de -3 a +5 (VON SPERLING, 2014).

O autor também menciona que a distribuição do nitrogênio no esgoto bruto doméstico pode ser representada em termos de Nitrogênio Total (NT) e Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK). As formas predominantes no esgoto são o nitrogênio orgânico (grupo amina) e nitrogênio amoniacal. Sabe-se que a amônia tem sua principal origem na ureia, que é rapidamente hidrolisada e pouco encontrada no esgoto bruto. Juntas, as duas

espécies constituem o NTK, com sua origem primordialmente fisiológica. O NTK pode ser dividido em fração solúvel (majoritariamente representado por  $\text{NH}_4^+$ ) e uma fração particulada (vinculada aos sólidos em suspensão orgânicos). Já a fração NOX (nitrito+nitrato) é desprezível em esgotos domésticos. As Equações (3.1) e (3.2) apresentam esquematicamente as formas de nitrogênio encontradas nos esgotos afluentes a uma estação de tratamento.

$$\text{NTK} = \text{amônia} + \text{N - orgânico} \quad \text{NTK} = (\text{forma predominante nos esgotos domésticos}) \quad (3.1)$$

$$\text{NT} = \text{NTK} + \text{NO}^{-2} + \text{NO}^{-3} \quad (\text{nitrogênio total}) \quad (3.2)$$

Ainda sobre as formas de nitrogênio, a poluição das águas e os efeitos deletérios à saúde, sabe-se que o nitrogênio na forma de amônia livre é diretamente tóxico aos peixes e na forma de nitrato está associado a doenças como a metahemoglobinemia (Síndrome do bebê azul) (VON SPERLING, 2014). Esta forma do nitrogênio oxida a hemoglobina do sangue a metahemoglobina, levando à anoxia. Outro possível efeito à saúde refere-se às nitrosamidas e nitrosaminas carcinogênicas formadas no estômago pela reação do nitrito com os aminoácidos presentes na dieta alimentar (LIBÂNIO, 2018).

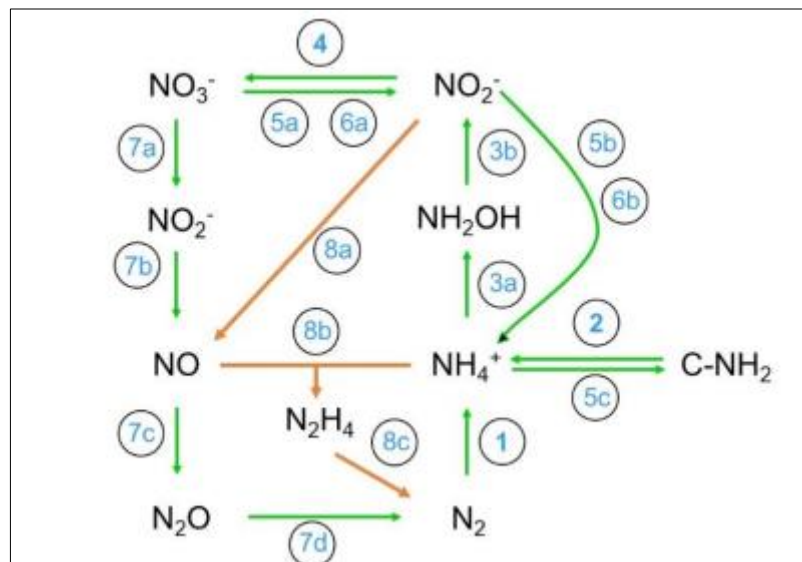
Como explicitado em Von Sperling (2014), a forma predominante de nitrogênio em um curso d'água pode fornecer indicações sobre o estágio de poluição. Sendo esta recente, predominam-se as formas amônia ou nitrogênio orgânico e, se antiga, basicamente observa-se nitrato, uma vez que o nitrito é quase que instantaneamente oxidado a nitrato.

É oportuno salientar que as características físicas e químicas dos corpos d'água tendem a definir o equilíbrio entre as espécies de nitrogênio amoniacal (FERNANDES, 2017). A amônia existe em solução na forma de íon ( $\text{NH}_4^+$ ) e na forma não ionizada ( $\text{NH}_3$ ) e a temperatura e o pH elevados favorecem a produção de amônia livre (na temperatura de  $25^\circ\text{C}$ , a proporção da amônia livre com relação a amônia total é aproximadamente o dobro em relação à temperatura de  $15^\circ\text{C}$ . Com o pH maior que 11, praticamente toda a amônia encontra-se na forma de  $\text{NH}_3$ . Com o pH igual a 9,5,

aproximadamente 50% estão na forma de  $\text{NH}_3$  e 50% na forma de  $\text{NH}_4^+$  e com o pH menor que 8, predomina a forma de  $\text{NH}_4^+$  (VON SPERLING, 2014).

No tocante ao ciclo do nitrogênio, os processos-chave que convertem  $\text{N}_2$  não-reactivo a  $\text{N}_2$  reativo são a fixação, a amonificação, a nitrificação, a desnitrificação e o processo anammox (ARYAL *et al.* 2022; MADIGAN *et al.* 2016). A Figura 3.2 apresenta esquematicamente o ciclo do nitrogênio, sendo: 1-fixação; 2-amonificação; 3a e 3b-nitrificação; 4-nitratação; 5a,5b,5c- assimilação do nitrato; 6a e 6b- desassimilação do nitrato; 7a,7b,7c e 7d- desnitrificação e 8a,8b,8c-anammox.

**Figura 3.2 - Processos-chave do ciclo do Nitrogênio**



Fonte: Carvalho (2019)

### 3.8.1 Fixação Biológica do Nitrogênio

Como representado acima, a fixação de nitrogênio é um processo de redução do nitrogênio gasoso ( $\text{N}_2$ ) ao íon amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) para incorporação em moléculas biológicas, em que a amônia produzida é assimilada na forma orgânica em aminoácidos e nucleotídeos. O processo é altamente consumidor de energia (anabólico), para promover a quebra da ligação tripla do nitrogênio. A principal enzima responsável pelo processo pertencente ao complexo nitrogenase, que catalisa a redução de nitrogênio gasoso a íon amônio biodisponível (Equação 3.3) em todos os processos conhecidos (ARYAL *et al.* 2022, FERNANDES; 2017, LEAL; 2015, MADIGAN *et al.* 2016).

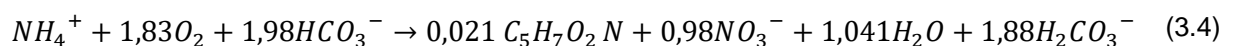
Apenas certas espécies de Bactéria e Archae podem fixar nitrogênio, logo, algumas bactérias fixadoras de nitrogênio são de vida livre e realizam o processo de forma independente e outras são simbióticas e fixam o nitrogênio apenas na associação com certas plantas. Assim, as bactérias podem ser de vida livre aeróbias (*Azotobacter*, *Cyanobacteria*, *Alcaligenes*), vida livre anaeróbias (*Clostridium*, *Purple bacteria*, *Methanosarcina*) e bactérias simbióticas, que fixam nitrogênio em simbiose com plantas (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Frankia*) (MADIGAN *et al.* 2016).



### 3.8.2 Nitrificação

Corresponde a um processo biológico de oxidação de amônia (NH<sub>3</sub>) ou íon amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) a nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), e ainda para nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Em um sistema convencional, a conversão do nitrogênio ocorre em duas etapas e é realizada por micro-organismos distintos, ou ainda, dois grupos fisiológicos de organismos. Primeiramente, a amônia ou o íon amônio é oxidado a nitrito por um grupo chamado de oxidantes de amônio (i), processo reconhecido como nitrificação. Esse grupo converte amônia a nitrito por meio de um produto intermediário, a hidroxilamina (NH<sub>2</sub>OH). Já os oxidantes de nitrito (ii) compreende os micro-organismos que produzem nitrato e que oxidam o nitrito a nitrato, dando nome ao processo de nitratação (MADIGAN *et al.* 2016; ARYAL *et al.* 2022).

Segundo Madigan *et al.* (2016), duas enzimas-chave participam do processo de nitrificação, a amônia *monooxigenase*, que oxida NH<sub>3</sub> a hidroxilamina, e a *nitrito oxidoreductase*, que oxida nitrito a nitrato. A oxidação completa da amônia a nitrato (nitrificação e nitratação), incluindo a síntese celular, foi proposta por Ahn (2006), conforme Equação (3.4).



Os micro-organismos nitrificantes são quimiolitotróficos e crescem utilizando compostos inorgânicos nitrogenados reduzidos (NH<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>). Em geral, são aeróbios estritos, mas podem ser autotróficos ou crescerem mixotroficamente, pela assimilação de CO<sub>2</sub> e carbono orgânico (MADIGAN *et al.* 2016).

Estes autores também afirmam que os oxidantes de amônia podem ser encontrados em duas classes de bactérias, sendo os principais gêneros *Nitrossomonas*, *Nitrosospira* e *Nitrosopumilus*, conhecidas como bactérias os de amônia (BOA), e em um filo de Archae, conhecidas como arqueas oxidadoras de amônia (AOA). Enquanto as bactérias desse grupo são encontradas em maior número em habitats com maior abundância de amônia (lagos e córregos que recebem esgotos e águas residuárias), as arqueias oxidantes de amônia são mais comuns em habitats com baixas concentrações de amônia, como em oceanos ou solos.

Os oxidantes de nitrito são representados estritamente por bactérias, sendo encontrados em quatro classes, fazendo-se destaque aos gêneros *Nitrospira* e *Nitrobacter*, e em um filo. A Tabela 3.2 apresenta as classes e filios dos micro-organismos oxidadores de amônia e de nitrito.

**Tabela 3.2 – Micro-organismos oxidadores de amônia e nitrito**

<b>Microorganismos oxidantes de Amônia ou Nitrito</b>	<b>Classe/Filo</b>	<b>Gêneros</b>
Amônia	Classe Betaproteobacteria	<i>Nitrosomonas</i> , <i>Nitrosospira</i> , <i>Nitrosolobus</i> , <i>Nitrosovibrio</i>
Amônia	Classe Gamaproteobacteria	<i>Nitrosococcus</i>
Amônia	Filo Thaumarchaeota	<i>Nitrosopumilus</i> , <i>Nitrosocaldus</i> , <i>Nitrosoarchaeum</i> , <i>Nitrososphaera</i>
Nitrito	Classe Alphaproteobacteria	<i>Nitrobacter</i>
Nitrito	Classe Betaproteobacteria	<i>Nitrotoga</i>
Nitrito	Classe Gamaproteobacteria	<i>Nitrosococcus</i>
Nitrito	Classe Deltaproteobacteria	<i>Nitrospira</i>
Nitrito	Filo Nitrospirae	<i>Nitrospira</i>

Adaptado de Madigan *et al.* (2016)

A suposição de longa data de um processo convencional de nitrificação em dois estágios e com divisão de trabalho por dois grupos de micro-organismos foi desafiada pela descoberta da nitrificação completa por um único microorganismo, processo conhecido como Comammox (*Complete ammonia oxidation*). Tal processo é denominado *Comammox* (*Complete ammonia oxidation*), sendo mediado por bactérias do gênero *Nitrospira* (*Nitrospira inopinata*), que possuem as enzimas necessárias para a oxidação do amônio diretamente a nitrato (VIEIRA, 2017; ARYAL *et al.*, 2022).

Desde a sua descoberta por Daim *et al.* (2015), Pinto *et al.* (2015) e Van Kessel *et al.* (2015), outros estudos detectaram bactérias comammox em sistemas ambientais,

incluindo biorreatores que tratam efluentes em escala plena e laboratorial, como Annavajhala *et al.* (2018) e Roots *et al.* (2019). Nesse sentido, Nitrospira Comammox já são amplamente detectadas em vários ambientes incluindo solos primitivos e agrícolas, habitats de água doce, águas subterrâneas, sistemas de tratamento de água potável e estações de tratamento de águas residuárias (KITS *et al.*, 2019).

### 3.8.3 Redução assimilatória e dissimilatória do nitrato

Quando um composto inorgânico, como nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), é reduzido para ser utilizado na biossíntese, ele é reconhecidamente assimilado, sendo o processo de redução denominado metabolismo assimilativo. O metabolismo assimilativo de nitrato é conceitual e fisiologicamente distinto da redução desses aceptores de elétrons no metabolismo energético da respiração anaeróbia. Nesse sentido, para distinguir estes dois tipos, a utilização dos compostos inorgânicos como aceptores de elétrons no metabolismo energético é chamada de dissimilativo (MADIGAN *et al.*, 2016).

A redução dissimilatória do nitrato, do inglês *Nitrate-reducing process* (DNRA) é um processo no qual o nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) é reduzido a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e a amônia ( $\text{NH}_4^+$ ), com geração de óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), como um subproduto da redução do nitrito (KELSO *et al.*, 1997; ARYAL *et al.* 2022). No metabolismo dissimilativo, uma grande quantidade de aceptores de elétrons é reduzida, sendo o produto reduzido excretado no meio (MADIGAN *et al.*, 2016).

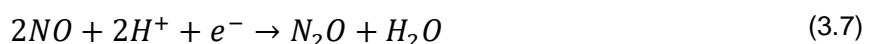
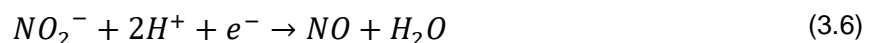
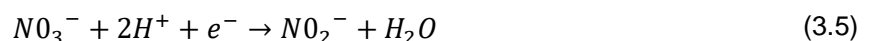
A DNRA ocorre em condições limitantes de oxigênio e tem por finalidade gerar amônia ou eliminar o excesso de potencial redutor para assimilação e crescimento celular anaeróbio (YE & THOMAS, 2001). No que tange a bioquímica da redução dissimilativa, a primeira enzima envolvida é a nitrato redutase, posteriormente nitrito redutase, óxido nítrico redutase e óxido nitroso redutase, todas desreprimidas por condições anóxicas. Alguns organismos são capazes de realizar o processo dissimilativo, todavia, há a formação de produtos gasosos que exibem maior importância global: o  $\text{N}_2\text{O}$  gerado pode ser convertido a NO e reagir com o ozônio nas camadas atmosféricas, formando nitrito que retorna como chuva ácida (MADIGAN *et al.*, 2016).

Sobre a redução assimilatória do nitrato, está também envolve a redução do nitrato a íon amônio para biossíntese celular. Todavia, ocorre tanto em condições aeróbias quanto anaeróbias, segundo Kieling (2004), e não resulta em rendimento energético e o íon amônio produzido não é excretado para o meio extracelular. No metabolismo assimilativo, apenas uma quantidade suficiente de nitrato é reduzida, visando as necessidades da biossíntese e os produtos são eventualmente convertidos em material celular, na forma de macromoléculas (MADIGAN *et al.*, 2016).

#### 3.8.4 Desnitrificação

A desnitrificação refere-se a uma via respiratória executada por micro-organismos anaeróbios onde nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) são reduzidos a nitrogênio gasoso ( $\text{N}_2$ ) e devolvidos para a atmosfera. São observadas reduções intermediárias nesse processo, com a produção de NO (óxido nítrico) e  $\text{N}_2\text{O}$  (óxido nitroso) (MADIGAN *et al.* 2016; Pan *et al.*, 2019; ARYAL *et al.* 2022).

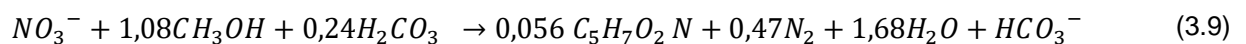
Na desnitrificação completa o nitrato reduz-se a nitrito (1ª etapa do processo) por intermédio da enzima nitrato redutase e o nitrito é convertido a óxido nítrico (2ª etapa), com atuação da enzima nitrito redutase. Posteriormente, óxido nítrico é reduzido a óxido nitroso (3ª etapa) sendo catalisado pela enzima óxido nítrico redutase. Por fim, o óxido nitroso é reduzido a nitrogênio gasoso (4ª etapa), utilizando a óxido nitroso redutase. Destaca-se que a nitrato redutase é uma enzima integral de membrana, cuja síntese é inibida pelo oxigênio molecular, assim como ocorre com as enzimas subsequentes. Ness sentido, além das condições anóxicas, é necessário a presença do nitrato para que as enzimas sejam plenamente expressas (RICHARDSON & WATMOUGH, 1999; MADIGAN *et al.* 2016). Richardson & Watnought (1999), Aryal *et al.* (2022) apresentaram as reações envolvidas no processo de desnitrificação conforme Equações (3.5), (3.6), (3.7) e (3.8):





Segundo Madigan *et al.* (2016), os micro-organismos capazes de realizar a desnitrificação são metabolicamente (em termos de mecanismos alternativos de geração de energia) e filogeneticamente diversos e podem ser encontrados em dois filos de arqueias e seis filos bacterianos, incluindo cinco classes de *Proteobacteria*. Grupos como os das *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Paracoccus* e *Thiobacillus* também fazem parte dos micro-organismos desnitrificantes (AHN, 2006). Aryal *et al.* (2022) fizeram alusão a estudos que indicam que mais de 60 gêneros de micro-organismos desnitrificantes já foram identificados, variando de bactérias e arqueobactérias a fundos e foraminíferos (GROFFMAN, 2012; THANDRUP, 2012).

A desnitrificação é geralmente realizada por um processo de bioconversão heterotrófica sob condições anóxicas, por bactérias anaeróbias facultativas, na qual os compostos nitrogenados oxidados, como nitrito e nitrato, são reduzidos a dinitrogênio gasoso por micro-organismos heterotróficos. Estes micro-organismos usam nitrito e/ou o nitrato como aceptores de elétrons, em vez de oxigênio, e usam compostos orgânicos como fonte de energia e carbono, como metanol, acetato, etanol, glicose e outros. A desnitrificação completa, utilizando o metanol como fonte orgânica, pode ser descrita na Equação (3.9) (AHN, 2006).



Todavia, muitos organismos não possuem um conjunto completo de enzimas para a desnitrificação, que libera óxido nítrico e nitroso (compostos nitrogenados gasosos) com a formação do nitrito. Em espécies de bactérias como *Paracoccus denitrificans* e *Pseudomonas stutzeri*, observa-se a desnitrificação completa, na qual óxidos de nitrogênio são formados a partir do nitrito pelas enzimas nitrato redutase, óxido nítrico redutase e óxido nitroso redutase. Outros organismos, como *Escheria coli* reduzem nitrato apenas a nitrito (MADIGAN *et al.* 2016).

### 3.8.5 Oxidação Anaeróbia do íon Amônio – Anammox

A oxidação aeróbia do íon amônio por bactérias oxidadoras de amônia (BOA) foi descoberta antes do século 19 e acreditava-se tradicionalmente que o íon amônio

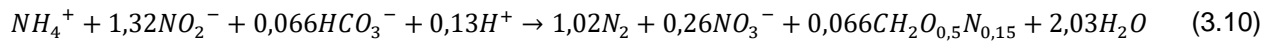
( $\text{NH}_4^+$ ) era oxidado apenas sob condições aeróbias  $\text{NH}_4^+$ . A descoberta do processo anammox, no início da década de 90, levou à constatação de que existia outro caminho, que não o convencional (nitrificação-desnitrificação) para a conversão de amônia a gás nitrogênio, por meio anaeróbio.

Existem poucos registros e comprovações datadas de antes de 1990 que sugeriram a oxidação da amônia por meio de condições anaeróbias. Hamm & Thompson (1941) foram os primeiros cientistas a preverem nos oceanos a oxidação anaeróbia da amônia, em 1941, no pacífico nordeste e Richards (1964) propôs a oxidação da amônia com nitrato em condições anóxicas. Contudo, tais estudos receberam pouca atenção, frente a inexistência de comprovação da bactéria anammox.

O austríaco Broda, em 1977, realizou cálculos termodinâmicos e previu que a existência de organismos que poderiam oxidar a amônia para gás nitrogênio usando nitrato ou nitrito como aceptor de elétrons sob condições anaeróbias. A reação seria possível do ponto de vista energético, com liberação significativa de energia livre de Gibbs (- 357 kJ/mol) (BRODA, 1977). A primeira evidência de oxidação anaeróbia da amônia foi originalmente descrita em estudo ocorrido na Universidade Técnica de Delf (TU Delft), na Holanda, em 1990 (MULDER *et al.*, 1995). Na oportunidade, os autores verificaram o desaparecimento do amônio com o consumo de nitrito e clara produção de nitrogênio gasoso, em uma planta piloto de um reator de leito fluidizado desnitrificante, do inglês, *denitrifying fluidized-bed reactor* (FBR), tratando águas residuárias de uma fábrica de fermento, sob condições anóxicas.

O termo “anammox”, portanto, foi dado por Mulder *et al.* (1995) e Van de Graaf *et al.* (1995), que utilizaram como marcadores em um reator FBR sendo observado o gás como produto, confirmando que as bactérias anammox usam nitrito como aceptor de elétrons em vez de nitrato (KUMAR *et al.*, 2017). O processo é catalisado por bactérias quimiolitotróficas, que apresentam crescimento lento, que usam o nitrito como aceptor de elétrons para oxidar diretamente amônia em condições anóxicas, convertendo amônia em gás nitrogênio na ausência de oxigênio (STROUS *et al.*, 1998; MADIGAN *et al.* 2016; CHANDEL *et al.*, 2022). O crescimento lento destes micro-organismos resulta em uma estequiometria (Equação 3.10) com produção baixa de biomassa por mol de amônio que é consumido. Segundo esta estequiometria, para

cada mol de amônio consumido, são consumidos 1,32 mol de nitrito e são produzidos 0,26 mol de nitrato (STROUS *et al.*, 1998).



Bactérias *Anammox* possuem forma de cocos, com um diâmetro de 800-1100 nanômetros, conforme Kartal *et al.* (2008), são quimiolitótróficas, sendo possível encontrar seis gêneros dentro do filo dos *Planctomycetes*: *Candidatus kueneria*, *C. brocadia*, *Ca. anammoxoglobus*, *C. anammoximicrobium*, *C. jettenia*, and *C. scalindua*. Também possuem coloração alaranjada, devido à elevada concentração de citocromos no interior das células (JETTEN *et al.*, 1998). Os cinco primeiros gêneros são comumente encontrados em águas residuárias e sistemas aquáticos enquanto o último é mais comum em sistemas salinos como água do mar e sedimentos (ALI *et al.*, 2015; GUO *et al.*, 2016; LAWSON *et al.*, 2017). A tabela 3.2.5.1 apresenta a taxonomia das bactérias anammox em diferentes sistemas ambientais.

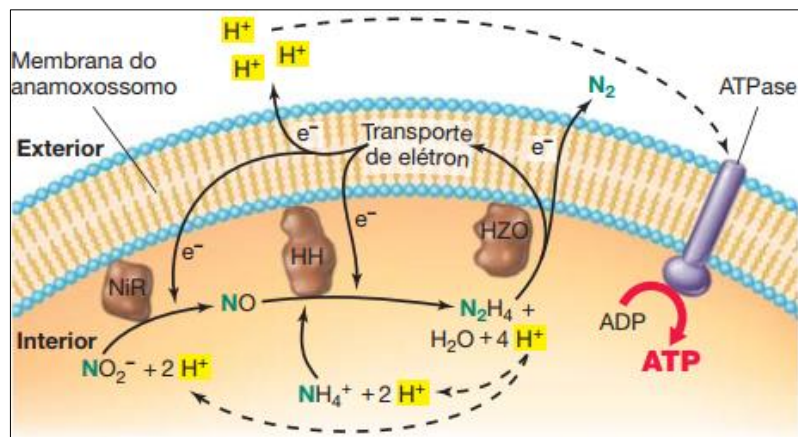
Sobre a sua estrutura, as bactérias Anammox possuem um compartimento celular conhecido como anammoxossomo, local no qual ocorre o seu catabolismo. A membrana de bicamada lipídica que envolve este compartimento contém lipídeos incomuns, denominados “laderanos”. Eles consistem em ácidos graxos contendo múltiplos anéis de quatro membros, ciclobutano, conectados ao glicerol por ligações tanto de éster quanto éter ocorrem como álcoois livres. Estes lipídeos agregam-se formando uma estrutura densa, resistente à difusão (MADIGAN *et al.*, 2016; KUMAR *et al.*, 2017).

As membranas lipídicas são necessárias para a atividade celular e permitem diferentes concentrações de íons e metabólicos, sendo provavelmente necessária para proteger a célula contra os intermediários tóxicos produzidos durante as reações, incluindo o composto *hidrazina*,  $N_2H_4$ , considerado um redutor extremamente forte. Na reação anammox, primeiro o nitrito reduz-se a óxido nítrico (NO) pela ação da enzima nitrito redutase (Nir) e depois o NO interage com a amônia produzindo a *hidrazina* (HH) por meio da enzima hidrazina hidroxilase (HZO). A *hidrazina* oxida-se a  $N_2$  mais elétrons pela enzima hidrazina desitrogenase. Durante essa etapa, alguns elétrons entram na cadeia de transporte de elétrons dos anammoxossomos e a reação de transporte de elétrons produz força próton-motiva enquanto outros elétrons

realimentam o sistema para promover as reações supramencionadas. Nesse sentido, o ATP é formado a partir da força próton-motiva pelas ATPases na membrana do anamoxossomo (MADIGAN *et al.*, 2016). A

Figura 3.3 apresenta o anamoxossomo, enzimas e a atividade microbiana neste compartimento celular.

Figura 3.3 – Reações no anamoxossomo



Fonte: Madigan *et al.* (2016)

A fisiologia e as condições ambientais impactam na disseminação de tipos diferentes de bactérias anammox (CHANDEL *et al.*, 2022), sendo referenciada na Tabela 3.3 distintas taxonomias. Em baixas cargas de Nitrogênio, os gêneros *C. jettenia*, *C. brocadia anammoxidans*, *C. anammoxoglobus*, e *C. Kuenenia* são dominantes (Li *et al.*, 2017; Reino *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2018). Enquanto em altas taxas dominam a *C. brocadia sinica* e a *C. kuenenia stuttgartiensis* (CHO *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2018). Diferentes temperaturas também favorecem diferentes gêneros: *C. Brocadia* e *C. brocadia fulgida* são mais comuns em ambientes entre 6°C e 15°C, conforme estudos como Hendrickx *et al.* (2014) e Awata *et al.* (2015), enquanto o gênero foi observado na faixa de 25-45°C (ISAKA *et al.*, 2008).

Tabela 3.3 – Taxonomia das bactérias anammox

Gênero	Espécies	Fonte ambiental	Referência
<i>Brocadia</i>	' <i>Candidatus Brocadia anammoxidans</i> '		Strous <i>et al.</i> (1999)
	' <i>Candidatus Brocadia sinica</i> '		Oshiki <i>et al.</i> (2011)
	' <i>Candidatus Brocadia fulgida</i> '	Águas residuárias	Kartal <i>et al.</i> (2008)
	' <i>Candidatus Brocadia caroliniensis</i> '		Yin <i>et al.</i> (2019)
	' <i>Candidatus Brocadia brasiliensis</i> '		Araújo <i>et al.</i> (2011)
<i>Kuenenia</i>	' <i>Candidatus Kuenenia stuttgartiensis</i> '	Águas residuárias e Água doce	Penton <i>et al.</i> (2006), Verma e Daverey (2024), Vossenberg <i>et al.</i> (2013), Schmid <i>et al.</i> (2001)
<i>Jettenia</i>	' <i>Candidatus Jettenia asiatica</i> '		Quan <i>et al.</i> (2008), Hu <i>et al.</i> (2011)
	' <i>Candidatus Jettenia caeni</i> '	Águas residuárias	Ali <i>et al.</i> (2015), Wang <i>et al.</i> (2024b)
	' <i>Candidatus Jettenia AMX2</i> '		Wang <i>et al.</i> (2024b)
<i>Anammoxoglobus</i>	' <i>Candidatus Anammoxoglobus propionicus</i> '	Efluente sintético	Kartal <i>et al.</i> (2007)
	' <i>Candidatus Anammoxoglobus sulfate</i> '	Efluente sintético	Liu <i>et al.</i> (2008)
<i>Scalindua</i>	' <i>Candidatus Scalindua brodae</i> '	Águas residuárias (marinha)	Schmid <i>et al.</i> (2003)
	' <i>Candidatus Scalindua wagneri</i> '	Águas residuárias (marinha)	Schmid <i>et al.</i> (2003)
	<i>Candidatus Scalindua sorokinii</i>	Água marinha	Schmid <i>et al.</i> (2003), Kuypers <i>et al.</i> (2003)
	' <i>Candidatus Scalindua marina</i> '	Sedimento marinho	Brandsma <i>et al.</i> (2011)
	' <i>Candidatus Scalindua profunda</i> '	Marinha	Vossenberg <i>et al.</i> (2013)

	<i>'Candidatus Scalindua arabica'</i>	Mar arábico	Woebken <i>et al.</i> (2008)
Woebken	<i>'Candidatus Anammoxomicrobium moscowii'</i>	Lodo de águas residuárias	Khramenkov <i>et al.</i> (2013)

Adaptado de Chandel *et al.* (2022)

### 3.9 Processo Anammox aplicado ao tratamento de efluentes

Como elucidado por Gamón, Cema e Ziemińska-Buczyńska (2021), a oxidação anaeróbica de amônio (Anammox) é um dos processos mais promissores para o tratamento de efluentes ricos em amônio, uma vez que as bactérias com atividade Anammox oxidam anaerobicamente o íon amônio a nitrogênio gasoso, usando o nitrito como acceptor final de elétrons (Kartal *et al.*, 2013; MADIGAN *et al.*, 2016).

Uma grande vantagem deste processo em relação à nitrificação e desnitrificação convencionais é que não há a necessidade de oxidar o nitrogênio até nitrato, permitindo uma economia de oxigênio e conseqüentemente, de energia (VON SPERLING, 2016). O processo oferece benefícios importantes em comparação com o processo generalizado de nitrificação e desnitrificação, e portanto, é interessante do ponto de vista de tratamento de efluentes, ao mencionar que promove a redução da demanda de oxigênio (cerca de 60%), a eliminação da adição de fontes externas de carbono, baixa produção de lodo em excesso devido ao longo tempo de duplicação das bactérias (9 a 29 dias), alta taxa de remoção de nitrogênio e menor emissão de gases do efeito estufa (em cerca de 90%) (GAMÓN, CEMA E ZIEMIŃSKA-BUCZYŃSKA, 2021; IZADI *et al.*, 2023).

Nesse sentido, a literatura não deixa dúvidas de que os processos baseados no sistema anammox podem oferecer um caminho sustentável, sendo os benefícios supracitados elencados por autores como Lackner *et al.* (2014), Hoekstra *et al.* (2018), Pedrouso *et al.* (2018) e Antwi *et al.* (2019).

O pós-tratamento de efluentes domésticos e de resíduos alimentares utilizando o processo anammox, para diferentes condições operacionais e experimentais tem sido objeto de pesquisas, mostrando-se eficiente para remoção de DQO, nitrito e amônio (CARVALHO *et al.*, 2021; FERNANDES *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2019). Outros autores também investigaram, em escala piloto e laboratorial, o processo anammox

aplicado ao tratamento de lixiviado de aterro sanitário; como em Ren *et al.* (2022) e o tratamento de efluente da suinocultura, desenvolvido por Chen *et al.* (2021a).

No contexto de tratamento de efluentes, é válida a menção ao processo conjugado da nitrificação parcial com o processo anammox (NP/A), uma vez que esta combinação é vista nos estudos correlatos ao tema (AKABOCI *et al.*, 2018; JIANG *et al.*, 2020; LAURENI *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2024; PEDROUSO *et al.*, 2018). A conjugação NP/A como um processo autotrófico completo tem sido utilizado para realizar a nitrificação e o processo anammox, permitindo a remoção de nitrogênio por meio da atividade sinérgica de bactérias oxidadoras de amônio (BOA) e bactérias anammox e esta combinação é conhecida por ser um processo efetivo para o tratamento de efluentes ricos em amônio (IZADI *et al.*, 2023). Portanto, o processo de nitrificação parcial com tecnologia anammox envolve duas etapas: na primeira, bactérias aeróbias oxidadoras de amônia oxidam amônio ( $\text{NH}_4\text{-N}$ ) a nitrito ( $\text{NO}_2\text{-N}$ ), e na segunda, bactérias anaeróbias oxidadoras de amônia oxidam o restante do grupo  $\text{NH}_4\text{-N}$  a dinitrogênio, com a formação de  $\text{NO}_2\text{-N}$  (CHANDEL *et al.*, 2022).

Como explicitado por Gilbert *et al.* (2015), o processo de nitrificação total é prejudicial ao sistema de NP/A, uma vez que o processo convencional consome o nitrito requerido por bactérias anammox para a produção de nitrato. Frente aos fatos, a NP/A é alcançada ajustando parâmetros de interesse (Oxigênio dissolvido, pH, temperatura, matéria orgânica, carbono inorgânico, amônia livre (FA), ácido nitroso livre (FNA) e tipo do reator) que devem ser controlados a fim de garantir a inibição de bactérias oxidadoras de nitrito (BON) e o crescimento de bactérias oxidadoras de amônio (BOA) (DUAN *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2018).

### **3.10 Fatores que influenciam no processo Anammox**

Mesmo diante dos benefícios explicitados anteriormente, o lento crescimento dessas bactérias (aumenta o tempo de partida dos reatores), associado à necessidade de controle do processo (pH, temperatura, concentração de oxigênio, concentração dos substratos amônio e nitrito, concentração de substâncias inibitórias) e a obtenção de biomassa são fatores que ainda limitam o emprego do processo de desamonificação (nitrificação parcial e anammox) em larga escala, como elencado em Fernandes (2017), sendo essencial a compreensão das condições que influenciam o processo.

Distintos fatores interferem no processo Anammox, dentre os quais pH, temperatura, efeito da concentração do substrato, concentração de oxigênio dissolvido, matéria orgânica e tempo de retenção de lodo (CHANDEL *et al.*, 2022).

### 3.10.1 Fornecimento de Oxigênio Dissolvido

O oxigênio dissolvido (OD) torna-se fator crucial quando realizado o processo conjugado de nitrificação parcial e anammox, para que haja controle das BOA e a inibição das BON. E, geralmente, a limitação de oxigênio é a estratégia mais aplicada para inibição das BON e enriquecimento das BOA com atividade anammox, em processos conjugados de NP/A (HU *et al.*, 2023).

A aeração contínua ou a intermitente, formas de aeração de reatores de nitrificação parcial, foi discutida por Giustinianovich *et al.* (2018), que observaram maior efetividade na redução da atividade de BON por meio da aeração intermitente. Pereira *et al.* (2019) constataram que a aeração intermitente tanto contribui para a supressão da atividade de BON quanto favoreceu o processo de NP/A.

Tem-se verificado que a baixa concentração de OD, menor que 0,5 mg/L, é usualmente requerida para a manutenção da atividade anammox, inibindo bactérias oxidadoras de nitrito e alcançando eficiência de remoção de nitrogênio acima de 80% (DAVEREY *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2017b)

Chen *et al.* (2020a) mantiveram o controle da taxa de aeração de OD na faixa de 0,13 -0,31 mg/L, o que foi favorável para o desempenho de um reator em batelada sequencial (RBS) de único estágio. Wu *et al.* (2021) foi bem-sucedido no processo de NP/A para um biorreator de membrana anaeróbio, mantendo a concentração de OD mais baixo do que 0,5 mg/L, por meio aeração intermitente. Chen *et al.* (2021b) puderam tratar efluente com  $\text{NH}_4^+$  em baixa concentração (50 mg/L), controlando o OD entre 0,05 e 0,15 mg/L, em um reator de biofilme de circulação interna de único estágio “airlif”, escala laboratorial de NP/A.

Hu *et al.* (2023) avaliaram o impacto de diferentes condições de oxigênio dissolvido (0,3 e 1,0 mg/L) em um RBS e verificaram a diminuição da atividade e abundância

das BOA com atividade anammox quando utilizaram a alta concentração de oxigênio dissolvido (1,0 mg/L).

### 3.10.2 Temperatura

Sobre a temperatura, testes contínuos e de bancada no sistema anammox geralmente são realizados em temperaturas de 30°C e 40°C para obter uma alta taxa de remoção de nitrogênio, uma vez que a fisiologia das bactérias aeróbias oxidadoras de amônio revela que sua atividade ótima é a 37°C e que temperaturas acima de 45°C resultam em perda irreversível da atividade (DOSTA *et al.*, 2008; STROUS *et al.*, 1999; TOH *et al.*, 2002). Todavia, faixa de temperatura entre 17 e 35 °C não é considerada por Daverey *et al.* (2013) um fator crítico para o crescimento das anammox, pois elas podem crescer ativamente sem afetar seu desempenho.

O efeito da temperatura na diversidade microbiana e na remoção de nitrogênio em um RBS anammox tratando efluente doméstico foi avaliado por Fernandes *et al.* (2018), que demonstraram que a atividade anammox não foi afetada pelo decréscimo de temperatura de 35°C para 20 °C sendo possível remover nitrogênio de efluente doméstico em temperaturas típicas tropicais. Carvalho *et al.* (2024) demonstraram a possibilidade de atividade ótima das bactérias anammox em RBS a temperatura ambiente do sudeste brasileiro, em condição de NP/A

Ma *et al.* (2016) fortalecem a discussão ao elucidarem que o desenvolvimento do processo PN/A tem sido vastamente aplicado para o tratamento de efluentes com altas concentrações de  $\text{NH}_4^+$ , mas, propenso a falhas quando a água residuária é submetido a baixas temperaturas, como as menores que 15°C. Contudo, mesmo que já seja consagrado na literatura os efeitos inibitórios das altas temperaturas, a adaptação do processo anammox a baixas temperaturas tem atraído outros estudos em laboratório e projetos piloto (LAURENI *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2020b).

### 3.10.3 Matéria Orgânica

Em efluentes reais, amônio, carbono inorgânico e carbono orgânico estão constantemente presentes e interferem distintamente na atividade anammox (CHANDEL *et al.*, 2022). Carbono inorgânico pode estimular o crescimento das

bactérias com atividade anammox, assim como aumentar sua atividade (KIMURA *et al.*, 2011). Compostos orgânicos, por outro lado, merecem atenção no processo conjugado NP/A, uma vez que podem ser considerados inibidores da bactéria anammox, especialmente em altas concentrações, levando a inativação enzimática e morte celular (ANJALI e SABUMON, 2014; CHAMCHOI, NITISORAVUT, SCHMIDT, 2008; CHEN *et al.*, 2021; MOLINUEVO *et al.*, 2009).

A matéria orgânica pode exercer dois mecanismos de inibição às bactérias anammox: a) inibição por autocompetição, com alteração da população microbiana devido a supressão de bactérias anammox e BOA e crescimento de BON e; vantagem competitiva as bactérias desnitrificantes heterotróficas se comparada com as bactérias anammox, uma vez que aquele grupo possui maior taxa de crescimento em comparação com este; b) alterações na via metabólica, nas quais as bactérias envolvidas passam a metabolizar carbono orgânico em vez de nitrogênio amoniacal e nitrito, causando diminuição na eficiência de remoção de nitrogênio (BONASSA *et al.*, 2021; CHENG *et al.*, 2018; JIN *et al.*, 2012 ; MIAO *et al.*, 2018). A discussão do item “a” também é fortalecida por Chen *et al.* (2016), ao mencionarem que a competição entre bactérias anammox e bactérias heterotróficas desnitrificantes pelo mesmo aceptor de elétrons, nitrito.

Se o carbono orgânico presente nos efluentes mostra baixa biodegradabilidade e disponibilidade, os efeitos dos processos da desamonificação são minimizados, não sendo suficientes para promover a coexistência de BOA e bactérias Anammox com as bactérias heterotróficas. Todavia, altas concentrações de carbono orgânico biodegradável, como sucralose ou glicose, podem promover o excessivo crescimento de bactérias heterotróficas e em concomitância, decréscimo das BOA e com atividade Anammox (LI *et al.*, 2018).

Na literatura, o processo Anammox revela distintas eficiências de remoção de  $\text{NH}_4^+$  para diferentes taxas de C/N (carbono/nitrogênio) e COD/N (carbono orgânico dissolvido/nitrogênio). Wu *et al.* (2015) verificaram as taxas de C/N de 1,30 e 1,36 (3000 mg/L de COD e 2200-2300 mg/L N-NH) no tratamento de efluentes em reator UASB. Na ocasião, efeitos inibitórios não foram observados devido à baixa biodegradabilidade da matéria orgânica e alta atividade Anammox.

Leal (2015) avaliou diferentes relações de DQO/N (com glicose) sobre o processo anammox aplicado ao efluente de reator UASB tratando esgoto doméstico e mostrou que valores de DQO superiores a 300 mg/L inibiram o processo, corroborando com os dados da literatura que afirmam sobre os efeitos inibitórios da matéria orgânica sobre as bactérias anammox. Adicionalmente, revelou que relações altas de DQO/N (de 5,0, com DQO até 300 mg/L) não inibiram o processo e permitiram atividade anammox e atividade desnitrificante em reator em batelada sequencial (RBS).

Liu *et al.* (2017a) testaram diferentes taxas de C/N (de 0,1 a 3,0), mantendo a concentração em 50 mg/L de N-NH<sub>3</sub> para avaliar o desempenho do processo e qual grupo predominaria. O crescimento da taxa de C/N de 0,1 para 0,6 levou ao aumento de bactérias heterotróficas, com aumento da desamonificação (de 7,5 a 16%). Com taxas maiores que 1,0, declinou-se a predominância de BOA e Anammox, com diminuição da eficiência de remoção de nitrogênio.

Miao *et al.* (2018) investigou os efeitos das taxas de C/N de 1,1 a 2,5 na remoção de nitrogênio, avaliando a morfologia das bactérias Anammox. A eficiência de remoção cresceu com o incremento de taxa de C/N de 1, para 2,0 (30,8 para 77,3%), frente ao desenvolvimento da atividade anammox. Contudo, com a taxa de C/N de 2,5 houve o decréscimo significativo da atividade anammox, associado no estudo ao desenvolvimento de bactérias heterotróficas.

Se por um lado, a matéria orgânica pode possuir caráter inibitório no processo de NP/A; a depender das suas condições de biodegradabilidade e biodisponibilidade; estudos já revelaram relações consorciais nas quais é possível manter a concentração de biomassa Anammox alta em reatores, enquanto aumenta-se a relação C/N afluente, podendo coexistir micro-organismos com atividade Anammox e bactérias heterotróficas (BONASSA *et al.*, 2021). Nesses sistemas mistos, a desnitrificação consome o carbono orgânico e o nitrato, produzido durante o processo anammox (Equação. 3.9) (MOLINUEVO *et al.*, 2009; XIE *et al.*, 2017; NI *et al.*, 2012).

De fato, uma boa performance de reatores que utilizam o processo NP/A pode estar vinculada a biodegradabilidade da matéria orgânica, a sua disponibilidade, assim como a uma relação de DQO/N inferior a 3,5 (BONASSA *et al.*, 2021).

#### 3.10.4 pH

Autores como Strous, Kuenen, Jetten (1999) e Jetten *et al.* (2009) enfatizaram que a faixa de pH ideal para a atividade anammox encontra-se entre 6,7 e 8,3. Ademais, faixas de pH fortemente ácidas ou fortemente básicas podem causar inibição completa do processo, pois podem favorecer a hidrólise da membrana celular e cessar processos metabólicos essenciais para as bactérias (SCHEEREN *et al.*, 2011).

Zhang e Okabe (2020) reforçam que bactérias anammox previamente enriquecidas só são ativas entre o pH de 6,8 e 8,5, e sua atividade e crescimento frequentemente cessam em pH abaixo de 6,5 (CARVAJAL-ARROYO *et al.*, 2013; PRADHAN; THIA; WUERTZ, 2020; TOMASZEWSKI; CEMA; ZIEMBÍNSKA-BUCZYNSKA, 2017; YIN *et al.*, 2016).

#### 3.10.5 Configuração do tipo de biomassa

As bactérias com atividade anammox têm a propensão de agregar-se, como explicitado em Ali *et al.* (2018) e Li *et al.* (2021b), sendo este processo benéfico para aumentar a sua atividade biológica, abundância relativa e proliferação (WANG *et al.*, 2022a).

Segundo Gu *et al.* (2016), as morfologias dos agregados microbianos enriquecidos com bactérias anammox possuem três categorias distintas: lodo floculento, biofilme aderido e lodo granular, contudo, as formas mais estáveis de biomassa, que protegem as bactérias anammox (de baixas temperaturas e outros fatores inibitórios) são os filmes e os grânulos (TOMASZEWSKI *et al.*, 2017).

O biofilme exerce múltiplas funções em sistemas baseados no processo anammox: agregação (retenção de bactérias anammox e BOA), produção (potencial de recuperação de produtos de alto valor e remoção de pouentes), seleção (transporte e recebimento de substratos e produtos metabólicos por bactérias sintróficas), proteção (mitigação dos impactos da matéria orgânica, temperatura e outros fatores inibidores por substâncias extracelulares poliméricas) e comunicação (indução de agregação de células e formação de biofilme) (Du *et al.*, 2024).

Ainda, dentre os três, o tipo grânulo tem maior eficiência de remoção de nitrogênio, abundância de bactérias anammox oxidadoras de amônia (BOAAn) e diversidade de comunidade microbiana (LIU *et al.*, 2020c).

Em sistemas estáveis granulares com biomassa anammox, os flocos geralmente coexistem com grânulos (LIU *et al.*, 2017; ZHUANG *et al.*, 2020). Comparado aos grânulos, flocos possuem menor limitação de difusão de massa devido à sua estrutura e pequeno tamanho, tornando-os mais susceptíveis à interferência do ambiente externo. Em contrapartida, grânulos grandes e com estrutura compacta geralmente apresentam maior limitação de difusão de massa, por conseguinte, criam microambientes internos completamente anóxicos para o enriquecimento de bactérias anammox (LIU *et al.*, 2020c). Desse modo, a abundância relativa de bactérias anammox funcionais em grânulos era maior do que dos flocos, enquanto os flocos eram tipicamente enriquecidos com mais bactérias aeróbias oxidadoras de amônia, BON e bactérias heterotróficas do que em grânulos (LI *et al.*, 2019b; WANG e WANG, 2023).

Além disso, o processo de granulação demonstrou melhorar a retenção da biomassa em distintos estudos, tornando-se mais comum para enriquecer micro-organismos anammox (ADAMS *et al.*, 2022; LIN, ZHANG E LI, 2023; MANONMANI E JOSEPH, 2018). Como resultado, a granulação do lodo resulta em um acúmulo de biomassa mais denso, prolongando o tempo de residência do lodo no reator, melhorando a sua estabilidade, assim como evitando a perda de biomassa devido a choques físicos ou hidráulicos (TANG *et al.*, 2017).

### 3.10.6 Íon amônio/amônia livre e nitrito/ácido nitroso livre

Atenção também deve ser dada às concentrações de nitrito, amônia livre e ácido nitroso livre, que podem funcionar como inibidores das bactérias anammox. Fernández *et al.* (2012) relataram que altas concentrações de nitrito (acima de 100 mg/L), amônia livre (FA) (acima de 20 mg/L) e ácido nitroso livre (FNA) (acima de 0,5 µg/L) inibiram o processo Anammox. O processo anammox pode ser, portanto, inibido pelos seus substratos, nitrogênio amoniacal e nitrito, e pelas suas formas não ionizadas (TOMASZEWSKI *et al.*, 2017).

Não há consenso literário quanto os valores máximos dos substratos que provocam inibição no sistema anammox. Lotti *et al.* (2012) concluíram que concentrações de  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_2^-$  - menores que 500 mg/L não pareciam inibir as bactérias com atividade anammox, mas, os resultados são distintos para outros estudos. Comparando o efeito inibitório da FA, do nitrogênio amoniacal, do FNA e do nitrito em diferentes processos anammox, conforme Tabela 3.4, adaptada de Ma *et al.* (2017), reforça-se a afirmativa de que não há um valor específico para inibição, mas sim, um conjunto de parâmetros e fatores integrados que podem comprometer o sistema.

Tabela 3.4 - Comparação dos efeitos de inibição em diferentes estudos utilizando processo Anammox.

Tipo de biomassa	Reator	Modo de Operação	T (°C)	pH	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/L)	NO <sub>2</sub> (mg/L)	FA (mgNH <sub>3</sub> /L)	FNA (mg/L)	Efeito	Referência
Biofilme	RBS	Batelada Contínuo	30	7,8	-	-	38 35-40	-	50% de inibição	Fernandez <i>et al.</i> (2012)
Floculenta	CSTR	Batelada	30	7,8	770	-	47	-	50% de inibição	Dapena-Mora <i>et al.</i> (2007)
Granular Anammox	UASB	Contínuo	20	7,3-8,1	-	-	13-90	-	Inibição	Waki <i>et al.</i> (2007)
Granular Anammox	UASB	Contínuo	35 ±1	7,5-7,8	100-250	-	< 5	-	Sem inibição	Niu <i>et al.</i> (2016)
Granular Anammox	UASB	Contínuo	33 ±1	7,5-7,9	195,3  282,4	-	7  11	-	10% de inibição  20% de inibição	Ma <i>et al.</i> (2017)
Granular Anammox	UASB	Contínuo	35 ±1	7,5-7,8	-	132-330	-	< 0,002	Sem inibição	Niu <i>et al.</i> (2016)
Granular Anammox	UASB	Contínuo	33 ±1	7,5-7,9	-	229,7338, 2	-	0,017  0,026	10% de inibição  20% de inibição	Ma <i>et al.</i> (2017)

Fonte: Adaptado de Ma *et al.* (2017)

### **3.11 Processo Anammox aplicado a remoção de compostos nitrogenados de efluentes da indústria de fertilizantes**

O processo anammox tem sido investigado no âmbito do tratamento de efluentes com diferentes concentrações de nitrogênio amoniacal (efluente sintético, digestato de resíduo alimentar, lixiviado de aterro sanitário e efluente doméstico) e operados por sistemas em reatores em batelada sequencial, respectivamente (LI *et al.*, 2019a; PEREIRA *et al.*, 2019; JIANG *et al.*, 2020; PEDROUSO *et al.*, 2018).

Em alusão ao item 3.6, distintas técnicas para o tratamento de efluentes da indústria de fertilizantes foram destacadas, incluindo processos físicos, químicos e biológicos. A Tabela 3.5 apresenta pesquisas que avaliaram o tratamento de efluente da indústria de fertilizantes e os respectivos processos envolvidos, sob distintas condições de operação.

Tabela 3.5 - Tratamento de efluentes de fertilizantes sob distintos processos e condições operacionais

(Continua)

Efluente	Reator	Parâmetros físico-químicos do efluente	Volume/Dimensões (reator)	Temperatura (c°)	Processo	Eficiência	Referência
Efluente da indústria de fertilizante sintético	SNAD - biorreator simultâneo de desnitrificação, anammox e nitrificação parcial	N/A	1L	30°C	Processo biológico (nitrificação parcial, anammox e desnitrificação)	Aproximadamente 98,9% de remoção de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Keluscar, Nerurkar e Desai (2013)
Efluente Sintético - Indústria de ureia	SABF - Filtro biológico aerado submerso	N/A	2L	30°C	Processo de hidrólise, nitrificação parcial, anammox	Remoção de ureia > 99,5% NT = 77,09% NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> = 89,04%	Chen <i>et al.</i> (2022)
Efluente real - coletado das instalações de armazenamento e manuseio de fertilizantes no Porto de tubarão, no Espírito Santo - Brasil.	Reator eletrolítico em batelada indivisível com recirculação de eletrodos de Ti/RuO <sub>2</sub>	pH: 9,7 TAN: 1400-1700 mg/L COD: 356 mg/L Nitrato: 29-32 mg/L Nitrito: 4 mg/L Cloreto: 3- 6,2 mg/L	N/A	25	Eletroxidação de nitrogênio amoniacal total (TAN)	Aproximadamente 96% de remoção de TAN	Santos <i>et al.</i> (2019)
Efluente real - Indústria Italiana	Planta de MDA em escala laboratorial  Planta de Osmose reversa em escala laboratorial	pH: 3 NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 296 mg/L DQO: 119 mg/L SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> : 2290 mg/L PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> : 3121 mg/L F <sup>-</sup> : 161 mg/L Cl <sup>-</sup> : 1986 mg/L	(MDA) Área de membrana efetiva: 22 cm <sup>2</sup> Altura de canal: 2mm  (OR) Área de membrana efetiva: 66 cm <sup>2</sup> Altura de canal: 2mm	(MDA: 40°C)  (OR: 25°C)	Comparação entre membranas de destilação a vácuo (MDA) e Osmose Reversa (OR)	Remoção de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>  (MDA > 99%)  (OR > 97%)	Tagliabue <i>et al.</i> (2021)

(Continua)

Efluente	Reator	Parâmetros físico-químicos do efluente	Volume/Dimensões (reator)	Temperatura (c°)	Processo	Eficiência	Referência
Efluente real - planta de fertilizantes no Vietnã, a "Phu My Fertilizer Wasterwater Plant"	N/A	pH $6.8 \pm 0.5$ Temperature °C $29 \pm 1.0$ OD: $4.7 \pm 0.6$ mg/L NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : $26.5 \pm 3.5$ mg/L NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> : $11.3 \pm 2.1$ mg/L PO <sub>4</sub> <sup>+3</sup> : $0.9 \pm 0.28$ mg/L TN: L $47.3 \pm 5.9$ mg/L TP: $1.8 \pm 0.27$ mg/L DQO: $180 \pm 18$ mg/L DBO: $87 \pm 12$ mg/L	N/A	27°C	Processo biológico - microalga verde. <i>Scenedesmus sp.</i>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> = 93% NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> = 84% PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> = 97% PT = 96% DQO = 93% DBO <sub>5</sub> = 84%	Pham e Bui (2020)
Efluente real - fertilizante fosfatado	SBR - "AnASBR_PPL" - Reator em batelada sequencial anóxico-aeróbio	PO <sub>4</sub> <sup>+3</sup> : 100 mg/L	N/A	N/A	Processo Anóxico-aeróbio	PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> = 90% (e desnitrificação completa) DQO: 90%	Jena <i>et al.</i> (2020)
Efluente real - indústria de fertilizante	"A round-bottomed"	COD: 4982 mg/L pH: 9,2 turbidez: 87 NTU NH <sub>3</sub> -N: 113 mg/L NO <sub>3</sub> -N: 270 mg/L NT: 450 mg/L PT: 2,0 mg/L	250 mL	N/A	Peroxidação catalítica	DQO: 83%	Singh, Srivastava e Mandal (2015)
Lixiviado de fosfogesso	N/A	N/A	N/A	N/A	DAS - Tecnologia de substrato alcalino disperso	PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> , F, Fe, Zn, Al, Cd, U e As: 100%	Míllan-Becerro <i>et al.</i> (2022)

(Continua)

Efluente	Reator	Parâmetros físico-químicos do efluente	Volume/Dimensões (reator)	Temperatura (c°)	Processo	Eficiência	Referência
Águas residuárias sintéticas preparadas em laboratório	Reator de membrana enzimática (EMR)	Enzima urease: 0,067 mg/L, adição de nitrogênio amoniacal (0, 100 mg/L, 200 mg/L, 500 mg/L)	N/A	20 ± 1 °C	Hidrólise da ureia para recuperação da amônia	N/A	Yahya <i>et al.</i> (2021)
Efluente real – indústria de Camaçari - Bahia	N/A	N/A	N/A	N/A	Processos físico-químicos (air stripping, osmose reversa, bomba de calor químico) e biológico (anammox)	Análise exérgica	Jorquera <i>et al.</i> (2014)
Efluente real – indústria de fertilizantes	Reator de leito fluidizado (FBR)	pH: 8,63 Mg: 312,9 mg/L PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> : 1800 mg/L NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 1710 mg/L F: 122 mg/L SST: 122,22 mg/L DQO: 72 mg/L SiO <sub>2</sub> : 850 mg/L Ca: 101,2 mg/L	Parte inferior (altura: 1,5 m, diâmetro: 0,05 m), e parte superior (altura: 0,25 m, diâmetro: 0,1 m) 105L	N/A	Método de cristalização	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 86,14% PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> : 98,98%	Warmadewanthi, Iklas, Damayanti (2023)

(Conclusão)

Efluente	Reator	Parâmetros físico-químicos do efluente	Volume/Dimensões (reator)	Temperatura (c°)	Processo	Eficiência	Referência
Efluente Sintético	Reator de leito expandido	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> e NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (proporção molar de 1:1,2) na forma de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> e NaNO <sub>2</sub> , KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .  Outras composições: 0,3 g/L de CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 0,57 g/L de KCl 0,2 g/L de MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0,5 g/L de NaHCO <sub>3</sub> Oligoelementos	5L	25 ± 1 °C	Anammox	N: 83,7 ± 4,8% P: 94,2 ± 1,2%	Ma <i>et al.</i> (2020)
Efluente real da indústria de fertilizantes químicos e efluente sintético	N/A	Nitrogênio total: 34~58 mg/L Nitrogênio orgânico: 0.5~18 mg/L CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O: 2~8 mg/L NH <sub>3</sub> : 25~50 mg/L NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> : 1.2~2.7 mg/L	250 mL	N/A	Sistema de Precipitação MAP (fosfato, amônio e magnésio)	Nitrogênio total: 83.9~91.2 % Nitrogênio orgânico: 41.6~99.8 % CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O: 78.8~99.9 % NH <sub>3</sub> : 80.8~91.5 % NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> : 87.2~94.3 %	Son <i>et al.</i> (2019)
Efluente real de fábrica de ureia e efluente sintético.	Reator de biofilme em batelada de sequenciamento anammox (SBBR)	Efluente real pH: 9,98±0,04 Condutividade Elétrica: 5,26±0,03µS OD: 1,8 mg/L NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 1500 mg/L Nitrogênio Kjeldahl: 3000 mg/L CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O: 1500 mg/L DQO: 200 mg/L Nitrato Nitrogênio: 33 mg/L Nitrogênio nitrito: ≤ 0,5 mg/L	1,7 L	25,6 °C	Anammox	N: ~ 83%, 81% e 80% nas fases subsequentes I, II e III.	Verma e Daverey (2024)

Contudo, no tocante ao processo biológico, foi observado na literatura apenas três estudos nos quais o sistema Anammox foi testado experimentalmente em efluente da indústria de fertilizante (sintético), Chen *et al.* (2022), Keluscar, Nerurkar e Desai (2013), Verma e Daverey (2024).

Keluscar, Nerurkar e Desai (2013), desenvolveram na Universidade de Nova Delhi, Índia, um processo simultâneo de nitrificação parcial, anammox e desnitrificação, em escala de bancada para remoção de  $\text{NH}_4^+$  de um efluente da indústria de fertilizante (sintético). Aproximadamente 98,9% de  $\text{NH}_4^+$  foi removida, com taxa de remoção de 0,35  $\text{kgNH}_4\text{-N/m}^3$  dia, com 46,6 mg/L de carbono orgânico dissolvido e 2,31 dias de tempo de detenção hidráulica (TDH).

Um filtro biológico aerado submerso de um único estágio foi operado por 126 dias, a fim de se obter o desempenho e os mecanismos de remoção de nitrogênio de um efluente de ureia ( $\text{H}_2\text{NCONH}_2$  - fertilizante nitrogenado), usando simultaneamente a hidrólise da ureia, nitrificação parcial e processo anammox. Foi utilizado um efluente sintético (0–1,6 g/L ureia, 0–0,3 g/L ( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ), 0-1.2 g/L alcalinidade (como  $\text{CaCO}_3$ ) e uma solução média, conforme descrições do estudo (CHEN *et al.*, 2022). O processo combinado forneceu uma eficiência de remoção de ureia maior do que 99,5%, mesmo com concentração afluente de ureia de 1600 mg/L. No que tange à carga removida, alcançou-se alta remoção (1.5 kg N/( $\text{m}^3\cdot\text{d}$ )), eficiência de remoção de  $\text{NH}_4^+$  de 89,46% e de nitrogênio total de 77,09%.

Em Gorakhpur, estado do Uttar Pradesh - Índia, Verma e Daverey (2024) testaram experimentalmente a eficiência de remoção de nitrogênio de águas residuárias de ureia em um reator em batelada sequencial de biofilme (SBBR), com atividade anammox. O reator foi alimentado com o efluente real e efluente sintético composto por macro e micronutrientes necessários para promover o crescimento da biomassa. Os testes funcionam com concentração máxima de 400 mg/L de  $\text{NH}_4^+$  e mesmo recebendo concentrações variadas do substrato, a eficiência de remoção alcançada não foi inferior a 80%, sendo detectado enriquecimento de *Candidatus Kueneria*, aumentando de 41,69% para 48,11 %, enquanto *Nitrospira* diminuiu de 23,9 % para 1,24 %, e *Nitrosomonas* caiu de 4,32% para 0,01%.

### **3.12 Processo Anammox aplicado a efluentes de alta carga de nitrogênio diluídos com efluente anaeróbio proveniente de reator tratando esgoto doméstico**

O emprego do processo anammox no tratamento de efluentes da indústria de fertilizantes químicos torna-se uma preocupação na medida que estes efluentes podem conter ácidos, alcoóis, metais pesados, nutrientes, sólidos suspensos e dissolvidos (AFFONSO *et al.*, 2020; BHANDARI; SOROKHAIBAM; RANADE, 2016; WARMADEWANTHI, IKLAS, DAMAYANTI, 2023) e serem tóxicos ou mesmo fatores de inibição para o processo anammox. Al-Harashsheh *et al.* (2014) mencionaram a geração de distintos íons em efluente da produção de fertilizante fosfatado, como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^+$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ , e  $\text{SO}_4^{2-}$ , além de ácidos como HF,  $\text{H}_2\text{SiF}_6$ ,  $\text{H}_3\text{PO}$ .

A análise dos fatores inibitórios na atividade das bactérias anammox não deve restringir-se ou mesmo justificar-se, apenas pelas concentrações dos compostos nitrogenados (Tabela 3.4), visto que o efluente pode conter outros compostos tóxicos a este grupo microbiano. Nos últimos vinte anos, várias pesquisas tem direcionado os esforços para a identificação de inibidores potenciais da atividade anammox em efluentes industriais e domésticos e estratégias de reduzir ou reverter os efeitos tóxicos. Madeira e Araújo (2021) apresentaram um compilado de estudos que reportaram o efeito inibitório de diferentes poluentes em efluentes domésticos e industriais na atividade anammox: antibióticos, poluentes aromáticos, surfactantes, microplásticos, solventes orgânicos, substâncias húmicas, matéria orgânica biodegradável, nanopartículas metálicas e metais. A Tabela 3.6 faz um recorte desta revisão, indicando os efeitos observados.

Tabela 3.6 - Compostos com efeitos inibitórios na atividade anammox

(continua)

Tipo de Poluente	Tipo de Reator	Inóculo	Bacteria Anammox	Composição	Concentrações testadas	Efeitos	Referências
Antibiótico	Reator UASB	Lodo granular <i>anammox</i> enriquecido de reator UASB	<i>Ca. Kueningia</i>	Oxitetraciclina	2 mg/L	A exposição a longo prazo levou a uma menor abundância e diversidade de bactérias anammox nos reatores. A presença dos genes de resistência a antibióticos tetC, tetG, tetX e intl1 aumentou a resistência do lodo <i>anammox</i> à oxitetraciclina. A bioaugmentação levou a uma recuperação acelerada do desempenho.	Zhang <i>et al.</i> (2019)
Antibiótico	Reator UASB	Lodo granular <i>anammox</i> enriquecido de reator UASB	<i>Ca. Kueningia stuttgartensis</i>	Tetraciclina	0,1 a 1,5 mg/L	Concentrações de 1 mg/L e superiores diminuíram a taxa de remoção de nitrogênio. Os efeitos inibitórios foram revertidos em 10 dias. Genes de resistência a antibióticos foram desenvolvidos.	Fan <i>et al.</i> (2019)
Antibiótico	Reator UASB	Lodo granular <i>anammox</i> enriquecido	<i>Ca. Kueningia</i>	Estreptomicina Espiramicina	1 a 50 mg/L 1 a 5 mg/L	A estreptomicina teve efeitos inibitórios baixos e observou-se o aumento de múltiplos ARGs. Inibição significativa com 3 mg/L de espiramicina. Ambos os antibióticos reduziram a diversidade e riqueza da comunidade microbiana.	Zhang <i>et al.</i> , (2020)
Antibiótico	Reator em batelada e UASB	Lodo granular <i>anammox</i> enriquecido de reator UASB	<i>Ca. Kueningia</i>	Spiramicina Estreptomicina	0,5 a 5,0 mg/L para teste de longo prazo 5,0 a 50,0 mg/L para teste de longo prazo	A eficiência de remoção de nitrogênio diminuiu drasticamente em 5 mg/L. A aclimação ajudou as bactérias anammox a obter resistência ao antibiótico. IC <sub>50</sub> = 256 mg/L no teste de curto prazo. A eficiência de remoção de nitrogênio diminuiu drasticamente em 50 mg/L. A aclimação ajudou as bactérias anammox a ganhar resistência ao antibiótico. IC <sub>50</sub> = 2096 mg/L no teste de curto prazo.	Lu <i>et al.</i> (2021)

(continua)

Tipo de Poluente	Tipo de Reator	Inóculo	Bacteria Anammox	Composição	Concentrações testadas	Efeitos	Referências
Orgânico	Reatores em batelada e colunas de fluxo contínuo.	Lodo granular <i>anammox</i> enriquecido de UASB	Não se aplica	Quinolina	5 a 100 mg/L para teste de curto prazo, 5 mg/L para teste de longo prazo.	IC <sub>50</sub> =13,07 mg/L para teste de curto prazo. Reatores de fluxo contínuo mostraram que a aclimatação aumentou a resistência das bactérias <i>anammox</i> à quinolina.	Chen <i>et al.</i> (2019)
Orgânico	Reator em batelada	Lodo floculento <i>anammox</i> enriquecido de reator UASB	<i>Ca. Kueneria</i> , <i>Ca. Brocadia</i>	Fenol	20 a 250 mg/L	Inibição da remoção de amônio a 20 mg/L de DQO.	Chen <i>et al.</i> (2020b)
Orgânico	Reator UASB	Lodo granular <i>anammox</i> enriquecido em reator de fluxo contínuo	<i>Ca. Kueneria</i>	Sulfonato de benzeno de dodecil sulfato de sódio	1 a 10 mg/L	Deterioração do desempenho do reator em exposição de longo prazo a >5 mg/L devido à desagregação do lodo e inibição metabólica.	Zhang <i>et al.</i> (2021c)
Orgânico	Reator em batelada	Lodo granular <i>anammox</i> enriquecido em reator anaeróbico compartimentado	<i>Ca. Brocadia</i>	Polibutileno succinato (PBS)	100 e 500 mg/L	A exposição ao PBS teve um efeito muito baixo nas taxas de remoção de amônio e nitrito. No entanto, alterou a composição do lodo, diminuindo sua viscosidade.	Tang <i>et al.</i> (2021)
				Policloreto de vinila (PVC)	100 e 500 mg/L	Concentrações de 100 e 500 mg/L reduziram ligeiramente a remoção de amônio, enquanto a remoção de nitrito foi altamente inibida.	
Orgânico biodegradável	Reator em batelada	Lodo <i>anammox</i> enriquecido	<i>Ca. Kueneria stuttgartiensis</i> , <i>Ca. Brocadia anammoxidans</i> , <i>Ca. Brocadia fulgida</i>	Ácido húmico	50 a 200 mg/L	Concentrações >100 mg/L causaram inibição significativa da atividade <i>anammox</i> em experimentos tanto de curto quanto de longo prazo.	Kraiem <i>et al.</i> (2019)

(continua)

Tipo de Poluente	Tipo de Reator	Inóculo	Bacteria Anammox	Composição	Concentrações testadas	Efeitos	Referências
Orgânico biodegradável	Reator em batelada	Lodo floculento enriquecido de <i>anammox</i> de reator UASB	<i>Ca. Jettenia</i> , <i>Ca. Brocadia</i>	Glucose Ácido acético Acetato de Sódio Metanol	20 a 250 mg/L 20 a 250 mg/L 20 a 250 mg/L 20 a 250 mg/L	Remoção mais alta de nitrito. Remoção mais alta de nitrito. Remoção mais alta de nitrito. Inibição da remoção de amônio em 150 mg/L de DQO.	Chen <i>et al.</i> (2020b)
Orgânico biodegradável	Reator UASB	Lodo enriquecido de <i>anammox</i>	<i>Ca. Jettenia</i> , <i>Ca. Kueningenia</i>	Ácido fúlvico	25,2 a 80,3 mg/L	A atividade <i>anammox</i> foi inibida em concentrações mais altas (72-80 mg/L), enquanto a remoção total de nitrogênio aumentou em concentrações mais baixas (25-65 mg/L). A inibição foi reversível.	Zhang <i>et al.</i> (2020)
Orgânico biodegradável	Reator de fluxo contínuo com suportes de gel <i>anammox</i>	Lodo <i>anammox</i> enriquecido de reator de leito fixo preenchido com suportes de tecido não tecido	<i>Ca. Jettenia asiatica</i> ou <i>Ca. Jettenia caeni</i> , <i>Ca. Kueningenia stuttgartiensis</i>	Metanol	5 a 40 mg/L	A atividade <i>anammox</i> foi mantida a 20 mg/L e inibida de forma irreversível a 40 mg/L. Com um aumento gradual na concentração de metanol, nenhum efeito inibitório foi observado, mesmo a 100 mg/L.	Isaka <i>et al.</i> (2021)
Metais pesados	Filtro biológico ascendente	Biofilme <i>anammox</i> enriquecido	Não se aplica	Fe (II)	0,0 a 378,6 mg/L	A atividade <i>anammox</i> foi impactada em 109,3 mg/L e completamente inibida em 378,6 mg/L de Fe (II). A lavagem com EDTA-2Na teve um impacto limitado na recuperação do <i>anammox</i> , enquanto a adição de betaína acelerou o processo de recuperação.	Li <i>et al.</i> (2020a)

(conclusão)

Tipo de Poluente	Tipo de Reator	Inóculo	Bacteria Anammox	Composição	Concentrações testadas	Efeitos	Referências
Metais pesados	Reator em batelada	Biomassa <i>anammox</i> enriquecida de SBR tratando água real de rejeito	Não se aplica	Zn (II) Cu (II) Ni (II)	0,4 a 0,8 mg/L 0,0375 a 0,225 mg/L 0,02 a 0,12 mg/L	Concentrações mais baixas dos três metais combinados não afetaram o desempenho do reator. Em concentrações mais altas, observou-se uma inibição significativa. Aumentar as concentrações de Cu e Ni sem adição de Zn não afetou o desempenho da remoção de nitrogênio, indicando alta toxicidade do Zn.	Gutwinski <i>et al.</i> (2021)
Metais pesados	Reator em batelada	Lodo <i>anammox</i> enriquecido de reator UASB	Não se aplica	Cd (II) Pb (II) Cr (II) As (II)	0,001 a 0,006 mg/L 0,025 a 0,15 mg/L 0,0625 a 0,375 mg/L 0 a 500 mg/L	A combinação dos três metais não causou inibição significativa da atividade <i>anammox</i> . O IC <sub>50</sub> foi de 41,97 mg/L para lodo sem EPS e 408 mg/L para lodo contendo EPS (testes de curto prazo). O As (III) foi encontrado principalmente ligado a compostos proteicos do EPS, levando a um estado mais solto.	Ma <i>et al.</i> (2021)
Metais pesados	Reatores em batelada e UASB	Lodo <i>anammox</i> enriquecido de reator UASB	<i>Ca. Kueneenia</i> , <i>Ca. Brocadia</i>	Cu	0 a 10 mg/L para testes de curto prazo, 0,1 a 8 mg/L para testes de longo prazo,	IC <sub>50</sub> = 4,6 mg/L (teste de curto prazo). No experimento de longo prazo, a concentração de Cu foi gradualmente aumentada, e uma redução severa da atividade <i>anammox</i> foi observada em 6 mg/L. <i>Ca. Brocadia</i> foi completamente removido em concentrações elevadas de Cu, enquanto <i>Ca. Kueneenia</i> permaneceu no reator.	Aktan <i>et al.</i> (2021)
Metais pesados	Reator em batelada	Lodo <i>anammox</i> enriquecido de reator UASB	<i>Ca. Brocadia</i>	Cr (VI)	0 a 32 mg/L	IC <sub>50</sub> = 6,8 mg/L (teste de curto prazo). A adição de hidrazina causou a redução de Cr(VI) para Cr(III), melhorando o desempenho do reator.	Feng <i>et al.</i> (2021)

As autoras propõem como estratégias para melhorar a performance da biomassa anammox submetida a condições de inibição por poluentes orgânicos uma menor adição do substrato, a bioaugmentação, o tratamento adicional para remoção do poluente e a dessorção do poluente por meio da lavagem da biomassa. Para o caso de inibição por metais ou nanopartículas metálicas, a bioaugmentação ainda é uma alternativa, assim como a baixa adição da concentração de metais, como Cu, Fe e Mn.

Sobre os efluentes da indústria de fertilizantes de alta carga de nitrogênio Wang *et al.* (2024a) investigaram a diferença na comunidade microbiana de quatro estações de tratamento de efluente da indústria de fertilizante nitrogenado, na China. As quatro estações possuem diferentes localidades e processos biológicos empregados. Contudo, mesmo projetadas para tratar águas residuárias contendo altas concentrações de nitrogênio, são identificados nos produtos; além de compostos nitrogenados, o éter dimetílico, o enxofre, a glicerina e o metanol. O último, por exemplo, é visto como fator inibitório para as bactérias Anammox (CHEN *et al.* 2024; MADEIRA; ARAÚJO, 2021).

Alternativas que evitem o efeito inibitório dos compostos nitrogenados e de outros potenciais poluentes tóxicos desconhecidos deste efluente, na atividade anammox, devem ser pensadas. Logo, a redução da concentração por meio da diluição do efluente da indústria de fertilizantes nitrogenados torna-se atrativa. Contudo, o processo perde seu caráter sustentável e de uso racional de recurso hídrico, se volumes excessivos de água limpa forem requeridos para diluir o efluente de fertilizante nitrogenado. Assim, a sua diluição em efluente doméstico é vista como uma boa estratégia.

Além de aumentar a biodegradabilidade da mistura e mitigar a toxicidade dos poluentes orgânicos em altas concentrações, como posto por Brennan *et al.* (2017), a diluição permite o co-tratamento dos efluentes. Estudos utilizando o processo Anammox ou de NP/A demonstraram viabilidade na diluição de efluentes de alta carga de nitrogênio em efluente doméstico (ZHANG *et al.* 2021b; WU *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2015).

Fernandes (2023) avaliou o desempenho do processo de NP/A no co-tratamento de lixiviado maduro e efluente anaeróbio doméstico sob 4 (quatro) diferentes diluições e estratégias de aeração, em RBS de mistura completa, alcançando nas Fases I, II, III, e IV, respectivamente, eficiência de remoção de nitrogênio total de 89,7%, 89%, 90% e 71 %. Também consolidou, por meio de seu experimento e de uma robusta revisão bibliográfica, a assertiva de que esgoto doméstico e lixiviado maduro é a principal combinação de diluição testada em estudos experimentais, podendo alcançar resultados satisfatórios.

Em caráter inovador, Spelman *et al.* (2024) propuseram o co-tratamento de drenagem ácida de mina com efluente doméstico, em RBS em escala de bancada, e demonstraram que o co-tratamento permitiu o tratamento do primeiro sem impactar negativamente no desempenho do tratamento por processos biológicos do segundo e sem impactos na diversidade microbiana.

Como posto na Tabela 3.5 foi testemunhado apenas um experimento na literatura com a utilização de um efluente real da indústria de fertilizantes nitrogenados, sob condições diretas de uso do processo anammox em RBS, para remoção de nitrogênio amoniacal. Contudo, ainda assim, favorecendo as condições de enriquecimento das bactérias adicionando outro efluente, no caso, sintético.

Frente à necessidade de maiores investigações sobre o tratamento de efluentes da produção de fertilizantes, em especial aos nitrogenados e, diante de perspectiva futura de implementação do processo Anammox, em escala plena e do potencial estratégico de diluição do efluente da indústria de fertilizantes em efluente anaeróbio doméstico, é importante avaliar as condições ideais e reais de funcionamento do sistema para que este viabilize a remoção de DQO, amônio e nitrito do efluente; em condições nas quais não se observe a inibição do processo Anammox. Até ao momento esta pesquisa mostra-se inédita frente às pesquisas desenvolvidas na área.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa, de cunho primordialmente experimental e quantitativo, foi realizada escala laboratorial, no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (DESA) da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), na linha de tratamento de águas residuárias, com a temática de Microbiologia Aplicada à Engenharia Sanitária. A seguir, apresentam-se as especificações técnicas e metodológicas do projeto.

### 4.1 Efluente utilizado na pesquisa

Para o desenvolvimento da pesquisa foram utilizados dois efluentes distintos, em diferentes condições de diluição para a remoção de N-amoniaco no reator RBS.

Foi utilizado o efluente anaeróbio advindo do reator UASB, que se destina ao tratamento de esgoto doméstico e está localizado no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento (CePTS/UFMG/COPASA), que se encontra na ETE Arrudas/COPASA. Primeiramente, o esgoto bruto passa por um tratamento preliminar na ETE e então uma parcela é direcionada para o reator piloto UASB, no qual foi coletado o efluente (semanalmente e armazenando-o a 4°C) para as diluições com o efluente de fertilizantes e posteriormente, operação das fases do reator RBS. Portanto, o efluente anaeróbio em questão foi utilizado como meio de diluição do efluente objeto do estudo (efluente da indústria de fertilizante nitrogenado).

Quanto aos seus parâmetros de projeto, o reator UASB possui 4,5 m<sup>2</sup> de área útil, 4,5 m de altura, 2 m de diâmetro interno, 14,2 m<sup>3</sup> de volume útil, dimensionado para equivaler a uma projeção populacional de 320 habitantes (per capita de esgoto igual a 125 L/hab.d) e tempo de detenção hidráulico (TDH) médio de 7,5 horas.

A Tabela 4.1 apresenta os principais parâmetros operacionais do reator UASB, definidas para sua operação, obtidos em pesquisas pretéritas com o mesmo reator.

**Tabela 4.1 - Condições operacionais do reator UASB**

<b>Parâmetro</b>	<b>Reator UASB Média (Desvio padrão)</b>
Tempo de detenção hidráulica - TDH (h)	10,17 (2,3)
Velocidade ascensional média (m.h <sup>-1</sup> )	0,47 (0,1)
Vazão afluyente (m <sup>3</sup> . h <sup>-1</sup> ) (vazão média)	1,43 (0,3)
Carga orgânica volumétrica (gDQO.m <sup>-3</sup> . dh <sup>-1</sup> )	41,53 (15)
Taxa de aplicação superficial (m <sup>3</sup> .m <sup>-2</sup> .d <sup>-1</sup> )	11,17 (2,7)

Fonte: Fernandes (2017, 2023).

O efluente da indústria de fertilizantes foi fornecido pela Oxi Ambiental S.A, empresa de São Paulo - Brasil, especializada em remediação ambiental *in-situ*, gerenciamento de áreas contaminadas, tratamento de efluentes industriais, amostragem de solo, água e efluentes e *brownfields*.

O efluente é originário de uma planta industrial de produção de fertilizantes, em Cubatão, no estado de São Paulo, que possui setor específico para a produção de fertilizantes nitrogenados (GANIT) e outro para os fosfatados (GAFOS). No que se refere a GANIT, esta é responsável pela produção de 3 (três) fertilizantes: nitrato de amônio, amônia e ácido nítrico. Durante o processo produtivo dos respectivos fertilizantes, há a limpeza de equipamentos como a lavagem dos filtros, torres, canais e vazamentos na rede, que compõem juntamente com a coleta da água pluvial e de lavagem dos pátios da planta industrial o “efluente da indústria de fertilizantes”.

O efluente da indústria de fertilizantes foi diluído com efluente anaeróbio doméstico. A diluição se justificou por distintos fatores, primeiramente, pelo pH alcalino do efluente da indústria de fertilizante a ser testado (pH = 10,8), que tende a causar inibição do processo anammox. Autores como Strous, Kuenen, Jetten (1999) e Jetten *et al.* (2009) enfatizaram que a faixa de pH ideal para a atividade anammox encontra-se entre 6,7 e 8,3. Faixas de pH fortemente ácidas ou fortemente básicas podem causar inibição completa do processo, pois podem favorecer a hidrólise da membrana celular e cessar processos metabólicos essenciais para as bactérias (SCHEEREN *et al.*, 2011).

Ademais, sabe-se que em pH próximo a 9,5, aproximadamente 50% da amônia está na forma de (AL) ou (NH<sub>3</sub>) e 50% na forma de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e em pH superior a 11, praticamente toda a amônia está na forma de NH<sub>3</sub> (VON SPERLING, 2014).

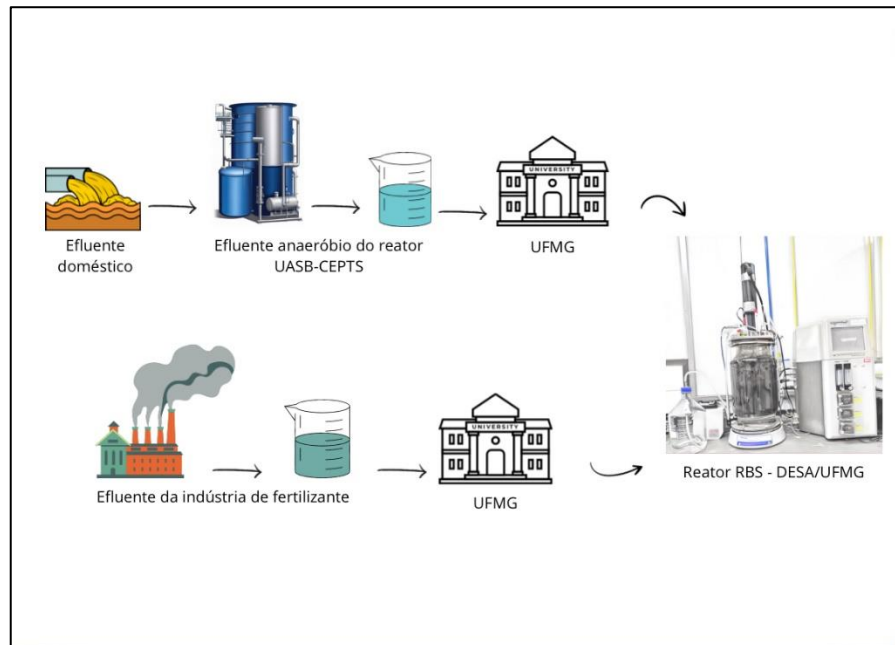
Considerando o pH e a concentração (mg/L) de amônia deste efluente (ver Tabela 4.3), acredita-se que mais de 50% da amônia esteja livre e, como elucidado no 3.10.4, poderia causar inibição das bactérias anammox.

De igual relevância para esta discussão, as altas cargas dos substratos amônia ( $\text{NH}_4^+$ ) e nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) em efluentes podem inibir o processo Anammox, como posto no item 3.10.6 e, portanto, a diluição proposta tende a diminuir a concentração destes compostos. Outra preocupação quanto ao emprego do processo anammox para tratamento de efluentes é a presença de compostos tóxicos, discutidos no item 3.11 e que podem gerar mecanismos de inibição na atividade anammox.

Frente a necessidade de se evitar efeitos inibitórios por compostos desconhecidos e, considerando a complexidade do efluente da indústria de fertilizante nitrogenado objeto deste estudo (Tabela 4.3) a diluição do efluente da indústria de fertilizante nitrogenado em efluente doméstico anaeróbio tornou-se uma boa estratégia operacional para redução da concentração de potenciais poluentes do efluente.

Reforça-se que estudos pretéritos utilizando o processo Anammox ou de NP/A demonstraram viabilidade na diluição de efluentes de alta carga de nitrogênio em efluente doméstico (ZHANG *et al.* 2021a; WU *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2015). A Figura 4.1 apresenta esquematicamente o fluxo de utilização e diluição dos efluentes utilizados no experimento. Cabe registrar que para esta pesquisa utilizou-se apenas 1 (um) lote de efluente da indústria de fertilizantes e para o efluente anaeróbio foram utilizados 5 (cinco), sendo realizadas, portanto, 5 caracterizações deste último.

**Figura 4.1 - Fluxo de chegada dos efluentes utilizados no experimento**



**Tabela 4.2 - Caracterização do efluente anaeróbio doméstico utilizado ao longo do estudo**

Parâmetros	Média (Desvio Padrão)
pH	6,70 (0,82)
Oxigênio Dissolvido (mg/L)	1,1 (1,14)
Temperatura (°C)	24,6 (1,3)
DQO (mg/L)	54,50 (20,12)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/L)	38,52 (14,89)
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	0,00
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	3,77
Alcalinidade (mg CaCO <sub>3</sub> /L)	209,23 (18,58)
DBO (mg/L)	116,37 (83,31)

**Tabela 4.3 - Caracterização do efluente da indústria de fertilizante nitrogenado**

Parâmetros	Média
Odor	Cheiro amoniacal altamente pungente
pH	10,32
Temperatura (°C)	25
DQO (mg/L)	1915,83
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/L)	10172,42
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	0,00
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	12,34
Alcalinidade (mg CaCO <sub>3</sub> /L)	25502,50

## 4.2 Reator em batelada sequencial

Utilizou-se para o experimento o fermentador de mistura completa, modelo *Benchtop Fermentor & Bioreactor BioFlo®/CelliGen® 115*, marca New Brunswick/Eppendorf. O reator possui 10 litros de volume útil de trabalho (Figura 4.2) e foi operado no modo batelada sequencial, sedimentação da biomassa e posterior retirada do sobrenadante.

**Figura 4.2 - RBS em escala de bancada – Laboratório de Microbiologia – DESA/UFMG**



O RBS é confeccionado de vidro, envolvido por uma jaqueta d'água que realiza a troca da água armazenada na parede externa para manter a temperatura desejada de operação. O reator possui sensores de nível para controlar o volume (entrada e saída) tanto de meio de cultura quanto de efluente, além de sondas que permitem medir o pH, temperatura e saturação de oxigênio (%). Adicionalmente, o RBS foi protegido de incidência luminosa para evitar o crescimento de algas em seu interior.

O RBS foi operado em condições anóxicas 5 (cinco) vezes por semana (segunda a sexta-feira) por um ciclo operacional de 24 horas (Tempo de Detenção Hidráulica – TDH de 48 horas), envolvendo 4 etapas: desligamento/sedimentação - I, retirada do efluente do ciclo anterior- II, alimentação – III e reação do reator-IV.

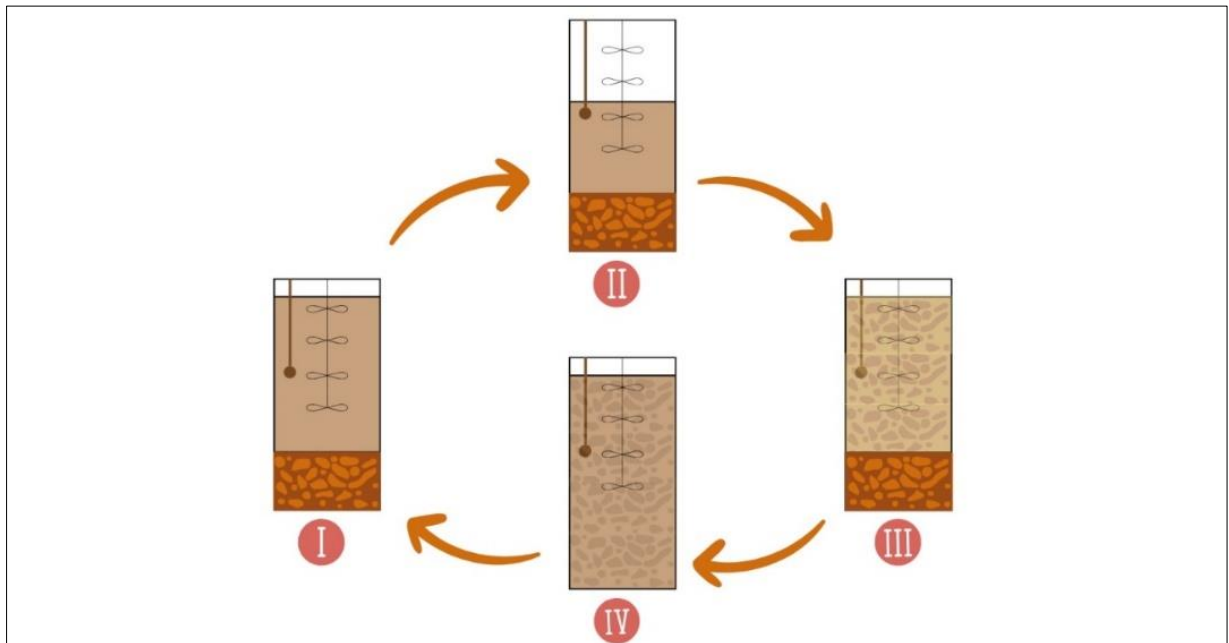
A primeira etapa consistiu na interrupção do ciclo anterior do reator, da aeração e da sua agitação, permitindo o descanso da biomassa para que esta não seja descartada junto do efluente. Após a sedimentação, é iniciada a retirada do sobrenadante por

meio do acionamento manual da mangueira de silicone do reator, que consistiu na retirada da sua pinça e em movimentos verticais pressionando-a, favorecendo a saída do efluente tratado biologicamente. Salienta-se que o efluente de entrada, assim como o de saída do RBS são armazenados em frascos shot de 5 litros e é retirado do reator todo o volume afluyente, correspondendo aos 5L do frasco.

Sobre a terceira etapa (alimentação) consistiu no acionamento da bomba externa (modelo Gilson) para entrada do novo efluente no reator, da aeração e da agitação e posteriormente. Após o acionamento do sistema ocorreu a reação e última etapa operacional, que possibilitou o contato do efluente com a biomassa do reator. A

Figura 4.3 apresenta as etapas supramencionadas de funcionamento do sistema.

**Figura 4.3 - Ciclo operacional do reator RBS**



Etapas operacionais do RBS: (i) Sedimentação, com desligamento da agitação para que a biomassa possa sedimentar no reator; (ii) saída do efluente, com desligamento da agitação e acionamento da bomba de saída; (iii) entrada do meio de cultura/ efluente da indústria de fertilizantes com as diferentes diluições no reator; (iv) período de reação, que ocorre até a interrupção para que um novo ciclo se inicie.

### 4.3 Enriquecimento de bactérias anammox

Quando do início das atividades experimentais, o reator em batelada sequencial já continha biomassa com atividade anammox, tendo em vista que o sistema foi previamente operado por Fernandes (2023), com inoculação de lodo proveniente da

linha de recirculação dos decantadores secundários da Estação de Tratamento de Esgoto do Ribeirão Arrudas (ETE-Arrudas) da Companhia de Saneamento de Minas Gerais (COPASA), em Belo Horizonte -MG. Após a operação do projeto anteriormente descrito, o reator foi utilizado para testes independentes utilizando lixiviado de aterro sanitário. Com o objetivo de remover as impurezas da biomassa, limpando quaisquer resquícios do referido efluente que porventura poderiam interferir no novo experimento e, visando a aclimação gradual do RBS para recebimento do efluente de fertilizante, realizou-se nova alimentação com meio de cultura por 267 dias.

Após as etapas de enriquecimento do RBS e aclimação, o RBS foi alimentado com efluente de fertilizante diluído com efluente doméstico do reator UASB, em fase preliminar, mantendo o TDH de 48 horas e temperatura de 35°C já utilizada anteriormente por Fernandes (2023).

A partir dos resultados observados da concentração de  $\text{NH}_4^+$  antes e após o tratamento biológico utilizando o RBS para os testes preliminares, observou-se possível inibição da atividade anammox, com aumento da concentração de  $\text{NH}_4^+$  e nitrito na saída do efluente tratado. Visando a bioaumentação das bactérias anammox, foi inserido novo meio de cultura no sistema, do dia 19 de dezembro de 2022 ao dia 10 de abril de 2023, todavia, os resultados apresentaram-se similares aqueles observados do teste com o efluente de fertilizante. Nesse sentido, optou-se pela reinoculação do reator RBS. A Tabela 4.4 apresenta o período de aclimação e testes experimentais do reator, levando a decisão de um novo período de *start up* do RBS.

**Tabela 4.4 – Concentração dos substratos no meio de cultura – aclimação**

Data de Operação	Concentração de substratos (mg/L)	
	N- $\text{NO}_2^-$	N- $\text{NH}_4^+$
09/11/22-20/11/22	120	90
21/11/22-04/12/22	<b>Testes preliminares com o efluente de fertilizante</b>	
19/12/22-30/12/22	120	90
03/01/23-12/02/23	60	50
13/02/23-26/02/23	30	30
27/03/23-10/04/23	30	0
-----	<b>Inoculação do reator</b>	

Em 10/04/2023, o RBS foi inoculado com lodo da linha de recirculação do sistema de lodos ativados, da Estação de Tratamento de Esgoto do Ribeirão Arrudas (ETE-Arrudas) da Companhia de Saneamento de Minas Gerais (COPASA), em Belo Horizonte - MG. Foram coletados 20 litros de lodo da linha de recirculação do sistema de lodos ativados e transportados ao laboratório. O lodo foi centrifugado a 10.000 rpm por 20 minutos nos dias 10 e 11/04/2023 e nesta transição, foi armazenado a 4°C. Após a centrifugação, adicionou-se a fração sólida ao meio de cultura mineral e autotrófico, em consonância com o preconizado por Dapena-Mora et al. (2004) e Van de Graaf et al. (1996), nas Tabela 4.5 e Tabela 4.6, respectivamente, visando o enriquecimento e o cultivo das bactérias com atividade anammox até atingir seu volume final de 10 litros, com concentração final de inóculo de 7,29 g STV.L<sup>-1</sup>.

**Tabela 4.5 – Composição do meio mineral autotrófico**

Componentes	Concentração (mg/L)
NH <sub>4</sub> Cl	Variável
NaNO <sub>2</sub>	Variável
KHCO <sub>3</sub>	500
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	27
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	180
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	300
Solução de Micronutrientes I	1,0 ml
Solução de Micronutrientes II	1,25 ml

**Tabela 4.6 – Composição das soluções de micronutrientes I e II**

Componentes	Micronutrientes I Concentração (mg/L)	Micronutrientes II Concentração (mg/L)
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	6250	15000
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	6250	-
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	-	430
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	-	240
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	-	990
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	-	250
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	-	220
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	-	190
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	-	80
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	-	14

Fonte: Dapena-Mora *et al.* 2004

Em virtude da elevada concentração inicial de sólidos no inóculo, adotou-se para o reator uma etapa reacional de aproximadamente 20,8 horas, visto a necessidade de um período de sedimentação prolongado, evitando a perda da biomassa durante a sua lavagem, sendo: 1 hora para a sedimentação, 0,17 horas para saída do efluente

e 2 horas para a entrada do efluente. Mesmo após observação da redução do teor de sólidos no efluente; conforme mencionado em estudos prévios por Fernandes (2017), Leal (2015) e Pereira (2013) que inocularam reatores do tipo RBS, com atividade anammox; manteve-se o período de sedimentação do reator, minimizando perdas da biomassa.

O período de enriquecimento do sistema ocorreu do dia 11/04/2023 a 02/01/2024, aumentando-se gradativamente as concentrações de nitrogênio amoniacal e nitrito visando o monitoramento da atividade anammox no reator. A Tabela 4.7 expõe os valores adotados durante esta fase. Após identificação de atividade anammox e estabilização do reator, foram viabilizados os testes com efluente real.

**Tabela 4.7 – Concentração dos substratos no meio de cultura - enriquecimento do reator**

Data de Operação	Concentração de substratos (mg/L)	
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
11/04/2023- 22/09/2023	45	30
25/09/2023 - 02/01/2024	70	55

#### 4.4 Planejamento Experimental

Realizou-se o *Start up* do reator, em 11 de abril de 2023, e posteriormente iniciou-se a fase de enriquecimento com o objetivo de selecionar e aumentar a comunidade de bactérias com atividade anammox. A

**Tabela 4.8** apresenta as fases do estudo desenvolvidas e os parâmetros avaliados.

Tabela 4.8 – Fases do estudo e respectivos parâmetros de análise

Étapas do RBS anammox	Temperatura (°C)	Data	Duração (dias)	Concentração em 5L (%)	Fator de diluição do efluente de fertilizante	Parâmetros ambientais de análise
Fase de Enriquecimento	35	11/04/2023 - 02/01/2024	267	Meio de cultura autotrófico	-	
Fase I	35	03/01/2024 - 01/03/2024	59	1% de efluente de fertilizante e 99% de efluente anaeróbio de UASB1	1:100	pH, oxigênio dissolvido, temperatura, DQO, DBO, NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , alcalinidade, análises microbiológicas
Fase II	35	02/03/2024 - 21/04/2024	51	2% de efluente de fertilizante e 98% de efluente anaeróbio de UASB	1:50	
Fase III	35	22/04/2024 - 17/05/2024	26	6% de efluente de fertilizante e 94% de efluente anaeróbio de UASB2	1:16,7	

#### 4.5 Métodos analíticos

As análises de sólido total, sólidos voláteis, nitrogênio amoniacal, nitrito, nitrato, demanda química de oxigênio, demanda bioquímica de oxigênio e alcalinidade foram realizadas utilizando metodologias consagradas no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012). No APÊNDICE A é apresentado o detalhamento das referidas análises.

<sup>1</sup> Para um frasco *schott* de 5L de mistura, utilizou-se 0,05 L de fertilizante e 4,95 L de efluente anaeróbio

<sup>2</sup> Para um frasco *schott* de 5L de mistura, utilizou-se 0,30 L de fertilizante e 4,70 L de efluente anaeróbio

A

Tabela 4.9 apresenta de forma resumida os parâmetros físico-químicos analisados, a unidade, princípio metodológico, frequência de amostragem e a importância das variáveis escolhidas para o monitoramento do sistema.

**Tabela 4.9 - Parâmetros de interesse da pesquisa**

<b>Parâmetros</b>	<b>Unidade</b>	<b>Metodologia</b>	<b>Frequência de Amostragem</b>	<b>Importância</b>
Temperatura	°C	Termométrico (RBS)	Diária	Estabilidade do sistema
pH	-	Potenciométrico (RBS)	Diária	Estabilidade do sistema e formação de NH <sub>3</sub> e HNO <sub>2</sub>
Alcalinidade	mgCaCO <sub>3</sub> /L	Titulométrico	2 vezes por semana	Intensidade da nitrificação
DQO	mg/L	Colorimétrico	3 vezes por Semana	Intensidade da atividade heterotrófica e estabilidade do sistema
DBO	mg/L	Oximétrico	1 vez por semana	
ST, STV	mg/L e g/L	Gravimétrico	Início do experimento e fim do experimento	Efeito da entrada de sólidos no desempenho do sistema
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	mg/L	Colorimétrico	Cinco vezes por semana	Eficiência de remoção de N, atividade de BOA
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	mg/L	Colorimétrico		Atividade de bactérias anammox, comammox e BON
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	mg/L	Colorimétrico		Eficiência de remoção de N e atividade de bactérias BON, anammox, comammox e desnitrificantes

Adaptado de Carvalho (2019).

#### 4.6 Investigação da comunidade microbiana

Foram coletadas amostras da biomassa para investigação da comunidade microbiana que esteve presente no RBS, sendo avaliada por meio de métodos moleculares. As amostragens ocorreram em distintos momentos de desenvolvimento do experimento, desde o *start up* do RBS até o final do experimento. Utilizando um coletor próprio, uma porção da biomassa foi removida do reator, durante o período de reação, no qual líquido e biomassa encontravam-se sob agitação contínua.

A Tabela 4.10 reflete os períodos de coleta da biomassa, assim como as técnicas de biologia molecular empregadas para a caracterização dos micro-organismos presentes no reator.

**Tabela 4.10 - Amostras coletadas para a investigação microbiana**

Identificação	Fase	Dia de Operação	Data	Amostras	Técnicas
1	Inóculo	0°	11/04/2023	Lodo ativado da linha recirculação - ETE Arrudas	
2	Enriquecimento – fase intermediária entre a inicial e a de propagação.	7°	20/06/2023	Após 70 dias de cultivo	
3	Enriquecimento – identificação de atividade anammox.	135°	24/08/2023	Biomassa após 35°C	Extração de DNA, PCR em tempo real e sequenciamento
4	Fim do enriquecimento	266°	02/01/2024	Biomassa após 35°C	
5	Fim da Fase 1	328°	04/03/2024	Biomassa após 35°C	

6	Período intermediário da Fase 2	363°	08/04/2024	Biomassa após 35°C
---	---------------------------------	------	------------	--------------------

Visando atender os prazos estipulados no cronograma de defesa do mestrado e, considerando o tempo necessário para a quantificação das bactérias pela técnica PCR, bem como da execução do Sequenciamento de Nova Geração, não foi possível avaliar a comunidade microbiana da Fase 3.

#### 4.6.1 Extração de DNA

As amostras (biomassa) foram submetidas a centrifugação (10000 rpm por 15 minutos) e lavadas três vezes consecutivas, após cada ciclo de centrifugação, com tampão fosfato-salino (PBS 1X, NaCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=7,2-7,4). Após a centrifugação, foram pesadas e armazenadas a -20°C, como preconizado em Garcia e Araújo (2010) e replicado por Leal (2015), Fernandes (2017), Carvalho (2019), Fernandes (2023).

Em seguida, o DNA genômico foi extraído a partir de 0,5 g de todas as amostras com o kit de extração *FastDNA™ SPIN Kit for Soil* (MP Biomedicals), conforme as instruções do fabricante. A fim de se verificar o resultado da extração, alíquotas de 2,0 µl de DNA extraído das amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,8% (75 volts, 35 minutos). O DNA foi quantificado em espectrofotômetro *Nanodrop 1000 (Thermo Scientific)*.

#### 4.6.2 Quantificação das bactérias do Ciclo do Nitrogênio pela técnica de PCR em tempo real

Para a estimar a concentração dos principais micro-organismos presentes nas amostras coletadas do RBS, foi realizada a técnica da PCR em tempo real (qPCR, *quantitative real-time polymerase chain reaction*, do inglês). As etapas utilizadas para a quantificação de bactérias nas amostras do RBS são descritas nos próximos itens.

#### Obtenção dos plasmídeos recombinantes para as curvas padrão de DNA

Plasmídeos recombinantes contendo genes específicos foram utilizados nas curvas padrão dos ensaios da PCR em tempo real. Os plasmídeos foram obtidos por meio de clonagem do produto da PCR em vetor plasmidial (kit pGem Easy Vector, Promega) e inseridos em células *E. coli* JM 109, seguindo instruções do fabricante. Os plasmídeos já se encontravam disponíveis no Laboratório de Microbiologia/DESA, uma vez que foram obtidos em pesquisas anteriormente realizadas por Mac Conell (2014).

Para o cálculo da massa do inserto, primeiramente calculou-se o número de cópias do plasmídeo com o inserto, considerando que a massa de 1 mol de par de bases (pb) possui 660g e que o número de moléculas em 1 mol é igual a  $6,02 \times 10^{23}$ , conforme descrito na Equação (4.1) (WHELAN *et al.*, 2003). A partir do resultado do cálculo descrito na Equação (4.1), obtém-se o número de cópias do inserto e dessa forma, pode-se calcular a quantidade de DNA do inserto utilizando a mesma equação, substituindo o tamanho do plasmídeo com o inserto, pelo tamanho do inserto.

$$C\acute{o}pias\ de\ DNA = \frac{6,02 \times 10^{23} (c\acute{o}pias/mol) \times quantidade\ de\ DNA\ (ng)}{Tamanho\ do\ DNA\ (pb) \times 6,6 \times 10^{11} (ng/mol/pb)} \quad (4.1)$$

Após a estimativa da quantidade em nanogramas (ng) de DNA do inserto foram realizadas diluições seriadas do DNA plasmidial em água ultrapura na proporção de 1:10 para o Domínio Bacteria, bactérias anammox, desnitrificantes e os gêneros *Nitrospira* e *Nitrobacter*. Alíquotas de 2,0µL de cada diluição foram adicionadas nas reações da PCR em tempo real, cujas curvas de amplificação foram utilizadas para elaboração da equação linear do experimento.

#### Preparo das reações para a realização da PCR em tempo real

Para as reações da PCR em tempo real utilizou-se o mix *PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix for qPCR* (Thermo Fisher Scientific). O SYBR® Green é um composto fluorescente amplamente utilizado em reações da PCR em tempo real, esse reagente se liga na fita dupla de DNA e emite fluorescência conforme acontece a reação da

PCR. Os reagentes utilizados na reação e suas respectivas concentrações estão detalhados na

Tabela 4.11 e os pares de iniciadores utilizados estão detalhados na Tabela 4.12. O volume final de cada reação foi igual a 20  $\mu$ L. As reações foram realizadas em triplicata, tanto para as amostras, quanto para os controles negativos e diluições das curvas padrão.

**Tabela 4.11 - Concentração dos reagentes utilizados na reação da PCR em tempo real, para um volume final de 20  $\mu$ L**

Reagente	Concentração do Estoque	Concentração final por reação	Volume por reação ( $\mu$ L)
Água ultrapura	-	-	7,5
Master Mix*	2X	1X	10
Iniciador 1	30 pmol/ $\mu$ L	375 nM	0,25
Iniciador 2	30 pmol/ $\mu$ L	375 nM	0,25
Amostra de DNA	variável	5 ng/ $\mu$ L	2,0

\* O Master Mix inclui o tampão da PCR, MgCl<sub>2</sub>, a enzima *Taq polimerase*, dNTPs, o corante SYBR Green e o corante de referência passiva ROX.

**Tabela 4.12 - Iniciadores (Primers) utilizados na reação da PCR em tempo real**

Primers	Grupo Alvo	Sequência (5'→3')	°C Anelamento	Referência
1055F	RNAr 16S	ATGGCTGTCGTCAGCT	53	FERRIS <i>et al.</i> , (1996)
1392R	Domínio Bacteria (337pb)	ACGGGCGGTGTGTAC		
Pla46F	<i>Planctomyces</i> e anammox (621pb)	GGATTAGGCATGCAAGTC	56	VAN DER STAR <i>et al.</i> (2007)
Amx 667 R		ACCAGAAGTTCCACTCTC		
nosZ F	Enzima óxido nitroso redutase de bactérias	CGYTGTTCMTCGACAGCCAG	55	ENWALL <i>et al.</i> (2005)
nosZ1622 R	Desnitrificantes (500pb)	CGSACCTTSTTGCCSTYGCG		
amoA-1F		GGGTTTCTACTGGTGG	57	

amoA-2R	Enzima amônia monoxigenase (amoA) de BOA (491 pb)	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC		Rotthauwe <i>et al.</i> (1997)
Nitro-1198F	RNAr 16S de Nitrobacter (397 pb)	ACCCCTAGCAAATCTCAAAA AACCG	58	Graham <i>et al.</i> (2007)
Nitro-1423R		CTTCACCCCAGTCGCTGACC		
NTSPAF	RNAr 16S de Nitrospira (151 pb)	CGCAACCCCTGCTTTTCAGT	60	Kindaichi <i>et al.</i> (2006)
NTSPAR		CGTTATCCTGGGCAGTCCTT		

A microplaca (96 poços) foi vedada com selante óptico e colocada em equipamento *7500 Real Time System (Applied Biosystems)*. O programa da PCR consistia em 40 ciclos de desnaturação por 1 minuto (94 °C), anelamento dos iniciadores por 1 minuto (temperatura de acordo com par, conforme especificado na Tabela 4.17) e extensão por 1 minuto (72 °C). O programa se encerrava com a elaboração da curva de *melting* ou de dissociação, útil para checar a pureza dos produtos amplificados, aparecendo-se apenas um pico no gráfico. Esta etapa consistia em 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C, 30 segundos a 95 °C e 15 segundos a 60 °C.

#### Determinação do número de cópias de genes dos grupos bacterianos

Para o cálculo do número de cópias dos genes por reação utilizou-se as equações da reta obtidas a partir das curvas padrão. A Tabela 4.13 apresenta as equações das curvas padrão e eficiências obtidas nos ensaios da PCR em tempo real realizados no presente estudo. Por meio da equação da reta, obteve-se a quantidade em nanogramas de DNA das amostras investigadas e por meio da Equação (4.7), determinou-se o número de cópias de DNA por reação, ou o número de cópias do gene por 5 ng de DNA (quantidade de DNA adicionada em cada reação). Posteriormente, estimou-se a quantidade em nanogramas de DNA extraído por grama de lodo.

**Tabela 4.13 - Equações das curvas padrão e eficiências dos ensaios da PCR em tempo real de quantificação absoluta**

Par de iniciadores	Eficiência (%)	r <sup>2</sup>	Valor Threshold	Equação da reta
1055F 1392R	105,77	0,992	0,017822	Y= -3,191x+32,758

Pla46F Amx 667 R	90,45	0,993	0,107387	$Y = -3,574X + 47,933$
NosZ F NosZ1622 R	110,7	0,99	0,917169	$Y = -3,012X + 50,378$
amoA-1F amoA-2R	106,38	0,993	0,248393	$Y = -2,676X + 40,731$
Nitro-1198F Nitro-1423R	103,76	0,989	0,255573	$Y = -3,235X + 42,903$
NTSPAF NTSPAR	111,53	0,992	0,29307	$Y = -2,611X + 39,666$

---

#### 4.6.3 Sequenciamento de Nova Geração

O DNA extraído das amostras foi enviado para sequenciamento genômico e este foi realizado pela empresa NGS Solutions, do município de Piracicaba, estado de São Paulo, Brasil, utilizando a técnica MiSeq (Illumina), seguindo as instruções do fabricante, com cobertura de 50.000 peired-end reads por amostra e 2x300pb. Foram utilizados os primers 515F-B (GTGYCAGCMGCCGCGGTAA) e 806R-B (GGACTACNVGGGTWTCTAAT) para amplificação e sequenciamento da região V4 do RNAr 16S de Archaea e Bacteria. A aplicação da técnica de Nested PCR foi necessária para amplificação das amostras. Assim, foram seguidas as seguintes etapas:

1. 1ª PCR- amplificação com primers 16S Universal  
Primer (27F e 1492R) a 10 µm
2. Purificação dos produtos da PCR com *beads ampure xp*
3. 2ª PCR - amplificação com os primers 16S V3V4  
Primer 16S V4 (515F-B e 806R-B) a 10 µm
4. Purificação dos produtos da PCR com *beads ampure xp*
5. 3ª PCR - ligação dos adaptadores (*nextera xt*)
6. Purificação da 3ª PCR com *beads ampure xp*
7. Normalização e pool das bibliotecas

Após a quantificação da 3ª PCR em *NanoDrop*, as bibliotecas foram normalizadas para uma mesma concentração. Foi realizado um pool equimolar com 5 µL de cada biblioteca. Esse pool foi quantificado por qPCR usando o kit *KAPA Library Quantification Kit* (Roche) para estimar a concentração do pool em nM (nanomolar) e assim fazer as diluições necessárias para o carregamento no equipamento Next seq 2000 em corridas 2x300pb.

#### **4.7 Análise estatística**

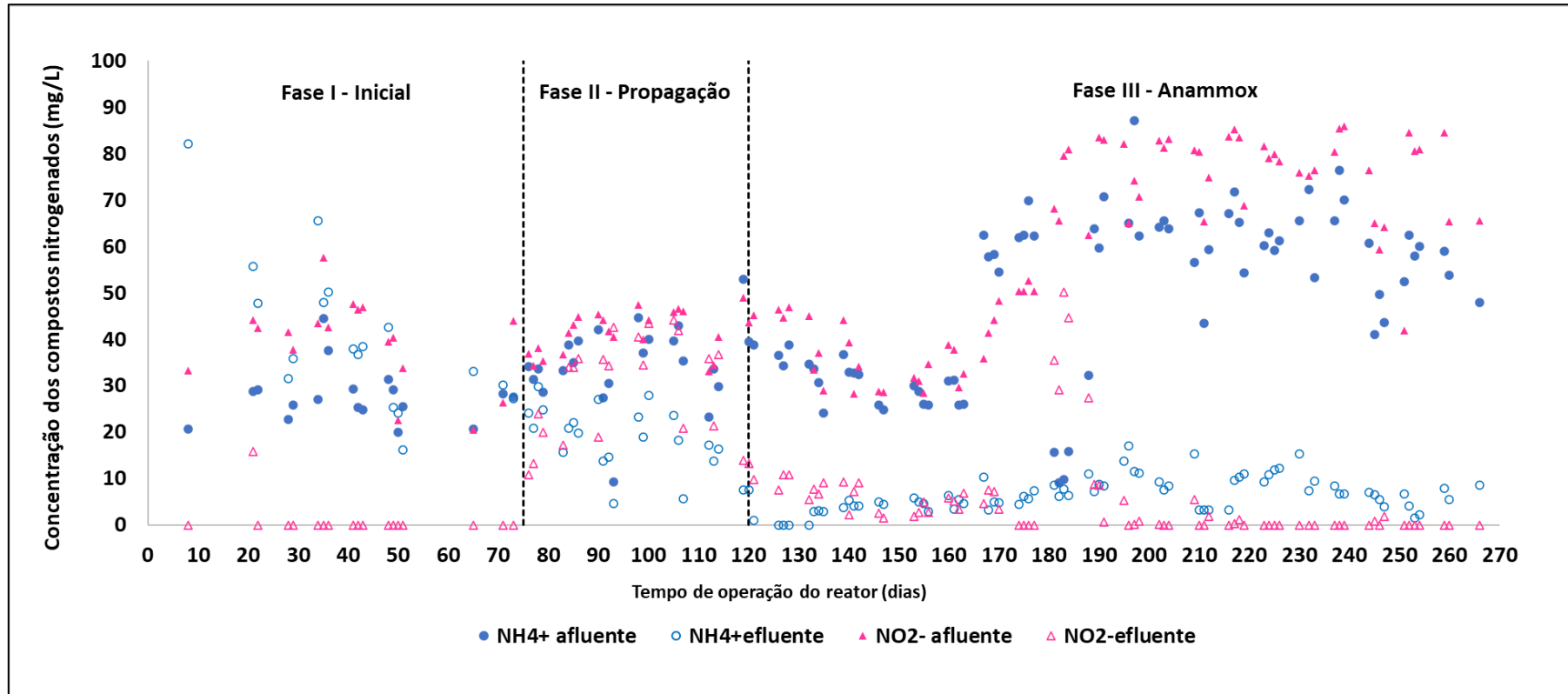
Para avaliar se as diluições testadas foram significativamente diferentes entre si em relação à eficiência de remoção dos compostos desejados, os resultados foram submetidos ao teste de normalidade (teste de *Shapiro-Wilk*). Posteriormente, os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e quando os tratamentos foram significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Para fins de análise dos dados, o delineamento experimental foi considerado inteiramente casualizado. Os testes foram executados no *software R*.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Etapa de enriquecimento**

O reator foi inoculado e monitorado desde abril de 2023, a fim de se verificar o crescimento e estabilidade das bactérias com atividade anammox, correspondendo a uma etapa enriquecimento do inóculo e desenvolvimento de atividade anammox antes do início dos testes com efluente real, conforme Tabela 4.7. O RBS foi mantido à temperatura de 35°C, e pH 7,5, realizando a correção deste parâmetro sempre que necessário, utilizando NaOH (0,5M) ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1N). Tais condições são consideradas ideais para o crescimento das bactérias com atividade anammox (STROUS *et al.*, 1999b). A partir do monitoramento realizado, foi possível observar a dinâmica dos compostos nitrogenados e a predominância das reações que ocorrem no RBS, conforme Figura 5.1.

Figura 5.1 - Dinâmica dos compostos nitrogenados durante o enriquecimento das bactérias anammox no RBS



Na etapa de enriquecimento do reator foram identificadas três fases: (I) fase inicial; (II) fase de propagação e (III) fase anammox. A fase inicial de operação foi marcada pelo consumo total de nitrito com aumento da concentração de nitrogênio amoniacal na saída do efluente sintético (meio de cultura), caracterizando reações de desnitrificação e amonificação, respectivamente, no reator.

As condições anaeróbias fornecidas ao sistema, juntamente com nitrito domeio de cultura, a disponibilidade de matéria orgânica advinda do inóculo e a morte e a lise das bactérias aeróbias do lodo, proporcionaram o processo de desnitrificação. Além disso, ocorreu a liberação de nitrogênio orgânico a partir das células mortas, que se converteu rapidamente em íon amônio e foi liberado, provocando o aumento da concentração de amônio observada no efluente durante a fase. Distintos estudos durante o período de enriquecimento de bactérias anammox em RBS com atividade anammox descreveram essa etapa (FERNANDES; 2017; PEREIRA, 2013; ARAÚJO *et al.*, 2011; DAPENA-MORA *et al.*, 2004; TOH & ASHBOLT, 2002).

Na fase de propagação das bactérias com atividade anammox (Fase II) observou-se diminuição da atividade desnitrificante, ocasionada possivelmente pela redução de compostos orgânicos presentes no meio, com detecção de nitrito no efluente a partir do 76º dia de operação. Também foi evidente a redução da amonificação, com a concentração de amônio afluente se equiparando à concentração efluente no RBS no 73º dia de operação. A redução da atividade das bactérias desnitrificantes heterotróficas pode ter impulsionado o estabelecimento das bactérias anammox, permitindo o início da segunda fase, visto que o primeiro grupo tende a competir com o segundo pelo mesmo aceptor de elétrons ( $\text{NO}_2^-$ ) (DÍAZ-JÚAN *et al.*, 2022; LI *et al.*, 2020; CHAMCHOI *et al.*, 2008).

A terceira fase do enriquecimento foi o período em que atividade anammox foi detectada no reator, identificada a partir do 120º dia de operação, marcada pelo consumo simultâneo de nitrogênio amoniacal e nitrito do meio de cultura em proporções estequiométricas semelhantes ao previsto na Equação 1.1 (a equação do consumo de nitrito e nitrogênio amoniacal de anammox).

Estudos pretéritos envolvendo reatores em batelada sequencial (escala de bancada), utilizando lodo ativado convencional como inóculo, encontraram distintos tempos para o início da atividade anammox. Campos (2011) e Pereira (2019) identificaram atividade Anammox após 90 dias de cultivo, para um reator RBS de 1,2 L e 2 L, respectivamente, enquanto Fernandes (2017), a partir do 82º dia de operação de um reator de 2L.

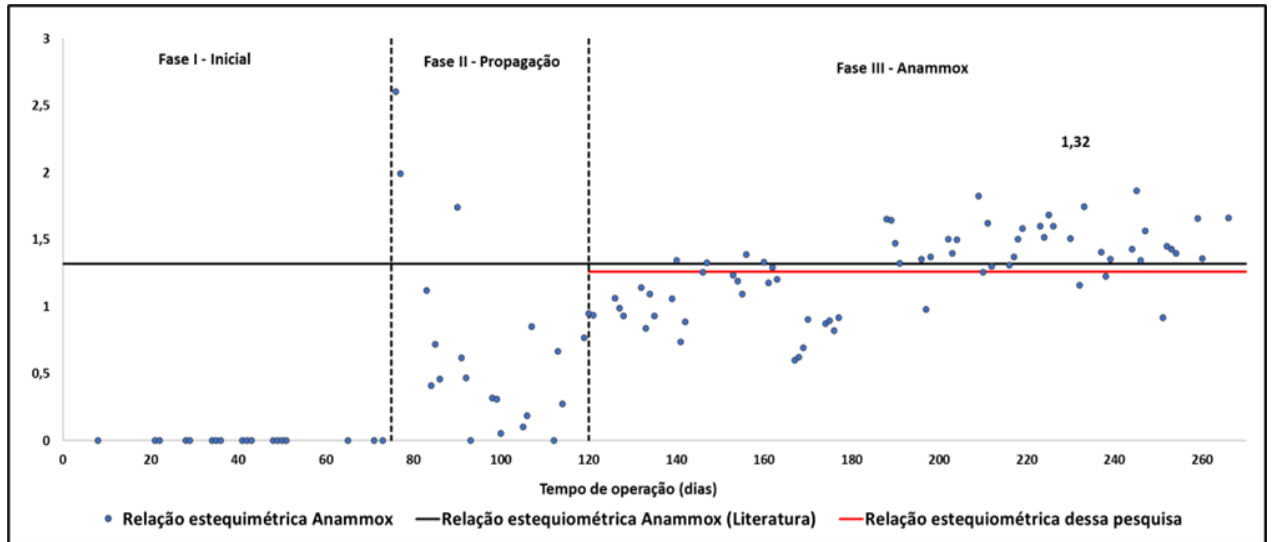
A variabilidade do tempo para obtenção da atividade anammox é notada em outras pesquisas, como em Chancoi e Nitsoravut (2007) que observaram atividade em 120 dias. Nota-se, portanto, uma faixa de 60 a 120 dias, estando esta pesquisa em consonância com a faixa identificada. Ressalta-se que o reator possui um volume útil de 10 L e foi operado com tempo de detenção hidráulica de 48 horas, havendo um ciclo operacional por dia. Esses fatores podem ter contribuído para que a atividade anammox fosse observada em período maior, comparado aos períodos mencionados em outras pesquisas.

O reator foi alimentado até o 163º dia de operação com meio de cultura nas concentrações de 30 mg/L<sup>-1</sup> e 45 mg/L<sup>-1</sup>, de nitrogênio amoniacal e nitrito, respectivamente. Observado o bom desempenho na remoção dos compostos nitrogenados no reator, a partir do 164º dia, a concentração dos compostos foi aumentada para 55 mg/L (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) e 70 mg/L (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), seguindo as proporções estequiométricas da reação anammox, a fim de favorecê-la. Tais concentrações foram mantidas até o último dia de enriquecimento (266º dia).

As relações estequiométricas obtidas entre os compostos nitrogenados durante a fase de enriquecimento são apresentadas na Figura 5.2. O coeficiente estequiométrico da reação representa a razão entre a concentração de nitrito consumido pela concentração de nitrogênio amoniacal consumida. Notou-se que durante a fase inicial o coeficiente foi nulo, como esperado, uma vez que o nitrito foi totalmente consumido pelo sistema que apresentava intensa desnitrificação.

No período de transição ou propagação, notadamente os coeficientes distanciaram-se do padrão estequiométrico almejado, indicando a redução da desnitrificação e consecutivo consumo de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> no sistema. A partir do 120º dia de operação, mesmo com oscilações, as proporções estequiométricas do reator aproximaram-se da estequiometria da reação anammox indicada na literatura (1,32 mol de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>:1 mol de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, STROUS *et al.*, 1998), revelando o bom desenvolvimento do processo anammox no reator, apresentando durante a Fase III o coeficiente médio de 1,27.

**Figura 5.2 - Coeficiente estequiométrico do consumo de nitrito/consumo de amônia**

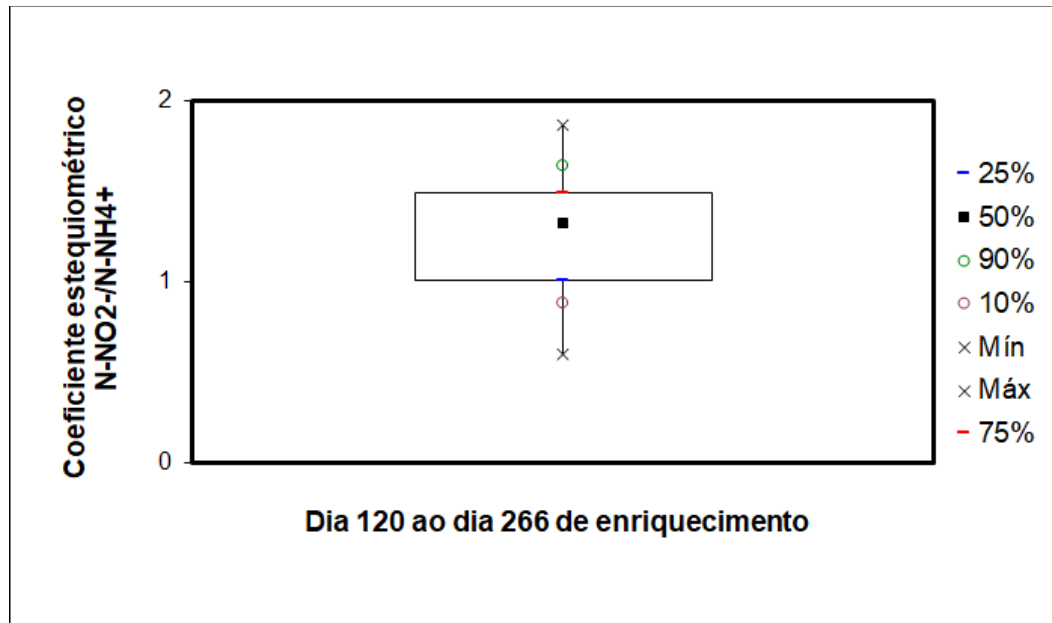


A estatística do coeficiente estequiométrico verificado na fase de enriquecimento é apresentada na Tabela 5.1 e Figura 5.3.

**Tabela 5.1 - Estatística descritiva do coeficiente estequiométrico obtido durante os dias 120 a 266 da etapa de enriquecimento**

<b>Consumo de nitrito/consumo de íon amônio</b>	
Nº de dados	70
Média	1,27
Desvio Padrão	0,30
Coefficiente de Variação	0,24
Mediana	1,33
Mínimo	0,60
Máximo	1,87
Percentil 10%	0,89
Percentil 25%	1,00
Percentil 75%	1,49
Percentil 90%	1,65

**Figura 5.3 - Box-plot do coeficiente estequiométrico Consumo de  $N-NO_2^-$  / Consumo de  $N-NH_4^+$  obtidos para o RBS durante os dias 120 e 266 da etapa de enriquecimento**

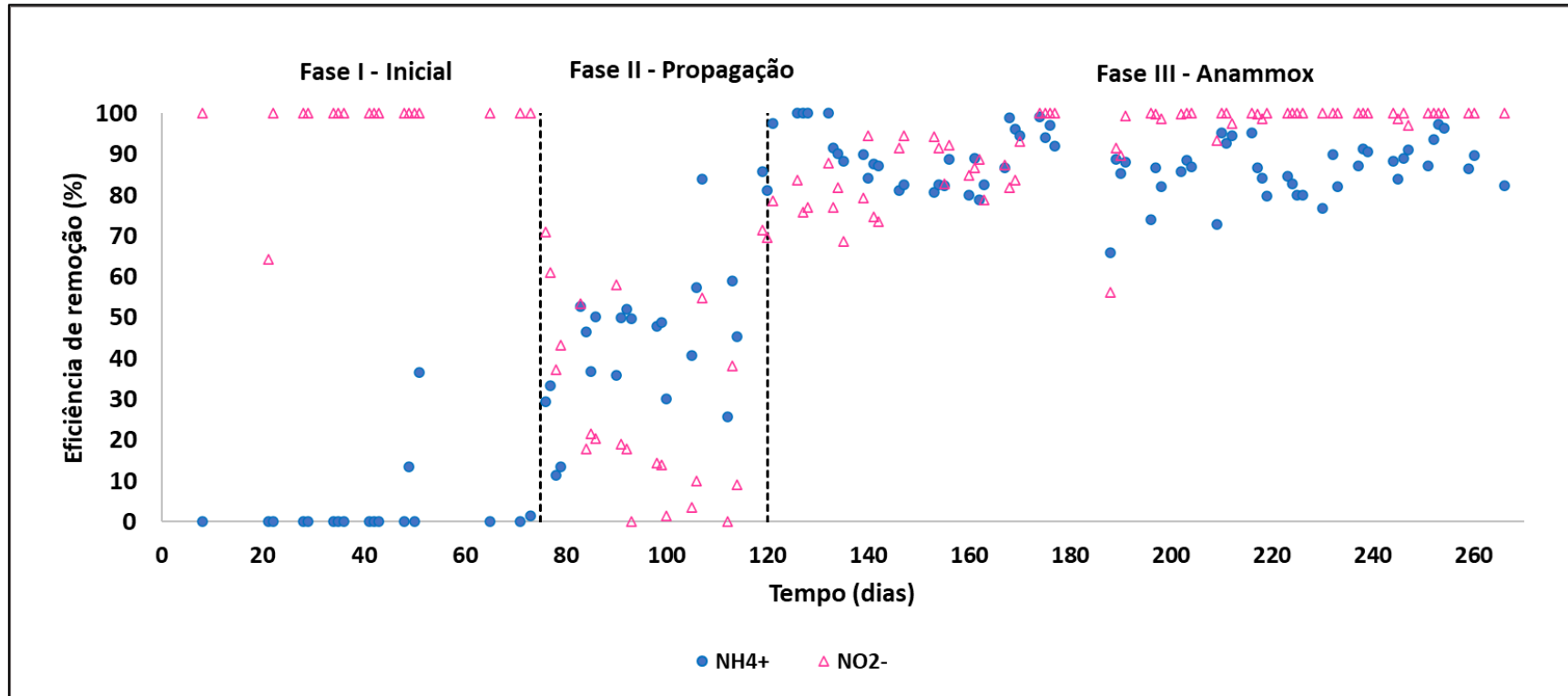


A média (1,27) e a mediana (1,33) apresentaram-se próximas, indicando uma distribuição com tendência à simetria dos dados. Campos (2011) enriqueceu bactérias anammox a partir de lodo proveniente de sistema de lodos ativados, alcançando, em RBS coeficientes de 1,26 (início da atividade anammox) e 1,11 (recuperação do processo anammox). Li *et al.* (2021a) alcançaram um coeficiente de 1,09 em reator em escala de bancada anaeróbio, anóxico, óxico, enriquecido com bactérias com atividade anammox, visando o tratamento de efluente municipal real. Os resultados observados nos estudos pretéritos e neste indicam maior presença de bactérias anammox se comparada com outros micro-organismos, uma vez identificado consumo semelhante de nitrogênio amoniacal e nitrito.

Já Fernandes (2017) reportou um coeficiente de 1,47, em RBS, ao avaliar o efeito da temperatura no processo anammox aplicado ao pós-tratamento de efluente de reator anaeróbio tratando esgoto doméstico. Resultados similares foram observados por Chamchoi e Nitorisravut (2007); com coeficiente igual a 1,5, em média; e por Quan *et al.* (2008); com coeficiente igual a 1,46; em um reator anaeróbio com atividade anammox. Para estes casos, acredita-se que outros micro-organismos além da bactéria anammox consumiram nitrito, mas, sem efeitos inibitórios.

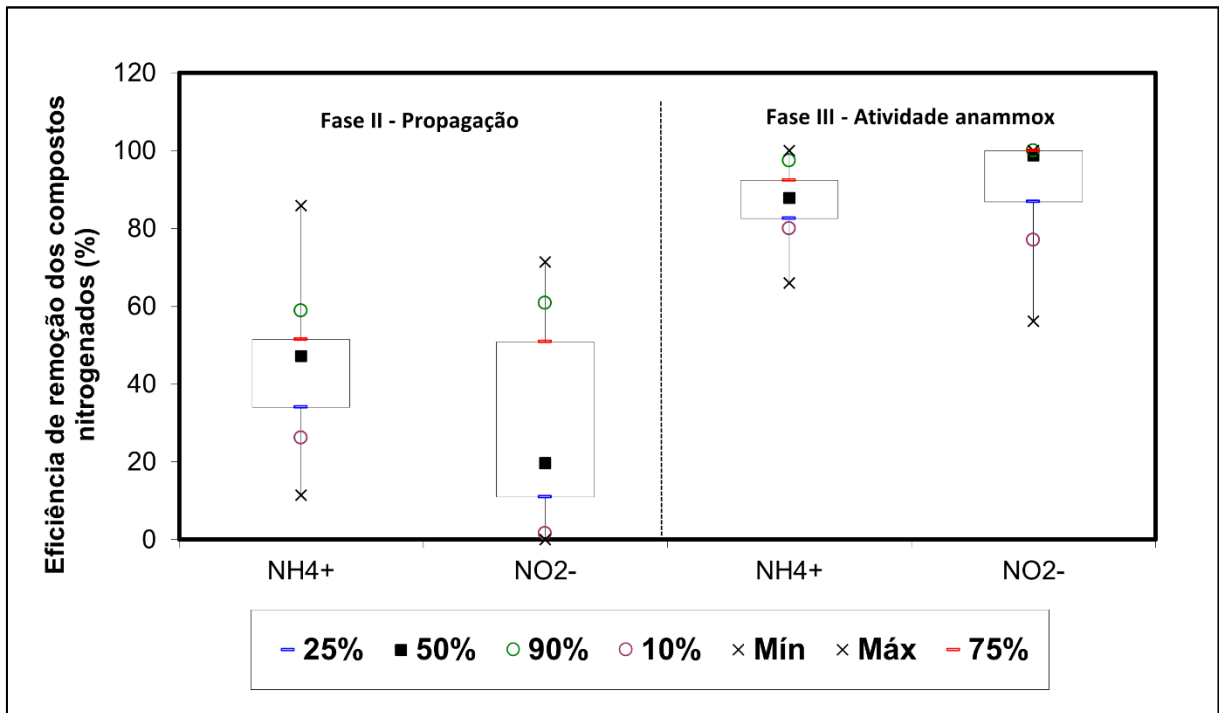
A Figura 5.4 apresenta a eficiência de remoção dos compostos nitrogenados ( $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_2^-$ ), notando-se fases bem definidas: Fase I - de consumo integral de nitrito; com eficiência de remoção de 100%; e, amonificação, com eficiência de remoção de 0%; Fase II – desnitrificação intensa; reduzindo a eficiência de remoção de nitrito e, redução da amonificação, aumentando sua eficiência de remoção; e Fase III – aumento das eficiências de remoção de ambos os compostos.

Figura 5.4 – Dinâmica de remoção dos compostos nitrogenados - enriquecimento



Notadamente, a Figura 5.5 demonstra estatisticamente a evolução da eficiência de remoção dos compostos nitrogenados ( $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_2^-$ ) entre as fases Fase II para a Fase III. Cumpre salientar que a Fase I não foi representada, visto que ao se avaliar os seus quartis (Q1, Q2 e Q3), estes corresponderam ao mesmo valor (Q1=Q2=Q3), com taxa de remoção inferiores a 5% ( $\text{NH}_4^+$ ) e 100% ( $\text{NO}_2^-$ ), como esperado, sendo mais bem representada a dinâmica desta fase na Figura 5.4.

Figura 5.5 - Eficiência de remoção dos compostos nitrogenados - enriquecimento



No que se refere a fase II observou-se que 90% dos resultados apresentaram taxa de remoção de nitrogênio amoniacal e nitrito inferiores a 58,8% e 60,8%, respectivamente. A eficiência de remoção dos compostos nitrogenados teve um salto de remoção na fase III, com percentis 90 de 97,41% e 100%, para NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, indicando bom desempenho do reator, mesmo com o aumento das concentrações do efluente sintético.

Desde a identificação da atividade anammox (120° dia), por 146 dias observou-se eficiência média de remoção de nitrogênio amoniacal e nitrito de 87,8% e 92,5%, motivando a partir do 267° dia a utilização do efluente real e dando início a Fase I da pesquisa.

Os dados de enriquecimento apresentados, portanto, demonstraram que a utilização de lodo da linha de recirculação de lodos ativados é idealmente adequada para cultivo e bioaugmentação da comunidade de bactérias com atividade anammox em reatores em batelada sequenciais, operados com pH neutro (7,2-7,6), a 35°C, e em meio mineral e autotrófico, aumentando-se gradualmente a carga de nitrogênio aplicada.

Vale lembrar que a concentração de sólidos totais voláteis (STV) inoculada foi de 7,29 g.L<sup>-1</sup> e ao final da Fase 2, identificou-se uma redução na concentração no RBS para

3,8 g.L<sup>-1</sup>. Dado o tempo de 267 dias de enriquecimento, acredita-se que microorganismos foram selecionados durante o período e outros naturalmente inibidos, frente às condições operacionais selecionadas para que o reator alcançasse atividade anammox.

## **5.2 Desempenho do reator anammox quando submetido à distintas diluições de efluente de fertilizante e efluente anaeróbio proveniente de reator UASB**

Para avaliar o desempenho do reator anammox tratando a mistura de efluente de fertilizante e efluente anaeróbio advindo de reator UASB, bem como a sua viabilidade de aplicação real, mesmo que em menor escala, o estudo dividiu-se em 3 fases operacionais: a) Fase 1: 1% de fertilizante e 99% de efluente anaeróbio; b) Fase 2: 2% de fertilizante e 98% de efluente anaeróbio; c) Fase 3: 6% de fertilizante e 94% de efluente anaeróbio, todas com suplementação de nitrito no reator.

Durante tais etapas manteve-se a temperatura de 35°C, a uma agitação de 50 rpm, e TDH de 48 horas com retenção total de biomassa. O pH do reator foi mantido entre 7,2 e 7,6 e corrigido com adição de ácido H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,5 M) ou base NaOH (0,5 M).

### **5.2.1 Fase 1 – Operação com adição de 1% de fertilizante**

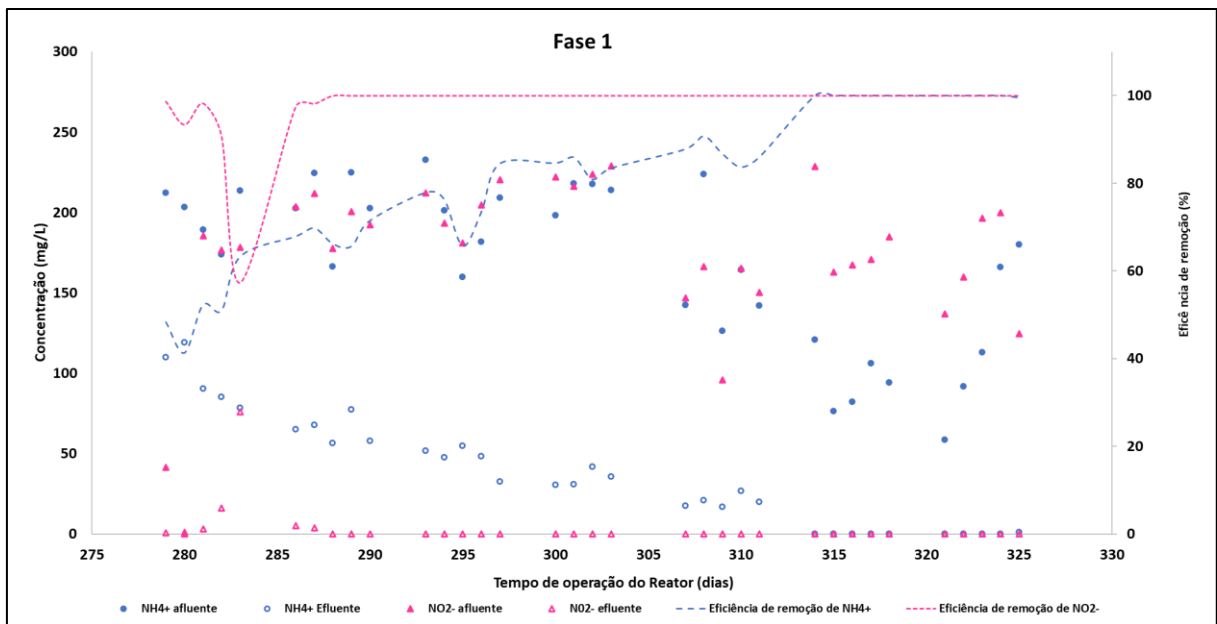
O período inicial da fase 1 foi marcado pela transição entre a aplicação do meio de cultura autotrófico, com concentrações finais utilizadas de 70 mg. L<sup>-1</sup> de nitrito e 55 mg. L<sup>-1</sup> de nitrogênio amoniacal para o efluente real, constituído da mistura de fertilizante (1%) e efluente anaeróbio (99%) e adição de 200 mg/L de nitrito.

Portanto, a fase 1 durou 59 dias, contudo, os dias 03 a 12 de janeiro foram considerados o intervalo de aclimatação do reator, sendo o comportamento do sistema avaliado a partir do 15º dia (dia 279), no qual observou-se o consumo de nitrogênio amoniacal e nitrito.

O perfil apresentado na Figura 5.6 reflete a concentração observada da série nitrogenada (nitrogênio amoniacal e nitrito), em função do tempo de operação do RBS. Notou-se um prejuízo inicial na remoção completa de amônia, devido à ausência de nitrito em quantidade suficiente para o completo consumo, que foi superado e verificada uma remoção integral com aumento gradual na concentração efluente de

amônia, a partir do dia 314. Na mesma perspectiva, a concentração de nitrito efluente aumentou. Considerando que a mistura fornecida ao sistema não possuía nitrito suficiente para favorecimento da reação anammox, foi adicionado ao reator solução concentrada em proporções estequiométricas de consumo das bactérias anammox, para concentração final de nitrito de 200 mg/L.

**Figura 5.6 - Dinâmica de remoção dos compostos nitrogenados da Fase 1**



Foi observada uma concentração média afluente de amônia de 168,6 mg/L e de 174,32 mg/L de nitrito. A concentração efluente foi de 37,36 mg/L e 3,09 mg/L, respectivamente. Assim, foi obtida na 1ª fase experimental uma eficiência média de remoção de amônia de 80,69 % e de 98,06 %, para nitrito, com efluente real da indústria de fertilizantes diluído cem vezes (1:100).

De fato, o efluente real aplicado na Fase 1 do experimento possui alta carga de nitrogênio amoniacal, e nesse sentido, a preocupação com as concentrações a serem aplicadas de nitrito são legítimas, uma vez que a alta concentração deste substrato pode inibir o crescimento do consórcio bacteriano anammox em uma ampla faixa (TALAN, TYAGI, DROGUI, 2021).

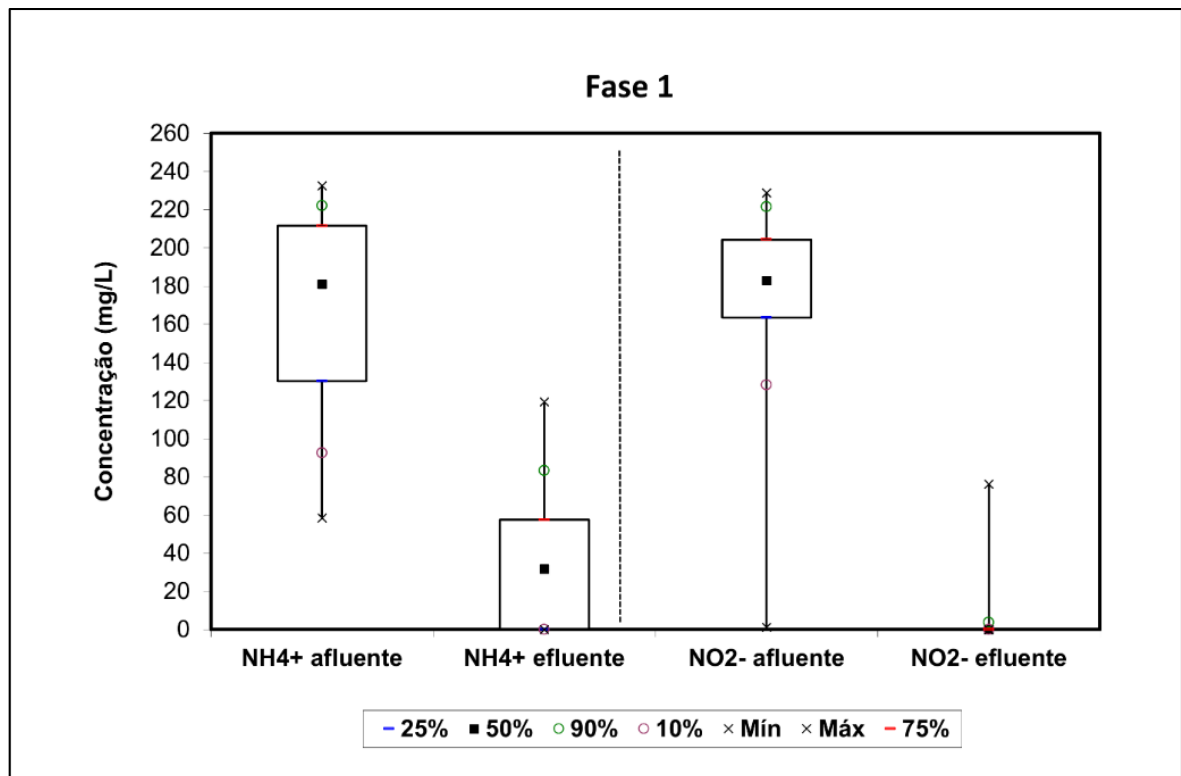
Reino *et al.* (2018) relataram que a atividade anammox é reduzida pela metade com alta concentração de nitrito (350 mg/L) enquanto nenhuma inibição foi verificada em valores superiores a 140 mg/L por Ma *et al.* (2016). Outro estudo indicou que nas

concentrações maiores que 280 mg/L de nitrito, acontece a completa inibição e nitrito (TANG *et al.*, 2011). Em geral, obteve-se comportamento satisfatório do RBS com atividade anammox ao longo da Fase 1, sem indícios de inibição com a evolução do tempo de operação.

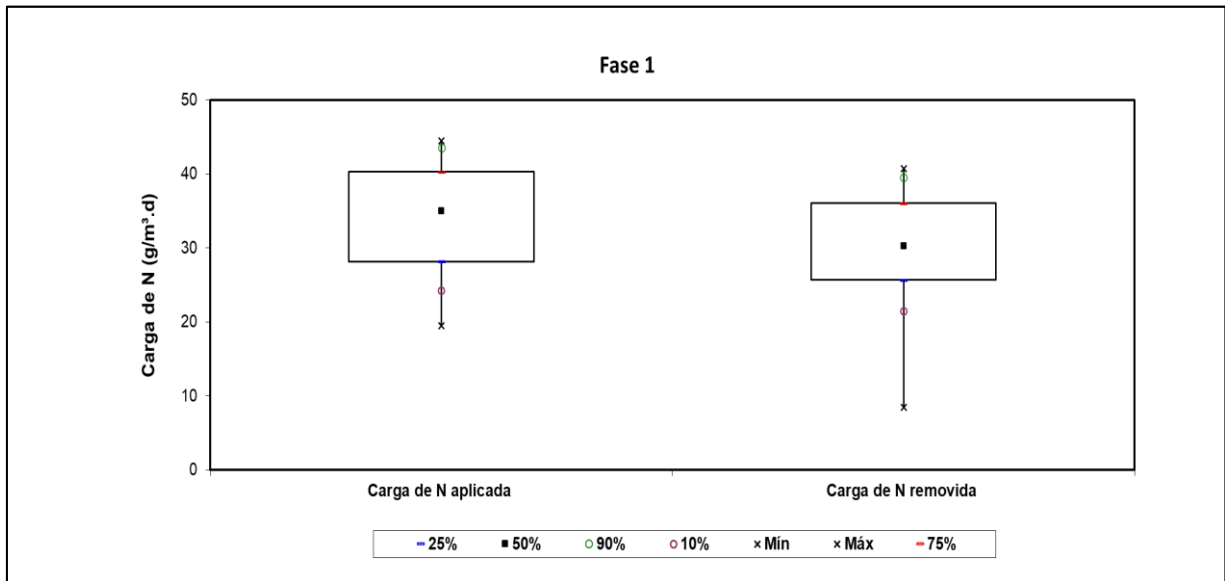
Acredita-se ainda que o momento de consumo integral de amônia foi retardado pela presença de bactérias heterotróficas que competem com as bactérias anammox pelo mesmo aceptor de elétrons, o nitrito (CHEN *et al.*, 2016). Ou ainda, por inibição de compostos tóxicos que podem existir no efluente da indústria de fertilizantes, que mesmo correspondendo a 1% na diluição da mistura, foi o maior contribuinte para a concentração de amônia no efluente final e nesse sentido, pode também contribuir com outros compostos (AFFONSO *et al.*, 2020).

As Figuras 5.7 e 5.8 apresentam as concentrações afluente e efluente de nitrogênio amoniacal e nitrito na Fase 1; conforme estatística descritiva; e a carga de nitrogênio total aplicada e removida do sistema (Tabela 5.2).

**Figura 5.7 - Concentrações afluente e efluente de amônia e nitrito - Fase 1**



**Figura 5.8 - Carga de nitrogênio total aplicada e removida no RBS– Fase 1**



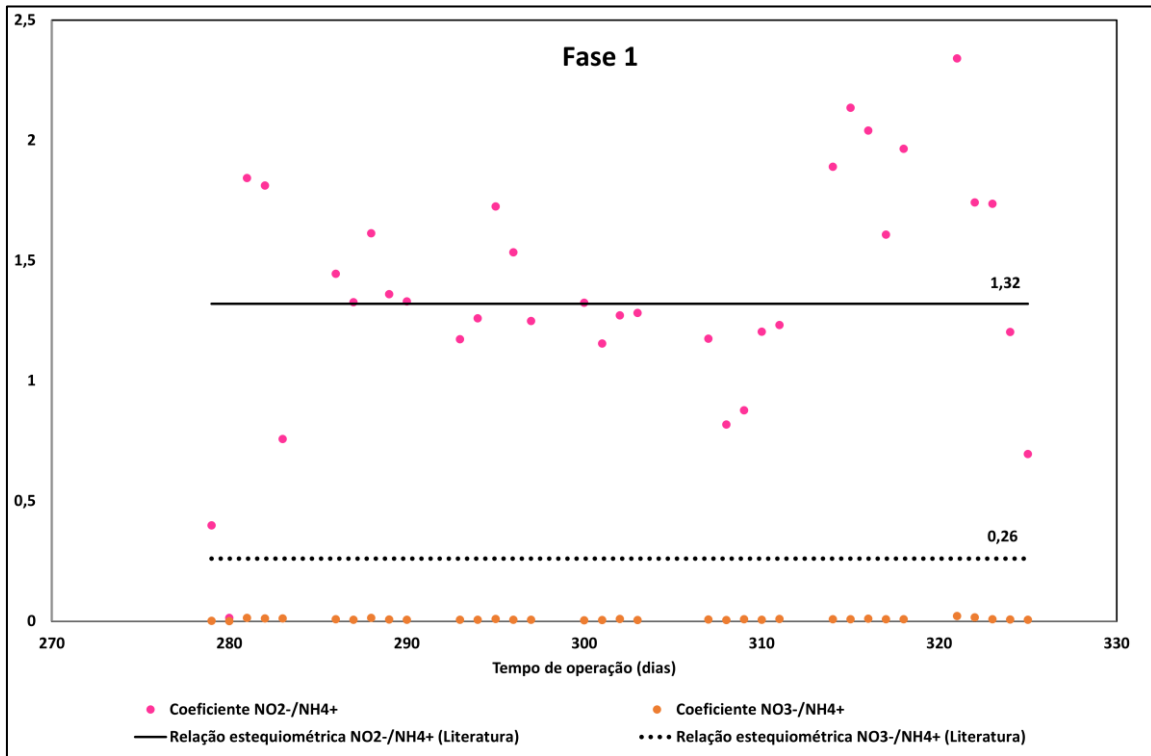
**Tabela 5.2 - Estatística descritiva da carga aplicada e removida durante a Fase 1 (1% de fertilizante e 99% de efluente anaeróbico de UASB)**

<b>Estatística descritiva – medidas de tendência central</b>	<b>Carga aplicada (gN/m<sup>3</sup>.d)</b>	<b>Carga removida (gN/m<sup>3</sup>.d)</b>
Nº de dados	34	34
Média	34,29	30,21
Desvio Padrão	7,65	7,62
Coefficiente de Variação	0,22	0,25
Mediana	34,99	30,31
Mínimo	19,53	8,50
Máximo	44,47	40,73
Percentil 10%	24,21	21,48
Percentil 25%	28,15	25,68
Percentil 75%	40,31	36,06
Percentil 90%	43,55	39,58

Obeve-se nesta pesquisa, em termos de nitrogênio amoniacal e nitrito, uma carga média aplicada de 34,29 gN/m<sup>3</sup>.d, sendo removida 30,21 gN/m<sup>3</sup>.d. A carga aplicada foi eficientemente removida, demonstrando adaptabilidade do RBS com atividade anammox a transição do efluente sintético autotrófico (meio de cultura) para o efluente misto (efluente de fertilizante e efluente doméstico anaeróbico), para esta fase.

As relações estequiométricas de consumo de nitrito e produção de nitrato por amônia foram monitoradas na Fase 1, conforme Figura 5.9.

**Figura 5.9 - Coeficiente estequiométrico de consumo de nitrito/consumo de amônia e produção de nitrato/consumo de amônio durante a fase 1**



O coeficiente médio de consumo de nitrito por consumo de amônia atingiu o valor de 1,37, próximo do valor da reação encontrado na literatura (1,32), demonstrando maior consumo de nitrito em relação ao nitrogênio amoniacal nesta fase, conforme Tabela 5.3. Enquanto o coeficiente médio de produção de nitrato por consumo de amônia alcançou o valor de 0,008, expressivamente menor do que o valor observado na literatura para a reação anammox (0,26), indicando baixa produção de nitrato.

**Tabela 5.3 - Estatística descritiva do coeficiente estequiométrico (NO<sub>2</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) obtido durante a Fase 1 (1% de fertilizante e 99% de efluente anaeróbio de UASB)**

<b>Estatística descritiva - Medidas de tendência central</b>	<b>Consumo de nitrito/consumo de íon amônio</b>	<b>Produção de nitrato/consumo de íon amônio</b>
Nº de dados	34	34
Média	1,37	0,008
Desvio Padrão	0,49	0,004
Coeficiente de Variação	0,24	0,522
Mediana	1,33	0,008
Mínimo	0,01	0,000
Máximo	2,34	0,022
Percentil 10%	0,78	0,005
Percentil 25%	1,18	0,005
Percentil 75%	1,73	0,009

---

Percentil 90%	1,94	0,013
---------------	------	-------

---

Estudos prévios utilizando RBS em escala laboratorial, como de Leal *et al.* (2016) verificaram um coeficiente de nitrito por amônia de 1,7, com efluente doméstico sendo aplicado a um RBS com atividade anammox. Para o mesmo estudo, os autores identificaram um coeficiente de nitrato por amônia de 0,2. Valores na mesma ordem de grandeza foram observados por Fernandes *et al.* (2018), alcançando os coeficientes de 1,92 e 0,37, respectivamente, tratando efluente doméstico em RBS. Pereira *et al.* (2019) reportou valores muito próximos da literatura, 1,33 e 0,26, alimentando um RBS de 10 L com digestato de resíduos alimentares.

O consumo de nitrito acima da relação estequiométrica das bactérias anammox e a baixa produção de nitrato apresentam indícios de outros processos metabólicos no processo. Chamchoi e Nitorisavut, (2007) afirmaram que coeficientes de produção de nitrato em relação ao consumo de amônia próximos a zero, são indícios de desnitrificação.

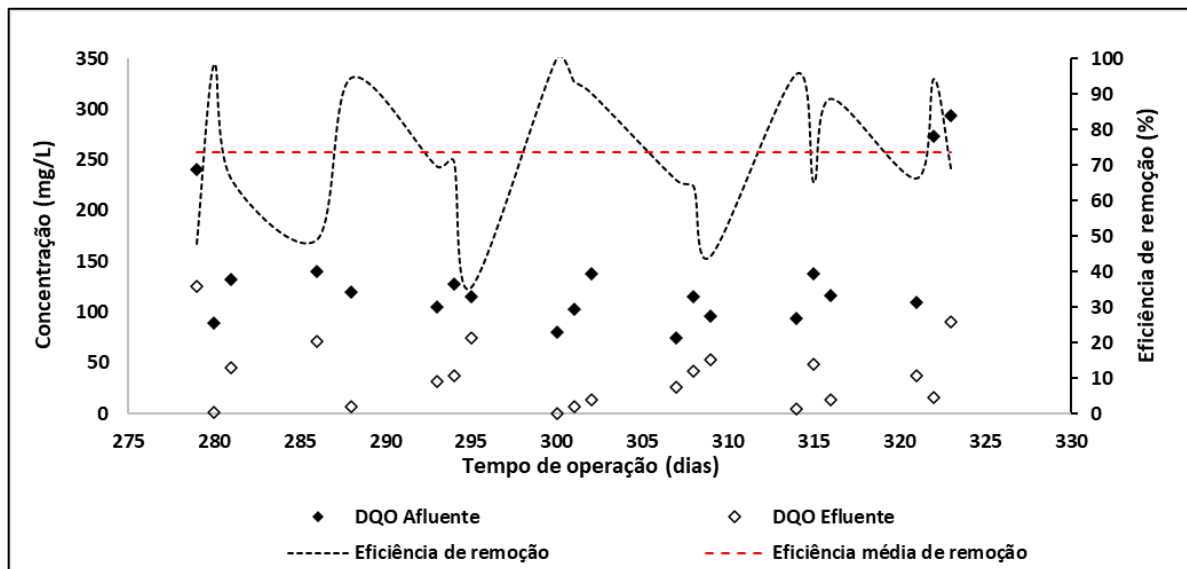
A redução do nitrato observada no experimento pode ter sido favorecida pela desnitrificação e impulsionada por fontes endógenas de carbono (MA *et al.*, 2024). Além da combinação do processo anammox com a nitrificação parcial, processos como a desnitrificação parcial podem estar envolvidos (ZHANG *et al.*, 2022). A desnitrificação parcial proporciona um fornecimento mais estável de nitrito do que a nitrificação parcial, sendo capaz de consumir matéria orgânica e reduzir o impacto negativo nas bactérias anammox (JIANG *et al.*, 2021).

Mesmo diante da hipótese da presença de bactérias desnitrificantes no RBS, não houve prejuízo na atividade anammox, sendo observado evolução gradual nas eficiências de consumo de nitrogênio amoniacal e nitrito, conforme Figura 5.6. Su *et al.* (2023) observaram que a desnitrificação parcial ajudou as bactérias anammox a competirem com outras bactérias heterotróficas, e em concomitância, mitigou os efeitos negativos da presença de matéria orgânica.

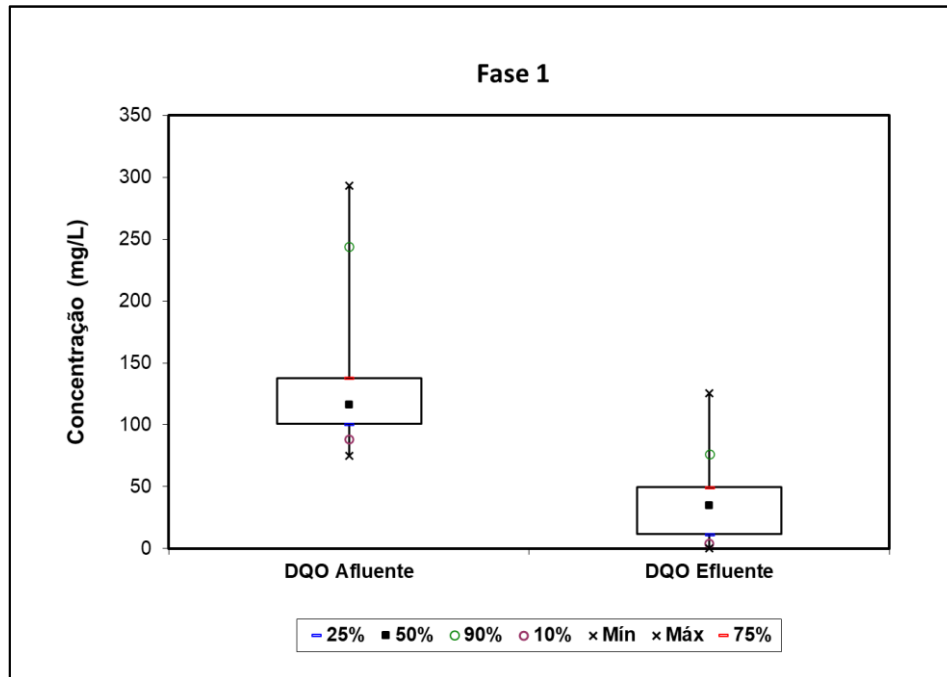
A condição de existência de um consórcio microbiano misto era, portanto, esperada na presente pesquisa, visto a disponibilidade de matéria orgânica e de bactérias heterotróficas (que podem requerer nitrato e DQO no seu metabolismo).

Com base nas inferências anteriores, e considerando que o reator foi alimentado nesta fase com 99% de efluente anaeróbio de um reator UASB, e portanto, há presença de matéria orgânica, foi realizado o monitoramento da DQO do sistema, conforme Figura 5.10. O perfil apresentado indicou oscilações na eficiência de remoção da matéria orgânica, com média de 73,41% e uma DQO média afluente de 135,04 mg/L e efluente de 37,17 mg/L (Figura 5.11). Considerando que as bactérias anammox não utilizam carbono orgânico no seu metabolismo, outros micro-organismos atuaram em cooperação no RBS, para que a eficiência de remoção da matéria orgânica se expressasse e não prejudicasse a eficiência de remoção da série nitrogenada, como observado. A oscilação também foi observada nas concentrações afluentes de DQO, que tiveram seu mínimo em 74,92 mg/L e máximo em 293,25 mg/L, também esperada frente a aplicação de efluente real composto por dois outros efluentes.

**Figura 5.10 - Concentração de matéria orgânica (DQO) afluente e efluente no RBS – Fase 1**

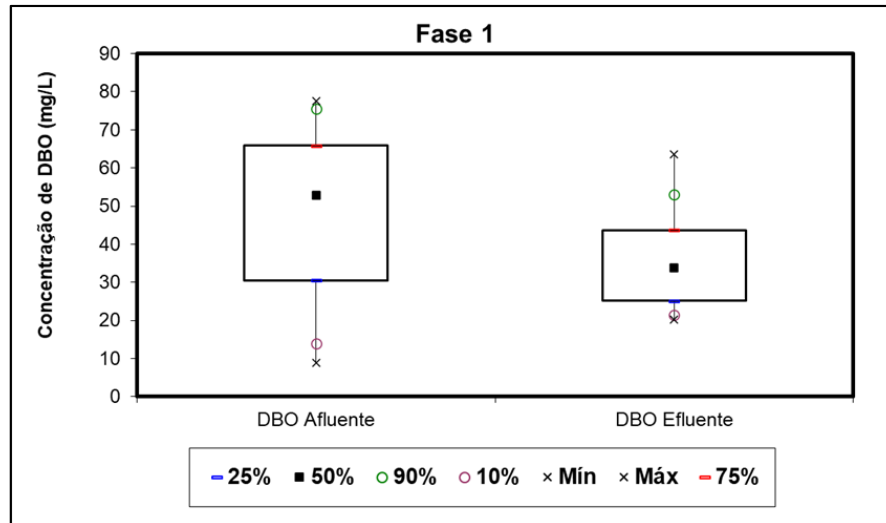


**Figura 5.11 - Box-plot da concentração de DQO afluente e efluente no RBS – Fase 1**



Na Fase 1, foi observada concentração média afluente de DBO de 47,44 mg/L e efluente de 36,46 mg/L, com eficiência de remoção de 28,28%. Também foram constatadas oscilações nas concentrações afluente (mínimo de 8,97 mg/L e máximo de 77,63 mg/L) e efluente (mínimo de 20,31 mg/L e máximo de 63,54 mg/L) vinculadas a utilização de um efluente real com matéria orgânica potencialmente recalcitrante (Figura 5.12). Portanto, maiores investigações são necessárias para o entendimento de quais micro-organismos atuaram na redução da matéria orgânica, biodegradável ou recalcitrante.

**Figura 5.12 - Box-plot da matéria orgânica (DBO) afluente e efluente no RBS – Fase 1**



A relação DQO/N foi avaliada na Fase 1, conforme Tabela 5.4 e Figura 5.13 apresentando valor médio de 0,45, favorável para a aplicação do processo Anammox. A literatura corrobora com tal entendimento na medida que o processo tem sido aplicado em efluentes com alta concentração de nitrogênio e teor de carbono orgânico biodegradável baixo, abaixo de 0,5 gDQO/N (JENNI et al., 2014; JOSS et al. 2009).

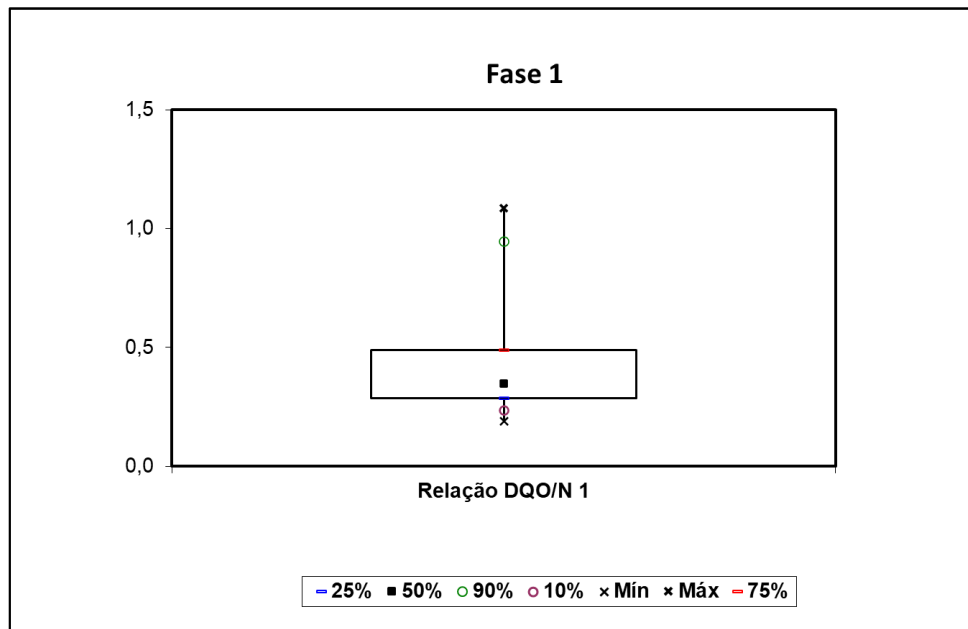
Li, Kechen, Yongzhen (2018) alcançaram valor ligeiramente menor do que o presente estudo (0,4), aplicando o sistema de NP/A a um livixiado de aterro sanitário, com alta concentração de DQO (2100 mg/L  $\pm$ 75). Li et al. (2020b) encontraram o intervalo de 0,3 - 0,4 para um efluente de suinocultura (101–352 mg/L), com aplicação similar à anteriormente mencionada.

No que tange ao decaimento de nitrogênio no sistema, Chen *et al.* (2016) constataram experimentalmente, utilizando um reator anaeróbio compartimentado (“*anaerobic baffled reactor*”) que a remoção de nitrogênio em um efluente sintético contendo nitrogênio amoniacal e nitrito foi potencializada pela coexistência de processo de desnitrificação e anammox em relações de DQO/N de 0,8 em uma Fase com adição de matéria orgânica. Portanto, correlações abaixo de 1 são vistas na literatura e podem apresentar bom desempenho de remoção de nitrogênio amoniacal sem prejuízo ao processo anammox, como verificado no presente estudo em sua primeira fase.

**Tabela 5.4 - Estatística descritiva da concentração de DQO afluente e efluente e da relação DQO/N durante a Fase 1 (1% de fertilizante e 99% de efluente anaeróbio de UASB)**

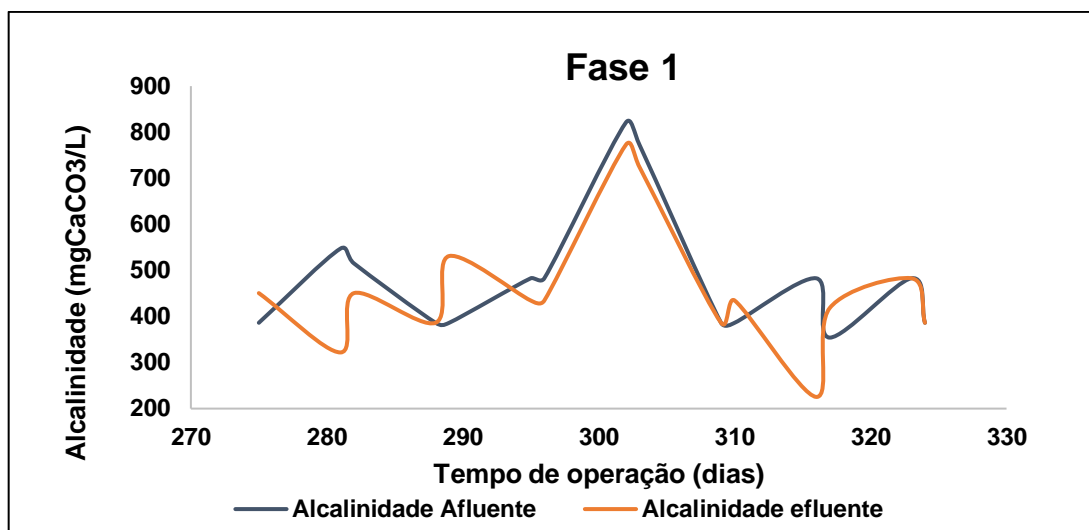
Estadística descriptiva – medidas de tendência central	DQO afluente (mg/L)	DQO efluente (mg/L)	DQO/N
N° de dados	20	20	20
Média	135,04	37,17	0,45
Desvio Padrão	61,28	33,35	0,26
Coefficiente de Variação	0,45	0,90	0,57
Mediana	115,96	34,50	0,35
Mínimo	74,92	0,00	0,19
Máximo	293,25	125,75	1,09
Percentil 10%	88,16	3,83	0,24
Percentil 25%	100,75	11,58	0,28
Percentil 75%	137,63	49,50	0,49
Percentil 90%	244,00	76,13	0,95

Figura 5.13 - Relação de DQO/N no RBS – Fase 1



A alcalinidade também foi um parâmetro de interesse no sistema monitorado. Foi identificada uma alcalinidade média afluente de 483,93 mgCaCO<sub>3</sub>/L e efluente de 456,03 mgCaCO<sub>3</sub>/L, conforme Figura 5.14, para a Fase 1. Primeiramente, é válido mencionar que o efluente da indústria de fertilizante bruto foi avaliado com uma concentração na ordem de 15.000 mg/L e o efluente anaeróbico com uma concentração média de 25.000 mgCaCO<sub>3</sub>/L. Portanto, a mistura resultante teria alta concentração de alcalinidade, como observado.

Figura 5.14 - Alcalinidade afluente e efluente do RBS – Fase 1



Em segundo plano, notou-se ligeiro consumo de alcalinidade, senão manutenção dos valores afluentes, com eficiência média de remoção de 3,62% nos dados amostrados.

Wang *et al.* (2024) apresentaram a caracterização físico-química de amostras de efluentes de duas indústrias chinesas produtoras de fertilizante nitrogenado, ambas utilizando como unidade de tratamento o RBS. As amostras coletadas em cada indústria diferenciam-se pelas concentrações dos parâmetros, como nitrogênio amoniacal, nitrito, alcalinidade, dentre outros.

A primeira indústria apresentou como produtos a ureia, o metanol o enxofre e o dimetil eter enquanto a segunda, além da ureia, produziu glicerol. As águas residuárias afluentes ao sistema biológico proposto apresentaram respectivamente, 978,5 mgCaCO<sub>3</sub>/L e 728,23 mgCaCO<sub>3</sub>/L. Após tratamento, a menor concentração efluente observada, dentro das Fases de cada indústria, foi de 515,50 mgCaCO<sub>3</sub>/L e 692,57 mgCaCO<sub>3</sub>/L, notando-se eficiências de remoção na ordem de 40% e 5%. Para a segunda indústria ainda foi observado em uma de suas fases o aumento da alcalinidade para 843,97 mgCaCO<sub>3</sub>/L. Dentre os micro-organismos abordados no referido estudo, não houve menção as bactérias com atividade anammox, contudo, é perceptível altas concentrações afluentes do parâmetro alcalinidade e a sua persistência no meio.

O processo anammox, segundo Szatkowska e Trela (2005), não confere alterações perceptíveis na alcalinidade do sistema. Strous *et al.* (1998) relataram que em termos de Carbonato de Cálcio, para cada miligrama de amônia oxidado, 0,23 mg de carbonato são consumidos pelas bactérias anammox. No presente estudo (Fase 1)

constatou-se uma remoção média de oxidação/remoção de 131,24 mg  $\text{NH}_4^+$ /L para 27,9 mg  $\text{CaCO}_3$ /L, conferindo uma relação aproximada de 0,21, bastante próximo ao próximo ao valor respaldado na literatura.

#### 5.2.2 Fase 2– Operação com adição de 2% de fertilizante

A condição de mistura de 2% de fertilizante e 98% de efluente anaeróbio (diluição 1:50) no RBS foi operada por 51 dias, sendo o desempenho do sistema avaliado do dia 328 ao dia 374. Foi adicionado ao reator solução concentrada de nitrito visando concentração final de 240 mg/L. Esta etapa também foi marcada pelo consumo simultâneo de nitrogênio amoniacal e nitrito, com concentrações afluente médias de 201,82 mg/L e 225,70 mg/L, e efluente de 29,81 mg/L e 0,80 mg/L respectivamente. Portanto, o aumento em 1% da diluição de fertilizante na mistura afluente, imputou em um aumento médio de 33,22 mg/L de amônia afluente e 51,38 mg/L de nitrito afluente no sistema.

Em que pese a eficiência de remoção, foram notadas maiores oscilações durante a Fase 2 (Figura 5.15) para ambos os substratos, se comparado a Fase anterior, na qual gradualmente foi constatado o aumento do consumo de nitrogênio amoniacal e nitrito. Para esta, obteve-se uma eficiência média de 85,5% (nitrogênio amoniacal) e 99,41% (nitrito) havendo, portanto, o aumento percentual no consumo dos substratos.

A preocupação com a inibição das bactérias anammox tratando distintos efluentes é válida, posto que não há consenso quanto aos valores típicos de inibição (FERNANDÉZ et al.; 2012; MA *et al.*, 2017; STROUS *et al.*, 1999). Para esta pesquisa, as concentrações até o momento adotadas não indicaram prejuízos ao RBS enriquecido com bactérias anammox (Figura 5.16).

**Figura 5.15 - Dinâmica de remoção dos compostos nitrogenados da Fase 2**

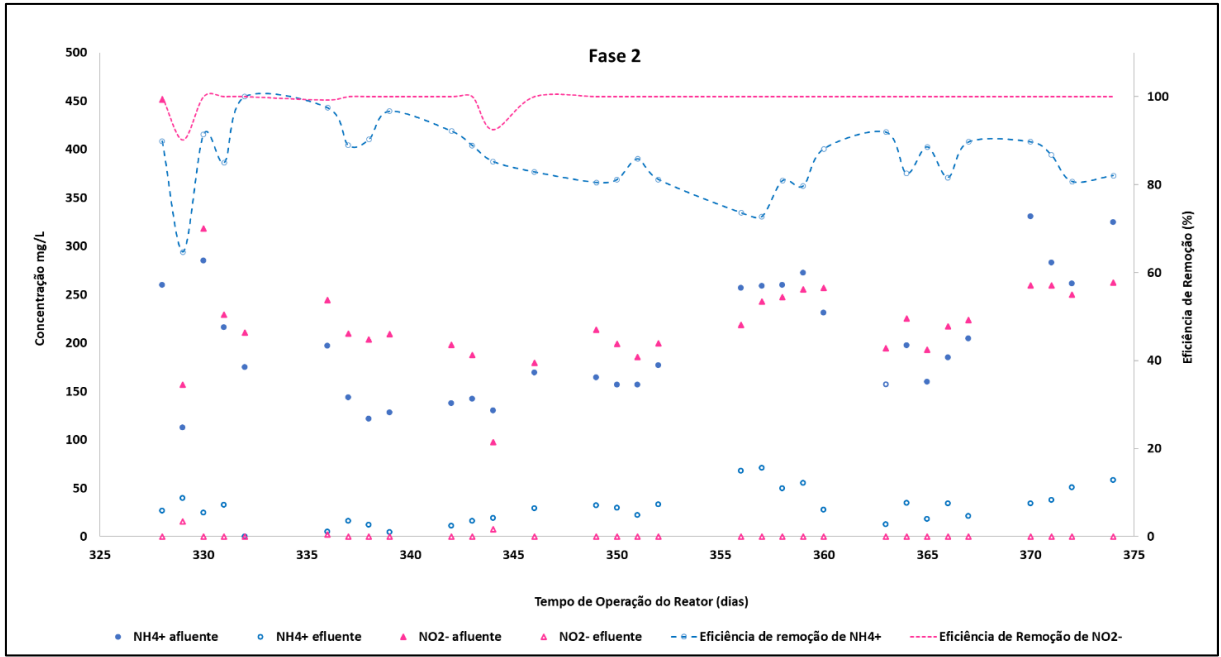
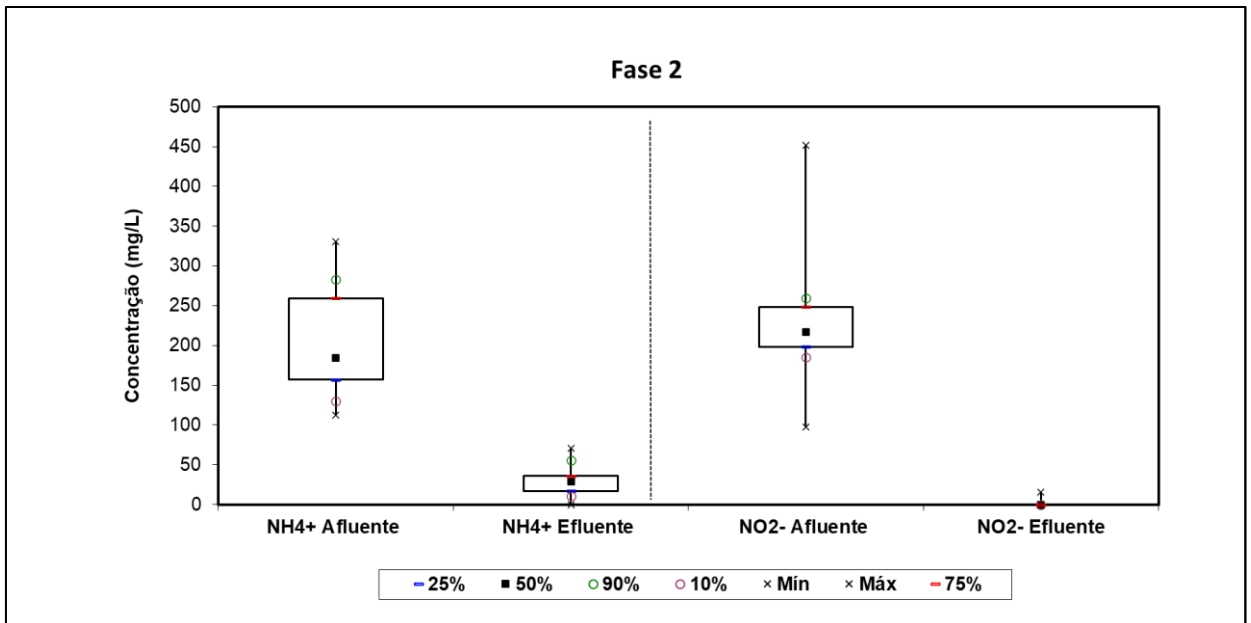
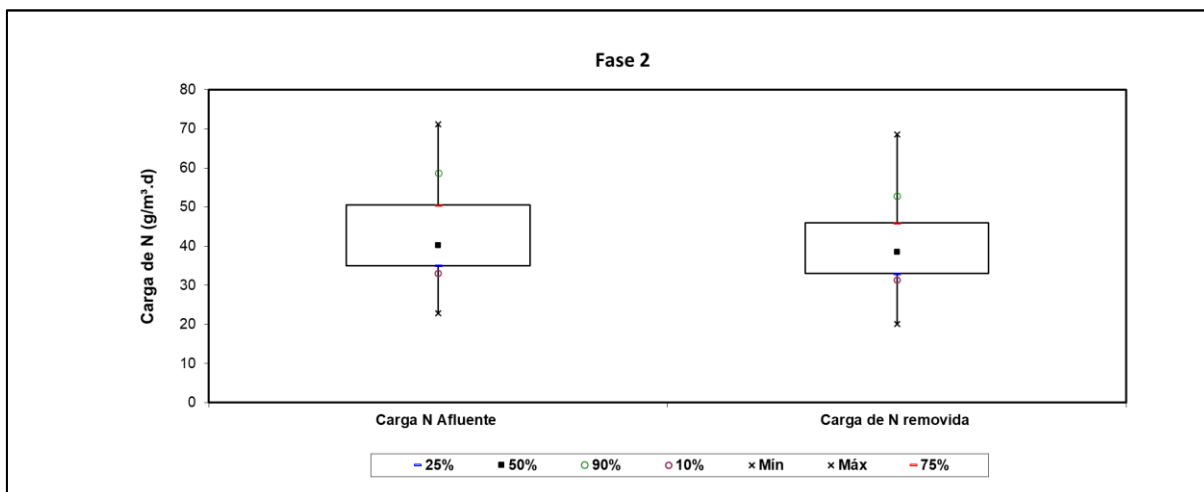


Figura 5.16 - Concentrações afluente e efluente de amônia e nitrito - Fase 2



Em termos de carga de nitrogênio aplicada diariamente, constatou-se valores satisfatórios de remoção, estando a carga aplicada (42,75 gN/m<sup>3</sup>.d) e a consumida (39,69 gN/m<sup>3</sup>.d) na mesma ordem de grandeza, como visto na Tabela 5.5 e Figura 5.17.

**Figura 5.17 - Carga de nitrogênio total aplicada e removida no RBS – Fase 2**



**Tabela 5.5 - Estatística descritiva da carga aplicada e removida durante a Fase 2 (2% de fertilizante e 98% de efluente anaeróbio de UASB)**

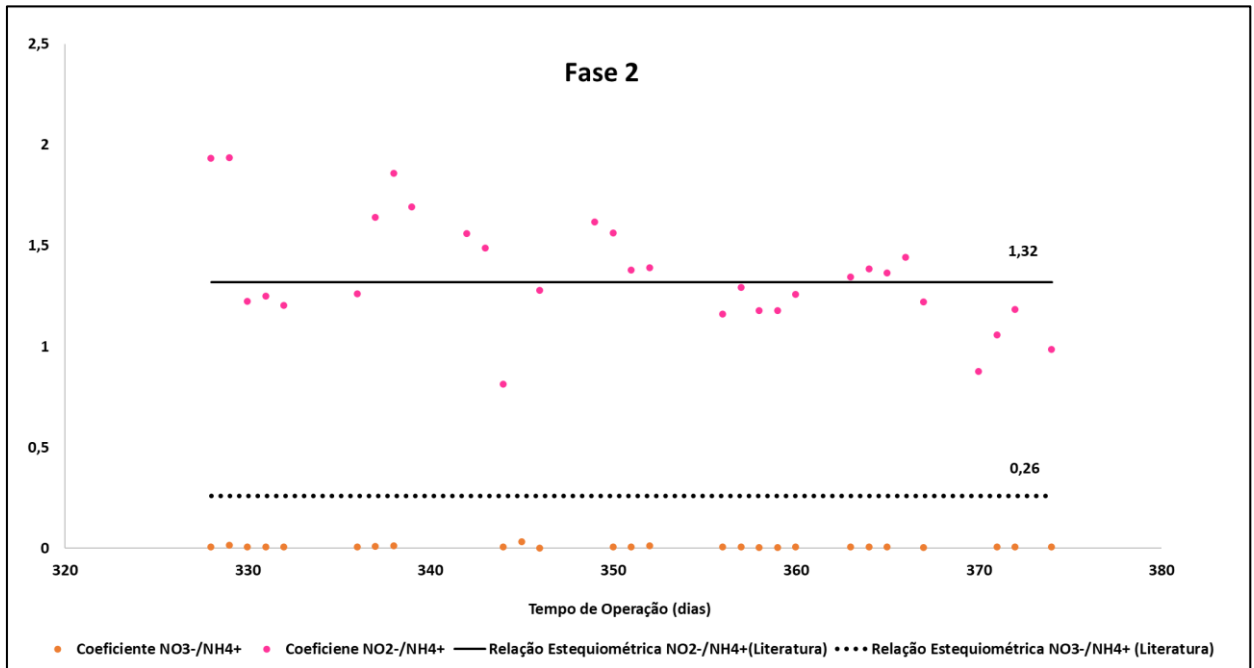
<b>Estatística descritiva – medidas de tendência central</b>	<b>Carga aplicada (gN/m<sup>3</sup>.d)</b>	<b>Carga removida (gN/m<sup>3</sup>.d)</b>
Nº de dados	31	31
Média	42,75	39,69
Desvio Padrão	10,90	10,33
Coefficiente de Variação	0,26	0,26
Mediana	40,17	38,54
Mínimo	22,77	20,11
Máximo	71,14	68,50
Percentil 10%	32,97	31,39
Percentil 25%	35,01	32,97
Percentil 75%	50,47	45,93
Percentil 90%	58,71	52,88

Até o momento, o desempenho do reator evidencia a existência de um consórcio misto de bactérias heterotróficas desnitrificantes e de bactérias anammox. A Figura 5.18 respaldada pela

**Tabela 5.6**, demonstrou na Fase 2 um coeficiente de consumo de nitrito de 1,35 notadamente próximo a literatura (1,32) e um coeficiente de produção de nitrato

próximo a zero, indicando a existência de micro-organismos consumidores de nitrato sem indícios de inibição na atividade anammox.

**Figura 5.18 - Coeficiente estequiométrico de consumo de nitrito/consumo de amônia e produção de nitrato/consumo de amônio durante a fase 2**



**Tabela 5.6 - Estatística descritiva do coeficiente estequiométrico (NO<sub>2</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) obtido durante a Fase 2 (2% de fertilizante e 98% de efluente anaeróbico de UASB)**

<b>Estatística descritiva - Medidas de tendência central</b>	<b>Consumo de nitrito/consumo de íon amônio</b>	<b>Produção de nitrato/consumo de íon amônio</b>
Nº de dados	31	26
Média	1,35	0,006
Desvio Padrão	0,28	0,006
Coefficiente de Variação	0,20	0,990
Mediana	1,29	0,004
Mínimo	0,81	0,000
Máximo	1,94	0,031
Percentil 10%	1,06	0,003
Percentil 25%	1,19	0,004
Percentil 75%	1,52	0,006
Percentil 90%	1,69	0,010

Bactérias heterotróficas são capazes de converter o nitrato a nitrito utilizando a DQO como doadora de elétrons, por meio do processo de desnitrificação parcial (DP). Por meio deste processo, o nitrito gerado pode servir como substrato para o crescimento de bactérias anammox, enquanto o consumo de matéria orgânica auxilia no controle deste parâmetro como um fator de inibição em sistemas enriquecidos por esta bactéria (GUO *et al.*, 2023). Estes mesmos autores identificaram relação similar ao presente estudo utilizando um RBS ( $1,33 \pm 0,1 - \text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$  e  $0,05 \pm 0,1 - \text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ) com efluente sintético.

Du *et al.* (2022) demonstraram eficiência de remoção de nitrogênio total acima de 94,1% em reator de único estágio de desnitrificação parcial e anammox (DP/A), com efluente sintético de baixa carga (50 mg/L de nitrogênio amoniacal e 50 mg/L de nitrato). Em consonância, Du *et al.* (2023) alcançaram eficiência sensivelmente próxima em RBS do tipo DP/A, adotando efluente sintético de alta carga (150 mg/L para os mesmos substratos mencionados). Além de uma boa estratégia de remoção de nitrogênio total, o processo demonstrou o aumento da riqueza populacional das bactérias anammox em reator de manta de lodo alimentado com lixiviado com alta concentração de nitrogênio amoniacal (1200-1300 mg/L) e matéria orgânica (4000-5000 mgDQO/L) (WU *et al.*, 2018).

A hipótese colocada inicialmente acerca da coexistência de “desnitrificantes” e bactérias anammox é sustentada pelo alto consumo de DQO. Conforme Figura 5.19 e Figura 5.20, a diluição adotada de 2% de efluente da indústria de fertilizante nitrogenado apontou analiticamente para uma concentração afluente e efluente média de 370,54 mgDQO/L e 43,08 mgDQO/L, respectivamente, condicionando o RBS a uma concentração afluente extra de 235,5 mgDQO/L se comparada a Fase anterior. Notou-se, portanto, um aumento expressivo de matéria orgânica no sistema entre Fases 1 e 2 e o consumo consistente de DQO, não sendo constatada a redução na atividade anammox, nem mesmo efeito inibitório.

Fernandes *et al.* (2018) reportaram uma eficiência de remoção de 100% de nitrogênio amoniacal com concentração máxima afluente de DQO de 124,7 mg/L. Em taxas mais altas, Leal *et al.* (2016) observaram que a concentração de DQO de 487 mg/L reduziu a eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal de 92 para 22%, utilizando efluente

sintético e a glicose como fonte orgânica. Carvalho *et al.* (2021) aplicando o sistema de NP/A ao digestato anaeróbio de resíduos alimentares alcançou um adequado desempenho do sistema com concentrações de DQO em torno de 550 mg/L.

Sobre remoções simultâneas de matéria orgânica e nitrogênio total, Zhang *et al.* (2021a) aplicaram lixiviado maduro diluído com efluente doméstico (1:11,5), em um sistema conjugado de nitrificação parcial/ anammox e desnitratação, e alcançaram eficiências de remoção de 99,1% (NT) e 95,3% (DQO), com concentrações afluentes de 47,3 mg/L de nitrogênio amoniacal e 205,5 mg/L de DQO, sem prejuízos ao sistema. WU *et al.* (2015) também aplicaram lixiviado maduro diluído com efluente doméstico (1:5), em um sistema UASB/ anóxico/óxico/anammox, e notaram eficiências de 93,5% (NT) e 89% (DQO), com concentrações afluentes de 460-500 mg/L de nitrogênio amoniacal e 1400-2000 mg/L de DQO.

O presente estudo demonstrou ser possível alcançar um bom desempenho do RBS, com uma concentração de DQO afluente na ordem de 400 mg/L, atingindo eficiência média de remoção de amônia de 85,5%. Igualmente, foi notória uma eficiência de remoção de DQO (média) de 86,16%, sem prejuízos a atividade das bactérias anammox.

**Figura 5.19 - Box-plot da concentração de DQO afluente e efluente no RBS – Fase 2**

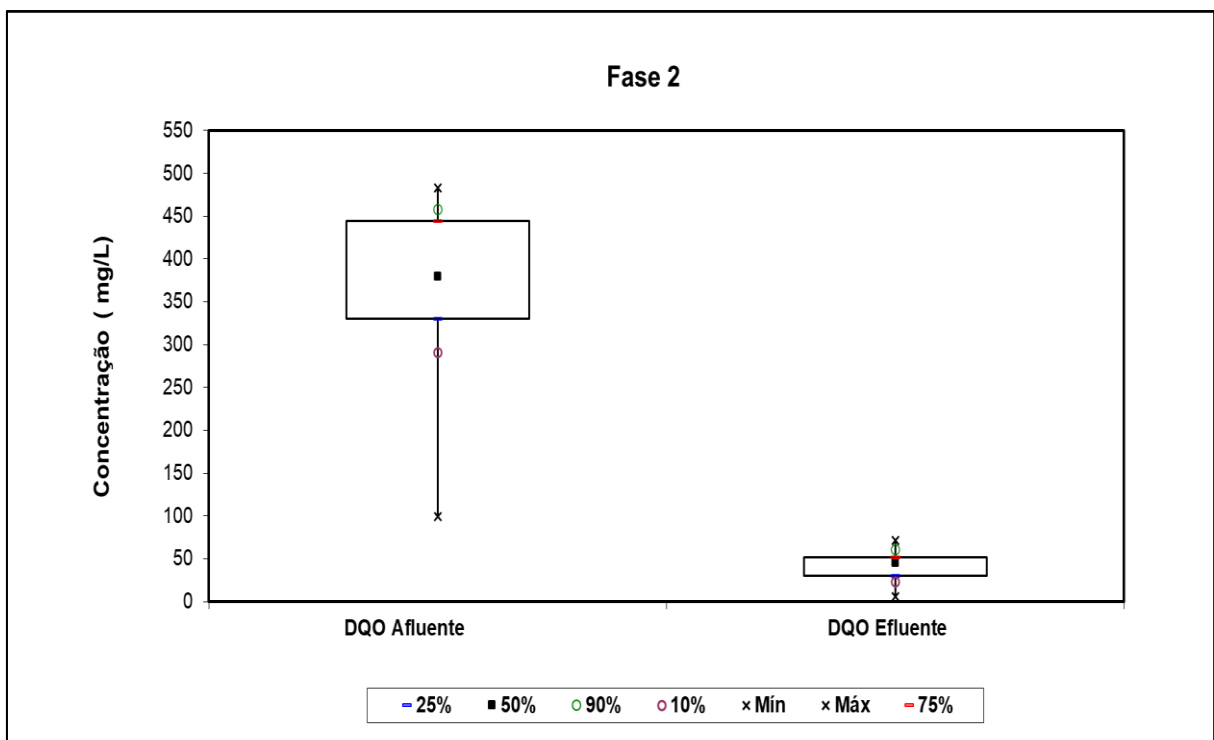
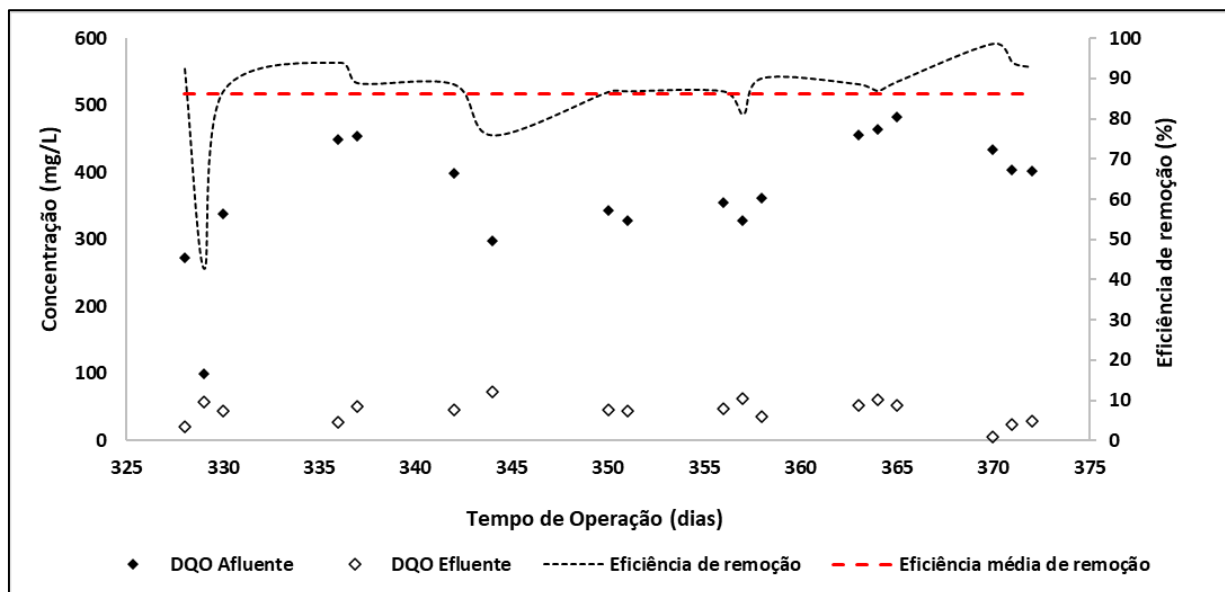


Figura 5.20 - Concentração de matéria orgânica (DQO) afluyente e efluente no RBS – Fase 2

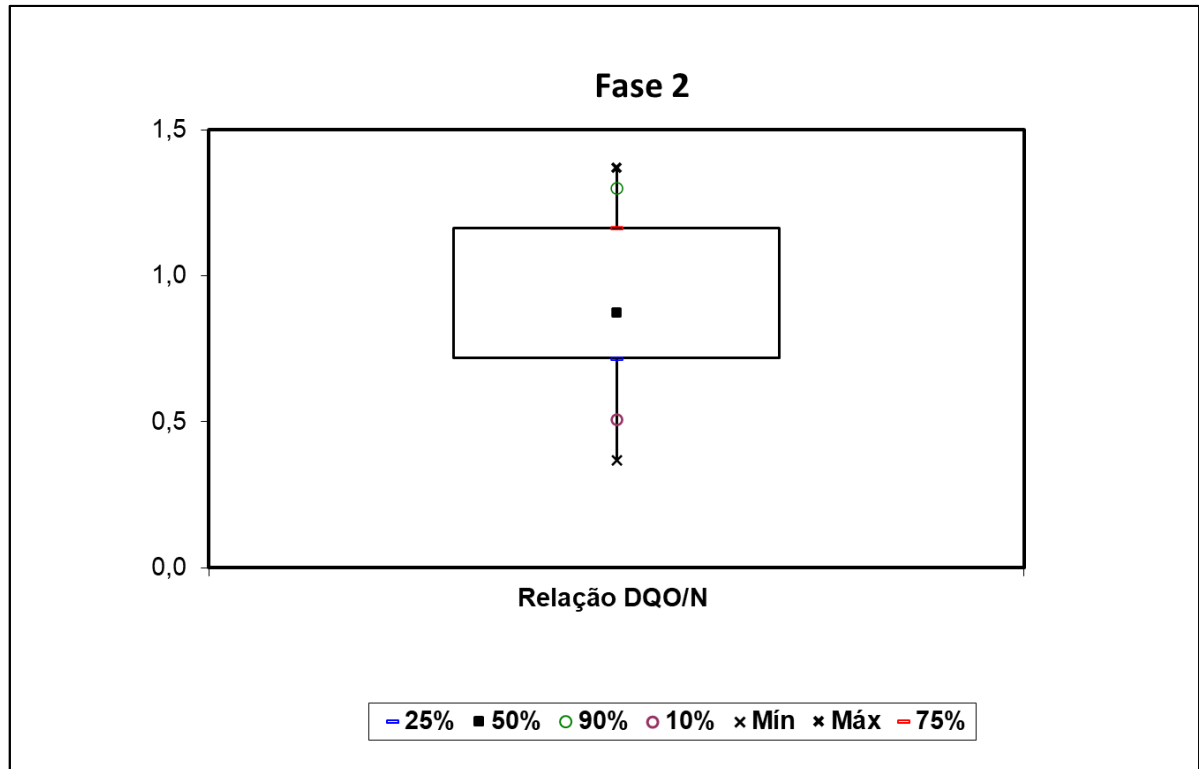


A relação de DQO/N na Fase 2 é expressa na Tabela 5.7 e Figura 5.21. Os resultados apresentados nesta fase do estudo indicaram uma relação média de 0,90, com máximo em 1,37 e mínimo em 0,37, ainda favorável à atividade anammox. As concentrações de DQO no sistema aumentaram com a diluição de 2% de efluente de fertilizante e 98% de efluente doméstico, assim como a concentração de nitrogênio total também aumentou, justificando a proporção encontrada nesta etapa.

Tabela 5.7 - Estatística descritiva da concentração de DQO afluyente e efluente e da relação DQO/N durante a Fase 2 (2% de fertilizante e 98% de efluente anaeróbico de UASB)

Estatística descritiva – medidas de tendência central	DQO afluyente (mg/L)	DQO efluente (mg/L)	DQO/N
Nº de dados	18	18	18
Média	370,54	43,08	0,90
Desvio Padrão	91,54	16,62	0,31
Coeficiente de Variação	0,25	0,39	0,35
Mediana	380,13	45,75	0,87
Mínimo	99,50	5,75	0,37
Máximo	483,25	72,00	1,37
Percentil 10%	290,75	23,38	0,51
Percentil 25%	330,75	30,69	0,72
Percentil 75%	444,50	52,00	1,16
Percentil 90%	458,38	61,13	1,30

Figura 5.21 - Relação de DQO/N no RBS – Fase 2



Relações de DQO/N similares foram promissoras para o desempenho de sistemas com atividade anammox tratando efluentes industriais. Li *et al.* (2021c) aplicaram experimentalmente lixiviado maduro em um sistema de desnitrificação parcial/nitrificação parcial, a uma relação de 0,98, sendo possível alcançar uma remoção estável de nitrogênio total acima de 96%. Pan *et al.* (2020), tratando efluente de suinocultura por NP/A, com DQO/N de 0,85, alcançou 94% de eficiência de remoção de nitrogênio total.

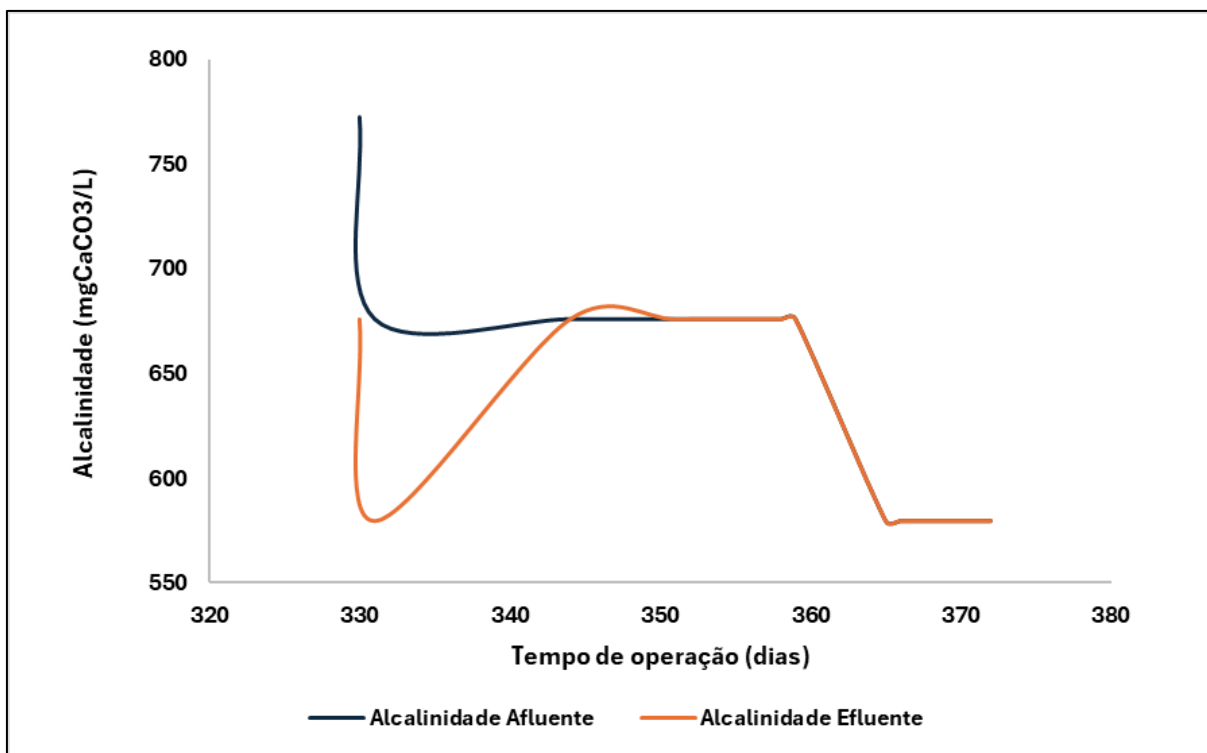
De fato, como defendido por Bonassa *et al.* (2021), relações de DQO/N menores que 3,5, inclusive como aquela obtida no presente estudo (0,88), apresentaram boa performance do sistema anammox.

A difícil biodegradabilidade da matéria orgânica presente no sistema na Fase 2 foi reafirmada pela razão DQO/DBO de 5,17. Nesta fase, também foi observado concentração média afluente de 71,7 mgDBO/L e efluente de 125,2 mgDBO/L, reiterando a necessidade de maiores investigações quanto a versatilidade metabólica dos micro-organismos do presente estudo.

Em fenômeno similar à Fase anterior, a Fase 2 foi marcada pelo baixo consumo de alcalinidade, com concentração afluyente média de 654,5 mgCaCO<sub>3</sub>/L e efluente de 633,08 CaCO<sub>3</sub>mg/L, sem indícios de inibição do sistema (Figura 5.22).

Pereira *et al.* (2019) adicionaram alcalinidade em um sistema de RBS (1084 mgCaCO<sub>3</sub>/L afluyente), alimentado com digestato de resíduos alimentares diluído, a fim de se verificar o aumento de eficiência do processo. Os autores chegaram a conclusão que esta adição não alterou o comportamento do sistema, sem influência na remoção de nitrogênio, nas condições experimentais avaliadas. Mesmo não alterando o processo, houve alto consumo de alcalinidade, justificando-se pelo uso do processo de NP/A, que diferentemente do sistema adotado no presente estudo (processo anammox convencional), consome maior alcalinidade, pois, bactérias nitrificantes possuem alto requerimento de alcalinidade (para cada mg oxidado de amônia, 7,07 mg de CaCO<sub>3</sub> é consumido (AHN,2006)).

**Figura 5.22 - Alcalinidade afluyente e efluente do RBS – Fase 2**



### 5.2.3 Fase 3 – Operação com adição de 6% de fertilizante

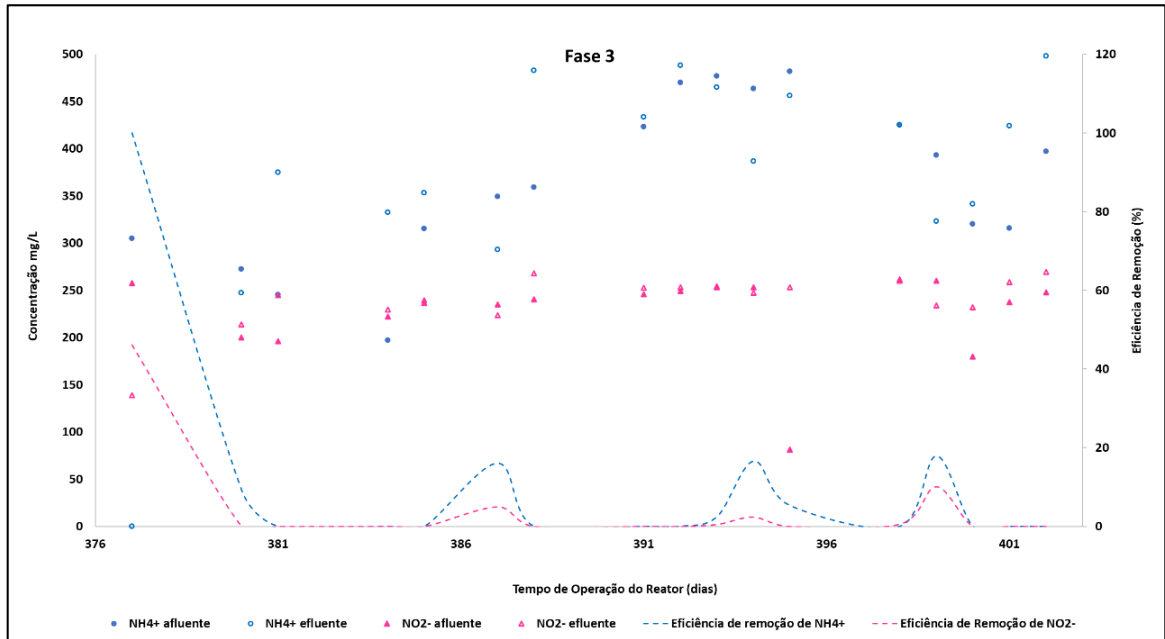
O RBS foi operado na Fase 3 por 26 dias, avaliando-se os dados do dia 377 ao dia 402. A aplicação de 6% de efluente de fertilizante (diluição 1:16,7) implicou na oscilação do consumo de amoniacal e nitrito. A remoção integral de amoniacal foi observada apenas no início da Fase 3 (Dia 377), resultado possivelmente influenciado pela fase anterior. Para o mesmo dia, foi constatado uma eficiência de 46% de remoção de nitrito. Por vezes, a remoção de amoniacal e nitrito foi nula, como observado na Figura 5.23.

Para esta fase foram obtidas as concentrações afluentes médias de nitrogênio amoniacal e nitrito de 365 mg/L e 227 mg/L, respectivamente, e efluente de 227,05 mg/L e 239,56 mg/L. Ao comparar a fase atual com a anterior, houve um incremento de 163,58 mg/L (médio) na concentração da  $\text{NH}_4^+$  e 13,86 mg/L (médio) no nitrito. A literatura já abordou experimentos com bactérias anammox utilizando efluentes com concentrações maiores que estas da Fase 3, sem detecção de prejuízo ao sistema, em distintas condições operacionais (WU *et al.*, 2018; WU *et al.*, 2024).

Contudo, considerando que este estudo não abrangeu a caracterização completa do fertilizante nitrogenado e assim, de todos os parâmetros com potencial de inibição

para as bactérias anammox, faz-se a reflexão de que além dos substratos amônia e nitrito, outros compostos presentes no fertilizante influenciaram nos resultados obtidos, como a própria DQO, que foi de 531,58 mg/L nesta fase.

**Figura 5.23 - Dinâmica de remoção dos compostos nitrogenados da Fase 3**



Na Figura 5.24, pode-se notar intervalos interquartílicos (afluente e efluente) similares para os dois substratos, reiterando o pequeno consumo dos compostos nitrogenados. Certamente, as concentrações afluentes de nitrogênio amoniacal foram maiores em relação ao nitrito, não seguindo a estequiometria esperada da reação anammox. Mesmo diante deste fato, caso a causa da inibição fosse a menor concentração do nitrito, este teria sido totalmente consumido no sistema, sendo rapidamente identificado como fator limitante, não sendo esta a ocasião.

Em termos de carga orgânica volumétrica (Figura 5.25), na Fase 3 foi aplicada no reator uma carga de 56,90 gN/m<sup>3</sup>d com remoção média de 4,09 gN/m<sup>3</sup>d. Notou-se acúmulo de carga nitrogenada no sistema, sendo que 75% dos dados de carga removida são iguais ou menores que 4,04 gN/m<sup>3</sup>d (ver Tabela 5.8), indicando que o consumo de nitrogênio amoniacal e nitrito foi estagnado pela inibição dos micro-organismos consumidores dos substratos.

Figura 5.24 - Concentrações afluente e efluente de amônia e nitrito - Fase 3

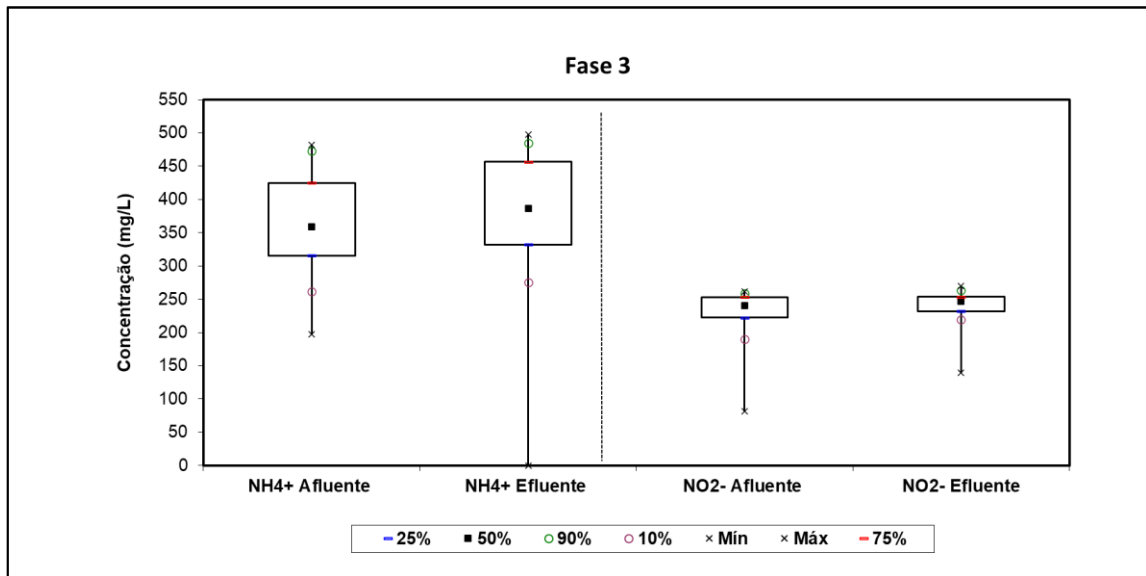


Figura 5.25 - Carga de nitrogênio total aplicada e removida no RBS – Fase 3

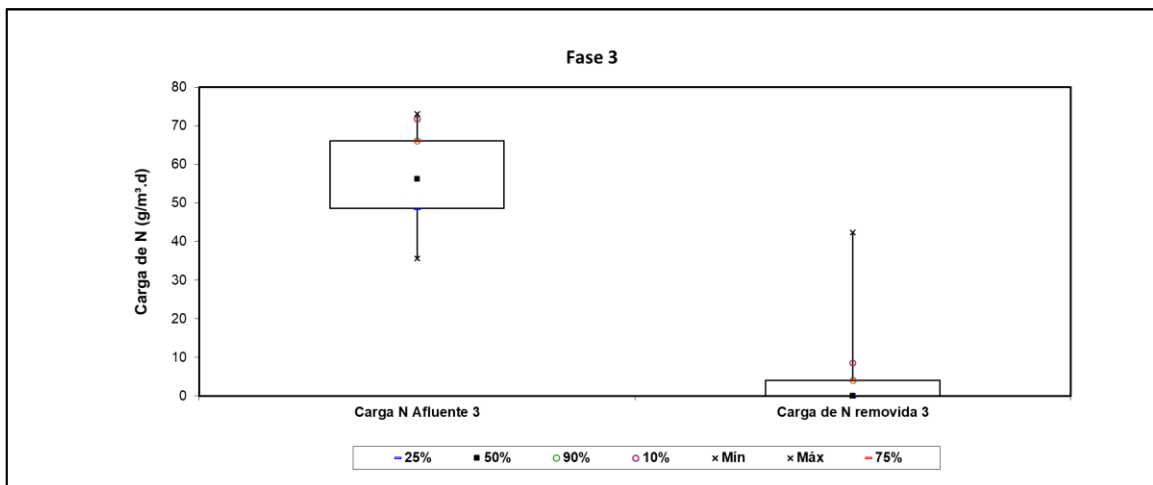


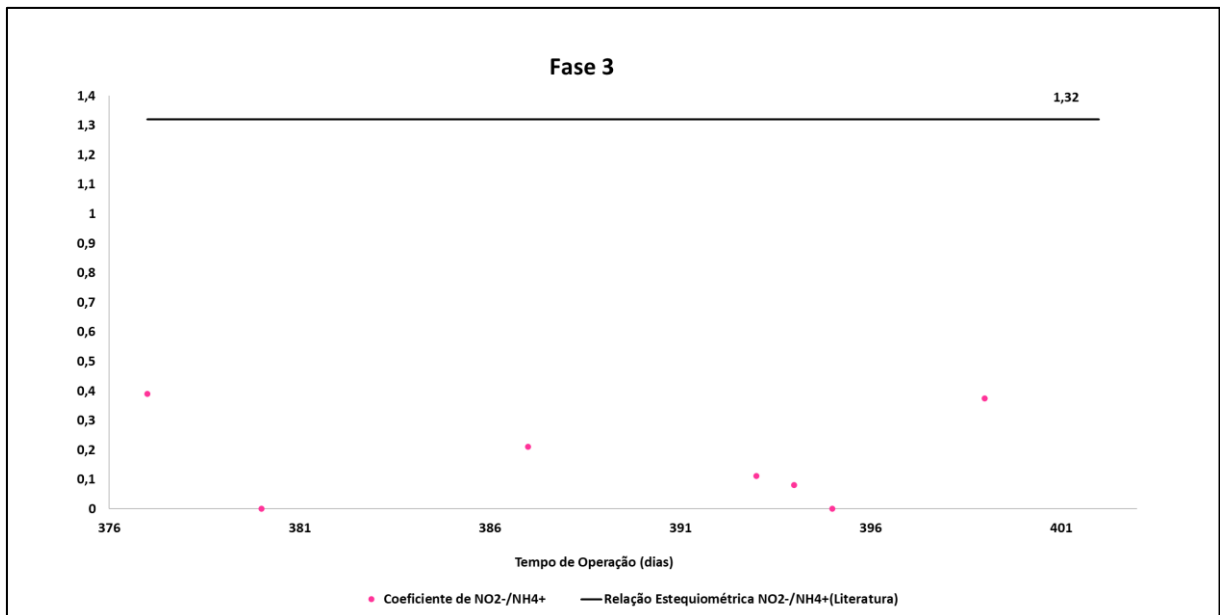
Tabela 5.8 - Estatística descritiva da carga aplicada e removida durante a Fase 3 (6% de fertilizante e 94% de efluente anaeróbico de UASB)

Estatística descritiva – medidas de tendência central	Carga aplicada (gN/m <sup>3</sup> .d)	Carga removida (gN/m <sup>3</sup> .d)
Nº de dados	19	19
Média	56,90	4,09
Desvio Padrão	11,59	9,87
Coefficiente de Variação	0,20	2,41
Mediana	56,31	0,00
Mínimo	35,61	0,00
Máximo	73,13	42,39
Percentil 10%	41,20	0,00
Percentil 25%	48,61	0,00
Percentil 75%	66,13	4,04
Percentil 90%	71,74	8,56

O coeficiente de consumo de nitrito teve redução expressiva das Fases anteriores para a atual (Figura 5.26), acreditando-se que este novo cenário se deva tanto a observação de uma proporção menor de nitrito do que de nitrogênio amoniacal afluyente no sistema quanto a redução do consumo de ambos os substratos, fazendo com que a relação estequiométrica e matemática apresente valores próximos a zero.

Dos 19 dados observados para o coeficiente de consumo de nitrito/consumo de amônia, 9 puderem ser valorados uma vez que a inibição das bactérias com atividade anammox foi clara, com remoção de  $\text{NH}_4^+$  e nitrito nula, indicando uma relação matemática com numerador e denominador nulos. Os dados de nitrato seguiram o comportamento similar ao das fases pretéritas, também sem indícios de produção de nitrato no reator e consumo de  $\text{NH}_4^+$ , com coeficientes próximos a zero ou com relações estequiométricas não sendo possíveis de serem valoradas.

**Figura 5.26 - Coeficiente estequiométrico de consumo de nitrito/consumo de amônia durante a fase 3**

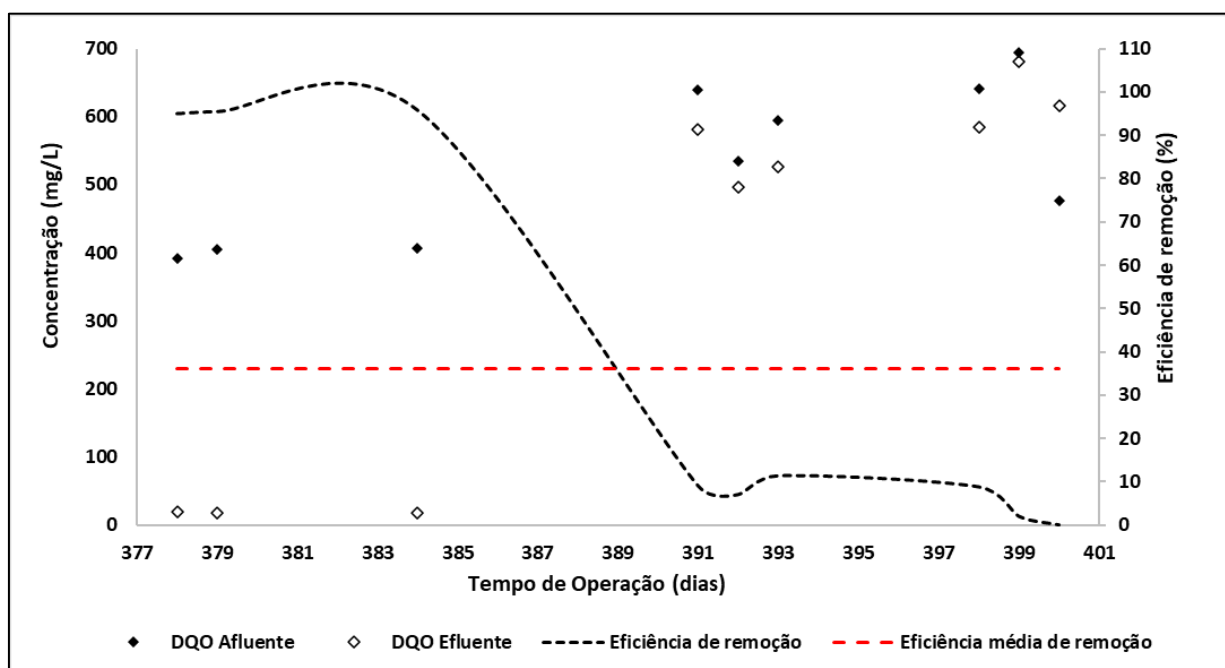


**Tabela 5.9 - Estatística descritiva do coeficiente estequiométrico ( $\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$ ) obtido durante a Fase 3 (6% de fertilizante e 94% de efluente anaeróbico de UASB)**

Estatística descritiva - Medidas de tendência central	Consumo de nitrito/consumo de íon amônio
N° de dados	9
Média	0,13
Desvio Padrão	0,16
Coefficiente de Variação	1,23
Mediana	0,08
Mínimo	0,00
Máximo	0,39
Percentil 10%	0,00
Percentil 25%	0,00
Percentil 75%	0,21
Percentil 90%	0,38

Na Fase 3, a concentração de DQO afluente alcançou uma média de 531,58 mg/L e efluente de 393,67 mg/L. Durante o início da Fase, a eficiência de remoção da matéria orgânica manteve-se constante (Figura 5.27), indicando que os micro-organismos consumidores da matéria orgânica e presentes no RBS não foram integralmente inibidos e estavam aclimatados. A partir do dia 391, o consumo de DQO diminuiu, junto a eficiência média de remoção, apontando para um potencial perda de bactérias heterotróficas, com eficiência média de remoção de 36%.

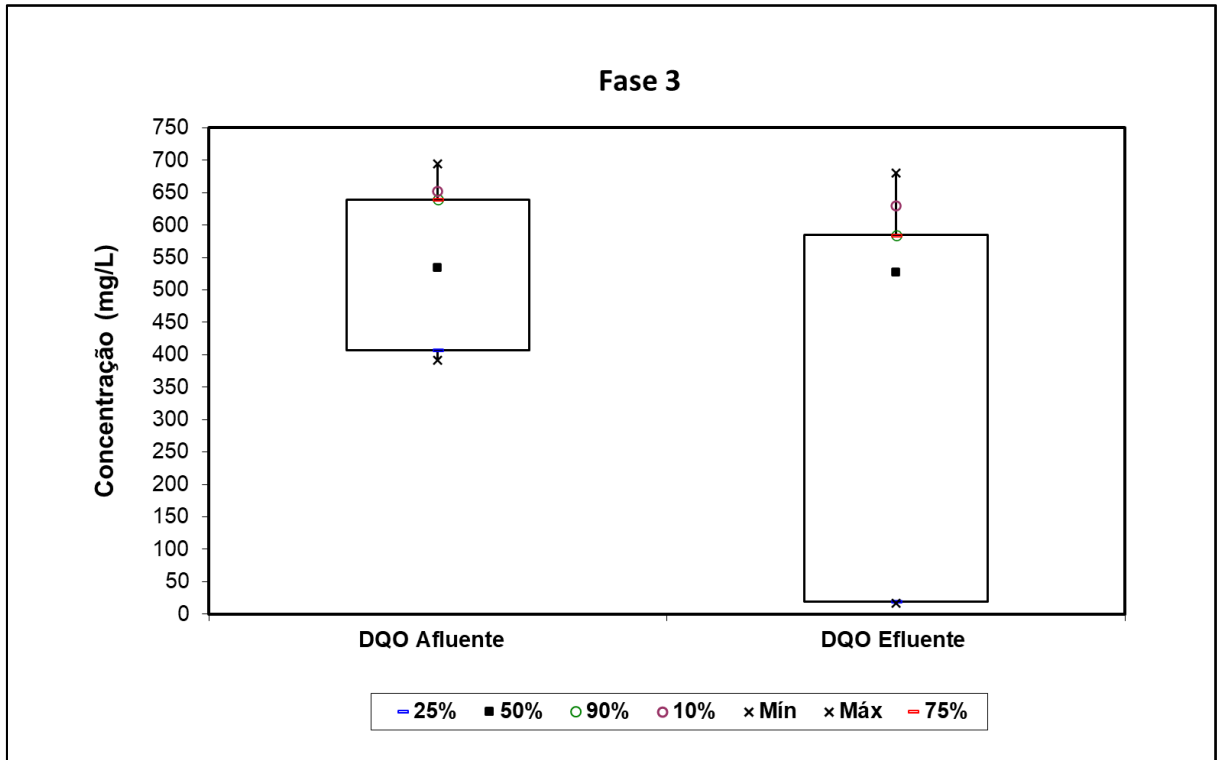
**Figura 5.27 - Concentração de matéria orgânica (DQO) afluente e efluente no RBS – Fase 3**



A matéria orgânica foi acumulada durante a fase 3, sendo encontrado valores afluentes e efluentes na ordem de 600 a 700 mg/L de DQO. A ampla faixa

interquartílica da DQO efluente reitera o declínio na remoção de matéria orgânica (Figura 5.28). De modo evidente, a diluição aplicada na Fase 3 alterou o comportamento e desempenho do RBS e do seu consórcio microbiano.

Figura 5.28 – Box-plot da concentração de DQO afluente e efluente no RBS – Fase 3



A relação de DQO/N na Fase 3 é expressa na Figura 5.29 e Tabela 5.10. Os resultados apresentados nesta etapa indicaram uma relação média de 0,95, com máximo em 1,10 e mínimo em 0,80. Mesmo que a proporção encontrada ainda seja favorável a atividade anammox, esta razão isoladamente não indica ausência de inibição no sistema, uma vez que as concentrações de  $\text{NH}_4^+$  e DQO aumentaram, assim como possivelmente a concentração de outros compostos não analisados neste estudo. Reitera-se a assertiva posta inicialmente de que a performance de um reator é avaliada por um conjunto de parâmetros e fatores integrados e não condições isoladas (MA *et al.*, 2017).

Figura 5.29 - Relação de DQO/N no RBS – Fase 3

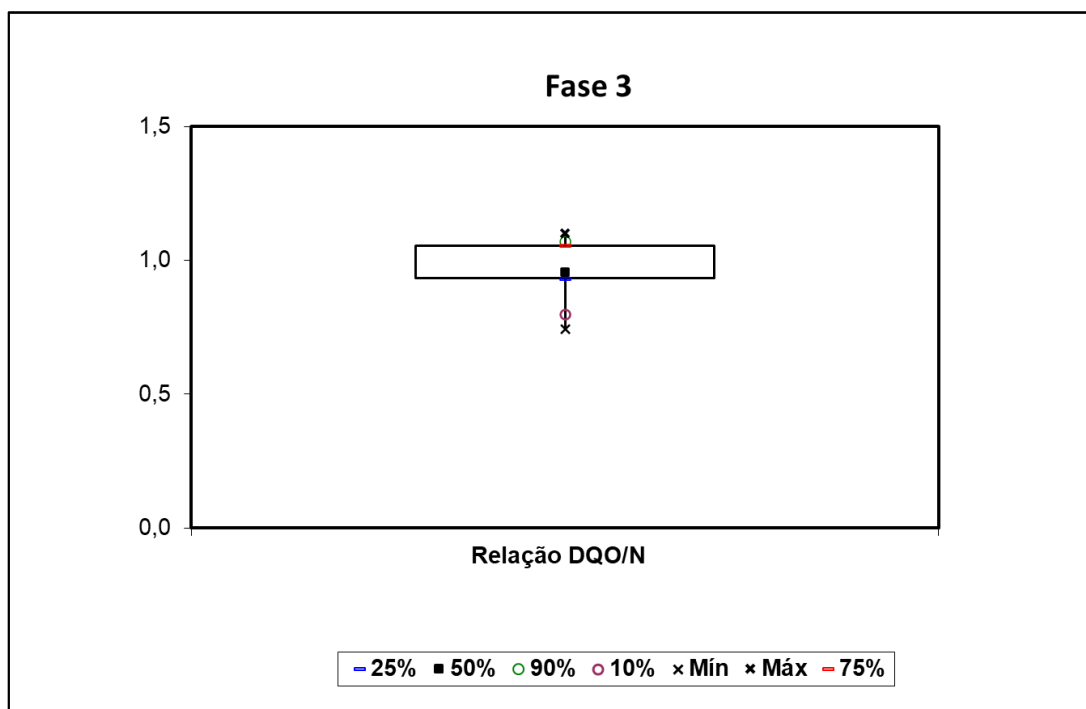


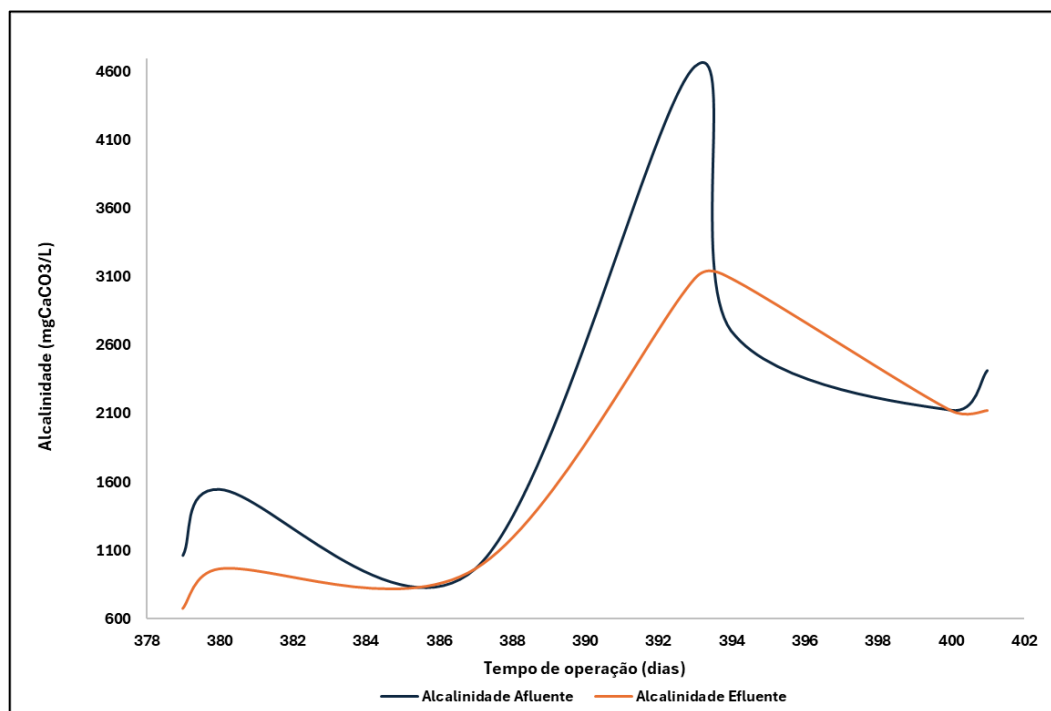
Tabela 5.10 - Estatística descritiva da concentração de DQO afluente e efluente e da relação DQO/N durante a Fase 3 (6% de fertilizante e 94% de efluente anaeróbico de UASB)

Estatística descritiva – medidas de tendência central	DQO afluente (mg/L)	DQO efluente (mg/L)	DQO/N
Nº de dados	9	9	9
Média	531,58	393,67	0,95
Desvio Padrão	166,30	286,24	0,12
Coeficiente de Variação	0,22	0,73	0,12
Mediana	534,5	527,00	0,96
Mínimo	392,00	680,75	0,80
Máximo	694,5	17,00	1,10
Percentil 10%	402,00	18,00	0,80
Percentil 25%	407,00	19,50	0,93
Percentil 75%	639,5	584,50	1,05
Percentil 90%	651,5	629,75	1,07

A matéria orgânica biodegradável afluente na Fase 3 alcançou concentração de 35,3 mg/L, valor esperado frente às características do efluente doméstico anaeróbico do reator UASB e do efluente da indústria de fertilizante. Porém, com eficiência média de remoção de 6%, valor este observado frente a uma remoção de DBO pontual no dia 380. A razão DQO/DBO nesta etapa mostrou-se alta (15,06) reforçando o caráter recalcitrante do efluente testado experimentalmente.

A mistura de 6% de efluente de fertilizante adotada na Fase 3 implicou em concentrações notadamente altas (Figura 5.30), de 2207,332 CaCO<sub>3</sub>mg/L afluente e 1862,437 CaCO<sub>3</sub>mg/L. Os valores afluentes observados superaram em três vezes o valor da fase anterior, podendo ser um dos fatores de grande influência para inibição das bactérias com atividade anammox. A rota metabólica da desnitrificação heterotrófica é capaz de repor em torno de 3,57 mg de alcalinidade (CaCO<sub>3</sub>), por grama de amônia (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) reduzida a nitrogênio gasoso, segundo Ahn (2006), contudo, considerando a hipótese na redução simultânea de micro-organismos heterotróficos e das anammox na Fase 3, notou-se consumo de alcalinidade, na ordem de 20%.

**Figura 5.30 - Alcalinidade afluente e efluente do RBS – Fase 3**



A Fase 3 foi marcada pelas maiores cargas de nitrogênio amoniacal, DQO e alcalinidade do presente estudo e estes compostos, de forma individual ou mesmo sinérgica, podem ter inibido a atividade anammox no RBS.

Wang *et al.* (2024) apresentaram como componentes dos efluentes de quatro indústrias de fertilizante de ureia, o éter, o glicerol, o metanol e o sulfato, além dos compostos nitrogenados, sendo identificado em todos o metanol ou a glicerina. Chen *et al.* (2024) investigaram o impacto do glicerol bruto em sistema com atividade

anammox e detectaram que o metanol é o principal composto do glicerol responsável pela inibição Anammox.

Portanto, traz-se a hipótese de que, além dos compostos caracterizados, o metanol esteja no efluente estudado na presente pesquisa. Para tanto, uma análise da caracterização detalhada deve ser feita, incluindo análise de metais pesados, orgânicos biodegradáveis e recalcitrantes, já que estes compostos podem ser fatores de inibição ao processo (Tabela 3.6).

Verma e Daverey (2024) testaram a eficiência de remoção de nitrogênio de águas residuárias de ureia, utilizando um Reator em Batelada Sequencial de Biofilme (SBBR) com atividade anammox. O estudo demonstrou viabilidade do sistema proposto e apesar de receber, de forma faseada, distintas concentrações de  $\text{NH}_4^+$  afluente (máxima de 400 mg/L) e nitrito afluente (máxima de 528 mg/L), o reator exibiu consistentemente uma eficiência de remoção de nitrogênio  $\geq 80\%$  ao longo de todo o estudo. O experimento em questão durou 225 dias e contou com 15 tratamentos (com aumento gradual das concentrações de nitrogênio amoniacal e nitrito), divididos em 3 fases, até alcançar as concentrações máximas mencionadas. Quanto à duração de cada tratamento, não foi observado um padrão temporal.

Assim, mesmo com altas concentrações de compostos nitrogenados e de outras potenciais substâncias inibitórias da atividade anammox, uma abordagem metodológica com um número maior de tratamentos entre Fases, poderia não ter inibido as bactérias anammox na Fase 3.

#### 5.2.4 Comparação dos resultados obtidos nas Fases 1, 2 e 3

Após a etapa de enriquecimento que durou 267 dias, o RBS foi operado por 136 dias, em três fases distintas de diluição do efluente de fertilizante nitrogenado: a) Fase 1 – a 1% de Fertilizante e 99% de efluente doméstico de reator UASB; b) Fase 2 – a 2% de Fertilizante e 98% de efluente doméstico de reator UASB; c) Fase 3 – a 6% de Fertilizante e 94% de efluente doméstico de reator UASB. A Figura 5.31 apresenta a dinâmica dos compostos nitrogenados nas três fases operacionais.

Ao final das três etapas testadas, observou-se elevado consumo de nitrogênio amoniacal e nitrito nas Fases 1 e 2, indicando resistência das bactérias com atividade anammox. Além disso, potencialmente houve um consórcio microbiano com bactérias heterotróficas desnitrificantes consumidoras de matéria orgânica, visto que as fases não demonstraram inibição quando da presença de DQO e alcalinidade.

Não foi observada diferença estatística (APENDICE B) entre os resultados das Fases 1 e 2, no que se refere às concentrações de  $\text{NH}_4^+$  e nitrito, afluentes e efluentes ao RBS. Também não houve diferença significativa entre as eficiências de remoção de  $\text{NH}_4^+$  e nitrito. Portanto, o aumento da concentração do efluente de fertilizante entre as fases de 1% para 2% (mudança de diluição de 1:100 para 1:50) não interferiu no desempenho do RBS com atividade anammox. Mesmo que os testes estatísticos não tenham indicado diferença entre as médias, notou-se aumento gradual da eficiência de remoção de  $\text{NH}_4^+$  na Fase 1, enquanto na Fase 2 a eficiência oscilou durante todo o período de controle. Acredita-se que na primeira etapa a biomassa estava mais aclimatada às condições iniciais de enriquecimento do que na Fase seguinte, pois mesmo que as concentrações afluentes não tenham sido distintas, o teste estatístico revelou diferença significativa entre a DQO afluente e efluente.

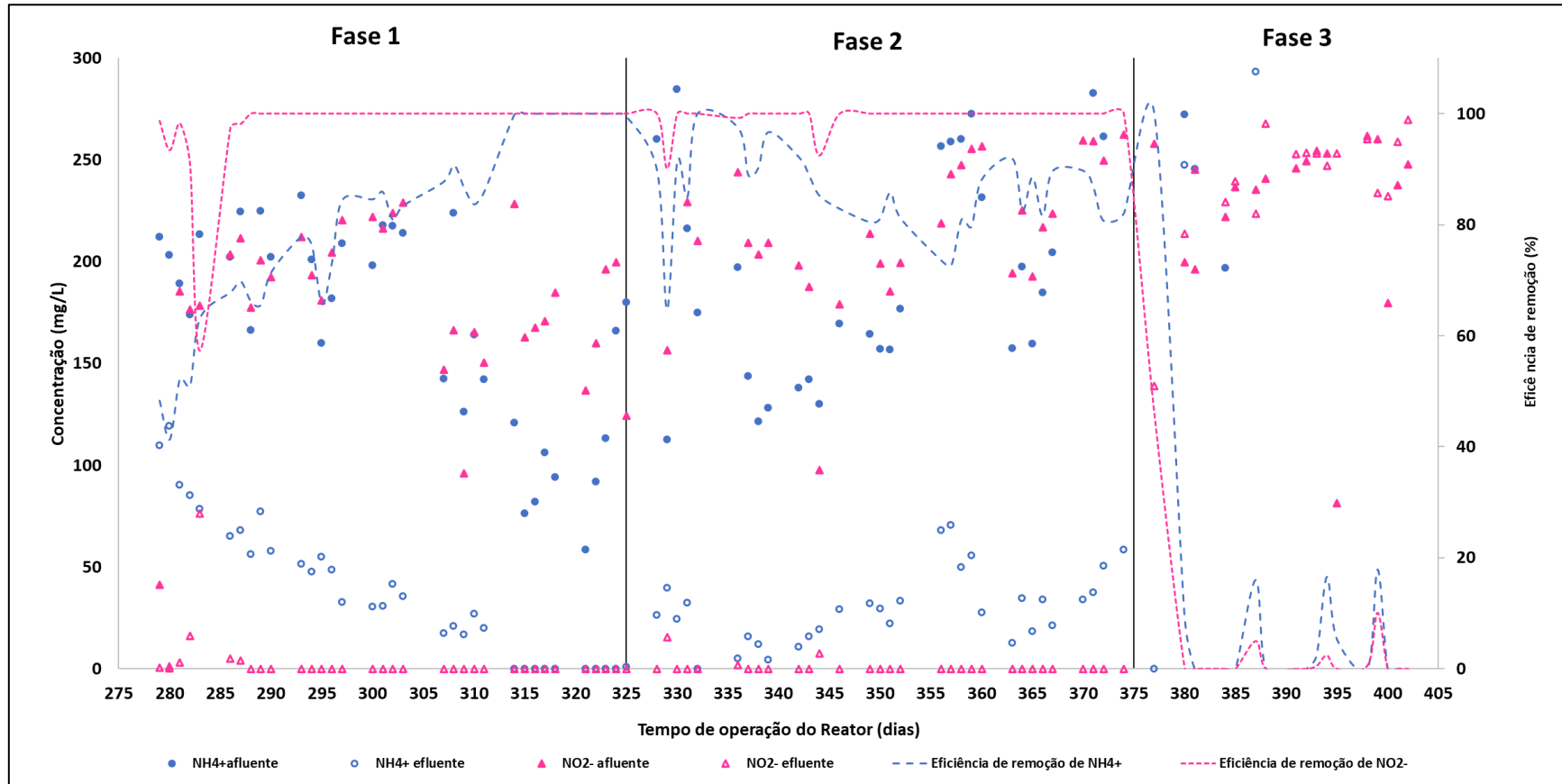
Ao comparar a Fase 3 com as demais, os resultados da concentração da  $\text{NH}_4^+$  afluente foram significativamente maiores, assim como a eficiência de remoção foi estatisticamente menor. Para o nitrito, a eficiência de remoção também foi significativamente baixa, indicando que a diluição de 6% de efluente de fertilizante não alcançou resultados satisfatórios.

Por fim, a Tabela 5.11 apresenta a estatística descritiva das eficiências de remoção de nitrogênio amoniacal e nitrito nas três fases experimentais.

**Tabela 5.11 - Estatística descritiva da eficiência de remoção de amônio e nitrito observado no RBS nas 3 fases experimentais**

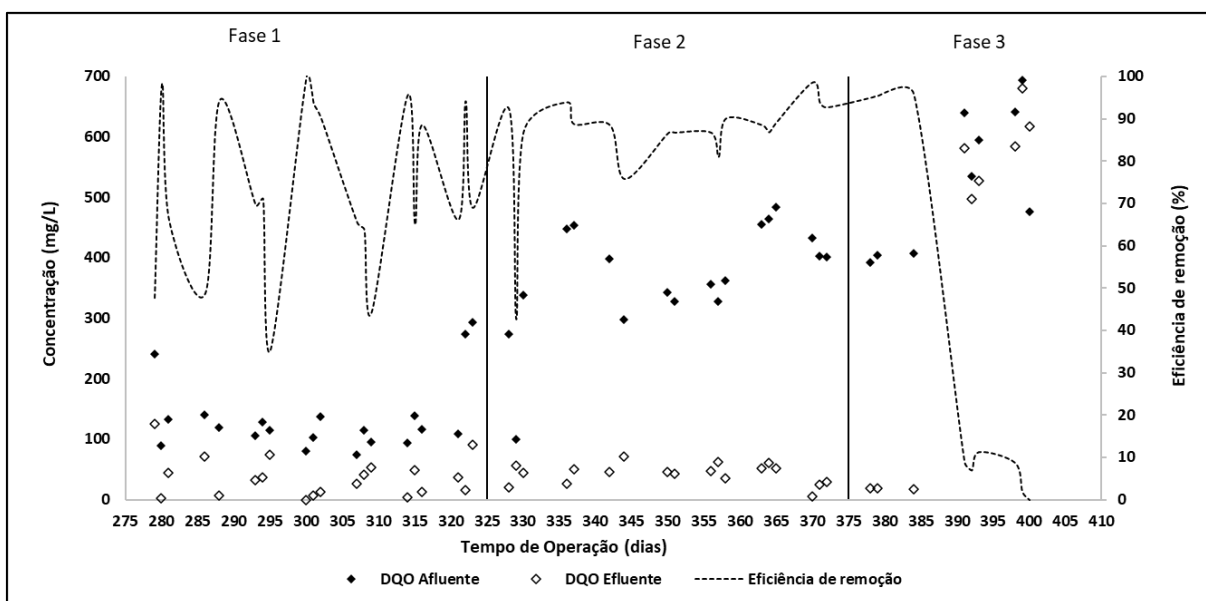
Medidas de tendência central	Fase 1		Fase 2		Fase 3	
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
	T = 35°C	T = 35°C	T = 35°C	T = 35°C	T = 35°C	T = 35°C
Nº de dados	34	34	31	31	19	19
Média	80,68	98,06	85,50	99,41	13,59	3,80
Desvio Padrão	17,15	7,46	7,40	2,20	25,81	10,63
Coefficiente de Variação	0,21	0,08	0,09	0,02	1,90	3,12
Mediana	84,05	100	85,83	100	0	0
Mínimo	41,30	57,32	64,69	90,08	0	0
Máximo	100	100	100	100	100	46,07
Percentil 10%	55,54	97,69	79,67	100	0	0
Percentil 25%	68,33	100	81,15	100	0	0
Percentil 75%	99,87	100	89,79	100	16,28	0,55
Percentil 90%	100	100	92,13	100	37	6

Figura 5.31 - Dinâmica dos compostos nitrogenados durante as três fases da pesquisa



A eficiência de remoção de DQO ao longo do experimento também foi avaliada (Figura 5.32) com o objetivo de verificar se o aumento das concentrações do efluente de fertilizante impactaria na remoção dos compostos nitrogenados e qual seria o comportamento da matéria orgânica no sistema. Ademais, se haveria aumento da concentração de DQO, se haveria consumo ou não e se este parâmetro provocaria inibição das bactérias com atividade anammox.

**Figura 5.32 - Dinâmica da concentração de DQO durante as três fases desta pesquisa**

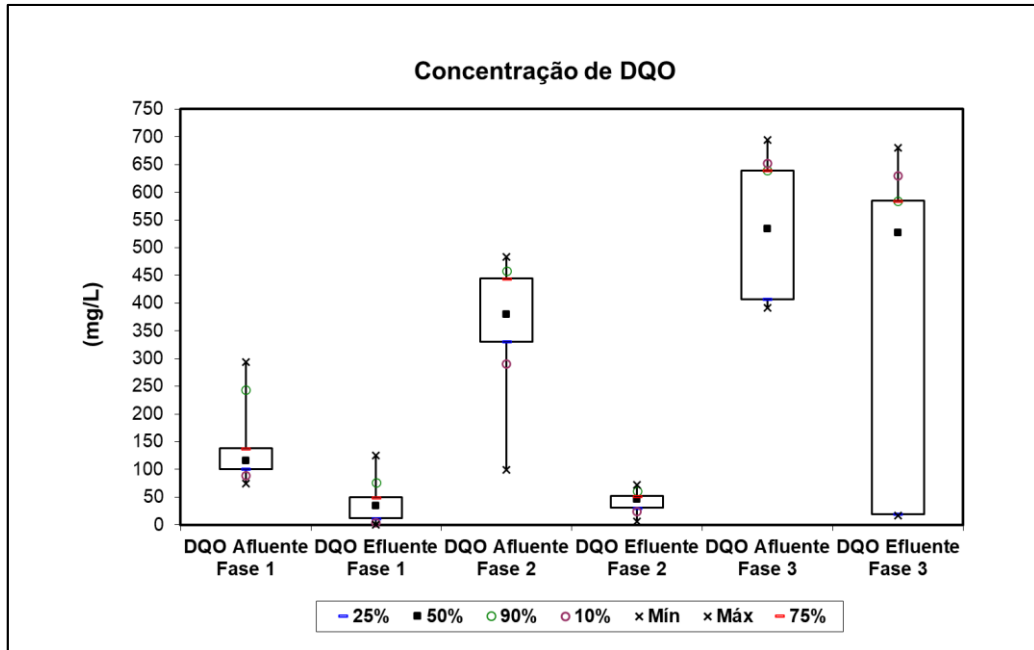


Como observado, a matéria orgânica esteve presente no RBS durante as três etapas experimentais e houve consumo de DQO nas Fases 1 e 2, sem efeitos inibitórios da atividade anammox no RBS. A eficiência de remoção de matéria orgânica durante a Fase 1 apresentou comportamento variável (de certo pelas condições novas impostas ao sistema que antes era alimentado com meio de cultura autotrófico), aumentando ao final da etapa. Na Fase seguinte, o consumo foi mais estável e com alta eficiência de remoção. Acredita-se que em ambas as fases o consumo foi favorecido por micro-organismos heterotróficos desnitrificantes e mesmo apresentando comportamentos distintos no decorrer do experimento, não foi detectada diferença significativa na eficiência de remoção de matéria orgânica entre elas.

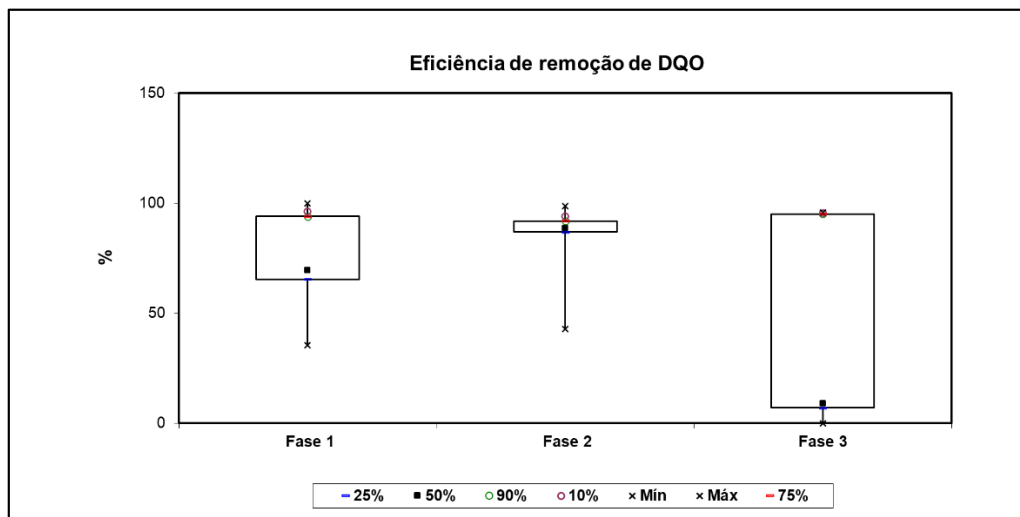
A Fase 3 apresentou concentrações afluentes significativamente maiores do que as demais, na ordem de 500 mg/L. O consumo foi observado inicialmente e declinou para eficiências baixas, por fim, nula. Em concomitância, houve decaimento na remoção dos compostos nitrogenados de maior interesse, nitrogênio amoniacal e nitrito,

prejudicando a performance do RBS. As Figura 5.33 e Figura 5.34, apresentam, respectivamente, a concentração de DQO ao longo do período experimental e a sua eficiência de remoção.

**Figura 5.33 - Concentração de DQO afluente e efluente durante as 3 fases operacionais (Fase 1, 1% de Fert.), (Fase 2, 2% de Fert.) e (Fase 3, 6% de Fert.).**



**Figura 5.34 – Eficiência de remoção de DQO durante as 3 fases**



A alcalinidade, mesmo não sendo o principal parâmetro de interesse, foi monitorada durante as 3 fases operacionais, já que o efluente bruto de fertilizante apresentou uma

concentração na ordem de 20.000 mg  $\text{CaCO}_3/\text{L}$ , podendo ser um fator de inibição quando do aumento das concentrações da mistura (efluente anaeróbico + efluente de fertilizante) afluente ao reator.

Em fenômeno similar ao parâmetro DQO, as duas primeiras fases do experimento não foram prejudicadas pela alcalinidade e não foi observada inibição das bactérias com atividade anammox. A alcalinidade pouco foi consumida na Fase 1 e 2, com eficiências de remoção de aproximadamente 9% e 3%, respectivamente, sem diferença estatística entre estas remoções. Já na Fase 3, as concentrações afluente e efluente foram significativamente maiores do que nas Fases 1 e 2, mas, apresentou 17% de consumo de alcalinidade, que não se diferiu estatisticamente das eficiências supramencionadas. As Figura 5.35 e

**Figura 5.36** apresentam, respectivamente, o comportamento da alcalinidade ao longo desta pesquisa e a concentração afluente e efluente durante as fases operacionais.

**Figura 5.35 - Dinâmica da alcalinidade durante a pesquisa**

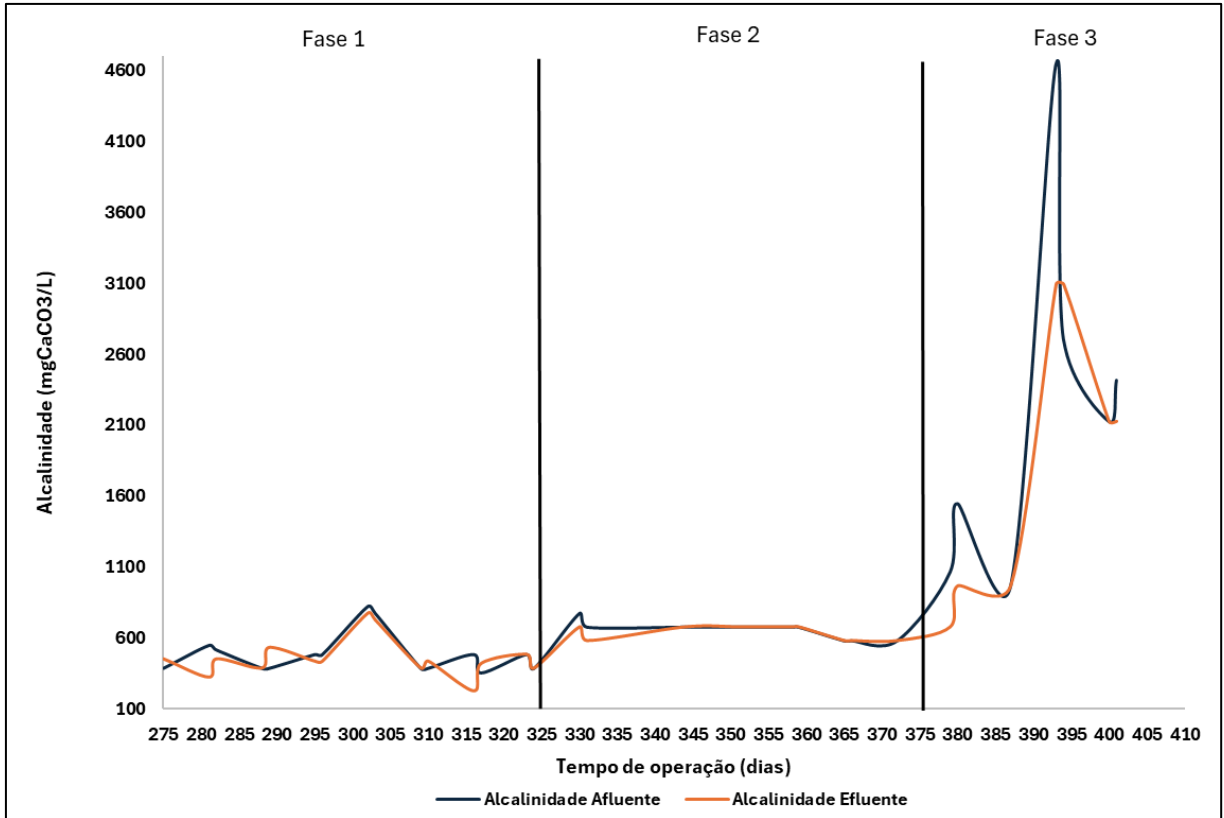
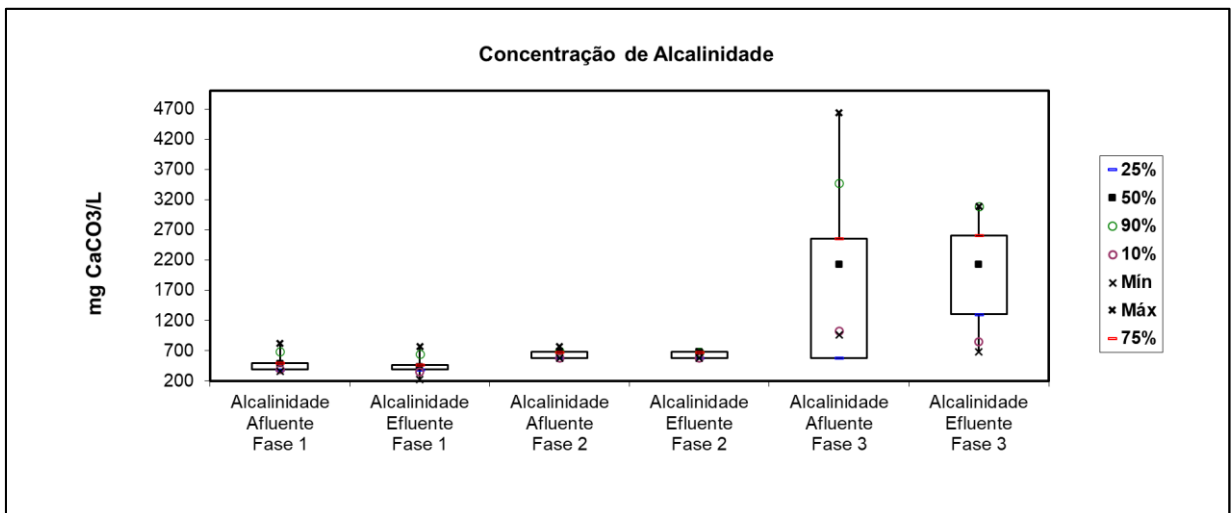


Figura 5.36 - Alcalinidade afluente e efluente medidas durante a 3 fases operacionais (Fase 1, 1% de Fert.), (Fase 2, 2% de Fert.) e (Fase 3, 6% de Fert.).



A Tabela 5.12 apresenta resumidamente as principais características avaliadas durante esta pesquisa

**Tabela 5.12 - Resumo dos principais parâmetros avaliados durante a pesquisa**

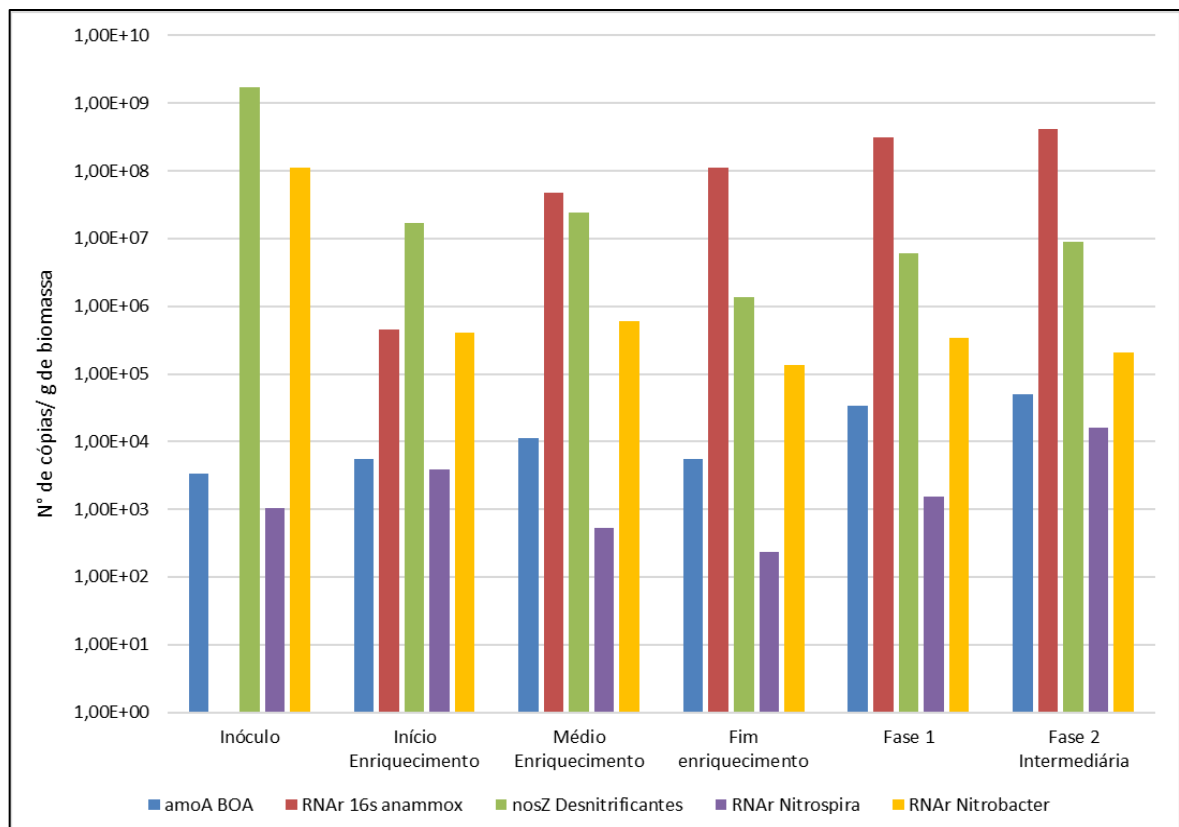
<b>Parâmetros</b>	<b>Fase de Enriquecimento</b>	<b>Fase 1</b>	<b>Fase 2</b>	<b>Fase 3</b>
Carga de N total (amônia +nitrito) (g.m <sup>3</sup> d <sup>-1</sup> )	11,08	34,29	42,75	56,90
Concentração de amônia afluente (mg/L)	50,92	168,6	201,82	365,40
Concentração de nitrito afluente (mg/L)	59,84	174,32	225,70	227,05
Concentração de DQO afluente (mg/L)	-	135,04	370,54	531,58
Eficiência de remoção de N total (%)	90,17	88,11	92,78	7,38
Eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal (%)	87,40	80,69	85,50	13,60
Eficiência de remoção de nitrito (%)	92,49	98,06	99,41	3,40
Eficiência de remoção de DQO (%)	-	74,76	86,16	36,05
Coeficiente nitrito/amônio	1,26	1,37	1,35	0,13
Coeficiente nitrato/amônio	-	0,008	0,006	-
Relação DQO/N	-	0,45	0,90	0,95
Concentração afluente de alcalinidade (mgCaCO <sub>3</sub> /L)	-	483,93	654,54	2207,33

### 5.3 Quantificação das bactérias do ciclo do nitrogênio pela técnica de qPCR

A quantificação de bactérias totais, bactérias anammox, bactérias desnitrificantes, bactérias oxidadoras de amônia e bactérias oxidadoras de nitrito (gêneros *Nitrospira* e *Nitrobacter*) pela técnica de PCR em tempo real na biomassa do reator foi realizada. Cabe ressaltar que foram avaliadas seis condições operacionais - resultando em 6 amostras de biomassa, incluindo o enriquecimento e excluindo a Fase 3, frente ao planejamento experimental desta pesquisa e ao tempo necessário para a conclusão das análises: 1- Inóculo; 2- Enriquecimento intermediário das anammox; 3 - Enriquecimento com identificação de atividade anammox; 4 - Fim do enriquecimento; 5 - Fim da Fase 1; 6 - Metade da Fase 2.

A Figura 5.37 demonstra as estimativas das quantificações do número de cópias dos genes por grama de lodo das bactérias identificadas no RBS. Registra-se que para as desnitrificantes, foram quantificadas as bactérias que realizam a desnitrificação completa, portanto, gene nosZ.

**Figura 5.37 - Estimativa do número de cópias dos genes de bactérias nas fases de enriquecimento e operacionais da pesquisa**



Os resultados revelaram que no inóculo não houve detecção do gene RNAr 16s das bactérias anammox, sendo identificado em maior concentração as bactérias desnitrificantes ( $1,72 \times 10^9$  cópias/ g de lodo) e as oxidadoras de nitrito do gênero *Nitrobacter* ( $1,11 \times 10^8$  cópias/ g de lodo). Os resultados encontrados foram esperados visto que ainda não haviam sido estabelecidas as condições favoráveis de enriquecimento das bactérias com atividade anammox.

Na transição entre as etapas de início e fim de enriquecimento, as concentrações de bactéria anammox aumentaram de  $4,49 \times 10^5$  cópias/ g de lodo, para  $4,82 \times 10^7$  e  $1,13 \times 10^8$  cópias/ g de lodo, indicando ótimo desempenho do sistema e corroborando com as análises físico-químicas apresentadas neste estudo. Para estas mesmas condições, enriquecimento das anammox com meio mineral e autotrófico (sem matéria orgânica), observou-se redução na concentração das desnitrificantes: de  $1,68 \times 10^7$  para  $1,37 \times 10^6$  cópias/g de lodo, respectivamente. O gênero *Nitrobacter* também foi impactado pela transição do inóculo para o enriquecimento, visto o favorecimento de condições anaeróbias no RBS.

Da condição final de enriquecimento para a Fase 1, o RBS deixou de ser alimentado com meio de cultura autotrófico e recebeu efluente real (misto de efluente anaeróbio de UASB com efluente de fertilizante). Pode-se notar que nesta nova Fase do experimento, bactérias anammox alcançaram  $3,12 \times 10^8$  cópias/ g de lodo, maior quantificação observada desde o *restart* do RBS. As desnitrificantes também aumentaram na referida etapa para  $6,06 \times 10^6$  cópias/ g de lodo.

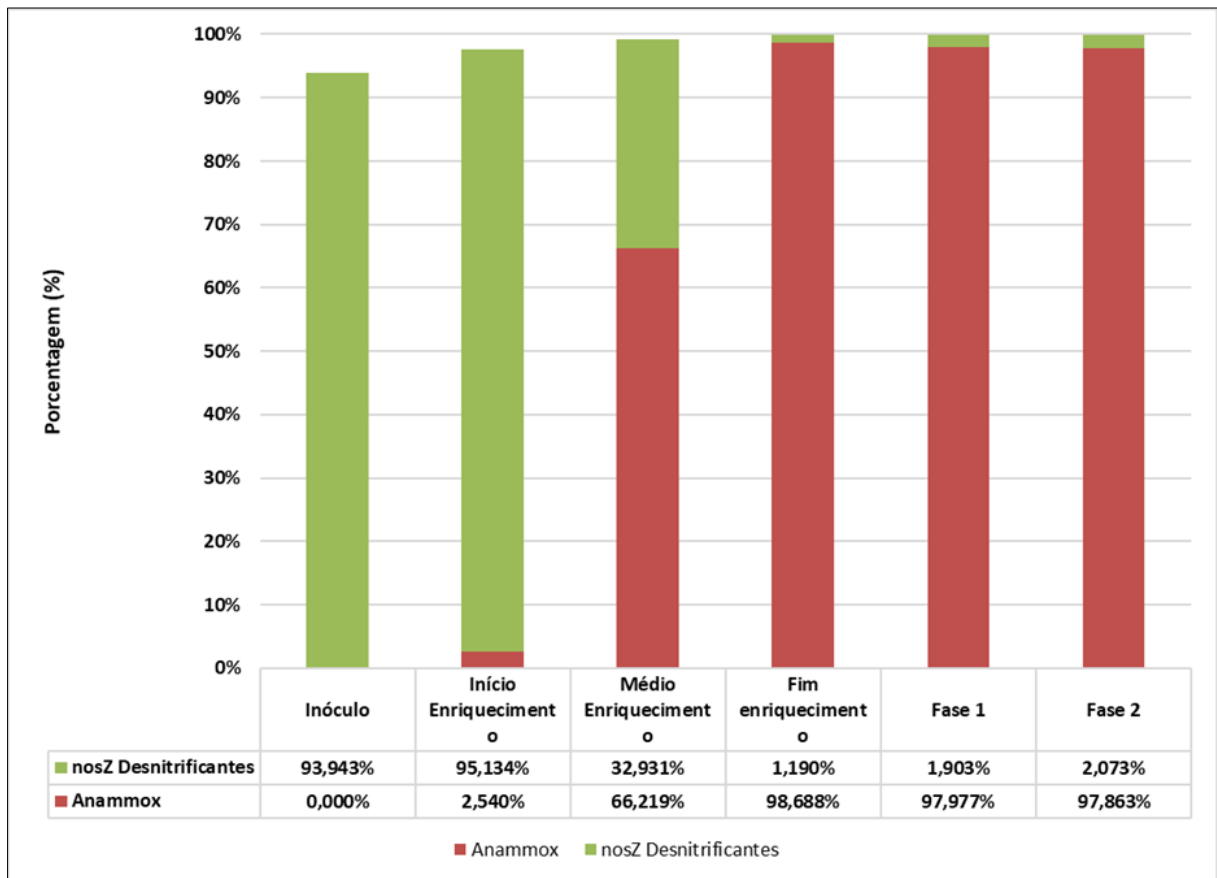
Já na metade da Fase 2, a concentração das bactérias anammox foi de  $4,49 \times 10^8$  cópias/g de lodo, ainda maior do que na Fase 1, e a população de desnitrificantes foi de  $8,87 \times 10^6$  cópias/ g de lodo, de fato indicando um consórcio entre os dois grupos mencionados e corroborando com a hipótese da ocorrência de desnitrificação no sistema.

Ademais, foi possível observar que a alimentação do RBS com meio de cultura provocou a redução das bactérias desnitrificantes, de  $1,72 \times 10^9$  cópias/g de lodo no inóculo para  $1,68 \times 10^7$  cópias/g de lodo,  $2,40 \times 10^7$  cópias/g de lodo,  $1,37 \times 10^6$  cópias/g de lodo nas fases inicial, intermediária e final de enriquecimento, respectivamente. Quando do início da alimentação com o efluente real, observou-se pequeno aumento

de  $1,37 \times 10^6$  para  $6,06 \times 10^6$  cópias/g de lodo de desnitrificantes (Fase 1). Da Fase 1 para a 2, foi notado crescimento em valor absoluto de  $6,06 \times 10^6$  para  $8,87 \times 10^6$  cópias/g de lodo de desnitrificantes, na mesma ordem de grandeza.

A Figura 5.38 apresenta a abundância relativa, em porcentagem, dos grupos com maior população identificados nesta pesquisa, bactérias anammox e desnitrificantes, em relação à quantificação de bactérias totais (soma dos grupos de bactérias anammox com as desnitrificantes).

**Figura 5.38 - Abundância relativa de bactérias anammox e desnitrificantes em relação ao número total de bactérias, determinada pelo qPCR, nas fases de enriquecimento e operacional da pesquisa**



Em níveis percentuais, a Fase 1 apresentou 98% de bactérias anammox e 2% de bactérias desnitrificantes. Portanto, o desempenho do RBS durante a Fase 1 não foi prejudicado pela transição dos efluentes, sintético para real, e as bactérias com atividade anammox não foram inibidas. Inclusive, nesta fase o reator apresentou bom desempenho de remoção dos substratos nitrogênio amoniacal e nitrito, sendo 80,69%

e 98,06%, respectivamente e boa remoção de 74,76% de DQO, esperada pela presença e confirmação das bactérias desnitrificantes.

Na Fase 2 intermediária, com 2% de efluente de fertilizante, detectou-se ligeiro aumento das bactérias anammox, com concentração de RNAr 16 S de  $4,19 \times 10^8$  cópias/ g de lodo e das desnitrificantes, com concentração de  $8,87 \times 10^6$ . A partir dos resultados apresentados, percebeu-se ainda excelente desempenho do RBS, e cooperação entre os dois grupos mencionados. Em níveis percentuais, a Fase 2 apresentou resultados similares aos da Fase 1, sem indícios de inibição das bactérias com atividade anammox e continuidade do sistema de cooperação entre os grupos de maior abundância.

Bactérias anammox podem trabalhar em cooperação e/ ou competição com outros grupos de micro-organismos do ciclo do nitrogênio, como os nitrificantes e desnitrificantes (KARTAL *et al.*, 2012). No presente estudo, bactérias anammox e desnitrificantes foram capazes de coexistir em condições sem inibição do primeiro grupo nas duas Fases operacionais. O processo simultâneo de bactérias anammox com a desnitrificação ou SAD (*Simultaneous anammox and denitrification*) é comum em tratamento de efluentes que possuem nitrogênio amoniacal, nitrito, nitrato e matéria orgânica (AZARI, LUBKEN, DENECKE, 2017; TAKEKAWA *et al.* 2014; ZHANG, WANG, DAI, 2020).

Em geral, a literatura reporta três tipos de SAD. No primeiro, as bactérias anammox obtém nitrito a partir da desnitratação, com o nitrato servindo como substrato ao processo metabólico. No segundo tipo, o processo anammox e a desnitrificação contribuem coletivamente para a remoção de nitrito, especialmente quando nitrito é um substrato predominante em comparação com a amônia ( $\text{NH}_4^+$ ). Já no terceiro tipo, nitrato e nitrito são removidos pelo processo completo de desnitratação e desnitratação, tratando efluente ricos em  $\text{NH}_4^+$ , independente se o nitrito ou o nitrato é apresentado como o acceptor principal de elétrons (WANG, GONG, PENG, 2021). O gene nosZ quantificado foi abundante durante esta pesquisa, revelando que o terceiro tipo de SAD foi preponderante.

## 5.4 Dinâmica e composição da comunidade microbiana no tratamento do efluente da indústria de fertilizantes nitrogenados.

### 5.4.1 Diversidade a nível de filo

Para esta pesquisa, foi avaliada a dinâmica da comunidade microbiana do RBS durante as etapas operacionais, resultando em 6 amostras: Inóculo (Amostra 1), Enriquecimento com 70 dias (Amostra 2), Enriquecimento com 135 dias (Amostra 3), Enriquecimento com 267 dias (Amostra 4), Fim da fase 1, com 328 dias (Amostra 5) e Fase 2 intermediária com 363 dias (Amostra 6).

As discussões quanto à diversidade microbiana no RBS foram realizadas a nível de filo e gênero. A abundância relativa dos filios (eixo y) nas amostras coletadas no RBS é apresentada na

Figura 5.39. Constatou-se que não houve diferença na comunidade microbiana durante as fases de enriquecimento (amostras 2, 3 e 4). Também não foi observada alteração na composição da comunidade após a adição de efluente de fertilizante diluído (amostras 5 e 6).

Proteobacteria, Actinobacteria, Planctomycetota, Firmicutes, Verrucomicrobiota e Chloroflexi foram os filios dominantes. Estes filios têm sido frequentemente encontrados em processos anammox, tratando efluentes em distintas condições operacionais (CARVALHO *et al.*, 2021; CHEN *et al.* 2021c; REN *et al.*, 2022). Pereira (2018) reportou que bactérias pertencentes aos filios Proteobacteria e Chloroflexi estão sempre presentes em reatores anammox juntamente com o filo Planctomycetes. De maneira recorrente, micro-organismos incluídos nos filios Acidobacteria, Chlorobi e Bacteroidetes e têm sido encontrados.

Considerando os 10 primeiros filios mais abundantes de cada amostra, estes representaram de 43,5% a 67,5% do total. Fernandes (2023) identificou Proteobacteria, Chloroflexi, Bacteroidetes, Zixibacteria, Acidobacteria e Latesbacteria como filios dominantes em reator de NP/A tratando lixiviado maduro de aterro sanitário diluído em efluente anaeróbico doméstico, representando de 84,3% a 91,2% do total. Pereira *et al.* (2019) tratando digestato de resíduos alimentares identificaram

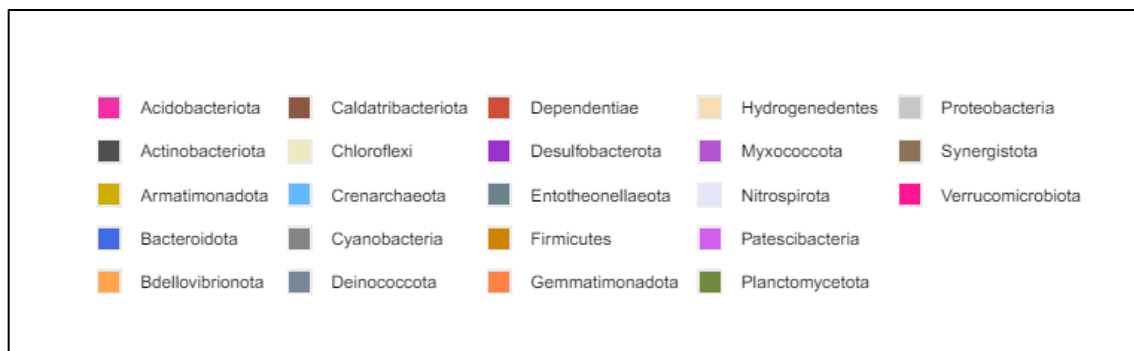
Proteobacteria, Planctomycetota, Chloroflexi, Bacteroidetes e Acidobacteria como os mais abundantes, correspondendo a 81% a 93%. Verma e Daverey (2024) identificaram em reator anammox tratando efluente de ureia os filos Planctomycetota, Nitrospirae, Proteobacteria e Bacteroidetes. Zhang *et al.* (2021a) reportaram como mais abundantes os filos Proteobacteria, Bacteroidetes e Planctomycetota co-tratando lixiviado maduro com efluente anaeróbio doméstico, via processo de nitrificação, anammox e de desnitrificação.

Nota-se grande diferença entre os resultados de abundância relativa de filos do presente estudo em comparação aos estudos referenciados, possivelmente devido ao fertilizante nitrogenado, que foi a principal diferença entre os trabalhos acima mencionados. Apesar disso, alguns filos foram comuns, como Planctomycetota, Chloroflexi e Proteobacteria. Pereira *et al.* (2017) constataram que independentemente da configuração do reator, das condições de operação e do tipo de inóculo utilizado, a presença frequente desses filos indica que eles desempenham papéis importantes nesses sistemas. Isto pode justificar a presença dos filos no RBS da presente pesquisa, uma vez que apesar do inóculo ter a mesma origem do inóculo de Pereira *et al.* (2017) e Fernandes (2023), os efluentes empregados foram diferentes.

Proteobacteria foi o grupo com maior abundância relativa em todas as Fases excetuando o inóculo, representando, respectivamente, 41%; 41,8%; 40,7%; 40,2%, 40,3% e 43,2%, não sofrendo, portanto, reduções expressivas entre as Fases.

O filo Proteobacteria é o grupo mais diversificado de bactérias gram-negativas. Os micro-organismos que representam esse grupo possuem distintos mecanismos para produção de energia, com espécies fototróficas, quimiolitotróficas e quimiorganotróficas. Também são fisiologicamente diversos e incluem formas aeróbias, anaeróbias, microaeróbias e aeróbias facultativas (MADGAN *et al.*, 2016). Ainda dentro deste filo, são encontrados micro-organismos que realizam a desnitrificação heterotrófica, como membros das ordens: Rhodospirillales, Burkholderiales, Rhodocyclales, Pseudomonadales, Rhizobiales. Isso pode justificar sua presença nas diferentes condições operacionais adotadas e, portanto, nas amostras sequenciadas.

**Figura 5.39 - Abundância relativa dos filos nas amostras do RBS anammox no tratamento de efluente de fertilizante nitrogenado diluído com efluente anaeróbio doméstico**



O filo Planctomycetota foi o segundo filo mais abundante no inóculo, como mostra a Figura 5.39. No decorrer das fases experimentais houve declínio deste grupo, apesar de ainda apresentar cooperação com os demais grupos microbianos identificados pelo desempenho observado do reator. No inóculo (amostra 1) este filo apresentou 26,5% de abundância relativa. Contudo, durante a bioaugmentação das bactérias com atividade anammox, notou-se sua expressiva redução para valores na ordem de grandeza de 2%: 2,5%, 2,6%, 3,8%, 3,9% e 3,3% para as amostras 2, 3, 4, 5 e 6,

respectivamente. Nota-se que a Fase 1 - amostra 5, em que os efluentes reais já foram inseridos no RBS e cujo desempenho em termos de eficiência alcançou 88,11% de remoção de nitrogênio, não provocou redução desse filo, em ordem de grandeza. Redução de Planctomycetota já foi reportada sem prejuízo observado no desempenho de reator com atividade anammox (PEREIRA, 2018).

Conforme mencionado e observado na

Figura 5.39, houve uma redução do filo Planctomycetota da amostra 1 para a 2. Entretanto, a abundância relativa se manteve semelhante nas demais amostras mesmo com as diferentes condições impostas. Vale mencionar que a quantificação do RNAr 16S de anammox apresentou  $3,12 \times 10^8$  cópias/ g de lodo para a amostra 5 e o SNG apresentou 3,9% de abundância relativa, maior valor entre as amostras de biomassa analisadas, em consonância também com o melhor desempenho do RBS. Dessa forma, observa-se que mesmo com a redução deste filo apresentada pelo SNG, a atividade anammox se manteve estável no reator.

Actinobacteriota aumentaram em proporção do inóculo (7,1%) para as demais fases operacionais (19,7%, 21,5%, 19,6%, 19,8% e 21,2%, para as amostras 2, 3, 4, 5 e 6, respectivamente). Verma e Daverey (2024) identificaram o crescimento expressivo na abundância relativa de Actinobactéria (0,79% para 5,91%) em RBS tratando efluente de indústria de ureia. O grupo de bactérias deste filo podem ser aeróbias Gram-positivas ou Gram-variáveis, anaeróbias facultativas ou anaeróbias e são capazes de degradar pesticidas, metais pesados, polímeros e metabolizar matéria orgânica complexa (ALVAREZ *et al.*, 2017). Portanto, o enriquecimento com meio de cultura mineral e autotrófico, ou seja, sem fontes externas de carbono, e, a introdução de fonte externa de carbono a partir do uso de efluente real não diferiram em porcentagem, demonstrando que as bactérias que compõem este filo não foram influenciadas pelo uso do efluente de fertilizante diluído em efluente anaeróbio de reator UASB.

Yang *et al.* (2024) observando as características de granulação do lodo anammox de um RBS alimentado com nitrogênio amoniacal e nitrito, identificaram a dominância dos filos Chloroflexi, Proteobacteria, e Actinobacteriota após sequenciamento da região hipervariável V3-V4 do gene 16S rRNA, usando primers 338F (5'-

ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') e 806R (5' GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'). Os autores constataram que enquanto a abundância relativa dos filões Actinobacteriota e Proteobacteria aumentaram, a abundância do filo ao qual as bactérias anammox (Planctomycetota) pertencem diminuiu e, enquanto o número total de bactérias anammox aumentou, a sua abundância relativa diminuiu.

O filo Firmicutes foi identificado no experimento nas 6 amostras, com abundância relativa na ordem de 8-10% em todas as amostras analisadas, não sendo afetado ou inibido pelo efluente testado. Corresponde ao grupo de bactérias Gram positivas e associa-se a microbiota intestinal humana (DAVEY, HALPERIN, LEE, 2016). A presença deste filo está possivelmente associada ao inóculo, retirado da linha de recirculação de lodos ativados de uma estação de tratamento de efluente doméstico, uma vez que são constantemente encontrados em biorreatores para tratamento de efluentes (ZHANG, SHAO, YE, 2012). *Wei et al.* (2017) também encontraram Proteobacteria, Chloroflexi, Acidobacteria e Firmicutes como dominantes na biomassa de reator anammox com desnitrificação. *Pereira et al.* (2017) avaliando o efeito do fenol sobre o desempenho de reator anammox também verificaram que Firmicutes e Verrucomicrobia estavam entre filões dominantes, contabilizando com outros filões, 2 a 7% do total. Actinobacteria e Firmicutes têm sido relacionadas à degradação de compostos como celulose e lignina (PANKRATOV *et al.*, 2011; PARTANEN *et al.*, 2010).

Na presente pesquisa observou-se que o filo mais favorecido durante todas as fases foi o Proteobacteria, que pode estar vinculado aos micro-organismos desnitrificantes heterotróficos. Em geral, o filo Planctomycetota, que compreende as bactérias com atividade anammox, esteve entre os 10 filões mais abundantes na última etapa de enriquecimento com meio de cultura autotrófico (Amostra 4), e nas etapas com uso de efluente real (Amostras 5 e 6). Entretanto, também foi identificado nas demais amostras, em menor abundância relativa.

#### 5.4.2 Diversidade em nível de gênero

A Figura 5.40 apresenta a abundância relativa dos gêneros (eixo y) nas amostras (eixo x) do RBS com atividade anammox (ver também Anexo A para identificação dos demais gêneros). A Tabela 5.13 apresenta os dez gêneros mais abundantes

identificados pelo sequenciamento nas amostras de biomassa coletadas durante esta pesquisa.

**Figura 5.40 - Abundância relativa dos gêneros nas amostras do RBS anammox no tratamento de efluente de fertilizante nitrogenado diluído com efluente anaeróbico doméstico**



Tabela 5.13 - Os dez gêneros mais abundantes nas sete amostras da biomassa coletadas, durante tratamento de efluente de fertilizante nitrogenado diluído com efluente anaeróbio doméstico

Posição	Amostra 1-Inóculo		Amostra 2 - Enriquecimento 70 dias		Amostra 3 - Enriquecimento 135 dias		Amostra 4 - Enriquecimento 266 dias		Amostra 5 - Efluente diluído (1:100)		Amostra 6 - Efluente diluído (1:50)	
	Gênero	AR	Gênero	AR	Gênero	AR	Gênero	AR	Gênero	AR	Gênero	AR
1	<b>Não id.</b>	23,08%	<b>Não id.</b>	15,34%	<b>Não id.</b>	15,17%	<b>Não id.</b>	14,87%	<b>Não id.</b>	15,03%	<b>Não id.</b>	14,94%
2	<i>Ottowia</i>	13,88%	<i>Conexibacter</i>	6,38%	<i>Conexibacter</i>	5,61%	<i>Conexibacter</i>	5,32%	<i>Conexibacter</i>	6,51%	<i>Conexibacter</i>	5,26%
3	<b>Não id.</b>	6,29%	<i>Acidibacter</i>	4,39%	<i>Acidothermus</i>	4,50%	<i>Acidibacter</i>	3,48%	<i>Acidibacter</i>	4,03%	<i>Acidibacter</i>	4,54%
4	<i>Romboutsia</i>	4,51%	<b>Não id.</b>	3,53%	<b>Não id.</b>	3,28%	<i>Acidothermus</i>	3,38%	<i>Acidothermus</i>	3,33%	<i>Acidothermus</i>	4,34%
5	<i>Ferruginibacter</i>	4,47%	<i>Acidothermus</i>	3,47%	<i>Candidatus</i> <i>Udaeobacter</i>	3,08%	<b>Não id.</b>	3,33%	<i>Candidatus</i> <i>Udaeobacter</i>	3,21%	<i>Bradyrhizobium</i>	3,36%
6	<i>Terrimonas</i>	4,09%	<b>Não id.</b>	3,16%	<i>Acidibacter</i>	2,85%	<b>Não id.</b>	2,92%	<b>Não id.</b>	3,14%	<b>Não id.</b>	3,35%
7	<i>IMCC26207</i>	2,94%	<i>Candidatus</i> <i>Udaeobacter</i>	2,81%	<i>Bradyrhizobium</i>	2,80%	<i>Candidatus</i> <i>Udaeobacter</i>	2,81%	<b>Não id.</b>	2,99%	<b>Não id.</b>	3,29%
8	<b>Não id.</b>	2,80%	<i>Bradyrhizobium</i>	2,38%	<b>Não id.</b>	2,58%	<b>Não id.</b>	2,71%	<b>Não id.</b>	2,73%	<i>Tumebacillus</i>	3,06%
9	<b>Não id.</b>	2,64%	<b>Não id.</b>	2,27%	<i>Tumebacillus</i>	2,39%	<i>Bradyrhizobium</i>	2,49%	<i>Tumebacillus</i>	2,70%	<i>Candidatus</i> <i>Udaeobacter</i>	2,60%
10	<b>Não id.</b>	2,52%	<b>Não id.</b>	2,25%	<i>Bryobacter</i>	2,27%	<b>Não id.</b>	2,22%	<i>Bradyrhizobium</i>	2,40%	<b>Não id.</b>	2,60%
89									<i>Candidatus</i> <i>Brocadia</i>	0,15%		

Como observado na tabela, os gêneros mais abundantes das amostras 1 a 6 (Posição 1) não foram identificados. Assim, para melhor compreensão da funcionalidade dos microrganismos que estiveram mais abundantes em cada amostra, de forma exclusiva, buscou-se correlacioná-los a nível de Família. No inóculo, o gênero amplificado é representado pela Família *Isosphaeraceae*, que se associa a oxidação de amônia e nitrito e à degradação de matéria orgânica (HOSODA *et al.*, 2022; ZHU *et al.*, 2018).

Nas amostras 2 a 6, os gêneros mais abundantes correlacionam-se a Família *Xanthobacteraceae*, que foram reportadas no estudo de Fan *et al.* (2022) como sendo responsáveis pelo processo de desnitrificação heterotrófica, reiterando a hipótese de um consórcio microbiano com bactérias desnitrificantes no presente estudo. A abundância relativa de *Xanthobacteraceae*, foi notadamente alta em solo contaminado por arsênio e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, estabelecendo esta Família como bioindicador para solos afetados por tais compostos (ZHOU, LIU, HU, 2024).

Os gêneros identificados na Tabela 5.13 não são comumente detectados em reatores anammox e possivelmente correlacionam-se às características do efluente da indústria de fertilizante testado. Gêneros como *Limnobacter* (desnitrificantes), *Thauera* (desnitrificantes), *Comamonadaceae* (desnitrificantes), *Nitrospira* (nitrificante), *Nitrosomonas* (BOA's), *Candidatus Kuenenia* (anammox), *Candidatus Jettenia* (anammox), *Candidatus Brocadia* (anammox) tem sido frequentemente identificados em reatores com alta carga de nitrogênio (Fernandes, 2023; VERMA e DAVEREY, 2024; WU *et al.*, 2019). A Tabela 5.14 apresenta as funções e processos metabólicos encontrados na literatura para os gêneros identificados na Tabela anterior.

Dos gêneros identificados, *Conexibacter* foi o mais abundante nas fases de enriquecimento e alimentação do reator com efluente real. O gênero é conhecido por degradar hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em solos (PAH) (LIANG *et al.*, 2021). Este gênero foi relacionado à desnitrificação parcial e associado à produção de nitrito para crescimento das bactérias anammox em um reator de biofiltro anammox tratando águas residuárias de baixa carga. Neste estudo, o sistema de desnitrificação parcial aliado ao processo anammox (detecção de *Ca. Brocadia*) foram os responsáveis pela

remoção eficiente de nitrogênio no sistema (LIU *et al.*, 2024). *Conexibacter* foi detectada em abundância semelhante (4%) em reator com atividade anammox combinado com remoção biológica de fósforo (LU *et al.*, 2022).

*Acidibacter* foi considerado um indicador de drenagem ácida de minas com alta concentração de metais pesados (ETTAMIMI *et al.*, 2019). Em consonância, o gênero tem sido identificado em espécies de plantas e solos contaminados por Cádmio (Chen *et al.*, 2023). Também foi associado como promotor do crescimento das plantas por favorecer a fixação de nitrogênio (GUPTA *et al.*, 2015). O gênero é acidofílico, exclusivamente composto por bactérias heterotróficas com habilidades para redução de compostos de Fe (III) (Hu *et al.*, 2024). *Acidibacter* tem demonstrado versatilidade heterotrófica, sendo capaz de metabolizar distintos compostos orgânicos e carboidratos para o seu crescimento, como os PAHs (SHANG *et al.*, 2024). Mesmo heterotrófico, o grupo não foi inibido na fase de enriquecimento com meio de cultura autotrófico, como esperado, e manteve-se constante nas fases de aplicação do efluente de fertilizante.

**Tabela 5.14 - Principais funções, processos e micro-organismos presentes nas fases do RBS durante o tratamento de efluente de fertilizante nitrogenado com efluente anaeróbio doméstico**

(Continua)		
<b>Gênero</b>	<b>Potencial Função</b>	<b>Referências</b>
<i>Acidibacter</i>	Associada a degradação de compostos orgânicos (hidrocarbonetos aromáticos policíclicos) e a redução de Fe (III)	Shang <i>et al.</i> (2024), Hu <i>et al.</i> (2024)
<i>Acidotherrmus</i>	Associada a degradação de compostos orgânicos (celulose, serrapilheira e madeira morta). Também se correlaciona a desnitrificação e a produção de óxido nitroso.	Ward <i>et al.</i> (2009); You, Lu, Huang (2022); Xu <i>et al.</i> (2024); Nie <i>et al.</i> (2018), Yin <i>et al.</i> (2023)
<i>Bradyrhizobium</i>	Tem sido associada a degradação de compostos orgânicos (aromáticos clorados)	Gao <i>et al.</i> (2024)
<i>Bryobacter</i>	Associada a utilização de nitrato e produtos microbianos solúveis produzidos por bactérias anammox, aumentando a capacidade de sobrevivência de bactérias anammox em ambientes orgânicos.	Silveira <i>et al.</i> (2021)
<i>Candidatus Udaeobacter</i>	Tem sido associada a urease em solos “florestais”	Qin <i>et al.</i> (2023)
<i>Conexibacter</i>	Tem sido associada a degradação de compostos orgânicos e a desnitrificação parcial	Liang <i>et al.</i> (2021), Liu <i>et al.</i> , 2024
<i>Ferruginibacter</i>	Associada à degradação de compostos orgânicos e de substâncias poliméricas extracelulares, além de desnitrificação.	Li <i>et al.</i> (2023), Huang <i>et al.</i> (2024)
<i>IMCC26207</i>	Bactéria resistente a metais e redutora de Cr (VI). Tem sido associada a desnitrificação. Forte correlação foi observada entre <i>Ottowia</i> , <i>Terrimonas</i> e <i>IMCC2620</i> , confirmando a associação destes micro-organismos como a desnitrificação	Chi <i>et al.</i> (2023), Zhang <i>et al.</i> (2021b), Li <i>et al.</i> (2024)
<i>Ottowia</i>	Associada à degradação de compostos orgânicos (aromáticos clorados), e a desnitrificação.	Gao <i>et al.</i> (2024), Spring <i>et al.</i> (2004)

(Conclusão)

Gênero	Potencial Função	Referências
<i>Romboutsia</i>	Frequentemente relacionada ao processo de acidificação e produção de ácidos graxos. Capaz de utilizar glicose, frutose, maltose, trealose e sorbitol como única fonte de carbono.	Jiang, Shi, Ng (2021); Wang <i>et al.</i> (2015)
<i>Terrimonas</i>	Tem sido associada à desnitrificação.	Huang <i>et al.</i> (2020)
<i>Tumebacillus</i>	Tem sido associada a oxidação enxofre Seu crescimento foi relacionado a adição de fertilizante orgânico no solo.	Wang <i>et al.</i> (2022b), Syao <i>et al.</i> (2017)

A diversidade microbiana neste estudo aponta para uma efetiva atuação de bactérias desnitrificantes heterotróficas, visto que estas não foram inibidas no enriquecimento e favoreceram o consumo de DQO ao longo das Fases 1 e 2, assim como do nitrato.

Na presente pesquisa, apenas a amostra 5, respectiva à Fase 1 (primeira fase com efluentes reais), detectou *Candidatus Brocadia* com abundância relativa de 0,15%, e não esteve dentro dos dez gêneros mais abundantes, ocupando a posição 89, como referenciado na Tabela 5.13.

Após aplicação de altas cargas de fenol em RBS com atividade anammox, Pereira *et al.* (2014) detectaram o gênero *Ca. Brocadia*, demonstrando que este grupo foi resistente às condições operacionais adversas. Fernandes *et al.* (2018) e Pereira *et al.* (2019) reportaram que *Ca. Brocadia* foi o gênero mais abundante, tratando respectivamente, efluente doméstico e digestato de resíduos alimentares em RBS com atividade anammox. Os reatores foram enriquecidos com lodos ativados, inóculo de mesma origem do presente estudo.

A ausência de detecção do gênero anammox pela técnica de sequenciamento do RNAr 16S nas demais amostras (2,3,4 e 6) não corroborou com as análises físico-químicas realizadas nesta pesquisa, que obtiveram resultados satisfatórios de remoção de nitrogênio amoniacal e nitrito no período de enriquecimento e nas Fases 1 e 2. Vale ressaltar que o qPCR realizado mostrou a presença de anammox utilizando o primer Amx 667 R (ACCAGAAGTTCCACTCTC), aumentando da amostra 2, etapa de enriquecimento, para a amostra 6, final do experimento com efluente real.

Na detecção de atividade anammox (Amostra 4), foram quantificados  $1,13 \times 10^8$  n° cópias/ g de lodo do gene 16S rNA. Na diluição de 1:10, qPCR quantificou  $3,12 \times 10^8$  n° cópias/ g de lodo do gene RNAr 16S de anammox e na razão de diluição de 1:50 aumentou para  $4,49 \times 10^8$  n° cópias/ g de lodo do gene 16S rNA de anammox (Figura 5.37).

Gao *et al.* (2023) avaliaram por meio de diferentes métodos de detecção e sequenciamento a composição da comunidade anammox em reservatórios de petróleo: pirosequenciamento, sequenciamento *Illumina* e metagenoma. A análise combinada de diferentes metodologias mostrou que as bactérias anammox existem

em vários reservatórios de petróleo, mas a sua baixa abundância relativa torna a sua detecção difícil pelo sequenciamento metagenômico. Pirosequenciamento não detectou bactérias anammox em 22 reservatórios geograficamente separados enquanto o sequenciamento *Illumina* detectou o gênero *Anammoximicrobium*, que não é comumente relatado em reatores anammox com o mesmo inóculo e metodologia de enriquecimento empregados nesta pesquisa.

A análise da comunidade microbiana obtida a partir do SNG (MiSeq - *Illumina*) para esta pesquisa pode ter apresentado limitações para identificação das bactérias anammox presentes no RBS, em função do primer usado (menos específico que o primer do qPCR). Por esta ser uma pesquisa pioneira, há poucos estudos investigando o processo anammox associado a efluentes de indústria de fertilizantes nitrogenados e, portanto, a diversidade de bactérias anammox nesta matriz ainda é desconhecida. Autores já relataram desvantagens da amplificação do gene 16S RNAr para análise da diversidade de bactérias anammox, uma vez que nenhum dos primers disponíveis pode ser aplicado a todas as bactérias anammox atualmente relatadas. Ademais, alguns primers resultam na amplificação do gene 16S RNAr de bactérias não anammox, como outras espécies de Planctomycetes (LI *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2020).

Contudo, a técnica de sequenciamento massivo do amplicon 16S rRNAr, usando os primers 515F (GTGYCAGCMGCCGCGGTAA) e o 806R (GGACTACNVGGGTWTCTAAT) para a região V4 do RNAr, na plataforma MiSeq – *Illumina*, se mostrou robusta para os estudos de Pereira *et al.* (2019), Fernandes (2023) e Carvalho *et al.* (2021), utilizando o mesmo inóculo desta pesquisa, com detecção de atividade anammox nas fases testadas. Considerando o exposto e o desempenho verificado do RBS durante as fases do presente estudo, pode ter ocorrido alguma interferência no SNG que não permitiu detectar bactérias anammox. Isto porque tanto bactérias anammox quanto outras bactérias do ciclo do nitrogênio frequentemente relatadas em reatores com atividade anammox não foram relacionadas nas amostras respectivas às etapas de enriquecimento.

## 6 CONCLUSÕES

A aplicação das bactérias com atividade Anammox no tratamento de efluente da indústria de fertilizantes nitrogenados não tem sido o alvo dos principais estudos relacionados ao uso desse processo. Assim, ainda são desconhecidos todos os compostos destes efluentes e os seus potenciais efeitos inibitórios sobre o processo anammox. Dessa forma, após caracterização físico-química do efluente de fertilizante nitrogenado, a diluição em efluente anaeróbio doméstico de reator UASB demonstrou ser uma boa estratégia para viabilizar a aplicação do processo anammox.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, constatou-se que as concentrações de 1% (diluição 1:100) e 2% (diluição 1:50) foram bem-sucedidas para a remoção de nitrogênio dos efluentes, alcançando eficiências médias de remoção de 92% (Fase 2), com cargas de nitrogênio total aplicadas de até 42,75 g.m<sup>3</sup> d<sup>-1</sup>. Quando aplicado 6% de efluente de fertilizante (diluição 1:16,7 e carga de N aplicada de 56,90 g.m<sup>3</sup> d<sup>-1</sup>), o RBS com atividade anammox foi negativamente impactado e não sendo mais observada remoção de nitrogênio amoniacal, indicando inibição das bactérias com atividade anammox.

O RBS exibiu consistentemente remoção de nitrogênio amoniacal e nitrito simultâneos ao consumo de DQO por 110 dias (diluições de 1 e 2%), após observação de desempenho estável do enriquecimento, sendo subsidiado principalmente por Proteobactérias e Actinobactérias. A concentração de bactérias anammox permaneceu na ordem de grandeza de 10<sup>8</sup> n° de cópias/g de lodo durante as fases, promovendo uma associação microbiana com as bactérias heterotróficas desnitrificantes, que se mantiveram na ordem de 10<sup>6</sup> n° de cópias/g de lodo, contribuindo para o desempenho observado.

O gênero *Ca. Brocadia* foi identificado somente na amostra 5 (Fase 1), com 0,15% de abundância relativa, pela técnica de sequenciamento massivo do amplicon 16S rRNA, usando os primers 515F-B (GTGYCAGCMGCCGCGGTAA) e 806R-B (GGACTACNVGGGTWTCTAAT), para amplificação e sequenciamento da região V4 do RNAr 16S de Archaea e Bacteria.

Mesmo com desempenho satisfatório neste experimento, as diluições aplicadas nas Fases 1 e 2 corresponderam a concentrações muito baixas do efluente de fertilizante, mostrando que a aplicação do processo anammox para o efluente *in natura* da indústria de fertilizante é inviável. Em contrapartida, para que concentrações maiores do efluente de fertilizante nitrogenado desta pesquisa sejam aplicáveis ao processo anammox sem efeitos inibitórios, é necessário o uso de um pré-tratamento, visando a degradação dos compostos recalcitrantes e de alta carga, além de uma análise detalhada das características do efluente.

Nesse cenário, os tratamentos físico-químicos e/ou avançados associados ao biológico (anammox) se apresentam como estratégias promissoras, a fim de alcançar a estabilidade observada nas Fases 1 e 2 e para aumentar a escala do processo.

De modo geral, os resultados deste trabalho demonstraram, em um RBS em escala de bancada, o potencial do processo anammox para o tratamento de efluente de indústria de fertilizante nitrogenado. A técnica pode se tornar, portanto, uma alternativa aplicável às indústrias brasileiras produtoras de fertilizantes, que devem atender aos padrões de lançamento de efluentes industriais em corpos d'água, em especial ao nitrogênio amoniacal, limitado a 20 mg/L, pela CONAMA nº 430/11.

## 7 IMPLICAÇÕES/PERSPECTIVAS FUTURAS/RECOMENDAÇÕES

A aplicação do processo anammox aos efluentes da indústria de fertilizantes testado no presente estudo é uma abordagem inovadora a nível nacional e internacional. As características de tais efluentes, bem como os efeitos em processos anammox são escassos perante o potencial de aplicação já iniciado no âmbito de pesquisa. Considerando a relevância da temática e os resultados aqui apresentados, recomenda-se investigações adicionais abarcando:

- Avaliar estratégias de diluições de fertilizante nitrogenado em efluente anaeróbio doméstico entre 2% e 6%, no desempenho do RBS anammox;
- Realizar caracterização do efluente de fertilizantes mais detalhada, incluindo a análise de metais, compostos orgânicos biodegradáveis e recalcitrantes, uma vez que estes (não avaliados nesta pesquisa) podem ter contribuído para a inibição da atividade anammox na diluição de 6%;
- Investigar a associação do processo anammox a processos oxidativos avançados, a fim de se obter um efluente que atenda a padrões mais restritivos de lançamento de nitrogênio amoniacal, como em Minas Gerais-Brasil, que estabelece um limite de 20 mg/L (Deliberação Normativa Conjunta CERH/MG N° 8, de 21 de novembro de 2022);
- Avaliar o desempenho do processo anammox após aplicação de um pré-tratamento por oxidação química;
- Investigar processos físico-químicos que podem ser empregados antes do processo anammox, para tratamento de efluentes de fertilizantes nitrogenados, visando a oxidação da matéria orgânica recalcitrante e demais agentes inibidores do processo anammox;
- Investigar tecnologias de recuperação de amônia que podem ser aplicadas como pré-tratamento de efluentes de fertilizantes nitrogenados, permitindo um melhor desempenho do processo biológico (anammox), a ser empregado consecutivamente.

## 8 REFERÊNCIAS

ADAMS, M.; XIE, J.; KABORE, A. W. J.; CHANG, Y.; XIE, J.; GUO, M.; CHEN, C. Research advances in anammox granular sludge: A review. *Environmental Science and Technology*, v. 52, p. 631-674, 2022.

ADAMS, M.; XIE, J.; KABORE, A. W. J.; CHANG, Y.; XIE, J.; GUO, M.; CHEN, C. Research advances in anammox granular sludge: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, v.52, p. 671-674, 2020.

AFFONSO, L.N.; MARQUES JR, J.L.; LIMA, V. V.C.; GONÇALVES, J.O., BARBOSA, S.C.; PRIMEL, E. G.; BURGO, T. A. L.; DOTTO, G. L.; PINTO, L.A.A.P.; CARDAVAL JR, T. R.S. Removal of fluoride from fertilizer industry effluent using carbon nanotubes stabilized in chitosan sponge. *Journal of Hazardous Materials*, v. 388, 122042, 2020.

AHN, Y. O. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: a review. *Process Biochemistry*, 41:1709-1721, 2006

AKABOCI, T.R.V.; GICH, F.; RUSCALLEDA, M.; BALAGUER, M.D.; COLPRIM, J. Assessment of operational conditions towards mainstream partial nitrification-anammox stability at moderate to low temperature: reactor performance and bacterial community. *Chemical Engineering Journal*, v. 350, p.192–200, 2018.

AKTAN, C.K.; YAPSAKLI, K.; MERTOGLU, B. Short- and long-term effects of copper on anammox under gradually increased copper concentrations. *Biodegradation*, v. 32, p. 273-286, 2021.

AL-HARAHSEH, M; BATIHA, M; KRAISHAN, S.; AL-ZOUBI, H. Precipitation treatment of effluent acidic wastewater from phosphate-containing fertilizer industry: Characterization of solid and liquid products. *Separation and Purification Technology*, v.123, p. 190-199, 2014.

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

ALI, M.; SHAW, D. R.; ZHANG, L.; HAROON, M. F.; NARITA, Y.; EMWAS, A.; S, P. E.; OKABE, S. Aggregation ability of three phylogenetically distant anammox bacterial species. *Water Reserach*, v. 143, p. 10-18, 2018.

ALVAREZ, A.; SAEZ, J. M.; COSTA, J. S. D.; COLIN, V. L.; FUENTES, M. S.; CUOZZO, S. A.; BENIMELI, C. S.; POLTI, M. A.; AMOROSO, M. J. Actinobacteria: Current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metal. *Chemosphere*, v. 166, p. 41-62, 2017.

ANJALI, G., SABUMON, P.C. Unprecedented development of anammox in presence of organic carbon using seed biomass from a tannery common effluent treatment plant (CETP). *Bioresource. Technology*, v. 153, p. 30-38, 2014.

ANTWI, P. et al. Performance, microbial community evolution and neural network modeling of single-stage nitrogen removal by partial-nitrification/anammox process. *Bioresource Technology*, v. 284, n. March, p. 359–372, 2019.

ANNAVAJHALA, M. K.; KAPOOR, V. SANTO-DOMINGO, J.; CHANDRAN, K. Comammox functionality identified in diverse engineered biological wastewater treatment systems. *Environmental Science & Technology*, v. 5, p.110-116, 2018.

ARAUJO, J. C.; CAMPOS, A. C.; CORREA, M. M.; SILVA, E. C.; MATTÉ, M. H. VON SPERLING, M.; CHERNICHARO, C. A. L. Anammox bacteria enrichment and characterization from municipal activated sludge. *Water Science and Technology*, v. 64, p. 1428-1434, 2011.

ARYAL, B.; GURUNG, R.; CAMARGO, A. F.; FONGARO, G.; TREICHEL, H.; MAINALI, B.; ANGOVE, M. J.; NGO, H. H.; GUO, W.; PUADEL, S. R. Nitrous oxide emission in altered nitrogen cycle and implications for climate change. *Environmental Pollution*, v.314, 120272, 2022.

AWATA, T., GOTO, Y., KINDAICHI, T., OZAKI, N., OHASHI, A. Nitrogen removal using an anammox membrane bioreactor at low temperature. *Water Sci. Technol.*, v.72, p. 2148–2153, 2015.

AZARI, M.; LUBKEN, M.; DENECKE, M. Simulation of simultaneous anammox and denitrification for kinetic and physiological characterization of microbial community in a granular biofilm system. *Biochemical Engineering Journal*, v. 127, p.206-216, 2017.

BHANDARI, V. M.; SOROKHAIBAM, L. G.; RANADE, V. V. Industrial wastewater treatment for fertilizer industry—A case study. *Desalination and Water Treatment*, v.57, p. 27934-27944, 2016

BONASSA, G. et al. Organic carbon bioavailability: Is it a good driver to choose the best biological nitrogen removal process? *Science of the Total Environment*, v. 786, p. 147390, 2021.

BRANDSMA, J.; VAN DE VOSSENBERG, J.; RISGAARDPETERSEN, N.; SCHMID, M.C.; ENGSTRÖM, P.; EURENIUS, K.; HULTH, S.; JAESCHKE, A.; ABBAS, B.; HOPMANS, E.C.; STROUS, M.; SCHOUTEN, S.; JETTEN, M.S.M.; DAMSTÉ, J.S.S. A multi-proxy study of anaerobic ammonium oxidation in marine sediments of the Gullmar Fjord, Sweden. *Environmental Microbiology*, v.3, p. 360–366, 2011.

BRASIL. Decreto nº 8.384, de 29 de dezembro de 2014. Altera o Anexo ao Decreto nº 4.954, de 14 de janeiro de 2004, que aprova o Regulamento da Lei nº 6.894, de 16 de dezembro de 1980, que dispõe sobre a inspeção e fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes ou biofertilizantes destinados à agricultura. Brasília. Presidência da República. [2014]. Disponível em: [https://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2011-2014/2014/decreto/D8384.htm](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2014/decreto/D8384.htm). Acesso em: 26 out. 2022.

BRASIL. *Decreto nº 4.954, de 14 de janeiro de 2004*. Altera o Anexo ao Decreto nº 4.954, de 14 de janeiro de 2004, que aprova o Regulamento da Lei nº 6.894, de 16 de dezembro de 1980, que dispõe sobre a inspeção e fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes, ou biofertilizantes,

remineralizadores e substratos para plantas destinados à agricultura. (Redação dada pelo Decreto nº 8.384, de 2014). Brasília. Presidência da República. [2004]. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2004-2006/2004/decreto/d4954.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2004/decreto/d4954.htm). Acesso em: 26 out. 2022.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Departamento de Agroindústria. *Informe Setorial da Área Industrial*. Rio de Janeiro: BNDES, n.16, jan. 2010. Disponível em [https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/1875/2/InformeSetorial-AI\\_n.16%2C%20jan.2010\\_final\\_A.pdf](https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/1875/2/InformeSetorial-AI_n.16%2C%20jan.2010_final_A.pdf). Acesso em: 10 out. 2022.

BRASIL. *Lei nº 6.894*, de 16 de dezembro de 1980. Dispõe sobre a inspeção e a fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes, estimulantes ou biofertilizantes, remineralizadores e substratos para plantas, destinados à agricultura, e dá outras providências. Brasília: Presidência da República, [1980]. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/1980-1988/l6894.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/1980-1988/l6894.htm). Acesso em: 10 out. 2022.

BRASIL. Resolução CONAMA 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. Ministério do Meio Ambiente. [2011]. Disponível em: [http://conama.mma.gov.br/?option=com\\_sisconama&task=arquivo.download&id=627](http://conama.mma.gov.br/?option=com_sisconama&task=arquivo.download&id=627). Acesso em: 10 out. 2022.

BRASIL. Secretaria Especial de Assuntos Estratégicos. *Plano Nacional de Fertilizantes 2050 (PNF 2050)*. Brasília: SAE, 2021. Disponível em: <https://static.poder360.com.br/2022/03/plano-nacional-de-fertilizantes-brasil-2050.pdf>. Acesso em: 10 out. 2022.

BRENNAN, R. B.; CLIFFORD, E.; DEVROEDT, C.; MORRISON, L.; HEALY, M. G. Treatment of landfill leachate in municipal wastewater treatment plants and impacts on effluent ammonium concentrations. *Journal of Environmental Management*, v.188, p.64–72, 2017

BRODA, E. Two kinds of lithotrophs missing in nature. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie*, v. 17, p. 491-493, 1977.

CAMPOS, A. P. *Enriquecimento e caracterização de bactérias anammox para a remoção de nitrogênio amoniacal de efluentes*. Belo Horizonte, 2011, 122p. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017.

CAO, S.; DU, R.; LI, B.; WANG, S.; REN, N.; PENG, Y. Nitrite production from partial-denitrification process fed with low carbon/nitrogen (C/N) domestic wastewater: performance, kinetics and microbial community. *Chemical Engineering Journal*, v. 326, p. 1186-1196, 2017.

CAO, S.; KOACH, K.; DUAN, H.; WELLS, G. F.; YE, L.; ZHAO, Y.; DU, R. In a quest for high-efficiency mainstream partial nitritation-anammox (PN/A) implementation: One-stage or two-stage?. *Science of the Total Environment*, v. 883, 163540, 2023.

CAO, S.;YAN, W.; YU, L.; ZHANG, L.; LAY, W.; ZHOU, Y. Challenges of THP-AD centrate treatment using partial nitritation-anammox (PN/A)–inhibition, biomass washout, low alkalinity, recalcitrant and more. *Water Research*, v. 203, 117555, 2021.

CARVAJAL-ARROYO, J. M.; SUN, W.; SIERRA-ALVAREZ, R.; FIELD, J. A. Inhibition of anaerobic ammonium oxidizing (anammox) enrichment cultures by substrates, metabolites and common wastewater constituents. *Chemosphere*, v. 91, p. 22-27, 2013.

CARVALHO, B. G. P. Efeitos da aeração intermitente e da temperatura no processo de nitrificação parcial/anammox para pós-tratamento de digestato de resíduos alimentares, 2019, 124 p. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.

CARVALHO, B. G. P.; WARRENER, F. A. C.; CASTRO, H. M.; PEREIRA, A. D.; LEAL, C. D.; ARAÚJO, J.C. Aeration strategies and temperature effect on the partial nitritation/anammox process for nitrogen removal: performance and bacterial community assessment. *Bioresource Technology*, v.43, p.3473-3485, 2021.

CARVALHO, B. G. P.; HENRIQUES, D. A.; FERNANDES, L. A.; LEAL, C. D.; ARAÚJO, J. C. Partial nitritation/anammox applied to real anaerobically pretreated domestic sewage under subtropical climate: aeration strategies and nitrogen cycle bacteria. *Environmental Technology*, v.45, p. 1-11, 2024.

CHAMCHOI, N.; NITISORAVUT, S. Anammox enrichment from different conventional sludges. *Chemosphere*, v. 66, n. 11, p. 2225-2232, 2007.

CHAMCHOI, N.; NITISORAVUT, S.; SCHMIDT, J.E. Inactivation of ANAMMOX communities under concurrent operation of anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) and denitrification. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 3331-3336, 2008.

CHANDEL, H.; SHYAM, K.; KUMAR, N.; SHARMA, G.; YADAV, M.; MURUGESAN, S.; THAKUR, S.; SAXENA, G. Anaerobic ammonium oxidation (anammox) technology for nitrogen removal from wastewater: Recent advances and challenges. In: KUMAR, V.; KUMAR, M (ed.). *Integrated Environmental Technologies for Wastewater Treatment and Sustainable Development. India: Elsevier, 2022. Cap 2, p. 23-47.*

CHEN, C.; JIANG, Y.; LIU, J.; ADAMS, M.; CHANG, Y.; GUO, M.; XIE, J.; XIE, J. The structure of anammox granular sludge under varying long-term organic matter stress: Performance, physiochemical and microbial community. *Journal of Cleaner Production*, v.323, 2021a.

CHEN, C.; SUN, F.; ZHANG, H.; WANG, J.; SHEN, Y.; LIANG, X. Evaluation of COD effect on anammox process and microbial communities in the anaerobic baffled reactor (ABR). *Bioresource. Technology*. v. 216, p.571–578, 2016.

CHEN, C.; WANG, Y.; JIANG, Y.; GUO, M.; CUI, M.; ZHANG, T.C. Effects of organic-matter-induced short-term stresses on performance and population dynamics of anammox systems. *Journal of Environmental Engineering*, v. 146, 04020120, 2020b.

CHEN, G.; ZHANG, Y.; WANG, X.; CHEN, F.; LIN, L.; RUAN, Q.; WANG, Y.; WANG, F.; CAO, W.; CHIANG, P. Optimizing of operation strategies of the single-stage partial nitrification-anammox process. *Journal of Cleaner Production*, v. 256, 120667, 2020a.

CHEN, H.; WANG, H.; YU, G.; XIONG, Y.; WU, H.; YANG, M.; CHEN, R.; YANG, E.; JIANG, C.; LI, Y. Key factors governing the performance and microbial community of one-stage partial nitritation and anammox system with bio-carriers and airlift circulation. *Bioresource Technology*, v. 324, 124668, 2021b.

CHEN, L.J.; TAN, F.H.; LI, Z.; LIU, W.; LYU, B. Contrasting responses of cuticular bacteria of *Pardosa pseudoannulata* under cadmium stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 225, 114832, 2023.

CHEN, Q.Q.; XU, L.Z.J.; ZHANG, Z.Z.; SUN, F.Q.; SHI, Z.J.; HUANG, B.C.; FAN, N.S.; JIN, R.C. Insight into the short- and long-term effects of quinoline on anammox granules: inhibition and acclimatization. *Science Total Environmental*, v. 651, p. 1294–1301, 2019.

CHEN, Y.; CHEN, H.; CHEN, Z.; ZHU, Z.; WANG, X. The nitrogen removal performance and mechanisms for urea wastewater by simultaneous urea hydrolysis, partial nitritation and anammox in one reactor. *Journal of Cleaner Production*, v. 332, 130124, 2022.

CHEN, Y.; ZHENG, R.; SUI, Q.; RITIGALA, T.; WEI, Y.; CHENG, X.; REN, J.; YU, D.; CHEN, M.; WANG, T. Coupling anammox with denitrification in a full-scale combined biological nitrogen removal process for swine wastewater treatment. *Bioresource Technology*, v. 329, 124906, 2021c.

CHEN, X.; JIANG, L.; AGHILINASROLLAHABADI, K.; PROANO, C. A.; MEISLER, S.; ANDERSON, M. O.; XUE, J.; LI, GUANGBIN, L. Impacts of crude glycerol on anaerobic ammonium oxidation (Anammox) process in wastewater treatment. *Bioresource Technology*, v. 394, 130271, 2024.

CHENG, D.L.; NGO, H.H.; GUO, W.S.; LIU, Y.W.; ZHOU, J.L.; CHANG, S.W.; NGUYEN, D.D.; BUI, X.T.; ZHANG, X.B. Bioprocessing for elimination antibiotics and hormones from swine wastewater. *Science of The Total Environment*. v 621, p.1664–1682, 2018.

CHI, Z.; ZHANG, P.; HOU, L.; LI, H.; LIANG, S.; SONG, A. Effects of chromate on nitrogen removal and microbial community in two-stage vertical-flow constructed wetlands. *Chemosphere*, v. 345, 140556, 2023.

CHO, K.; CHOI, M.; LEE, S.; BAE, H. Negligible seeding source effect on the final anammox community under steady and high nitrogen loading rate after enrichment using poly (vinyl alcohol) gel carriers. *Chemosphere*, v. 208, p. 21–30, 2018.

DAIMS, H.; LEBEDEVA, E. V.; PJEVAC, P.; HAN, P.; HERBOLD, C.; ALBERSTSEN, M.; JEHLICH, N.; PALATINSZKY, M.; VIERHEILIG, J.; BULAEV, A.; KIRKEGAARD, R. H.; VON BERGEN, M.; RATTEI, T.; BENDINGER, B.; NIELSEN, P. H.; WAGNER, M. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature*, v. 528, p. 504-523, 2015.

DAPENA-MORA, A.; HULLE, S. W. V.; CAMPOS, J. L.; MÉNDEZ, R.; VANROLLEGHEM, P. A.; JETTEN, M. Enrichment of Anammox biomass from municipal activated sludge: Experimental and modelling results. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2004.

DAPENA-MORA, A.; FERNANDÉZ, I.; CAMPOS, J. L.; CORRAL-MOSQUERA, A.; MÉNDEZ, R.; JETTEN, M. S. M. Evaluation of activity and inhibition effects on Anammox process by batch tests based on the nitrogen gas production. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, n. 4, p. 859–865, 2007.

DAVEY, L.; HALPERIN, S. A.; LEE, S. Thiol-Disulfide Exchange in Gram-Positive Firmicutes. *Trends in Microbiology*, v. 24, p. 902-905, 2016.

DAVEREY, A. SU, S.; HUANG, Y.; CHEN, S.; SUNG, S.; LIN, J. Partial nitrification and anammox process: A method for high strength optoelectronic industrial wastewater treatment. *Water Research*, v. 47, n. 9, p. 2929–2937, 2013.

DÍAZ-JÚAN, X.; OLMO, L.; PÉREZ, J.; CARRERA, J. Coupling anammox and heterotrophic denitrification activity at mainstream conditions in a single reactor unit. *Chemical Engineering*, v. 431, 2022.

DOSTA, J.; FERNANDÉZ, I.; VÁZQUEZ-PADÍN, J. R.; MOSQUERA-CORRAL, A.; CAMPOS, J. L.; MATA-ALVAREZ, J.; MENDÉZ, R. Short-and long-term effects of temperature on the anammox process. *J. Hazard. Mater*, v. 154, p. 688-693, 2008.

DU, R.; CAO, S.; JIN, R.; LI, X.; FRAN, J.; PENG, Y. Beyond an Applicable Rate in Low-Strength Wastewater Treatment by Anammox: Motivated Labor at an Extremely Short Hydraulic Retention Time. *Environmental Science and Technology*, v. 56, p. 8650-8662, 2022.

DU, R.; CHANG, F.; FAN, J.; XU, D.; CAO, S.; PENG, Y.; HORN, H. Biofilms recall versatile capability of anammox integrating with heterotrophs and advances in application for wastewater treatment: A critical review. *Chemical Engineering Journal*, v. 496, 154198, 2024.

DU, R.; LIU, Q.; LI, C.; LI, X.; CAO, S.; PENG, Y. Spatiotemporal Assembly and Immigration of Heterotrophic and Anammox Bacteria Allow a Robust Synergy for High-Rate Nitrogen Removal. *Environmental Science and Technology*, v. 57, p. 9075-9085, 2023.

DUAN, H.; YE, L.; LU, X.; YUAN, Z. Overcoming nitrite oxidizing bacteria adaptation through alternating sludge treatment with free nitrous acid and free ammonia. *Science of The Total Environment*, v. 53, p. 1937-1946, 2019.

ENWALL, K.; PHILIPPOT, L.; HALLIN, S. Activity and Composition of the Denitrifying Bacterial Community Respond Differently to Long-Term Fertilization. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 12, p. 8335–8343, 2005.

ETTAMIMI, S.; CARLIER, J. D.; COX, C. J. ELAMINE, Y.; HAMMANI, K.; GHAZAL, H.; COSTA, M. C. A meta-taxonomic investigation of the prokaryotic diversity of water bodies impacted by acid mine drainage from the São Domingos mine in southern Portugal. *Extremophiles*, v. 23, p. 821-834, 2019.

FAN, N.S.; ZHU, X.L.; WU, J.; TIAN, Z.; BAI, Y.H.; HUANG, B.C.; JIN, R.C. Deciphering the microbial and genetic responses of anammox biogranules to the single and joint stress of zinc and tetracycline. *Environment International*, v. 132, 105097, 2019.

FAN, X.; LI, J.; HE, L.; WANG, Y.; ZHOU, J.; ZHOU, J.; LI, C. Co-occurrence of autotrophic and heterotrophic denitrification in electrolysis assisted constructed wetland packing with coconut fiber as solid carbon source. *Chemosphere*, v. 301, 134762, 2022.

FENG, F.; TANG, X.; QU, C.; LU, X.; LIU, Z.; TANG, J.; TANG, C.J.; CHAI, L. Hydroxylamine addition enhances fast recovery of anammox activity suffering Cr(VI) inhibition. *Bioresource Technology*, v. 329, 124920, 2021.

FERNANDES, L. A. *Efeito da temperatura no processo anammox aplicado ao pós-tratamento de efluente de reator anaeróbio tratando esgoto doméstico*. Belo Horizonte, 2017, 116 p. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017.

FERNANDES, L. A. *Nitrificação parcial e anammox aplicado ao co-tratamento de lixiviado maduro e efluente anaeróbio doméstico: avaliação do processo e da comunidade microbiana*. Belo Horizonte, 2023, 178 p. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2023.

FERNANDES, L. A.; PEREIRA, A. D.; LEAL, C. D.; DAVENPORT, R.; WERNER, D.; FILHO, C.R.M.; BRESSANI-RIBEIRO, T.; CHERNICHARO, C. A. L.; ARAÚJO, J.C. Effect of temperature on microbial diversity and nitrogen removal performance of an anammox reactor treating anaerobically pretreated municipal wastewater. *Bioresource Technology*, v. 258, p.208-219, 2018.

FERNÁNDEZ, I.; DOSTA, J.; FAJARDO, C.; CAMPOS, J. L.; CORRAL-MOSQUERA, A.; MÉNDEZ, A. Short- and long-term effects of ammonium and nitrite on the Anammox process. *Journal of Environmental Management*, v. 95, n. SUPPL., p. 170–174, 2012.

FERRIS, M. J.; MUYZER, G.; WARD, D. M. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, n. 2, p. 340–6, 1996.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. *World fertilizer: trends and outlook to 2022*. Disponível em: <https://www.fao.org/3/ca6746en/ca6746en.pdf>. Acesso em: 31out.2022.

GAUR, V. K.; SHARMA, P.; SIROHI, R.; AWASTHI, M. K.; DUSSAP, C.G.; PANDEY, A. Assessing the impact of industrial waste on environment and mitigation strategies: A comprehensive review. *Journal of Hazardous Materials*, v.398, 123019, 2020.

GAMOŃ F.; CEMA G.; ZIEMBIŃSKA-BUCZYŃSKA A. The influence of antibiotics on the anammox process — a review. *Environmental Science and Pollution Research*, v.29, 8074-8090, 2021.

GAO, L.; WANG, S.; XU, X.; ZHENG, J.; CAI, T.; JIA, S. Metagenomic analysis reveals the distribution, function, and bacterial hosts of degradation genes in activated sludge from industrial wastewater treatment plants. *Environmental Pollution*, v. 340, 122802, 2024.

GAO, P.; GAO, Y.; WANG, H.; MA, T.; GU, J.D. An evaluation of different detection methods for anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria inhabiting the oil reservoir systems. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 177, 105536, 2023.

GIUSTINIANOVICH, E. A.; CAMPOS, J.; ROECKEL, M. D.; ESTRADA, A. J.; MOSQUERRA-CORRAL, A.; VAL DEL RÍO, Á. Influence of biomass acclimation on the performance of a partial nitritation-anammox reactor treating industrial saline effluents. *Chemosphere*, v. 194, p. 131-138, 2018.

GLOBALFERT. *Outlook GlobalFert 2021*. Disponível em: <https://www.globalfert.com.br/OGFposEvento/arquivo/Outlook-GlobalFert-2021.pdf>. Acesso em: 10 out. 2022.

GRAHAM, D. W.; KNAPP, C. W.; VLECK, E. S. VAN; BLOOR, K.; LANE, T. B.; GRAHAM, C. E. Experimental demonstration of chaotic instability in biological nitrification. *The ISME Journal*, v. 1, n. 5, p. 385–393, 2007.

GROFFMAN, P. M. Terrestrial denitrification: challenges and opportunities. *Ecological Processes*, p. 1-11, 2012.

GUO, H.; GAO, M.; LEE, K.; YAO, Y.; ZOU, X.; ZHANG, Y.; HUANG, W.; LIU, Y. Rapid enrichment of anammox bacteria for low-strength wastewater treatment: Role of influent nitrite and nitrate ratios in sequencing batch reactors (SBRs). *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 11, 111434, 2023.

GUO, J.; MO, J.; QI, Q.; PENG, J.; QI, G.; KANERVA, M.; IWATA, H.; LI, Q. Prediction of adverse effects of effluents containing phenolic compounds in the Ba River on the ovary of fish (*Hemiculter leucisculus*) using transcriptomic and metabolomic analyses. *Science of the Total Environment*, v. 801, 149554, 2021.

GUO, J.; PENG, Y.; FAN, L.; ZHANG, L.; NI, B.-J.; KARTAL, B.; FENG, X.; JETTEN, M.S.M.; YAUN, Z. Metagenomic analysis of anammox communities in three different microbial aggregates. *Environmental*, v. 18, p. 2979–2993, 2016.

GUPTA, G.; PARIHAR, S. S.; AHIRWAR, N. K.; SNEHI, S. K., SINGH, V. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. *Microbial & Biochemical Technology*, v.7, 2015.

GUTWINSKI, P.; CEMA, G.; ZIEMBINSKA-BUCZYNSKA, A.; WYSZYNSKA, K.; SURMACZ-GÓRSKA, J. Long-term effect of heavy metals Cr(III), Zn(II), Cd(II), Cu(II), Ni(II), Pb(II) on the anammox process performance. *Journal of Water Process Engineering*, v. 39, 101668, 2021.

HAMM, R. E.; THOMPSON, T. G. Dissolved nitrogen in the sea water of the northeast pacific with notes on the total carbon dioxide and the dissolved oxygen. *Journal of Marine Research*, v. 4, p. 11-27, 1941.

HENDRICKX, T.L., KAMPMAN, C., ZEEMAN, G., TEMMINK, H., HU, Z., KARTAL, B., BUISMAN, C.J. High specific activity for anammox bacteria enriched from activated sludge at 10 C. *Bioresource*, v.163, p. 214–221, 2014.

HOEKSTRA, M. et al. Deterioration of the anammox process at decreasing temperatures and long SRTs. *Environmental Technology (United Kingdom)*, v. 39, n. 5, p. 658–668, 2018.

HU, B.-L., RUSH, D., VAN DER BIEZEN, E., ZHENG, P., VAN MULLEKOM, M., SCHOUTEN, S., DAMSTÉ, J.S.S, SMOLDERS, A.J.P., JETTEN., M.S.M., New anaerobic, ammonium-oxidizing community enriched from peat soil. *Applied Environmental Microbiology*, v. 77, p. 966-971, 2011.

HU, M.; LIU, X.; YA, T.; L. J.; Z, M.; WANG, X. Dissolved oxygen alters the microbial interactions of anammox consortia in PN/A process. *Journal of Water Process Engineering*, v. 53, 103697, 2023.

HU, W.; LI, Q.; WANG, W.; LIN, X.; HE, Z.; LI, Q. Straw mulching decreased the contribution of Fe-bound organic carbon to soil organic carbon in a banana orchard. *Applied Soil Ecology*, v. 194, 105177, 2024.

HUANG, S.; ZHU, Y.; ZHANG, G.; LIAN, J.; LIU, Z.; ZHANG, L.; TIAN, S. Effects of low-intensity ultrasound on nitrite accumulation and microbial characteristics during partial nitrification. *Science of The Total Environment*, v. 705, 1355985, 2020.

HUANG, Y.; CHEN, R.; ZHANG, Z.; QI, Y.; GUAN, Y.; MA, X.; WEI, Q.; YANG, G. Enhancing wastewater treatment with a novel separated algae membrane oxygenated activated sludge reactor. *Journal of Water Process Engineering*, v. 61, 105283, 2024.

INTERNATIONAL FERTILIZER ASSOCIATION. *Public summary: short-term fertilizer outlook 2021-2021*. Paris: IFA, 2020. Disponível em: <https://www.fertilizer.org/member/Download.aspx?PUBKEY=50AB625D-48C3-4EB9-4FBFFF47DF1FE623>. Acesso em: 26 de out. 2022.

ISAKA, K., SUWA, Y., KIMURA, Y., YAMAGISHI, T., SUMINO, T., TSUNEDA, S. Anaerobic ammonium oxidation (anammox) irreversibly inhibited by methanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v.81, p.379–385, 2008.

ISAKA, K.; OSAKA, T.; KIMURA, Y.; IWASAKI, N.; TSUNEDA, S. Methanol tolerance and acclimation in the anammox process using a gel carrier. *Biochemical Engineering Journal*, v.165, 107814, 2021.

IZADI, P.; SINHA, P.; ANDALIB, M.; SAMBERGER, C.; LEHMAN, G.; MESSOLOGITIS, K.; JACANGELO, J. Coupling fundamental mechanisms and operational controls in mainstream partial denitrification for partial denitrification anammox applications: A review. *Journal of Cleaner Production*, v. 400, 136741, 2023.

JAGABA, A. H.; KUTTY, S.R.M.; LAWAL, I. M.; ABUBAKAR, S.; HASSAN, I.; ZUBAIRU, I.; UMARU, I.; ABDURRASHEED, A.S.; ADAM, A.A.; GHALEB A. A.; ALMAHBASHIB, N.M.Y.; AL-DHAWIA, N. M. Y.; NOOR, A. Sequencing batch reactor technology for landfill leachate treatment: A state-of-the-art review. *Journal of Environmental Management*, v. 282, 111496, 2021.

JENA, J.; NARWADE, N., DAS, T.; DHOTRE, D.; SARKAR, U.; SOUCHE, Y. Treatment of industrial effluents and assessment of their impact on the structure and function of microbial diversity in a unique Anoxic-Aerobic sequential batch reactor (AnASBR). *Journal of Environmental Management*, v.261, 110241, 2020.

JENNI, S.; VLAEMINCK, S. E.; MORGENROTH, E.; UDERT, K. M. Successful application of nitrification/anammox to wastewater with elevated organic carbon to ammonia ratios. *Water Research*, v. 49, p. 316-326, 2014.

JETTEN, M. S. M., STROUS, M., VAN DE PAS-SCHOONEN, K. T., SCHALK, J., VAN DONGEN, U. G., VAN DE GRAAF, A. A., LOGEMANN, S., MUYZER, G., VAN LOOSDRECHT, M. C., KUENEN, J. G. The anaerobic oxidation of ammonium. *Microbiology Review*, v.22, p. 421–437, 1998.

JETTEN, M. S. M.; NIFTRIK, L. V. V.; STROUS, M.; KARTAL, B.; KELTJENS, J. T.; OP DEN CAMP, H. J., Biochemistry and molecular biology of Anammox bacteria. *Critical reviews in Biochemistry and molecular biology* 44, 65–84p, 2009.

JIA, M.; SOLON, K.; VANDEPLASSCHE, D.; VENUGOPAL, H.; VOLCKE, E. I. P. Model-based evaluation of an integrated high-rate activated sludge and mainstream anammox system. *Chemical Engineering Journal*, v. 382, 122878, 2020.

JIANG, H.; PENG, Y.; LI, X.; ZHANG, F.; WANG, Z.; REN, S. Advanced nitrogen removal from mature landfill leachate via partial nitrification-Anammox biofilm reactor (PNABR) driven by high dissolved oxygen (DO): protection mechanism of aerobic biofilm. *Bioresour. Technol.* v. 306, 123119, 2020.

JIANG, H.; WANG, Z.; REN, S.; QIU, J.; ZHANG, Q.; LI, X.; PENG, Y. Enrichment and retention of key functional bacteria of partial denitrification-Anammox (PD/A)

- process via cell immobilization: A novel strategy for fast PD/A application. *Bioresource Technology*, v. 326, 124744, 2021.
- JIANG, Y.; SHI, X.; NG, H. Y. Aerobic granular sludge systems for treating hypersaline pharmaceutical wastewater: Start-up, long-term performances and metabolic function. *Journal of Hazardous Materials*, v. 412, 125229, 2021.
- JIN, R.; YANG, G.; YU, J.; ZHENG, P. The inhibition of the anammox process: a review. *Chemical Engineering Journal*, v. 197, p. 67-79, 2012.
- JORQUERA, O.; KALID, R.; KIPERSTOK, A.; BRAGA, E.; SALES, E. A. Effluent stream treatment in a nitrogenous fertilizer factory: An exergy analysis for process integration. *Process Safety and Environmental Protection*, v. 92, p. 862-868, 2014.
- JOSS, A.; SALZGEBER, D.; EUGSTER, J.; KONIG, R.; ROTTERMANN, K.; BURGER, S.; FABIJAN, P.; LEUMANN, S.; MOHN, J.; SIEGRIST, H. Full-scale nitrogen removal from digester liquid with partial nitrification and anammox in one SBR. *Environmental Science Technology*, v. 43, p. 5301–5306, 2009.
- KAMALI, M.; SUHAS, D. P.; COSTA, M. E.; CAPELA, I.; AMINABHAVI, T. M. Sustainability considerations in membrane-based technologies for industrial effluents treatment. *Chemical Engineering Journal*, v 368, p.474-494, 2019.
- KARTAL, B.; RATTRAY, J.; VAN NIFTRIK, L.A.; VAN DE VOSSENBERG, J.; SCHMID, M.C.; WEBB, R.I.; SCHOUTEN, S.; FUERST, J.A.; DAMSTÉ J.S.; JETTEN; M.S.M.; STROUS, M. Candidatus “Anammoxoglobus propionicus” a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 30, p.39–49, 2007.
- KARTAL, B.; DE ALMEIDA, N. M.; MAALCKE W. J.; OP DEN CAMP, H. J. M.; JETTEN, M. S. M; KELTJENS, J.T. How to make a living from anaerobic ammonium oxidation. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 37, p. 428-461, 2013.
- KARTAL, B.; VAN NIFTRIK, L. RATTRAY, J. VAN DE VOSSENBERG, J. L. C. M., SCHMID, M., C. SINNINGHE, D., J.; JETTEN, M., S., M.; STROUS, M. Candidatu s ‘Brocadia fulgida’: an autofluorescent anaerobic ammonium oxidizing bacterium. *FEMS Microbiology Ecology*.v.63, p.46-55, 2008.
- KELSO, B.; SMITH, R. V.; LAUGHLIN, R. J.; LENNOX, S. D. Dissimilatory nitrate reduction in anaerobic sediments leading to river nitrite accumulation. *American Society for Microbiology*, v. 63, p. 655-667, 1997.
- KELUSCAR, R.; NERURKAR, A.; DESAI, A. Development of a simultaneous partial nitrification, anaerobic ammonia oxidation and denitrification (SNAD) bench scale process for removal of ammonia from effluent of a fertilizer industry. *Biosource Technology*, v. 130, p. 390-397, 2013.
- KHRAMENKOV, S.V.; KOZLOV, M.N.; KEVBRINA, M.V.; DOROFEEV, A.G.; KAZAKOVA, E.A.; GRACHEV, V.A.; KUZNETSOV, B.B.; POLYAKOV, D.Y.; NIKOLAEV, Y.A. A novel bacterium carrying out anaerobic ammonium oxidation in a reactor for biological treatment of the filtrate of wastewater fermented sludge. *Microbiology*, v. 82, p. 628-636, 2013.

KITS, K.D.; JUNG, M.Y.; VIERHEILIG, J.; PJEVAC, P.; SEDLACEK, C.J.; LIU, S.; HERBOLD, C.; STEIN, L.Y.; RICHTER, A.; WISSEL, H.; BRÜGGEMANN, N.; WAGNER, M.; DAIMS, H. Low yield and abiotic origin of N<sub>2</sub>O formed by the complete nitrifier *Nitrospira inopinata*. *Nature Communications*, v.10, 1836, 2019.

KIELING, D. D. *Estudo da remoção biológica de nitrogênio a partir de lodo nitrificante cultivado em meio autotrófico sob condições anóxicas*. Florianópolis, 2004, 106 p. Dissertação (Mestrado). Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

KINDAICHI, T.; KAWANO, Y.; ITO, T.; SATOH, H.; OKABE, S. Population dynamics and in situ kinetics of nitrifying bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by real-time quantitative PCR. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 94, n. 6, p. 1111–1121, 2006.

KIMURA, Y.; ISAKA, K.; KAZAMA, F. Effects of inorganic carbon limitation on anaerobic ammonium oxidation (anammox) activity. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 4390–4394, 2011.

KRAIEM, K.; WAHAB, M.A.; KALLALI, H.; FRA-VAZQUEZ, A.; PEDROUSO, A.; MOSQUERA-CORRAL, A.; JEDIDI, N. Effects of short- and long-term exposures of humic acid on the anammox activity and microbial community. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 26, p. 19012–19024, 2019.

KUYPERS, M.M.M.; OLAV SLIEKERS, A.; LAVIK, G.; SCHMID, M.; JORGENSEN, B.B.; GIJS KUENEN, J.; DAMSTÉ, J.S.S.; STROUS, M.; JETTEN, M.S.M. Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. *Nature* v. 422, p. 608–611, 2003.

KUMAR, M.; DAVEREY, A.; GU, J.-D.; LIN, J.-D. Anammox Processes. In: LEE, D.; JEGATHEESAN, V.; NGO, H. H.; HALLENBECK, P. C.; PANDEY, A. (ed). *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. India: Elsevier, 2017. Cap. 15, p. 381-407.

LACKNER, S.; GILBERT, E. M.; VLAEMINCK, S. E.; JOSS, A.; HORN, H.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Full-scale partial nitritation/anammox experiences - An application survey. *Water Research*, v. 55, p. 292-303, 2014.

LAURENI, M.; FALÃS, P.; ROBIN, O.; WICK, A.; WEISSBRODT, D.G.; NIELSEN, J. L.; TERNES, T. A.; MORGENROTH, E.; JOSS, A. Mainstream partial nitritation and anammox: long-term process stability and effluent quality at low temperatures. *Water Research*, v. 101, p. 628-639, 2016.

LAURENI, M.; WEISSBRODT, D.G.; SZIVÁK, I.; ROBIN, O.; NIELSEN, J.L.; MORGENROTH, E.; JOSS, A. Activity and growth of anammox biomass on aerobically pre-treated municipal wastewater. *Water Research*, v. 80, p. 325–336, 2015.

LAWSON, C.E.; WU, S.; BHATTACHARJEE, A.S.; HAMILTON, J.J.; MCMAHON, K.D.; GOEL, R.; NOGUERA, D.R. Metabolic network analysis reveals microbial community interactions in anammox granules. *Nat. Commun*, v.8, p.1–12, 2017.

LEAL, C. D. Avaliação do efeito de diferentes relações DQO/N sobre o processo anammox e viabilidade da aplicação do processo como pós-tratamento de efluente de reator UASB tratando esgoto doméstico. Belo Horizonte, 2015, 123 p. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

LEAL, C. D.; PEREIRA, A. D.; NUNES, F. T.; FERREIRA, L. O.; COELHO, A. C. C.; BICLHO, S. K.; CONELL, E. F. A. M.; RIBEIRO, T. B.; CHERNICHARO, C. A. L., ARAÚJO, J. C. Anammox for nitrogen removal from anaerobically pre-treated municipal wastewater: Effect of COD/N ratios on process performance and bacterial community structure. *Bioresource Technology*, v. 211, p. 257–266, 2016.

LI, B.; LI, Y.; YAN, W.; WANG, H.; WANG, Y.; ZHOU, Z.; ZHANG, W. Effects of key enzyme activities and microbial communities in a flocculent-granular hybrid complete autotrophic nitrogen removal over nitrite reactor under mainstream conditions. *Bioresource Technology*, v. 280, p.136–142, 2019a.

LI, B.; WANG, Y.; LI, J.; YANG, L.; LI, X.; ZHOU, Z.; L, Y.; CHEN, X.; WU, L. The symbiosis of anaerobic ammonium oxidation bacteria and heterotrophic denitrification bacteria in a size-fractioned single-stage partial nitrification/ anammox reactor. *Biochemical Engineering Journal*, v. 151, 107353, 2019b.

LI, D.; LI, W.; ZHANG, D.; ZHANG, K.; LV, L.; ZHANG, G. Performance and mechanism of modified biological nutrient removal process in treating low carbon-to-nitrogen ratio Wastewater. *Bioresource Technology*, v. 367, 128254, 2023.

LI, H.; CHEN, S.; MU, B.Z.; GU, J.D. Molecular detection of anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria in high-temperature petroleum reservoirs. *Microbiology Ecology*, v. 60, p. 771-783, 2010.

LI, J.; LI, J.; GAO, R.; WANG, M.; YANG, L.; WANG, X.; ZHANG, L.; PENG, Y. . A critical review of one-stage anammox processes for treating industrial wastewater: Optimization strategies based on key functional microorganisms. *Bioresource Technology*, v. 265, p. 498-505, 2018.

LI, Z.; PENG, Y.; GAO, H. A novel strategy for accelerating the recovery of a Fe(II)-inhibited anammox reactor by intermittent addition of betaine: performance, kinetics and statistical analysis. *Chemosphere*, v. 251, 2020a.

LI, J.; LI, J.; PENG, Y.; WAHNG, S.; ZHANG, L.; YANG, S.; LI, S. Insight into the impacts of organics on anammox and their potential linking to system performance of sewage partial nitrification-anammox (PN/A): A critical review. *Bioresource Technology*, v. 300, 122655, 2020b.

LI, X.; LU, M.; HUANG, Y.; YUAN, Y.; YUAN, Y. Influence of seasonal temperature change on autotrophic nitrogen removal for mature landfill leachate treatment with high-ammonia by partial nitrification-Anammox process. *Journal of Environmental Sciences*, v. 102, p. 291-300, 2021c.

LI, J.; PENG, Y.; GAO, R.; YANG, L.; DENG, L.; ZHAO, Q.; LIU, Q.; LI, X.; ZHANG, Q.; ZHANG, L. Highly enriched anammox within anoxic biofilms by reducing

suspended sludge biomass in a real-sewage A2/O process. *Water Research*, v. 194, 116906, 2021a.

LI, J.; PENG, Y.; ZHANG, Q.; LI, X.; YANG, S.; LI, S. Rapid enrichment of anammox bacteria linked to floc aggregates in a single-stage partial nitritation-anammox process: Providing the initial carrier and anaerobic microenvironment. *Water Research*, v. 191, p. 116807, 2021b.

LI, Y.; DONG, W.; HOU, Z.; ZHAO, Z.; XIE, J.; WANG, H.; HUANG, X.; PENG, Y. Intermittent hydroxylamine dosing to strengthen stability of partial nitrification and nitrogen removal efficiency through continuous-flow anaerobic-aerobic-anoxic reactor treating municipal Wastewater. *Bioresource Technology*, v. 406, 130947, 2024.

LI, X.; SUN, S.; YUAN, H.; BADGLEY, B.D.; HE, Z. Mainstream upflow nitritation-anammox system with hybrid anaerobic pretreatment: long-term performance and microbial community dynamics. *Water Res*, v.125, p.298–308, 2017.

LI, Z.; KECHEN, X.; YONGZHEN, P. Composition characterization and transformation mechanism of refractory dissolved organic matter from an ANAMMOX reactor fed with mature landfill leachate. *Bioresource Technology*, v. 250, p. 413–421, 2018.

LIANG, J.; GAO, S.; WU, Z.; RIJINAARTS, H. H. M.; GROTENHUIS, T. DNA-SIP identification of phenanthrene-degrading bacteria undergoing bioaugmentation and natural attenuation in petroleum-contaminated soil. *Chemosphere*, v. 266, 128984, 2021.

LIBÂNIO, M. *Fundamentos de qualidade e tratamento de água*. 4 ed. Campinas: Átomo, 638p. 2018.

LIU, F.; XU, H.; SHEN, Y.; LI, F, YANG, B. Rapid start-up strategy and microbial population evolution of anaerobic ammonia oxidation biofilm process for low-strength wastewater treatment. *Bioresource Technology*, v. 394, 130201, 2024.

LIN, L.; ZHANG, Y.; LI, Y. Enhancing start-up strategies for anammox granular sludge systems: A review. *Science of The Total Environment*, v. 902, 166398, 2023.

LIU, J.; ZHANG, J.; HUANG, Y.; CAI, Y.; YANG, H.; WANG, W.; DENG, L. Nitrogen removal and performance deterioration in digested effluent treatment by partial nitrification-anammox (PNA) process based on aeration sedimentation integrated microaerobic reactor (ASIMR). *Chemical Engineering Journal*, v. 481, 148310, 2024.

LIU, L.; JI, M.; WANG, F.; WANG, S.; QIN, G. Insight into the influence of microbial aggregate types on nitrogen removal performance and microbial community in the anammox process - A review and meta-analysis. *Science of the Total Environment*, v. 714, 136571, 2020a.

LIU, S.; CAI, C.; SUN, F.; MA, M.; NA, T. Advanced nitrogen removal of landfill leachate treatment with anammox process: A critical review. *Journal of Water Process Engineering*, v.58, 104756, 2024.

LIU, S.; YANG, F.; GONG, Z.; MENG, F.; CHEN, H.; XUE, Y.; FURUKAWA, K. Application of anaerobic ammonium-oxidizing consortium to achieve completely autotrophic ammonium and sulfate removal. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 6817-6825, 2008.

LIU, T.; LIM, Z. K.; CHEN, H.; HU, S.; YUAN, Z.; GUO, J. Temperature-Tolerated Mainstream Nitrogen Removal by Anammox and Nitrite/Nitrate-Dependent Anaerobic Methane Oxidation in a Membrane Biofilm Reactor. *Environmental Science & Technology*, v. 54, p. 3012-3021, 2020b.

LIU, T.; MA, B.; CHEN, X.; NI, B.J.; PENG, Y.; GUO, J.; 2017. Evaluation of mainstream nitrogen removal by simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification (SNAD) process in a granule-based reactor. *Chemical Engineering Journal*, v.327, p. 973–981, 2017a.

LIU, Y.; ZHAO, T.; SU, Z.; ZHU, T.; NI, B. Evaluating the roles of coexistence of sludge flocs on nitrogen removal and nitrous oxide production in a granule-based autotrophic nitrogen removal system. *Science of the Total Environment*, v. 730, 139018, 2020c.

LIU, Y.; NIU, Q.; WNAG, S.; JI, J.; ZHANG, Y.; YANG, M.; HOJO, T.; LI, Y. Y. Upgrading of the symbiosis of Nitrosomonas and anammox bacteria in a novel single-stage partial nitrification–anammox system: Nitrogen removal potential and Microbial characterization. *Bioresource Technology*, v. 244, p. 463–472, 2017b.

LIU, W.; YANG, D.; CHEN, W.; GU, X. High-throughput sequencing-based microbial characterization of size fractionated biomass in an anoxic anammox reactor for low-strength wastewater at low temperatures. *Bioresource Technology*, v. 231, p. 45-52, 2017.

LU, W.; ZHANG, X.; ZHANG, Y.; WANG, Q.; WEI, Y.; MA, B. Synergistic simultaneous endogenous partial denitrification/anammox (EPDA) and denitrifying dephosphatation for advanced nitrogen and phosphorus removal in a complete biofilm system. *Bioresource Technology*, v. 358, 127378, 2022.

LU, Z.Y.; FU, J.J.; MA, Y.L.; JIN, R.C.; FAN, N.S. Response of anammox granules to the simultaneous exposure to macrolide and aminoglycoside antibiotics: linking performance to mechanism. *Journal of Environmental Management*, v. 286, 112267, 2021.

LOTTI, T. et al. The effect of nitrite inhibition on the anammox process. *Water Research*, v. 46, n. 8, p. 2559–2569, 2012.

MADEIRA, C. L.; DE ARAÚJO, J. C. Inhibition of anammox activity by municipal and industrial wastewater pollutants: A review. *Science of the Total Environment*, v. 799, p. 149449, 2021.

MA, H.; NIU, Q.; ZHANG, Y.; HE, S.; LI, Y. Substrate inhibition and concentration control in an UASB-Anammox process. *Bioresource Technology*, v. 238, p. 263-272, 2017.

MA, B.; WANG, S.; CAO, S.; MIAO, Y.; JIA, F.; DU, R.; PENG, Y. Biological nitrogen removal from sewage via anammox: Recent advances. *Bioresource Technology*, v. 200, p. 981-900, 2016.

MA, Y.; LI, X.; WANG, S.; WANG, W.; PENG, Y. Enrichment of anammox biomass during mainstream wastewater treatment driven by achievement of partial denitrification through the addition of bio-carriers. *Journal of Environmental Sciences*, v. 137, p. 191-194, 2024.

MA, W.-J.; ZHANG, J.-T.; WANG, Y.; LI, G.-F.; WU, X.-X.; YAO, Y.-X.; CHENG, Y.-F.; HUANG, B.-C.; JIN, R.-C. Extracellular polymeric substances excreted by anammox sludge act as a barrier for As(III) invasion: binding property and interaction mechanism. *Chemosphere* 278, 130414, 2021.

MAC CONNELL, E. F. A. *Caracterização da comunidade bacteriana de filtros biológicos percoladores tratando efluente anaeróbio*. 2014. 143 f. Tese. (Doutorado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos - Escola de Engenharia), Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, 2014.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K.; BUCKLEY, D.; STAHL, D. *Microbiologia de Brock*. 14 ed. Porto Alegre: Artmed, 960p. 2016.

MANONMANI, U.; JOSEPH, K. Granulation of anammox microorganisms for autotrophic nitrogen removal from Wastewater. *Environmental Chemistry Letters*, v. 16, p. 881-901, 2018.

MIAO, Y.; PENG, Y.; ZHANG, L.; LI, B.; LI, X.; WU, L.; WANG, S. Partial nitrification-anammox (PNA) treating sewage with intermittent aeration mode: Effect of influent C/N ratios. *Chemical Engineering Journal*, v.334, p.664-672, 2018.

MILLÁN-BECERRO, R.; MACÍAS, F.; CÁNOVAS, C. R.; PÉREZ-LÓPEZ, R.; FUENTES-LÓPEZ, J. M. Environmental management and potential valorization of wastes generated in passive treatments of fertilizer industry effluents. *Chemosphere*, v. 295, 133876, 2022.

MOLINUEVO, B. et al. Anammox for ammonia removal from pig manure effluents: Effect of organic matter content on process performance. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 7, p. 2171–2175, 2009.

MULDER, A.; VAN DE GRAAF, A. A.; ROBERTSON, L. A.; KUENEN J. G. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 16, p. 177-184, 1995.

NI, S.-Q.; NI, J.-Y.; HU, D.-L.; SUNG, S. Effect of organic matter on the performance of granular anammox process. *Bioresource Technology*, v.110, p.701–705, 2012.

NIE, Y.; WANG, M.; ZHANG, W.; NI, Z.; HASHIDOKO, Y.; SHEN, W. Ammonium nitrogen content is a dominant predictor of bacterial community composition in an acidic forest soil with exogenous nitrogen enrichment. *Science of The Total Environment*, v. 624, p. 407-415, 2018.

NIU, Q.; HE, S.; ZHANG, Y.; MA, H.; LIU, Y.; LI, Y. Process stability and the recovery control associated with inhibition factors in a UASB-anammox reactor with a long-term operation. *Bioresource Technology*, v. 203, p. 132-141, 2016.

OKEREAFOR, U.; MAKHATHA, M.; MEKUTO, L.; UCHE-OKEREAFOR, N.; SEBOLA, T.; MAVUMENGWANA, V. Toxic Metal Implications on Agricultural Soils, Plants, Animals, Aquatic life and Human Health. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 17, 2020.

OSHIKI, M.; SHIMOKAWA, M.; FUJII, N.; SATOH, H.; OKABE, S. Physiological characteristics of the anaerobic ammonium-oxidizing bacterium 'Candidatus Brocadia sinica'. *Microbiology*, v. 157, p. 1706–1713, 2011.

PAN, Z.; DAI, R.; LIAO, J.; LIN, J-G.; HONG, Y.; LING, J.; XU, Y.; LI, Y.; PENG, J. Spontaneous formation and mechanism of anaerobic ammonium oxidation (anammox) bacteria in swine wastewater treatment system. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 154, 105058, 2020.

PAN, Y.; LIU, Y.; PENG, L.; NGO, H. H.; GUO, W.; WEI, W.; WANG, D. Substrate Diffusion within Biofilms Significantly Influencing the Electron Competition during Denitrification. *Environmental Science & Technology*, v. 53, p. 261-269, 2019.

PANKRATOV, T.A.; IVANOVA, A.O.; DEDYSH, S.N.; LIESACK, W. Bacterial populations and environmental factors controlling cellulose degradation in an acidic Sphagnum peat. *Environmental Microbiology*, v. 13, p.1800–1814, 2011.

PARTANEN, P.; HULTMAN, J.; PAULIN, L.; AUVINEN, P.; ROMANTSCHUK, M. Bacterial diversity at different stages of the composting process. *BMC Microbiology*, v.10, p.1–11, 2010.

PEDROUSO, A. et al. Pilot-scale ELAN® process applied to treat primary settled urban wastewater at low temperature via partial nitrification-anammox processes. *Separation and Purification Technology*, v. 200, n. February, p. 94–101, 2018.

PENTON, C.R.; DEVOL, A.H.; TIEDJE, J.M. Molecular evidence for the broad distribution of anaerobic ammonium oxidizing bacteria in freshwater and marine sediments. *Applied Environmental Microbiology*, v. 72, p.6829–6832, 2006.

PEREIRA, A. D.; LEAL, C. D.; DIAS, M. F.; ETCHEBEHERE, C.; CHERNICHARO, C. A. L.; ARAÚJO, J. C. Effect of phenol on the nitrogen removal performance and microbial community structure and composition of an anammox reactor. *Bioresource Technology*, v.166, p. 103–111, 2014.

PEREIRA, A. D. et al. Nitrogen removal from food waste digestate using partial nitrification anammox process: Effect of different aeration strategies on performance and microbial community dynamics. *Journal of Environmental Management*, v. 251, 109562, 2019.

PEREIRA, A. D. Reatores com atividade anammox para o Pós- Tratamento de digestato de resíduo alimentar: avaliação de diferentes estratégias de aeração e da comunidade microbiana. Belo Horizonte, 2018, 242 p. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.

PEREIRA, A. D. Caracterização microbiana e avaliação do efeito do fenol em um reator em batelada sequencial com atividade anammox. Belo Horizonte, 2013, 145 p. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

PHAM, T.; BUI, M. H. Removal of Nutrients from Fertilizer Plant Wastewater Using *Scenedesmus* sp.: Formation of Bioflocculation and Enhancement of Removal Efficiency. *Journal of Chemistry*, v. 2020, 2020.

PINTO, A.J.; MARCUS, D.N.; IJAZ, U.Z.; SANTOS, Q. M. B.; DICK, G.J., RASKIN, L. Metagenomic Evidence for the Presence of Comammox *Nitrospira*-Like Bacteria in a Drinking Water System. *mSphere*, v.1 (1), 2015.

POHL, J.; BJÖRLENIUS, B.; BRODIN, T.; CARLSSON, G.; FICK, J.; LARSSON, D.G.J.; NORRGREN, L.; ÖRN, S. Effects of ozonated sewage effluent on reproduction and behavioral endpoints in zebrafish (*Danio rerio*), *Aquatic Toxicology*, v. 200, p. 93-101, 2018.

PRADHANA, N.; THIA, S. S.; WUERTZ, S. Inhibition factors and kinetic model for anaerobic ammonia oxidation in a granular sludge bioreactor with *Candidatus Brocadia*. *Chemical Engineering Journal*, v. 389, 123618, 2020.

QUAN, Z.-X.; RHEE, S.-K.; ZUO, J.-E.; YANG, Y.; BAE, J.-W.; PARK, J.R.; LEE, S.-T.; PARK, Y.-H. Diversity of ammonium oxidizing bacteria in a granular sludge anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) reactor. *Environmental*, v.10, p. 3130–3139, 2008.

QIN, Peiyan et al. Responses of bacterial communities to microplastics: More sensitive in less fertile soils. *Science of The Total Environment*, v. 857, 159440, 2023.

RAMÍREZ-GARCÍA, R.; GOHIL, N.; SINGH, V. Recent advances, challenges, and opportunities in bioremediation of hazardous materials. In: PANDEY, P. C.; BAUDDH, K (ed.). *Phytomanagement of Polluted Sites: Market opportunities in sustainable phytoremediation*. India: Elsevier, 2019. cap. 21, p. 517-568.

RAMANAYAKA, S; VITHANAGE, M.; SARMAH. A.; NA, T.; KIM, K.; OK, Y. S. Performance of metal–organic frameworks for the adsorptive removal of potentially toxic elements in a water system: a critical review. *RSC Advances*, v.9, p. 34359-34376, 2019.

- REEZT, H. F. *Fertilizantes e seu uso eficiente*. Tradução: Alfredo Scheid Lopes. São Paulo: ANDA, 2017. 178p. Título original: Fertilizers and their eficiente use. ISBN 85-7110-495-6.
- REINO, C., SUÁREZ-OJEDA, M.E., PÉREZ, J., CARRERA, J. Stable long-term operation of an upflow anammox sludge bed reactor at mainstream conditions. *Water Res*, v.128, p.331–340, 2018.
- REN, S.; WANG, Z.; JIANG, H.; LI, X.; ZHANG Q.; PENG, Y. Efficient nitrogen removal from mature landfill leachate in a step feed continuous plug-flow system based on one-stage anammox process. *Bioresource Technology*, v.347, 126676, 2022.
- RICHARDS, F.A. Chemical observations in some anoxic, sulfide-bearing basins and fjords. In: Proceedings of the Second International Water Pollution Research Conference, 1964.
- RICHARDSON D. J. & WATMOUGH, N. J. Inorganic nitrogen metabolism in bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 3, p. 207-219, 1999.
- ROOTS, P.; WANG, Y.; ROSENTHAL, A.F.; GRIFFIN, J.S.; SABBA, F.; PETROVICH, M.; YANG, F.; KOZAK, J.A.; ZHANG, H.; WELLS. G.F. Comammox Nitrospira are the dominant ammonia oxidizers in a mainstream low dissolved oxygen nitrification reactor. *Water Research*, v. 157, p. 396-405, 2019.
- ROTHAUWE, J. H.; WITZEL, K. P.; LIESACK, W. The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, n. 12, p. 4704–12, 1997.
- ROY, S.; NAGARCHI, L.; DAS, I.; Achuthananthan, J. M.; Krishnamurthy, S. Cytotoxicity, Genotoxicity, and Phytotoxicity of Tannery Effluent Discharged into Palar River Basin, Tamil Nadu, India. *Journal of Toxicology*, v. 2015, 504360, 2015.
- SANTOS, I. D.; SANTOS, K. B.; OLIVEIRA, L. M. S.S.; ROUSE-RADINO, P.; DUTRA, A. J. B. Influence of some parameters on the nitrate formation during ammonia electrooxidation from an effluent generated by fertilizers' storage and handling facilities. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v.7, 103123, 2019.
- SARAVANAKUMAR, K.; SILVA, S.; SANTOSH, S. S.; SATHIYASEELAN, A.; GANESHALINGAM, A. JAMLA, M. Impact of industrial effluents on the environment and human health and their remediation using MOFs-based hybrid membrane filtration techniques. *Chemosphere*.v.307, 135593, 2022.
- SCHMID, M.; SCHMITZ-ESSER, S.; JETTEN, M.; WAGNER, M. 16S-23S rDNA intergenic spacer and 23S rDNA of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: implications for phylogeny and in situ detection. *Environmental Microbiology* v.7, p.450–459, 2001.

- SCHMID, M.; WALSH, K.; WEBB, R.; RIJPSTRA, W.I.C.; VAN DE PAS-SCHOONEN, K.; VERBRUGGEN, M.J.; HILL, T.; MOFFETT, B.; FUERST, J.; SCHOUTEN, S.; DAMSTE, J.S.S.; HARRIS, J.; SHAW, P.; JETTEN, M.; STROUS, M. Candidatus 'Scalindua brodae', sp. nov., Candidatus 'Scalindua wagneri', sp. nov., two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, v.26, p. 529–538, 2003.
- SHANG, X.; WU, S.; LIU, Y.; ZHANG, K.; GUO, M.; ZHOU, Y.; ZHU, J.; LI, X.; MIAO, R. Rice husk and its derived biochar assist phytoremediation of heavy metals and PAHs co-contaminated soils but differently affect bacterial community. *Journal of Hazardous Materials*, v. 466, 133684, 2024.
- SHEEREN, M. B.; KUNZ, A.; STEINMETZ, R. L. R.; DRESSLER, V. O processo ANAMMOX como alternativa para o tratamento de águas residuárias, contendo alta concentração de nitrogênio. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 15, n.12, p. 1289-1297, 2011.
- SILVEIRA, N. C.; OLIVEIRA, G. H. D.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; FORESTI, E. Two-stage partial nitrification-Anammox process for nitrogen removal from slaughterhouse wastewater: Evaluation of the nitrogen loading rate and microbial community analysis. *Journal of Environmental Management*, v. 296, 113214, 2021.
- SINGH, V. K.; SINGH, R.; KUMAR, A. Impact of wastewater irrigation on soil attributes. In: FERREIRA, L.P. R.; KUMAR, A.; BILAL, M (ed). *Advances in Chemical Pollution, Environmental Management and Protection*. India: Elsevier, 2023. Cap. 5, p. 79-95.
- SINGH, S.; SRIVASTAVA, V. C.; MANDAL, T. K. Treatment of fertilizer industry wastewater by catalytic peroxidation process using copper-loaded SBA-15. *Journal of Environmental Science and Health: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*. v. 50, pt. A, p. 1-11, 2015.
- SIYAO, Du *et al.* Effect of facility management regimes on soil bacterial diversity and community structure. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, v. 25, p.1615-1625, 2017.
- SPRING, S.; JACKEL, U.; WAGNER, M.; KAMPFER, P. *Ottowia thiooxydans* gen. nov., sp. nov., a novel facultatively anaerobic, N<sub>2</sub>O-producing bacterium isolated from activated sludge, and transfer of *Aquaspirillum gracile* to *Hylemonella gracilis* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 54, 2004.
- STEIN, L. Y.; KLOTZ, M. G. The nitrogen cycle. *Current Biology*, v. 26, p. 94-98, 2016.
- STROUS, M.; FUERST, J.A.; KRAMER, E.H.M.; LOGEMANN, S.; MUYZER, G.; VAN DE PAS-SCHOONEN, K.T.; WEBB, R.; GIJS KUENEN, J., JETTEN, M.S.M. Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature*, v. 400, p. 446-449, 1999.
- STROUS, M.; KUENEN, J.G.; JETTEN, M.S. Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.7, p. 3248–3250, 1999.
- STROUS, M., HEIJNEN, J.J., KUENEN, J.G., JETTEN, M.S.M. The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic

ammonium-oxidizing microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v. 50, n. 5, p. 589-596, 1998.

SU, Y.; PENG, Y.; WANG, J.; ZHANG, Q.; LI, X.; WANG, S.; XUE, X.; DU, R. Rapid enrichment of anammox bacteria and transformation to partial denitrification/anammox with nitrification/denitrification sludge. *Science of the Total Environment*, v. 856, 158973, 2023.

SZATKOWSKA, B.; TRELA, J. Partial Nitritation / Anammox and Canon – Nitrogen Removal Systems Followed By Conductivity Measurements. *PolishSwedish Conference Integration and Optimisation of Urban Sanitation Systems Joint PolishSwedish Reports*, v. 13, p. 109–117, 2005.

TAGLIABLU, M.; TONZIELLO, J.; BOTTINO, A.; CAPANNELLI, G.; COMITE, A.; PAGLIERO, M.; BOERO, F.; CATTANEO, C. Laboratory Scale Evaluation of Fertiliser Factory Wastewater Treatment through Membrane Distillation and Reverse Osmosis. *Membranes*, v.11, 610, 2021.

TAKEKAWA, M.; PARK, G.; SODA, S.; IKE, M. Simultaneous anammox and denitrification (SAD) process in sequencing batch reactors. *Bioresource Technology*, v. 174, p. 159-166, 2014.

TALAN, A.; TYAGI, R. D.; DROGUI, P. Critical review on insight into the impacts of different inhibitors and performance inhibition of anammox process with control strategies. *Environmental Technology & Innovation*, v. 23, 101533, 2021.

TANG, C-J.; DUAN, C-S.; YU, C.; SONG, Y-X.; CHAI, L-Y.; XIAO, R.; Z, W.; MIN, X-B. Removal of nitrogen from wastewaters by anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) using granules in upflow reactors. *Environmental Chemistry Letters*, v. 15, p. 311-328, 2017.

TANG, C-J.; ZHENG, P.; WANG, C-H.; MAHMOOD, Q.; ZHANG, J-Q.; CHEN, X-G.; ZHANG, L.; CHEN, J-W. Performance of high-loaded ANAMMOX UASB reactors containing granular sludge, *Water Research*, v.45, p. 135-144, 2011.

TANG, L.; SU, C.; CHEN, Y.; XIAN, Y.; HUI, X.; YE, Z.; CHEN, M.; ZHU, F.; ZHONG, H. Influence of biodegradable polybutylene succinate and non-biodegradable polyvinyl chloride microplastics on anammox sludge: performance evaluation, suppression effect and metagenomic analysis. *Journal of Hazardous Materials*, v. 401, 123337, 2021.

THANDRUP, B. New Pathways and processes in the Global Nitrogen Cycle. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, v. 43, p. 407-428, 2012.

TOH, S.; ASHBOLT, N. Adaptation of anaerobic ammonium-oxidising consortium to synthetic coke-ovens wastewater. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v. 59, p. 344–352, 2002.

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

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - EPA. *Fertilizer Manufacturing Effluent Guidelines*. United States: EPA, 2021. Disponível em: <https://www.epa.gov/eg/fertilizer-manufacturing-effluent-guidelines>. Acesso em: 10 out. 2022.

VAN DE GRAAF, A. A.; MULDER, A.; BRUIJN, P.; JETTEN, M. S. M.; ROBERTSON, L.A.; KUENEN, J. G. Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, n. 4, p. 1246-1251, 1995.

VAN DE GRAAF, A. A. et al. Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology*, v. 142, n. 8, p. 2187–2196, 1996.

VAN DE VOSSENBERG, J.; WOEBKEN, D.; MAALCKE, W.J.; WESSELS, H.J.C.T.; DUTILH, B.E.; KARTAL, B.; JANSSEN-MEGENS, E.M.; ROESELERS, G.; YAN, J.; SPETH, D.; GLOERICH, J.; GEERTS, W.; VAN DER BIEZEN, E.; PLUK, W.; FRANCOIJS, K.-J.; RUSS, L.; LAM, P.; MALFATTI, S.A.; TRINGE, S.G.; HAAIJER, S.C.M.; OP DEN CAMP, H.J.M.; STUNNENBERG, H.G.; AMANN, R.; KUYPERS, M.M.M.; JETTEN, M.S.M. The metagenome of the marine anammox bacterium 'Candidatus scalindua profunda' illustrates the versatility of this globally important nitrogen cycle bacterium. *Applied Environmental Microbiology*. v.15, p. 1275-1289, 2013.

VAN DER STAR, W. R. L.; ABMA, W. R.; BLOMMERS, D.; MULDER, J.; TOKUTOMI, T.; STROUS, M.; PICIOREANU, C.; LOOSDRECHT, M. C. M. VAN. Startup of reactors for anoxic ammonium oxidation: Experiences from the first full-scale anammox reactor in Rotterdam. *Water Research*, v. 41, p. 4149–4163, 2007.

VAN KESSEL, M. A. H. J.; SPETH, D. R.; ALBERTSEN, M.; NIELSEN, P. H.; CAMP, H. J. M. O.; KARTAL, B.; JETTEN, M. S. M.; LÜCKER, S. Complete nitrification by a single microorganism. *Nature*, v. 528, p. 555-571, 2015.

VIEIRA, R. F. *Ciclo do Nitrogênio em Sistemas Agrícolas*. 1ed. Brasília: Embrapa Meio Ambiente, 163p. 2017.

VERMA, S.; DAVEREY, A. Nitrogen removal from urea effluent in an anammox sequencing batch biofilm reactor with valorised dishwashing scrubber as biocarrier. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 105502, 2024.

VINOTH, S.; RAJESHKUMAR, V.; SIVABALAN, T.; SURYA, M.; THAMILKUMARAN, M.; SAIPRAKASH, S. Impact of industrial effluents on geotechnical properties of soil. *Material Today: Proceedings*. v. 37, p. 2636-2643, 2021.

VON SPERLING, M. *Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos*. v 1. 4 ed. Belo Horizonte: UFMG, 470 p. 2014.

VON SPERLING, M. *Lodos ativados*. v 4. 4 ed. Belo Horizonte: UFMG, 461p. 2016a.

VON SPERLING, M. *Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias*. v 2, 2 ed. Belo Horizonte: UFMG, 211p. 2016b.

- WAKI, M.; TOKUTOMI, T.; YOKOYAMA, H.; TANAKA, Y. Nitrogen removal from animal waste treatment water by anammox enrichment. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 2775-2780, 2007.
- WANG, B.; GONG, X.; PENG, Y. Simultaneous anammox-denitrification process and its emerging extensions. *Chemical Engineering Journal*, v. 415, 128380, 2021.
- WANG, J.; CHEN, Y.; CAI, P.; GAO, Q.; ZHONG, H.; SUN, W., CHEN, Q., 2022. Impacts of municipal wastewater treatment plant discharge on microbial community structure and function of the receiving river in Northwest Tibetan Plateau. *Journal of Hazardous Materials*. v. 423, pt. B, 127170, 2022a.
- WANG, K.; YAN, D.; CHEN, X.; XU, Z.; HU, P.; LI, H. Microbiome comparisons reveal the core microorganisms and key nitrogen metabolic pathway involved in industrial nitrogen fertilizer wastewater treatment plants. *Journal of Water Process Engineering*, v. 59, 105063, 2024a.
- WANG, X.; SHEN, N.; ZHI, Y.; ZHANG, X.; WANG, G. Sulfur oxidation process: A neglected contributor to minimize P release during sediment microbial fuel cell operation. *Chemical Engineering Journal*, v. 449, 137845, 2022b.
- WANG, Y. C.; MAO, Y.; FU, H-M.; WANG, J.; WENG, X.; LIU, Z. H.; XU, X.W.; YAN, P.; FANG, F.; GUO, J-S.; SHEN, Y.; CHEN, Y-P. New insights into functional divergence and adaptive evolution of uncultured bacteria in anammox community by complete genome-centric analysis. *Science of The Total Environment*, v. 924, 171530, 2024b.
- WANG, Yanwei *et al.* *Romboutsia sedimentorum* sp. nov., isolated from an alkaline-saline lake sediment and emended description of the genus *Romboutsia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 65, 2015.
- WANG, W.; WANG, Y. Determining the mechanism for biomass segregation between granules and flocs in anammox granular system from the prospective of EPS. *Chemical Engineering Journal*, v.475, 146028, 475, 2023.
- WARD, Naomi *et al.* Three genomes from the phylum Acidobacteria provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. *Applied Environmental Microbiology*, v. 75, p. 46-56, 2009.
- WARMADEWANTHI, D. A. A.; IKLAS, N.; DAMAYANTI, F. Effect of recirculation and hydraulic loading rate on ammonium and phosphate recovery from fertilizer industry wastewater. *Heliyon*, v. 9, e20255, 2023.
- WEI, H.; WANG, J.; HASSAN, M.; HAN, L.; XIE, B. Anaerobic ammonium oxidation-denitrification synergistic interaction of mature landfill leachate in aged refuse bioreactor: Variations and effects of microbial community structures. *Bioresource Technology*, v. 243, p.1149–1158, 2017.
- WEN, X.; GONG, B.; ZHOU, J.; HE, Q.; QING, X. Efficient simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification (SNAD) system equipped with a real-time

dissolved oxygen (DO) intelligent control system and microbial community shifts of different substrate concentrations. *Water Research*, v. 119, p. 201-211, 2017.

WHELAN, J. A.; RUSSELL, N. B.; WHELAN, M. A. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *Journal of Immunological Methods*, n. 278, p. 261-269, 2003.

WOEBKEN, D.; LAM, P.; KUYPERS, M.M.M.; NAQVI, S.W.A.; KARTAL, B.; STROUS, M.; JETTEN, M.S.M.; FUCHS, B.M.; AMANN, R. Amicrodiversity study of anammox bacteria reveals a novel *Candidatus scalindua* phylotype in marine oxygen minimum zones. *Environmental Microbiology*, v.10, p. 3106–3119, 2008.

WU, J.; FAN, N.S.; YU, Y.Y.; HE, Y.J.; ZHAO, Y.H.; ZHANG, Q.; HUANG, B.C.; JIN, R.C. Insight into the microbial and genetic responses of anammox granules to spiramycin: comparison between two different dosing strategies. *Journal of Cleaner Production*. v. 258, 120993, 2020.

WU, J.; KONG, Z.; LUO, Z.; QIN, Y.; RONG, C.; WANG, T.; HANAOKA, T.; S, S.; ITO, M.; KOBAYASHI, S.; KOBAYASHI, M.; XU, K.; KOBAYASHI, T.; KUBOTA, K.; L, Y. 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*, v. 207, 117783, 2021.

WU, L.; LI, Z.; HUANG, S.; SHEN, M.; YAN, Z.; LI, J.; PENG, Y. gênero . *Environment International*, v.127, p. 452–461, 2019.

WU, L.; ZHANG, L.; SHI, X.; LIU, T.; PENG, Y.; ZHANG, J. Analysis of the impact of reflux ratio on coupled partial nitrification-anammox for co-treatment of mature landfill leachate and domestic wastewater. *Bioresource Technology*, v.198, p. 207–214, 2015.

WU, L.; LI, Z.; ZHAO, C.; LIANG, D.; PENG, Y. A novel partial-denitrification strategy for post-anammox to effectively remove nitrogen from landfill leachate. *Science of the Total Environment*, v. 633, p. 745-751, 2018.

WU, L.; YIN, J.; ZHANG, Y.; LUO, A.; TIAN, Y.; LIU, Y.; PENG, Y. Nitrogen removal and carbon reduction of mature landfill leachate under extremely low dissolved oxygen conditions by simultaneous partial nitrification anammox and denitrification. *Bioresource Technology*, v. 401, 130704, 2024.

XIE, H.; JI, D.; ZANG, L. Effects of inhibition conditions on anammox process. *IOP Conference Series: Earth Environmental Science*, v.100, 2017.

XU, Schengwen et al. Microbial communities overwhelm environmental controls in explaining nitrous oxide emission in acidic soils. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 194, 109453, 2024.

YADAV, A.; RAJ, A.; PURCHASE, D.; FERREIRA, L. F. R.; SARATALE, G. D.; BHARAGAVA, R. N. Phytotoxicity, cytotoxicity and genotoxicity evaluation of organic

and inorganic pollutants rich tannery wastewater from a Common Effluent Treatment Plant (CETP) in Unnao district, India using *Vigna radiata* and *Allium cepa*. *Chemosphere*, v, 224, p. 324-332, 2019.

YAHYA, M. N.; GOKÇEKUS, H.; ORHON, B. K.; KARAGUNDUZ, A.; OMWENE, P. I.; A Study on the Hydrolysis of Urea Contained in Wastewater and Continuous Recovery of Ammonia by an Enzymatic Membrane Reactor. *Advances in Water and Wastewater Treatment Processes*, v. 9, 2021.

YANG, T.; LIU, Q.F.; HAO, Q.; FU, Z. Quinoline's influence on nitrogen removal performance and microbial community composition of the anammox process. *Environmental Technology*, v. 40, p. 1425–1437, 2019.

YANG, Y.; LI, M.; LI, H.; LI, X.Y.; LIN, J.G.; DENECKE, M.; GU, J.D. Specific and effective detection of anammox bacteria using PCR primers targeting the 16S rRNA gene and functional genes. *Science Total Environmental*, v. 734, 139387, 2020

YANG, Y., ZHANG, L., CHENG, J., ZHANG, S., LI, X., PENG, Y. Microbial community evolution in partial nitritation/anammox process: from sidestream to mainstream. *Bioresource*, v. 251, p. 327–333, 2018.

YANG, Z.; WANG, X.; YU, D.; CHEN, G.; MA, K.; ZHANG, P.; XU, Y. Granulation characteristics of anammox sludge in response to different signal-molecule-stimulants; mediated through programmed cell death. *Chemosphere*, v. 354, 141497, 2024

YE, R. W.; THOMAS, S. M. Microbial Nitrogen Cycles: physiology, genomics and application. *Current Opinion in Microbiology*, v. 4, 307-3012, 2001.

YIN, Junhui *et al.* Soil microbial communities as potential regulators of N<sub>2</sub>O sources in highly acidic soils. *Soil Ecology Letters*, v. 5, 230178, 2023.

YIN, X.; ZHAI, J.; HU, W.; LI, Y.; RAHAMAN, M. H.; MAKINIA, J. A fast start-up of the organotrophic anammox process inoculated with constructed wetland sediment. *Ecological Engineering*, v. 138, p. 454-460, 2019.

YIN, Z.; SANTOS, C. E. D.; VILAPLANA, J. G.; SOBOTKA, D.; CZERWIONKA, K.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; XIE, L.; MORALES, F. J. F.; MAKINIA, J. Importance of the combined effects of dissolved oxygen and pH on optimization of nitrogen removal in anammox-enriched granular sludge. *Process Biochemistry*, v. 51, p.01274-1282, 2016.

YOU, F.; LU, P.; HUANG, L. Characteristics of prokaryotic and fungal communities emerged in eco-engineered waste rock – Eucalyptus open woodlands at Ranger uranium mine. *Science of The Total Environment*, v. 816, 151571, 2022.

YOUNAS, U.; IQBAL, S.; SALEEM, A.; IQBAL, M.; NAZIR, A.; NOUREEN, S.; MEHMOOD, K.; NISAR, N. Fertilizer industrial effluents: Physico-chemical

characterization and water quality parameters evaluation. *Acta Ecologica Sinica*, v. 37, p. 236-239, 2017.

YOO, J.; HUR, J.; JUNG, J. Identification of oxidative stress and estrogenic activity induced by polarity fractions of effluent organic matter. *Journal of Hazardous Materials*. v. 375, p. 264-272, 2019.

ZHANG, C.; GUO, L.; QIN, J.; CHEN, Z.; DENG, Z.; WANG, X. Combined partial denitrification-anammox with urea hydrolysis (U-PD-Anammox) process: A novel economical low-carbon method for nitrate-containing wastewater treatment. *Journal of Environmental Management*, v.326, 116653, 2023.

ZHANG, D.; WANG, G.; DAÍ, X. Operation of pilot-scale nitrification-anammox reactors for the treatment of reject-water produced from the anaerobic digestion of thermal hydrolysis-treated sludg. *Bioresource Technology*, v. 314, 123717, 2020.

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

ZHANG, F.; LI, X.; WANG, Z.; JIANG, H.; REN, S.; PENG, Y. Simultaneous Ammonium oxidation denitrifying (SAD) in an innovative three-stage process for energy-efficient mature landfill leachate treatment with external sludge reduction. *Water Research*, v. 169, 115156, 2020.

ZHANG, F.; PENG, Y.; WANG, Z.; JIANG, H.; REN, S.; QIU, J. New insights into co-treatment of mature landfill leachate with municipal sewage via integrated partial nitrification, Anammox and denitrification. *Journal of Hazardous Materials*, v. 415, 2021a.

ZHANG, L.; JIANG, L.; ZHANG, J.; LI, J.; PENG, Y. Enhancing nitrogen removal through directly integrating anammox into mainstream wastewater treatment: Advantageous, issues and future study. *Bioresource Technology*, v. 362, 127827, 2022.

ZHANG, L.; NARITA, Y.; GAO, L.; ALI, M.; OSHIKI, M.; OKABE, S. Maximum specific growth rate of anammox bacteria revisited. *Water Research*, v. 116, p. 296-303, 2017.

ZHANG, Q.; WU, J.; YU, Y.Y.; HE, Y.J.; HUANG, Y.; FAN, N.S.; HUANG, B.C.; JIN, R.C. Microbial and genetic responses of anammox process to the successive exposure of different antibiotics. *Chemical Engineering Journal*, 127576, 2020.

ZHANG, Q.Q.; ZHAO, Y.H.; WANG, C.J.; BAI, Y.H.; WU, D.; WU, J.; TIAN, G.M.; SHI, M.L.; MAHMOOD, Q.; JIN, R.C. Expression of the nirS, hzsA, and hdh genes and antibiotic resistance genes in response to recovery of anammox process inhibited by oxytetracycline. *Science Total Environmental*, v. 681, p. 56–65, 2019.

ZHANG, T.; SHAO, M.F.; YE, L. Pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. *Microbial Population and Community Ecology*, v. 6, p. 1137-1147, 2012.

ZHANG, Y.; SUN, Q.; WANG, J.; MA, Y.; CAO, B. Responses of heavy metals mobility and resistant bacteria to adding time of activated carbon during chicken manure composting. *Environmental Pollution*, v. 290, 118070, 2021b.

ZHANG, Z.Z.; ZHANG, Y.; CHENG, Y.F.; JIN, R.C. Linear anionic surfactant (SDBS) destabilized anammox process through sludge disaggregation and metabolic inhibition. *Journal of Hazardous Materials*, v. 403, 123641, 2021c.

ZHOU, M.; LIU, Z.; HU, B. Impact of arsenic and PAHs compound contamination on microorganisms in coking sites: From a community to individual perspective. *Environmental Pollution*, v. 360, 124628, 2024.

ZHU, B-L.; FANG, Y-M.; ZHU, D.; CHRISTIE, P.; KE, X.; ZHU, Y-G. Exposure to nanoplastics disturbs the gut microbiome in the soil oligochaete *Enchytraeus crypticus*. *Environmental Pollution*, v. 239, p. 408-415, 2018.

ZHU, G., WANG, S., MA, B., WANG, X., ZHOU, J., ZHAO, S., LIU, R. Anammox granular sludge in low-ammonium sewage treatment: not bigger size driving better performance. *Water Res*, v.142, p.147–158, 2018.

ZHUANG, J.; ZHOU, Y.; LIU, Y.; LI. Floccs are the main source of nitrous oxide in a high-rate anammox granular sludge reactor: insights from metagenomics and fed-batch experiments. *Water Research*, v. 186, 116321, 2020.

## APÊNDICE A – Detalhamento das análises físico-químicas

### Análise de sólidos total (ST) e sólidos totais voláteis (STV)

A análise de ST e STV foi realizada duas vezes e em duplicatas: quando do enriquecimento do reator, em abril de 2023, e posteriormente na fase II, em abril de 2024. Cabe ressaltar que o número de análises foi determinado em função da quantidade de biomassa presente no reator, evitando-se maiores perdas desta no sistema. Assim, para o resultado de cada análise, considerou-se a média entre as duplicatas realizadas. Tais análises foram realizadas utilizando a metodologia 2540B e E do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012).

Seguindo a metodologia, foi utilizado 20 ml de lodo (pesado em recipientes de porcelana – “cadinho”) de peso conhecido e posteriormente submetido a banho maria, à temperatura de 90°C, visando a evaporação da água. Em seguida, os cadinhos contendo a amostra do inóculo foi incubada por 1 (uma) hora da estufa, com temperatura aproximada de 105°C para secagem. Dando sequência, os recipientes esfriaram em dessecador e foram pesados novamente. Obteve-se a concentração de sólidos totais, conforme Equação seguinte:

$$ST \text{ g.l}^{-1} = (A + B) \times \frac{1000}{20}$$

Em que:

A = peso (em g) da cápsula somada ao do resíduo seco, após passar na estufa;

B = peso (em g) da cápsula.

Para a identificação dos sólidos voláteis, dando continuidade à análise, após a pesagem dos recipientes, estes foram submetidos à mufla, à temperatura de 550° C, durante 30 minutos, para alcançar a volatilização da matéria orgânica dos sólidos. Pesou-se novamente, após esfriamento, sendo possível a determinação de sólidos fixos presentes no lodo, conforme Equação a seguir:

$$STF \text{ g.l}^{-1} = (C + B) \times \frac{1000}{20}$$

Em que:

C = peso (em g) da cápsula somada ao do resíduo seco, após passar na mufla;

B = peso (em g) da cápsula.

A concentração de STV foi então obtida subtraindo-se os sólidos totais fixos dos sólidos totais, como segue na Equação:

$$STV \text{ g.l}^{-1} = \frac{\text{g ST}}{l} - \frac{\text{g STF}}{l}$$

#### **Análise de nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)**

As análises de nitrogênio amoniacal basearam-se no método colorimétrico 4500-NH<sub>3</sub>F, detalhado no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012). O método consiste na formação de um composto de coloração azul intensa (indofenol), proveniente da reação de amônio, hipoclorito e fenol. O nitroprussiato de sódio age como catalisador da reação, permitindo que a reação seja determinada por colorimetria em espectrofotômetro. Mede-se, portanto, a absorvância (medida no comprimento de onda de 640nm) que é proporcional à quantidade de nitrogênio amoniacal presente na matriz analisada.

Analiticamente, o procedimento consistiu inicialmente na transferência de 5 ml de amostra de efluente (de entrada ou saída do RBS) – ou de diluição da amostra – em tubos tipo *falcon* de 15 ml e de 5 ml de água Milli-Q® (para o branco). Posteriormente, foram pipetados os reagentes: 200 µl de solução de fenol 1% (p/v), 200 µl de uma solução de nitroprussiato de sódio 0,5% (p/v), seguido de 500 µl de solução oxidante; composta por hipoclorito de sódio 4-6%; e de uma solução alcalina, composta por citrato de sódio e hidróxido de sódio. A solução oxidante é preparada na proporção 4:1 dos reagentes informados. Os tubos falcon foram devidamente homogeneizados em agitador tipo vórtex e incubados a temperatura ambiente, na ausência de luz por

um período de 2 horas. Após a incubação seguiu-se para a etapa de leitura das absorvâncias em espectrofotômetro *PerkinElmer Lambda XLS*.

As análises foram feitas em triplicata para obtenção do resultado, realizando-se a média entre as repetições obtidas. Ademais, a concentração foi obtida por meio da equação de reta obtida na construção da curva de calibração, conforme Equação abaixo.

$$Y = aX + b$$

Em que:

Y = concentração de amônia (mg/L);

X = absorvâncias;

### **Análise de nitrito (N-NO<sub>2</sub>)**

As análises de nitrito basearam-se no método colorimétrico 4500 NO<sub>2</sub>-B, conforme *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012). O método consiste na reação de nitrito com ácido sulfanílico, em condições de baixo pH, com a formação de um íon diazônico, que se acopla com um composto  $\alpha$ -Naftil, formando um corante com a coloração avermelhada.

Analiticamente, pipetou-se 5 ml de amostra de efluente (de entrada ou saída do RBS) – ou de diluição da amostra – em tubos tipo *falcon* de 15 ml e de 5 ml de água Milli-Q® (para o branco). Foi adicionado 200  $\mu$ l de um reagente de cor (ácido fosfórico 85%, sulfanilamida e cloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina) nos tubos e estes foram devidamente homogeneizados posteriormente no vórtex. Os cubos foram incubados por 20 minutos a temperatura ambiente e em seguida foi feita a leitura da absorvância no espectrofotômetro a 543nm. Registra-se que para ambas as análises, de amônia e nitrito, utilizou-se uma cubeta quadrada de quartzo, de caminho óptico igual a 1 cm.

A concentração de nitrogênio nitroso foi obtida por meio da Equação abaixo, sendo realizadas análises em duplicata e o resultado foi obtido por meio das médias das duplicatas.

$$Y = aX + b$$

Em que:

Y = concentração de nitrito (mg/l);

X = absorbâncias;

### **Análise de nitrato (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)**

A análise de nitrato foi realizada pelo método de absorção ultravioleta 4500 NO<sub>3</sub>-B (espectrofotométrico), que se baseia na absorção de luz ultravioleta em um comprimento de onda de 220 nm (APHA, 2012). A curva de calibração alcança até 11 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L. A metodologia é recomendada para águas com baixo teor de matéria orgânica, pois a matéria orgânica absorve ondas de 220nm e de 275 nm. Contudo, o íon nitrato não absorve esta última, contornando-se a limitação do método realizando uma segunda medida em 275nm para que o valor de absorbância referente à matéria orgânica seja subtraído.

Analiticamente, pipetou-se 1 ml de ácido clorídrico em cada amostra de 5 ml de efluente (entrada ou saída do RBS) e posteriormente foi lida a absorbância utilizando os comprimentos de onda de 220nm, de 275 nm. A concentração de nitrato foi obtida, em duplicata, realizando a subtração duas vezes da absorbância de 275nm da absorbância de 220nm. Por fim, preparou-se a curva de calibração para a leitura de nitrato em mg/L.

### **Análise de Demanda Química de Oxigênio Total (DQO)**

Conforme APHA (2012), a DQO foi realizada pelo método colorimétrico, refluxo fechado (5520 D). As amostras foram oxidadas por dicromato de potássio, em meio ácido. Conforme metodologia, a quantidade de dicromato de potássio colocada em contato com a amostra foi superior à quantidade necessária para a oxidação, assegurando a oxidação da matéria orgânica. Logo, o excesso deste reagente foi medido ao final do processo de oxidação, permitindo a determinação da quantidade consumida para degradação da matéria orgânica e, indiretamente, a quantidade de oxigênio.

### **Análise de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO)**

A DBO foi realizada pelo método oximétrico (5210) da APHA (2012) e consistiu em colocar as amostras em frascos vedados e completamente cheios, incubando-os sob condições específicas e durante tempo específico. O oxigênio dissolvido (OD) foi medido inicialmente e após a incubação. A DBO foi dada pela diferença entre OD inicial e final.

Analiticamente, foram preparadas 4 soluções (tampão fosfato, sulfato de magnésio, cloreto de cálcio, cloreto férrico). Em seguida, preparou-se a água de diluição, na qual foi separado um barrilete, com volume de água deionizada em função do número de pontos. Para cada litro de água deionizada, adicionou-se 1 ml de cada solução e posteriormente, deixou-se a água com os nutrientes aerando durante uma hora. As amostras foram colocadas em frascos de volumes conhecidos e iguais, separando-se um frasco do OD imediato (lido em oxímetro) e os outros foram tampados com papel alumínio e incubados à 20 °C por um tempo de 5 dias. Foi realizado um branco com a água de diluição juntamente com a determinação de DBO, com no máximo 0,2 mg/L.

Após os dias de incubação (de 5 a 8) à 20 °C, os frascos de OD foram retirados da incubadora, colocados dentro do becker de 1L e sobre agitador magnético. Foram destampados e após agitação, foi realizada a leitura no oxímetro.

### **Alcalinidade**

As análises basearam-se no método 2510 B *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012). A medida de alcalinidade foi realizada volumetricamente por titulação com  $H_2SO_4$ , e é representada em termos de Carbonato de Cálcio ( $CaCO_3$ ). Foi utilizado o método potenciométrico, no qual colocou-se o ácido  $H_2SO_4$  na bureta, com concentração (0,002N) e fator de correção conhecidos. Em seguida, pipetou-se um volume da solução a ser titulada (efluente de entrada ou saída do reator RBS), transferindo-a para um béquer de 250 ml, colocando-o sobre o agitador magnético. O eletrodo de pH foi imergido na solução com o béquer e foi medido o seu pH inicial. A titulação foi então iniciada, anotando o pH em função do volume de titulante ( $H_2SO_4$ ) adicionado. Realizou-se a titulação até o pH próximo de 3,5, traçando-se posteriormente a curva de pH x  $H_2SO_4$ .

O cálculo da Alcalinidade foi dado pela Equação a seguir:

$$A = \frac{V \times 50000 \times N \times Fc}{v}$$

Em que:

V = volume total de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (ml);

N = normalidade do ácido calculada;

Fc = fator de correção da normalidade do ácido

v = volume da amostra (ml)

### APÊNDICE B – Análises estatísticas

Fases	Nitrogênio Amoniacal (mg/L)		Eficiência (%)
	Afluente	Efluente	
Fase 1	168,59 b	37,75 b	80,68 a
Fase 2	201,82 b	29,80 b	85,50 a
Fase 3	360,52 a	351,26 a	13,59 b
CV (%)	28,10	62,67	25,23

Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não se diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). CV = coeficiente de variação.

Fases	Nitrito (mg/L)		Eficiência (%)
	Afluente	Efluente	
Fase 1	174,32 b	3,09 b	98,06 a
Fase 2	225,70 a	0,80 b	99,41 a
Fase 3	227,05 a	239,55 a	3,80 b
CV (%)	25,30	31,52	8,99

Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não se diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). CV = coeficiente de variação.

Fases	DQO (mg/L)		Eficiência (%)
	Afluente	Efluente	
Fase 1	135,04 c	37,17 b	73,40 a
Fase 2	370,54 b	43,08 b	86,15 a
Fase 3	531,58 a	393,66 a	36,05 b
CV (%)	28,41	115,54	34,13

Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não se diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). CV = coeficiente de variação.

Fases	Alcalinidade (mg/L)		Eficiência (%)
	Afluente	Efluente	
Fase 1	483,92 b	456,02 b	9,27 a
Fase 2	654,53 b	633,07 b	2,97 a
Fase 3	2207,33 a	1862,43 a	17,02 a
CV (%)	64,10	58,2	158,01

Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não se diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). CV = coeficiente de variação.



A4b	Cerasicoccus	Holosporaceae	Obscuribacteraceae	Sandaracinaceae
AAP99	Chitinophaga	HSB_OF53-F07	Occallatibacter	Sandaracinobacter
Acetobacteraceae	Chitinophagaceae	Hungateiclostridiaceae	OLB8	Saprosiraceae
Acetobacterium	Chlamydiaceae	Hungateiclostridium	OM27_clade	Sarcina
Achromobacter	Christensenellaceae_R-7_group	Hydrogenedensaceae	Opatutaceae	SC-I-84
Acidibacter	Chryseobacterium	Hyphomicrobiaceae	Oryzihumus	Sedimentibacter
Acidimicrobiaceae	Chthoniobacter	Hyphomicrobium	Oscillospiraceae	SH-PL14
Acidiphilium	Chthonomonas	Iiumatobacteraceae	Ottowia	Simkaniaceae
Acidipila	Cloacibacterium	IMCC26207	Oxalobacteraceae	Singulisphaera
Acidobacteriaceae_(Subgroup_1)	Clostridium_sensu_stricto_1	Intestinibacter	Paenarthrobacter	Sinomonas
Acidothermus	Clostridium_sensu_stricto_12	Intrasporangiaceae	Paenibacillaceae	SM1A02
Acinetobacter	Clostridium_sensu_stricto_18	Intrasporangium	Paenibacillus	Smithella
Actinoallomurus	Clostridium_sensu_stricto_3	Isosphaera	Pajaroellobacter	Solirubrobacter
Actinospica	Cohnella	Isosphaeraceae	Paludisphaera	Solirubrobacteraceae
ADurb.Bin063-1	Comamonadaceae	Janibacter	Pandoraea	Sphaerisporangium
AKYG587	Comamonas	Jatrophihabitans	Parachlamydiaceae	Sphingobacteriaceae
AKYH767	Conexibacter	JG30-KF-AS9	Paracoccus	Sphingobacterium
Alicyclobacillus	Coxiella	JG30-KF-CM45	Parafilimonas	Sphingomonadaceae
Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium	Crossiella	JGI_0001001-H03	Pedomicrobium	Sphingomonas
alpha1_cluster	Cupriavidus	Kaistia	Pedosphaeraceae	Sporomusa
Amycolatopsis	cvE6	KD3-10	Phenylobacterium	ST-12K33
Anaerocolumna	Dactylosporangium	KFJG30-B3	PHOS-HE36	Stenotrophomonas
Anaerolinea	Defluviimonas	Kitasatospora	Pir4_lineage	Steroidobacter
Anaerolineaceae	Deinococcus	Kribbella	Pirellula	Streptococcus
Anaeromyxobacter	Denitratisoma	Ktedonobacter	Pirellulaceae	Streptomyces
Anaerosinus	Desulforhabdus	Ktedonobacteraceae	Planctopirus	Streptomycetaceae
Anaerostipes	Desulfosporosinus	Kutzneria	Planococcaceae	Streptosporangiaceae
Anaerovoracaceae	Devosia	Labrys	Pleomorphomonas	Subdoligranulum
Ancalomicrobium	Diplorickettsiaceae	Lachnospiraceae	Polyangiaceae	Subgroup_10
Aquicella	DMER64	Lacihabitans	Prolixibacteraceae	Sutterellaceae
Aquisphaera	Dokdonella	Lactobacillus	Prostheobacter	SWB02
Aureimonas	Dongia	Lacunisphaera	Pseudosthecomicrobium	Symbiobacteraceae
Azospirillum	Duganella	Larkinella	Pseudarthrobacter	Synergistaceae
Babeliaceae	Dyella	Lautropia	Pseudoflavitalea	Syntrophobacteraceae
Bacillaceae	Edaphobacter	Legionella	Pseudolabrys	Syntrophus
Bacillus	Edaphobaculum	Leifsonia	Pseudomonadaceae	Taibaella
Bacteroidetes_vadinHA17	Ellin516	Leptolinea	Pseudonocardia	TC1
Bauldia	Ellin6067	Leucobacter	Pseudonocardiaceae	Terrabacter
Bdellovibrio	Enterobacteriaceae	Limnobacter	Pseudoxanthomonas	Terracidiphilus
Beijerinckiaceae	Enterococcus	Longilinea	Puia	Terrimicrobium
Belnapia	Entotheonellaceae	Luedemannella	Ralstonia	Terrimonas
Birri41	env.OPS_17	Magnetospirillaceae	Ramlibacter	Terrisporobacter
Blastocatella	Erysipelatoclostridium	Marmoricola	RB41	Tetrasphaera
Blastocatellaceae	Eubacteriaceae	Massilia	Reyranela	Thermomonas
Blastococcus	FCPS473	Mesorhizobium	Reyraneliaceae	Thermovirga
Blautia	Ferruginibacter	Methylobacterium-Methylorubrum	Rhizobiaceae	Thiobacillus
Bosea	Fictibacillus	Methyloligellaceae	Rhizobiales_Incertae_Sedis	TM7a
Bradyrhizobium	Filimonas	Micrococcaceae	Rhodanobacter	Truepera
Brevibacillus	Fimbrilglobus	Micromonosporaceae	Rhodanobacteraceae	Tumebacillus
Brevundimonas	Fimbriimonadaceae	Micropepsaceae	Rhodobacter	Turicibacter
Bryobacter	Flavisolibacter	Microscillaceae	Rhodobacteraceae	UBA12409
Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia	Flavobacteriaceae	Microvirga	Rhodoblastus	UCG-010
Burkholderiaceae	Flavobacterium	mle1-7	Rhodocyclaceae	Vampirovibrionaceae
Caldilineaceae	Fonticella	MND1	Rhodomicrobium	Vermiphilaceae
Candidatus_Berkiella	G12-WMSP1	Moraxellaceae	Rhodoplanes	Vicinamibacteraceae
Candidatus_Brocadia	Gaiella	Mucilaginitibacter	Rhodospirillaceae	Vulgatibacter
Candidatus_Caldatribacterium	Gallicola	Mycobacterium	Romboutsia	WD2101_soil_group