

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANEAMENTO,  
MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS**

**REATORES COM ATIVIDADE ANAMMOX PARA O PÓS-  
TRATAMENTO DE DIGESTATO DE RESÍDUO ALIMENTAR:  
AVALIAÇÃO DE DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE  
AERAÇÃO E DA COMUNIDADE MICROBIANA**

**Alyne Duarte Pereira**

**Belo Horizonte**

**2018**

**REATORES COM ATIVIDADE ANAMMOX PARA O PÓS-  
TRATAMENTO DE DIGESTATO DE RESÍDUO ALIMENTAR:  
AVALIAÇÃO DE DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE  
AERAÇÃO E DA COMUNIDADE MICROBIANA**

**Alyne Duarte Pereira**

**Alyne Duarte Pereira**

**REATORES COM ATIVIDADE ANAMMOX PARA O PÓS-  
TRATAMENTO DE DIGESTATO DE RESÍDUO ALIMENTAR:  
AVALIAÇÃO DE DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE  
AERAÇÃO E DA COMUNIDADE MICROBIANA**

Tese 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 Doutora 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

Coorientador: Prof. Carlos Augusto de Lemos Chernicharo

Belo Horizonte  
Escola de Engenharia

2018

P436r

Pereira, Alyne Duarte.

Reatores com atividade anammox para o pós-tratamento de digestato de resíduo alimentar [manuscrito] : avaliação de diferentes estratégias de aeração e da comunidade microbiana / Alyne Duarte Pereira. – 2018. xvi, 242 f., enc.: il.

Orientadora: Juliana Calábria de Araújo.

Coorientador: Carlos Augusto de Lemos Chernicharo.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia.

Anexos: f. 224-242.

Bibliografia: f. 206-223.

1. Engenharia Sanitária - Teses. 2. Saneamento - Teses. 3. Águas residuais - Tratamento - Teses. 4. Nitrificação - Teses. I. Araújo, Juliana Calábria de. II. Chernicharo, Carlos Augusto Lemos. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia. IV. Título.

CDU: 628(043)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Escola de Engenharia

Programa de Pós-Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos  
Avenida Antônio Carlos, 6627 - 4º andar - 31270-901 - Belo Horizonte - BRASIL  
Telefax: 55 (31) 3409-1882 - posgrad@desa.ufmg.br  
<http://www.smarh.eng.ufmg.br>

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Reatores Com Atividade Anammox Para O Pós-tratamento de Digestato de Resíduo Alimentar: Avaliação de Diferentes Estratégias de Aeração e da Comunidade Microbiana

**ALYNE DUARTE PEREIRA**

Tese defendida e aprovada pela banca examinadora constituída pelos Senhores:

  
Profª JULIANA CALÁBRIA DE ARAÚJO (ORIENTADORA)

  
Prof. CARLOS AUGUSTO DE LEMOS CHERNICHARO (CO-orientador)

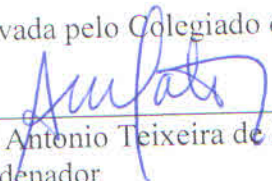
  
Prof. MARCOS VON SPERLING

  
Profª SILVANA DE QUEIROZ SILVA

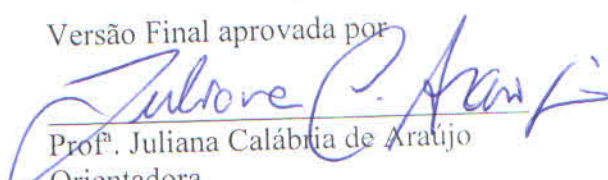
  
Prof. AIRTON KUNZ

  
Profª ANDRÉA MARIA AMARAL NASCIMENTO

Aprovada pelo Colegiado do PG SMARH

  
Prof. Antonio Teixeira de Matos  
Coordenador

Versão Final aprovada por

  
Profª. Juliana Calábria de Araújo  
Orientadora

Belo Horizonte, 17 de agosto de 2018.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos meus pais, José Lucas e Leonor e ao meu irmão, Rangel, por serem minha base, meu porto seguro e desde sempre os maiores responsáveis por todas as minhas conquistas.

Ao meu esposo, Gustavo, pelo incentivo, paciência, por compartilhar comigo as conquistas e pelos abraços apertados que me acolheram nos momentos difíceis. A conclusão deste trabalho só foi possível graças ao seu apoio.

À minha orientadora, Prof<sup>ª</sup> Juliana Calábria de Araújo, que sempre me recebeu de braços abertos. Obrigada pela excepcional orientação acadêmica, pelos ensinamentos, oportunidades a mim oferecidas e pela confiança em mim depositada.

Ao meu coorientador, Prof. Carlos Augusto de Lemos Chernicharo, pelas importantes contribuições feitas a esse trabalho e pelo exemplo de profissionalismo e dedicação.

Às queridas amigas do laboratório de microbiologia, Cíntia, Cássia, Luyara, Bruna, Elayne, Alessandra, Helena, Brenda, Adriana, Josiane, Lariza, Hortência, Taís, Amanda, Débora, Érika, Cristina, Luciene, Sarah, Ana Maria, Cristina, Karol, Graziela e Renata. Além das contribuições científicas, vocês fizeram com que os dias de trabalho no laboratório fossem mais leves. Obrigada pelo apoio, pelas conversas, momentos de descontração e pela amizade, que levarei como presente para toda a vida.

Aos colegas de equipe do Quarteirão 10, Alessandra, Juliana, Gabriel Tadeu, Tiago Ferreira, Lucas Melgaço, Andrés Felipe, Brenda, Carla, Claudinei, Anderson e Vitor, pelo empenho no trabalho realizado no Q10 e por serem sempre tão solícitos em me auxiliar ao longo desta jornada. Obrigada pelas experiências compartilhadas e pelo excelente convívio.

Aos alunos de iniciação científica que passaram pelo ‘Projeto Anammox’, Helena, Karine, Luisa, Aline, Fernanda e Pedro, pelo auxílio na realização das análises laboratoriais, que foi imprescindível para a realização deste trabalho.

Aos colegas do PPG SMARH, Thiago Bressani, Débora, Lucas, Iacy, Isabela, Emanuel, Bernardo, Carlos Andrés, Taiana, Rodrigo López, Jorge Alejandro, Daniel Dias, Victor Franco,

Tiago Assunção por todo apoio em suas diferentes formas, pela excelente convivência, pelas conversas e momentos de descontração.

A todos os professores do PPG SMARH pelos ensinamentos transmitidos nas disciplinas ministradas durante o curso.

Aos técnicos Gabriel e Érico pelo auxílio com as análises físico-químicas.

À Prof. Claudia Etchebehere e à Angela Cabezas por estarem sempre dispostas em ajudar e pelas contribuições realizadas a esse trabalho.

À Aline Paranhos e aos professores Bruno Baêta e Sérgio Aquino pelo auxílio com as análises de nitrato e por possibilitarem sua realização na Universidade Federal de Ouro Preto.

À Marcela Dias e à Prof. Andrea Amaral pela disponibilidade em colaborar com as análises dos dados do sequenciamento de nova geração.

À FAPEMIG, pela bolsa de doutorado concedida.

À FAPEMIG, CNPq, CAPES e ao INCT ETEs Sustentáveis pelo apoio financeiro essencial para a execução do trabalho.

## RESUMO

O processo de oxidação anaeróbia da amônia (anammox) é bastante promissor para a remoção de nitrogênio de efluentes e geralmente é associado a outros processos, como a nitrificação parcial (NP). Há ainda demanda de pesquisas para avaliar a aplicabilidade deste processo para o tratamento de diferentes tipos de efluentes. Este trabalho avaliou o desempenho de reatores em bateladas sequencias (RBS) com atividade anammox no pós-tratamento de digestato de resíduo alimentar visando a remoção de nitrogênio. O experimento foi dividido em duas etapas. A Etapa 1, realizada em RBS em escala laboratorial de 10 L de volume (RBS-Lab), consistiu em três fases experimentais: 1) Enriquecimento de bactérias anammox; 2) Alimentação do RBS-Lab com digestato de resíduo alimentar mais nitrito e; 3) Avaliação de diferentes estratégias de aeração para o desenvolvimento do processo de NP/ anammox. A Etapa 2 foi realizada na Plataforma de metanização de resíduo alimentar (pMethar) localizada no Quarteirão 10 da UFMG onde um RBS em escala piloto (RBS-Piloto) de 500 L de volume foi operado para o pós-tratamento do digestato. Esta etapa consistiu do desenvolvimento do processo anammox em escala piloto a partir de lodo ativado de estação de tratamento de esgoto (ETE). No RBS-Lab, a alimentação do reator com digestato mais nitrito não alterou a eficiência na remoção de nitrogênio por meio do processo anammox, uma vez que carga de nitrogênio removida igual a  $77,5 \text{ g N.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$  foi obtida e não foi significativamente diferente do valor alcançado na fase de enriquecimento ( $81,9 \text{ g N.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ ). Dentre as estratégias de aeração avaliadas, aeração intermitente com maiores períodos anóxicos (30 e 45 minutos) em relação ao aeróbio (15 minutos) e menor taxa de ar aplicada ( $0,026 \text{ L.min}^{-1}.\text{L}_{\text{reator}}^{-1}$ ) permitiram alcançar valores de produção de nitrato/ consumo de amônio mais próximos aos reportados na literatura para o processo de NP/ anammox (0,17 e 0,21). Cargas de nitrogênio removidas medianas iguais a 18,4 e 24,3  $\text{g N.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$  foram obtidas nestas condições. A suplementação de alcalinidade não alterou significativamente a remoção de nitrogênio. A estrutura da comunidade microbiana foi alterada pelas diferentes condições operacionais do reator. A abundância de bactérias anammox foi reduzida de 31 % para 1 % após as primeiras estratégias de aeração avaliadas. Após período de recuperação, a abundância relativa de bactérias anammox aumentou para 15 % e houve substituição do gênero dominante, de *Ca. Brocadia* para *Ca. Jettenia*. Bactérias desnitrificantes foram encontradas juntamente com bactérias heterotróficas aeróbias no RBS-Lab. No RBS-Piloto baixa carga de nitrogênio removida foi alcançada, com mediana igual a  $12,2 \text{ g N.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$  refletindo a dificuldade em desenvolver o processo anammox em escala piloto a partir de efluente real e de lodo não enriquecido previamente. Neste reator, o gênero de anammox *Ca. Anammoximicrobium* foi enriquecido e poucos táxons de desnitrificantes foram observados com elevada abundância. Os resultados demonstraram o potencial de reatores com atividade anammox para o tratamento de digestato de resíduo alimentar.

Palavras-chave: Anammox, Comunidade microbiana, Digestato de resíduo alimentar, Nitrificação parcial, Remoção de nitrogênio.

## ABSTRACT

The anaerobic ammonium oxidation (anammox) process is a promising technology for nitrogen removal from wastewaters and is generally associated with other processes, such as partial nitrification (PN). There is still a demand for evaluate the applicability of this process to treat diferente types of wastewaters. This study aims to evaluate the performance of sequencing batch reactors (SBR) with anammox activity in post-treatment of food waste digestate. The experiment was divided into two stages. Stage 1 was performed in a SBR laboratory-scale of 10 L of volume (Lab-SBR) and consisted of three experimental phases: Phase 1 - Enrichment of anammox bacteria; Phase 2 - Application of food waste digestate to Lab-SBR with nitrite supplementation and; Phase 3 - Evaluation of different aeration strategies for development of PN/ anammox process in the reactor. Stage 2 was performed at the Metanization Platform of food waste (pMethar) located at Block 10 from UFMG where a pilot scale SBR (Pilot-SBR) of 500 L of volume was implemented for food waste digestate post-treatment. This stage consisted of the enrichment and development anammox process at pilot scale from activated sludge obtained from wastewater treatment plant. In SBR-Lab, the addition of digestate and nitrite did not affect the nitrogen removal efficiency by anammox process, once the nitrogen load removed was equal to  $77.5 \text{ g.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ , and was not significantly different from that obtained during enrichment phase ( $81.9 \text{ g.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ ). Among the aeration strategies evaluated, the intermittent strategies with the highest anoxic periods (30 and 45 minutes) compared to the aerobic periods (15 minutes) and lower air flow rate ( $0.026 \text{ L.min}^{-1}.\text{L}_{\text{reactor}}^{-1}$ ) reached closer values of nitrate production/ ammonium consumption than those reported in the literature for PN/ anammox process (0.17 e 0.21). Median nitrogen removal loads equal to 18.4 and  $24.3 \text{ g N.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$  were obtained under these conditions. Alkalinity supplementation did not significantly alter the nitrogen removal. The microbial community structure was affected by different reactor operating conditions. The abundance of anammox bacteria was reduced from 31 % to 1 % after the first aeration strategies evaluated. After recovery period, the relative abundance of anammox bacteria increased to 15 % and there was replacement of the dominant genus, from *Ca. Brocadia* to *Ca. Jettenia*. Denitrifying bacteria were found together with aerobic heterotrophic bacteria in SBR-Lab. In Pilot-SBR low nitrogen load removed was achieved, with a median value equal to  $12.2 \text{ g N.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$  reflecting the difficulty in developing the pilot-scale anammox process from real effluent and without previously enriched sludge. In this reactor, the genus of anammox *Ca. Anammoximicrobium* was enriched and few taxa of denitrifying bacteria were observed with high abundance. The results demonstrated the potential of reactors with anammox activity for treatment of food waste digestate.

Key words: Anammox, Food waste digestate, Microbial community, Nitrogen removal, Partial nitrification.

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>6</b>
2.1	O CICLO DO NITROGÊNIO.....	6
2.2	A OXIDAÇÃO ANAERÓBIA DA AMÔNIA - ANAMMOX .....	9
2.3	PROCESSO ANAMMOX NO TRATAMENTO DE EFLUENTES .....	16
2.4	PÓS-TRATAMENTO DE DIGESTATOS ORIUNDOS DO TRATAMENTO DE DIFERENTES TIPOS EFLUENTES E RESÍDUOS ORGÂNICOS .....	27
2.5	ESTRATÉGIAS DE AERAÇÃO EM REATORES DE ÚNICO ESTÁGIO COM NITRIFICAÇÃO PARCIAL E ANAMMOX.....	32
2.6	COMUNIDADES MICROBIANAS EM REATORES ANAMMOX .....	35
2.6.1	<i>Técnicas moleculares utilizadas para o estudo de comunidades microbianas em reatores anammox .....</i>	<i>36</i>
2.6.2	<i>Diversidade microbiana em reatores anammox.....</i>	<i>38</i>
2.6.2.1	<i>Diversidade de bactérias ‘não anammox’ em reatores anammox .....</i>	<i>39</i>
2.6.2.2	<i>Diversidade de arqueias em reatores anammox .....</i>	<i>48</i>
2.6.3	<i>Fatores que afetam a composição da comunidade microbiana em reatores anammox.....</i>	<i>50</i>
2.6.3.1	<i>Influência do inóculo na composição da comunidade microbiana de reatores anammox .....</i>	<i>50</i>
2.6.3.2	<i>Estrutura da comunidade microbiana em reatores anammox com diferentes formas de crescimento da biomassa.....</i>	<i>54</i>
2.6.3.3	<i>Efeito da matéria orgânica sobre a remoção de nitrogênio e sobre as comunidades microbianas em reatores anammox .....</i>	<i>58</i>
<b>3</b>	<b>PREMISSAS E HIPÓTESES DE INVESTIGAÇÃO.....</b>	<b>65</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>67</b>
4.1	OBJETIVO GERAL .....	67
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	67
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>68</b>
5.1	ÁREA DE ESTUDO E DESCRIÇÃO DO PROCESSO DE TRATAMENTO DO RESÍDUO ALIMENTAR .....	68
5.2	EXPERIMENTOS REALIZADOS DURANTE A ETAPA 1 DA PESQUISA.....	71
5.2.1	<i>Fase 1: Enriquecimento e cultivo de bactérias anammox no RBS em escala laboratorial .</i>	<i>72</i>
5.2.2	<i>Fase 2: Alimentação do RBS em escala laboratorial com digestato de resíduo alimentar mais nitrito.....</i>	<i>75</i>
5.2.3	<i>Fase 3: Avaliação de diferentes estratégias de aeração e da suplementação de alcalinidade na remoção de nitrogênio pelos processos de nitrificação parcial e anammox (NP/A) em RBS em escala laboratorial .....</i>	<i>75</i>
5.2.3.1	<i>Avaliação da atividade anammox específica durante o período de recuperação R2.....</i>	<i>77</i>

5.2.4	<i>Análises estatísticas</i> .....	77
5.3	EXPERIMENTOS REALIZADOS DURANTE A ETAPA 2 DA PESQUISA.....	78
5.3.1	<i>Enriquecimento de bactérias anammox em RBS em escala piloto com digestato de resíduo alimentar e suplementação com nitrito</i> .....	78
5.4	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	80
5.4.1	<i>Caracterização dos efluentes gerados na plataforma de metanização de resíduo alimentar e monitoramento dos RBS em escala laboratorial e piloto</i> .....	80
5.5	ANÁLISES MOLECULARES.....	81
5.5.1	<i>Extração de DNA</i> .....	84
5.5.2	<i>Deteção e quantificação de bactérias do ciclo do nitrogênio por PCR quantitativo (qPCR)</i> .....	84
5.5.3	<i>Análise dos perfis da comunidade microbiana por PCR-DGGE</i> .....	87
5.5.4	<i>Análise da diversidade microbiana dos reatores por sequenciamento de nova geração</i> ....	89
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>91</b>
6.1	EXPERIMENTOS REALIZADOS DURANTE A ETAPA 1 DA PESQUISA.....	91
6.1.1	<i>Avaliação do efeito da aplicação de digestato de resíduo alimentar</i> .....	91
6.1.1.1	<i>Enriquecimento de bactérias anammox com meio de cultura – Fase 1</i> .....	91
6.1.1.2	<i>Alimentação do RBS-Lab com digestato de resíduo alimentar mais nitrito em condições anaeróbias - Fase 2</i> .....	95
6.1.1.3	<i>Impacto da alimentação do RBS-Lab com digestato de resíduo alimentar mais nitrito sobre a remoção de nitrogênio pelo processo anammox</i> .....	101
6.1.2	<i>Avaliação de diferentes estratégias de aeração sobre os processos concomitantes de nitrificação parcial e anammox – Fase 3</i> .....	102
6.1.3	<i>Avaliação da influência da adição de alcalinidade sobre os processos de nitrificação parcial e anammox</i> .....	110
6.1.3.1	<i>Recuperação da atividade anammox no RBS-Lab</i> .....	115
6.1.4	<i>Otimização das condições de aeração visando obter maior controle do processo de nitrificação parcial</i> .....	121
6.1.5	<i>Resumo dos parâmetros operacionais e resultados físico-químicos obtidos durante as estratégias de aeração avaliadas no RBS-Lab</i> .....	127
6.1.6	<i>Determinação da abundância dos grupos de bactérias do ciclo do nitrogênio por PCR quantitativo (qPCR) no RBS em escala laboratorial</i> .....	136
6.1.7	<i>Análise do perfil da comunidade microbiana do RBS em escala laboratorial investigado por PCR-DGGE</i> .....	143
6.1.7.1	<i>PCR- DGGE do Domínio Bacteria</i> .....	143
6.1.7.2	<i>PCR-DGGE de bactérias anammox</i> .....	151
6.1.8	<i>Análise da diversidade microbiana do RBS em escala laboratorial por sequenciamento de nova geração (SNG)</i> .....	158
6.1.8.1	<i>Diversidade em nível de Filo</i> .....	161
6.1.8.2	<i>Diversidade em nível de Ordem</i> .....	163
6.1.8.3	<i>Principais táxons relacionados ao ciclo do nitrogênio</i> .....	171
6.1.9	<i>Conclusões dos experimentos realizados em escala laboratorial – Etapa 1</i> .....	173
6.2	EXPERIMENTOS REALIZADOS DURANTE A ETAPA 2 DA PESQUISA.....	175

6.2.1	<i>Enriquecimento de bactérias anammox em RBS em escala piloto alimentado com digestato de resíduo alimentar e suplementado com nitrito</i> .....	175
6.2.2	<i>Determinação da abundância dos grupos de bactérias do ciclo do nitrogênio por qPCR no RBS em escala piloto</i> .....	182
6.2.3	<i>Análise do perfil da comunidade microbiana do RBS em escala piloto por PCR-DGGE</i> . 184	
6.2.3.1	PCR-DGGE do domínio Bacteria .....	184
6.2.3.2	PCR-DGGE de bactérias anammox .....	187
6.2.4	<i>Análise da diversidade microbiana do RBS em escala piloto por SNG</i> .....	190
6.2.4.1	Diversidade em nível de Filo.....	192
6.2.4.2	Diversidade em nível de Ordem.....	193
6.2.4.3	Principais táxons relacionados ao ciclo do nitrogênio .....	198
6.2.5	<i>Conclusões dos experimentos realizados em escala piloto – Etapa 2</i> .....	199
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	<b>201</b>
<b>8</b>	<b>RECOMENDAÇÕES</b> .....	<b>205</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>206</b>
	<b>APÊNDICE A - Estatística descritiva dos compostos nitrogenados e DQO durante as Fases 1, 2 e 3 de operação do RBS-Lab.</b> .....	<b>224</b>
	<b>APÊNDICE B – Experimento de Atividade anammox específica durante o período de recuperação R2 do RBS-Lab</b> .....	<b>236</b>
	<b>APÊNDICE C – Estimativa das concentrações de sólidos totais voláteis (STV) ao longo dos períodos operacionais do RBS-Lab e relação alimento/micro-organismo (A/M) ....</b>	<b>237</b>
	<b>APÊNDICE D – Resultados obtidos nos ensaios de qPCR do RBS-Lab</b> .....	<b>238</b>
	<b>APÊNDICE E – Estatística descritiva das concentrações dos compostos nitrogenados e DQO no RBS-Piloto</b> .....	<b>240</b>
	<b>APÊNDICE F – Resultados obtidos nos experimentos de qPCR no RBS-Piloto</b> .....	<b>242</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1</b> - Ciclo do nitrogênio .....	7
<b>Figura 2.2</b> - Micrografia eletrônica (direita) e representação esquemática (esquerda) de uma célula anammox mostrando o anammoxossomo .....	15
<b>Figura 2.3</b> - Processos para nitrificação parcial e anammox. (a) único estágio e (b) dois estágios. BOA – Bactérias oxidadoras de nitrito; AMX – Bactérias anammox.....	20
<b>Figura 2.4</b> - Distribuição geográfica dos reatores anammox em escala plena ao redor do mundo. ....	22
<b>Figura 2.5</b> - Fluxograma com possíveis técnicas de tratamento e reutilização de efluentes provenientes da digestão anaeróbia de resíduos orgânicos. ....	30
<b>Figura 2.6</b> - Principais técnicas moleculares utilizadas em estudos de comunidades microbianas em reatores anammox e suas potenciais aplicações. (a) FISH: Hibridação in situ Fluorescente; (b) PCR: Reação em cadeia da Polimerase; (c) PCR-DGGE: Reação em cadeia da polimerase seguida pela eletroforese em gel de gradiente desnaturante; (d) qPCR: PCR quantitativo; (e) SNG: Sequenciamento de nova geração.....	37
<b>Figura 2.7</b> - Estrutura de biofilme formado em reator com biodiscos para o tratamento de efluente de lixiviado de aterro de resíduos perigosos.....	55
<b>Figura 2.8</b> - Estrutura da comunidade microbiana de grânulo anammox proposta por Hu et al. (2012). ....	55
<b>Figura 2.9</b> - Rota metabólica hipotética em grânulos anammox construída a partir do estudo da comunidade microbiana (Pirosequenciamento do gene RNAr 16S e Metagenoma) de grânulos anammox. ....	57
<b>Figura 5.1</b> - Fluxograma das etapas metodológicas com duração de cada etapa. (a) RA: Resíduo alimentar; (b) NP/A: Nitrificação parcial e anammox.....	68
<b>Figura 5.2</b> - Fluxograma do processo de tratamento do resíduo alimentar. ....	69
<b>Figura 5.3</b> - Unidades que compõem a plataforma de metanização de resíduos alimentares e tratamento dos efluentes gerados. (a) Vista externa e interna do galpão de triagem dos resíduos; (b) Biodigestor anaeróbio de resíduo alimentar; (c) Reator UASB e (d) Vista externa e interna da unidade de separação sólido-líquido.....	70
<b>Figura 5.4</b> - Representação esquemática (a) e imagem (b) do RBS utilizado para o enriquecimento e cultivo de bactérias anammox.....	72
<b>Figura 5.5</b> - Ciclo de operação do RBS em escala laboratorial com duração de cada período de operação.....	73
<b>Figura 5.6</b> - Representação esquemática (a) e imagens do RBS em escala piloto (b e c). ....	79
<b>Figura 5.7</b> - Ciclo de operação do RBS em escala piloto com duração de cada período de operação.....	79
<b>Figura 5.8</b> - Fluxograma das amostras coletadas para a caracterização microbiológica dos RBS laboratorial e piloto. <sup>a</sup> RA: Resíduo alimentar; <sup>b</sup> Número da coleta de biomassa; <sup>c</sup> Estratégia de aeração; <sup>d</sup> pM: Plataforma de Metanização (pMethar). . E1: 45min aeração on/ 15 min off, 0,2 L.min <sup>-1</sup> .L <sub>reator</sub> <sup>-1</sup> ; E2: 15 min on/15 min off, 0,075 L.min <sup>-1</sup> .L <sub>reator</sub> <sup>-1</sup> ; E3: 15 min on/ 30 min off, 0,125 L.min <sup>-1</sup> .L <sub>reator</sub> <sup>-1</sup> ; E4: 15 min on/ 45 min off, 0,125 L.min <sup>-1</sup> .L <sub>reator</sub> <sup>-1</sup> ; E5: aeração contínua, 0,125 L.min <sup>-1</sup> .L <sub>reator</sub> <sup>-1</sup> ; E6: 15 min on/45 min off, 0,125 L.min <sup>-1</sup> .L <sub>reator</sub> <sup>-1</sup> , com adição de CaCO <sub>3</sub> ; R1, R2 e R3: períodos de recuperação; E7: 15 min on/ 45 min off, 0,026 L.min <sup>-1</sup> .L <sub>reator</sub> <sup>-1</sup> ; E8: 15 min on/ 30 min off, 0,026 L.min <sup>-1</sup> .L <sub>reator</sub> <sup>-1</sup> . ....	82
<b>Figura 6.1</b> - Dinâmica dos compostos nitrogenados (N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> e N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) durante a Fase 1 de operação do RBS-Lab. (I) Período inicial com predominância de desnitrificação	

heterotrófica; (II) Período com diminuição de atividade de desnitrificação e; (III) Período com atividade anammox.....	91
<b>Figura 6.2</b> - Coeficientes estequiométricos obtidos durante o Período III da Fase 1 de operação do RBS-Lab.....	93
<b>Figura 6.3</b> - Concentrações afluentes, efluentes e eficiência de remoção de nitrogênio total ( $N-NH_4^+ + N-NO_2^- + N-NO_3^-$ ) durante o Período III da Fase 1 de operação do RBS-Lab.....	94
<b>Figura 6.4</b> - Cargas de nitrogênio ( $N-NH_4^+ + N-NO_2^- + N-NO_3^-$ ) aplicadas e removidas durante o Período III da Fase 1 no RBS-Lab.....	94
<b>Figura 6.5</b> - Dinâmica dos compostos nitrogenados no RBS-Lab durante a Fase 2 de operação.....	97
<b>Figura 6.6</b> - Coeficientes estequiométricos obtidos durante a Fase 2 de operação do RBS-Lab.....	98
<b>Figura 6.7</b> – Concentrações afluentes, efluentes e eficiência de remoção de nitrogênio total ( $N-NH_4^+ + N-NO_2^- + N-NO_3^-$ ) durante a Fase 2 de operação do RBS-Lab.....	98
<b>Figura 6.8</b> – Cargas de nitrogênio ( $N-NH_4^+ + N-NO_2^- + N-NO_3^-$ ) aplicadas e removidas durante a Fase 2 de operação do RBS-Lab.....	99
<b>Figura 6.9</b> - Concentrações de DQO total afluente e efluente e eficiência de remoção de DQO durante a Fase 2 de operação do RBS-Lab.....	100
<b>Figura 6.10</b> - Box-plot das cargas de nitrogênio removidas durante as Fases 1 e 2 de operação do RBS-Lab.....	102
<b>Figura 6.11</b> - Dinâmica dos compostos nitrogenados (a) e eficiência de remoção de $N-NH_4^+$ (b) durante as estratégias de aeração E1 até E5 da Fase 3 de operação do RBS-Lab. E1: 45min aeração on/ 15 min off, $0,2 L.min^{-1}.L_{reator}^{-1}$ ; E2: 15 min on/15 min off, $0,075 L.min^{-1}.L_{reator}^{-1}$ ; E3: 15 min on/ 30 min off, $0,125 L.min^{-1}.L_{reator}^{-1}$ ; E4: 15 min on/ 45 min off, $0,125 L.min^{-1}.L_{reator}^{-1}$ ; E5: aeração contínua, $0,125 L.min^{-1}.L_{reator}^{-1}$ .....	104
<b>Figura 6.12</b> – Série histórica (a) e estatística descritiva (b) dos coeficientes estequiométricos para a produção de $N-NO_3^-$ / consumo de $N-NH_4^+$ durante as estratégias de aeração E1 até E5 da Fase 3 de operação do RBS-Lab. E1: 45min aeração on/ 15 min off, $0,2 L.min^{-1}.L_{reator}^{-1}$ ; E2: 15 min on/15 min off, $0,075 L.min^{-1}.L_{reator}^{-1}$ ; E3: 15 min on/ 30 min off, $0,125 L.min^{-1}.L_{reator}^{-1}$ ; E4: 15 min on/ 45 min off, $0,125 L.min^{-1}.L_{reator}^{-1}$ ; E5: aeração contínua, $0,125 L.min^{-1}.L_{reator}^{-1}$ .....	106
<b>Figura 6.13</b> – Concentrações afluentes e efluentes (a) e eficiências de remoção de nitrogênio total durante as estratégias de aeração E1 até E5 da Fase 3 de operação do RBS lab. E1: 45min aeração on/ 15 min off, $0,2 L.min^{-1}.L_{reator}^{-1}$ ; E2: 15 min on/15 min off, $0,075 L.min^{-1}.L_{reator}^{-1}$ ; E3: 15 min on/ 30 min off, $0,125 L.min^{-1}.L_{reator}^{-1}$ ; E4: 15 min on/ 45 min off, $0,125 L.min^{-1}.L_{reator}^{-1}$ ; E5: aeração contínua, $0,125 L.min^{-1}.L_{reator}^{-1}$ .....	107
<b>Figura 6.14</b> - Cargas de nitrogênio aplicadas (a) e removidas (a e b) durante as cinco primeiras estratégias de aeração avaliadas no RBS-Lab durante a Fase 3 de operação. E1: 45min aeração on/ 15 min off, $0,2 L.min^{-1}.L_{reator}^{-1}$ ; E2: 15 min on/15 min off, $0,075 L.min^{-1}.L_{reator}^{-1}$ ; E3: 15 min on/ 30 min off, $0,125 L.min^{-1}.L_{reator}^{-1}$ ; E4: 15 min on/ 45 min off, $0,125 L.min^{-1}.L_{reator}^{-1}$ ; E5: aeração contínua, $0,125 L.min^{-1}.L_{reator}^{-1}$ .....	108
<b>Figura 6.15</b> - Concentrações afluentes e efluentes (a) e eficiências de remoção de DQO total durante as estratégias de aeração E1 até E5 da Fase 3 de operação do RBS-Lab. E1: 45min aeração on/ 15 min off, $0,2 L.min^{-1}.L_{reator}^{-1}$ ; E2: 15 min on/15 min off, $0,075 L.min^{-1}.L_{reator}^{-1}$ ; E3: 15 min on/ 30 min off, $0,125 L.min^{-1}.L_{reator}^{-1}$ ; E4: 15 min on/ 45 min off, $0,125 L.min^{-1}.L_{reator}^{-1}$ ; E5: aeração contínua, $0,125 L.min^{-1}.L_{reator}^{-1}$ .....	109
<b>Figura 6.16</b> - Dinâmica dos compostos nitrogenados e eficiência de remoção de $N-NH_4^+$ durante a estratégia E6 (15 min aeração/ 45 min anóxico; $0,125 L.min^{-1}.L_{reator}^{-1}$ ; adição de bicarbonato) de aeração do RBS-Lab.....	111

<b>Figura 6.17</b> - Coeficiente estequiométrico para o consumo de N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> por consumo de N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> durante a estratégia E6 (15 min aeração/ 45 min anóxico; 0,125 L.min <sup>-1</sup> .Lreator <sup>-1</sup> ; adição de bicarbonato) de aeração da Fase 3 do RBS lab.....	112
<b>Figura 6.18</b> - Concentrações afluentes, efluentes e eficiência de remoção de nitrogênio total durante a estratégia E6 (15 min aeração/ 45 min anóxico; 0,125 L.min <sup>-1</sup> .Lreator <sup>-1</sup> ; adição de bicarbonato) de aeração da Fase 3 de operação do RBS-Lab.....	112
<b>Figura 6.19</b> - Cargas nitrogenadas aplicadas e removidas durante a estratégia E6 (15 min aeração/ 45 min anóxico; 0,125 L.min <sup>-1</sup> .Lreator <sup>-1</sup> ; adição de bicarbonato) de aeração (a) e estatística descritiva das cargas nitrogenadas removidas durante as estratégias E4 (15 min aeração/ 45 min anóxico; sem adição de bicarbonato) e E6 (b) da Fase 3 de operação do RBS-Lab.....	113
<b>Figura 6.20</b> - Concentrações afluentes, efluentes e eficiências de remoção de DQO total durante a estratégia E6 de aeração da Fase 3 de operação do RBS-Lab .....	114
<b>Figura 6.21</b> - Dinâmica dos compostos nitrogenados (a) e eficiências de remoção de N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (b) durante o período de recuperação (R1, R2 e R3) da Fase 3 de operação do RBS-Lab ....	117
<b>Figura 6.22</b> - Coeficientes estequiométricos para o consumo de N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> / consumo de N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> e para a produção de N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> / consumo de N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> durante o período de recuperação (R1, R2 e R3) da Fase 3 de operação do RBS-Lab .....	118
<b>Figura 6.23</b> - Concentrações afluentes, efluentes (a) e eficiências de remoção (b) de nitrogênio total durante o período de recuperação (R1, R2 e R3) da Fase 3 de operação do RBS-Lab..	119
<b>Figura 6.24</b> - Cargas de nitrogênio aplicadas e removidas durante o período de recuperação (R1, R2 e R3) da Fase 3 de operação do RBS-Lab .....	119
<b>Figura 6.25</b> - Concentrações afluentes, efluentes (a) e eficiências de remoção de DQO (b) durante o período de recuperação (R1, R2 e R3) da Fase 3 de operação do RBS-Lab.....	120
<b>Figura 6.26</b> - Dinâmica dos compostos nitrogenados (a) e eficiências de remoção de nitrogênio amoniacal (b) durante as estratégias de aeração E7 (15 min aeração/ 45 min anóxico; 0,026 L.min <sup>-1</sup> .Lreator <sup>-1</sup> ) e E8 (15 min aeração/ 30 min anóxico; 0,026 L.min <sup>-1</sup> .Lreator <sup>-1</sup> ) da Fase 3 de operação do RBS-Lab.....	122
<b>Figura 6.27</b> - Coeficientes estequiométricos para a produção de N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> / consumo de N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> durante as estratégias de aeração E7 (15 min aeração/ 45 min anóxico; 0,026 L.min <sup>-1</sup> .Lreator <sup>-1</sup> ) e E8 (15 min aeração/ 30 min anóxico; 0,026 L.min <sup>-1</sup> .Lreator <sup>-1</sup> ) da Fase 3 de operação do RBS-Lab .....	123
<b>Figura 6.28</b> - Concentrações afluentes, efluentes (a) e eficiências de remoção de nitrogênio total durante as estratégias de aeração E7 (15 min aeração/ 45 min anóxico; 0,026 L.min <sup>-1</sup> .Lreator <sup>-1</sup> ) e E8 (15 min aeração/ 30 min anóxico; 0,026 L.min <sup>-1</sup> .Lreator <sup>-1</sup> ) da Fase 3 de operação do RBS-Lab .....	123
<b>Figura 6.29</b> - Cargas de nitrogênio aplicadas (a) e removidas (a e b) durante as estratégias de aeração E7 (15 min aeração/ 45 min anóxico; 0,026 L.min <sup>-1</sup> .Lreator <sup>-1</sup> ) e E8 (15 min aeração/ 30 min anóxico; 0,026 L.min <sup>-1</sup> .Lreator <sup>-1</sup> ) da Fase 3 de operação do RBS-Lab.....	124
<b>Figura 6.30</b> - Cargas de nitrogênio removidas durante as estratégias de aeração E4 (15 min aeração/ 45 min anóxico; 0,125 L.min <sup>-1</sup> .Lreator <sup>-1</sup> ) e E7 (15 min aeração/ 45 min anóxico; 0,026 L.min <sup>-1</sup> .Lreator <sup>-1</sup> ) (a) e E3 (15 min aeração/ 30 min anóxico; 0,125 L.min <sup>-1</sup> .Lreator <sup>-1</sup> ) e E8 (15 min aeração/ 30 min anóxico; 0,026 L.min <sup>-1</sup> .Lreator <sup>-1</sup> ) (b) e coeficiente estequiométrico para produção de N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> / consumo de N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> em E4 e E7 (c) e E3 e E8 (d) .....	125
<b>Figura 6.31</b> - Concentrações afluentes e efluentes (a) e eficiências de remoção de DQO durante as estratégias de aeração E7 (15 min aeração/ 45 min anóxico; 0,026 L.min <sup>-1</sup> .Lreator <sup>-1</sup> ) e E8 (15 min aeração/ 30 min anóxico; 0,026 L.min <sup>-1</sup> .Lreator <sup>-1</sup> ) da Fase 3 de operação do RBS-Lab ...	126
<b>Figura 6.32</b> - Abundância dos genes de bactérias do ciclo do nitrogênio obtidos por qPCR nas amostras do RBS-Lab (ver Tabela 5.9 para detalhamento das amostras). .....	137

<b>Figura 6.33</b> - Perfis obtidos por PCR-DGGE para o Domínio Bacteria no RBS-Lab. As setas em vermelho indicam as bandas que foram excisadas do gel e sequenciadas (Ver Tabela 5.9 para detalhamento das amostras).....	143
<b>Figura 6.34</b> - Dendrograma obtido para o perfil de bandas do RBS-Lab por meio da PCR-DGGE do Domínio Bacteria (coeficiente de similaridade de Dice e método de agrupamento UPGMA) .....	150
<b>Figura 6.35</b> - Perfis obtidos por PCR-DGGE para bactérias anammox nas amostras do RBS-Lab. As setas em vermelho indicam as bandas que foram excisadas do gel e sequenciadas (Ver Tabela 5.9 para detalhamento das amostras). .....	151
<b>Figura 6.36</b> - Dendrograma obtido para o perfil de bandas do RBS-Lab por meio da PCR-DGGE de bactérias anammox (coeficiente de similaridade de Dice e método de agrupamento UPGMA) .....	157
<b>Figura 6.37</b> - Curvas de rarefação obtidas para as amostras do RBS-Lab. ....	158
<b>Figura 6.38</b> - Análise de coordenadas principais (PCoA) com base nos índices de dissimilaridade de Bray-curtis, representando a distância entre as comunidades microbianas das amostras do RBS-Lab. ....	160
<b>Figura 6.39</b> – Abundância relativa dos filos mais representativos ( $\geq 1\%$ ) nas amostras do RBS-Lab (ver Tabela 5.9 para detalhamento das amostras). ....	163
<b>Figura 6.40</b> – Ordens mais representativas do filo Proteobacteria nas amostras do RBS-Lab (ver Tabela 5.9 para detalhamento das amostras).....	166
<b>Figura 6.41</b> – Ordens mais representativas dentro do Filo Planctomycetes nas amostras do RBS-Lab (ver Tabela 5.9 para detalhamento das amostras) .....	168
<b>Figura 6.42</b> – Ordens mais representativas dentro do filo Bacteroidetes nas amostras do RBS-Lab (ver Tabela 5.9 para detalhamento das amostras) .....	169
<b>Figura 6.43</b> – Ordens mais representativas dentro do filo Chloroflexi nas amostras do RBS-Lab (Ver Tabela 5.9 para detalhamento das amostras) .....	170
<b>Figura 6.44</b> – Ordens mais representativas dentro do filo Acidobacteria no RBS-Lab nas amostras (Ver Tabela 5.9 para detalhamento das amostras) .....	171
<b>Figura 6.45</b> – Heatmap com os táxons mais abundantes dentro do ciclo do nitrogênio nas amostras do RBS-Lab (Ver Tabela 5.9 para detalhamento das amostras) .....	173
<b>Figura 6.46</b> – Dinâmica dos compostos nitrogenados (a) e eficiências de remoção de $\text{N-NH}_4^+$ e $\text{N-NO}_2^-$ (b) durante a operação do RBS-Piloto.....	177
<b>Figura 6.47</b> – Coeficientes estequiométricos para o consumo de $\text{N-NO}_2^-$ / Consumo de $\text{N-NH}_4^+$ e Produção de $\text{N-NO}_3^-$ / Consumo de $\text{N-NH}_4^+$ durante a operação do RBS-Piloto.....	178
<b>Figura 6.48</b> – Concentrações afluentes, efluentes e eficiências de remoção de nitrogênio total no RBS-Piloto.....	179
<b>Figura 6.49</b> – Cargas de nitrogênio aplicadas e removidas no RBS-Piloto.....	179
<b>Figura 6.50</b> - Concentrações afluentes e efluentes de ST e STV (a) e concentração de STV no interior do RBS-Piloto no dia 0 e 253 de operação (b). ....	180
<b>Figura 6.51</b> – Concentrações afluentes, efluentes e eficiências de remoção de DQO total no RBS-Piloto.....	181
<b>Figura 6.52</b> – Abundância dos genes de bactérias do ciclo do nitrogênio obtidos por qPCR nas amostras do RBS-Piloto .....	182
<b>Figura 6.53</b> – Perfis obtidos por PCR-DGGE para o Domínio Bacteria no RBS-Piloto. As setas em vermelho indicam as bandas que foram excisadas do gel e sequenciadas. ....	185
<b>Figura 6.54</b> – Dendrograma obtido para o perfil de bandas do RBS-Piloto por meio da PCR-DGGE do Domínio Bacteria (coeficiente de similaridade de Dice e método de agrupamento UPGMA) .....	187

<b>Figura 6.55</b> – Perfis obtidos por PCR-DGGE para bactérias anammox no RBS-Piloto. As setas em vermelho indicam as bandas que foram excisadas do gel e sequenciadas. ....	188
<b>Figura 6.56</b> – Dendrograma obtido para o perfil de bandas do RBS-Piloto por meio da PCR-DGGE de bactérias anammox (coeficiente de similaridade de Dice e método de agrupamento UPGMA) .....	190
<b>Figura 6.57</b> – Curvas de rarefação obtidas para as amostras do RBS-Piloto .....	190
<b>Figura 6.58</b> – Análise de coordenadas principais (PcoA) com base nos índices de dissimilaridade de Bray-curtis, representando a distância entre as comunidades microbianas das amostras coletadas no RBS-Piloto.....	191
<b>Figura 6.59</b> - Abundância relativa dos filos mais representativos ( $\geq 1\%$ ) nas amostras do RBS-Piloto.....	193
<b>Figura 6.60</b> - Ordens mais representativas dentro do filo Proteobacteria nas amostras do RBS-Piloto.....	194
<b>Figura 6.61</b> - Ordens mais representativas dentro do filo Planctomycetes nas amostras do RBS-Piloto.....	196
<b>Figura 6.62</b> - Ordens mais representativas dentro do filo Chloroflexi nas amostras do RBS-Piloto.....	197
<b>Figura 6.63</b> - Ordens mais representativas dentro do Filo Bacteroidetes nas amostras do RBS-Piloto.....	198
<b>Figura 6.64</b> - Heatmap com os táxons mais abundantes dentro do ciclo do nitrogênio nas amostras do RBS-Piloto .....	199

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1</b> - Compostos nitrogenados e seus respectivos estados de oxidação.....	6
<b>Tabela 2.2</b> - Gêneros de bactérias anammox descritos na literatura.....	11
<b>Tabela 2.3</b> - Concentrações típicas de nitrogênio amoniacal em diferentes tipos de efluentes .....	17
<b>Tabela 2.4</b> - Experiências com diferentes configurações de reatores para nitrificação parcial e anammox no tratamento de efluentes .....	24
<b>Tabela 2.5</b> - Características de diferentes tipos de digestatos. ....	28
<b>Tabela 2.6</b> - Diversidade microbiana em reatores anammox .....	40
<b>Tabela 2.7</b> - Diversidade de gêneros de micro-organismos anammox em reatores que partiram de diferentes inóculos .....	53
<b>Tabela 2.8</b> - Influência da matéria orgânica sobre a remoção de nitrogênio e sobre a comunidade microbiana de reatores anammox .....	62
<b>Tabela 3.1</b> - Premissas e hipóteses que fundamentaram o presente trabalho .....	65
<b>Tabela 5.1</b> - Características das unidades que compõem a plataforma de metanização dos resíduos sólidos orgânicos.....	70
<b>Tabela 5.2</b> - Características dos efluentes gerados na plataforma de metanização dos resíduos alimentares (pMethar).....	71
<b>Tabela 5.3</b> - Composição do meio de cultura mineral autotrófico utilizado para o enriquecimento de bactérias anammox durante a Fase 1 .....	74
<b>Tabela 5.4</b> - Composição das soluções de micronutrientes adicionadas ao meio de cultura utilizado para o enriquecimento de bactérias anammox durante a Fase 1.....	74
<b>Tabela 5.5</b> - Concentrações e cargas (amônio mais nitrito) teóricas de nitrogênio aplicadas ao RBS em escala laboratorial.....	75
<b>Tabela 5.6</b> - Estratégias de aeração avaliadas no RBS em escala laboratorial .....	76
<b>Tabela 5.7</b> - Concentrações teóricas de amônio e nitrito durante os períodos de recuperação do RBS em escala laboratorial.....	77
<b>Tabela 5.8</b> - Parâmetros de análise, frequências de monitoramento e métodos analíticos utilizados durante a pesquisa .....	80
<b>Tabela 5.9</b> - Descrição das amostras coletas para as análises de biologia molecular.....	83
<b>Tabela 5.10</b> - Iniciadores utilizados na técnica de qPCR .....	86
<b>Tabela 5.11</b> - Concentração dos reagentes utilizados na técnica de qPCR .....	86
<b>Tabela 5.12</b> - Iniciadores a serem utilizados na técnica de PCR-DGGE.....	87
<b>Tabela 5.13</b> - Concentração dos reagentes utilizados na técnica de PCR-DGGE.....	87
<b>Tabela 5.14</b> - Porcentagens de acrilamida, gradientes e condições de corrida utilizadas no DGGE .....	88
<b>Tabela 6.1</b> - Estatística descritiva das concentrações afluentes e efluentes de alcalinidade durante a Fase 2 de operação do RBS-Lab.....	101
<b>Tabela 6.2</b> - Concentrações médias e medianas da alcalinidade afluente e efluente durante as estratégias de aeração E1 até E5 da Fase 3 de operação do RBS-Lab .....	110
<b>Tabela 6.3</b> - Estatística descritiva das concentrações afluentes e efluentes de alcalinidade durante a estratégia E6 de aeração da Fase 3 de operação do RBS lab.....	115
<b>Tabela 6.4</b> - Concentrações médias e medianas afluentes e efluentes de alcalinidade durante o período de recuperação R3 da Fase 3 de operação do RBS-Lab.....	120
<b>Tabela 6.5</b> – Concentrações médias e medianas de alcalinidade durante as estratégias de aeração E7 e E8 da Fase 3 de operação do RBS lab.....	127

<b>Tabela 6.6</b> - Resumo dos principais parâmetros operacionais avaliados durante as estratégias de aeração no RBS-Lab durante a Fase 3 de operação.....	129
<b>Tabela 6.7</b> - Experiências com NP/ anammox em unico estágio para tratamento de diferentes tipos de efluentes .....	133
<b>Tabela 6.8</b> - Correlação entre a abundância de bactérias do ciclo de nitrogênio e a carga de nitrogênio removida, produção de nitrato e coeficiente $N-NO_3^-$ produzido/ $N-NH_4^+$ consumido no RBS lab.....	142
<b>Tabela 6.9</b> - Identificação das bandas do DGGE de Bacteria do RBS-Lab de acordo com as bases de dados RDP Classifier e GenBank .....	144
<b>Tabela 6.10</b> - Identificação das bandas do DGGE de Anammox de acordo com bases de dados RDP Classifier e GenBank .....	152
<b>Tabela 6.11</b> - Número de sequências, OTUs e índices de diversidade alfa Chao1 e Shannon obtidos para as amostras do RBS-Lab .....	159
<b>Tabela 6.12</b> - Estatística descritiva das concentrações afluentes e efluentes de alcalinidade ( $mg\ CaCO_3.L^{-1}$ ).....	182
<b>Tabela 6.13</b> – Identificação das bandas do DGGE de Bacteria do RBS-Piloto de acordo com as bases de dados RDP Classifier e GenBank. ....	185
<b>Tabela 6.14</b> – Identificação das bandas do DGGE de bactérias anammox do RBS-Piloto de acordo com as bases de dados RDP Classifier e GenBank .....	188
<b>Tabela 6.15</b> – Número de sequências, OTUs e índices de diversidade alfa Chao1 e Shannon obtidos para as amostras do RBS-Piloto.....	191

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\mu\text{M}$	Micromolar
AAE	Atividade Anammox específica
AGV	Ácidos graxos voláteis
Anammox	Oxidação anaeróbia da amônia (do inglês, <i>anaerobic ammonium oxidation</i> )
BOA	Bactérias oxidadoras de amônia
BON	Bactérias oxidadoras de nitrito
C/N	Relação Carbono/ Nitrogênio
Ca.	<i>Candidatus</i>
CANON	Remoção completamente autotrófica de amônio até nitrito (do inglês, <i>Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite</i> )
Comammox	Completa oxidação da amônia (do inglês, <i>complete ammonia oxidation</i> )
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
COT	Carbono Orgânico Total
CT	Carbono total
DeAmmon	Deamonificação (do inglês, <i>Deammonification</i> )
Deamox	Desnitrificação parcial e anammox (do inglês, <i>denitrifying ammonium oxidation</i> )
DGGE	Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (do inglês, <i>Denaturing gradient gel electrophoresis</i> )
DEMON	Deamonificação (do inglês, <i>Deammonification</i> )
DESA	Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DQO	Demanda química de oxigênio
DQO/N	Relação entre Demanda química de oxigênio e Nitrogênio
FISH	Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (do inglês, <i>Fluorescent in situ hybridization</i> )
FORSU	Fração orgânica dos resíduos sólidos urbanos
FPM	Força próton motora
PT	Fósforo total
GEE	Gases de efeito estufa
MBBR	Reator com biofilme e leito móvel (do inglês, <i>Moving Bed Biofilm Reactor</i> )
MBR	Bioreator de membrana (do inglês, <i>Membrane Bioreactor</i> )
mM	Milimolar
NAS	Novo sistema de lodos ativados (do inglês, <i>New activated sludge</i> )
NAT	Nitrogênio amoniacal total
NP/A	Nitrificação parcial e anammox
NT	Nitrogênio total
NTK	Nitrogênio total <i>Kjeldahl</i>

OD	Oxigênio Dissolvido
OLAND	Nitrificação e desnitrificação autotrófica limitada pelo oxigênio (do inglês, <i>Oxygen Limited Autotrophic Nitrification Denitrification</i> )
OTU	Unidade taxonômica operacional (do inglês, <i>Operational taxonomic unit</i> )
Pb	Par de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês, <i>Polymerase chain reaction</i> )
PRFV	Poliéster reforçado com fibra de vidro
qPCR	PCR quantitativo
RBS	Reator em batelada sequencial
RBSB	Reator em batelada sequencial com biofilme
RLF	Reator de leito fixo
RNA	Ácido ribonucleico
RNAr 16S	Ácido ribonucleico ribossomal 16S
SHARON	Reator em sistema único para elevada remoção de amônio até nitrito (do inglês, <i>Single reactor system for high ammonium removal over nitrite</i> )
SNAD	Nitrificação parcial, anammox e desnitrificação simultâneas (do inglês, <i>Simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification</i> )
SNG	Sequenciamento de nova geração
SST	Sólidos em suspensão totais
ST	Sólidos totais
STV	Sólidos totais voláteis
T	Temperatura
TDH	Tempo de detenção hidráulica
TRS	Tempo de retenção de sólidos
UASB	Reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (do inglês, <i>Upflow anaerobic sludge blanket</i> )
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UPGMA	<i>Unweighted pair group method with arithmetic averages</i>

# 1 INTRODUÇÃO

No Brasil, estima-se que aproximadamente 50% dos resíduos sólidos urbanos sejam constituídos de resíduos orgânicos (BRASIL, 2016; IPEA, 2012). A produção e composição da fração orgânica dos resíduos sólidos urbanos (FORSU) depende da região geográfica, do número de habitantes e condições sociais locais, das atividades econômicas predominantes e dos hábitos alimentares regionais (CAMPUZANO e GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, 2016). Dentro desta fração dos resíduos sólidos urbanos, está incluído o resíduo alimentar, que pode ser gerado em diversas etapas da cadeia de fornecimento de alimentos: (i) durante a produção; (ii) após a colheita, manuseio e armazenamento; (iii) durante o processamento; (iv) distribuição e (v) consumo dos alimentos (FAO, 2011). A disposição inadequada desta fração dos resíduos pode contribuir para a geração de diversos impactos, em especial, a produção de gases de efeito estufa (GEE). Além disso, a decomposição da matéria orgânica leva também à formação do lixiviado, que é um líquido com elevado potencial poluidor.

Estudo realizado por Thi *et al.* (2015) sobre a gestão do resíduo alimentar, aponta que sua reciclagem é raramente aplicada em países em desenvolvimento. A falta de uma política efetiva para regulamentação e incentivo e o baixo investimento em programas de reciclagem são algumas das causas para que esta prática seja tão negligenciada. Dentre as formas de tratamento que geralmente são aplicadas ao resíduo alimentar é possível citar a incineração, a alimentação animal, a compostagem, a disposição em aterros e a biodigestão anaeróbia. A disposição em aterros é o método mais utilizado em países em desenvolvimento como o Brasil. Entretanto, essa prática não é considerada sustentável, uma vez que os aterros demandam grandes áreas, a disposição de resíduos orgânicos nesses locais pode atrair vetores de doenças e a elevada biodegradabilidade desses resíduos pode acabar aumentando as emissões de GEE. Além disso, expressivo volume de lixiviado pode ser gerado, necessitando de gerenciamento adequado para que impactos ambientais sejam evitados. Nesse sentido, a biodigestão anaeróbia (ou metanização) constitui-se em alternativa promissora para o tratamento da FORSU e tem ganhado destaque, uma vez que alia a simplicidade operacional e a possibilidade de aproveitamento de subprodutos do processo, como o biogás, por exemplo.

Entretanto, há que se atentar para os subprodutos líquidos gerados no processo de metanização, os quais possuem elevadas concentrações de matéria orgânica e de nitrogênio amoniacal e podem gerar grande impacto, se lançados sem tratamento nos corpos hídricos (CHENG *et al.*, 2016; SHIN *et al.*, 2015). Tradicionalmente, estes subprodutos, também chamados de

digestatos ou efluentes da biodigestão anaeróbia, são dispostos no solo para utilização como fertilizantes orgânicos para o crescimento de diversos tipos de cultura. Entretanto, há preocupações econômicas e ambientais que limitam a aplicação destes efluentes na agricultura (SHEETS *et al.*, 2015). Digestatos podem também ser recirculados para a diluição dos resíduos orgânicos antes da introdução dos mesmos no digestor anaeróbio, prática essa, muitas vezes requerida para o bom funcionamento do processo. Entretanto, a elevada concentração de nitrogênio, na forma de amônia livre, nos digestatos pode causar a inibição dos microorganismos envolvidos no processo de metanogênese e, portanto, a viabilidade dessa prática deve ser bem avaliada (ZAMANZADEH *et al.*, 2016).

Uma das alternativas para o pós-tratamento do digestato gerado no processo de metanização da fração orgânica dos resíduos sólidos é a utilização de reatores UASB (do inglês, *Upflow Anaerobic Sludge Blanket*). Os reatores UASB são unidades que se prestam fundamentalmente à remoção de matéria orgânica carbonácea (DQO e DBO em suspensão ou dissolvidas no efluente) e destacam-se principalmente por apresentarem baixa produção de lodo, baixos custos de implantação e operação, baixos requisitos de área e potencial de aproveitamento energético do biogás gerado no processo. Todavia, esta tecnologia apresenta dificuldades em satisfazer padrões muito restritivos de lançamento e não é capaz de remover nutrientes do efluente, necessitando, assim, de uma etapa de pós-tratamento (VON SPERLING, 2005). Nesse sentido, vários sistemas têm sido estudados com objetivo de melhorar a qualidade do efluente final produzido em reatores UASB, visando a remoção de compostos não degradados durante este processo de tratamento anaeróbio, como o nitrogênio amoniacal, por exemplo.

O nitrogênio amoniacal pode causar sérios problemas ambientais se lançado indiscriminadamente nos corpos d'água, dentre eles, o processo de eutrofização artificial. No Brasil, a Resolução CONAMA 430/2011, estabelece como padrão de lançamento de nitrogênio amoniacal, o valor de 20 mg.L<sup>-1</sup>. Esse padrão atualmente é aplicável para efluentes industriais, não sendo exigido para esgotos sanitários e para sistemas de esgotos sanitários que recebam lixiviados de aterros sanitários (BRASIL, 2011).

Ressalta-se que em efluentes gerados na metanização de resíduos sólidos orgânicos, o nitrogênio está presente em elevadas concentrações, sendo que a maioria deste nitrogênio (até 99%) é uma combinação do íon amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) mais amônia livre (NH<sub>3</sub>). O balanço entre NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e NH<sub>3</sub> varia com o pH e a temperatura, de acordo com o equilíbrio da dissociação iônica desse composto. Em digestatos de resíduo alimentar, por exemplo, CHENG *et al.* (2016) reportam

valores tão elevados quanto  $2.120 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4^+$ . Por esse motivo é muito importante que os compostos nitrogenados sejam removidos antes do lançamento desses efluentes nos corpos hídricos. A recuperação e reutilização de nutrientes destes efluentes são também alternativas que podem ser consideradas (SHEETS *et al.*, 2015).

É reportada na literatura a utilização de diversos processos físico-químicos para a remoção e recuperação de nitrogênio de efluentes provenientes da biodigestão anaeróbia de resíduos sólidos orgânicos, dentre eles, a troca iônica (WIRTHENSOHN *et al.*, 2009), *stripping* de amônia (WALKER *et al.*, 2011), tratamento eletroquímico (LEI e MAEKAWA, 2007), contadores de membrana (LAUTERBOCK *et al.*, 2012), osmose inversa (BLISTAD *et al.*, 1992), dentre outros. Contudo processos físico-químicos são geralmente mais onerosos e podem produzir resíduos químicos que necessitam de tratamento adequado.

Dentre as alternativas para o tratamento biológico de digestatos, é possível citar a utilização de microalgas, que devido às elevadas taxas fotossintética e de crescimento são capazes de consumir os nutrientes (nitrogênio e fósforo) e produzir biomassa a qual tem potencial para a produção de biodiesel, devido ao seu elevado conteúdo de lipídeos. Entretanto, a elevada turbidez e o alto teor de amônia presente nos digestatos podem inibir o crescimento das microalgas. Por esse motivo, quando se utiliza esta alternativa geralmente é necessário que o efluente seja bastante diluído necessitando de um grande volume de água e tornando esta alternativa não muito sustentável (CHENG *et al.*, 2016; SHIN *et al.*, 2015).

Convencionalmente, a remoção biológica de nitrogênio de efluentes é realizada em duas etapas: nitrificação e desnitrificação. Na nitrificação, micro-organismos aeróbios oxidam a amônia a nitrato. Esse processo requer grande gasto energético para aeração. Na desnitrificação, o nitrato é convertido a nitrogênio gasoso por outros grupos de micro-organismos na ausência de oxigênio. Nessa etapa há demanda por matéria orgânica, que muitas vezes já não está presente no efluente em quantidade suficiente para suprir as necessidades dos micro-organismos heterotróficos que realizam esse processo. Por esse motivo, é necessária a adição de fontes externas de carbono. Matéria orgânica é uma significativa fonte de energia, já que pode ser utilizada para a produção de metano por micro-organismos metanogênicos durante o processo de biodigestão anaeróbia. Quando se utiliza a desnitrificação, a matéria orgânica é desviada para suprir os requisitos metabólicos dos micro-organismos heterotróficos, resultando em diminuição do potencial de produção de energia em uma estação de tratamento de efluentes.

Por esse motivo, processos biológicos completamente autotróficos vêm sendo considerados mais sustentáveis para a remoção de nitrogênio de efluentes (MA *et al.*, 2016).

Nesse sentido, o processo da oxidação anaeróbia da amônia (anammox) apresenta-se como uma alternativa bastante promissora. Esse processo é mediado por bactérias quimiolitotróficas e consiste da oxidação anaeróbia do íon amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) diretamente a nitrogênio gasoso ( $\text{N}_2$ ) utilizando o nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) como acceptor de elétrons (MULDER *et al.*, 1995). Estas bactérias possuem crescimento lento, podendo atingir longos tempos de duplicação, de até 32 dias (KHRAMENKOV *et al.*, 2013). Um contínuo suprimento de nitrito é essencial ao metabolismo das bactérias com atividade anammox, e hoje é uma das principais limitações para a aplicação deste processo (MA *et al.*, 2016). Dessa forma, o processo anammox tem sido combinado a outros processos, como a nitrificação parcial, em que a amônia é parcialmente oxidada até nitrito e assim, esses dois substratos tornam-se disponíveis para a completa oxidação da amônia até nitrogênio gasoso pelas bactérias com atividade anammox (JOSS *et al.*, 2011).

A nitrificação parcial e anammox (NP/A) tem sido aplicada para o tratamento de diversos tipos de efluentes como lixiviados de aterros sanitários (NHAT *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2016), esgotos domésticos (DU *et al.*, 2017), efluentes industriais como o de curtumes e de indústrias alimentícias (processamento de batata, processamento de carne, glutamato monossódico, amido, vinícola, destilaria, laticínios) (LACKNER *et al.*, 2014). Todavia, grande parte dos reatores anammox existentes são empregados para o tratamento do efluente proveniente da digestão anaeróbia do lodo produzido em estações de tratamento de esgotos (JOSS *et al.*, 2011; LACKNER *et al.*, 2014; VAN DER STAR *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2017). O emprego deste processo para o tratamento de efluentes da digestão anaeróbia de resíduos agropecuários também tem sido reportado (MAGRÍ *et al.*, 2013; FIGUEROA *et al.*, 2012; MOLINUEVO *et al.*, 2009). Ressalta-se que não foram identificados relatos na literatura da aplicação de processos que utilizam a atividade de bactérias anammox no tratamento de digestatos de resíduo alimentar.

Destaca-se o potencial do processo anammox para o tratamento de efluentes, já que o mesmo possui menores requisitos energéticos do que outros processos que vêm sendo utilizados para o tratamento de efluentes da digestão anaeróbia, como os processos biológicos convencionais, o *stripping* da amônia e osmose reversa, por exemplo (SHEETS *et al.*, 2015). Ademais, processos como a NP/A podem gerar um efluente seguro, com emissão de gases inofensivos como o  $\text{N}_2$  e baixas concentrações de nitrogênio.

Há alguns anos, o processo anammox vem sendo objeto de estudo do Programa de Pós-Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), que vem contribuindo com avanços em pesquisas relacionadas ao cultivo de micro-organismos anammox a partir de diferentes tipos de lodo e utilizando diferentes configurações de reatores. Além disso, a toxicidade de compostos orgânicos, como glicose e fenol, e o efeito de diferentes relações DQO/N sobre o processo anammox também já foram estudados (ARAÚJO *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2014; LEAL *et al.*, 2016; PEREIRA *et al.*, 2014). O efeito da temperatura sobre o processo anammox tratando esgoto doméstico foi também objeto de recente estudo (FERNANDES *et al.*, 2018). Até o momento, todos os trabalhos foram realizados em escala laboratorial, sendo que o aumento de escala desses reatores é ainda um desafio no Brasil, devido à indisponibilidade de biomassa enriquecida com bactérias com atividade anammox para a inoculação de reatores de maior escala.

É notável o crescente interesse ao longo dos anos pela utilização de processos que empregam as bactérias com atividade anammox no tratamento de efluentes. Isso é refletido no modo como cresce o número de publicações acerca desse tema, desde sua descoberta na década de 90 (ZHANG e LIU, 2014). Com o crescente interesse, surgiram também diversos desafios para a implementação do processo anammox como uma alternativa realmente mais econômica e sustentável. Desafios esses, que pesquisadores em diversas partes do mundo vem discutindo com objetivo de superá-los. Dentre estes desafios, é possível citar: o *start-up* de reatores anammox que normalmente se dá lentamente, a presença de elevadas concentrações de matéria orgânica em determinados tipos de efluentes, o que pode inibir o processo anammox e como controlar o processo de nitrificação parcial para que o nitrito (acceptor de elétrons) seja gerado em reatores anammox.

A presente pesquisa visa contribuir com avanços nos estudos e aplicações do processo anammox, avaliando a potencialidade do seu emprego para o pós-tratamento de digestato oriundo de um sistema anaeróbio de duplo estágio utilizado para o tratamento de resíduo alimentar (biodigestor anaeróbio de mistura completa para tratamento de resíduo alimentar seguido de reator UASB para tratamento do digestato). O estudo compreendeu a avaliação da remoção de nitrogênio e da comunidade microbiana de reatores com atividade anammox frente a diferentes condições operacionais. Com esse trabalho, pretende-se contribuir para melhor compreensão da estrutura, das funções e da dinâmica das comunidades microbianas nestes processos biotecnológicos, fatores que podem auxiliar na otimização de tais sistemas.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 O ciclo do nitrogênio

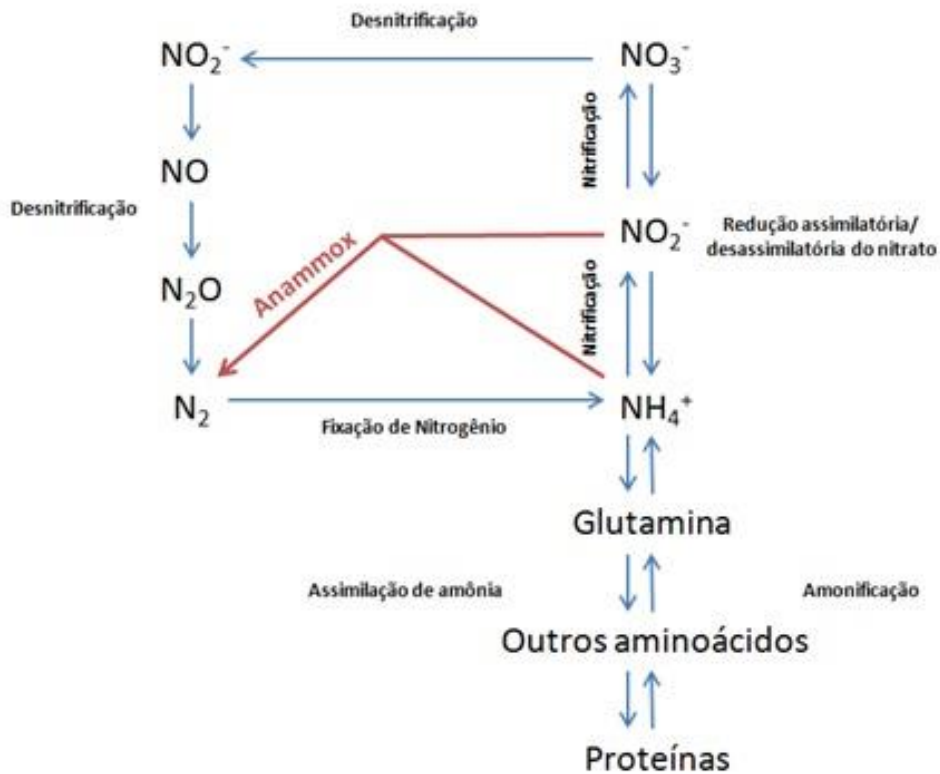
O nitrogênio é um dos elementos químicos mais abundantes na natureza e é encontrado principalmente na forma de  $N_2$ . Nos organismos vivos, é constituinte de moléculas imprescindíveis à vida como os ácidos nucleicos e diversas proteínas importantes para o metabolismo celular. Estima-se que cerca de 6,25% da massa seca dos organismos vivos seja constituída de nitrogênio (BOTHE *et al.*, 2007; MADIGAN *et al.*, 2010).

Os compostos nitrogenados podem sofrer uma variedade de reações de oxidação e redução no ambiente apresentando estados de oxidação, que variam de +5 a -3 (Tabela 2.1). O conjunto destas reações redox, realizadas por diferentes micro-organismos por meio de rotas distintas, forma o ciclo do nitrogênio. Do ponto de vista microbiológico, as transformações no ciclo do nitrogênio ocorrem por meio de processos catabólicos como nitrificação, desnitrificação, redução desassimilatória do nitrato e oxidação anaeróbia da amônia e processos anabólicos, como redução assimilatória do nitrato, assimilação e fixação de nitrogênio (JETTEN *et al.*, 2009; Figura 2.1).

**Tabela 2.1** - Compostos nitrogenados e seus respectivos estados de oxidação

Composto nitrogenado	Fórmula	Estado de oxidação
Amônio	$NH_4^+$	-3
Hidrazina	$N_2H_{4(aq)}$	-2
Hidroxilamina	$NH_2OH_{(aq)}$	-1
Gás dinitrogênio	$N_{2(g)}$	0
Óxido nitroso	$N_2O_{(g)}$	+1
Óxido nítrico	$NO_{(g)}$	+2
Nitrito	$NO_2^-$	+3
Dióxido de nitrogênio	$NO_{2(g)}$	+4
Nitrato	$NO_3^-$	+5

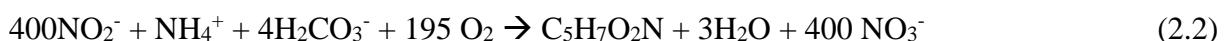
Fonte: Adaptado de Jetten *et al.* (2009).



**Figura 2.1** - Ciclo do nitrogênio

Nesta revisão, destaque será dado aos processos de nitrificação, desnitrificação e anammox, já que se configuram em processos de grande importância para o tratamento de efluentes.

A nitrificação é um processo que envolve a oxidação da amônia a nitrato em condições estritamente aeróbias por micro-organismos quimiolitotróficos, os quais obtêm energia a partir da oxidação de compostos químicos e tem como fonte de carbono o  $\text{CO}_2$ , geralmente na forma de alcalinidade bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ). Esse processo ocorre em duas etapas sequenciais de oxidação. Na primeira etapa, a amônia é oxidada a nitrito por bactérias oxidadoras de amônia (BOA) (Equação 2.1). A segunda etapa envolve a oxidação do nitrito à nitrato por bactérias oxidadoras de nitrito (BON) (Equação 2.2) (AHN, 2006).



A estequiometria geral do processo de nitrificação é mostrada pela Equação 2.3 (AHN, 2006).



Os gêneros de BOA mais conhecidos são *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosovibrio* e *Nitrosolobus*. Estas bactérias são geneticamente diversas, porém estão filogeneticamente relacionadas entre si, dentro do filo Proteobacteria, subdivisão  $\beta$ -Proteobacteria. O mais conhecido gênero de BON é o *Nitrobacter*, que está relacionado geneticamente com os micro-organismos da divisão alfa do filo Proteobacteria. No entanto, gêneros como *Nitrospira*, *Nitrospina*, *Nitrosococcus* e *Nitrocystis* também estão envolvidos neste processo (AHN, 2006).

As BOA possuem, em sua membrana celular, a enzima amônia mono-oxigenase, que é responsável pela oxidação da amônia à hidroxilamina e, no periplasma celular, a enzima hidroxilamina oxidoreductase, responsável pela oxidação da hidroxilamina à nitrito. As BON utilizam a enzima nitrito oxidoreductase para oxidar o nitrito a nitrato (JETTEN *et al.*, 2009; MADIGAN *et al.*, 2010).

As bactérias nitrificantes possuem crescimento lento e o rendimento de biomassa por mol de composto nitrogenado oxidado (amônio ou nitrito) é baixo. Para *Nitrosomonas* 0,15 mg de células são produzidas para cada miligrama de amônio consumido, enquanto que para *Nitrobacter* são produzidos 0,02 mg de células por miligrama de amônio oxidado. Com relação à alcalinidade, 7,07 mg de  $\text{CaCO}_3$  são requeridos para cada miligrama de amônio consumido (AHN, 2006).

Por décadas se pensava que a nitrificação só poderia ser realizada por meio das duas etapas, conforme descrito anteriormente, e que a divisão de trabalho entre dois grupos de micro-organismos distintos era essencial para que esse processo acontecesse. Entretanto, estudos conduzidos por Daims *et al.* (2015) e Van Kessel *et al.* (2015) demonstraram que a nitrificação completa também pode ser realizada por um único micro-organismo. Esse processo foi denominado Comammox (do inglês, *complete ammonia oxidation*) e é mediado por bactérias do gênero *Nitrospira* que possuem todas as enzimas necessárias para a oxidação direta da amônia a nitrato.

A desnitrificação é a redução do nitrato à nitrogênio gasoso. Por ser um processo redutivo, a desnitrificação é uma forma de respiração, em que o nitrato ou nitrito são utilizados como aceptores de elétrons. A desnitrificação completa acontece em quatro estágios: Nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ),  $\text{NO}_2^-$  a óxido nítrico (NO), NO a óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) e, por fim,  $\text{N}_2\text{O}$  à nitrogênio gasoso ( $\text{N}_2$ ) (BOTHE *et al.*, 2007; MADIGAN *et al.*, 2010).

Bactérias desnitrificantes heterotróficas estão amplamente distribuídas, sendo que diversos grupos de micro-organismos são capazes de realizar tal processo. Dentre elas, é possível citar as bactérias gram-negativas pertencentes às classes alfa e beta do filo Proteobacteria: *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Paracoccus* e *Thiobacillus*. Alguns micro-organismos gram-positivos como *Bacillus* e a arqueia halofílica *Halobacterium* também são capazes de realizar a desnitrificação. Na desnitrificação heterotrófica, uma série de doadores de elétrons podem ser utilizados. A Equação 2.4 apresenta a reação de desnitrificação utilizando o metanol como doador de elétrons (AHN, 2006).



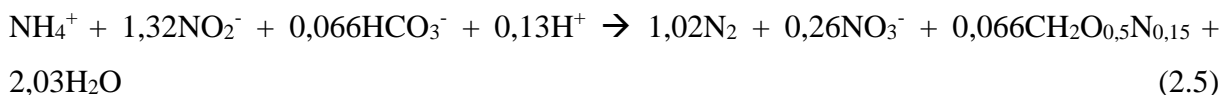
A desnitrificação autotrófica, utilizando compostos inorgânicos, como compostos de enxofre ( $\text{H}_2\text{S}$ , por exemplo) como doador de elétrons também é possível e é realizada por micro-organismos como *Thiobacillus denitrificans* (CLAUS e KUTZNER, 1985).

Em 1977, o bioquímico austríaco Broda, por meio de cálculos termodinâmicos previu a possibilidade da existência de um organismo capaz de oxidar amônia em condições anóxicas, com o nitrito ou nitrato como acceptor de elétrons. Esta reação seria possível do ponto de vista energético, com uma substancial liberação de energia livre de Gibbs igual a  $-358 \text{ kJ.mol}^{-1}$  (BRODA, 1977). A primeira evidência de que a amônia poderia ser oxidada biologicamente na ausência de oxigênio ocorreu há duas décadas em uma estação de tratamento de efluentes em escala piloto (MULDER *et al.*, 1995). O novo processo foi denominado anammox (do inglês, *anaerobic ammonium oxidation*) e será abordado com maior nível de detalhes ao longo desta revisão uma vez que se trata do tema de maior relevância deste trabalho.

## **2.2 A oxidação anaeróbia da amônia - Anammox**

O processo de oxidação anaeróbia da amônia foi descoberto na década de 90 por Mulder *et al.* (1995), que verificaram o consumo de amônia em condições anóxicas em um reator desnitrificante tratando efluente de uma indústria de fermento em Delft (Holanda). Esse processo, denominado anammox, é mediado por micro-organismos anaeróbios e quimiolitautotróficos que oxidam o íon amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) diretamente a nitrogênio gasoso ( $\text{N}_2$ ) utilizando o nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) como acceptor de elétrons (VAN DE GRAAF *et al.*, 1996; STROUS *et al.*, 1998).

Segundo a estequiometria da reação anammox, proposta por Strous *et al.* (1998), para cada mol de amônia consumida, é consumido 1,32 mol de nitrito e produzido 0,26 mol de nitrato, resultando em baixa produção de biomassa por mol de amônia consumida (Equação 2.5). A reação catabólica de oxidação da amônia é realizada quinze vezes para que seja possível a fixação de uma molécula de dióxido de carbono.



Na Tabela 2.2 são apresentados os gêneros de bactérias anammox descritos na literatura, bem como as espécies de bactérias anammox que compõem cada gênero e os habitats onde foram inicialmente descobertos.

Até o momento, foram descritos sete gêneros, os quais estão incluídos no filo Planctomycetes, sendo que quase todos pertencem à ordem Brocadiales. A exceção se dá para o gênero *Candidatus Anammoximicrobium*, o qual pertence à ordem Planctomycetales. Entretanto, parece ainda não estar bem resolvido filogeneticamente, já que em algumas bases de dados é classificado dentro da ordem Pirellulares. A maioria dos gêneros de bactérias anammox descritos até o momento foram inicialmente detectados em sistemas de tratamento de efluentes e cultivados em reatores com diferentes configurações a partir de distintos tipos de inóculo. Um gênero em particular, *Candidatus Scalindua*, teve a maioria de seus representantes descobertos em ambientes marinhos. O termo *Candidatus (Ca.)* deve ser empregado para a denominação destes micro-organismos, uma vez que ainda não foi possível o isolamento e cultivo destes micro-organismos por métodos clássicos de microbiologia.

**Tabela 2.2** - Gêneros de bactérias anammox descritos na literatura

<b>Gênero</b>	<b>Espécie</b>	<b>Habitat</b>	<b>Informações sobre o primeiro experimento de enriquecimento</b>	<b>Referência</b>
<i>Candidatus</i> Kuenenia	<i>Ca. Kuenenia stuttgartiensis</i>	Sistemas de tratamento de efluente	Inóculo: lodo nitrificante Reator: reator 'gas-lift' alimentado com efluente sintético	Schimid <i>et al.</i> (2000)
	<i>Ca. Brocadia anammoxidans</i>	Sistemas de tratamento de efluente	Inóculo: lodo de sistema de tratamento de efluente Reator: RBS alimentado com efluente sintético	Strous <i>et al.</i> (1999a)
	<i>Ca. Brocadia fulgida</i>	Sistemas de tratamento de efluentes	Inóculo: lodo ativado Reator: RBS alimentado com efluente contendo acetato	Kartal <i>et al.</i> (2008)
	<i>Ca. Brocadia sinica</i>	Sistemas de tratamento de efluentes	Inóculo: lodo de reator anammox (TSUSHIMA <i>et al.</i> , 2007) Reator: Reator de leito expandido e reator UASB alimentado com efluente sintético	Hu <i>et al.</i> (2010)
<i>Candidatus</i> Brocadia	<i>Ca. Brocadia brasiliensis</i>	Sistemas de tratamento de efluentes	Inóculo: lodo ativado Reator: RBS alimentado com efluente sintético.	Araujo <i>et al.</i> (2011)
	<i>Ca. Brocadia caroliniensis</i>	Sistemas de tratamento de efluentes	Inóculo: lodo de sistema de tratamento de efluente de suinocultura Reator: biorreatores de fluxo contínuo contendo biomassa imobilizada em esferas de polivinil-álcool (PVA)	Vanotti <i>et al.</i> (2011)
	<i>Ca. Brocadia sapporoensis</i>	Sistemas de tratamento de efluentes	Inóculo: Biomassa coletada de reator de fluxo ascendente tratando efluente industrial Reator: Bioreator de Membrana alimentado com efluente sintético	Narita <i>et al.</i> (2017)

/Continua

<b>Gênero</b>	<b>Espécie</b>	<b>Habitat</b>	<b>Informações sobre o primeiro experimento de enriquecimento</b>	<b>Referência</b>
<i>Candidatus Anammoxoglobus</i>	<i>Ca. Anammoxoglobus propionicus</i>	Sistemas de tratamento de efluentes	Inóculo: lodo ativado Reator: RBS alimentado com efluente sintético contendo propionato	Kartal <i>et al.</i> (2007)
	<i>Ca. Anammoxoglobus sulfate</i>	Sistemas de tratamento de efluentes	Inóculo: lodo de reator anammox (LIU <i>et al.</i> , 2008) Reator: reator com biodiscos alimentado com efluente sintético contendo sulfato	Liu <i>et al.</i> (2008)
<i>Candidatus Jettenia</i>	<i>Ca. Jettenia asiatica</i>	Ambiente de água doce	Inóculo: sedimento de rio Reator: reator de fluxo ascendente alimentado com efluente sintético	Quan <i>et al.</i> (2008)
	<i>Ca. Jettenia caeni</i>	Sistemas de tratamento de efluentes	Inóculo: lodo ativado Reator: reator de fluxo ascendente com meio suporte ( <i>non-woven carrier</i> )	Ali <i>et al.</i> (2015)
	<i>Ca. Jettenia moscovienalis</i>	Sistemas de tratamento de efluentes	Inóculo: lodo ativado Reator: RBS alimentado com efluente proveniente da digestão de lodo	Nikolaev <i>et al.</i> (2015)
<i>Candidatus Brasilis</i>	<i>Ca. Brasilis concordiensis</i>	Sistemas de tratamento de efluentes	Inóculo: lodo de lagoa anaeróbia tratando efluente de suinocultura Reator: reator anaeróbio de fluxo ascendente alimentado com efluente sintético	Viancelli <i>et al.</i> (2011)

/Continua

Gênero	Espécie	Habitat	Informações sobre o primeiro experimento de enriquecimento	Referência
<i>Candidatus Scalindua</i>	<i>Ca. Scalindua brodae</i> and <i>Ca. Scalindua wagneri</i>	Sistemas de tratamento de efluentes	Inóculo: lodo de sistema de tratamento de efluente Reator: reator com biodiscos alimentado com efluente de aterro sanitário	Schmid <i>et al.</i> (2003)
	<i>Ca. Scalindua sorokonii</i> and <i>Ca. Scalindua arabica</i>	Zonas de oxigênio mínimo	- <sup>a</sup>	Woebken <i>et al.</i> (2008)
	<i>Ca. Scalindua sinooifield</i>	Reservatórios de petróleo com temperatura elevada	-	Li <i>et al.</i> (2010)
	<i>Ca. Scalindua zhenghei</i>	Sedimentos marinhos	-	Hong <i>et al.</i> (2011)
	<i>Ca. Scalindua marina</i>	Sedimentos marinhos	-	Brandsma <i>et al.</i> (2011)
	<i>Ca. Scalindua richardsii</i>	Zonas marinhas sub-óxicas	-	Fuchsman <i>et al.</i> (2012)
	<i>Ca. Scalindua profunda</i>	Sedimentos marinhos	Inóculo: Sedimentos marinhos Reator: RBS com efluentes sintéticos contendo sais marinhos	Van de Vossenberg <i>et al.</i> (2013)
<i>Candidatus Anammoximicrobium</i>	<i>Ca. Anammoximicrobium moscowii</i>	Ambientes de água doce	Inóculo: sedimentos de rio Reator: RBS alimentado com efluente proveniente da digestão de lodo	Khramenkov <i>et al.</i> (2013)

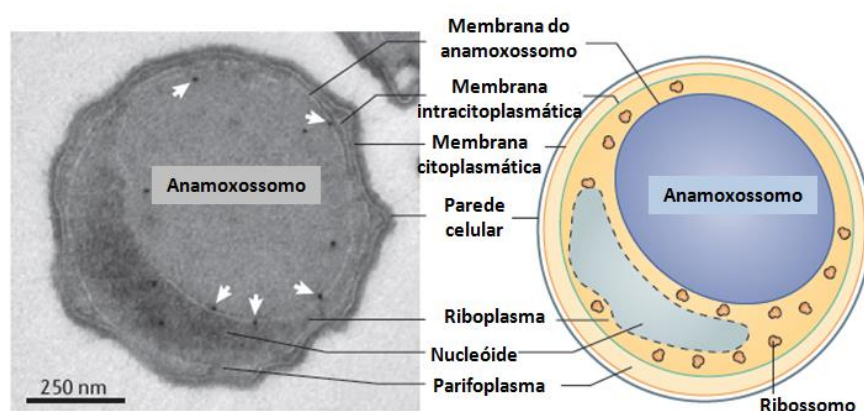
<sup>a</sup>Não foi realizado experimento de enriquecimento.

Até o momento, os genomas de sete espécies de bactérias anammox já foram sequenciados (*Ca. Kuenenia stuttgartiensis*, *Ca. Brocadia fulgida*, *Ca. Jettenia asiática*, *Ca. Scalindua profunda*, *Ca. Brocadia sinica*, *Ca. Brocadia* sp. 40 - recentemente reclassificada como *Ca. Brocadia sapporoensis* - e *Ca. Brocadia caroliniensis*) (ALI *et al.*, 2016; GORI *et al.*, 2011; HU *et al.*, 2012; OSHIKI *et al.*, 2015; PARK *et al.*, 2017; STROUS *et al.*, 2006; VAN DE VOSSENBERG *et al.*, 2013). Estudos baseados em sequenciamento de metagenomas tem auxiliado na compreensão do metabolismo destes importantes micro-organismos do ciclo do nitrogênio, uma vez que eles são de lento crescimento e não são encontrados em culturas puras. Baseados nesses estudos, a rota metabólica central das bactérias anammox parece ter sido desvendada e os principais genes envolvidos na oxidação anaeróbia da amônia foram decifrados.

Todas as bactérias anammox consomem o nitrogênio inorgânico (amônio e nitrito) que se encontra disponível no ambiente. Muitos genes que codificam enzimas para o transporte desses substratos estão presentes no genoma de bactérias anammox, como *narK* (antitransportador nitrato/nitrito), *focA* (transportador formiato/nitrito) assim como *amtB* (proteína transportadora de amônio). Uma vez transportados para dentro da célula, estes substratos são convertidos em intermediários do metabolismo anammox resultando na produção de nitrogênio gasoso (N<sub>2</sub>). No interior da célula, nitrito é reduzido a óxido nítrico (NO), reação que é catalisada por uma enzima nitrito redutase. *NirS* é o gene que codifica a enzima envolvida nesta etapa em *Ca. Kuenenia stuttgartiensis* e *Ca. Scalindua profunda*. Em *Ca. Jettenia asiática* e *Ca. Brocadia caroliniensis* *NirS* não foi mapeado, entretanto uma enzima homóloga cobre-nitrito redutase (codificada pelo gene *nirK*) realiza esta conversão. *NirS* também não foi encontrado no genoma de *Ca. Brocadia Fulgida* e *Ca. Brocadia sapporoensis*, indicando que a produção de NO pode ser catalisada por outras proteínas nestas espécies. A reação do íon amônio com o óxido nítrico para formar hidrazina (N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>), que é o último intermediário da reação anammox é catalisada pela enzima hidrazina sintase (*hzs*). Finalmente, um octaheme tipo HAO, como a enzima hidrazina oxidoreductase, codificada pelo gene *hzo*, catalisa a oxidação da hidrazina até nitrogênio gasoso. A fixação do carbono em bactérias anammox ocorre pela via da acetil coenzima A (*coA*). Genes chaves envolvidos nessa via (*acsA* e *acsB*) que codificam as alfa e beta subunidades da enzima dehidrogenase acetil coA sintase estão presentes no genoma de bactérias anammox. Poder redutor para a fixação do CO<sub>2</sub> vem da oxidação do nitrito a nitrato. Os genes *narG* e *narH* que codificam enzimas nitrato redutases parecem estar envolvidos nesta etapa. Em bactérias anammox este complexo enzimático funciona em uma direção reversa, como uma enzima do tipo nitrito oxido-redutase, catalisando a oxidação do nitrito a nitrato. O

nitrito é, então, exportado para fora do citoplasma celular (ALI *et al.*, 2016; GORI *et al.*, 2011; HU *et al.*, 2012; OSHIKI *et al.*, 2015; PARK *et al.*, 2017; STROUS *et al.*, 2006; VAN de VOSSENBERG *et al.*, 2013).

As bactérias anammox possuem forma de cocos, têm aproximadamente um micrômetro de diâmetro e possuem um compartimento intracelular membranoso denominado anamoxossomo onde estão localizadas enzimas que possibilitam a oxidação anaeróbia da amônia, como a hidrazina oxidoreductase (Figura 2.2) (FUERST e SAGULENKO, 2011; NIFTRIK *et al.*, 2004). O anamoxossomo é um compartimento formado por estrutura membranosa de lipídeos laterais contendo anéis de ciclobutano concatenados unidos por ligações éter ou éster (FUERST e SAGULENKO, 2011). Esta estrutura ocupa grande parte do volume da célula (LINDSAY *et al.*, 2001). A membrana do anamoxossomo é a estrutura que realiza a separação entre esta organela e o riboplasma circundante, o que é importante para que seja gerada força próton motora (FPM) através da membrana do anamoxossomo pela ATP sintase, para geração de energia na célula. Além disso, esta estrutura membranosa possui densidade elevada, fator que impede a saída de compostos intermediários tóxicos do metabolismo anammox, como por exemplo, a hidrazina (FUERST e SAGULENKO, 2011).



**Figura 2.2** - Micrografia eletrônica (direita) e representação esquemática (esquerda) de uma célula anammox mostrando o anamoxossomo

**Fonte:** Adaptado de Fuerst e Sagulenko (2011).

De acordo com Jetten *et al.* (1998) bactérias anammox possuem uma coloração alaranjada devido à elevada concentração de citocromos na membrana de suas células. Estes microorganismos possuem crescimento lento, sendo que o tempo de duplicação para algumas espécies foi calculado. Strous *et al.* (1998) foram os primeiros a determinar os tempos de duplicação de *Ca. Brocadia anammoxidans*, como sendo de aproximadamente 11 dias.

Entretanto, tempos de duplicação muito menores foram reportados para *Ca. Jettenia caeni* (3,9 dias), *Ca. Brocadia sapporoensis* (3,5 dias) e *Ca. Brocadia sinica* (2,1 dias) (NARITA *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2017b). Em contrapartida, taxas de duplicação muito maiores também já foram reportadas para *Ca. Anammoximicrobium moscowii* (igual a 32 dias) e *Ca. Jettenia moscovienalis* (28 dias) (KHRAMENKOV *et al.*, 2013; NIKOLAEV *et al.*, 2015).

Strous *et al.* (1999b) definiram as constantes de afinidade por amônia e nitrito para *Ca. Brocadia anammoxidans* como sendo iguais a 5 µM. O pH ideal para o crescimento de bactérias anammox encontra-se entre 6,7 e 8,3 e a temperatura, entre 20 e 43 °C. No entanto, estes organismos já demonstraram tolerância sob uma ampla faixa de temperaturas, podendo sobreviver em ambientes com temperaturas elevadas (85 °C) e reduzidas (-2 °C) (GAO e TAO, 2011).

Devido ao metabolismo singular das bactérias anammox há crescente interesse pela utilização desses micro-organismos no tratamento de efluentes para a remoção de nitrogênio. Entretanto, o crescimento lento dessas bactérias, associado à necessidade de controle rigoroso do processo (pH, concentração de oxigênio, concentração dos substratos amônia e nitrito, concentração de substâncias inibitórias, como a matéria orgânica, por exemplo) são fatores que ainda limitam o emprego do processo anammox em larga escala. Apesar disso, experiências de sucesso têm sido relatadas com a utilização do processo para tratamento de diferentes tipos de efluentes ao redor do mundo.

### **2.3 Processo anammox no tratamento de efluentes**

Os esgotos domésticos e efluentes industriais podem constituir expressiva fonte de nitrogênio, e se lançados sem o devido tratamento nos corpos d'água trazem sérias consequências para o meio ambiente e para a saúde pública. Um dos principais problemas relacionados ao lançamento de efluentes contendo nutrientes como nitrogênio e fósforo nos corpos hídricos é a eutrofização artificial. Devido à grande disponibilidade de nutrientes no meio, ocorre crescimento excessivo de algas e plantas aquáticas, causando interferências nas comunidades aquáticas, no nível de produção do sistema e nas condições físicas e químicas do meio. O nitrogênio também gera demanda de oxigênio para a oxidação do íon amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) até nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), causando prejuízos para a vida aquática. Quando presente na forma de amônia livre (NH<sub>3</sub>) é diretamente tóxica aos peixes, causando problemas nas guelras e brânquias destes animais, comprometendo seu sistema respiratório, promovendo morte por asfixia (SMART, 1976). Alta concentração de nitrato na água está associada a doenças como a

metahemoglobinemia em crianças e à ocorrência de câncer gástrico e de bexiga (CAMP, 2007; EICHELBERGER *et al.*, 2015; ESPEJO-HERRERA *et al.*, 2015).

A fim de evitar grande impacto ambiental e para a saúde pública, os efluentes domésticos e industriais devem ser tratados antes de serem lançados nos corpos d'água. Nos efluentes domésticos, aproximadamente 60% dos compostos nitrogenados estão na forma orgânica e 40% na forma inorgânica, sendo que as concentrações típicas de nitrogênio total estão entre 35 e 60 mg.L<sup>-1</sup> e as concentrações de nitrogênio amoniacal entre 20 e 35 mg.L<sup>-1</sup> (VON SPERLING, 2005). No que diz respeito aos efluentes industriais, suas características estão intrinsecamente relacionadas ao processo produtivo da indústria. Sua composição e volume, dependem da natureza e porte da indústria, do grau de modernidade dos seus processos produtivos, bem como da origem das matérias primas e insumos utilizados nos processos de produção (CAVALCANTI, 2012).

Alguns tipos de despejos industriais, lixiviados de aterros sanitários e efluentes provenientes da biodigestão anaeróbia de diferentes tipos de resíduos sólidos e líquidos, podem conter expressivas concentrações de nitrogênio amoniacal, conforme apresentado na Tabela 2.3.

**Tabela 2.3** - Concentrações típicas de nitrogênio amoniacal em diferentes tipos de efluentes

<b>Efluentes Industriais/ Lixiviado de aterros</b>	<b>Concentração N amoniacal (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Referência</b>
Efluente de indústria alimentícia (glutamato monossódico)	15.000 – 25.000	Li-dong <i>et al.</i> (2012)
Efluente de indústria alimentícia (processamento de batata)	200-400	Abma <i>et al.</i> (2010)
Efluentes de coqueria de indústria siderúrgica	330-5.100	Toh e Ashbolt (2002)
Efluentes de indústria farmacêutica (produção de antibiótico)	1.639	Ma <i>et al.</i> (2009)
Lixiviado de aterro	1.400-2.800 3.000	Liang e Liu (2008) Miao <i>et al.</i> (2016)
<b>Efluentes provenientes da biodigestão anaeróbia de:</b>	<b>Concentração N amoniacal (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Referência</b>
Lodo de esgoto	1.200 500-1.500	Van der Star <i>et al.</i> (2007) Fux e Siegrist (2004)
Efluente de suinocultura	900-1.500 2.050	De Prá <i>et al.</i> (2012) Tigini <i>et al.</i> (2016)
Resíduo alimentar	157 <sup>a</sup> 4,07 <sup>b</sup> 2,70 <sup>b</sup>	Sheets <i>et al.</i> (2015) Tampio <i>et al.</i> (2015) Tampio <i>et al.</i> (2016)

<sup>a</sup> Valor expresso em g.Kg<sup>-1</sup> de Matéria Seca;

<sup>b</sup> Valor expresso em g.Kg<sup>-1</sup> de Matéria Fresca;

A legislação brasileira, por meio da Resolução CONAMA nº 430/2011, que altera e complementa a Resolução CONAMA nº 357/2005, estabelece em seu artigo 16 o valor máximo permitido de 20 mg.L<sup>-1</sup> para o lançamento de nitrogênio amoniacal em corpos hídricos. Esse limite é aplicável somente a efluentes industriais, não sendo exigido para esgotos sanitários nem para efluentes de estações de tratamento de esgotos que recebem lixiviado de aterros sanitários (BRASIL, 2011).

Com vistas a atender aos padrões de lançamento para nitrogênio amoniacal estabelecidos na legislação brasileira, diversas tecnologias para o tratamento de efluentes visando a remoção destes compostos têm sido estabelecidas. Dentre os processos físico-químicos utilizados, o *stripping*, também conhecido como volatilização da amônia, pode ser citado. O *stripping* consiste na transferência de massa deste poluente da fase líquida para a fase gasosa. Isso é alcançado por meio da elevação do pH do efluente (por meio da adição de cal, por exemplo), complementada pela injeção de ar no líquido por meio de difusores de ar ou outros mecanismos de aeração. Geralmente, os processos físico-químicos resultam em aumento dos custos operacionais, quando comparados aos processos biológicos (VON SPERLING, 2005).

Com relação aos processos biológicos, convencionalmente, o tratamento de efluentes visando a remoção de nitrogênio amoniacal é realizado por meio da nitrificação, seguida pela desnitrificação. Conforme discutido no item 2.1, a nitrificação é um processo mediado por micro-organismos aeróbios e autotróficos, sendo que na desnitrificação atuam micro-organismos anaeróbios e heterotróficos. Uma vez que estes dois processos são mediados por bactérias com requisitos metabólicos distintos, há a demanda de dois reatores com características operacionais diferentes. Além disso, os baixos níveis de carbono em muitos tipos de efluentes, são insuficientes para que o processo de desnitrificação completa ocorra, sendo, muitas vezes necessária a adição de fontes externas de carbono (AHN, 2006).

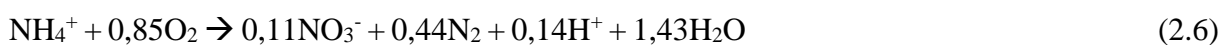
Processos baseados na utilização das bactérias com atividade anammox, surgiram como alternativa à nitrificação/desnitrificação para o tratamento de efluentes ricos em amônia e vêm sendo reconhecidos por serem mais eficientes, custo-efetivos e por possuírem menores requisitos energéticos do que os processos biológicos convencionais (ALI e OKABE, 2015). De acordo com Ma *et al.* (2016), por ser um processo completamente autotrófico, a nitrificação parcial/ anammox reduz em 100% a utilização de matéria orgânica. Dessa forma, a matéria orgânica pode ser alternativamente usada para produzir metano por meio da digestão anaeróbia tornando o processo de tratamento do efluente mais eficiente do ponto de vista energético. Há

uma economia de 90% no gerenciamento e transporte do lodo (MIAO *et al.*, 2016). Além disso, há uma redução de cerca de 50% no consumo de oxigênio e, por fim, menos óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) é gerado, diminuindo as emissões de gases de efeito estufa (MA *et al.*, 2016). Uma das principais desvantagens do processo está associada ao lento crescimento das bactérias anammox. Esse fator eleva consideravelmente o período de partida de reatores anammox inoculados com lodo não enriquecido previamente.

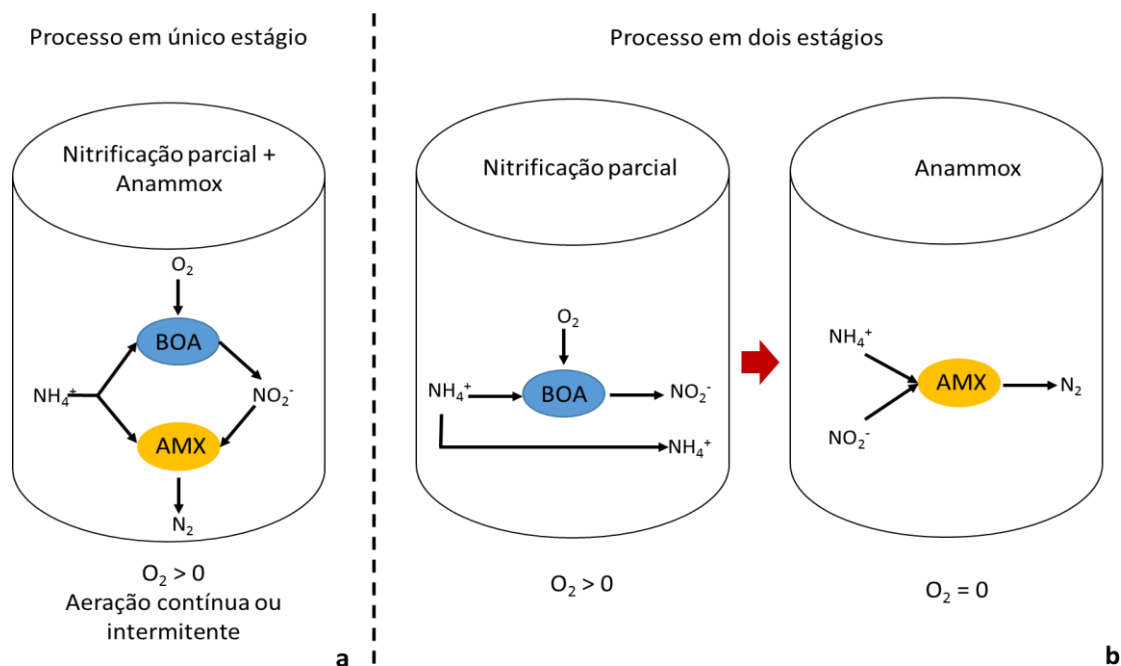
Fux e Siegrist (2004) compararam os custos dos processos de nitrificação/desnitrificação e da nitrificação parcial/anammox (NP/A) considerando a construção de reatores para o tratamento de líquido de digestor de lodo, para um equivalente populacional de 100.000 habitantes e com a geração de 1,5 g N.habitante<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Adotou-se a concentração de nitrogênio amoniacal no efluente de 1000 g.m<sup>-3</sup>, estimando-se uma carga de nitrogênio a ser tratada igual a 150 m<sup>3</sup>.d<sup>-1</sup> e assumindo-se uma eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal igual a 85%, sendo requerido um volume de reator de 260 a 280 m<sup>3</sup> com TDH de 0,5 dia para ambos os processos. O custo total estimado para o reator de NP/A foi de €2,5.kg<sup>-1</sup> N removido, mais econômico, portanto, do que o custo estimado para o processo de nitrificação/ desnitrificação, entre €3,0 a €4,0.kg<sup>-1</sup> N removido.

Bactérias anammox necessitam de amônio e nitrito de acordo com as proporções estequiométricas apresentadas na Equação 2.5. O íon amônio está presente em efluentes domésticos, e em maior concentração, em alguns tipos de efluentes industriais (Tabela 2.3). Entretanto, o nitrito geralmente não está presente ou está presente em níveis baixos e deve, portanto, ser gerado no efluente para que a reação anammox ocorra. Por esse motivo, o processo de nitrificação parcial geralmente é utilizado em conjunto com o processo anammox no tratamento de efluentes. Dessa maneira, o íon amônio é oxidado parcialmente a nitrito e, subsequentemente, estes dois substratos se tornam disponíveis para as bactérias com atividade anammox. A nitrificação parcial pode ser alcançada, por meio do fornecimento de oxigênio em baixas concentrações ao sistema.

A estequiometria geral para o processo de nitrificação parcial/ anammox (NP/A) foi proposta por Sliemers (2002) e é representada pela Equação 2.6.



Processos de NP/A podem ser realizados em um único reator (único estágio) ou em dois reatores distintos (dois estágios) (Figura 2.3).



**Figura 2.3** - Processos para nitrificação parcial e anammox. (a) único estágio e (b) dois estágios. BOA – Bactérias oxidadoras de nitrito; AMX – Bactérias anammox

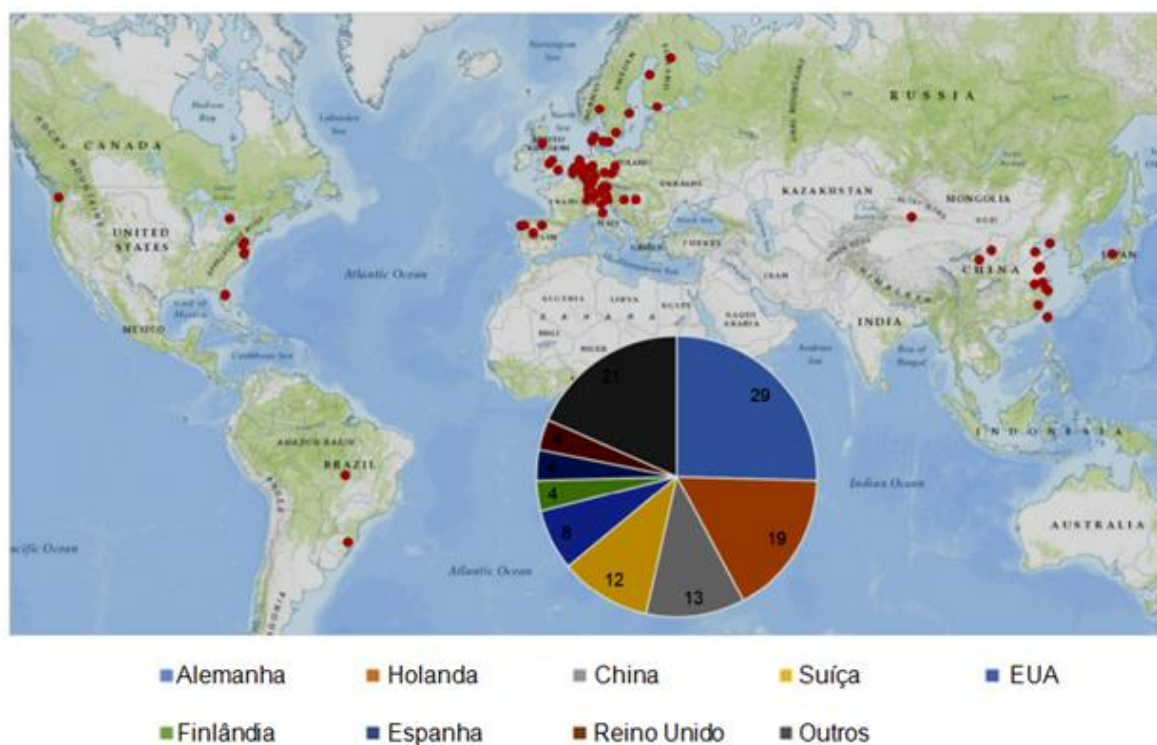
Diferentes denominações têm sido aplicadas aos reatores que utilizam a nitrificação parcial/anammox. Por exemplo, dentre os processos que utilizam dois estágios é possível citar o processo SHARON (*Single Reactor System for High Ammonium Removal over Nitrite*) seguido pelo processo anammox (VAN DER STAR *et al.*, 2007). Em um reator SHARON condições ideais são fornecidas para que a amônia seja oxidada somente até a nitrito. Estes reatores operam em temperaturas elevadas (35 °C). Nestas condições bactérias oxidadoras de nitrito (BON) possuem crescimento mais lento que as bactérias oxidadoras de amônia (BOA). Além disso, a oxidação do nitrito à nitrato é evitada por meio do controle do tempo de detenção hidráulico (TDH). O reator é operado com curtos TDH, suficientes para favorecer o crescimento de BOA, mas não o crescimento de BON (VAN DER STAR *et al.*, 2007). O efluente do reator SHARON é posteriormente enviado à um segundo estágio, constituído de um reator operado em condições completamente anaeróbicas para propiciar o desenvolvimento de bactérias anammox.

Em processos de um único estágio como o CANON (*Completely Autotrophic Nitrogen removal Over Nitrite*) (VÁZQUEZ-PADÍN *et al.*, 2009) e o OLAND (*Oxygen Limited Autotrophic Nitrification Denitrification*) (KUAH e VERSTRATE, 1998) a nitrificação parcial e o processo anammox acontecem concomitantemente em um único reator. São fornecidas baixas concentrações de oxigênio dissolvido, de forma que as BOA conseguem se desenvolver e oxidar

parcialmente a amônia até nitrito, consumindo o oxigênio dissolvido do meio e formando, dessa maneira, vários nichos anaeróbios. Dessa forma, as bactérias anammox são capazes de se desenvolver e oxidar a amônia completamente até nitrogênio gasoso, utilizando o nitrito gerado pelas BOA como acceptor de elétrons (KUAI e VERSTRATE, 1998; VÁZQUEZ-PADÍN *et al.*, 2009).

Outro processo em um único estágio que vem se tornando uma das configurações mais utilizadas dentre as tecnologias que utilizam Reatores em bateladas sequenciais (RBS) é o processo DEMON<sup>®</sup> (Deamonificação). Nesses reatores há ciclos de aeração e anaerobiose e o controle dessas etapas é baseado nos valores de pH. As concentrações de oxigênio dissolvido se mantêm abaixo de 3 mg.L<sup>-1</sup> para propiciar o acúmulo de nitrito e reprimir continuamente o segundo passo da oxidação aeróbia da amônia (oxidação do nitrito à nitrato). Durante a etapa de aeração a oxidação da amônia a nitrito acontece a uma taxa maior que o processo anammox e ocorre produção de H<sup>+</sup> diminuindo o valor de pH, o que faz com que a aeração (que é automatizada) desligue. Durante o período em que a aeração permanece desligada todo oxigênio é consumido e o nitrito que foi acumulado durante a etapa de aeração é utilizado pelas bactérias anammox para oxidar a amônia. Nessa etapa alguma alcalinidade é recuperada e além disso a entrada do efluente também faz com que os valores de alcalinidade aumentem, fazendo com que o valor de pH se eleve novamente o que aciona a ligação da aeração. Estes ciclos de aeração/anaerobiose são repetidos continuamente (WETT, 2006).

Levantamentos recentes apontaram a existência de mais de 110 instalações em escala plena que utilizam o processo anammox ao redor do mundo (ALI e OKABE, 2015; LACKNER *et al.*, 2014; MAO *et al.*, 2017). A maioria delas (88) está localizada na Europa, seguido pela Ásia e América do Norte (13 e 8 instalações, respectivamente). No Brasil, sabe-se que as plantas em escala plena que utilizam o processo anammox são operadas pela empresa Paques, entretanto não foram identificadas informações na literatura sobre tais estações de tratamento (Figura 2.4).



**Figura 2.4** - Distribuição geográfica dos reatores anammox em escala plena ao redor do mundo.

**Fonte:** Adaptado de Ali e Okabe (2015)

Cerca de 50% das estações de tratamento que utilizam o processo anammox operam com reatores em batelada sequenciais (RBS). O segundo tipo de reator anammox mais utilizado opera com biomassa de crescimento granular, seguido por sistemas que utilizam biorreatores de leito móvel com biofilme (MBBR, do inglês, *Moving Bed Biofilm Reactor*) (LACKNER *et al.*, 2014).

Grande parte dos reatores anammox em escala plena existentes são empregados para tratar digestato de lodo gerado em estações de tratamento de esgotos domésticos (JEANNINGROS *et al.*, 2010; JOSS *et al.*, 2009; LACKNER *et al.*, 2014; VAN DER STAR *et al.*, 2007; WETT, 2007). Entretanto, há relatos na literatura sobre a utilização do processo anammox em escala plena para o tratamento de efluentes industriais como o de curtumes, de indústrias alimentícias (processamento de batata, processamento de carne, glutamato monossódico, amido, vinícola, destilaria, laticínios), de fertilizantes (LACKNER *et al.*, 2014) e lixiviado de aterros sanitários (AZARI *et al.*, 2017).

Estudos tem mostrado o potencial da utilização da nitrificação parcial e anammox (NP/A) também para o tratamento de esgotos domésticos. Uma das principais limitações, nesse caso, é o alto conteúdo de matéria orgânica em relação ao nitrogênio presente nos esgotos (relações

C/N variando de 7 a 12), resultando em crescimento de bactérias heterotróficas no lodo que acabam por inibir o crescimento de bactérias com atividade anammox, devido à competição pelo acceptor de elétrons ( $\text{NO}_2^-$ ), que é respirado por ambos os grupos microbianos (CAO *et al.*, 2017). Propostas para diminuir o efeito das altas relações C/N presentes nos esgotos domésticos sobre o processo anammox incluem a utilização de um primeiro estágio de tratamento visando a remoção de carbono, sem alterar a concentração de nitrogênio amoniacal. Para isso, processos como a digestão anaeróbia podem ser utilizados. Dessa forma, um efluente com menor relação C/N é gerado no primeiro estágio de tratamento e em um estágio posterior a remoção de amônia por meio do processo anammox pode ser alcançada (XU *et al.*, 2015).

Os processos que utilizam NP/A vêm sendo aplicados em diferentes configurações de reatores. Estes sistemas variam, fundamentalmente, com relação ao número de estágios em que ocorrem os processos (um ou dois), quanto ao tipo de biomassa no reator (suspensa – floculenta ou granular, biofilme aderido à um meio suporte ou híbrida), além das formas de controle da aeração (que serão discutidas no item 2.5). A Tabela 2.4 apresenta algumas das experiências com a aplicação de reatores para nitrificação parcial e anammox, tratando diversos tipos de efluentes.

**Tabela 2.4** - Experiências com diferentes configurações de reatores para nitrificação parcial e anammox no tratamento de efluentes

Tipo de reator	Localização	Nº de Estágios	Tipo de biomassa	Volume do reator onde ocorre o processo anammox (m <sup>3</sup> )	Tipo de efluente	Carga de N removida Kg N.m <sup>-3</sup> .d <sup>-1</sup>	Referência
Sharon <sup>a</sup> / Anammox	Rotterdan (Holanda)	2	Granular	70	Digestato de lodo de esgoto	7,1	Van der Star <i>et al.</i> (2007)
RBS <sup>b</sup>	Zurich (Suíça)	1	Suspensa	1400	Digestato de lodo de esgoto	0,45	Joss <i>et al.</i> , (2009)
RBS	St. Gallen (Suíça)	1	Suspensa	108	Digestato de lodo de esgoto	0,36	Joss <i>et al.</i> (2009)
RBS	Niederglatt (Suíça)	1	Suspensa	160	Digestato de lodo de esgoto	0,35	Joss <i>et al.</i> (2009)
NAS <sup>c</sup>	Bergen op Zoon (Holanda)	2	Floculenta	1650	Efluente de indústria alimentícia (processamento de batata)	0,26	Desloover <i>et al.</i> (2011)
CANON <sup>d</sup>	Olburgen (Holanda)	1	Granular	600	Efluente de indústria alimentícia (processamento de batata)	1,1	Abma <i>et al.</i> (2010)
ANITA-MOX <sup>e</sup>	Malmö (Suíça)	1	Biofilme	200	Digestato de lodo de esgoto	1,1	Christensson <i>et al.</i> (2011)
DEMON <sup>f</sup>	Strass (Áustria)	1	Suspensa	400	Digestato de lodo de esgoto	0,6	Wett (2007)
DeAmmon <sup>g</sup>	Hattingen (Alemanha)	1	Biofilme	319	Digestato de lodo de esgoto	0,3-0,4	Rosenwinkel e Cornelius (2005)

<sup>a</sup> Reator único para remoção de amônio até nitrito (*Single Reactor System for High Ammonium Removal over Nitrite*).

<sup>b</sup> Reator em batelada sequencial.

<sup>c</sup> Novo sistema de lodos ativados (*New Activated Sludge*).

<sup>d</sup> Remoção de nitrogênio autotrófica completa até nitrito (*Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite*).

<sup>e</sup> ANITA-MOX é o nome comercial para processo de um estágio de nitrificação parcial/ anammox em MBBR (*Moving Bed Biofilm Reactor*).

<sup>f</sup> DEMON ou *Deammonification* é o nome comercial para processo de um estágio de nitrificação parcial/ anammox em RBS.

<sup>g</sup> DeAmmon ou *Deammonification* é o nome comercial para o processo de um estágio de nitrificação parcial/ anammox em MBBR.

Independentemente da configuração, a inoculação dos reatores em escala plena, em países em que o processo anammox já está bem estabelecido, normalmente se faz com biomassa previamente enriquecida, o que diminui drasticamente o tempo de partida dos sistemas. Isso porque, um dos principais desafios a ser superado para a aplicação de processos que utilizam bactérias anammox são os longos tempos de *start-up* dos reatores, devido às lentas taxas de duplicação dos micro-organismos que desempenham a reação de oxidação anaeróbia da amônia. Por esse motivo, a escolha do inóculo apropriado, assim como a escolha da configuração do reator, que seja eficaz na retenção de biomassa durante o período de *start-up* são extremamente importantes. Dentre os reatores mais indicados, estão os reatores em bateladas sequenciais (RBS), capazes de reter biomassa, e além disso são de fácil construção e fácil monitoramento (HE *et al.*, 2015). A adição de compostos intermediários da reação anammox é também utilizada para reduzir o tempo de *start-up* desses reatores. Wang et al. (2017) reportaram que a utilização de concentrações traço de hidroxilamina foram essenciais para a partida de um reator anammox em escala piloto tratando digestato de lodo de esgoto.

O primeiro reator anammox em escala plena, construído na Holanda, o qual possuía um volume de 70 m<sup>3</sup>, foi inoculado com lodo de um reator nitrificante e teve um tempo de partida de aproximadamente dois anos e meio (VAN DER STAR *et al.*, 2007). Em trabalho conduzido por Wett (2006) na Áustria, foi proposto um aumento gradativo na escala de reatores que utilizam o processo DEMON<sup>®</sup> objetivando diminuir seus tempos de partida. Partiu-se de um reator DEMON<sup>®</sup> de 4 L de volume, que foi previamente enriquecido a partir de lodo ativado e sua biomassa foi utilizada para inocular um reator de 300 L de volume. Por sua vez a biomassa deste último reator foi utilizada para inocular um reator de 2,4 m<sup>3</sup> de volume. Por fim, um reator em escala plena de 500 m<sup>3</sup> de volume foi inoculado com a biomassa do reator de 2,4 m<sup>3</sup>. Com esta estratégia, o tempo para a partida do reator em escala plena (500 m<sup>3</sup>) foi de apenas seis meses.

No Brasil, esforços no sentido de enriquecer biomassa anammox tornando-a disponível para a inoculação de novos reatores são ainda necessários, já que não há reatores em escala plena que podem fornecer biomassa para inoculação de novos reatores anammox. Além disso, estratégias para diminuir o tempo de partida de reatores em escala piloto e plena devem também ser estudadas.

Desde o ano de 2008, o enriquecimento e cultivo de bactérias anammox a partir de diferentes inóculos têm sido objeto de estudo pelo grupo de pesquisa em microbiologia aplicada do

Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (DESA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Diferentes configurações de reatores vêm sendo aplicadas em tais experimentos. Lara (2009) utilizou reatores em batelada para tentar enriquecer bactérias anammox partindo de diferentes inóculos (lodo de reator UASB e lodo ativado de estação de tratamento de esgotos). A autora identificou atividade de bactérias desnitrificantes, mas nenhuma atividade anammox foi identificada, em todos os experimentos realizados, mesmo com adição de cloranfenicol, utilizado com objetivo de inibir a atividade desses microorganismos. Com as estratégias utilizadas neste estudo não foi possível enriquecer bactérias anammox.

Campos (2011) e Pereira (2013) utilizaram reatores em bateladas sequenciais de um litro e dois litros de volume, respectivamente, para enriquecer biomassa anammox a partir de lodo ativado de estação de tratamento de esgotos domésticos. Em ambos os experimentos, atividade anammox foi detectada nos reatores entre 2 e 3 meses de cultivo, e as comunidades microbianas desenvolvidas nos reatores foram capazes de remover elevadas concentrações de nitrogênio amoniacal (em torno de  $100 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ ) a partir de efluentes sintéticos.

Costa (2013) avaliou o impacto de dois tipos de inóculos (lodo obtido a partir de um sistema de *wetlands* construídos tratando esgoto doméstico e lodo oriundo de um sistema de tratamento de efluente industrial de refinaria de petróleo) no desempenho e desenvolvimento da comunidade microbiana de dois reatores de leito fixo com fluxo ascendente e contínuo. A eficiência média de remoção de nitrogênio amoniacal após um ano de operação dos reatores foi de 97%, para concentração afluente de  $110 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$  no reator inoculado com lodo de *wetland* e  $145 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$  no reator inoculado com lodo da refinaria de petróleo. Em ambos os reatores os grupos microbianos mais abundantes identificados foram Proteobacteria, Chloroflexi, Planctomycetes e Acidobacteria.

Estes trabalhos contribuíram para avaliar a utilização de possíveis inóculos para o desenvolvimento do processo anammox e também para entender como diferentes estratégias operacionais podem influenciar a remoção de nitrogênio por meio desse processo. Entretanto, todos estes experimentos foram realizados em escala laboratorial (em reatores de, no máximo, 2 L de volume) e obteve-se sempre uma pequena quantidade de biomassa anammox, que é insuficiente para dar partida em reatores de grande escala.

## ***2.4 Pós-tratamento de digestatos oriundos do tratamento de diferentes tipos efluentes e resíduos orgânicos***

A digestão anaeróbia vem sendo aplicada para o tratamento de diversos tipos de efluentes líquidos e resíduos sólidos, como esgotos domésticos, efluentes industriais, resíduos agropecuários e para a fração orgânica de resíduos sólidos urbanos. Nesse processo, os resíduos são estabilizados e convertidos em dois subprodutos principais: biogás e um digestato rico em nutrientes (também conhecido como efluente da digestão anaeróbia). Há um grande interesse pela utilização do biogás produzido para conversão em energia, devido à elevada proporção de metano presente no mesmo. As características do digestato tendem a variar de acordo com o resíduo ou efluente submetido ao processo de digestão anaeróbia. Na Tabela 2.5 são apresentados valores típicos de compostos presentes em diferentes tipos de digestatos.

**Tabela 2.5 - Características de diferentes tipos de digestatos.**

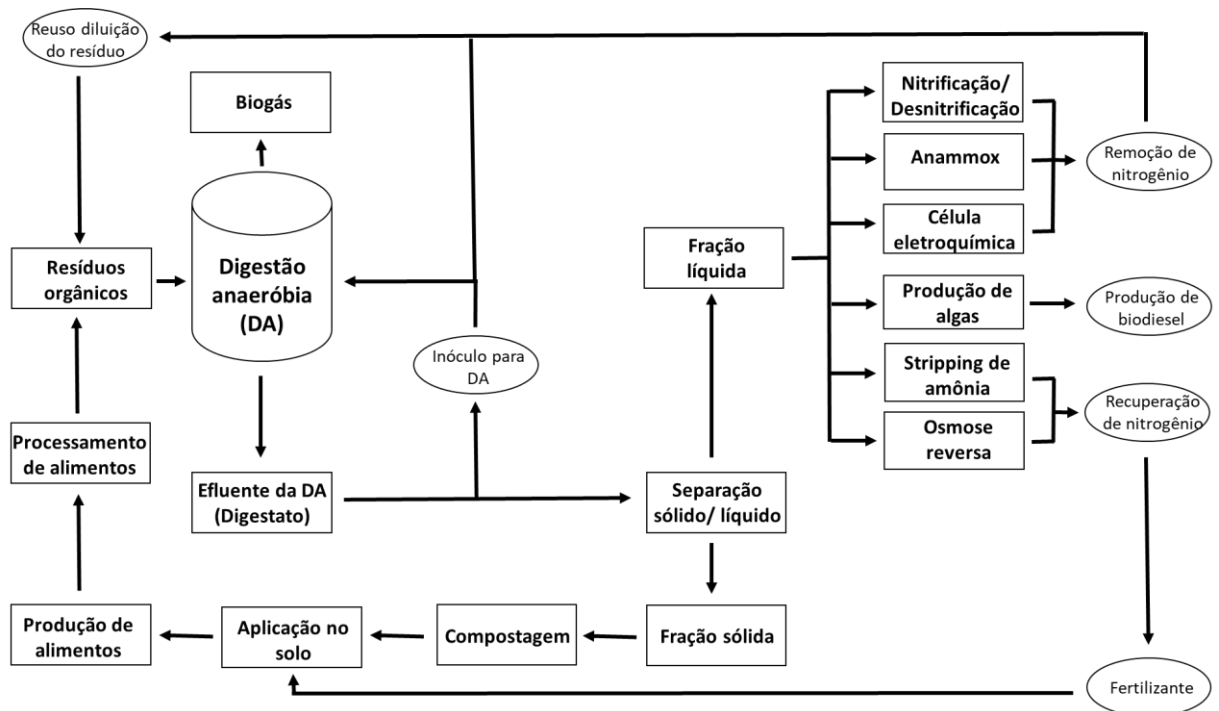
Digestato	NT	NAT	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NTK	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	PT	COT	CT	DQO	Alcalinidade	ST	STV	SST	pH	Referências
Esgoto doméstico digerido (mg.L <sup>-1</sup> )	46	- <sup>a</sup>	27	45	0	0,1	-	-	-	150	-	-	-	71	7,2	Leal <i>et al.</i> (2016)
Digestato de lodo de esgoto (mg.L <sup>-1</sup> )	-	-	740	-	<0,5	<0,5	-	-	-	140	-	-	-	-	8,3	Jenni <i>et al.</i> (2014)
Efluente de suinocultura (mg.L <sup>-1</sup> )	1.170	-	1.124	-	0	81	-	2.549	-	-	1.122	-	-	25.000	7,7	Lei e Maekawa (2007)
Efluente de suinocultura (mg.L <sup>-1</sup> )	1.700	-	1.650	-	0	0	171	-	-	3.969	1.183	11.210	5.350	2.580	8,4	Obaja <i>et al.</i> (2003)
Efluente de laticínios (mg.L <sup>-1</sup> )	-	492	-	-	-	-	8,1	-	-	-	-	8.636	5.015	-	7,7	Jiang <i>et al.</i> (2014)
Resíduo alimentar (mg.L <sup>-1</sup> )	2.370	-	-	-	-	-	47,8	-	-	5.923	-	-	-	-	-	Shin <i>et al.</i> (2015)
Resíduo alimentar (mg.L <sup>-1</sup> )	-	-	7.170	8.954	-	-	-	-	-	-	-	57,8 <sup>b</sup>	41,2 <sup>b</sup>	-	8,2	De La Rubia <i>et al.</i> (2010)
Resíduo alimentar (mg.L <sup>-1</sup> )	-	-	2.120	-	-	-	-	-	-	3.158	-	-	-	-	-	Cheng <i>et al.</i> (2016)
Resíduo alimentar (g.Kg <sup>-1</sup> MS)	112-157	52-108	-	-	-	-	6-16	-	311-157	-	-	-	38-71	-	7,9-8,2	Sheets <i>et al.</i> (2015)
Resíduo da agricultura (g.Kg <sup>-1</sup> MS)	22-88	6-45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,5-8,4	Sheets <i>et al.</i> (2015)
Co-digestão – resíduo da pecuária, cozinha e culturas energéticas (mg.L <sup>-1</sup> )	9.326	-	7.194	-	-	-	1.382	-	-	54.460	-	-	-	-	-	Wirthensohn <i>et al.</i> (2009)

MS: Matéria Seca; NT: Nitrogênio total; NAT: Nitrogênio amoniacal total (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> + NH<sub>3</sub>); NTK: Nitrogênio total Kjeldahl; PT: Fósforo total; COT: Carbono orgânico total; CT: Carbono total; DQO: Demanda química de oxigênio; ST: sólidos totais; SV: Sólidos voláteis; SST: Sólidos em suspensão totais. <sup>a</sup>Valores não reportados; <sup>b</sup>Concentração reportada em g.Kg<sup>-1</sup>.

Devido ao alto teor de nutrientes, o digestato é comumente utilizado como fertilizante orgânico ou condicionador de solos. Entretanto, essa prática tem causado discussão acerca da segurança e sustentabilidade para o meio ambiente, uma vez que, quando realizada de maneira imprópria, a aplicação de digestatos no solo pode levar à uma série de problemas ambientais. Dentre eles é possível citar a volatilização da amônia, emissão de gases de efeito estufa, como o  $N_2O$ , contaminação das áreas por patógenos, excesso de fertilização do solo e escoamento de nutrientes para os corpos d'água. Dessa forma, em sistemas de digestão anaeróbia, o gerenciamento seguro dos efluentes gerados tornou-se tão importante quanto produzir o máximo rendimento de biogás (NKOA, 2014; SHEETS *et al.*, 2015).

A recirculação dos digestatos anaeróbios também é possível, com objetivo de serem utilizados como inóculos, já que possuem micro-organismos anaeróbios ativos, o que pode fazer com que a produção de biogás no reator seja aumentada. Outra possibilidade é utilizar a fração líquida do digestato para diluir os resíduos a serem digeridos no sistema de metanização com objetivo de economizar água. Porém, uma preocupação associada à recirculação de digestatos são os altos conteúdos de amônia livre, ácidos graxos voláteis e outros metabólitos presentes que podem causar inibição da atividade microbiana, comprometendo a produção de metano no sistema (SHEETS *et al.*, 2015; SHENG *et al.*, 2013; ZAMANZADEH *et al.*, 2016).

A separação da fração sólida e líquida dos digestatos pode ser requerida para a utilização de algumas técnicas de tratamento desses efluentes. Essa separação, geralmente é feita por meio de desaguamento utilizando centrifugação, prensas de parafuso ou filtros-prensa. Após o desaguamento, torna-se mais fácil gerenciar uma fração sólida com volume reduzido e é gerada uma fração líquida com nutrientes solúveis disponíveis. A Figura 2.5, adaptada de Sheets *et al.* (2015) apresenta algumas das técnicas emergentes de tratamento que podem ser aplicadas para ambas as frações sólida/líquida de digestatos anaeróbios.



**Figura 2.5** - Fluxograma com possíveis técnicas de tratamento e reutilização de efluentes provenientes da digestão anaeróbia de resíduos orgânicos.

**Fonte:** Adaptado de Sheets *et al.* (2015)

A compostagem é uma técnica antiga que tem sido utilizada como alternativa para o tratamento da fração sólida dos efluentes da digestão anaeróbia (LIN *et al.*, 2014). Na compostagem, a atividade de micro-organismos aeróbios faz com que elevadas temperaturas sejam alcançadas em leiras onde são dispostos os resíduos, ocasionando a morte de patógenos e a estabilização da matéria orgânica. Com a compostagem, há uma redução do volume do digestato anaeróbio, o que reduz os custos para seu transporte. O composto gerado, pode ser utilizado como condicionador de solos (SHEETS *et al.*, 2015).

Dentre as técnicas físico-químicas para o remoção de amônia da fração líquida de efluentes de digestão anaeróbia de resíduos orgânicos, o *stripping* da amônia é uma das alternativas mais reportadas (BONMATÍ e FLOTATS, 2003; JIANG *et al.*, 2014; DE LA RUBIA *et al.*, 2010; WALKER *et al.*, 2011). No *stripping* da amônia, ar é fornecido ao sistema para que a amônia livre seja transferida da fase líquida para a fase gasosa. Experiências relatam que o pH elevado, alta taxa de ar aplicada e elevadas temperaturas favorecem esse processo (WALKER *et al.*, 2011). Nesse processo nitrogênio pode ser recuperado na forma de sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) por meio de uma reação de absorção. O ar carregado de amônia livre é absorvido por ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) em solução, formando o sulfato de amônio, que pode ser utilizado como fertilizante. Em contrapartida, esse processo requer energia para aquecimento, já que sua

eficiência reduz com a diminuição da temperatura, requer um eficiente controle de pH e da taxa de ar, há risco de formação de espuma e é ineficaz na remoção de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NO}_2^-$  (JIANG *et al.*, 2014).

Outros processos físico-químicos para remoção de nitrogênio de digestatos incluem a osmose reversa (BLISTAD *et al.*, 1992 citado por SHEETS *et al.*, 2015) e utilização de células eletroquímicas (eletrodo de Ti/Pt-IrO<sub>2</sub>) (LEI e MAEKAWA, 2007). A osmose reversa é influenciada pela pressão de operação, pH e temperatura. Elevada pressão favorece a passagem do efluente através da membrana e baixo pH produz maior proporção de  $\text{NH}_4^+$  que fica retido no líquido concentrado. Uma das desvantagens desse processo é que os altos teores de sólidos presentes nos digestatos anaeróbios, mesmo após passar por processo de desaguamento, pode favorecer a colmatção rápida das membranas (SHEETS *et al.*, 2015). Dessa forma, devido ao acúmulo e deposição de materiais na superfície e poros da membrana ocorre uma drástica redução no fluxo de efluente através da mesma, o que gera uma demanda pela limpeza utilizando elevadas temperaturas e/ou produtos químicos (VANEECKHAUTE *et al.*, 2012). Experimentos com a utilização de eletrodos de Ti/Pt-IrO<sub>2</sub> foram reportados na literatura para tratamento de digestato anaeróbio de efluente de suinocultura. Os autores alcançaram remoção completa de amônio do digestato em 5 horas (concentração de  $\text{NH}_4^+$  igual a 1.124 mg.L<sup>-1</sup>) com certa quantidade de nitrato formado. A eficiência do processo foi associada à dosagem de NaCl, sendo que a o aumento na dosagem desse sal favoreceu a remoção de amônia (LEI e MAEKAWA, 2007).

No que diz respeito aos processos biológicos, pode-se citar a utilização de microalgas para a remoção de nitrogênio e fósforo de digestatos. As algas removem estes nutrientes produzindo biomassa que possui elevado teor de lipídeos. Esta biomassa tem potencial para ser utilizada na produção de biodiesel. Uma limitação da utilização de microalgas está no fato de que os efluentes da digestão anaeróbia geralmente possuem alto teor de sólidos e turbidez elevada, o que impede a penetração da luz nos sistemas utilizados para o crescimento de biomassa algal e consequentemente reduz o crescimento desses organismos. Além disso, elevados teores de  $\text{NH}_3$  podem ser tóxicos para as algas. Por isso, diluições elevadas dos digestatos podem ser requeridas, o que acaba por tornar esse processo não muito sustentável (CHENG *et al.*, 2016; SHEETS *et al.*, 2015; SHIN *et al.*, 2015).

A nitrificação e desnitrificação são métodos biológicos convencionalmente utilizados para a remoção de nitrogênio de diversos tipos de efluentes, incluindo digestatos anaeróbios (OBAJA

*et al.*, 2003; RAJAGOPAL *et al.*, 2011) . Entretanto, muitos digestatos podem conter baixa relação C/N o que compromete o processo de desnitrificação, sendo necessária a adição de fontes externas de carbono.

O processo anammox emergiu como uma alternativa mais econômica e sustentável em relação aos métodos biológicos tradicionais de remoção de nitrogênio, conforme discutido no item 2.3. Esse processo que geralmente é acoplado à nitrificação parcial (NP), já vem sendo utilizado para o pós-tratamento de efluentes da biodigestão anaeróbia. Boas experiências com a utilização de processos que envolvem a atividade de bactérias anammox foram relatadas para o pós-tratamento de digestatos de lodo de esgotos (JEANNINGROS *et al.*, 2010; JOSS *et al.*, 2009; VAN DER STAR *et al.*, 2007), pós-tratamento de esgotos domésticos tratados em reator UASB (FERNANDES *et al.*, 2018), pós-tratamento de digestato de suinocultura (FIGUEROA *et al.*, 2012) e pós-tratamento de efluente proveniente da biodigestão de resíduos agrícolas mistos (SCAGLIONE *et al.*, 2015). Não foram identificados na literatura trabalhos que utilizam o processo anammox para o pós-tratamento de digestato de resíduo alimentar oriundo de restaurante, que é objeto de estudo da presente pesquisa.

## **2.5 Estratégias de aeração em reatores de único estágio com nitrificação parcial e anammox**

Para se obter um bom desempenho na remoção de nitrogênio por meio da nitrificação parcial/anammox (NP/A) em um único estágio é fundamental que a nitrificação seja encerrada em sua primeira etapa (até a formação do  $\text{NO}_2^-$ ). Para isso, o modo de operação do sistema deve favorecer as bactérias aeróbias oxidadoras de amônia (BOA) e inibir os micro-organismos responsáveis pela oxidação do nitrito até nitrato (bactérias oxidadoras de nitrito – BON).

Fatores importantes a serem considerados são o modo de aeração e a concentração de oxigênio dissolvido fornecida ao sistema, que podem ser determinantes para a atividade de micro-organismos do ciclo do nitrogênio. As BOA possuem maior afinidade pelo oxigênio em relação às BON (WANTAWIN *et al.*, 2008). Blackburne *et al.* (2008) encontraram constantes de meia saturação ( $K_o$ ) para o oxigênio para BOA e BON iguais a, respectivamente,  $0,033 \pm 0,003 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $0,43 \pm 0,08 \text{ mg.L}^{-1}$ . Dessa forma, as BOA são capazes de crescer em condições onde as concentrações de oxigênio dissolvido são mais baixas, condição que limita, ao mesmo tempo, o crescimento de BON e faz com que o nitrito se faça disponível para bactérias anammox no reator.

Aeração intermitente é apontada por muitos autores como sendo eficaz para suprimir a atividade de BON. Foi demonstrado que, após submetidas a períodos de anoxia, BOA possuem a fase lag da curva de crescimento menor em relação à BON. Estudos conduzidos por Gilbert *et al.* (2014) demonstraram que períodos anóxicos maiores do que 15-20 minutos são suficientes para atrasar a produção de nitrato por BON, mas não influenciam a oxidação da amônia a nitrito por BOA. Bons resultados têm sido alcançados utilizando períodos anóxicos longos e curtos, mas os resultados obtidos nos diferentes estudos não convergem para qual deveria ser o comprimento ideal do período anóxico em relação ao período aerado, capaz de inibir a atividade de BON, atrasando a oxidação do nitrito à nitrato nos reatores. Por esse motivo, esse é um tema que necessita de maiores investigações.

Alguns pesquisadores têm voltado seus esforços para avaliar diferentes estratégias de aeração a fim de otimizar o processo de nitrificação parcial e anammox para a remoção de nitrogênio. Com este objetivo, Wantawin *et al.* (2008) avaliaram em dois reatores em batelada sequencial com biofilme (RBSB) de 3 L de volume, utilizando anéis fibrosos como meio suporte, duas estratégias de aeração: (a) Aeração intermitente, com períodos de aeração/ anóxico de 3 horas cada, repetidamente (levando a 4 ciclos de aeração/anóxico em cada batelada); (b) aeração contínua, com concentração de oxigênio mantida a  $1,5 \pm 0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ . O reator era alimentado com efluente sintético contendo  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{N-NH}_4^+$  e foram testados dois tempos de detenção hidráulicos (TDH), de 24 e 48 horas. Os autores concluíram que a remoção de amônia foi possível neste reator por ambas as vias, aeróbia e anaeróbia. Independentemente do modo de aeração, foram obtidos melhores resultados quando o TDH adotado foi o de 48 horas. Considerando este TDH, ambas as estratégias de aeração resultaram em completa remoção de nitrogênio amoniacal. Entretanto, melhores eficiências de remoção de nitrogênio total foram obtidas com a aeração intermitente, uma vez que este modo de aeração resultou em menor produção de nitrato (cerca de  $10 \text{ mg.L}^{-1}$ ).

Joss *et al.* (2009) realizaram comparação entre os modos de aeração, contínua e intermitente, em um RBS em escala plena ( $1.400 \text{ m}^3$ ) tratando efluente com elevada concentração de nitrogênio amoniacal ( $650 \pm 50 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e baixa relação DQO/N (concentração de DQO =  $630 \pm 50 \text{ mg/L}$ ; Relação DQO/N = 0,97, aproximadamente). Neste estudo, a concentração de oxigênio dissolvido foi mantida abaixo de  $1 \text{ mg.L}^{-1}$ , e foram utilizados dois reatores, sendo que um deles era aerado de maneira contínua e outro de modo intermitente (45 minutos com aeração ligada e 15 minutos com aeração desligada). Os resultados demonstraram que ambas as estratégias foram comparáveis em termos de remoção de nitrogênio amoniacal (cerca de 87%

de eficiência de remoção, produzindo efluentes com cerca de 25 mg.L<sup>-1</sup> de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) e de produção de nitrato (em ambos os reatores as concentrações de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> efluentes variaram de 0 a 20 mg.L<sup>-1</sup>). Os autores ressaltaram algumas vantagens do modo de aeração contínuo em relação ao intermitente, dentre elas: (a) maior simplicidade do processo, uma vez que não demanda o ligamento/ desligamento de aeradores várias vezes ao dia ou a cada hora; (b) alta performance pode ser encontrada sob condições de aeração contínua uma vez que a atividade anammox simultânea à oxidação aeróbia da amônia, já é suficiente para consumir a maior parte do nitrito durante a aeração.

Yang *et al.* (2015) avaliaram a influência de diferentes estratégias de aeração na remoção de nitrogênio amoniacal em um biorreator de membrana (200 L de volume), contendo 40% de seu volume preenchido por meio suporte (*Kaldness carriers*) e tratando digestato de lodo de esgoto (contendo 980 mg.L<sup>-1</sup> de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e 681 mg.L<sup>-1</sup> de DQO). Os autores avaliaram as seguintes formas de aeração (aeração contínua, aeração intermitente com 45 min de aeração/ 15 min anóxico e aeração intermitente com 30 min aeração/ 30 min anóxico). As concentrações de oxigênio variaram de 1,5 até 3,5 mg.L<sup>-1</sup> no interior do reator. A condição que propiciou maior eficiência de remoção de nitrogênio total (88%) no reator foi a obtida durante a aplicação da estratégia de aeração intermitente com 45 min aeração/ 15 min anoxia, concentração de oxigênio igual a 3,5 mg.L<sup>-1</sup> e taxa de ar aplicada igual a 7 L.L<sub>reator</sub><sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.

Miao *et al.* (2016b) avaliaram a diferença entre a aeração contínua (com concentração de oxigênio dissolvido variando entre 0,17 e 0,27 mg.L<sup>-1</sup>) e intermitente (com ciclos de 7 minutos de aeração e 21 minutos de anoxia, com concentrações de oxigênio dissolvido próximas a 0,5 mg.L<sup>-1</sup>) no tratamento de esgoto doméstico contendo de 51 a 67 mg.L<sup>-1</sup> N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, em um RBS de 10L de volume. Diferentes tempos de retenção de sólidos (TRS) também foram avaliados nesse experimento (40, 50, 80 e 100 dias). Os autores apontaram a aeração intermitente aliada ao TRS igual a 80 dias como a melhor estratégia avaliada, uma vez que baixas concentrações de nitrogênio na forma de nitrato foram encontradas no efluente (1,49 mg.L<sup>-1</sup>) e uma eficiência média de remoção de nitrogênio total igual a 77% foi alcançada, resultando em concentrações efluentes menores que 20 mg.L<sup>-1</sup> de nitrogênio total.

Aeração intermitente foi avaliada como sendo a melhor estratégia também por Zhang *et al.* (2017b). Quatro frascos de 1,5 L de volume inoculados com biomassa oriunda de um RBS CANON de 13 L foram utilizados. Todos os reatores foram alimentados com meio de cultura mineral e autotrófico contendo 280 mg.L<sup>-1</sup> de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e cada reator submetido à uma estratégia

de aeração distinta: (i) aeração contínua; (ii) 0,5h aeração/ 0,5h de anoxia; (iii) 1h aeração/ 1h anoxia e (iv) 1h aeração/0,5h anoxia. A duração dos testes foi igual a 450 minutos. As estratégias i e iii resultaram em melhores eficiências de remoção de nitrogênio total (65%) e foram encontradas taxas de produção de nitrato por consumo de amônia próximas à relatada para o processo de NP/A (iguais a 0,15 e 0,12, para as estratégias i e iii, respectivamente). Entretanto, a estratégia iii foi considerada pelos autores como sendo a melhor já que com a aeração intermitente há um menor gasto energético em relação à aeração contínua.

Além das estratégias de aeração é possível citar outros fatores que podem ser controlados para que o processo de nitrificação parcial juntamente com o processo anammox ocorra. Um deles é a temperatura de operação dos reatores. Reatores que operam com temperaturas maiores que 20 °C favorecem o crescimento de BOA, em detrimento de BON. Reatores do tipo SHARON são operados em temperaturas elevadas com objetivo de reduzir a oxidação do nitrito a nitrato por BON (HELLINGA *et al.*, 1998). O Tempo de retenção de sólidos (TRS) é outro fator que pode influenciar a eficiência dos processos de nitrificação parcial e anammox. Uma vez que BOA crescem mais rapidamente do que BON, um TRS curto pode favorecer a lavagem de BON do reator, favorecendo a permanência de BOA (HELLINGA *et al.*, 1998). Em contrapartida, bactérias anammox possuem taxa de crescimento dez vezes menor do que BOA e BON e por esse motivo, há necessidade de reter grande quantidade de biomassa, evitando perdas, para que as bactérias anammox não sejam lavadas do reator (OKHRAVI, 2015).

Outro fator que afeta consideravelmente a atividade de bactérias anammox é a presença de matéria orgânica. No item 2.6.3.3, este tema será discutido com maior nível de detalhes.

## **2.6 Comunidades microbianas em reatores anammox**

Em reatores anammox vários grupos microbianos distintos se desenvolvem e estão interligados por meio de múltiplos processos enzimáticos. Compreender a estrutura, as funções e a dinâmica das comunidades microbianas nestes processos biotecnológicos têm sido o objeto de vários estudos e o conhecimento destes fatores pode auxiliar na otimização de tais sistemas (COSTA *et al.*, 2014; GONZALEZ-GIL *et al.*, 2015a; GONZALEZ-MARTINEZ *et al.*, 2015b; ISANTA *et al.*, 2015). Por exemplo, a compreensão sobre quais os grupos de micro-organismos se desenvolvem a partir de inóculos diferentes em reatores anammox, pode ajudar na escolha de inóculos para a partida de novos reatores. Além disso, o conhecimento sobre como as comunidades microbianas mudam, de acordo com alterações no modo de operação do reator pode auxiliar a determinar a melhor estratégia de operação para se obter uma melhor eficiência

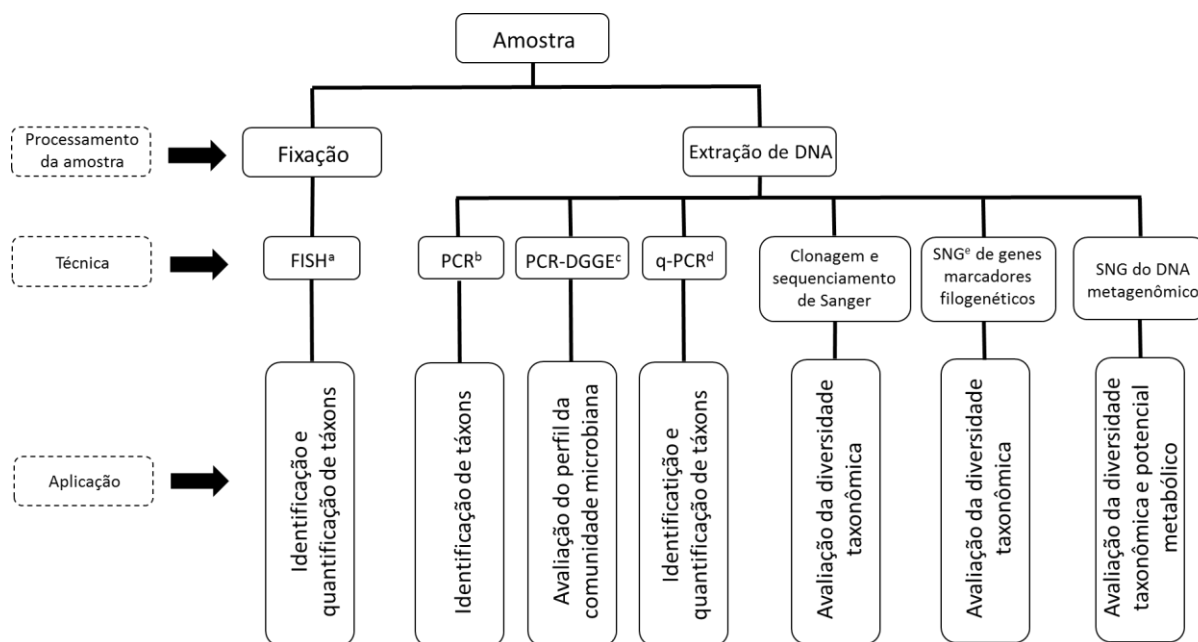
do processo. Ou ainda, entender como substâncias consideradas inibitórias para o processo anammox atuam, modificando a estrutura da comunidade microbiana desses reatores pode ajudar a entender porque o reator funciona mal quando submetido à efluentes contendo tais substâncias inibidoras.

Para o estudo de comunidades microbianas em reatores anammox, várias técnicas baseadas em biologia molecular, têm ganhado destaque e são consideradas importantes ferramentas para identificar os micro-organismos e compreender suas funções nestes ambientes. De acordo com as perguntas a serem respondidas, as técnicas moleculares são selecionadas e os resultados obtidos, aliados a dados físico-químicos podem auxiliar a elucidar uma série de questões.

### **2.6.1 Técnicas moleculares utilizadas para o estudo de comunidades microbianas em reatores anammox**

Há atualmente, diferentes técnicas moleculares disponíveis para utilização. A seleção da técnica a ser utilizada depende do objetivo que se deseja alcançar: O objetivo do estudo pode ser, por exemplo: (i) identificar os micro-organismos presentes nos reatores; (ii) quantificar grupos específicos de micro-organismos nos reatores; (iii) avaliar a dinâmica da comunidade microbiana ao longo do tempo, ou mesmo se o perfil desta comunidade se modifica, mediante à diferentes condições operacionais ou a condições de estresse; (iv) estudar a função específica de determinado grupo microbiano dentro de uma comunidade em um ecossistema complexo.

As principais técnicas que vêm sendo utilizadas para o estudo de comunidades microbianas em reatores anammox são apresentadas na Figura 2.6. Suas potenciais aplicações são também indicadas.



**Figura 2.6** - Principais técnicas moleculares utilizadas em estudos de comunidades microbianas em reatores anammox e suas potenciais aplicações. (a) FISH: Hibridação *in situ* Fluorescente; (b) PCR: Reação em cadeia da Polimerase; (c) PCR-DGGE: Reação em cadeia da polimerase seguida pela eletroforese em gel de gradiente desnaturante; (d) qPCR: PCR quantitativo; (e) SNG: Sequenciamento de nova geração.

Dentre as técnicas apontadas, destacam-se as novas tecnologias de sequenciamento, chamadas de sequenciamento de nova geração (SNG), que tem revolucionado as ciências biológicas e evoluído cada vez mais, superando algumas das principais limitações da técnica de clonagem e sequenciamento de Sanger. O SNG proporciona maior rapidez, menor custo por par de base sequenciada e alto rendimento. Além disso, tem possibilitado a recuperação de milhares de sequências a partir de amostras complexas, como amostras ambientais, simultaneamente e em um curto período de tempo, gerando uma grande quantidade de dados que podem ser utilizados para avaliar a biodiversidade de determinado ambiente e para compreender fenótipos cada vez mais complexos (GOODWIN *et al.*, 2016; SHOKRALLA *et al.*, 2012).

A partir da comparação das sequências obtidas, as quais são agrupadas em OTUs (Unidades taxonômicas operacionais, do inglês, *Operational taxonomic unit*), com sequências de organismos conhecidos disponíveis em bases de dados, táxons presentes em um ambiente podem ser identificados. Diversas ferramentas de bioinformática estão disponíveis para serem empregadas na análise do vasto número de informações fornecidas pelas plataformas de SNG, permitindo inferir a biodiversidade do ambiente por meio de índices ecológicos e agrupar

táxons utilizando uma combinação de técnicas de agrupamento e análises filogenéticas (CABEZAS *et al.*, 2015; SCHUSTER, 2008; SHOKRALLA *et al.*, 2012).

Atualmente, muitas plataformas de SNG estão sendo comercializadas, como a plataforma de Pirosequenciamento 454 da Roche (GS FLX, GS FLX+, GS júnior), Sequenciadores Illumina (MiSeq, HiSeq 2000, HiSeq1000 e GA IIx), AB SOLiD system, Ion Torrent e Helicos Heliscope. Cada plataforma apresenta vantagens e desvantagens. Por exemplo, o pirosequenciamento 454 pode produzir sequências de tamanho maior (400-800 pb) se comparado às plataformas da Illumina (50-200 pb). Em contrapartida, um maior número de sequências é obtido por meio da plataforma Illumina (até  $6 \times 10^9$  sequências/corrída utilizando a plataforma Illumina HiSeq 2000), em relação ao pirosequenciamento 454 ( $1 \times 10^6$  sequências/corrída) (CABEZAS *et al.*, 2015; GOODWIN *et al.*, 2016; SHOKRALLA *et al.*, 2012). Portanto, antes de escolher a plataforma a ser utilizada é necessário avaliar se o que se deseja obter como resultado é uma maior quantidade de sequências, e conseqüentemente, uma maior cobertura da diversidade microbiana ou sequências de tamanho maiores, que fornecem maior acurácia na anotação de genomas (CABEZAS *et al.*, 2015).

O SNG tem permitido, além da avaliação da diversidade taxonômica presente no ambiente, por meio do sequenciamento de marcadores filogenéticos como o gene RNAr 16S, a avaliação do potencial metabólico do ambiente, por meio do sequenciamento do DNA metagenômico (SIMON e DANIEL, 2011; SU *et al.*, 2012).

## **2.6.2 Diversidade microbiana em reatores anammox**

Em reatores anammox, além de micro-organismos deste grupo, podem estar presentes uma ampla gama de outros grupos microbianos, fazendo destes ambientes ecossistemas complexos. Com o surgimento das técnicas de SNG o número de trabalhos que realizam a caracterização da comunidade microbiana total desses reatores tem aumentado consideravelmente, permitindo identificar outros grupos microbianos e não somente bactérias anammox ou micro-organismos do ciclo do nitrogênio, como era o foco dos trabalhos anteriores à essa técnica. Entretanto, destaca-se que, em sua maioria, estes estudos têm sido realizados em reatores de escala laboratorial, sendo poucos ainda os estudos de comunidades em reatores que operam em escala plena.

### 2.6.2.1 Diversidade de bactérias ‘não anammox’ em reatores anammox

Estudos que realizaram a caracterização da comunidade microbiana em reatores anammox detectaram uma grande diversidade de micro-organismos ‘não-anammox’ além de bactérias deste grupo. Curiosamente, alguns grupos em particular têm sido frequentemente encontrados nestes reatores, o que sugere que os mesmos podem exercer papéis importantes para o equilíbrio desses sistemas. A Tabela 2.6 apresenta os grupos microbianos mais frequentemente encontrados (pesquisados por meio de técnicas de SNG e clonagem e sequenciamento) em reatores anammox com características operacionais diversas (inóculos e configurações operacionais distintas, tratando diferentes efluentes e com concentrações variáveis de nitrogênio amoniacal afluentes).

Observa-se que bactérias pertencentes aos filos Proteobacteria e Chloroflexi estão sempre presentes em reatores anammox juntamente com o filo Planctomycetes. De maneira recorrente, micro-organismos incluídos nos filos Acidobacteria, Chlorobi e Bacteroidetes e também têm sido encontrados (Tabela 2.6).

**Tabela 2.6 - Diversidade microbiana em reatores anammox**

Inóculo	Configuração do reator	Tipo de efluente	Concentração de amônia afluente (mg.L <sup>-1</sup> )	Diversidade microbiana (abundância relativa na biblioteca genômica) <sup>a</sup>	Gêneros/ espécies de anammox (% em relação ao total de <i>Planctomycetes</i> )	Técnica	Referência
Lodo de estação de tratamento de efluentes domésticos	Reator de fluxo ascendente e leito granular	Efluente sintético	100-300	Chloroflexi (34,5%) Planctomycetes (33,5%) Proteobacteria (22,9%) Bacteroidetes (2,1%) Acidobacteria (2,1%)	<i>Ca. Brocadia</i> anammoxidans (100%)	Clonagem e sequenciamento <sup>b</sup>	Cho <i>et al.</i> (2010)
Lodo de <i>wetlands</i> tratando esgoto doméstico	Reator anaeróbio de leito fixo e fluxo ascendente	Efluente sintético	30-110	Proteobacteria (21,0%) Chloroflexi (17,0%) Planctomycetes (11,0%) Acidobacteria (8,8%) GN04 (5,7%) Chlorobi (5,2%) Nitrospirae (0,3%)	<i>Ca. Brocadia</i> (100%)	Pirosequenciamento 454 <sup>c</sup>	Costa <i>et al.</i> (2014)
Lodo de lagoa aerada tratando efluente de refinaria de petróleo	Reator anaeróbio de leito fixo e fluxo ascendente	Efluente sintético	30-110	Planctomycetes (21,0%) Proteobacteria (16,0%) Chloroflexi (17,0%) Acidobacteria (19,0%) GN04 (8,5%) Chlorobi (1,6%) Nitrospirae (2,1%)	<i>Ca. Brocadia</i> (71,5%)	Pirosequenciamento 454 <sup>c</sup>	Costa <i>et al.</i> (2014)
Lodo ativado de estação de tratamento de efluentes domésticos	Reator em batelada sequencial (RBS)	Efluente sintético	30-175	Proteobacteria (24,6%) Planctomycetes (17,4%) Chloroflexi (15,7%) GN04 (15,2%) Acidobacteria (2,6%) Firmicutes (2,0%) Bacteroidetes (0,1%) Nitrospirae (0,1%)	<i>Ca. Brocadia</i> (82,5%); <i>Ca. Jettenia</i> (0,02%)	Pirosequenciamento 454 <sup>c</sup>	Pereira <i>et al.</i> (2014)
Lodo ativado de estação de tratamento de efluentes domésticos	Reator anaeróbio de fluxo ascendente	Efluente sintético	380	Chlorobi (38,0%) Chloroflexi (21,3%) Proteobacteria (11,0%) Planctomycetes (10,2%) Bacteroidetes (5,5%)	<i>Ca. Kuenenia stuttgartiensis</i> (84,6%).	Clonagem e sequenciamento <sup>d</sup>	Li <i>et al.</i> (2009)

Inóculo	Configuração do reator	Tipo de efluente	Concentração de amônia afluente (mg.L <sup>-1</sup> )	Diversidade microbiana (abundância relativa na biblioteca genômica) <sup>a</sup>	Gêneros/ espécies de anammox (% em relação ao total de <i>Planctomycetes</i> )	Técnica	Referência
Lodo nitrificante	Reator anaeróbio de fluxo ascendente	Efluente proveniente da digestão de lodo de ETE pré- tratado em reator SHARON	1.200	Planctomycetes: Brocadiaceae (32,0%) Proteobacteria: Rhodocyclaceae (9,0%) Commamonadaceae (3,0%) Chloroflexi: Anaerolinea (7,0%) Chlorobi: Ignavibacteria (18,0%)	<i>Ca. Brocadia</i> (99%)	Pirosequenciamento 454 <sup>e</sup>	Gonzalez-Gil <i>et al.</i> (2015)
Lodo de estação de tratamento de esgoto	Reator de leito fixo com meio suporte ( <i>nonwoven carriers</i> ) e fluxo ascendente e contínuo	Efluente sintético	37-440	Planctomycetes: bactéria anammox (%NI) Chloroflexi não cultivado (% NI) Firmicutes: <i>Bacillus</i> sp. (75,0%)	<i>Ca. Brocadia</i> anammoxidans (% NI)	Clonagem e sequenciamento <sup>f</sup>	Date <i>et al.</i> (2009)
Sedimento de rio	Reator anaeróbio de fluxo ascendente e biomassa granular	NI	NI	Planctomycetes: Bacteria anammox (~50,0%) Proteobacteria: <i>Ca. Methyloiridis oxyfera</i> (~6,0%); <i>Nitrosomonas</i> sp. (~6,0%); <i>Burkholderia</i> (% NI) Chloroflexi (% NI) Arqueia Metanogênica (% NI)	<i>Ca. Jettenia</i> asiática (% NI)	Pirosequenciamento 454 <sup>g</sup> .	Hu <i>et al.</i> (2012)
NI <sup>o</sup>	Reator em Batelada Sequencial (RBS)	Efluente sintético	250	Planctomycetes (46,0%) Proteobacteria: β-Proteobacteria (9,0%); Bactéria aeróbia oxidadora de amônia (6,0%); <i>Nitrosospira</i> (3,0%); <i>Dexia</i> (3,0%) Bacteroidetes: <i>Petrimonas</i> (2,0%)	<i>Ca. Brocadia</i> (99,0%) e <i>Ca. Kuenenia</i> (1,0%)	Pirosequenciamento 454 <sup>h</sup>	Isanta <i>et al.</i> (2015)
¼ de lodo anammox mais ¾ de lodo granular anaeróbio	Bioreator de membrana convencional, com membrana de fibra oca (cMBR)	Efluente sintético	125,8	Proteobacteria (18,0%) Planctomycetes (14,5%) Chloroflexi (% NA) Chlorobi (% NA) Bacteroidetes (% NA) Actinobacteria (% NA) Armatimonadetes (% NA) Nitrospirae (% NA)	<i>Ca. Kuenenia</i> (% NI) e <i>Ca. Jettenia</i> (% NI)	MiSeq Illumina <sup>i</sup>	Ren <i>et al.</i> (2015)

Inóculo	Configuração do reator	Tipo de efluente	Concentração de amônia afluente (mg.L <sup>-1</sup> )	Diversidade microbiana (abundância relativa na biblioteca genômica) <sup>a</sup>	Gêneros/ espécies de anammox (% em relação ao total de <i>Planctomycetes</i> )	Técnica	Referência
¼ de lodo anammox mais ¾ de lodo granular anaeróbico	Bioreator de membrana, com membrana de Tecido não tecido – <i>non woven fabric</i> (nMBR)	Efluente sintético	125,8	Proteobacteria (21,5%) Planctomycetes (18%) Chloroflexi (% NI) Chlorobi (% NI) Actinobacteria (% NI) Armatimonadetes (% NI) Bacteroidetes (% NI) Chloroflexi (% NI) Nitrospirae (% NI)	<i>Ca. Kuenenia</i> (% NI) e <i>Ca. Jettenia</i> (% NI)	MiSeq Illumina <sup>i</sup>	Ren <i>et al.</i> (2015)
Lodo nitrificante mais lodo anammox	Reator UASB	Efluente sintético	30-300	Proteobacteria (32,2%) Chloroflexi (29,1%) Bacteroidetes (9,9%) Chlorobi (9,5%) Planctomycetes (8,4%) Acidobacteria (4,5%) Actinobacteria (2,8%) Nitrospirae (0,05%)	<i>Ca. Brocadia</i> (28,2%) <i>Ca. Kuenenia</i> (0,4%)	MiSeq Illumina <sup>j</sup>	Cao <i>et al.</i> (2016a)
Lodo ativado	Reator para fermentação, desnitrificação e anammox (SFDA)	Esgoto doméstico pré-tratado em RBS para nitrificação parcial	0.5–25	Proteobacteria (70,4%) Planctomycetes (0,3%) Chlorobi (%NI) Chloroflexi (%NI) Bacteroidetes (%NI) Acidobacteria (%NI) Candidate_division_OP3 (%NI) Elusimicrobia (%NI) Verrucomicrobia (%NI)	<i>Ca. Anammoxomicrobium</i> (% NI)	MiSeq Illumina <sup>k</sup>	Wang <i>et al.</i> (2016a)
NI	Bioreator de membrana com biofilme (MBBR)	Efluente proveniente da digestão de lodo de ETE	45-500	Planctomycetes (~60,0%) Chloroflexi (~18,0%) Proteobacteria (~15,0%) Bacteroidetes (%NI) Acidobacteria (%NI) Chlorobi (%NI) Actinobacteria (%NI)	<i>Ca. Brocadia</i> sp.40 (49-56%) <i>Ca. Brocadia fulgida</i> (0,64-1,27%)	MiSeq Illumina <sup>l</sup>	Persson <i>et al.</i> (2017)

Inóculo	Configuração do reator	Tipo de efluente	Concentração de amônia afluente (mg.L <sup>-1</sup> )	Diversidade microbiana (abundância relativa na biblioteca genômica) <sup>a</sup>	Gêneros/ espécies de anammox (% em relação ao total de <i>Planctomycetes</i> )	Técnica	Referência
Lodo ativado	Reator em batelada sequencial com biofilme (RBSB)	Efluente sintético	310-2.400	Proteobacteria (>50,0%) Bacteroidetes (14,3%) Acidobacteria (19,7%) Planctomycetes (%NI) Chloroflexi (%NI) Chlorobi (%NI) Nitrospirae (%NI) Firmicutes (%NI)	NI	Pirosequenciamento 454 <sup>d</sup>	Zhang <i>et al.</i> (2014)
Lodo anammox	Bioreator de membrana (MBR)	Efluente sintético	820	Planctomycetes (75,3%) Bacteroidetes (8,2%) Proteobacteria (5,1%) Firmicutes (4,0%) Cyanobacteria (2,6%) Chlorobi (1,2%) Acidobacteria (0,9%) Chloroflexi (0,8%) Fibrobacteres (0,7%) Verrucomibrobia (0,7%)	<i>Ca. Brocadia</i> sp. (99,85%)	Pirosequenciamento 454 <sup>m</sup>	Gonzalez-Martinez <i>et al.</i> (2015c)
Lodo anammox	Reator em batelada sequencial (RBS)	Efluente proveniente da digestão de lodo de ETE pré-tratado em reator para nitrificação parcial		Proteobacteria (19,9%) Planctomycetes (7,9%) Chlorobi (28,7%) Chloroflexi (17,5%) Acidobacteria (8,9%) Bacteroidetes (7,3%) Candidato a Divisão TM7 (5,8%)	<i>Ca. Brocadia</i> (%NI)	Pirosequenciamento 454 <sup>n</sup>	Dosta <i>et al.</i> , (2015)

<sup>a</sup> Abundância relativa em relação ao número total de clones obtidos quando a técnica utilizada foi clonagem e sequenciamento de Sanger ou abundância relativa em relação ao número total de sequências quando a técnica utilizada foi o SNG; <sup>b</sup> PCR foi realizado utilizando os iniciadores 27F e 1492R para RNAr 16S de bactérias; <sup>c</sup> PCR foi realizada utilizando os iniciadores 563F e 802R para a região V4 do RNAr 16S de bactérias; <sup>d</sup> Iniciadores não informados; <sup>e</sup> PCR foi realizado utilizando iniciadores 519F e 1017r para o RNAr 16S de bactérias; <sup>f</sup> PCR foi realizado utilizando iniciadores Eub341f e Eub926r para o RNAr 16S de bactérias; <sup>g</sup> Iniciadores utilizados não informados; <sup>h</sup> PCR foi realizado utilizando os iniciadores 530F e 1100R para o RNAr 16S de bactérias; <sup>i</sup> Iniciadores utilizados não informados; <sup>j</sup> PCR foi realizado utilizando os iniciadores 515F e 907R para a região v4 do RNAr 16S de bactérias; <sup>k</sup> PCR foi realizado utilizando os iniciadores 515F and 907R; <sup>l</sup> PCR foi realizado utilizando os iniciadores 515F e 806R para a região V4 do RNAr 16S de bactérias; <sup>m</sup> PCR foi realizado utilizando os iniciadores 530F e 1100R para a região V4, V5 e V6 do RNAr 16S de bactérias; <sup>n</sup> PCR foi realizado utilizando os iniciadores 27F e 519R para a região Vi-V3 do RNAr 16S de bactérias; <sup>o</sup>NI: Não informado.

O filo Proteobacteria é o maior e mais diverso grupo dentro do domínio *Bacteria*. Todos os micro-organismos presentes nesse grupo são gram-negativos e exibem uma diversidade muito ampla de mecanismos de produção de energia, contendo espécies quimiolitotróficas, quimiorganotróficas e fototróficas. Possuem fisiologia diversa, incluindo formas anaeróbias, microaerófilas e aeróbias facultativas. Quanto à morfologia, também é muito variável entre as diferentes espécies, podendo possuir formas de bacilos retos e curvos, cocos, espirilos e formas com brotamento e apendiculadas (MADIGAN *et al.*, 2010). É importante ressaltar que dentro deste filo, encontram-se alguns micro-organismos capazes de realizar desnitrificação heterotrófica, como os que pertencem às ordens Rodhospirillales, Rhodocyclales, Pseudomonadales e Rhizobiales os quais têm sido encontrados frequentemente em reatores anammox (CAO *et al.*, 2016a; CHO *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2014; GONZALEZ-GIL *et al.*, 2015; HU *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2016).

Dentre os gêneros de bactérias desnitrificantes que podem realizar a desnitrificação heterotrófica é possível citar *Denitratisoma*, *Thauera*, *Dechloromonas*, *Bradyrhizobium*, *Rhodoplanes*, *Pseudomonas*, entre outros (CAO *et al.*, 2016a; COSTA *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2016). A presença de bactérias desnitrificantes heterotróficas em reatores anammox pode afetar consideravelmente o processo uma vez que esses micro-organismos podem competir com bactérias anammox, que são autotróficas, pelo aceptor de elétrons  $\text{NO}_2^-$ , que é comumente utilizado por ambos grupos microbianos. Como as bactérias heterotróficas são capazes de crescer mais rapidamente em relação às autotróficas, acabam por eliminar as bactérias anammox na competição, inibindo dessa maneira, sua atividade (MOLINUEVO *et al.*, 2009). Vários experimentos foram conduzidos para investigar a interação entre a desnitrificação heterotrófica e a oxidação anaeróbia de amônia em reatores anammox tratando águas residuárias contendo nitrogênio amoniacal e matéria orgânica. Águas residuárias contendo relações DQO/N entre 1,4 e 6,0 foram capazes de inibir a atividade anammox, reduzindo a eficiência de remoção de amônia e afetando a comunidade microbiana desses reatores. De maneira geral, águas residuárias com elevada relação DQO/N favorecem o crescimento de bactérias desnitrificantes e inibem o crescimento de bactérias anammox (Tabela 2.8, item 2.6.3.3) (DU *et al.*, 2014; JENNI *et al.*, 2014; LEAL *et al.*, 2016; MOLINUEVO *et al.*, 2009; NI *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2015). As bactérias desnitrificantes podem também utilizar o nitrato, que é sempre produzido durante a reação anammox (GONZALEZ-GIL *et al.*, 2015). Em estudo conduzido por Jenni *et al.* (2014) observou-se que o aumento da razão DQO/N aplicada a um RBS anammox usado para o tratamento de digestato de lodo de esgoto afetou positivamente a remoção de nitrogênio total. Nesse caso, o aumento da carga orgânica aplicada

permitiu maior desnitrificação do nitrato produzido pelas bactérias anammox. Assim, a combinação de bactérias heterotróficas e anammox no mesmo reator em alguns casos pode ser benéfica para o tratamento de águas residuárias, uma vez que pode melhorar a remoção de nitrogênio e, adicionalmente, remover matéria orgânica.

Bactérias aeróbias oxidadoras de amônia (BOA), também pertencem ao filo Proteobacteria e são frequentemente encontradas em reatores anammox (EGLI *et al.*, 2003; HU *et al.*, 2012; ISANTA *et al.*, 2015; WANG. *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2014). Nos sistemas em que a nitrificação parcial e o processo anammox ocorrem simultaneamente, BOA desempenham um papel fundamental convertendo a amônia parcialmente à nitrito, fazendo com que o nitrito esteja disponível para que aconteça a oxidação anaeróbia da amônia (WANG *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2014). No entanto a presença de BOA em alguns reatores anaeróbios também já foi relatada. Isanta *et al.* (2015) identificaram a presença de *Nitrosomonas*, *Nitrospira* e *Nitrosococcus* em um reator anammox mesmo quando esses micro-organismos encontravam-se inativos. Da mesma forma, *Nitrospira* também foi detectada em um bioreator de membrana operado sob condições anaeróbias por (GONZALEZ-MARTINEZ *et al.*, 2015b). Verificou-se que algumas cepas de *Nitrosomonas* e *Nitrospira* podem desenvolver um metabolismo anaeróbio chamado desnitrificação nitrificante, que está relacionado com a formação de óxido nítrico em condições anaeróbias ou microaeróbias (GONZALEZ-MARTINEZ *et al.*, 2015b; SHAW *et al.*, 2006). *Nitrosomonas eutropha* e *Nitrosomonas europaea* têm sido relatadas por Li *et al.* (2009) e Zhang *et al.* (2014) como micro-organismos que podem ter baixo nível de atividade anaeróbia de oxidação de amônia, usando o dióxido de nitrogênio como acceptor de elétrons.

Bactérias do filo Nitrospirae são também encontradas em reatores anammox (CAO *et al.*, 2016a; COSTA *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2014; REN *et al.*, 2015). Estes micro-organismos são anaeróbios e oxidam nitrito a nitrato. Quando se utiliza a nitrificação parcial e anammox para o tratamento de efluentes é desejável que este grupo de bactérias seja inibida, uma vez que bactérias oxidadoras de nitrito (BON) como *Nitrospira* competem com bactérias anammox por nitrito (VAN DER STAR *et al.*, 2007; WETT, 2006). Por esse motivo, estratégias que tem como objetivo controlar as populações de BON em reatores para NP/A tem sido usadas, dentre elas, a operação desses reatores com baixas concentrações de oxigênio dissolvido e a aeração intermitente podem ser mencionadas, visto que BON tem menor afinidade pelo oxigênio em relação à BOA (MIAO *et al.*, 2016; WANTAWIN *et al.*, 2008).

Além dos estudos visando o sequenciamento do RNAr 16S da comunidade microbiana, por meio do metagenoma é possível detectar genes funcionais envolvidos no ciclo do nitrogênio em reatores anammox. Estudo realizado por Gonzalez-Gil *et al.* (2015) recuperou sequências de vários genes funcionais envolvidos no ciclo do nitrogênio em grânulos retirados de um reator anammox em escala real. Foram observadas várias sequências associadas a enzimas relacionadas ao ciclo do nitrogênio, sendo que as mais abundantes foram as relacionadas à desnitrificação, redução de  $\text{NO}_2^-$  e amonificação com algumas sequências relacionadas à assimilação de  $\text{NH}_4^+$ . Algumas sequências específicas relacionadas ao metabolismo de bactérias anammox (hidrazina oxidoreadutase e enzima oxidadora de hidrazina) também foram recuperadas a partir dos dados metagenômicos.

A maioria dos estudos que realizaram a caracterização da comunidade microbiana geral de reatores anammox, observaram a coexistência de micro-organismos do filo Chloroflexi com bactérias anammox (Tabela 2.6). A ecofisiologia desse grupo de micro-organismos é ainda desconhecida e existem poucos estudos sobre o papel dos mesmos em reatores anammox. O fato de existirem poucos micro-organismos deste grupo isolados, contribui para a falta de dados fisiológicos relacionados aos exemplares deste grupo microbiano. Por esse motivo, ainda não é possível afirmar com segurança qual o papel estes micro-organismos exercem nos reatores em que são frequentemente encontrados. Apesar disso, resultados de alguns trabalhos indicam que bactérias do filo Chloroflexi podem atuar na degradação de produtos microbianos em biofilmes nitrificantes autotróficos e biorreatores de membrana (KINDAICHI *et al.*, 2004; MIURA *et al.*, 2007; OKABE *et al.*, 2005). Da mesma forma, em reatores anammox, estudos mostraram que estes micro-organismos podem utilizar compostos e metabólitos derivados de células microbianas mortas (KINDAICHI *et al.*, 2012). Bactérias deste filo podem também auxiliar no processo de granulação do lodo em reatores anammox, formando a estrutura inicial dos grânulos, servindo como núcleo ou suporte para a adesão de outros micro-organismos (CAO *et al.*, 2016a). Alguns dos gêneros de Chloroflexi encontrados em reatores anammox são as bactérias filamentosas *Anaerolinea*, *Caldilinea* e *Longilinea* (CAO *et al.*, 2016a; DOSTA *et al.*, 2015; GONZALEZ-GIL *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2014).

O filo Chlorobi é constituído por bactérias verdes sulfurosas, que realizam o processo anaeróbico e fototrófico da oxidação de sulfeto ( $\text{H}_2\text{S}$ ) à enxofre elementar ( $\text{S}^0$ ), com redução de  $\text{CO}_2$ . Embora ainda não tenha sido relatado na literatura o papel desses organismos em reatores anammox, onde têm sido frequentemente encontrados (COSTA *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2014; REN *et al.*, 2015), é sugerido que a presença desses micro-organismos

pode ser benéfica, uma vez que consomem sulfeto, composto que causa efeito tóxico à bactérias anammox em baixas concentrações, 1 a 2 mM (Dapena-Mora *et al.*, 2007). Dentro do filo Chlorobi, o gênero *Ignavibacterium* tem sido frequentemente relatado como membro de comunidades microbianas de reatores anammox (DOSTA *et al.*, 2015; GONZALEZ-GIL *et al.*, 2015; GONZALEZ-MARTINEZ *et al.*, 2015b; ZHANG *et al.*, 2014). *Ignavibacterium* é conhecido como um micro-organismo quimioheterotrófico estritamente anaeróbio e por isso pode estar envolvido no metabolismo de compostos orgânicos em reatores anammox (LIU *et al.*, 2012). Em trabalho recente foi sugerido que esta bactéria é capaz de degradar proteínas acoplando a redução do nitrato à nitrito, o que seria muito interessante em um reator com atividade anammox, uma vez que esse micro-organismo poderia reciclar dois substratos essenciais para o desenvolvimento de bactérias anammox (amônio, a partir da degradação de aminoácidos e nitrito, a partir da redução do nitrato) (LAWSON *et al.*, 2017).

Bacteroidetes é um filo grande e diverso, constituído de alguns micro-organismos que possuem motilidade e habilidade de digerir macromoléculas (MCBRIDE e ZHU, 2013). Bacteroidetes ocupam as camadas externas dos grânulos e parecem formar teias que melhoram a estrutura dos mesmos (CAO *et al.*, 2016a). Estudo conduzido por Inoue *et al.* (2015) encontrou no genoma de oito gêneros de bactérias deste filo, pertencentes à ordem Bacteroidales, a presença de genes relacionados à fixação de nitrogênio (*nifH*, *nifK*, *nifD*, *nifK*, *nifE*, *nifN*, *nifB* e *nifA*). Isto indica que estes micro-organismos atuam no ciclo do nitrogênio. Os autores sugerem que outras bactérias deste filo, oriundas de ambientes diversos, que ainda não tiveram seu genoma sequenciado, possam ser micro-organismos diazotróficos (capazes de fixar N<sub>2</sub>). Entretanto, o papel de micro-organismos do filo Bacteroidetes em reatores anammox ainda não foi investigado. Gonzalez-Martinez *et al.* (2015b) relataram a presença de um membro do filo Bacteroidetes denominado *Sphingobacterium* em um MBR anammox tratando efluente sintético. Este micro-organismos pode realizar simultaneamente desnitrificação do nitrito e remoção de fósforo sob condições anóxicas (BAO *et al.*, 2012). Desta forma, eles também são potenciais competidores pelo nitrito com bactérias anammox. Por outro lado, podem remover fosfato que é comumente encontrado em efluentes e pode exercer efeito tóxico sobre as bactérias anammox, como já foi demonstrado por alguns pesquisadores (CARVAJAL-ARROYO *et al.*, 2013; DAPENA-MORA *et al.*, 2007; VAN DE GRAAF *et al.*, 1996).

A presença de bactérias do filo Acidobacteria tem sido também reportada em reatores anammox (CHO *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2014). As acidobactérias são heterotróficas capazes de utilizar uma ampla gama de substratos como açúcares, aminoácidos, álcoois e metabólitos

intermediários. Também têm a habilidade de degradar compostos complexos como xilano, hemicelulose, pectina amido e quitina (WARD *et al.*, 2009).

#### 2.6.2.2 Diversidade de arqueias em reatores anammox

Embora a maioria dos trabalhos tenham como objetivo a investigação de comunidades bacterianas, alguns estudos tiveram como alvo a caracterização da comunidade de arqueias em reatores anammox.

Por meio de análise metagenômica de lodo granular anammox em um reator em escala laboratorial, Hu *et al.* (2012) chamaram a atenção para a presença de genes relacionados à arqueias metanogênicas. A análise dos genes RNAr 16S sequenciados evidenciou que sequências relacionadas a um clone de arqueia metanogênica (JN836400) foram muito abundantes na biblioteca gênica, perdendo apenas para sequências do gene RNAr 16S da bactéria anammox *Ca. Jettenia*. O gene *mcrA*, que codifica a enzima metil M redutase, subunidade alfa, que é um marcador filogenético de arqueias metanogênicas, também foi detectado, e parece estar relacionado a *Methanothermobacter thermoautotrophicus* (91% de identidade a nível de aminoácido). Os autores sugeriram que esses micro-organismos ocupam espaço no interior dos grânulos anammox, formando juntamente com outros micro-organismos uma comunidade mutualista.

Gonzalez-Gil *et al.* (2015) estudando grânulos de um reator anammox em escala plena, verificaram por qPCR que as arqueias constituíam 2,9% dos procariotos neste reator. O pirosequenciamento 454 do gene RNAr 16S indicou que a maioria das arqueias presentes nestes grânulos estavam relacionadas ao gênero *Methanobacterium* (ordem Methanobacteriales) que é um metanogênico hidrogenotrófico, embora sequências relacionadas à metanogênicas acetoclásticas (Methanosarcinales) também tenham sido encontradas. Uma rede metabólica hipotética nos grânulos anammox deste reator foi proposta neste estudo, em que arqueias metanogênicas hidrogenotróficas exerceriam um papel benéfico para a comunidade microbiana como um todo, retirando o H<sub>2</sub> formado durante metabolismo fermentativo de outros micro-organismos presentes no grânulo anammox.

Em estudo recente, comunidades microbianas de três reatores anammox em escala plena (Reator de 2 estágios NP/A – Holanda, DEMON – Appeldorn e CANON – Olburgen) foram estudadas por qPCR, para avaliar a porcentagem de arqueias em relação aos procariotos. Os reatores que possuíam biomassa granular (NP/A e CANON), apresentaram menos arqueias

(1,44% e 0,37%, respectivamente) do que o reator DEMON, que possuía biomassa na forma de flocos (3,8%). Este estudo também avaliou a relação entre a abundância de arqueias e a eficiência de remoção de compostos nitrogenados e foi verificado que a eficiência dos sistemas em relação à remoção de nitrogênio é inversamente proporcional à abundância de arqueias na biomassa do reator, o que sugere que, um aumento no número de arqueias metanogênicas no reator pode produzir um decréscimo na atividade anammox e na remoção autotrófica de nitrogênio (GONZALEZ-MARTINEZ *et al.*, 2015a). Estes resultados contrariam a hipótese de que a presença de arqueias em reatores anammox seria benéfica para o processo (GONZALEZ-GIL *et al.*, 2015; HU *et al.*, 2012).

Ainda em estudo realizado por Gonzalez-Martinez *et al.* (2015a) sobre a comunidade de arqueias nos reatores anammox DEMON, 2 estágios NP/A e CANON, investigado por Pirosequenciamento 454, foi demonstrado uma predominância do gênero *Methanosaeta* (48,66%, 97,31% e 82,50% de abundância relativa em relação ao total de arqueias, respectivamente). *Methanosaeta* é um gênero de arqueias acetoclásticas, anaeróbias estritas e filamentosas que geralmente crescem como agregados formando flocos ou grânulos (GARCIA *et al.*, 2000), o que pode explicar seu crescimento em reatores anammox com biomassa suspensa. Este gênero de arqueias tem alta afinidade por acetato, sendo capaz de crescer em ambientes com baixa concentração deste substrato (JANG *et al.*, 2015), como é o caso dos reatores estudados. Como as arqueias metanogênicas são anaeróbias estritas e muito sensíveis à baixas concentrações de oxigênio (GARCIA *et al.*, 2000), é proposto que no interior dos grânulos em reatores anammox estes micro-organismos estariam protegidos da inibição por oxigênio, assim como como relatado por Hu *et al.* (2012). É sabido que em presença de aceptores de elétrons como  $O_2$ ,  $NO_2^-$ ,  $NO_3^-$ , que são comumente encontrados em reatores anammox dificilmente arqueias metanogênicas podem competir. Nesse sentido, a atividade de arqueias metanogênicas em reatores anammox estaria restrita às camadas interiores da biomassa, no interior dos grânulos, onde, devido ao gradiente de difusão dos nutrientes, este acceptor de elétrons não estaria presente (GONZALEZ-MARTINEZ *et al.*, 2015a).

Apesar de trabalhos recentes demonstrarem que as arqueias estão presentes em reatores anammox, mais estudos são ainda necessários para desvendar se estes micro-organismos estão exercendo algum papel significativo nestes ambientes e qual a relação dos mesmos com os outros grupos microbianos presentes.

### **2.6.3 Fatores que afetam a composição da comunidade microbiana em reatores anammox**

É esperado que os grupos microbianos a se desenvolverem em reatores anammox sejam dependentes das condições operacionais destes sistemas, bem como da disponibilidade de doadores e aceptores de elétrons existentes no meio. Entretanto, o lodo de inóculo a ser utilizado pode também influenciar no desenvolvimento desta comunidade, uma vez que uma série de grupos microbianos autóctones deste lodo podem sobreviver às condições a que os reatores anammox são submetidos. Além disso, o modo de crescimento da biomassa, parece também ter influência na composição e estrutura da comunidade microbiana em reatores anammox. A presença de alguns compostos, como matéria orgânica, que geralmente está presente nos efluentes é outro fator que pode favorecer o crescimento de determinados grupos de microorganismos em detrimento de outros, influenciando a comunidade microbiana de reatores anammox.

#### **2.6.3.1 Influência do inóculo na composição da comunidade microbiana de reatores anammox**

Um aspecto que pode afetar diretamente a comunidade microbiana em reatores anammox é o tipo de inóculo utilizado para a partida dos reatores. Um dos grandes desafios para a implementação do processo anammox em larga escala é a prática predominante de inoculação dos reatores anammox em escala plena. Em regiões em que o processo é bem estabelecido, como na Europa, por exemplo, é prática comum partir de biomassa anammox previamente enriquecida para dar partida em novos reatores. Entretanto, essa prática torna-se difícil em países em que o processo anammox ainda não é utilizado em larga escala. Por esse motivo, esforços no sentido de enriquecer biomassa anammox a partir de um inóculo proveniente de outros sistemas são ainda necessários. Lodos obtidos de diferentes sistemas de tratamento de efluentes têm sido utilizados com sucesso para o enriquecimento de bactérias anammox. Biomassa proveniente de reatores UASB, sistemas de lodos ativados tratando efluente de lixiviados de aterros de resíduos perigosos e de sistemas de tratamento de esgotos domésticos, de sistemas de *wetlands* construídos e de lagoas aeróbias tratando efluente de refinaria de petróleo já foram utilizadas como inóculo para a partida de reatores anammox (ARAUJO *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2014; DATE *et al.*, 2009; JETTEN *et al.*, 2009; PARK *et al.*, 2010).

Costa *et al.* (2014) estudaram as diferenças entre comunidades microbianas desenvolvidas em dois reatores anammox de fluxo ascendente e contínuo (2 L de volume), com meio suporte, alimentados com efluente sintético e inoculados com dois tipos de lodos distintos: (I) reator inoculado com lodo proveniente de sistema de *wetlands* construídos tratando esgoto doméstico

e (II) reator inoculado com lodo proveniente de lagoa aerada tratando efluente de refinaria de petróleo. Por meio da clonagem e sequenciamento do gene RNAr 16S de bactérias anammox, foi possível detectar diferenças entre os dois inóculos utilizados em termos de composição e dominância de bactérias anammox. No lodo de *wetland*, dominou o filotipo *Candidatus Brocadia*, enquanto no lodo da lagoa foram encontrados três gêneros de bactérias anammox *Candidatus Anammoxoglobus*, *Candidatus Brocadia* e *Candidatus Kuenenia*, com alta dominância dos dois primeiros gêneros. Após 440 dias de operação, amostras da biomassa cultivada nos reatores a partir dos diferentes inóculos foram analisadas por pirosequenciamento. Os filos dominantes em ambos os reatores foram Proteobacteria, Planctomycetes, Chloroflexi e Acidobacteria. Entretanto, alguns gêneros de micro-organismos foram encontrados apenas no reator I (*Bosea*, *Deinococcus*, *Planctomyces* e *Prostheco bacter*) enquanto outros gêneros foram encontrados apenas no Reator II (*Desulfococcus*, *Rhodoplanes* e *Treponema*). Os autores atribuíram as diferenças entre as comunidades microbianas desenvolvidas nos reatores ao tipo de inóculo utilizado. Uma das evidências foi a presença do microrganismo *Desulfococcus* (micro-organismos capaz de degradar compostos aromáticos) somente no reator inoculado com o lodo da lagoa aerada da refinaria de petróleo. Com relação às bactérias anammox, apenas sequências do gênero *Ca. Brocadia* foram recuperadas por pirosequenciamento (10,9 % e 14,7 % do total de sequências, no reator I e II, respectivamente) após 440 dias de operação.

Date *et al.* (2009) avaliando inóculos distintos para o enriquecimento de bactérias anammox por meio da clonagem e sequenciamento do gene RNAr 16S desses micro-organismos, produziram biomassa com predominância de bactérias anammox de gêneros distintos. Três inóculos foram testados neste estudo, sendo: (A) lodo de estação de tratamento de esgoto doméstico; (B) lodo de digestor anaeróbio e (C) lodo nitrificante, de tanque utilizado para tratamento de efluente de suinocultura. Os três tipos de inóculos foram cultivados em reatores cilíndricos de leito fixo (*non woven carriers* como meio suporte) de fluxo ascendente e contínuo. No reator em que foi utilizado o inóculo A observou-se a presença de bactérias anammox do gênero *Ca. Brocadia fulgida* e *Ca. Brocadia anammoxidans*, enquanto nos reatores em que foram utilizados os inóculos B e C, somente foram recuperados clones relacionados à *Ca. Brocadia anammoxidans*, sugerindo que o tipo de inóculo foi determinante na composição e diversidade de bactérias anammox desses reatores.

O impacto do inóculo no desenvolvimento de bactérias do ciclo do nitrogênio também foi avaliado por Park *et al.* (2010) por meio de PCR-DGGE e qPCR. Um RBS anammox de 20L de volume foi inoculado com biomassa proveniente de um reator anammox granular em escala

piloto (originalmente inoculado com lodo nitrificante) e um reator CANON foi inoculado com lodo ativado de estação de tratamento de esgotos. Ambos os reatores foram alimentados com líquido proveniente da digestão de lodo. Neste estudo, foi verificado que os dois reatores inoculados com lodos com características completamente diferentes, resultaram em populações de anammox semelhantes, ambos com predominância de *Ca. Brocadia* sp. 40. Em termos de bactérias aeróbias oxidadoras de amônia observou-se uma maior concentração destes micro-organismos no reator CANON, com predominância do gênero *Nitrosomonas eutropha*. Esta maior concentração foi atribuída ao modo de operação deste reator, com alternância de condições aeróbias e anóxicas, que são comumente fornecidas em reatores do tipo CANON. Com relação a bactérias oxidadoras de nitrito, estas foram encontradas em ambos os reatores, com predominância do gênero *Nitrobacter* em relação ao gênero *Nitrospira*.

Na Tabela 2.7 são apresentados resultados de diversos estudos que avaliaram a diversidade de bactérias anammox em reatores que partiram de distintos inóculos. Observa-se que o gênero *Ca. Brocadia* é o gênero dominante em reatores anammox, independente do tipo de lodo utilizado para a inoculação do reator. Micro-organismos deste gênero estão amplamente distribuídos, principalmente em sistemas de tratamento de efluentes (Tabela 2.2) (ARAÚJO *et al.*, 2011; HU *et al.*, 2010; KARTAL *et al.*, 2008; VANOTTI *et al.*, 2011).

**Tabela 2.7** - Diversidade de gêneros de micro-organismos anammox em reatores que partiram de diferentes inóculos

Inóculo	Diversidade de bactérias anammox no reator após enriquecimento	Referência
Lodo desnitrificante	<i>Ca. Brocadia anammoxidans</i>	Tsushima <i>et al.</i> (2007)
Lodo de sistema de lodos ativados	<i>Ca. Brocadia</i> sp. 40	Park <i>et al.</i> , (2010)
Lodo anaeróbio granular metanogênico	<i>Ca. Brocadia</i>	Tang <i>et al.</i> (2010)
Lodo nitrificante	<i>Ca. Brocadia anammoxidans</i>	Van der Star <i>et al.</i> (2007)
Sedimento marinho	<i>Ca. Scalindua wagnerii</i>	Nakajima <i>et al.</i> (2008)
Sedimento de rio	<i>Ca. Jettenia asiatica</i>	Quan <i>et al.</i> (2008)
Lodo de sistema de lodos ativados	<i>Ca. Brocadia</i> <i>Ca. Jettenia</i>	Pereira <i>et al.</i> (2014)
Lodo de sistema de wetlands construído	<i>Ca. Brocadia</i>	Costa <i>et al.</i> (2014)
Lodo de lagoa aerada para tratamento de efluente de refinaria de petróleo	<i>Ca. Brocadia</i> <i>Ca. Anammoxoglobus</i> <i>Ca. Kuenenia</i>	Costa <i>et al.</i> (2014)
Lodo de estação de tratamento de esgoto	<i>Ca. Brocadia fulgida</i> <i>Ca. Brocadia anammoxidans</i>	Date <i>et al.</i> (2009)
Lodo de digestor	<i>Ca. Brocadia anammoxidans</i>	Date <i>et al.</i> (2009)
Lodo de tanque de nitrificação para tratamento de efluente de suinocultura	<i>Ca. Brocadia anammoxidans</i>	Date <i>et al.</i> (2009)
Lodo de sistema de lodos ativados	<i>Ca. Kuenenia stuttgartiensis</i>	Li <i>et al.</i> (2009)

Segundo Van Der Star *et al.* (2008), os principais grupos de bactérias anammox enriquecidos em reatores anammox em escala laboratorial são *Ca. Brocadia* e *Ca. Kuenenia*. Isso indica, que há uma diferenciação de nichos entre esses dois gêneros de bactérias anammox em relação a outros gêneros, como *Ca. Scalindua* (encontrada principalmente em ambientes marinhos) e *Ca. Anammoxoglobus* (enriquecido em meios contendo propionato). A diferenciação de nicho entre *Ca. Brocadia* e *Ca. Kuenenia* ainda não está clara. Entretanto, mesmo partindo-se de um único inóculo a predominância de uma espécie em relação à outra pode mudar ao longo do tempo de acordo com as condições operacionais à que os reatores são submetidos. A afirmativa acima foi confirmada em experimento conduzido em um biorreator de membrana (MBR) inoculado com biomassa anammox proveniente de reator em escala plena (VAN DER STAR *et al.*, 2007). Observou-se, utilizando a técnica de FISH, que o gênero de anammox predominante no inóculo e nos primeiros 35 dias de cultivo era *Ca. Brocadia*, e após 149 dias, esse gênero foi completamente substituído por *Ca. Kuenenia*. Os autores atribuíram esta mudança à maior afinidade da bactéria *Ca. Kuenenia* pelo substrato nitrito. A constante de afinidade (Ks) por este substrato foi estimado por Van Der Star *et al.* (2008) como sendo de 0,2 a 3  $\mu\text{M}$  para *Ca. Kuenenia stuttgartiensis*, valor menor do que o estimado para *Ca. Brocadia* em estudo realizado

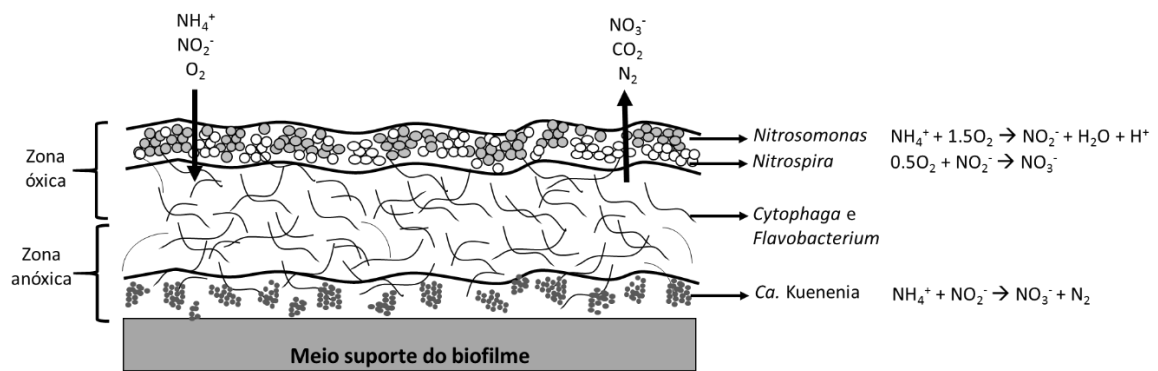
anteriormente (5  $\mu\text{M}$ ; STROUS; KUENEN; JETTEN, 1999). Em condições limitantes de nitrito, como foi o caso deste trabalho, o gênero *Ca. Kuenenia*, que possui maior afinidade por esse substrato predominou em relação à *Ca. Brocadia* (VAN DER STAR *et al.*, 2008).

#### 2.6.3.2 Estrutura da comunidade microbiana em reatores anammox com diferentes formas de crescimento da biomassa

O cultivo de micro-organismos de baixa taxa de crescimento, como é o caso das bactérias anammox, requer eficiente retenção de biomassa e se baseia principalmente na capacidade dos micro-organismos formarem biofilmes ou agregados como flocos ou grânulos (VAN DER STAR *et al.*, 2008). Em reatores anammox, a afirmação acima tem se verificado, uma vez que esses micro-organismos crescem preferencialmente na forma de agregados ou aderidos a um meio suporte.

Os trabalhos que estudaram a estrutura das comunidades microbianas em reatores anammox com diferentes formas de crescimento da biomassa sugerem que este fator tem influência no desenvolvimento dos grupos microbianos presentes nestes reatores.

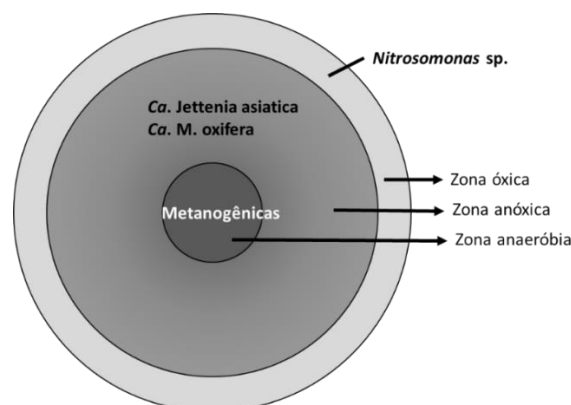
Egli *et al.* (2003) avaliaram a estrutura da comunidade microbiana em um biofilme com atividade anammox de reator biológico com biodiscos rotativos, tratando efluente de lixiviado de aterro de resíduos perigosos com elevadas concentrações de nitrogênio amoniacal. A composição e estrutura da comunidade microbiana deste reator foi investigada com auxílio da técnica de FISH. Um modelo para a estrutura da comunidade microbiana neste biofilme foi proposto neste estudo (Figura 2.7). Foi observada a presença de bactérias oxidadoras de amônia (*Nitrosomonas* e *Nitrospira*) na zona óxica do biofilme. Nesse ambiente, as bactérias nitrificantes eram responsáveis pela oxidação parcial da amônia a nitrito. A presença de bactérias filamentosas (dos grupos *Cytophaga* e *Flavobacterium*, pertencentes ao filo Bacteroidetes) foi observada na parte imediatamente inferior, provavelmente, auxiliando na estruturação do biofilme. Nas camadas inferiores do biofilme, em que prevaleciam condições anóxicas, foi confirmada a presença de bactérias anammox do gênero *Ca. Kuenenia*. Nesse ambiente, as bactérias anammox eram capazes de oxidar a amônia a nitrogênio gasoso, com nitrito como acceptor de elétrons.



**Figura 2.7** - Estrutura de biofilme formado em reator com biodiscos para o tratamento de efluente de lixiviado de aterro de resíduos perigosos

**Fonte:** Adaptado de Egli *et al.* (2003).

Hu *et al.* (2012) estudaram o metagenoma (por meio das plataformas Illumina e pirosequenciamento 454) de lodo granular anammox proveniente de reator em escala laboratorial, propôs um modelo, em que, em condições de microaeração, o grânulo era formado por um núcleo composto por arqueias metanogênicas (capazes de crescer porque o oxigênio não pode penetrar no interior do grânulo), cercado por uma camada de bactérias anammox pertencentes à espécie *Ca. Jettenia asiática* e bactérias metanotróficas desnitrificantes do filo NC10 (*Ca. Methyloirabilis oxyfera*), e por fim, uma camada externa composta por bactérias aeróbias oxidadoras de amônia (*Nitrosomonas sp.*). Os autores propuseram que juntos estes micro-organismos formam uma comunidade mutualista no interior do grânulo. Na figura 2.8 é apresentada uma representação esquemática do grânulo anammox, de acordo com o modelo proposto por Hu *et al.* (2012). Entretanto, os autores ressaltam a importância de mais estudos para a confirmação de tal modelo.



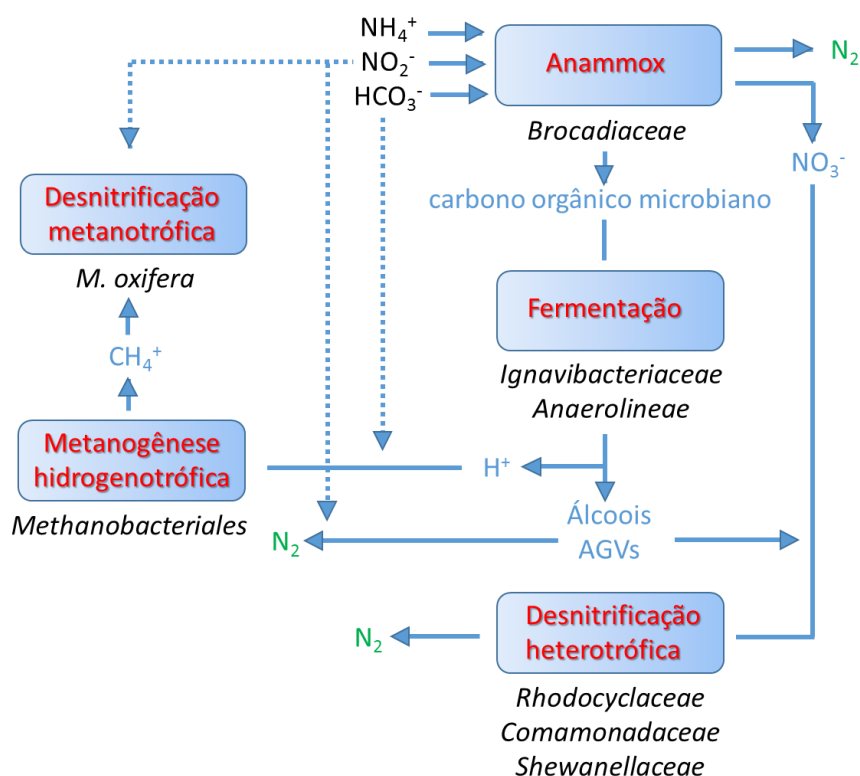
**Figura 2.8** - Estrutura da comunidade microbiana de grânulo anammox proposta por Hu *et al.* (2012).

**Fonte:** Adaptado de Hu *et al.* (2012).

Caracterização microbiológica de grânulos de um reator anammox em escala plena foi realizada por GONZALEZ-GIL *et al.* (2015). O reator anammox em questão foi o primeiro em escala plena implementado no mundo, localizado em Roterdã, na Holanda, utilizado para tratamento de efluente proveniente da digestão anaeróbia de lodo de ETE. Este reator é precedido por um reator SHARON para nitrificação parcial e vem sendo operado desde 2007. A diversidade microbiana dos grânulos foi investigada através da técnica de pirosequenciamento 454 a partir dos genes RNAr 16S. Adicionalmente o metagenoma do DNA total extraído dos grânulos foi realizado.

A investigação da comunidade microbiana dos grânulos anammox revelou a predominância de famílias relacionadas a bactérias anammox (Brocadiaceae) com 37% de abundância em relação ao total de sequências obtidas pelo pirosequenciamento, sendo que a grande maioria das sequências de anammox (99%) pertenciam ao gênero *Ca. Brocadia*. Outros grupos de bactérias que foram abundantes na estrutura dos grânulos foram: Ignavibacteriaceae (18%), Anaerolinaceae (7%), Rhodocyclaceae (9%), Comamonadaceae (3%) e Shewanellaceae (3%). As bactérias das famílias Ignavibacteriaceae (filo Chlorobi) e Anaerolinaceae (filo Chloroflexi), são heterotróficos capazes de realizar fermentação. Bactérias da família Rhodocyclaceae e Comamonadaceae são heterotróficos desnitrificantes, e por esse motivo, são potenciais competidoras pelo nitrito, com bactérias anammox. Entretanto, uma vez que bactérias anammox também produzem nitrato, esses micro-organismos poderiam estar consumindo este composto no meio. As bactérias do gênero *Shewanella* podem oxidar compostos orgânicos utilizando vários aceptores de elétrons, e também são capazes de fermentar piruvato. Este micro-organismo também pode utilizar acetato para desnitrificação. Outros grupos de micro-organismos encontrados nos grânulos anammox pertencem às ordens Bacteroidales e Acidobacteriales, capazes de degradar carboidratos complexos em substâncias menores. Vale ressaltar que neste estudo não foram recuperadas sequências do metanotrófico desnitrificante *M. oxifera* (filo NC10) por meio do pirosequenciamento, porém, os autores observaram por microscopia eletrônica de transmissão a presença de bactérias com forma poligonal, característica deste grupo microbiano. Arqueias metanogênicas também foram detectadas fazendo parte da estrutura dos grânulos, mais especificamente, as do gênero *Methanobacterium* (ordem Methanobacteriales), que é uma metanogênica hidrogenotrófica.

Com base nos estudos moleculares realizados, GONZALEZ-GIL *et al.* (2015) propuseram uma rota metabólica hipotética dentro dos grânulos anammox estudados (Figura 2.9).



**Figura 2.9** - Rota metabólica hipotética em grânulos anammox construída a partir do estudo da comunidade microbiana (Pirosequenciamento do gene rRNA 16S e Metagenoma) de grânulos anammox.

**Fonte:** Adaptado de Gonzalez-Gil *et al.* (2015).

Neste modelo é proposto que mesmo em sistemas predominantemente autotróficos, como é o caso de reatores anammox, matéria orgânica decorrente do decaimento da biomassa microbiana está prontamente disponível para que micro-organismos heterotróficos atuem em sua degradação. Bactérias degradadoras de polímeros e bactérias fermentativas atuam fornecendo álcoois e ácidos graxos voláteis (AGVs) de cadeia curta que são utilizados por desnitrificantes heterotróficos que podem consumir o nitrato produzido pelas bactérias anammox. Nesta rede metabólica arqueias metanogênicas hidrogenotróficas consomem o  $H_2$ , produto chave da fermentação. Metanotróficas desnitrificantes consomem o  $CH_4$  produzido pelas arqueias metanogênicas, utilizando o nitrito como receptor de elétrons. Esse estudo mostra, que apesar do metabolismo autotrófico predominante das anammox nos grânulos, oxidação de compostos orgânicos e desnitrificação heterotrófica, por meio de várias interações microbianas é possível. Entretanto, os autores ressaltam a necessidade de maiores investigações para validar esta hipotética rede metabólica (GONZALEZ-GIL *et al.*, 2015).

Apesar da grande diversidade de micro-organismos encontrados em reatores anammox, estudos têm indicado que os grânulos presentes nestes reatores são menos diversos em termos de

comunidades microbianas em relação a grânulos ou flocos encontrados em outros sistemas de tratamento de efluentes, como por exemplo, reatores anaeróbios destinados ao tratamento de efluente de indústria de papel, de processamento de alimentos e sistemas de lodos ativados. Isso indica que em reatores anammox, uma comunidade altamente especializada com poucos filotipos dominantes é formada, resultado de uma faixa mais estreita de doadores e aceptores de elétrons nestes sistemas, em relação a outros sistemas (GONZALEZ-GIL *et al.*, 2015).

#### 2.6.3.3 Efeito da matéria orgânica sobre a remoção de nitrogênio e sobre as comunidades microbianas em reatores anammox

Compostos orgânicos estão presentes em praticamente todos os tipos de efluentes e, muitos estudos tem comprovado a sua capacidade de inibição sobre o processo anammox. Diversos tipos de efluentes, contêm altas concentrações de matéria orgânica e elevada relação DQO/N e alguns pesquisadores tem investigado o impacto de compostos orgânicos nas comunidades microbianas em reatores anammox e conseqüentemente na performance dos reatores (Tabela 2.8).

Molinuevo *et al.* (2009) em estudo utilizando reatores anammox UASB em escala laboratorial, para pós-tratamento de dois tipos de efluentes: efluente de suinocultura após digestão em reator UASB e efluente de suinocultura parcialmente oxidado (após nitrificação). Os efluentes foram diluídos em meio mineral autotrófico, e as concentrações de DQO foram aumentadas gradativamente. Valores de DQO iguais a 237 mg.L<sup>-1</sup> e 290 mg.L<sup>-1</sup>, nos efluentes pós digerido e parcialmente oxidado, respectivamente, foram capazes de inibir totalmente a remoção de nitrogênio nos reatores anammox. Análises de FISH revelaram que quando a concentração de DQO aumentou para 290 mg.L<sup>-1</sup> houve diminuição no número de bactérias anammox em relação ao período inicial, em que a concentração era de 121 mg.L<sup>-1</sup>.

Em estudo conduzido por Ni *et al.* (2012) a performance de reator UASB em escala laboratorial com lodo anammox granular foi avaliado na presença de matéria orgânica sob diferentes concentrações (100, 200 e 400 mg.L<sup>-1</sup>) e relações DQO/N (1, 2 e 4). Foi observado que quando a concentração de DQO aumentou para 400 mg.L<sup>-1</sup>, com conseqüente aumento da relação DQO/N para 4, houve uma diminuição na eficiência de nitrogênio amoniacal de 100% para 70%. Por meio da técnica de qPCR a população de bactérias anammox e desnitrificantes foi avaliada e foi constatada uma diminuição na abundância relativa de bactérias anammox em relação ao total de bactérias, que era de 90%, no período controle (quando não havia adição de matéria orgânica) e passou a ser 83% quando a concentração de DQO passou a ser 400 mg.L<sup>-1</sup>.

Em contrapartida, neste mesmo período observou-se um aumento da abundância relativa de bactérias desnitrificantes heterotróficas.

Populações de bactérias anammox foram avaliadas em um RBS de 6,7 L de volume tratando efluente de um digestor de lodo de estação de tratamento de esgotos na Áustria, quando submetido à crescentes relações DQO/N (de 0,6 até 1,4) (JENNI *et al.*, 2014). O incremento da relação DQO/N foi realizado por meio da adição de acetato e glicose ao afluente do reator. Foi observado que houve um aumento gradativo na eficiência de remoção de nitrogênio total, de 85% para 95%, à medida em que a relação DQO/N aumentava. Os autores atribuíram o aumento da eficiência de remoção de nitrogênio total à atividade de bactérias que realizam desnitrificação heterotrófica, uma vez que, maior quantidade de matéria orgânica estava disponível para que as bactérias desnitrificantes heterotróficas consumissem o nitrato produzido pelas bactérias anammox. A comunidade microbiana foi investigada por meio da técnica de FISH. Duas sondas foram utilizadas, BFU, que tem como alvo o RNAr 16S de *Ca. Brocadia fulgida*, e AMX820, que tem como alvo o RNAr 16S de *Ca. Brocadia* e *Ca. Kuenenia*. Foi observado que o aumento da relação DQO/N de 0,27 para 1,40 diminuiu a abundância de bactérias anammox. Entretanto, houve um aumento na quantidade de *Ca. Brocadia fulgida*, em relação aos outros gêneros de bactérias anammox. Esse gênero de bactérias anammox é conhecido por ser capaz de oxidar acetato, utilizando o nitrito como acceptor de elétrons (KARTAL *et al.*, 2008) o que pode explicar o aumento de sua concentração em relação aos outros gêneros pesquisados quando houve aumento da relação DQO/N.

A estrutura e composição da comunidade microbiana em um RBS anammox (2 L de volume) foram avaliadas antes e após a perturbação pela adição de fenol (PEREIRA *et al.*, 2014). Fenol é componente de muitos efluentes industriais que possuem também elevadas concentrações de nitrogênio amoniacal em sua composição, como por exemplo, efluentes de coqueria da indústria siderúrgica (TOH e ASHBOLT, 2002) e efluentes de indústrias petroquímicas (YANG e JIN, 2012), entre outros. Concentração de fenol igual a 300 mg.L<sup>-1</sup> foi capaz de reduzir drasticamente a eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal de 96,5% para 47%. A adição de fenol ao afluente do RBS anammox promoveu mudanças na comunidade microbiana, estudada por meio das técnicas de DGGE e pirosequenciamento 454 do DNAr 16S. Após a adição de matéria orgânica (fenol), observou-se que houve mudanças no perfil da comunidade microbiana, com aparecimento de bandas no gel de DGGE com sequências similares à de *Pseudomonas putida*. Esta bactéria está associada com a degradação de compostos aromáticos e vem sendo utilizada no tratamento de águas residuárias na degradação de fenol (ULLHYAN

e GOSH, 2012). Os resultados do pirosequenciamento 454 revelaram que após a adição do fenol, houve aumento da abundância relativa de micro-organismos do filo Proteobacteria. Destaca-se que dentro deste filo, encontram-se alguns micro-organismos que podem realizar a desnitrificação heterotrófica, Burkholderiales, Rhodocyclales e Pseudomonadales, os quais também tiveram sua abundância relativa aumentada após a adição de fenol ao reator. Em contrapartida, o filo ao qual pertencem as bactérias anammox, Planctomycetes, sofreu uma diminuição, em termos de abundância relativa após o impacto por adição de elevadas concentrações de fenol. Apesar disso, bactérias anammox dos gêneros *Ca. Brocadia* e *Ca. Jettenia*, persistiram no reator, mesmo após esta perturbação (PEREIRA *et al.*, 2014).

Zhang *et al.* (2015) avaliaram o efeito da matéria orgânica sobre o processo CANON em cinco bioreatores de membrana (MBR) em escala laboratorial. Os reatores foram alimentados com efluente sintético suplementado com glicose. Cada reator foi submetido a diferentes concentrações de DQO (0, 100, 200, 400 e 800 mg.L<sup>-1</sup>) e relações DQO/N (0; 0,5; 1; 2 e 4). Os reatores apresentaram boa remoção de nitrogênio total até a relação DQO/N igual a 2, com cargas de nitrogênio removidas variando de 0,69 a 0,57 kg N.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>. Entretanto, no reator em que foi aplicado efluente com relação DQO/N igual a 4 houve diminuição de 30% na eficiência de remoção de nitrogênio total (carga de N removida de 0,43 kg N.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>). A comunidade microbiana nos cinco reatores foi investigada por meio da técnica de PCR-DGGE, utilizando iniciadores para bactérias aeróbias oxidadoras de amônia (BOA) e para bactérias anammox. Observou-se que o número de bandas nos géis de DGGE diminuíram, quando as relações DQO/N testadas foram iguais a 2 e 4, indicando que, as elevadas concentrações de DQO influenciaram negativamente a presença de micro-organismos destes dois grupos microbianos. Não obstante, foram encontradas bandas, cujas sequências foram relacionadas à *Ca. Brocadia* e *Ca. Brocadia fulgida* e *Ca. Kuenenia stuttgartiensis* em todos os reatores.

A dinâmica de comunidades microbianas de um RBS anammox em escala laboratorial foi avaliada quando o mesmo foi submetido à crescentes razões DQO/N (por meio da adição de glicose ao reator) (LEAL *et al.*, 2016). Concentração de DQO igual a 487 mg.L<sup>-1</sup> (DQO/N= 3,5) foi capaz de inibir a eficiência de remoção de nitrogênio, que reduziu de aproximadamente 98% (período em que o reator era alimentado com meio autotrófico) para 22%. Após período de recuperação, o RBS anammox alcançou elevada eficiência de remoção de nitrogênio amoniaco, mesmo quando o afluente possuía elevada razão DQO/N (DQO/N=5; 300 mg.L<sup>-1</sup> de DQO afluente). Em etapa subsequente deste mesmo estudo, o reator foi utilizado para pós tratamento de efluente de reator UASB tratando esgoto doméstico, e se mostrou viável para a

remoção de amônia e DQO deste efluente (DQO/N=3,5; 172 mg.L<sup>-1</sup> de DQO afluente). A investigação da comunidade microbiana por meio de PCR-DGGE revelou que bactérias anammox do gênero *Ca. Brocadia sinica*, persistiram durante todo o tempo (LEAL *et al.*, 2016). Segundo Oshiki *et al.* (2011), este gênero de bactérias pode ser encontrado em reatores anammox submetidos a condições adversas, como por exemplo, em presença de compostos orgânicos. Bactérias do grupo Chloroflexi também foram encontradas fazendo parte da comunidade microbiana deste reator anammox e os autores sugeriram que elas podem estar envolvidas na remoção de DQO. Destaca-se também, a presença da bactéria *Denitratisoma oestradiolicum*, que é heterotrófica desnitrificante e foi encontrada durante todo o período experimental do reator, como mostrou o perfil do DGGE. Por meio da técnica de qPCR foi verificado que a abundância relativa de bactérias desnitrificantes aumentou em relação aos períodos após a adição do efluente contendo glicose e do efluente doméstico, entretanto, a abundância relativa de bactérias anammox não foi alterada. Por meio da técnica de qPCR os autores observaram um aumento na concentração do gene *nosZ* de bactérias desnitrificantes heterotróficas de  $2,57 \times 10^9$  cópias.g<sup>-1</sup> de lodo para  $7,57 \times 10^9$  cópias.g<sup>-1</sup> de lodo após a adição de glicose e de efluente pré-tratado anaerobiamente (LEAL *et al.*, 2016). Entretanto, a concentração de bactérias anammox, medido pela concentração do número de cópias do gene RNAr 16S desses micro-organismos) praticamente não foi alterada com a adição dos efluentes contendo DQO (variou de  $2,08 \times 10^9$  cópias.g<sup>-1</sup> de lodo para  $1,9 \times 10^9$  cópias.g<sup>-1</sup> de lodo).

Na Tabela 2.8 são resumidos alguns dos estudos que avaliaram a influência da matéria orgânica nos processos de tratamento de efluentes envolvendo as bactérias anaeróbias oxidadoras de amônia. Como pode ser observado a partir dos dados da Tabela 2.8, não existe consenso na literatura quanto à faixa de DQO capaz de inibir o processo anammox. Os valores encontrados são bastante variáveis (192 a 800 mg.L<sup>-1</sup>), assim como as relações DQO/N capazes de inibir o processo (1,4 a 6), dependendo do tipo de efluente tratado.

**Tabela 2.8** - Influência da matéria orgânica sobre a remoção de nitrogênio e sobre a comunidade microbiana de reatores anammox

Tipo de reator <sup>a</sup>	Efluente	Relação DQO/N	Concentração inibitória de matéria orgânica (mg.L <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	Efeito sobre a remoção de nitrogênio	Efeito sobre a comunidade microbiana	Referência
UASB anammox	Efluente sintético contendo leite	2	300	Supressão da atividade anammox	NI	Chamchoi <i>et al.</i> (2008)
UASB anammox	Efluente sintético + efluente de suinocultura pré-digerido em reator UASB	NI <sup>b</sup>	237	Inibição completa da remoção de nitrogênio amoniacal	NI	Molinuevo <i>et al.</i> (2009)
UASB anammox	Efluente sintético + efluente de suinocultura pré-oxidado (nitrificado)	NI	290	Inibição completa da remoção de nitrogênio amoniacal	Redução no número de bactérias anammox (investigado por FISH)	Molinuevo <i>et al.</i> (2009)
UASB anammox	Efluente sintético + sacarose	2,9	700	Redução na eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal de 75% <sup>d</sup> para 1,7%	NI	Tang <i>et al.</i> (2010)
UASB anammox	Efluente sintético + leite livre de gordura	4	400	Redução da eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal de 100% <sup>d</sup> para 70%	Redução da abundância relativa de bactérias anammox de 90% para 83% e aumento da abundância relativa de bactérias desnitrificantes (investigado por qPCR)	Ni <i>et al.</i> (2012)
RBS anammox	Efluente de digestor de logo de ETE + acetato e glicose	1,4	720	Aumento na eficiência de remoção de nitrogênio total de 85% <sup>d</sup> para 95%	Aumento da abundância relativa de <i>Ca. Brocadia fulgida</i> em relação a outras bactérias anammox (investigado por FISH)	Jenni <i>et al.</i> (2014)

/Continua

<b>Tipo de reator<sup>a</sup></b>	<b>Efluente</b>	<b>Relação DQO/N</b>	<b>Concentração inibitória de matéria orgânica (mg.L<sup>-1</sup>)<sup>c</sup></b>	<b>Efeito sobre a remoção de nitrogênio</b>	<b>Efeito sobre a comunidade microbiana</b>	<b>Referência</b>
Frascos em batelada	Efluente sintético + acetato e amido	6	192	Nenhuma alteração na remoção de nitrogênio (a temperaturas de 22 °C e 30 °C)	NI	Sánchez Guillén <i>et al.</i> (2014)
RBS anammox	Efluente sintético + fenol	NI	300	Redução na eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal de 96,5% <sup>d</sup> para 47%	Aumento na abundância relativa de bactérias desnitrificantes e diminuição na abundância relativa de bactérias anammox (investigado por Pirosequenciamento)	Pereira <i>et al.</i> (2014)
RBS anammox	Efluente sintético + glicose	3,5	487	Redução na eficiência de remoção de nitrogênio de 99% <sup>d</sup> para 22%	Aumento da abundância relativa de bactérias desnitrificantes. Não houve alteração na abundância relativa de bactérias anammox (investigado por qPCR).	Leal <i>et al.</i> (2016)
RBS anammox	Efluente doméstico	3,5	172	Elevada eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal próxima de 100%	Aumento da abundância relativa de bactérias desnitrificantes. Não houve alteração na abundância relativa de bactérias anammox (investigado por qPCR).	Leal <i>et al.</i> (2016)
MBR (processo CANON)	Efluente sintético + glicose	4	800	Redução na eficiência de remoção de nitrogênio total de 30% em relação ao período controle.	Redução no número de bandas do gel de DGGE, relacionadas à BOA e bactérias anammox.	Zhang <i>et al.</i> (2015)

<sup>a</sup> Todos os estudos foram realizados em escala laboratorial; <sup>b</sup> NI: Não informado; <sup>c</sup> Concentrações em termos de DQO, com exceção do estudo de Pereira *et al.* (2014), cuja concentração informada é de fenol; <sup>d</sup> Eficiência de remoção no período controle.

Segundo Jin *et al.* (2012) existem dois mecanismos de inibição do processo anammox por matéria orgânica. O primeiro está relacionado com a competição entre bactérias anammox e desnitrificantes heterotróficas por nitrito, o aceptor de elétrons que ambos os grupos microbianos utilizam. O segundo mecanismo de inibição ocorre quando bactérias anammox ainda são o grupo dominante no ambiente onde há elevada relação entre carbono e nitrogênio, no entanto, elas realizam rota metabólica alternativa, na qual matéria orgânica é usada como doador de elétrons em vez de amônio. Isso foi observado por GUVEN *et al.* (2005) em experimento em que bactérias anammox foram capazes de oxidar propionato, usado como fonte matéria orgânica no efluente. Como resultado, houve diminuição na remoção de nitrogênio.

Além da relação entre carbono e nitrogênio e da concentração, o tipo de matéria orgânica presente (com alta ou baixa biodegradabilidade ou toxicidade) exerce influência na remoção de nitrogênio por bactérias anammox. Segundo (RUSCALLEDA *et al.*, 2008) o crescimento de bactérias heterotróficas é limitado em águas residuárias com baixa disponibilidade de matéria orgânica biodegradável. Dessa forma, na presença de matéria orgânica pouco biodegradável bactérias heterotróficas podem não ser bem-sucedidas na competição com bactérias anammox. Além disso, alguns compostos orgânicos como o metanol, aldeídos, antibióticos e fenóis foram relatados como agentes tóxicos para bactérias anammox (GUVEN *et al.*, 2005; PEREIRA *et al.*, 2014; TOH e ASHBOLT, 2002; YANG e JIN, 2012).

### 3 PREMISSAS E HIPÓTESES DE INVESTIGAÇÃO

A partir da análise da literatura e das premissas apresentadas na Tabela 3.1, foram formuladas as hipóteses que fundamentam este trabalho e estabelecidos os objetivos específicos da presente tese, conforme é mostrado na Tabela 3.1.

**Tabela 3.1** - Premissas e hipóteses que fundamentaram o presente trabalho

Premissas	Hipóteses	Objetivos específicos
O processo anammox vem demonstrando ser aplicável ao pós-tratamento de diversos tipos de efluentes provenientes de digestão anaeróbia, como digestato de lodo de esgoto e de efluentes agropecuários pré-digeridos anaerobiamente (FIGUEROA <i>et al.</i> , 2012; JEANNINGROS <i>et al.</i> , 2010; JOSS <i>et al.</i> , 2009; SCAGLIONE <i>et al.</i> , 2015; VAN DER STAR <i>et al.</i> , 2007). Esses efluentes possuem baixas concentrações de matéria orgânica biodegradável e baixas relações DQO/N o que favorece a aplicação de reatores com atividade anammox para o pós-tratamento objetivando a remoção de nitrogênio. Estas características também estão presentes no digestato de resíduo alimentar, mais especificamente em sistemas anaeróbios de duplo estágio (caso do presente estudo), os quais são capazes de gerar efluentes com baixa relação entre DQO/N favorecendo o pós-tratamento pelo processo anammox.	O processo anammox é aplicável ao tratamento de digestato de resíduo alimentar, produzindo efluentes com baixos níveis de nitrogênio.	1
Em reatores para nitrificação parcial e anammox (NP/A), diferentes estratégias de aeração vêm sendo utilizadas (FIGUEROA <i>et al.</i> , 2012; MIAO <i>et al.</i> , 2016; ZHANG <i>et al.</i> , 2012). No entanto, não há um consenso na literatura acerca de qual o melhor modo de aeração para estabelecer o processo de NP/A, se contínuo ou intermitente, e quando intermitente, qual seria a duração dos períodos aerados e anóxicos. Tampouco há consenso sobre qual a taxa de aeração a ser aplicada, nem com relação à concentração de oxigênio que deve ser mantida no interior do reator. Sabe-se que bactérias oxidadoras de nitrito possuem fase lag da curva de crescimento mais longa do que bactérias oxidadoras de amônia. Isso faz com que, após serem submetidos a períodos anóxicos, durante estratégias de aeração intermitentes, ocorra o retardamento do crescimento de bactérias oxidadoras de nitrito e conseqüentemente da produção de nitrato (GILBERT <i>et al.</i> , 2014). Como resultado, tem-se o favorecimento da remoção de nitrogênio.	A aeração intermitente resulta em melhores resultados de remoção de nitrogênio, em relação ao modo de aeração contínuo, em RBS com nitrificação parcial e anammox.	2

/Continua

Premissas	Hipóteses	Objetivos específicos
<p>Bactérias nitrificantes (oxidadoras de amônia e nitrito) e bactérias anammox competem por carbono inorgânico. Como as bactérias anammox possuem crescimento mais lento do que as nitrificantes, podem perder na competição por carbono inorgânico no meio para as bactérias aeróbias oxidadoras de amônia e nitrito, e esse substrato pode se tornar limitante no meio para bactérias anammox. Além disso não são conhecidos mecanismos adaptativos para bactérias anammox que permitam seu crescimento em ambientes com limitação de carbono inorgânico (MA <i>et al.</i>, 2015). Dessa forma a adição de alcalinidade pode favorecer o crescimento de bactérias anammox e aumentar a eficiência de remoção de nitrogênio no reator.</p>	<p>A suplementação de alcalinidade favorece o controle do processo de nitrificação parcial e anammox, resultando em melhores resultados de remoção de nitrogênio.</p>	<p>3</p>
<p>Bactérias oxidadoras de amônia (BOA) possuem maior afinidade por oxigênio, em relação a bactérias oxidadoras de nitrito (BON). Por esse motivo, a redução na taxa de ar aplicada ao reator pode inibir o crescimento de BON e ainda assim permitir a oxidação da amônia a nitrito por BOA (BLACKBURNE <i>et al.</i>, 2008). Além disso, bactérias anammox são sensíveis ao oxigênio, e por esse motivo, menores vazões de ar aplicadas ao RBS podem reduzir a inibição desse grupo de micro-organismos pelo oxigênio (JIN <i>et al.</i>, 2012).</p>	<p>A redução na taxa de aeração aliado a estratégias de aeração intermitentes permitem maior controle do processo de nitrificação, por isso favorecem a remoção de nitrogênio por meio do processo de nitrificação parcial a e anammox.</p>	<p>4</p>
<p>As comunidades microbianas são selecionadas de acordo com as condições ambientais e presença de substratos essenciais para seu crescimento. Uma vez que a disponibilidade de substratos (como por exemplo, OD, amônio, nitrito, nitrato, carbono orgânico e inorgânico) poderão variar com as diferentes estratégias operacionais a serem avaliadas, as populações microbianas também sofrerão mudanças.</p>	<p>Aeração intermitente, com períodos anóxicos mais longos, em relação aos períodos aeróbios, é mais efetiva para permitir o desenvolvimento de bactérias anammox, uma vez que possibilita a inibição de maneira mais efetiva do crescimento de BON.</p>	<p>5</p>
<p>É sabido que as bactérias anammox estão presentes na biomassa de sistemas de lodos ativados de estação de tratamento de esgotos e por isso o enriquecimento de bactérias anammox utilizando esse tipo de lodo como inóculo e fornecendo condições propícias a seu desenvolvimento (como alimentação de reatores com meios de cultura minerais e autotróficos) resulta, na maioria das vezes, em experimentos de enriquecimento de sucesso (FERNANDES <i>et al.</i>, 2018; ARAÚJO <i>et al.</i>, 2010; PEREIRA <i>et al.</i>, 2014). Entretanto, experimentos que visam enriquecer esses micro-organismos em reatores de maior escala e com alimentação do reator com efluentes reais podem resultar em períodos de <i>start up</i> bastante elevados (VAN DER STAR <i>et al.</i>, 2007). No entanto, o digestato de resíduo alimentar, contém elevadas concentrações de amônia e baixas relações DQO/N e sua adição ao reator juntamente com solução contendo nitrito pode propiciar o desenvolvimento de bactérias anammox.</p>	<p>É possível desenvolver atividade anammox e aumentar a população de bactérias anaeróbias oxidadoras de amônia em reator em escala piloto a partir de lodo ativado de estação de tratamento de esgotos e alimentação do reator com digestato de resíduo alimentar e suplementação com nitrito.</p>	<p>6 e 7</p>

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo Geral**

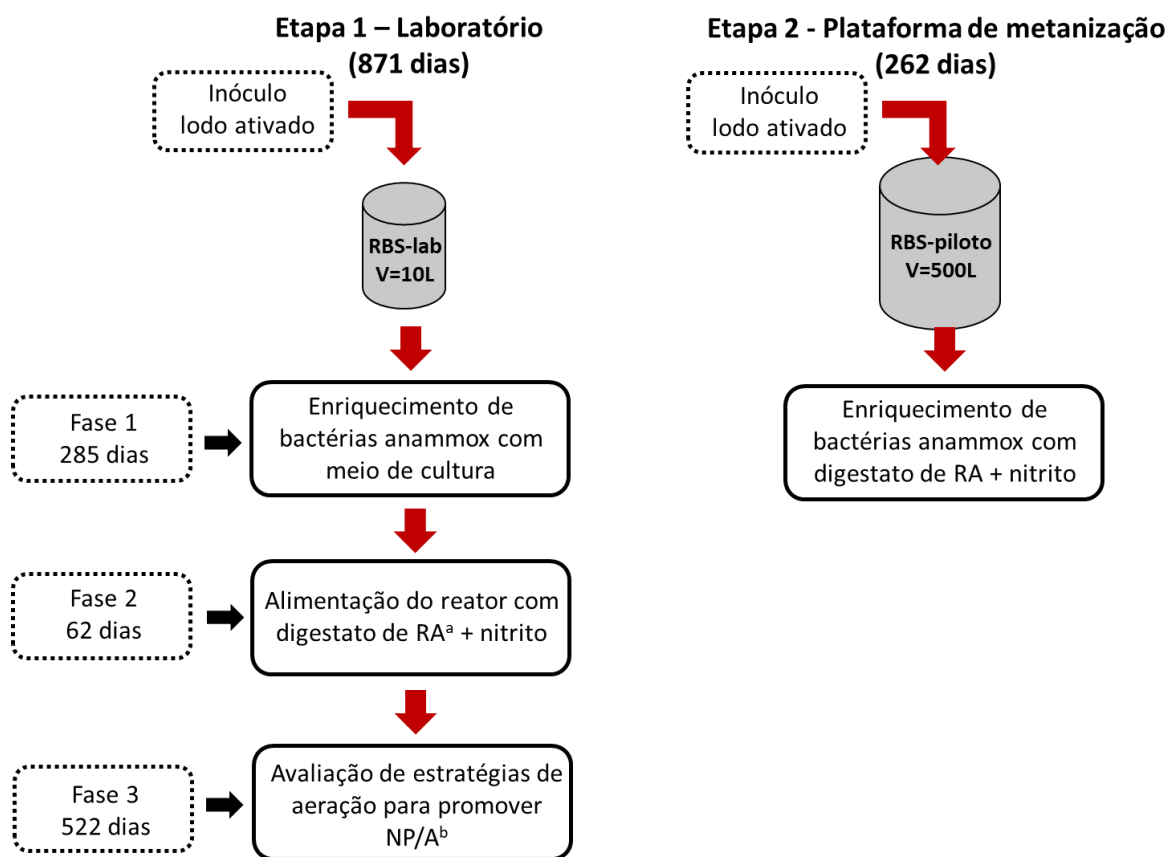
Avaliar o desempenho na remoção de nitrogênio e a estrutura da comunidade microbiana desenvolvida em reatores em bateladas sequenciais com atividade de bactérias anammox em escala laboratorial (RBS-Lab) e piloto (RBS-Piloto) no pós-tratamento de digestato de resíduo alimentar.

### **4.2 Objetivos Específicos**

- (1) Avaliar, em RBS-Lab, o efeito da aplicação de digestato de resíduo alimentar sobre a eficiência de remoção de nitrogênio por meio do processo anammox (em condições anaeróbias e suplementado com nitrito).
- (2) Avaliar, em RBS-Lab, o efeito de diferentes estratégias de aeração sobre a remoção de nitrogênio via processos concomitantes de nitrificação parcial e anammox.
- (3) Avaliar, em RBS-Lab, a influência da adição de alcalinidade sobre o processo de nitrificação parcial e anammox.
- (4) Otimizar as condições de aeração no RBS-Lab, em termos de taxa de ar aplicada, com vistas a obter maior controle do processo de nitrificação parcial e aumentar a remoção de nitrogênio.
- (5) Investigar o efeito das diferentes condições de operação do RBS-Lab sobre a diversidade e a dinâmica da comunidade microbiana.
- (6) Avaliar o desenvolvimento de atividade anammox em um RBS-Piloto inoculado com lodo ativado de estação de tratamento de esgotos, alimentado com digestato de resíduo alimentar e suplementado com nitrito.
- (7) Investigar a diversidade e a dinâmica da comunidade microbiana ao longo do desenvolvimento de atividade anammox no RBS-Piloto.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi constituído de duas etapas. A primeira etapa foi realizada no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (DESA) em RBS em escala laboratorial (RBS-Lab). A segunda etapa foi desenvolvida em RBS em escala piloto (RBS-Piloto), implementado junto à plataforma de metanização de resíduo alimentar (pMethar), localizado no Quarteirão 10 (Q10) do Campus Pampulha da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A Figura 5.1 apresenta um fluxograma das etapas metodológicas da pesquisa.



**Figura 5.1** - Fluxograma das etapas metodológicas com duração de cada etapa. (a) RA: Resíduo alimentar; (b) NP/A: Nitrificação parcial e anammox.

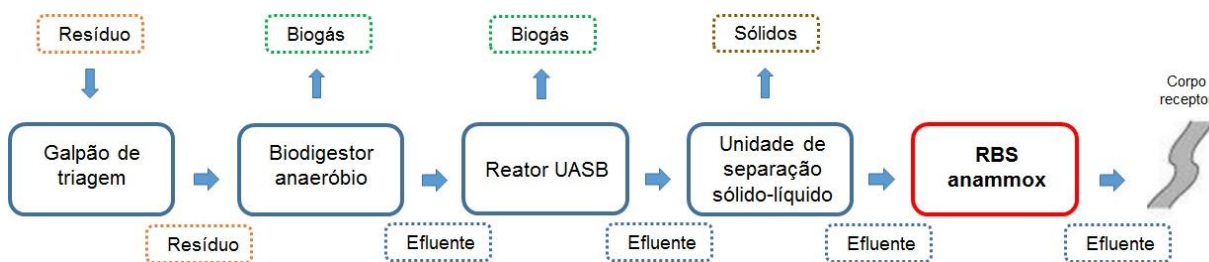
O detalhamento das fases que compõem as etapas da pesquisa é apresentado nos itens 5.2 e 5.3.

### **5.1 Área de Estudo e descrição do processo de tratamento do resíduo alimentar**

No Quarteirão 10 do Campus Pampulha da UFMG está inserido o sistema integrado para tratamento de resíduos orgânicos. O sistema é composto por uma plataforma de metanização

de resíduo alimentar, uma plataforma de aproveitamento energético de biogás, e de unidades de tratamento e aproveitamento dos subprodutos (sólidos e líquidos) do tratamento. Neste trabalho é descrita a rota para o tratamento da fase líquida gerada pelo processo de metanização do resíduo alimentar, uma vez que este estudo objetiva o pós-tratamento desta fase, para remoção de nitrogênio.

O fluxograma do tratamento do resíduo alimentar e do tratamento do efluente gerado na plataforma de metanização do resíduo é apresentado na Figura 5.2. Inicialmente, os resíduos (oriundos do restaurante setorial II do Campus Pampulha da UFMG) foram coletados e submetidos a uma etapa de triagem (Figura 5.3a), de modo a impedir o aporte de materiais impróprios ao tratamento biológico. Posteriormente, os resíduos passaram por etapas de trituração, diluição (para o ajuste do teor de sólidos) e homogeneização e foram então encaminhados para a unidade de metanização, constituída de um biodigestor anaeróbio de mistura completa, com volume útil igual a 18,8 m<sup>3</sup> (Figura 5.3b). O efluente gerado no biodigestor anaeróbio foi então tratado em uma segunda etapa de biodigestão anaeróbia, composta por um reator UASB de volume igual a 2 m<sup>3</sup> (Figura 5.3c). Esta etapa teve como objetivo complementar a digestão da matéria orgânica do efluente gerado na unidade de metanização. O reator UASB foi operado de modo a não haver a necessidade de descarte de lodo. Por este motivo o efluente deste reator, que sai com elevada concentração de sólidos, passa por subsequente etapa de separação de fases sólido-líquida. Para esta etapa foi utilizada uma unidade constituída de um leito construído em camadas compostas de tijolo, areia e brita (números 1, 2, 3 e 4) (Figura 5.3d). Por fim, a fase líquida foi encaminhada para pós-tratamento em reatores anammox, após diluição. Durante a primeira etapa do experimento o efluente foi coletado e armazenado para posterior pós-tratamento em reator em batelada sequencial em escala laboratorial (RBS-Lab), que é detalhado no item 5.2.1. Durante a segunda etapa realizada em reator em bateladas sequenciais em escala piloto (RBS-Piloto), o efluente foi armazenado em um tanque com capacidade para 400L de volume para posterior tratamento no RBS-Piloto, que é descrito no item 5.3.1.



**Figura 5.2** - Fluxograma do processo de tratamento do resíduo alimentar.



**Figura 5.3** - Unidades que compõem a plataforma de metanização de resíduos alimentares e tratamento dos efluentes gerados. (a) Vista externa e interna do galpão de triagem dos resíduos; (b) Biodigestor anaeróbico de resíduo alimentar; (c) Reator UASB e (d) Vista externa e interna da unidade de separação sólido-líquido.

Mais detalhes das unidades que compõem a plataforma de metanização dos resíduos sólidos orgânicos são apresentados na Tabela 5.1. O biodigestor anaeróbico foi alimentado duas a três vezes por semana. Todas as unidades foram operadas em modo semi-contínuo, gerando efluente apenas durante o intervalo de alimentação do biodigestor anaeróbico que dura cerca de 30 minutos.

**Tabela 5.1** - Características das unidades que compõem a plataforma de metanização dos resíduos sólidos orgânicos

Parâmetros	Biodigestor anaeróbico	Reator UASB	Unidade de separação sólido-líquido
Volume útil (m <sup>3</sup> )	18,80	2,02	0,24
Altura (m)	2,65	5,17	0,55
Diâmetro (m)	3,00	0,72	1,10
Material	PRFV <sup>a</sup>	PRFV	Tijolo maciço, areia, brita 1, 2, 3 e 4 <sup>b</sup> .

<sup>a</sup> PRFV: Poliéster reforçado com fibra de vidro; <sup>b</sup> Materiais que compõem o leito da unidade de separação sólido-líquido.

A caracterização dos efluentes gerados na plataforma de metanização foi realizada por meio de análises físico-químicas (de acordo com o item 5.4.1) durante o primeiro semestre de 2016. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 5.2.

**Tabela 5.2** - Características dos efluentes gerados na plataforma de metanização dos resíduos alimentares (pMethar)

Unidades	Nº de dados	Biodigestor		UASB		Unidade de separação sólido/líquido	
		Média (DP <sup>a</sup> )	Mediana	Média (DP)	Mediana	Média (DP)	Mediana
<b>N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b> (mg.L <sup>-1</sup> )	17	822 (156)	758	827 (159)	834	737 (180)	754
<b>N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b> (mg.L <sup>-1</sup> )	17	0,1 (0,2)	0,0	0,2 (0,5)	0,0	19,7 (19,8)	15,8
<b>N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b> (mg.L <sup>-1</sup> )	14	10,0 (9,4)	9,4	12,2 (6,1)	13,9	60,3 (89,2)	25,1
<b>DQO</b> (mg.L <sup>-1</sup> )	13	1812 (862)	1757	762 (267)	719	671 (234)	590
<b>DBO</b> (mg.L <sup>-1</sup> )	2	-	-	-	-	187 (1,4)	187
<b>ST</b> (mg.L <sup>-1</sup> )	13	3.300 (700)	3.500	2.500 (500)	2.500	2.300 (300)	2.400
<b>STV</b> (mg.L <sup>-1</sup> )	13	1.700 (300)	1.700	1.400 (200)	1.500	1.400 (200)	1.300
<b>COT</b> (mg.L <sup>-1</sup> )	3	-	-	-	-	52,2 (21,6)	52,8
<b>pH</b>	21	7,4 (0,3)	7,3	7,7 (0,3)	7,6	7,8 (0,5)	7,8
<b>Temperatura</b> (°C)	21	25 (2)	25	24 (2)	25	24 (3)	25

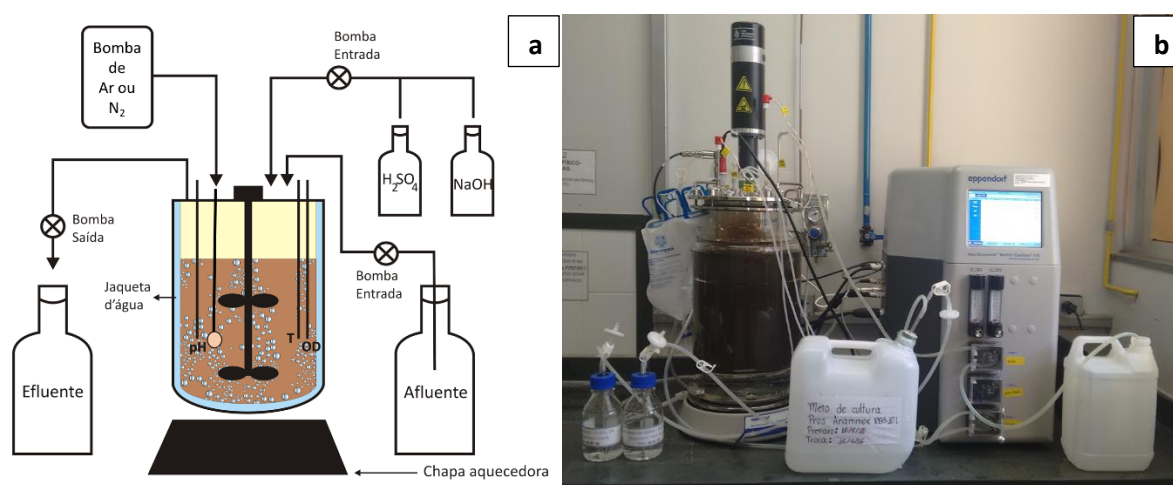
<sup>a</sup> DP: Desvio-padrão.

## 5.2 Experimentos realizados durante a Etapa 1 da pesquisa

Os experimentos constantes da Etapa 1 da pesquisa foram idealizados de modo a possibilitar o alcance dos objetivos específicos 1 a 5 e subsidiar a confirmação (ou não) das hipóteses associadas a estes mesmos objetivos (ver Capítulos 3 e 4). Todos os experimentos que integram a Etapa 1 foram desenvolvidos em Reator em Batelada Sequencial em escala laboratorial (RBS-Lab), instalado no Laboratório de Microbiologia do DESA. A Etapa 1 foi dividida em três fases experimentais, conforme descrito nos itens seguintes.

### 5.2.1 Fase 1: Enriquecimento e cultivo de bactérias anammox no RBS em escala laboratorial

O enriquecimento e cultivo de bactérias anammox foram realizados em reator de mistura completa operado em bateladas sequenciais em escala laboratorial (RBS-Lab). O RBS-Lab, fabricado em vidro, possui volume de trabalho de 10 L, sendo equipado com sondas de temperatura, oxigênio dissolvido, sensores de nível e pH (*Benchtop Fermentor & Bioreactor BioFlo®/CelliGen® 115, New Brunswick*). Na Figura 5.4 são apresentadas a representação esquemática e a imagem do reator utilizado no presente estudo.

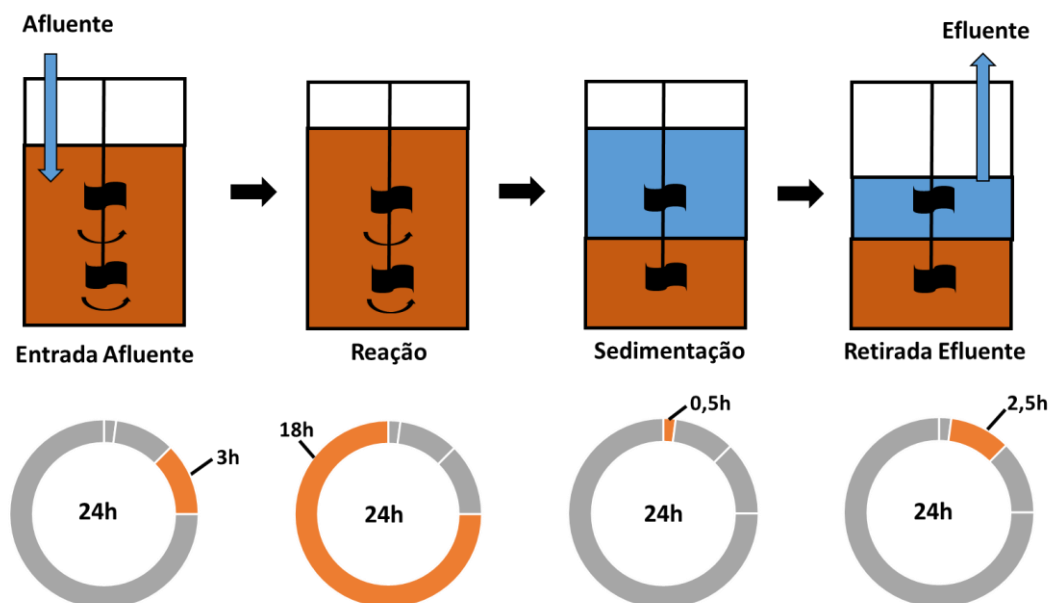


**Figura 5.4** - Representação esquemática (a) e imagem (b) do RBS utilizado para o enriquecimento e cultivo de bactérias anammox.

A temperatura no interior do reator foi mantida a 35 °C e o pH em torno de 7,5. Durante a Fase 1, o pH foi ajustado sempre que necessário utilizando soluções de NaOH (0,5M) e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1M). O reator foi protegido da luz para evitar o crescimento de micro-organismos fotossintetizantes, as quais podem competir com as bactérias anammox pelo nitrogênio do meio. Sempre que necessário gás nitrogênio foi adicionado no interior do líquido e no *headspace* do reator, a fim de manter condições anaeróbias no interior do mesmo.

Um ciclo de reação com duração de 24 horas foi definido para a operação do RBS-Lab. Este ciclo foi dividido em quatro etapas: (i) período de alimentação, em que o meio afluente foi bombeado para dentro do reator e a agitação foi ligada; (ii) período de reação, o qual consistiu no tempo em que a biomassa permaneceu reagindo com o meio afluente sob agitação contínua; (iii) período de sedimentação, em que a agitação foi desligada para que a biomassa se sedimentasse no fundo do reator; (iv) período de retirada de meio, em que o efluente do reator

foi retirado e coletado. A Figura 5.5 apresenta um esquema do ciclo de reação do RBS, evidenciando a duração de cada período.



**Figura 5.5** - Ciclo de operação do RBS em escala laboratorial com duração de cada período de operação.

O lodo utilizado como inóculo foi proveniente do sistema de lodos ativados da Estação de Tratamento de Esgotos do Ribeirão Arrudas (ETE-Arrudas), operada pela Companhia de Saneamento de Minas Gerais (COPASA). O lodo foi coletado da linha de recirculação de lodo a partir dos decantadores secundários. A escolha do inóculo foi baseada em estudos realizados previamente por Araujo *et al.* (2011) e Pereira *et al.* (2014), em que foi obtido sucesso no enriquecimento de bactérias anammox a partir de amostra derivada do mesmo sistema de lodos ativados.

Um volume de 20 litros de lodos ativados, com concentração de sólidos totais voláteis (STV) igual a  $4,6 \text{ g STV.L}^{-1}$  foi centrifugado a 4000 rotações por minutos (RPM) durante 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o lodo concentrado após centrifugação foi adicionado a um meio de cultura mineral e autotrófico (descrito a seguir), de modo que o volume final (lodo mais meio de cultura) fosse igual a 10 L. Os 10 L de lodo mais meio de cultura foram adicionados ao RBS-Lab, resultando em uma concentração final de STV igual a  $8,2 \text{ g.L}^{-1}$  no interior do reator. As análises de sólidos totais (ST) e sólidos totais voláteis (STV) foram realizadas de acordo com metodologia descrita no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012).

Meio de cultura mineral autotrófico previamente descrito por Van de Graaf *et al.* (1996) e Dapena-Mora *et al.* (2004) foi utilizado para o enriquecimento e cultivo de bactérias anammox. A composição do meio de cultura é descrita nas Tabelas 5.3 e 5.4. O meio de cultura possuía como único doador e único acceptor de elétrons, amônio e nitrito, respectivamente. Carbonato era a única fonte de carbono, sendo que ao meio também eram adicionados micronutrientes. Antes da alimentação do reator, gás nitrogênio era fluxionado ao meio de cultura com objetivo de propiciar condições anaeróbias no mesmo.

**Tabela 5.3** - Composição do meio de cultura mineral autotrófico utilizado para o enriquecimento de bactérias anammox durante a Fase 1

Componentes	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )
NH <sub>4</sub> Cl	Variável
NaNO <sub>2</sub>	Variável
KHCO <sub>3</sub>	0,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,027
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,18
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,3
Solução de micronutrientes I	1 mL
Solução de micronutrientes II	1,25 mL

**Fonte:** Dapena-Mora et al. (2004) e Van de Graaf et al. (2006)

**Tabela 5.4** - Composição das soluções de micronutrientes adicionadas ao meio de cultura utilizado para o enriquecimento de bactérias anammox durante a Fase 1

Componentes	Concentração (g.L <sup>-1</sup> ) para a solução I	Concentração (g.L <sup>-1</sup> ) para a solução II
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	6,25	15,0
FeSO <sub>4</sub>	6,25	-
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	-	0,43
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	-	0,24
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	-	0,99
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	-	0,25
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	-	0,22
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	-	0,19
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	-	0,08
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	-	0,014

**Fonte:** Dapena-Mora et al. (2004).

As concentrações teóricas de amônio e nitrito iniciais foram iguais a 60 mg.L<sup>-1</sup>. Após a identificação do início da atividade anammox, com consumo simultâneo de amônio e nitrito em proporções estequiométricas para esta reação (1,32 mol de nitrito por mol de amônio) as

concentrações destes dois compostos e as cargas de nitrogênio aplicadas, foram sendo aumentadas, de acordo com a Tabela 5.5. A Fase 1 teve duração de 285 dias.

**Tabela 5.5** - Concentrações e cargas (amônio mais nitrito) teóricas de nitrogênio aplicadas ao RBS em escala laboratorial

Dias de operação	Concentração de N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	Concentração de N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	Relação N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	TDH (h)	Carga volumétrica de nitrogênio aplicada <sup>a</sup> (g.m <sup>-3</sup> .d <sup>-1</sup> )
0-88	60	60	1	96	30
88-117	60	60	1	73	40
118-133	80	106	1,32	73	61
134-159	100	132	1,32	73	77
160-179	130	170	1,32	73	99
180-206	150	198	1,32	73	115
207-251	200	260	1,32	73	152
251-285	250	330	1,32	73	191

<sup>a</sup> A Carga de nitrogênio refere-se à carga de amônio mais nitrito aplicada.

### 5.2.2 Fase 2: Alimentação do RBS em escala laboratorial com digestato de resíduo alimentar mais nitrito

Durante a Fase 2, o RBS em escala laboratorial foi alimentado com digestato proveniente do tratamento de resíduo alimentar (descrito no item 5.1). Esta fase do experimento teve duração de 61 dias (do dia 286 até o dia 347 de operação). Antes de ser adicionado ao RBS-Lab, o digestato foi diluído três a quatro vezes em água destilada. Nitrito foi adicionado ao reator separadamente, a fim de evitar seu consumo durante o armazenamento do digestato por grupos microbianos presentes, que eventualmente utilizem este composto. As concentrações teóricas de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> adicionadas ao RBS nesta fase variaram de 200 a 400 mg.L<sup>-1</sup>, de acordo com as concentrações de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> aplicadas, para manter a relação N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> próximo à 1,32. O reator foi operado em condições anóxicas e o TDH foi igual a 73 horas.

### 5.2.3 Fase 3: Avaliação de diferentes estratégias de aeração e da suplementação de alcalinidade na remoção de nitrogênio pelos processos de nitrificação parcial e anammox (NP/A) em RBS em escala laboratorial

A Fase 3 consistiu na avaliação de diferentes estratégias de aeração a fim de verificar qual a melhor alternativa, dentre as avaliadas, para promover o processo de nitrificação parcial, com objetivo de fornecer nitrito e amônio em proporções estequiométricas para as bactérias anammox.

Durante esta fase, o reator foi alimentado com o efluente proveniente do tratamento anaeróbio de resíduos alimentares diluído quatro vezes em água destilada. Entretanto, não foi adicionado nitrito ao RBS-Lab (com exceção do período entre os 628 e 788 dias de operação do RBS). O TDH foi igual a 73 horas. Ar foi fornecido ao reator por meio de uma bomba de ar comprimido (*Big air* A420). A bomba foi ligada a um temporizador analógico, programado para ligar e desligar a aeração, conforme os tempos estabelecidos pelas estratégias avaliadas apresentadas na Tabela 5.6.

**Tabela 5.6** - Estratégias de aeração avaliadas no RBS em escala laboratorial

Estratégia	Dias de operação	Duração (dias)	Taxa de ar aplicada ( $L \cdot \text{min}^{-1} \cdot L_{\text{reator}}^{-1}$ )	Período (minutos) <sup>b</sup>	
				Aeração ligada	Aeração desligada
E1 – Intermitente	348-382	34	0,200	45	15
E2 – Intermitente	383-431	48	0,075	15	15
E3 – Intermitente	432-491	59	0,125	15	30
E4 – Intermitente	492-536	44	0,125	15	45
E5 – Contínua	537-571	34	0,125	Todo o período	-
E6 – Intermitente <sup>a</sup>	572-627	55	0,125	15	45
E7 – Intermitente	789-829	40	0,026	15	45
E8 – Intermitente	830-871	41	0,026	15	30

<sup>a</sup> Durante a estratégia E6 as mesmas condições da estratégia E4 foram utilizadas, entretanto bicarbonato de potássio foi adicionado ao reator; <sup>b</sup> A aeração era ligada/desligada sucessivamente durante os períodos de alimentação e reação do reator. Durante os períodos de sedimentação e retirada de efluente a aeração permaneceu sempre desligada.

Durante a estratégia E6 as mesmas condições da estratégia E4 foram utilizadas. Entretanto, solução de bicarbonato de potássio ( $\text{KHCO}_3$ ) nas concentrações de 500 até 780  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , o que equivale a aproximadamente 250 a 385  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de alcalinidade em termos de  $\text{CaCO}_3$ , respectivamente, foram adicionadas ao sistema a fim de avaliar se a alcalinidade era um fator limitante para a remoção de nitrogênio, já que foi observado, durante as estratégias anteriores elevado consumo de alcalinidade no RBS (conforme apresentado no item 6.1.3).

Entre os dias 628 e 788 de operação (160 dias) o reator foi operado em condições anóxicas com objetivo de recuperar a atividade anammox, já que foi observado um decréscimo na remoção de nitrogênio durante as seis primeiras estratégias de aeração avaliadas em relação às Fases 1 e 2 de operação. Primeiramente, realizou-se uma tentativa de recuperação adicionando digestato de resíduo alimentar diluído mais nitrito (Período R1). Observou-se baixa remoção de nitrogênio durante esta primeira tentativa de recuperação, então optou-se por adicionar meio de cultura mineral e autotrófico (Tabelas 5.3 e 5.4), em período posterior (R2), em que foi possível

recuperar a atividade anammox no reator. Após o período de recuperação com meio mineral e autotrófico, o reator começou a ser alimentado novamente com digestato de resíduo alimentar diluído mais nitrito (R3). Na Tabela 5.7 são apresentadas as concentrações teóricas de  $\text{N-NO}_2^-$  durante os períodos de recuperação com digestato de resíduo alimentar mais nitrito (R1 e R3) e as concentrações teóricas de  $\text{N-NH}_4^+$  e  $\text{N-NO}_2^-$  durante o período de recuperação com meio de cultura (R2).

**Tabela 5.7-** Concentrações teóricas de amônio e nitrito durante os períodos de recuperação do RBS em escala laboratorial

Período de recuperação	Dias de operação	Tipo de afluente	Concentração de $\text{N-NH}_4^+$ ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	Concentração de $\text{N-NO}_2^-$ ( $\text{mg.L}^{-1}$ )
R1	628-663	Digestato de resíduo alimentar	-	75 a 150 <sup>a</sup>
R2	664-719	Meio de cultura	90 a 130 <sup>b</sup>	120 a 170 <sup>b</sup>
R3	720-788	Digestato de resíduo alimentar	-	150 a 200 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Concentrações teóricas adicionada ao RBS juntamente com o digestato de resíduo alimentar; <sup>b</sup> Concentrações teóricas no meio de cultura.

#### 5.2.3.1 Avaliação da atividade anammox específica durante o período de recuperação R2

Durante o período R2 de recuperação, experimento para avaliar a taxa de consumo dos compostos nitrogenados e a atividade anammox específica no reator foi realizado. O experimento foi realizado em triplicada, aos 687, 691 e 692 dias de operação, com adição de meio de cultura mineral e autotrófico ao reator (Tabelas 5.3 e 5.4). As concentrações afluentes e efluentes teóricas de  $\text{N-NH}_4^+$  e  $\text{N-NO}_2^-$  foram iguais a  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $132 \text{ mg.L}^{-1}$ , respectivamente.  $\text{N-NO}_3^-$  não foi adicionado. Os experimentos foram realizados ao longo de 8 horas, sendo que a cada 2 horas, efluente era coletado para análise dos compostos nitrogenados. Os valores foram plotados em gráficos de dispersão utilizando o modelo de regressão linear. A taxa de consumo de  $\text{N-NH}_4^+$  e  $\text{N-NO}_2^-$  e a produção de  $\text{N-NO}_3^-$  foram obtidos pelo coeficiente angular das equações das retas obtidas.

#### **5.2.4 Análises estatísticas**

A remoção de nitrogênio durante as Fases de operação 1 e 2 foram comparadas por meio de análises estatísticas utilizando o *Software Statistica* 8.0. Primeiramente, foi avaliado se os dados obtidos seguiam distribuição normal por meio do teste *Shapiro-Wilk* ( $\alpha=5\%$ ). Posteriormente, foi aplicado o teste U de *Mann-Whitney* para comparação das medianas dos resultados obtidos ( $\alpha=5\%$ ).

A fim de avaliar a melhor estratégia de aeração obtida, dentre as cinco primeiras avaliadas (E1 a E5) na Fase 3 foi aplicado o teste *Kruskal-Wallis* para comparação entre medianas ( $\alpha=5\%$ ), seguido de teste de comparação múltipla entre medianas ( $\alpha=5\%$ ), para os casos em que houve diferença significativa entre as medianas no teste *Kruskal-Wallis*.

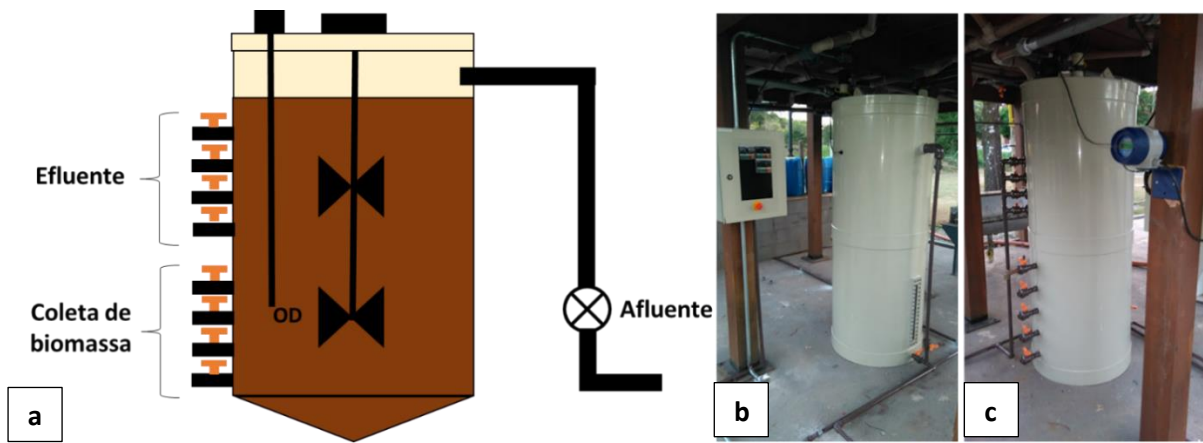
Posteriormente, a estratégia de aeração E4 foi comparada com a estratégia E6, para avaliar se a adição de alcalinidade influenciou a remoção de nitrogênio. Esta comparação foi feita por meio do teste U de *Man-Whitney* ( $\alpha=5\%$ ). Esse teste também foi utilizado para comparar as duas últimas estratégias avaliadas, E7 e E8, com as estratégias E4 e E3, respectivamente, com objetivo de avaliar se menores taxas de ar aplicadas foram mais eficientes na remoção de nitrogênio no reator.

### **5.3 Experimentos realizados durante a Etapa 2 da pesquisa**

Os experimentos realizados durante Etapa 2 da pesquisa foram idealizados para possibilitar o alcance dos objetivos específicos 6 e 7 e subsidiar a confirmação (ou não) das hipóteses associadas a estes mesmos objetivos (ver Capítulos 3 e 4). A Etapa 2 foi realizada na plataforma de metanização de resíduos sólidos orgânicos (pMethar) localizada no Quarteirão 10 da UFMG em um RBS em escala piloto (RBS-Piloto), o qual é descrito no item subsequente.

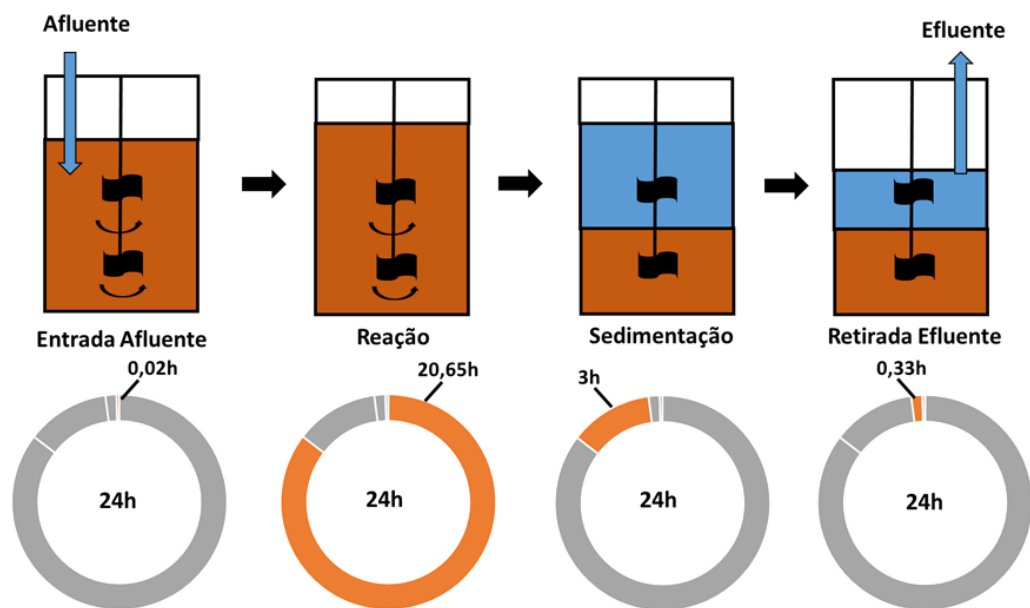
#### **5.3.1 Enriquecimento de bactérias anammox em RBS em escala piloto com digestato de resíduo alimentar e suplementação com nitrito**

O enriquecimento de bactérias anammox em escala piloto foi realizado em RBS de mistura completa, fabricado em polietileno com altura e diâmetro iguais a 1,80 e 0,70 m, respectivamente, e volume de trabalho igual a 0,5 m<sup>3</sup> (500 L). O reator foi operado em temperatura ambiente, cujas médias mensais variaram de 20 a 24 °C em Belo Horizonte, segundo o Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), durante o período de monitoramento do reator (agosto de 2017 a abril de 2018) (<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=bdmep/bdmep>). A Figura 5.7 mostra a representação esquemática e imagem do RBS em escala piloto.



**Figura 5.6** - Representação esquemática (a) e imagens do RBS em escala piloto (b e c).

O RBS em escala piloto foi operado em ciclos com duração de 24 horas, com quatro períodos distintos, assim como o RBS-Lab. A duração de cada período dentro do ciclo de reação do RBS piloto é apresentada na Figura 5.7.



**Figura 5.7** - Ciclo de operação do RBS em escala piloto com duração de cada período de operação

O lodo utilizado como inóculo foi proveniente do sistema de lodos ativados da ETE-Arrudas, que trata esgoto sanitário proveniente da sub-bacia do Ribeirão Arrudas, em Belo Horizonte. Esta ETE é operada pela COPASA. O lodo foi coletado da linha de recirculação do sistema de lodos ativados a partir do decantador secundário. Uma massa de aproximadamente 1,14 kg de STV, correspondente a um volume de 500 litros de lodo, com concentração igual a 2,27 g STV.L<sup>-1</sup> foi inoculado no RBS-Piloto.

Durante os primeiros 28 dias de operação, o reator foi alimentado somente com solução contendo  $\text{N-NO}_3^-$  de modo que a concentração final no interior do reator permanecesse em torno de  $20 \text{ mg.L}^{-1}$ . A partir dos 28 dias de operação, o reator passou a ser alimentado com efluente proveniente da digestão anaeróbia de resíduo alimentar diluído quatro vezes e suplementado com solução de nitrito, na concentração de  $\text{N-NO}_2^-$  igual  $150 \text{ mg.L}^{-1}$ . O RBS piloto foi operado durante todo o período de monitoramento com TDH igual a 10 dias.

## 5.4 Análises Físico-Químicas

### 5.4.1 Caracterização dos efluentes gerados na plataforma de metanização de resíduo alimentar e monitoramento dos RBS em escala laboratorial e piloto

A caracterização dos efluentes gerados na plataforma de metanização de resíduos e o monitoramento dos RBS em escala laboratorial e piloto em cada fase experimental foram realizados por meio das análises físico-químicas e frequências de monitoramento apresentadas na Tabela 5.8.

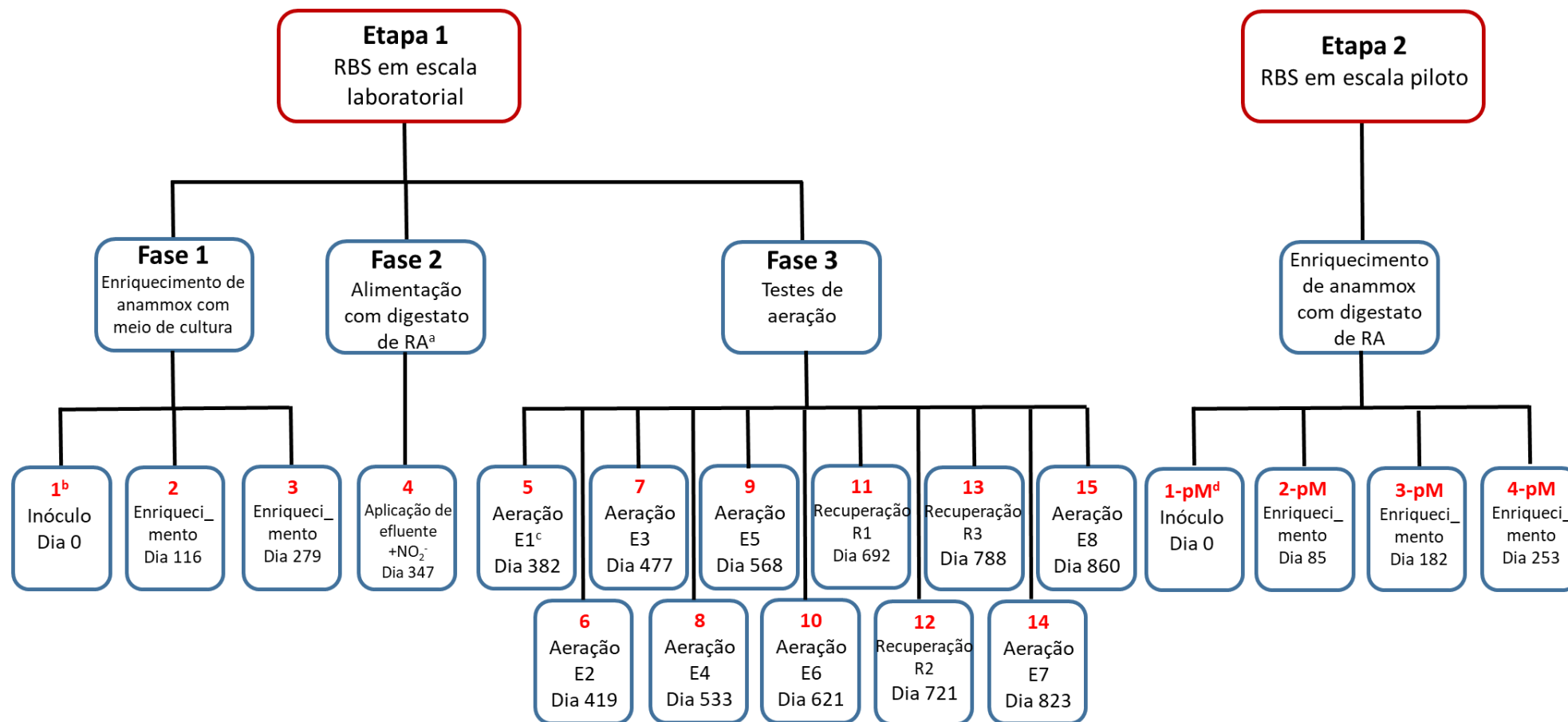
**Tabela 5.8** - Parâmetros de análise, frequências de monitoramento e métodos analíticos utilizados durante a pesquisa

Parâmetro	Fases <sup>a</sup>	Método	Frequência <sup>b</sup>	Referência
ST e SV	CE Etapa 1 Etapa 2	Gravimétrico (2540)	1 a 3	APHA (2012)
DQO total	CE Etapa 1 – Fases 2 e 3 Etapa 2	Colorimétrico, refluxo fechado (5220 D)	3	APHA (2012)
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	CE Etapa 1 Etapa 2	Colorimétrico (4500 NH <sub>3</sub> F)	3 a 5	APHA (2012)
N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	CE Etapa 1 Etapa 2	Colorimétrico (4500 NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> B)	3 a 5	APHA (2012)
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	CE Etapa 1 Etapa 2	Kit NitraVer <sup>®</sup> 5 Nitrate Reagent, Hach ou Cromatografia iônica <sup>c</sup>	3 a 5	De acordo com instruções do fabricante ou APHA (2012)
Alcalinidade	CE Etapa 1 – Fases 2 e 3 Etapa 2	Potenciométrico (2320)	1	APHA (2012)

<sup>a</sup> Fases em que os parâmetros serão monitorados; CE: Caracterização dos efluentes da plataforma de metanização de resíduos sólidos; <sup>b</sup> Frequência de análises semanais; <sup>c</sup> Para os efluentes da Etapa 1, Fases 2 e 3 durante os períodos de recuperação e durante a Etapa 2 foi usada a cromatografia iônica para análise de nitrato.

## **5.5 Análises moleculares**

Amostras da biomassa dos RBS (escala laboratorial e piloto) foram coletadas para a caracterização da comunidade microbiana por meio de técnicas moleculares. A Figura 5.8 apresenta um fluxograma das coletas realizadas para a caracterização microbiológica das amostras de biomassa dos reatores.



**Figura 5.8** - Fluxograma das amostras coletadas para a caracterização microbiológica dos RBS laboratorial e piloto. <sup>a</sup> RA: Resíduo alimentar; <sup>b</sup> Número da coleta de biomassa; <sup>c</sup> Estratégia de aeração; <sup>d</sup> pM: Plataforma de Metanização (pMethar). . E1: 45min aeração on/ 15 min off, 0,2 L.min<sup>-1</sup>.L<sub>reator</sub><sup>-1</sup>; E2: 15 min on/15 min off, 0,075 L.min<sup>-1</sup>.L<sub>reator</sub><sup>-1</sup>; E3: 15 min on/ 30 min off, 0,125 L.min<sup>-1</sup>.L<sub>reator</sub><sup>-1</sup>; E4: 15 min on/ 45 min off, 0,125 L.min<sup>-1</sup>.L<sub>reator</sub><sup>-1</sup>; E5: aeração contínua, 0,125 L.min<sup>-1</sup>.L<sub>reator</sub><sup>-1</sup>; E6: 15 min on/45 min off, 0,125 L.min<sup>-1</sup>.L<sub>reator</sub><sup>-1</sup>, com adição de CaCO<sub>3</sub>; R1, R2 e R3: períodos de recuperação; E7: 15 min on/ 45 min off, 0,026 L.min<sup>-1</sup>.L<sub>reator</sub><sup>-1</sup>; E8: 15 min on/ 30 min off, 0,026 L.min<sup>-1</sup>.L<sub>reator</sub><sup>-1</sup>.

Na Tabela 5.9, descrição das amostras coletadas para as análises microbiológicas é apresentada.

**Tabela 5.9** - Descrição das amostras coletas para as análises de biologia molecular

Coleta	Nome da Amostra/ Fase operacional	Dia de operação	Descrição da amostra
<b>RBS-Lab</b>			
1	Inóculo	0	Inóculo
2	Fase 1	116	Enriquecimento com meio de cultura
3	Fase 1	279	Enriquecimento com meio de cultura
4	Fase 2	347	Alimentação com digestato + NO <sub>2</sub> -
5	Fase 3 E1	382	Aeração intermitente: 45min aeração on/ 15 min off, 0,2 L.min <sup>-1</sup> .L <sub>reator</sub> <sup>-1</sup>
6	Fase 3 E2	419	Aeração intermitente: 15 min on/15 min off, 0,075 L.min <sup>-1</sup> .L <sub>reator</sub> <sup>-1</sup>
7	Fase 3 E3	477	Aeração intermitente: 15 min on/ 30 min off, 0,125 L.min <sup>-1</sup> .L <sub>reator</sub> <sup>-1</sup>
8	Fase 3 E4	533	Aeração intermitente: 15 min on/ 45 min off, 0,125 L.min <sup>-1</sup> .L <sub>reator</sub> <sup>-1</sup>
9	Fase 3 E5	568	Aeração contínua, 0,125 L.min <sup>-1</sup> .L <sub>reator</sub> <sup>-1</sup>
10	Fase 3 E6	621	Aeração intermitente: 15 min on/45 min off, 0,125 L.min <sup>-1</sup> .L <sub>reator</sub> <sup>-1</sup> , suplementação com alcalinidade
11	Fase 3 R1	692	Recuperação com digestato + nitrito
12	Fase 3 R2	721	Recuperação com meio de cultura
13	Fase 3 R3	788	Recuperação com digestato + nitrito
14	Fase 3 E7	823	Aeração intermitente: 15 min on/ 45 min off, 0,026 L.min <sup>-1</sup> .L <sub>reator</sub> <sup>-1</sup>
15	Fase 3 E8	860	Aeração intermitente: 15 min on/ 30 min off, 0,026 L.min <sup>-1</sup> .L <sub>reator</sub> <sup>-1</sup>
<b>RBS-Piloto</b>			
1-pM	Inóculo	0	Inóculo
2-pM	85d	85	Enriquecimento com digestato mais nitrito
3-pM	182d	182	Enriquecimento com digestato mais nitrito
4-pM	253d	253	Enriquecimento com digestato mais nitrito

As amostras de biomassa referentes às coletas 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15 e 16 do RBS em escala laboratorial e às coletas 1-pM, 2-pM, 3-pM e 4-pM do RBS em escala piloto foram submetidas à análise da comunidade microbiana por meio da Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR) para bactérias do ciclo do nitrogênio, de PCR seguida de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (PCR-DGGE) para o domínio *Bacteria* e bactérias anammox e à análise de diversidade microbiana por sequenciamento de nova geração (SNG). As amostras referentes às coletas 2 e 12 foram submetidas apenas à análise por qPCR. Nos itens a seguir, detalhamento acerca das técnicas utilizadas é realizado.

### 5.5.1 Extração de DNA

As amostras de biomassa foram coletadas e centrifugadas a 4000 RPM por 20 minutos. Após centrifugação as amostras foram lavadas três vezes em 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), sendo centrifugadas novamente após cada lavagem. Alíquotas contendo 0,5 grama da amostra de biomassa foram então submetidas à extração do DNA genômico dos micro-organismos por meio do o kit comercial *Power Soil DNA Kit, MoBio laboratórios, Inc., Carlsbad, CA, EUA*, seguindo as instruções do fabricante. Para a verificação do resultado da extração, alíquotas de 3,0 µl do DNA extraído das amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,2% (80 volts, 40 minutos). O DNA foi quantificado em espectrofotômetro *Nanodrop 1000 (Thermo Scientific)*.

### 5.5.2 Detecção e quantificação de bactérias do ciclo do nitrogênio por PCR quantitativo (qPCR)

A técnica de PCR quantitativo foi utilizada para estimar o número de cópias dos genes RNAr 16S ou genes funcionais de bactérias envolvidas no ciclo do nitrogênio nos reatores utilizados neste estudo ao longo das fases de operação.

As curvas-padrão foram construídas a partir de plasmídeos recombinantes contendo genes específicos dos organismos alvo, com exceção do gene amônia monoxigenase (*AmoA*) de bactérias oxidadoras de amônia (BOA). Os plasmídeos foram obtidos por meio de clonagem de produtos 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, uma vez que foram obtidos em pesquisas anteriormente realizadas por Mac Conell (2014).

Considerando que 1 mol de par de base (pb) possui 649 g, que 1 mol possui  $6,022 \times 10^{23}$  moléculas (ou cópias) e que o tamanho do plasmídeo recombinante é igual ao tamanho do plasmídeo (3015pb) + inserto (variável de acordo com o grupo alvo), o cálculo para a obtenção da concentração (em número de cópias.µL<sup>-1</sup>) dos plasmídeos no primeiro ponto das curvas padrão foi realizado de acordo com a Equação 5.1.

$$\text{Número de cópias. } \mu\text{L}^{-1} = \frac{\text{Concentração do plasmídeo recombinante (g/}\mu\text{L)} \times 6,022 \times 10^{23} \text{ cópias}}{\text{Tamanho do plasmídeo recombinante em pb} \times 649 \text{ (g)}} \quad (5.1)$$

Para a quantificação do gene *amoA* de BOA, produtos de PCR foram utilizados para a construção da curva padrão. Amostra positiva para esse gene foi amplificada por PCR utilizando os iniciadores (AmoA-1F e AmoA-2R; Tabela 5.9). Os produtos de PCR foram purificados por meio do kit *Wizard® SV gel and PCR Clean-up system* (Promega), sua concentração foi determinada em *Nanodrop* e diluições sucessivas do produto de PCR foram utilizadas na curva-padrão. O cálculo para a concentração do número de cópias.  $\mu\text{L}^{-1}$  do gene foi realizado de acordo com a Equação 5.1. Entretanto, a concentração do plasmídeo recombinante foi substituída pela concentração do inserto ( $\text{g}/\mu\text{L}$ ), assim como o tamanho do plasmídeo recombinante, foi substituído pelo tamanho do inserto (pb).

Os pares de iniciadores para quantificação dos micro-organismos do ciclo do nitrogênio são especificados na Tabela 5.10. Os reagentes utilizados e suas respectivas concentrações nas reações de qPCR são detalhados na Tabela 5.11. O volume final das reações era igual a 20  $\mu\text{L}$ . As reações foram realizadas em triplicata, tanto para as amostras, quanto para os controles negativos e diluições das curvas padrão. Um termociclador em tempo real modelo *Applied Biosystem 7500* foi utilizado nesta análise. O programa consistiu de 40 ciclos de desnaturação por 1 minuto ( $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), anelamento dos iniciadores por 1 minuto (temperatura de acordo com os iniciadores, conforme especificado na Tabela 5.10) e extensão por 1 minuto. O programa se encerrava com a elaboração da curva de *melting*, a fim de avaliar a pureza dos produtos amplificados. Esta etapa consistiu de 15 segundos a  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 1 minuto a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  e 15 segundos a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**Tabela 5.10** - Iniciadores utilizados na técnica de qPCR

Par de iniciadores	Especificidade (Tamanho do inserto)	Sequência 5'→3'	Temperatura de anelamento (°C)	Referência
1055F 1392R	RNAr 16S do domínio Bacteria (337 pb)	ATGGCTGTCGTCAGCT ACGGGCGGTGTGTAC	53	Ferris <i>et al.</i> (1996)
Pla 46F Amx 667R	RNAr 16S de bactérias anammox (621 pb)	GGATTAGGCATGCAAGTC ACCAGAAGTTCCACTCTC	56	Van der Star <i>et al.</i> (2007)
<i>amoA-1F</i> <i>amoA-2R</i>	Enzima amônia monoxigenase ( <i>amoA</i> ) de BOA (491 pb)	GGGGTTTCTACTGGTGG CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	57	Rotthauwe <i>et al.</i> (1997)
Nitro-1198F Nitro-1423R	RNAr 16S de <i>Nitrobacter</i> (397 pb)	ACCCCTAGCAAATCTCAAAA AACCG CTTCACCCCAGTCGCTGACC	58	Graham <i>et al.</i> (2007)
NTSPAF NTSPAR	RNAr 16S de <i>Nitrospira</i> (151 pb)	CGCAACCCCTGCTTTCAGT CGTTATCCTGGGCAGTCCTT	60	Kindaichi <i>et al.</i> (2006)
<i>nosZ F</i> <i>nosZ1622R</i>	Enzima óxido nitroso redutase ( <i>nosZ</i> ) de bactérias desnitrificantes (500 pb)	CGYTGTTCMTCGACAGCCAG CGSACCTTSTTGCCSTYGCG	55	Enwall <i>et al.</i> (2005)

**Tabela 5.11** - Concentração dos reagentes utilizados na técnica de qPCR

Reagente	Concentração na solução estoque	Concentração final por 20 µL de reação	Volume por reação (µL)
Água ultrapura	-	-	7,5
<i>Master Mix</i> *	2x	1x	10
Iniciador 1	30 pmol.µL <sup>-1</sup>	375 nM	0,25
Iniciador 2	30 pmol.µL <sup>-1</sup>	375 nM	0,25
Amostra de DNA	2	0,5 ng.µL <sup>-1</sup>	2,0

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

O resultado final foi expresso em número de cópias.g de lodo<sup>-1</sup>. Para isso, o resultado obtido em número de cópias.µL<sup>-1</sup> foi multiplicado pelo volume de DNA utilizado na reação (2 µL).

Em seguida, foi multiplicado pelo volume total de DNA obtido na extração de DNA (100 µL) e em seguida multiplicado pela massa de lodo utilizada para a extração de DNA (0,5 g).

### 5.5.3 Análise dos perfis da comunidade microbiana por PCR-DGGE

A análise dos perfis da comunidade microbiana em cada fase de operação, foi avaliada pela técnica da PCR seguida pela Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE). A partir das amostras de DNA extraídos, foi realizada a PCR utilizando iniciadores que tem como alvo o gene RNAr 16S do domínio Bacteria e também o RNAr 16S de bactérias anammox (Tabela 5.12). Ao iniciador 1392r (para Domínio *Bacteria*) e A438F (bactérias anammox) foi adicionado um grampo GC (CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCGCCCCGCCCC) que tem como objetivo facilitar a separação das bandas durante a eletroforese.

**Tabela 5.12** - Iniciadores a serem utilizados na técnica de PCR-DGGE

Par de iniciadores	Especificidade	Sequência (5'→3')	Referência
1055F 1392R	RNAr 16S do domínio Bacteria	ATGGCTGTCGTCAGCT ACGGGCGGTGTGTAC	Ferris <i>et al.</i> (1996)
A438F A684R	RNAr 16S de bactérias anammox	GTCRGGAGTTADGAAATG GAAGTTCCACTCTC	Sonthiphand e Neufeld (2013)

As concentrações dos reagentes utilizados na reação de PCR-DGGE são descritas na Tabela 5.13.

**Tabela 5.13** - Concentração dos reagentes utilizados na técnica de PCR-DGGE

Reagente	Concentração da Solução estoque	Concentração final na reação	Volume para reação de 50 µL
H <sub>2</sub> O ultrapura	-	-	20
Pré-Mix	2x	1x	25
Iniciador 1	30 pmol.µL <sup>-1</sup>	300 nM	0,5
Iniciador 2	30 pmol.µL <sup>-1</sup>	300 nM	0,5
Albumina de soro bovina (BSA)	5 ng.µL <sup>-1</sup>	0,3 ng.µL <sup>-1</sup>	3
DNA	variável	variável	1

\*O Pré-Mix (*Phoneutria*) possui todos os reagentes básicos para a reação da PCR, ou seja, tampão de uso padrão, nucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) e a enzima *Taq DNA Polimerase*.

A reação de PCR para o DGGE do domínio Bacteria foi realizado de acordo com as condições de amplificação recomendadas por Ferris *et al.* (1996) com os iniciadores 1055F/ 1392R-GC. A reação da PCR consistiu de desnaturação inicial a 94 °C por 4 minutos, 30 ciclos de desnaturação (94 °C, 1 minuto), anelamento (55 °C, 1 minuto) e extensão (72 °C, 1 minuto) e a extensão final foi realizada a 72 °C por 10 minutos.

Para bactérias anammox, foi realizado um *Nested* PCR de acordo com condições descritas por Sonthiphand e Neufeld (2013). Para a primeira reação de PCR foram utilizados os iniciadores Pla 46F/ 1392R. As condições da reação consistiram de desnaturação inicial a 95 °C, 35 ciclos de desnaturação (95 °C, 45 segundos), anelamento (59 °C, 1 minuto) e extensão (72 °C, 1 minuto) e extensão final a 72 °C por 1 minuto. O produto de PCR desta primeira reação foi então reamplificado com os iniciadores A438F-GC/ A684R. A segunda reação de PCR consistiu de desnaturação inicial a 96 °C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação (95 °C, 30 segundos), anelamento (55 °C, 30 segundos) e extensão (72 °C, 30 segundos) e extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,2% para avaliar se o tamanho do fragmento obtido estava de acordo com o esperado. Posteriormente foram quantificados por meio de comparação com o marcador de peso molecular *Low DNA mass Ladder* (Invitrogen) utilizando-se o processador de imagens *ImageJ* 1.6.0.

Após a quantificação, 500 ng dos produtos de PCR foram aplicados em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante de ureia e formamida. A porcentagem de acrilamida (massa/volume), bem como o gradiente e as condições da eletroforese são apresentadas na Tabela 5.14.

**Tabela 5.14** - Porcentagens de acrilamida, gradientes e condições de corrida utilizadas no DGGE

DGGE	Acrilamida (massa/volume; %)	Gradiente desnaturante (ureia e formamida; %)	Voltagem da Eletroforese (V)	Tempo de corrida (h)
Domínio Bacteria	8	50-75	80	16
Bactérias Anammox	10	30-70	85	15

Após a corrida, os géis foram corados por 20 minutos em solução do corante SYBR<sup>®</sup> *gold* (Invitrogen), observado em transiluminador de LED *Nippon Genetics* e as imagens foram

obtidas por meio de sistema de captura de imagem. O perfil de bandas obtidos nos géis de DGGE foram analisados pelo software *Bionumerics 2.5 (Applied Maths)*. O coeficiente de similaridade de *Dice* foi calculado para avaliar a similaridade entre os perfis obtidos. Os dendrogramas foram contruídos por meio do método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages*). As bandas mais predominantes em cada gel foram recortadas, eluídas em Tampão TE (Tris 10mM e EDTA 1mM, pH 8,0) e reamplificadas com os mesmos iniciadores utilizados, porém sem cauda GC. Os produtos de PCR foram purificados e enviados para o sequenciamento (realizado pela empresa Macrogen Inc., Coréia) em sequenciador 3730XL. As sequências obtidas foram comparadas com aquelas depositadas no *GenBank* utilizando a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) do NCBI (*National Center of Biotechnology Information*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e também com as sequencias depositadas na base de dados RDP *classifier* (<https://rdp.cme.msu.edu>) (WANG *et al.*, 2007).

#### **5.5.4 Análise da diversidade microbiana dos reatores por sequenciamento de nova geração**

A técnica de sequenciamento de nova geração (SNG) utilizando a plataforma MiSeq (Illumina), foi aplicada com o objetivo de avaliar mais ampla e detalhadamente as comunidades microbianas dos reatores utilizados neste experimento durante as diferentes fases de operação. Os DNAs extraídos foram enviados para o sequenciamento com os iniciadores 515F (GTGYCAGCMGCCGCGGTAA) e o 806R (GGACTACNVGGGTWTCTAAT) que tem como alvo a região V4 do RNAr 16S de Archaea e Bacteria (CAPORASO *et al.*, 2011).

Os barcodes foram adicionados ao primer *forward* e a reação de PCR foi realizada sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, 28 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 53 °C por 45 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto. Extensão final foi realizada a 72 °C por 5 minutos. O kit Master Mix *HotStar Taq Plus* (Quiagen, EUA) foi utilizado na reação de PCR. Após a amplificação os produtos foram verificados em gel de agarose 2%. Os produtos da PCR foram então purificados utilizando beads Ampure XP para formar a biblioteca de DNA. O sequenciamento foi realizado pela empresa MrDNA (Shallowater, TX, EUA) em plataforma MiSeq (Illumina) seguindo as instruções do fabricante.

As sequências brutas foram processadas usando o software MOTHUR v.1.33.0 (SCHLOSS *et al.*, 2009) de acordo com o Procedimento Operacional Padrão para a plataforma MiSeq (Illumina) (KOZICH *et al.*, 2013). Sequências com baixa qualidade, sequências ambíguas e

homopolímeros maiores que 8 nucleotídeos foram removidos. As sequências filtradas foram alinhadas e classificadas de acordo com a base dados SILVA v. 132 (QUAST *et al.*, 2012). Quimeras foram removidas utilizando o algoritmo UCHIME (EDGAR *et al.*, 2011). As sequências restantes foram agrupadas em OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais) com 97% de similaridade. Índices de diversidade alfa e beta foram calculados utilizando a plataforma R (<https://www.r-project.org>), com os pacotes *Phyloseq* (McMURDIE e HOLMES, 2013) e *Vegan* (OKSANEN *et al.*, 2013). Para o cálculo dos índices, as sequências foram reamostradas para que todas as amostras ficassem com o mesmo número de sequências daquela com menor número. Para isso foi utilizado o comando “rarefy\_even\_deph” do pacote *Phyloseq*. A dissimilaridade entre as comunidades microbianas de diferentes amostras foi calculada por meio do índice de dissimilaridade de *Bray-curtis* e ordenadas por meio de análise de coordenadas principais (PCoA). *Heatmaps* com os táxons mais abundantes relacionados ao ciclo do nitrogênio foram construídos com o pacote *Phyloseq*.

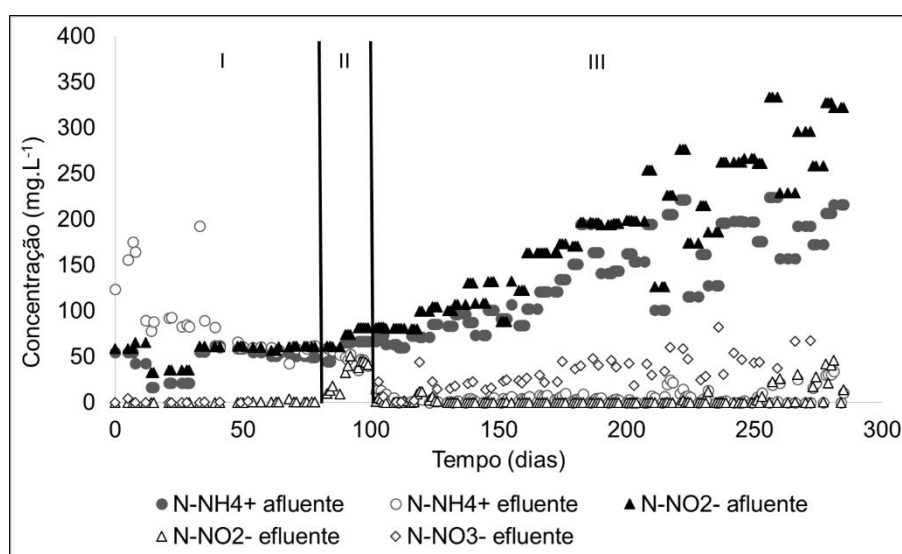
## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Experimentos realizados durante a Etapa 1 da pesquisa

#### 6.1.1 Avaliação do efeito da aplicação de digestato de resíduo alimentar

##### 6.1.1.1 Enriquecimento de bactérias anammox com meio de cultura – Fase 1

A Figura 6.1 apresenta as concentrações afluentes e efluentes dos compostos nitrogenados ( $\text{N-NH}_4^+$ ,  $\text{N-NO}_2^-$  e  $\text{N-NO}_3^-$ ) no RBS em escala laboratorial desde sua partida até os 285 dias de operação (Fase 1). Na Tabela A1 do Apêndice A a estatística descritiva das concentrações afluentes e efluentes dos compostos nitrogenados é apresentada. Com base no consumo de amônio e nitrito é possível observar três períodos distintos: (a) Período I: período inicial, no qual predominou o processo de desnitrificação heterotrófica; (b) Período II: período em que houve diminuição da atividade de bactérias desnitrificantes; (c) Período III: período em que inicia e predomina a atividade de bactérias anammox.



**Figura 6.1** - Dinâmica dos compostos nitrogenados ( $\text{N-NH}_4^+$ ,  $\text{N-NO}_2^-$  e  $\text{N-NO}_3^-$ ) durante a Fase 1 de operação do RBS-Lab. (I) Período inicial com predominância de desnitrificação heterotrófica; (II) Período com diminuição de atividade de desnitrificação e; (III) Período com atividade anammox.

O Período I correspondeu aos primeiros 84 dias de operação do reator e foi marcado principalmente pela atividade de organismos desnitrificantes, devido à disponibilidade de matéria orgânica no lodo de inóculo, às condições anaeróbias do ambiente e à presença de nitrito, o qual era adicionado no meio afluente ao RBS. Nesta fase, observou-se intenso

consumo de nitrito, com eficiência de remoção mediana igual a 100%, sendo que o afluente possuía uma concentração mediana igual a  $60,7 \text{ mg.L}^{-1} \text{ N-NO}_2^-$  (Figuras 6.1; Tabela A1). As concentrações efluentes de nitrogênio amoniacal durante os primeiros dias deste período foram superiores às concentrações afluentes, resultando em eficiências negativas de remoção deste composto (Figuras 6.1; Tabela A1). Isso provavelmente ocorreu devido à morte e lise de células de microrganismos aeróbios presentes no lodo de inóculo. A morte celular culminou em liberação de nitrogênio orgânico no meio, o qual foi convertido à nitrogênio amoniacal, que era liberado no efluente do RBS. Além de nitrogênio amoniacal, a morte celular durante este período forneceu também matéria orgânica, que foi utilizada como doador de elétrons para bactérias desnitrificantes heterotróficas. A ocorrência de desnitrificação heterotrófica endógena em períodos de aclimação de reatores anammox é relatada por diversos autores (ARAÚJO *et al.*, 2011; DAPENA-MORA *et al.*, 2004; LÓPEZ *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2014; TOH *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2011).

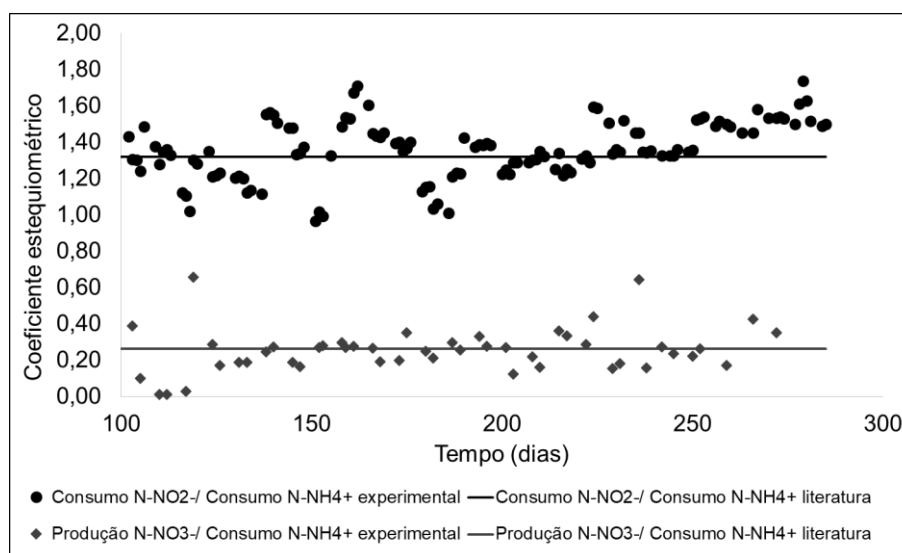
O término do período de intensa atividade desnitrificante no RBS ocorreu a partir de 84 dias de operação, aproximadamente (Período II) (Figura 6.1). Neste período nitrito começou a ser liberado no efluente e o íon amônio começou a ser removido. A concentração afluente de nitrogênio amoniacal foi igual  $66,4 \text{ mg.L}^{-1}$  e de nitrogênio nitroso igual a  $77,7 \text{ mg.L}^{-1}$ , sendo que as eficiências de remoção desses compostos foram iguais a 29% e 47%, respectivamente (Figura 6.1, Tabela A1).

No Período III teve início a atividade anammox no RBS-Lab, com consumo simultâneo de  $\text{N-NO}_2^-$  e  $\text{N-NH}_4^+$  em proporções estequiométricas bem próximas às descritas na literatura para estes micro-organismos (Figura 6.2). Neste período, as concentrações de amônio e nitrito foram sendo aumentadas gradativamente atingindo valores iguais a  $224,2 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $333,7 \text{ mg.L}^{-1}$ , respectivamente (Figura 6.1) e as eficiências medianas de remoção de nitrogênio amoniacal e nitroso foram elevadas, respectivamente 98% e 100% (Tabela A1).

A partir do Período III as concentrações de nitrogênio na forma de nitrato ( $\text{N-NO}_3^-$ ) começaram a ser monitoradas no efluente do RBS (Figura 6.1; Tabela A1), uma vez que este composto é produzido pelas bactérias anammox durante a oxidação anaeróbia da amônia. As concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  no efluente do RBS foram aumentando ao longo do tempo, e variaram de 0,6 a  $82,4 \text{ mg.L}^{-1}$ . Este aumento era esperado, já que as concentrações afluentes de  $\text{N-NH}_4^+$  no meio foram sendo aumentadas gradativamente, durante este período. A concentração mediana de  $\text{N-NO}_3^-$  no efluente do RBS durante o Período III foi igual a  $30,2 \text{ mg.L}^{-1}$ .

Os coeficientes estequiométricos para o consumo de nitrito/ consumo de amônia e para a produção de nitrato/ consumo de amônia durante o Período III de operação permaneceram em torno dos valores relatados na literatura para o processo anammox (Figura 6.2; Tabela A2). De acordo com Strous *et al.* (1998) as bactérias com atividade anammox consomem 1,32 mol de  $\text{N-NO}_2^-$  e produzem 0,26 mol de  $\text{N-NO}_3^-$  para cada mol de  $\text{N-NH}_4^+$  consumido. O consumo e produção destes compostos nestas proporções é uma forte evidência de que a remoção de nitrogênio amoniacal no reator está ocorrendo por meio do processo anammox.

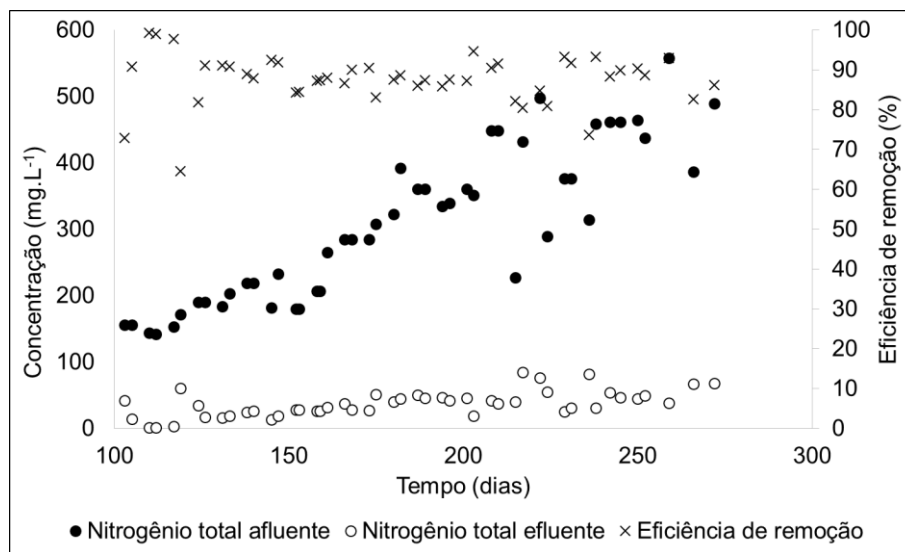
A estatística descritiva dos coeficientes estequiométricos obtidos no Período III da Fase 1 deste experimento é apresentada no Apêndice A, na Tabela A2. O valor mediano para o consumo de  $\text{N-NO}_2^-$  em relação ao de  $\text{N-NH}_4^+$  foi igual a 1,35 e para a produção de  $\text{N-NO}_3^-$  em relação ao consumo de  $\text{N-NH}_4^+$  igual a 0,26. Os coeficientes obtidos foram bem próximos aos relatados na literatura para reatores com atividade anammox, evidenciando o sucesso do enriquecimento desses micro-organismos no RBS-Lab.



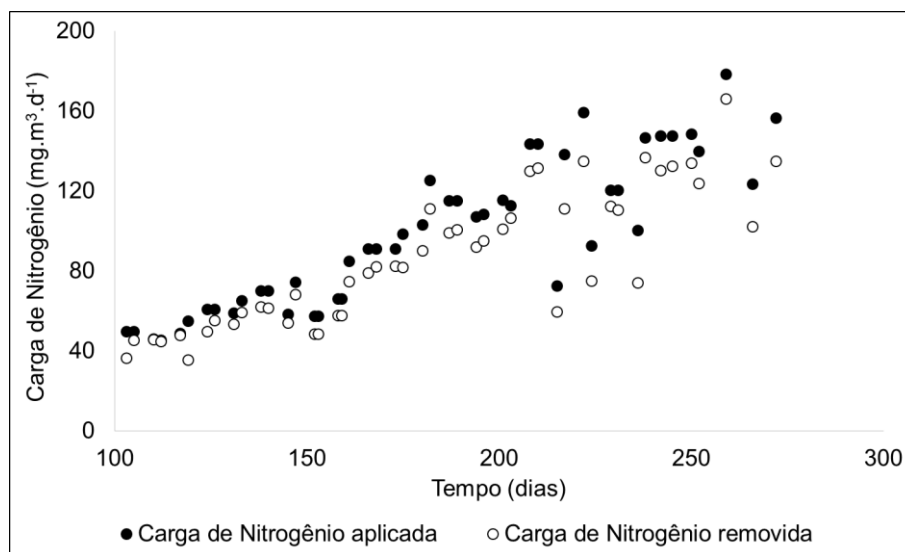
**Figura 6.2** - Coeficientes estequiométricos obtidos durante o Período III da Fase 1 de operação do RBS-Lab

Após identificação de atividade anammox no RBS-Lab, o mesmo foi capaz de remover, em média 88 % do nitrogênio total afluyente ( $\text{N-NH}_4^+ + \text{N-NO}_2^- + \text{N-NO}_3^-$ ), cuja mediana foi igual a 298,5  $\text{mg.L}^{-1}$ . O RBS alcançou neste período carga de nitrogênio máxima removida igual a 166,1  $\text{g.m}^3.\text{d}^{-1}$ , sendo que a mediana foi igual a 81,9  $\text{g.m}^3.\text{d}^{-1}$  (Figuras 6.3 e 6.4; Tabela A3). Cargas de nitrogênio total removidas maiores são reportadas na literatura em outros experimentos realizados em reatores em batelada sequenciais em escala laboratorial tratando

efluentes sintéticos. Wang *et al.* (2011) em RBS de 6,5L de volume alimentado com efluente sintético alcançou carga de nitrogênio removida ( $N-NH_4^+ + N-NO_2^-$ ) igual a  $410,0 \text{ g.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ . López *et al.*, (2008) alcançou carga de nitrogênio ( $N-NH_4^+ + N-NO_2^-$ ) removida igual a  $1.600,0 \text{ g.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$  em um RBS com volume de trabalho igual a 15,8 L, também alimentado com efluente sintético. Entretanto, ressalta-se que os reatores foram operados com TDH menores e com maiores cargas de nitrogênio aplicadas. Além disso, os autores não incluíram no cálculo a carga de nitrato produzida durante a atividade da oxidação anaeróbia da amônia, o que provavelmente promoveria ligeira redução nos valores reportados.



**Figura 6.3** - Concentrações afluentes, efluentes e eficiência de remoção de nitrogênio total ( $N-NH_4^+ + N-NO_2^- + N-NO_3^-$ ) durante o Período III da Fase 1 de operação do RBS-Lab



**Figura 6.4** - Cargas de nitrogênio ( $N-NH_4^+ + N-NO_2^- + N-NO_3^-$ ) aplicadas e removidas durante o Período III da Fase 1 no RBS-Lab

As estimativas das concentrações de sólidos totais voláteis (STV) no RBS-Lab durante a Fase 1 de operação demonstrou que houve perda considerável de sólidos do sistema durante este período operacional, uma vez que a concentração de STV no reator logo após o início da operação (Dia 0) era igual a 8,15 g.L<sup>-1</sup> e ao final da fase de enriquecimento (Dia 279) foi igual a 4,38 g.L<sup>-1</sup>. Esta perda de sólidos pode estar relacionada à seleção de micro-organismos no interior do reator ao longo desta fase de enriquecimento de bactérias anammox com meio de cultura mineral e autotrófico, sendo que muitos micro-organismos com metabolismos aeróbios e heterotróficos foram lavados do reator, ocasionando a diminuição na concentração de sólidos. Os resultados das concentrações de STV ao longo de toda a operação do RBS-Lab é apresentado na Figura A2 do Apêndice C.

A fim de se estabelecer a relação entre o substrato disponível (em termos de nitrogênio total) por unidade de biomassa no RBS-Lab (em termos de STV), a relação A/M (alimento/micro-organismo) foi estimada, de acordo com a equação 6.1 (VON SPERLING, 2002). O valor mediano estimado para a Fase 1 foi igual a 0,02 g N.g STV<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. A estimativa da relação A/M ao longo de todo o período operacional do RBS-Lab é apresentada no Apêndice C, na Tabela A12.

$$\frac{A}{M} = \frac{Q \times S}{V \times X} \quad (6.1)$$

Onde: Q = vazão afluente (m<sup>3</sup>.d<sup>-1</sup>); S = Concentração de N total afluente (g.m<sup>-3</sup>); V = volume do reator (m<sup>3</sup>) e X = concentração de STV (g.m<sup>-3</sup>).

#### 6.1.1.2 Alimentação do RBS-Lab com digestato de resíduo alimentar mais nitrito em condições anaeróbias - Fase 2

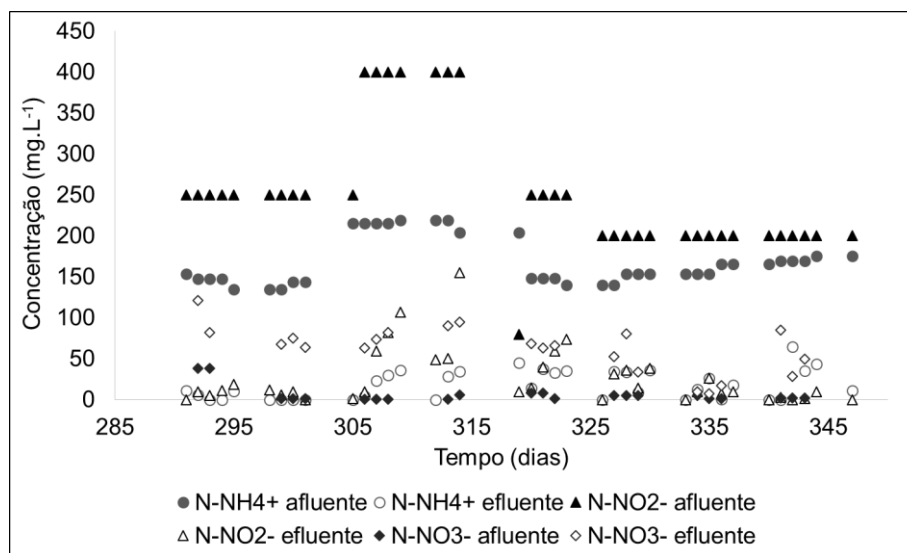
Durante a Fase 2 o RBS-Lab foi alimentado com digestato de resíduo alimentar diluído em água destilada três a quatro vezes e suplementado com solução de NaNO<sub>2</sub> de modo a fornecer o aceptor de elétrons necessário para a respiração de bactérias anammox. As concentrações afluentes e efluentes de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> e N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> durante esta Fase de operação são apresentadas na Figura 6.5 e a estatística descritiva é apresentada na Tabela A4 do Apêndice A.

Nos primeiros 20 dias da Fase 2 o digestato aplicado ao RBS foi diluído quatro vezes, culminando em concentrações de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> afluentes próximas de 150,0 mg.L<sup>-1</sup>. Nitrito foi fornecido em relação estequiométrica (N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/ N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) maior do que 1,32, com objetivo de

fornecer  $\text{N-NO}_2^-$  em excesso para diminuir possíveis relações de competição por esse íon entre bactérias desnitrificantes que eventualmente estivessem presentes no sistema e bactérias anammox. Por esse motivo, as concentrações afluentes de  $\text{N-NO}_2^-$  aplicadas ao RBS foram iguais a  $250,0 \text{ mg.L}^{-1}$ . Como o reator apresentou bom desempenho na remoção de  $\text{N-NH}_4^+$  e  $\text{N-NO}_2^-$  durante os primeiros 20 dias desta fase de operação, o afluente passou a ser diluído três vezes nas semanas subsequentes (305 a 315 dias) e concentração maior de  $\text{N-NO}_2^-$  passou a ser aplicada ( $400 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_2^-$ ). Com isso, foi observado acúmulo de nitrito no efluente do reator e menor remoção do íon amônio em relação aos primeiros 20 dias de operação desta fase. Por esse motivo, a partir dos 320 dias de operação o digestato a ser tratado passou a ser diluído quatro vezes novamente e menor concentração de  $\text{N-NO}_2^-$  foi adicionada ( $200 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_2^-$ ) (Figura 6.5).

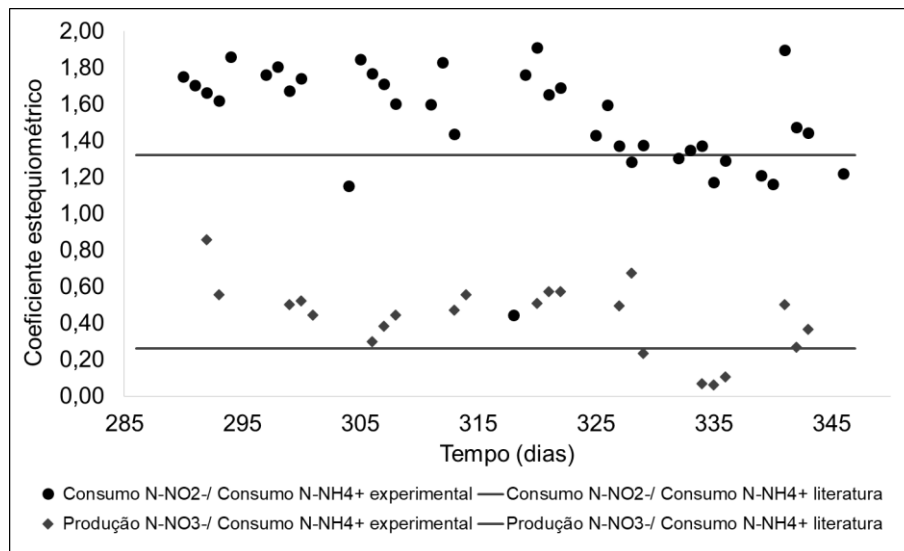
Nitrito em elevada concentração no meio pode ser tóxico para bactérias com atividade anammox. As concentrações inibitórias reportadas na literatura variam consideravelmente. Por exemplo, Strous *et al.* (1999b) relataram concentração igual a  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_2^-$  como sendo inibitória para bactérias anammox em experimentos em batelada. Não obstante, outros autores reportaram inibição de 50% da atividade frente a concentrações mais elevadas de  $\text{N-NO}_2^-$ , variando de 350 a  $400 \text{ mg.L}^{-1}$  (DAPENA-MORA *et al.*, 2007; FERNÁNDEZ *et al.*, 2012). A inibição por nitrito tem sido atribuída por alguns autores a formas não dissociadas desse composto, como o ácido nitroso livre ( $\text{HNO}_2$ ). Outros autores, entretanto, associam a inibição ao íon  $\text{NO}_2^-$  propriamente dito e ao pH do meio (CARVAJAL-ARROYO *et al.*, 2014b). Segundo Carvajal-Arroyo *et al.* (2014b) o pH afeta o equilíbrio  $\text{HNO}_2/\text{NO}_2^-$ , entretanto afeta também outros processos metabólicos como a formação de gradientes de pH para formação de ATP ou proteínas associadas ao transporte ativo de substâncias para dentro das células, sendo que algumas dessas proteínas são transportadoras de  $\text{NO}_2^-$ . Nesse sentido esses autores levantam a hipótese de que a inibição por nitrito é causada pelo acúmulo do íon em algum compartimento intracelular (riboplasma ou anammoxossomo). Esta inibição está fortemente associada ao pH e às condições fisiológicas da célula. Células ativas parecem ser menos propensas à inibição por nitrito do que células em repouso, especialmente quando os valores de pH se encontram abaixo de 7,5. No caso do presente estudo, a exposição a elevados valores de  $\text{N-NO}_2^-$  ( $400 \text{ mg.L}^{-1}$ ) parece ter promovido efeito negativo na remoção de nitrogênio amoniacal no reator mesmo quando operado com valores elevados de pH (que foi, em média, igual a 8,08 durante a Fase 2 de operação).

Apesar disso, de maneira geral, o reator demonstrou bom desempenho na remoção de nitrogênio amoniacal durante esta fase de operação. As concentrações medianas afluentes de  $\text{N-NH}_4^+$  e  $\text{N-NO}_2^-$  foram, respectivamente, iguais a  $141,0 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $250,0 \text{ mg.L}^{-1}$ , sendo que o RBS apresentou valores medianos de eficiência de remoção iguais a 92% para amônia e 95% para nitrito. Nitrato foi produzido no reator e a concentração efluente foi, em média, igual a  $66,9 \text{ mg.L}^{-1}$  (Figura 6.5; Tabela A4).



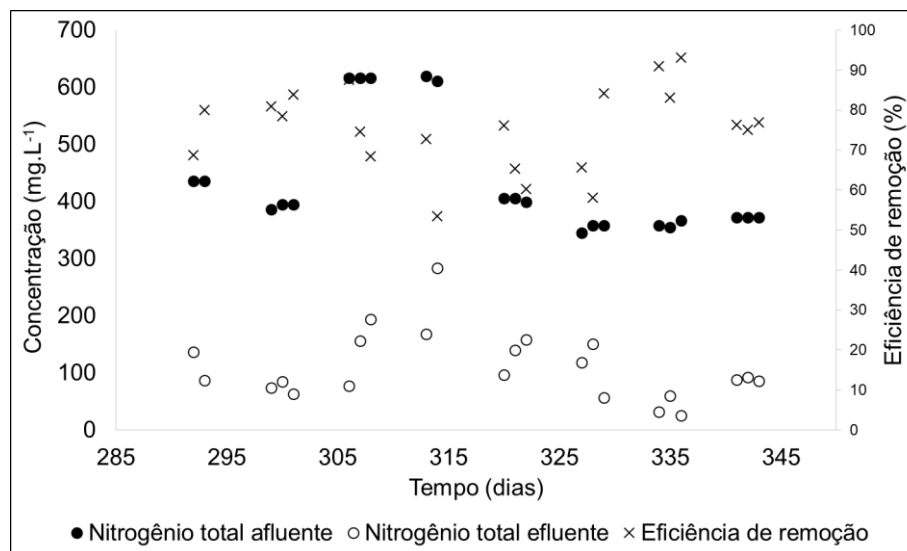
**Figura 6.5** - Dinâmica dos compostos nitrogenados no RBS-Lab durante a Fase 2 de operação

Os coeficientes estequiométricos obtidos para o consumo de  $\text{N-NO}_2^-$  por consumo de  $\text{N-NH}_4^+$  e para a produção de  $\text{N-NO}_3^-$  por consumo de  $\text{N-NH}_4^+$  durante a Fase 2 são apresentados na Figura 6.6. Na Tabela A5 do Apêndice A é apresentada a estatística descritiva para esses coeficientes estequiométricos. Durante a Fase 2, os coeficientes estequiométricos para o consumo de amônia por consumo de nitrito ficaram, em geral, maiores do que é esperado para a reação anammox, atingindo valores tão altos quanto 1,91 (Figura 6.6). O valor mediano foi igual a 1,60 mol de  $\text{N-NO}_2^-$  consumido/ mol de  $\text{N-NH}_4^+$  oxidada (Tabela A5). Isso indica que houve atividade de bactérias desnitrificantes heterotróficas no reator durante esta fase. Como o digestato de resíduo alimentar continha matéria orgânica, os micro-organismos desnitrificantes realizaram sua oxidação, reduzindo o nitrito no meio, dessa maneira, esses micro-organismos contribuíram para o consumo de  $\text{N-NO}_2^-$  no reator. Durante a Fase 2,  $\text{N-NO}_3^-$  foi produzido no meio e a relação entre sua produção e o consumo de  $\text{N-NH}_4^+$  variou entre 0,06 e 0,86 e teve valor mediano igual a 0,48 (Figura 6.6; Tabela A5).

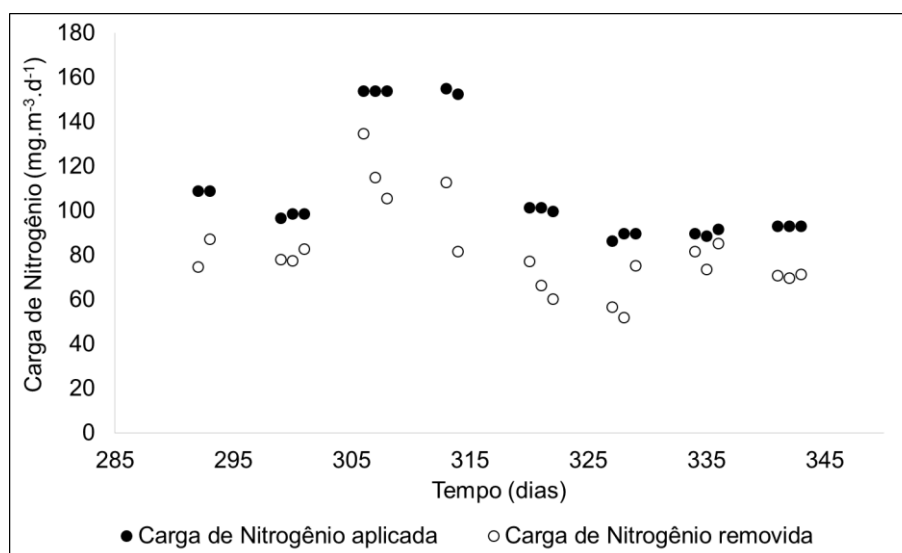


**Figura 6.6** - Coeficientes estequiométricos obtidos durante a Fase 2 de operação do RBS-Lab

As concentrações afluentes de nitrogênio total ( $\text{N-NH}_4^+ + \text{N-NO}_2^- + \text{N-NO}_3^-$ ) durante esta fase variaram de 345,1 até 619,8  $\text{mg.L}^{-1}$ , sendo que a mediana foi igual a 345,3  $\text{mg.L}^{-1}$  (Figura 6.7; Tabela A5). Isso resultou em valores medianos de cargas de nitrogênio aplicadas iguais a 98,8  $\text{g.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$  e o reator foi capaz de remover 76% da carga nitrogenada aplicada (ou 77,5  $\text{gN.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ ) (Figura 6.8; Tabela A5).



**Figura 6.7** – Concentrações afluentes, efluentes e eficiência de remoção de nitrogênio total ( $\text{N-NH}_4^+ + \text{N-NO}_2^- + \text{N-NO}_3^-$ ) durante a Fase 2 de operação do RBS-Lab

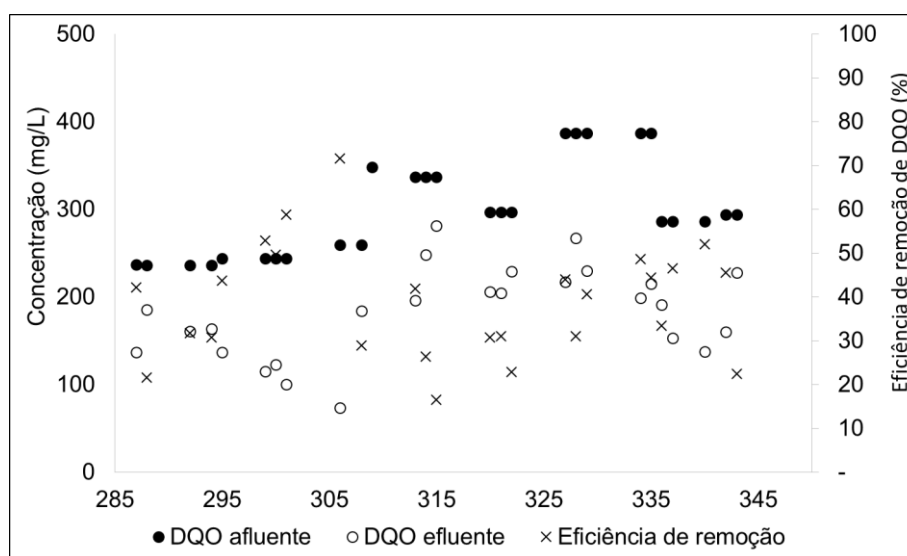


**Figura 6.8** – Cargas de nitrogênio ( $\text{N-NH}_4^+ + \text{N-NO}_2^- + \text{N-NO}_3^-$ ) aplicadas e removidas durante a Fase 2 de operação do RBS-Lab

A concentração de STV no interior do RBS-Lab ao longo da Fase 2 de operação foi ligeiramente maior ( $4,92 \text{ g.L}^{-1}$ ) em relação à Fase 1 ( $4,38 \text{ g.L}^{-1}$ ) indicando que houve ligeiro incremento na concentração de biomassa, o que pode ter ocorrido por dois motivos: (1) devido à adição de efluente contendo matéria orgânica ao reator, houve crescimento de micro-organismos com metabolismo heterotrófico no interior do mesmo e; (2) o próprio efluente adicionado ao reator continha certa concentração de sólidos totais voláteis que era incorporada ao RBS-Lab. A concentração de STV no afluente ao reator não foi monitorada durante a Fase 2, entretanto, estima-se que esteve em torno de  $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ , de acordo com a caracterização do digestato de resíduo alimentar realizada (Tabela 5.2). A relação entre o substrato disponível (em termos de nitrogênio total afluente) por massa de biomassa não foi alterada em relação à Fase 1, permanecendo igual à  $0,02 \text{ g N.g STV}^{-1}.\text{d}^{-1}$  (Figura A2; Tabela A12).

Além da remoção de nitrogênio, o RBS-Lab também foi capaz de remover DQO durante a Fase 2. As concentrações afluentes, efluentes e a eficiência de remoção deste composto são apresentadas na Figura 6.9. A estatística descritiva para este parâmetro é mostrada na Tabela A6 do Apêndice A. As concentrações afluentes de DQO variaram de 236,1 até  $386,9 \text{ mg.L}^{-1}$  durante a Fase 2 (Figura 6.9; Tabela A6). A concentração efluente teve sua mediana igual a  $188,0 \text{ mg.L}^{-1}$ . O consumo de matéria orgânica no reator durante essa fase, provavelmente ocorreu por micro-organismos desnitrificantes, já que o reator era operado em condições anaeróbias e havia nitrito e nitrato disponíveis no meio. A eficiência de remoção de DQO, entretanto, foi baixa, tendo sua mediana igual a 41% (Figura 6.9; Tabela A6). Isso pode ser

explicado pelo fato do efluente tratado no RBS anammox ser proveniente de duplo tratamento anaeróbio prévio (em digestor anaeróbio de resíduos alimentares seguido por reator UASB), sendo que a grande parte da matéria orgânica de fácil biodegradabilidade deve ter sido degradada durante os primeiros estágios do tratamento. A DBO não foi monitorada durante o experimento, entretanto, análises deste parâmetro visando a caracterização do digestato resultou em valores próximos a  $187 \text{ mg.L}^{-1}$  (Tabela 5.2) e conseqüentemente, em relação DQO/DBO igual a 3,1, que é um indicativo de efluente com biodegradabilidade intermediária, segundo Von Sperling (2005). Ainda assim, o RBS com atividade anammox foi capaz de promover polimento adicional do efluente em termos de matéria orgânica, o que incrementou a qualidade do efluente tratado.



**Figura 6.9** - Concentrações de DQO total afluente e efluente e eficiência de remoção de DQO durante a Fase 2 de operação do RBS-Lab

A alcalinidade afluente e efluente ao reator também foi monitorada durante a Fase 2. Alcalinidade não foi consumida no reator durante essa fase de monitoramento, pelo contrário foram observadas concentrações efluentes (mediana igual a  $558,0 \text{ mg CaCO}_3.\text{L}^{-1}$ ) maiores do que as concentrações afluentes (mediana igual a  $501,1 \text{ mg CaCO}_3.\text{L}^{-1}$ ) (Tabela 6.1). A produção de alcalinidade pode ocorrer durante alguns processos como a amonificação e a desnitrificação heterotrófica (OH *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2016). Segundo OH *et al.* (2001) durante a desnitrificação heterotrófica utilizando metanol como doador de elétrons, para cada mg de  $\text{N-NO}_3^-$  reduzido a  $\text{N}_2$ ,  $3,57 \text{ mg}$  de  $\text{CaCO}_3$  são produzidos. Durante a Fase 2 o processo de desnitrificação heterotrófica ocorreu no reator, o que pode explicar o aumento da alcalinidade no efluente.

Bactérias com atividade anammox, por sua vez são autotróficas, por isso tem como fonte de carbono para síntese dos componentes celulares compostos inorgânicos. Entretanto, esses micro-organismos possuem baixo requisito de carbono inorgânico. De acordo com Strous *et al.* (1998) para cada mol de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> consumido apenas 0,066 mol de bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) é consumido. Em termos de CaCO<sub>3</sub>, para cada mg do íon amônio oxidado apenas 0,23 mg CaCO<sub>3</sub> são consumidos por bactérias anammox. Por esse motivo, alguns autores reportam que o processo anammox geralmente não ocasiona mudanças perceptíveis na alcalinidade do meio (SZATKOWSKA *et al.*, 2005).

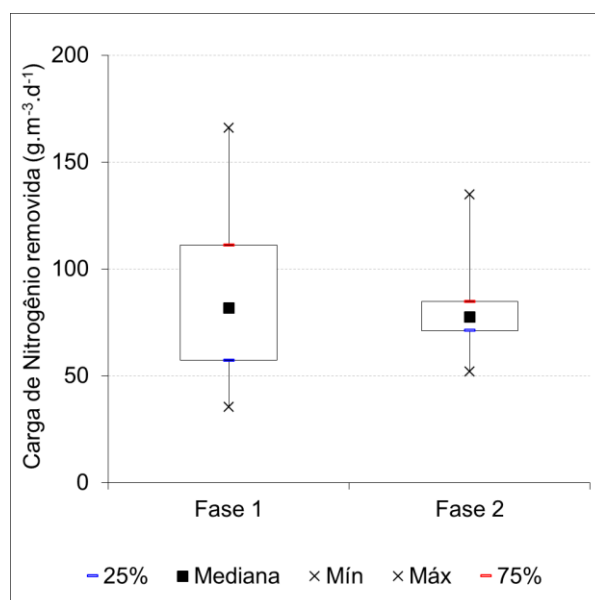
**Tabela 6.1** - Estatística descritiva das concentrações afluentes e efluentes de alcalinidade durante a Fase 2 de operação do RBS-Lab

	Alcalinidade afluente (mg CaCO <sub>3</sub> .L <sup>-1</sup> )	Alcalinidade efluente (mg CaCO <sub>3</sub> .L <sup>-1</sup> )
Nº de dados	7	10
Média (DP)	501,1 (226,0)	558,0 (143,5)
Mediana	518,0	559,1
Mínimo	267,5	304,0
Máximo	788,0	728,6
Percentil 25%	280,8	503,8
Percentil 75%	686,3	684,0

#### 6.1.1.3 Impacto da alimentação do RBS-Lab com digestato de resíduo alimentar mais nitrito sobre a remoção de nitrogênio pelo processo anammox

Com o objetivo de avaliar se houve impacto na remoção de nitrogênio pelo processo anammox após a alimentação do RBS-Lab com digestato de resíduo alimentar, os resultados obtidos para as cargas de nitrogênio removidas durante a Fase 2 foram comparados com os obtidos durante a Fase 1, em que o reator foi alimentado com meio de cultura mineral e autotrófico.

De acordo com a análise estatística (Teste U de Mann-Whitney,  $\alpha= 5\%$ ) não houve diferença significativa entre as cargas de nitrogênio total removidas durante as fases 1 (mediana = 81,9 g.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>) e 2 (mediana = 77,5 g.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>) (pvalor=0,85222) (Figura 6.10). Dessa forma, a aplicação do digestato anaeróbio parece não ter influenciado a atividade das bactérias anammox na remoção de nitrogênio, quando o reator foi suplementado com nitrito e operado em condições anaeróbias, durante a fase 2 de operação.



**Figura 6.10** - Box-plot das cargas de nitrogênio removidas durante as Fases 1 e 2 de operação do RBS-Lab.

A matéria orgânica presente no digestato anaeróbico não foi capaz de inibir a remoção de nitrogênio pelas bactérias com atividade anammox. Nesta fase, a concentração de DQO no afluente teve mediana igual a 290,7 mg.L<sup>-1</sup>, conforme apresentado anteriormente. Isso resultou em uma relação DQO/N afluente baixa, igual a 0,7, o que torna o efluente favorável ao tratamento pelo processo anammox. Na Tabela 4.8 são reportados diferentes valores de relação DQO/N em diferentes tipos de efluentes que foram capazes de inibir o processo anammox. Esses valores variaram de 1,4 a 6,0 sendo maiores do que o obtido durante a Fase 2 deste experimento. Além disso, é importante ressaltar que o efluente tratado no presente trabalho foi previamente tratado por dois processos anaeróbios (digestor anaeróbico de resíduos alimentares seguido por reator UASB), onde foi consumida boa parte da matéria orgânica biodegradável. Dessa forma, possivelmente parte da matéria orgânica presente no efluente era composta por compostos recalcitrantes, de difícil degradação por micro-organismos heterotróficos desnitrificantes, que não foram capazes de competir com bactérias anammox pelo acceptor de elétrons e inibir a atividade de oxidação anaeróbia da amônia no reator.

### 6.1.2 Avaliação de diferentes estratégias de aeração sobre os processos concomitantes de nitrificação parcial e anammox – Fase 3

Durante a Fase 3 estratégias de aeração foram avaliadas no RBS em escala laboratorial com intuito de promover os processos de nitrificação parcial e anammox simultaneamente no reator. Inicialmente, cinco estratégias foram avaliadas (E1, E2, E3, E4 e E5). Estas estratégias de

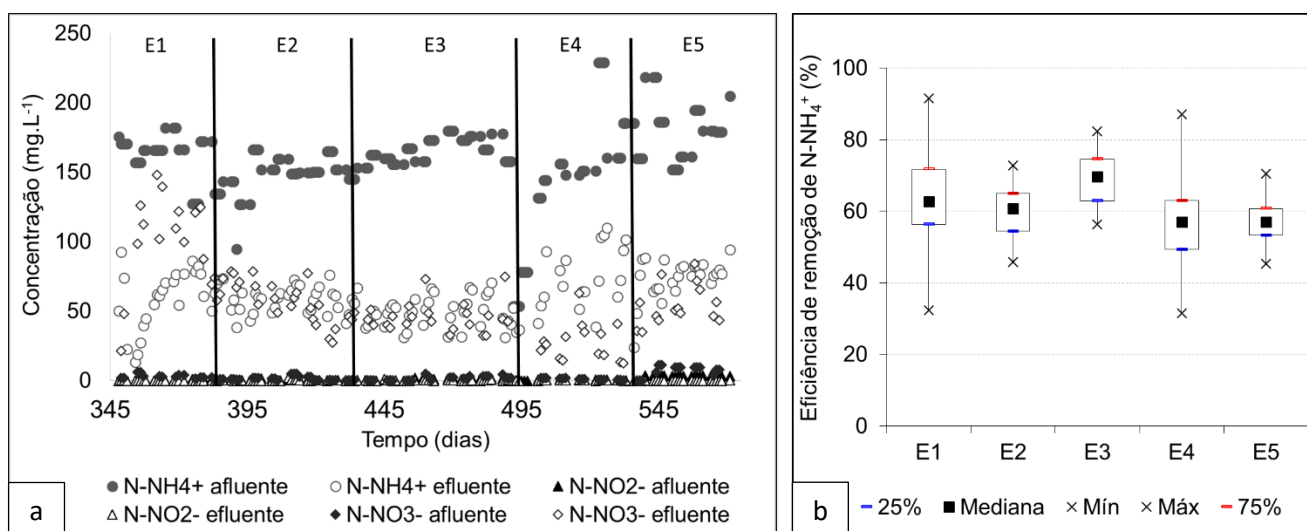
aeração variaram com relação ao tempo dos períodos aerados e anóxicos, com exceção da estratégia E5 em que a aeração foi contínua. Além disso, variou-se também, a taxa de ar aplicada no reator (Conforme descrito na Tabela 5.6 do item 5.2.3).

A estratégia E6 foi semelhante à E4 tanto com relação à duração dos períodos aerados/ anóxicos (15 min aeração/ 45 min anóxico) tanto com relação à taxa de ar aplicada ( $0,125 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}_{\text{reator}}^{-1}$ ). A estratégia E6 foi incluída no experimento, uma vez que foi observado durante as estratégias de aeração anteriores um intenso consumo de alcalinidade no meio. Por esse motivo, durante a estratégia E6 bicarbonato de potássio foi adicionado ao reator, a fim de verificar se este não estava sendo um substrato limitante para o processo de nitrificação parcial e anammox.

Após a avaliação da estratégia E6, foram estabelecidos alguns períodos de recuperação do reator (R1, R2 e R3) em que novamente, o reator foi submetido a condições anaeróbias e alimentado com efluente proveniente da digestão anaeróbia de resíduo alimentar suplementado com nitrito (R1 e R3) ou meio de cultura autotrófico (R2). Estes períodos tiveram por objetivo a recuperação da atividade de bactérias anammox no reator, uma vez que foi observada perda na eficiência de remoção de nitrogênio após o início dos testes de aeração, como será discutido adiante.

Por fim, mais duas estratégias de aeração foram avaliadas E7 e E8, que foram semelhantes às estratégias E4 (15 min aeração/ 45 min anóxico) e E3 (15 min aeração/ 30 min anóxico), respectivamente, em termos dos tempos de aeração/anoxia. Entretanto, a taxa de ar aplicada nestas duas últimas estratégias ( $0,026 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}_{\text{reator}}^{-1}$ ), foi menor do que em E3 e E4 ( $0,125 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}_{\text{reator}}^{-1}$ ).

Na Figura 6.11a são apresentados os resultados para as concentrações afluentes e efluentes dos compostos nitrogenados ( $\text{N-NH}_4^+$ ,  $\text{N-NO}_2^-$  e  $\text{N-NO}_3^-$ ) durante as primeiras cinco estratégias de aeração avaliadas. As eficiências de remoção de  $\text{N-NH}_4^+$  durante esses períodos são apresentadas na Figura 6.11b. A estatística descritiva das concentrações afluentes, efluentes e eficiências de remoção de todos os compostos nitrogenados é apresentada no Apêndice A, na Tabela A7.



**Figura 6.11** - Dinâmica dos compostos nitrogenados (a) e eficiência de remoção de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (b) durante as estratégias de aeração E1 até E5 da Fase 3 de operação do RBS-Lab. E1: 45min aeração on/ 15 min off, 0,2 L.min<sup>-1</sup>.L<sub>reator</sub><sup>-1</sup>; E2: 15 min on/15 min off, 0,075 L.min<sup>-1</sup>.L<sub>reator</sub><sup>-1</sup>; E3: 15 min on/ 30 min off, 0,125 L.min<sup>-1</sup>.L<sub>reator</sub><sup>-1</sup>; E4: 15 min on/ 45 min off, 0,125 L.min<sup>-1</sup>.L<sub>reator</sub><sup>-1</sup>; E5: aeração contínua, 0,125 L.min<sup>-1</sup>.L<sub>reator</sub><sup>-1</sup>

Durante as primeiras cinco estratégias de aeração avaliadas as concentrações medianas afluentes de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> variaram de 150,2 mg.L<sup>-1</sup> (durante a estratégia E2) até 179,9 mg.L<sup>-1</sup> (E7). As eficiências medianas de remoção desse composto permaneceram entre 57% (E4 e E5) e 70% (E3), sendo que a estratégia E3 foi a que removeu maior concentração de amônia, alcançando um valor mediano igual a 112,7 mg.L<sup>-1</sup> de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> removido (Figura 6.11; Tabela A7).

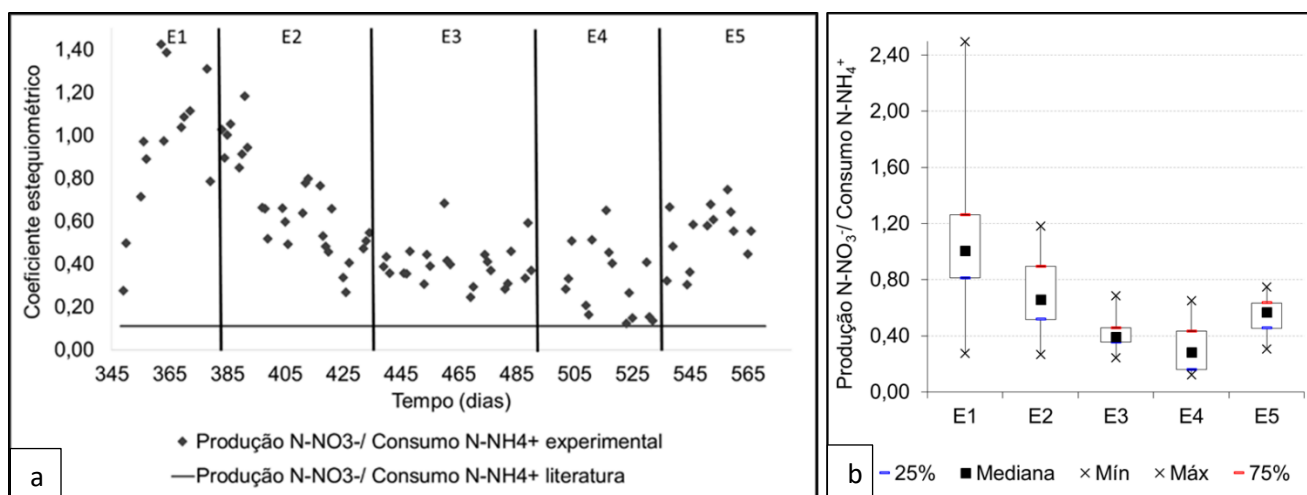
Valores muito baixos de nitrito foram detectados no efluente durante todo este período, variando entre 0 e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Em contrapartida, nitrato foi produzido em todas as estratégias de aeração avaliadas, especialmente em E1, cuja mediana foi igual a 109,5 mg.L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> produzido. Nesse período, toda a amônia consumida (104,4 mg.L<sup>-1</sup>) parece ter sido convertida a nitrato, indicando que houve durante esta fase intensa atividade de bactérias nitrificantes aeróbias. Ressalta-se que durante a estratégia E1, o período de aeração era maior em relação ao período anóxico (45 min aeração/ 15 min anóxico) e aliado a isso, taxa de ar elevada foi aplicada ao reator (0,2 L.min<sup>-1</sup>.L<sub>reator</sub><sup>-1</sup>). Por esse motivo, durante a estratégia E2 a taxa de ar aplicada foi reduzida (0,075 L.min<sup>-1</sup>.L<sub>reator</sub><sup>-1</sup>), assim como o período de aeração, sendo que a estratégia passou a ser 15 min aeração/ 15 min anóxico. Durante a estratégia E2, foi observada menor produção de nitrato no efluente, com valor mediano igual a 59,5 mg.L<sup>-1</sup>, mas ao mesmo tempo, menor concentração de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> foi oxidada (mediana igual a 89,7 mg.L<sup>-1</sup>) em relação à estratégia avaliada anteriormente (E1) (Figura 6.11; Tabela A7). Tendo em vista

os resultados das duas primeiras estratégias de aeração (E1 e E2) e no intuito de controlar o processo para que houvesse uma maior remoção de amônia e menor produção de nitrato, concomitantemente, a taxa de ar foi aumentada novamente para  $0,125 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}_{\text{reator}}^{-1}$  durante as estratégias subsequentes (E3, E4 e E5). Sob essas condições, durante a estratégia E3 (15 min aeração/30 min anóxico) foi possível alcançar boa remoção de  $\text{N-NH}_4^+$  ( $112,7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) com menos nitrato produzido, com valor mediano igual a  $44,3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$ . Menor quantidade de nitrato foi produzida durante a estratégia E4 (15 min aeração/ 45 min anóxico) com valor mediano igual a  $26,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Entretanto, observou-se que um tempo anóxico muito maior em relação ao aerado levou a uma menor quantidade de amônia oxidada durante a estratégia E4 (mediana igual a  $86,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Em E5, em que foi avaliada a aeração contínua, a produção de nitrato atingiu valores elevados novamente, alcançando  $84,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  com mediana igual a  $50,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (Figura 6.11a; Tabela A7).

O acúmulo de nitrato é um problema frequente em sistemas de NP/A. Estima-se que em 50% das estações em escala plena existentes no mundo, esse problema já tenha sido reportado, independente do tipo de reator utilizado (RBS, com biofilme ou biomassa granular) (LACKNER *et al.*, 2014). O principal motivo para que o acúmulo de nitrato ocorra, o que é consequência do crescimento excessivo de bactérias oxidadoras de nitrito, é o fornecimento de grande quantidade de oxigênio ao reator. Segundo Lackner *et al.* (2014), o fornecimento em excesso de oxigênio não necessariamente reflete em um aumento detectável na concentração de oxigênio no interior do reator, o que faz com que esse seja um parâmetro difícil de se controlar. O acúmulo de nitrato muitas vezes pode ser acompanhado de um aumento na concentração de sólidos em suspensão totais (SST). Algumas das formas utilizadas para o controle do acúmulo de nitrato no reator, são: redução da vazão de ar aplicada, redução da concentração de OD no reator, utilização de estratégias de aeração intermitentes com tempos maiores das fases anóxicas, em relação às fases aeradas. No caso de reatores em batelada sequenciais, a remoção de lodo flocular pode ser também utilizada, ou pelo uso de hidrociclones ou pela diminuição do tempo de sedimentação do lodo antes da retirada do efluente (LACKNER *et al.*, 2014). Neste trabalho, duas estratégias foram utilizadas com intuito de reduzir a produção de nitrato: a redução da vazão de ar aplicada e a redução de períodos aerados em relação aos períodos anóxicos.

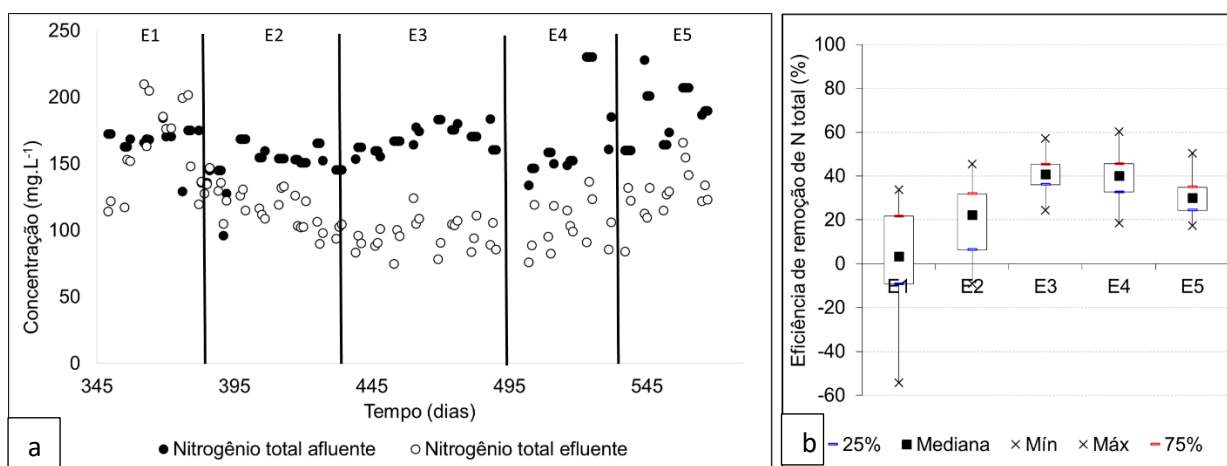
Os coeficientes estequiométricos para a produção de nitrato/ consumo de amônia foram calculados para os períodos em que as estratégias de aeração foram avaliadas. Sliemers (2002) estimou o coeficiente para o processo de nitrificação parcial/ anammox como sendo igual 0,11

(Equação 2.6). Observou-se que durante as cinco primeiras estratégias de aeração avaliadas neste trabalho, os coeficientes obtidos tiveram valores superiores ao valor relatado na literatura para o processo de NP/A (Figura 6.12; Tabela A8), sendo que os maiores valores obtidos ocorreram durante a estratégia E1 (mediana igual a 1,07). A estratégia E4 foi a que apresentou valores mais próximos aos da literatura para o processo de NP/A, com variação entre 0,12 e 0,65 e mediana igual a 0,28. Entretanto, esse valor não foi significativamente diferente aos encontrados durante as estratégias E3 (0,39;  $p=1,0000$ ) e E5 (0,57;  $p=0,59452$ ).



**Figura 6.12** – Série histórica (a) e estatística descritiva (b) dos coeficientes estequiométricos para a produção de  $\text{N-NO}_3^-$ / consumo de  $\text{N-NH}_4^+$  durante as estratégias de aeração E1 até E5 da Fase 3 de operação do RBS-Lab. E1: 45min aeração on/ 15 min off,  $0,2 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}_{\text{reator}}^{-1}$ ; E2: 15 min on/15 min off,  $0,075 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}_{\text{reator}}^{-1}$ ; E3: 15 min on/ 30 min off,  $0,125 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}_{\text{reator}}^{-1}$ ; E4: 15 min on/ 45 min off,  $0,125 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}_{\text{reator}}^{-1}$ ; E5: aeração contínua,  $0,125 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}_{\text{reator}}^{-1}$

As medianas das concentrações afluentes de nitrogênio total variaram entre  $153,3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (E2) e  $190,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (E5). Em termos de eficiência de remoção de nitrogênio total foi observado que as estratégias E3 e E4 foram as que apresentaram maiores eficiências dentre as cinco primeiras estratégias avaliadas, com medianas iguais a 41% e 40%, respectivamente (Figura 6.14; Tabela A7).

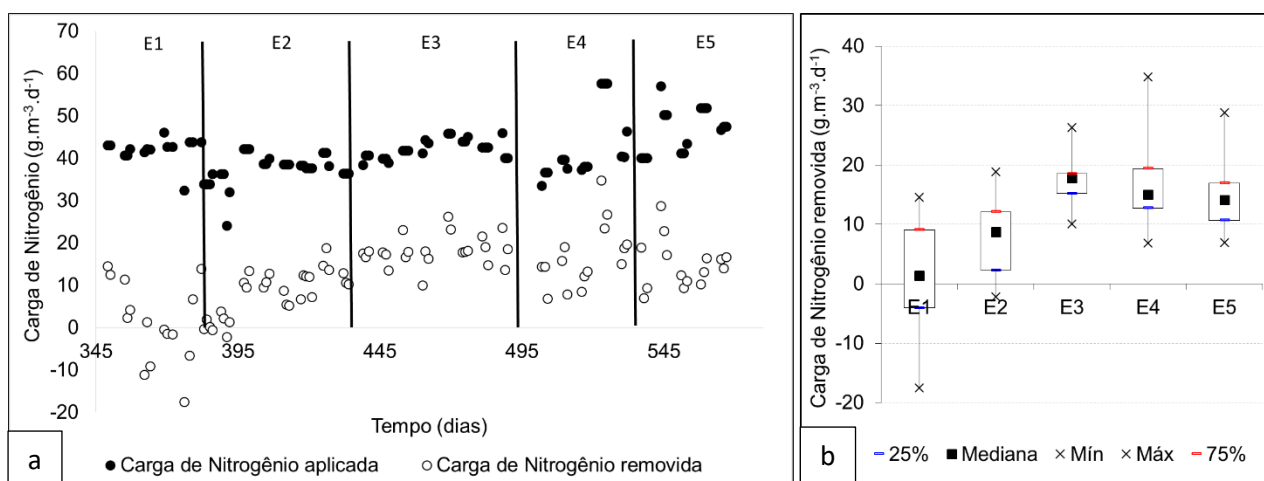


**Figura 6.13** – Concentrações afluentes e efluentes (a) e eficiências de remoção de nitrogênio total durante as estratégias de aeração E1 até E5 da Fase 3 de operação do RBS lab. E1: 45min aeração on/ 15 min off,  $0,2 \text{ L.min}^{-1} \cdot \text{L}_{\text{reator}}^{-1}$ ; E2: 15 min on/15 min off,  $0,075 \text{ L.min}^{-1} \cdot \text{L}_{\text{reator}}^{-1}$ ; E3: 15 min on/ 30 min off,  $0,125 \text{ L.min}^{-1} \cdot \text{L}_{\text{reator}}^{-1}$ ; E4: 15 min on/ 45 min off,  $0,125 \text{ L.min}^{-1} \cdot \text{L}_{\text{reator}}^{-1}$ ; E5: aeração contínua,  $0,125 \text{ L.min}^{-1} \cdot \text{L}_{\text{reator}}^{-1}$

Foi observado que as cargas de nitrogênio aplicadas foram maiores durante o período da estratégia E5 de aeração, com valores variando de  $40,0$  até  $57,1 \text{ g.m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ . De maneira geral, os valores medianos das cargas nitrogenadas aplicadas variaram de  $38,3 \text{ g.m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$  (E2) até  $47,5 \text{ g.m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$  (E5) (Figura 6.14a). Estas variações ocorreram devido as alterações naturais das concentrações dos compostos nitrogenados do digestato gerado, uma vez que não houve alteração do volume de efluente aplicado no reator e nem do TDH ao longo da Fase 3. Observou-se por meio da análise estatística utilizando o teste *Kruskal-Wallis*, seguido de comparação múltipla entre as medianas, que não houve diferença significativa entre as cargas nitrogenadas removidas durante as estratégias E1 ( $1,4 \text{ g.m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ ) e E2 ( $8,8 \text{ g.m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ ) ( $p\text{-valor}=1,0000$ ). Em contrapartida as medianas das cargas de nitrogênio removidas durante as duas primeiras estratégias de aeração foram estatisticamente menores em relação a E3 ( $17,8 \text{ g.m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ ) e E4 ( $15,0 \text{ g.m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ ) ( $p\text{-valores}=0,0000$  E1 e E3;  $0,000005$  E2 e E3;  $0,000273$  E1 e E4;  $0,003991$  E2 e E4). A mediana da carga de nitrogênio removida durante E5 ( $14,1 \text{ g.m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ ) só foi diferente estatisticamente da estratégia E1 ( $p\text{-valor}=0,004064$ ) (Figura 6.14 a e b).

Dessa forma foi observado que as estratégias E3, E4 e E5 apresentaram melhor performance na remoção de nitrogênio em relação às demais estratégias de aeração avaliadas. Estes períodos tiveram em comum a taxa de ar aplicada, igual a  $0,125 \text{ L.min}^{-1} \cdot \text{L}_{\text{reator}}^{-1}$ . Essa taxa foi menor do que a aplicada durante a estratégia E1 e maior do que a aplicada durante a estratégia E2. Quando

esta taxa de ar foi aplicada maior equilíbrio entre o consumo de amônia e produção de nitrato foi obtido, resultando em cargas de nitrogênio removidas maiores no reator (Figura 6.14b).

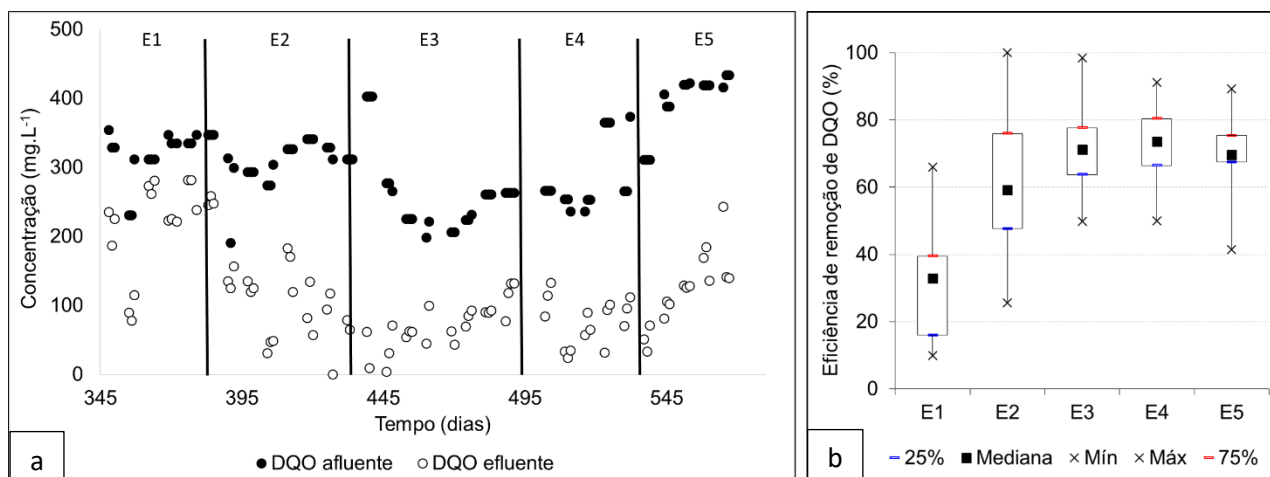


**Figura 6.14** - Cargas de nitrogênio aplicadas (a) e removidas (a e b) durante as cinco primeiras estratégias de aeração avaliadas no RBS-Lab durante a Fase 3 de operação. E1: 45min aeração on/ 15 min off,  $0,2 \text{ L.min}^{-1}.\text{L}_{\text{reator}}^{-1}$ ; E2: 15 min on/15 min off,  $0,075 \text{ L.min}^{-1}.\text{L}_{\text{reator}}^{-1}$ ; E3: 15 min on/ 30 min off,  $0,125 \text{ L.min}^{-1}.\text{L}_{\text{reator}}^{-1}$ ; E4: 15 min on/ 45 min off,  $0,125 \text{ L.min}^{-1}.\text{L}_{\text{reator}}^{-1}$ ; E5: aeração contínua,  $0,125 \text{ L.min}^{-1}.\text{L}_{\text{reator}}^{-1}$

Observou-se que a concentração de STV no interior do reator após o início das estratégias de aeração da Fase 3 de operação diminuiu consideravelmente em relação à Fase 2 de operação, que teve concentração de biomassa igual a  $4,92 \text{ g STV.L}^{-1}$ . Durante E1, observou-se que a concentração de sólidos diminuiu para  $2,79 \text{ g STV.L}^{-1}$ . Após o início das estratégias de aeração observou-se o crescimento de lodo em suspensão no reator, de difícil sedimentabilidade. Isso pode ter favorecido o arraste de sólidos com o efluente, ocasionando tal perda de biomassa. Juntamente a esse fato, parte da biomassa, com metabolismo estritamente anaeróbico pode ter sido também lavada do reator. Ao longo das cinco primeiras estratégias de aeração houve uma tendência de aumento na concentração de sólidos novamente no reator, que alcançou valor igual  $3,73 \text{ g STV.L}^{-1}$  ao final da estratégia aeração E5 (Figura A2; Apêndice C). A relação A/M diminuiu a partir de E1 de 0,02 para  $0,01 \text{ gN.g STV}^{-1}.\text{d}^{-1}$  durante as demais estratégias de aeração (E2 a E5). Ressalta-se que durante as estratégias de aeração nitrito não foi adicionado ao reator, o que ocasionou diminuição da carga nitrogenada afluente ao mesmo.

O afluente ao RBS-Lab apresentou os maiores valores para a DQO durante o período da estratégia E5, com valores variando de  $311,3 \text{ mg.L}^{-1}$  até  $433,6 \text{ mg.L}^{-1}$ . As medianas das concentrações afluentes de DQO variaram de  $262,0 \text{ mg.L}^{-1}$  (E3) até  $394,6 \text{ mg.L}^{-1}$  (E5). O reator

foi capaz de remover DQO em todos os períodos, com valores medianos maiores de eficiência de remoção durante as estratégias E3 (71%), E4 (74%) e E5 (70%) (Figura 6.15 a e b; Tabela A9). É importante ressaltar que durante esses períodos acidobactérias da ordem Blastocatellales, com metabolismo aeróbio e heterotrófico, dominaram o reator (Figura 6.44) como é discutido no item 6.1.7.2. Dessa forma, a elevada remoção de matéria orgânica durante esses períodos pode ser atribuída, ao menos parcialmente, a esses micro-organismos.



**Figura 6.15** - Concentrações afluentes e efluentes (a) e eficiências de remoção de DQO total durante as estratégias de aeração E1 até E5 da Fase 3 de operação do RBS-Lab. E1: 45min aeração on/ 15 min off, 0,2 L.min<sup>-1</sup>.L<sub>reator</sub><sup>-1</sup>; E2: 15 min on/15 min off, 0,075 L.min<sup>-1</sup>.L<sub>reator</sub><sup>-1</sup>; E3: 15 min on/ 30 min off, 0,125 L.min<sup>-1</sup>.L<sub>reator</sub><sup>-1</sup>; E4: 15 min on/ 45 min off, 0,125 L.min<sup>-1</sup>.L<sub>reator</sub><sup>-1</sup>; E5: aeração contínua, 0,125 L.min<sup>-1</sup>.L<sub>reator</sub><sup>-1</sup>

As relações entre a DQO/N afluyente variaram bastante entre E1 e E5. As medianas obtidas para esta relação foram iguais a 1,94, 2,13, 1,56, 1,70 e 2,20 para E1, E2, E3, E4 e E5, respectivamente. Foi observado que os períodos que obtiveram melhores resultados para a remoção de nitrogênio (E3 e E4) foram também os períodos que tiveram menor relação DQO/N afluyente, o que pode ter contribuído para esses resultados, já que é sabido que relações DQO/N mais baixas podem favorecer a atividade de bactérias anaeróbias oxidadoras de amônia e afetar positivamente a remoção de nitrogênio.

A Tabela 6.2 apresenta os resultados para as médias e medianas da alcalinidade afluyente e efluente no RBS lab durante as cinco primeiras estratégias de aeração. Foi observado que houve um intenso consumo de alcalinidade no reator durante este período com valores medianos de alcalinidade baixos no efluente, variando de 0,0 mg.L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub> (E1) até 113,0 mg.L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub> (E4) (Tabela 6.2). Esses resultados indicam que houve intensa atividade de bactérias

nitrificantes durante estes cinco primeiros períodos. De acordo com Ahn (2006) bactérias nitrificantes tem um elevado requisito para alcalinidade sendo que para cada mg de  $\text{N-NH}_4^+$  oxidado são consumidos 7,07 mg de alcalinidade  $\text{CaCO}_3$ . Dentre as estratégias avaliadas, a estratégia E4 em que se utilizou aeração intermitente com maior período anóxico (45 minutos) em relação ao aeróbio (15 minutos) foi a que apresentou consumo ligeiramente menor de alcalinidade ( $597 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{CaCO}_3$ ) em relação às demais estratégias avaliadas. As baixas concentrações efluentes de alcalinidade demonstraram que carbono inorgânico pode ter sido um fator limitante para que uma maior quantidade de amônia fosse oxidada no reator durante as primeiras cinco estratégias de aeração avaliadas.

**Tabela 6.2** - Concentrações médias e medianas da alcalinidade afluenta e efluente durante as estratégias de aeração E1 até E5 da Fase 3 de operação do RBS-Lab

		E1	E2	E3	E4	E5
Alcalinidade afluente (mg $\text{CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ )	Média	606,0	675,1	663,6	734,4	833,6
	(DP)	(240,4)	(106,5)	(95,8)	(59,5)	(20,7)
	Mediana	606,0	683,1	683,5	710,0	836,0
Alcalinidade efluente (mg $\text{CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ )	Média	17,9	27,3	10,4	109,8	13,6
	(DP)	(10,0)	(29,9)	(17,5)	(63,5)	(23,9)
	Mediana	0,0	19,8	1,0	113,0	2,0

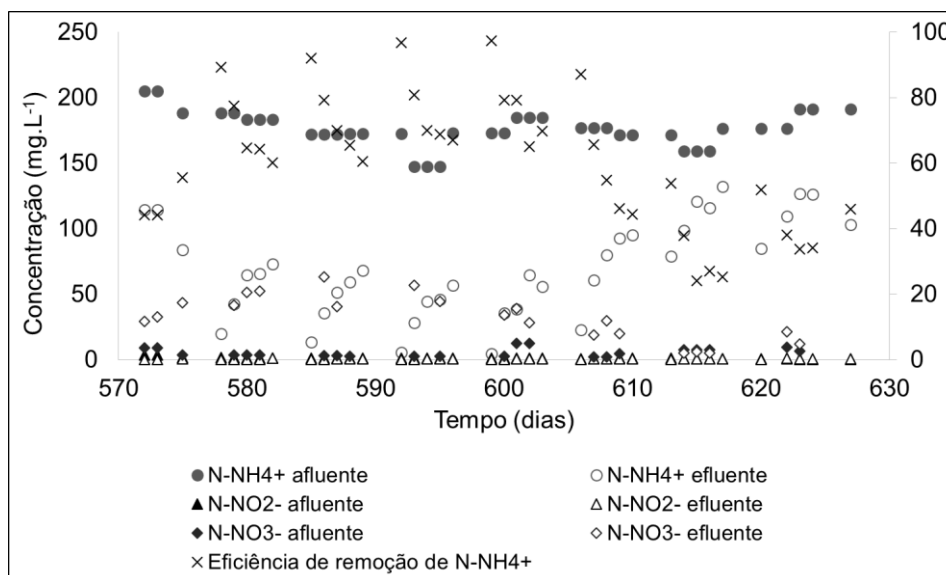
Observou-se que o consumo de alcalinidade por consumo de  $\text{N-NH}_4^+$  em todas as estratégias de aeração avaliadas alcançou valores elevados, iguais a 5,8, 7,4, 5,9, 6,9 e 8,0 para E1, E2, E3, E4 e E5, respectivamente. Segundo Bagchi *et al.* (2010), relação estequiométrica entre o consumo de alcalinidade e o consumo de  $\text{N-NH}_4^+$  igual ou superior a 7 indica a ocorrência de nitrificação completa. Para nitrificação parcial/ anammox valores teóricos iguais a 3,6 foram estimados (BAGCHI *et al.*, 2010; SLIEKERS, 2002).

### 6.1.3 Avaliação da influência da adição de alcalinidade sobre os processos de nitrificação parcial e anammox

Para avaliar se a alcalinidade foi fator limitante no meio para que houvesse uma maior oxidação da amônia, durante a estratégia de aeração E6 (572 até 627 dias de operação) foi adicionado ao RBS solução de bicarbonato de potássio a fim de fornecer alcalinidade ao sistema. Durante as primeiras três semanas de operação desta estratégia cerca de  $302 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HCO}_3^-$  ( $248 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{CaCO}_3$ ) foram adicionados, sendo que esta concentração foi aumentada para  $471 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HCO}_3^-$  ( $385 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{CaCO}_3$ ) nas cinco semanas posteriores da estratégia E6. A adição de alcalinidade ao reator resultou em concentrações afluentes variando de 707,6 até  $1.218,3 \text{ mg.L}^{-1}$

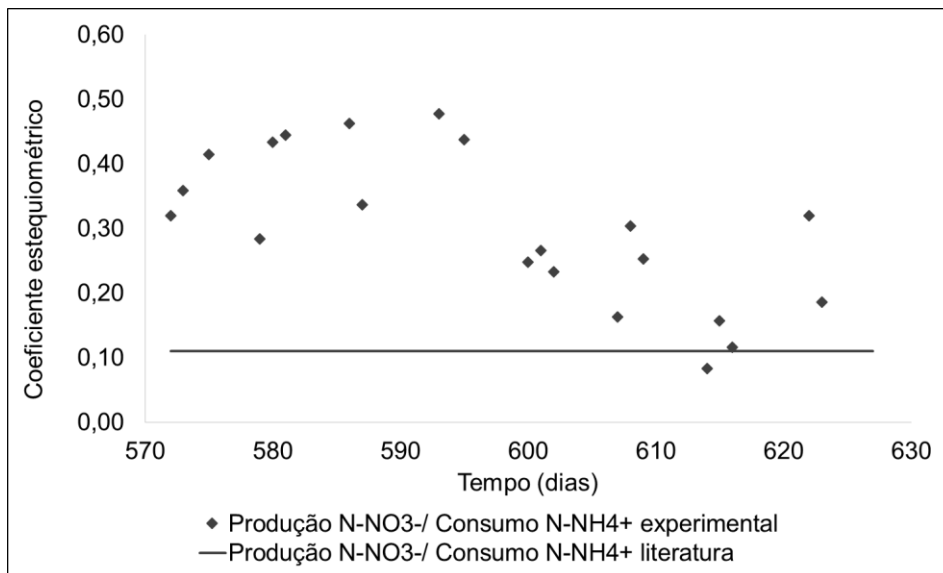
<sup>1</sup> de  $\text{CaCO}_3$ , com valor mediano igual a  $1.084,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{CaCO}_3$ , como é apresentado na Tabela 6.3. A estratégia de aeração E6 foi semelhante à estratégia E4 (15 min aeração/ 45 min anóxico; taxa de ar  $0,125 \text{ L.min}^{-1}.\text{L}_{\text{reator}}^{-1}$ ). A estratégia E4 foi repetida durante o experimento de adição de alcalinidade, uma vez que foi uma das que apresentou melhores resultados em termos de remoção de nitrogênio total e DQO, conforme discutido no item 6.1.4.1.

Durante a estratégia E6 foi observado consumo mais intenso de  $\text{N-NH}_4^+$  (cerca de  $103,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{N-NH}_4^+$  removida) (Figura 6.16; Tabela A7), em relação à E4 (cerca de  $86,2 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{N-NH}_4^+$ ) (Figura 6.11; Tabela A7), com eficiências de remoção medianas iguais a 63% para este composto (Figura 6.16; Tabela A7). Em contrapartida, maiores concentrações de nitrato produzido foram observadas, com valores medianos iguais a  $32,5 \text{ mg.L}^{-1}$  (Figura 6.16; Tabela A7) quando comparados a estratégia E4 ( $26,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de nitrato produzido) (Figura 6.11; Tabela A7).



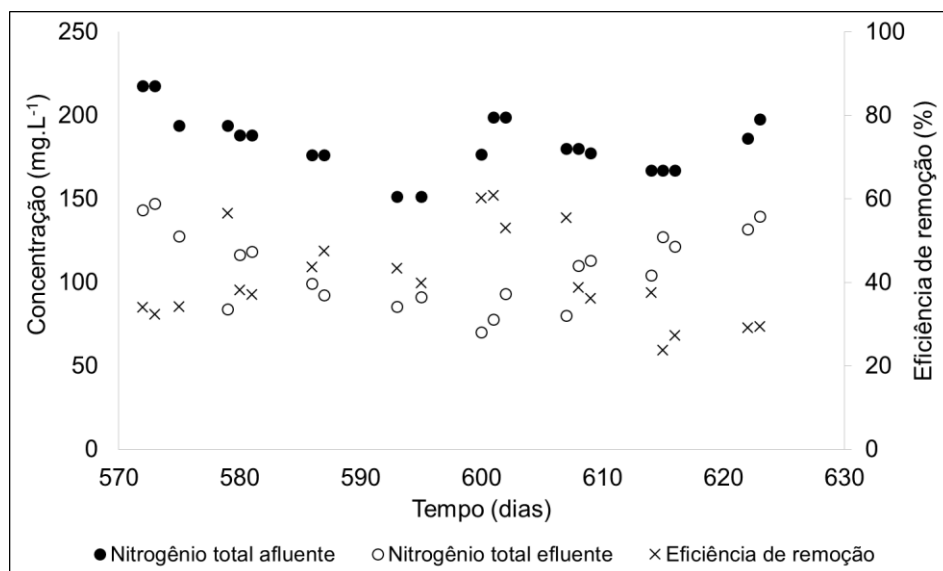
**Figura 6.16** - Dinâmica dos compostos nitrogenados e eficiência de remoção de  $\text{N-NH}_4^+$  durante a estratégia E6 (15 min aeração/ 45 min anóxico;  $0,125 \text{ L.min}^{-1}.\text{L}_{\text{reator}}^{-1}$ ; adição de bicarbonato) de aeração do RBS-Lab.

A relação entre a produção de nitrato e o consumo de amônia durante esta estratégia é apresentada na Figura 6.17. A relação obtida, assim como nas estratégias avaliadas anteriormente foi elevada, atingindo valores máximos próximos a 0,50, com mediana igual a 0,30 (Figura 5.17; Tabela A8).



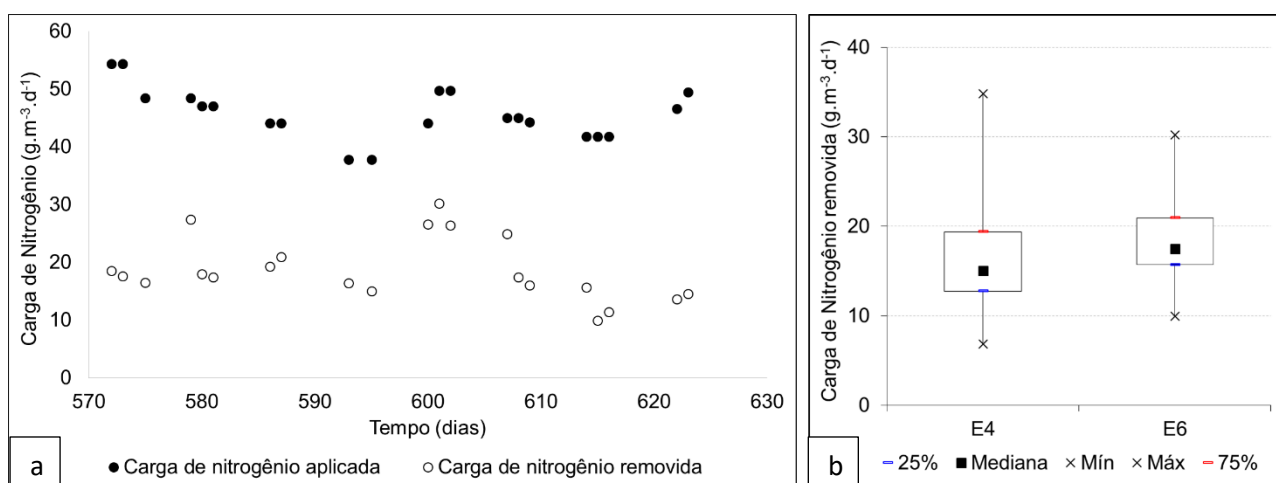
**Figura 6.17** - Coeficiente estequiométrico para o consumo de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> por consumo de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> durante a estratégia E6 (15 min aeração/ 45 min anóxico; 0,125 L.min<sup>-1</sup>.Lreator<sup>-1</sup>; adição de bicarbonato) de aeração da Fase 3 do RBS lab.

O RBS-Lab foi capaz de remover entre 24% a 60% do nitrogênio total afluyente, com mediana igual a 38% (Figura 7.18; Tabela A7), valor bem próximo ao obtido durante a estratégia E4 (40% de eficiência de remoção de nitrogênio total) (Figura 6.11; Tabela A7). Isso resultou em uma concentração de nitrogênio removida de cerca de 70 mg.L<sup>-1</sup>.



**Figura 6.18** - Concentrações afluentes, efluentes e eficiência de remoção de nitrogênio total durante a estratégia E6 (15 min aeração/ 45 min anóxico; 0,125 L.min<sup>-1</sup>.Lreator<sup>-1</sup>; adição de bicarbonato) de aeração da Fase 3 de operação do RBS-Lab

Na Figura 6.19a são apresentadas as cargas aplicadas e removidas de nitrogênio no RBS-Lab durante E6. Comparação entre as cargas removidas durante E6 e E4 é apresentada na Figura 6.19b. As cargas de nitrogênio aplicadas durante E6 variaram de 37,8 g.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup> a 54,4 g.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>, sendo que mediana igual a 17,5 g.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup> de nitrogênio foi removido. Não houve diferença significativa entre as medianas das cargas nitrogenadas consumidas durante E4 (15,0 g.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>) e E6 (17,5 g.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>) pelo teste U de *Mann-Whitney* a um nível de significância de 5% (pvalor=0,225876). Assim, a adição de alcalinidade não influenciou no consumo de nitrogênio sob as condições de aeração avaliadas.

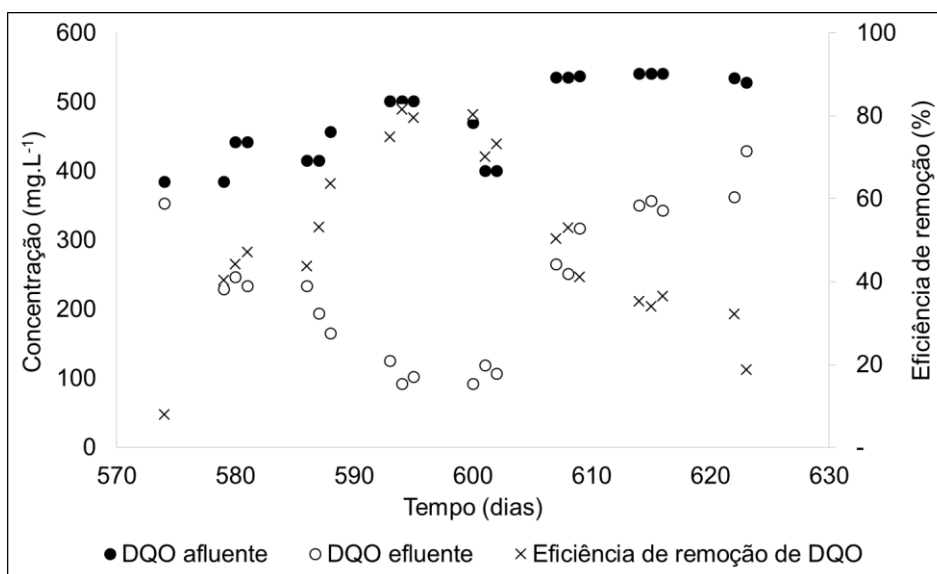


**Figura 6.19** - Cargas nitrogenadas aplicadas e removidas durante a estratégia E6 (15 min aeração/ 45 min anóxico; 0,125 L.min<sup>-1</sup>.Lreator<sup>-1</sup>; adição de bicarbonato) de aeração (a) e estatística descritiva das cargas nitrogenadas removidas durante as estratégias E4 (15 min aeração/ 45 min anóxico; sem adição de bicarbonato) e E6 (b) da Fase 3 de operação do RBS-Lab

A concentração de biomassa no interior do RBS-Lab se manteve em E6 (3,83 g STV.L<sup>-1</sup>) se comparada à estratégia anterior E5 (3,73 g STV.L<sup>-1</sup>). Da mesma maneira, a relação entre o substrato adicionado por massa de biomassa permaneceu a mesma das estratégias anteriores, igual a 0,01 gN.gSTV<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (Figura A2; Tabela A12; Apêndice C).

Cerca de 47,2 % da DQO afluente, que teve concentração variando de 384,6 mg.L<sup>-1</sup> até 541,3 mg.L<sup>-1</sup>, foi removida durante E6 (Figura 6.20; Tabela A9). A eficiência de remoção de DQO em E6 foi bem menor quando comparada à estratégia E4 (mediana igual a 73,6 %), entretanto, ressalta-se que durante o período da estratégia E6 o digestato aplicado ao reator apresentou valores maiores de DQO, com medianas iguais a 501,3 mg.L<sup>-1</sup>. O maior valor de DQO afluente também resultou em valor elevado da relação DQO/N aplicado ao RBS-Lab durante esse

período, em torno de 3,20. A relação DQO/N foi bastante elevada durante E6, quando comparada ao período da estratégia E4, quando essa relação permaneceu em torno de 1,70. No entanto, como foi discutido anteriormente, a remoção de nitrogênio não foi alterada, durante a estratégia E6 em comparação com a estratégia E4, que foi uma das que apresentou melhores resultados, dentre as cinco primeiras estratégias avaliadas. Dessa forma, os valores mais elevados da relação DQO/N neste período não causou prejuízos na performance do reator em termos de remoção de nitrogênio.



**Figura 6.20** - Concentrações afluentes, efluentes e eficiências de remoção de DQO total durante a estratégia E6 de aeração da Fase 3 de operação do RBS-Lab

A mediana da concentração efluente de alcalinidade durante a estratégia de aeração E6, foi maior em relação às estratégias anteriores, igual a 278,0 mg.L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub> (Tabela 6.3). O consumo durante este período foi igual a 806,0 mg.L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub>, maior do que em E4, em que o consumo foi igual a 597,0 mg.L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub>. Considerando uma concentração de nitrogênio amoniacal removida igual a 111,5 mg.L<sup>-1</sup> em E6, a relação entre o consumo de alcalinidade e o consumo de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> em E6 foi igual a 7,2, bem próximo ao obtido em E4, que foi igual a 6,9.

**Tabela 6.3** - Estatística descritiva das concentrações afluentes e efluentes de alcalinidade durante a estratégia E6 de aeração da Fase 3 de operação do RBS lab.

	<b>Alcalinidade afluente (mg CaCO<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Alcalinidade efluente (mg CaCO<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup>)</b>
Nº de dados	9	8
Média (DP)	1074,6 (164,9)	377,6 (296,3)
Mediana	1084,0	278,0
Mínimo	707,6	61,4
Máximo	1218,3	913,9
Percentil 25%	1023,0	168,9
Percentil 75%	1202,9	573,1

Os resultados obtidos durante a estratégia E6 de operação, indicam que a adição de alcalinidade, embora tenha favorecido um aumento na remoção de nitrogênio amoniacal, não impactou a remoção de nitrogênio total, uma vez que o aumento na remoção de amônia foi acompanhado por um aumento na produção de nitrato. Os valores elevados das relações entre o consumo de alcalinidade e o consumo de amônia (igual a 7,2) e de produção de nitrato em relação ao consumo de amônia (igual a 0,30) indicam que durante esta estratégia a nitrificação parece ter sido a rota metabólica preferencial para o consumo de amônia no reator.

Bactérias aeróbias oxidadoras de amônia (BOA), de nitrito (BON) e anammox competem também por alcalinidade, já que são organismos autotróficos. De acordo com Ma *et al.* (2015) BOA e BON possuem mecanismos para sobreviver em condições de carbono inorgânico limitantes por meio da regulação das vias de fixação de carbono. BON também podem sobreviver com um modo de crescimento heterotrófico quando as concentrações de CO<sub>2</sub> são limitantes. Bactérias anammox, entretanto, não são conhecidas por possuir tais mecanismos adaptativos e por esse motivo, possivelmente esse grupo é o mais afetado, em condições em que as concentrações de carbono inorgânico são limitantes.

#### 6.1.3.1 Recuperação da atividade anammox no RBS-Lab

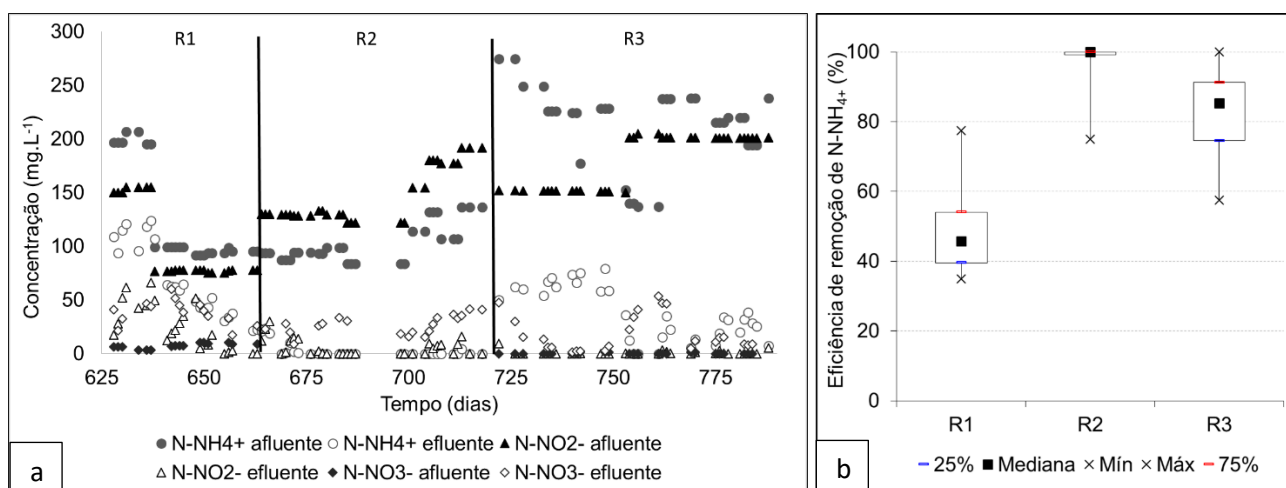
Após os primeiros experimentos de aeração observou-se um decréscimo considerável nas eficiências de remoção de nitrogênio em relação às fases anteriores (Fase 1 de enriquecimento de bactérias anammox e Fase 2, quando o reator foi alimentado com digestato de resíduos alimentares e suplementado com nitrito, em condições anaeróbias). A aeração parece ter causado instabilidade na performance do reator, uma vez que favoreceu outros processos mediados por micro-organismos com metabolismo aeróbio, como a nitrificação.

Com intuito de recuperar a atividade anammox no reator, após a estratégia E6, o reator passou a ser operado novamente em condições anaeróbias. A partir dos 628 dias de operação até o dia 663, o RBS foi alimentado com o digestato de resíduo alimentar e suplementado com nitrito, em condições anaeróbias, assim como na Fase 2 de operação. Esse período foi denominado R1. Nos primeiros dias de R1 (628 até aproximadamente 640 dias) o digestato anaeróbio a ser tratado no reator foi diluído quatro vezes resultando em uma concentração de  $\text{N-NH}_4^+$  afluyente próxima de  $200 \text{ mg.L}^{-1}$ . Nitrito foi adicionado ao reator com concentração menor, próxima de  $150 \text{ mg.L}^{-1}$ , resultando em uma relação  $\text{N-NO}_2^- / \text{N-NH}_4^+$  afluyente próxima de 0,76. Baixas concentrações de nitrito foram adicionadas com intuito de evitar possível inibição de bactérias anammox, que são sensíveis a elevadas concentrações desse composto, especialmente quando não estão ativas no meio, de acordo com o observado por Carvajal-Arroyo *et al.* (2014a). A adição de baixas cargas de nitrito é uma das estratégias recomendadas para a recuperação de reatores anammox após condições adversas (YE *et al.*, 2018). Observou-se durante os primeiros dias de operação de R1 que nem a amônia, tão pouco o nitrito afluentes estavam sendo consumidos completamente e por esse motivo, o digestato passou a ser diluído 8 vezes a partir dos 640 dias de operação, resultando em concentrações afluentes próximas a  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{N-NH}_4^+$ . Consequentemente, as concentrações de nitrito aplicadas foram reduzidas, permanecendo próximas a  $75 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_2^-$ . Mesmo com a redução das concentrações afluentes de amônia, o RBS teve dificuldades em remover os compostos nitrogenados gerando efluentes com concentrações elevadas de  $\text{N-NH}_4^+$  e  $\text{N-NO}_2^-$  (Figura 6.21). Durante R1, as concentrações afluentes de  $\text{N-NH}_4^+$  e  $\text{N-NO}_2^-$  tiveram medianas iguais a  $99,4 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $77,7 \text{ mg.L}^{-1}$  sendo que as eficiências de remoção desses compostos foram, respectivamente, iguais a 46% e 77%, como pode ser observado na Tabela A8 dos Apêndice A.

Dessa maneira, uma tentativa de recuperar mais rapidamente a atividade de bactérias anammox no RBS foi realizada durante o período denominado R2 (de 664 até 719 dias de operação). Durante esse período, o reator foi alimentado com meio de cultura mineral e autotrófico e em condições anaeróbias, assim como na Fase 1, de enriquecimento e cultivo de bactérias anammox. Uma vez submetido à essas condições, o reator recuperou sua performance e estabilidade na remoção dos compostos nitrogenados, alcançando remoção de praticamente todo o nitrogênio amoniacal afluyente, que teve mediana igual a  $94,3 \text{ mg.L}^{-1}$ . Elevada eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal, com mediana igual a 100% foi alcançada (Figura 6.21; Tabela A7). Durante este período, experimento de atividade anammox específica (AAE) foi realizado, e as taxas de consumo de  $\text{N-NH}_4^+$ ,  $\text{N-NO}_2^-$  e produção de  $\text{N-NO}_3^-$  foram iguais a, respectivamente, 2,51, 3,28 e  $0,99 \text{ mg.L}^{-1}\text{N.gSTV}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , indicando que a atividade desses micro-

organismos foi realmente recuperada no reator durante o período R2. Os resultados do experimento de AAE são apresentados no Apêndice B (Figura A1; Tabela A11).

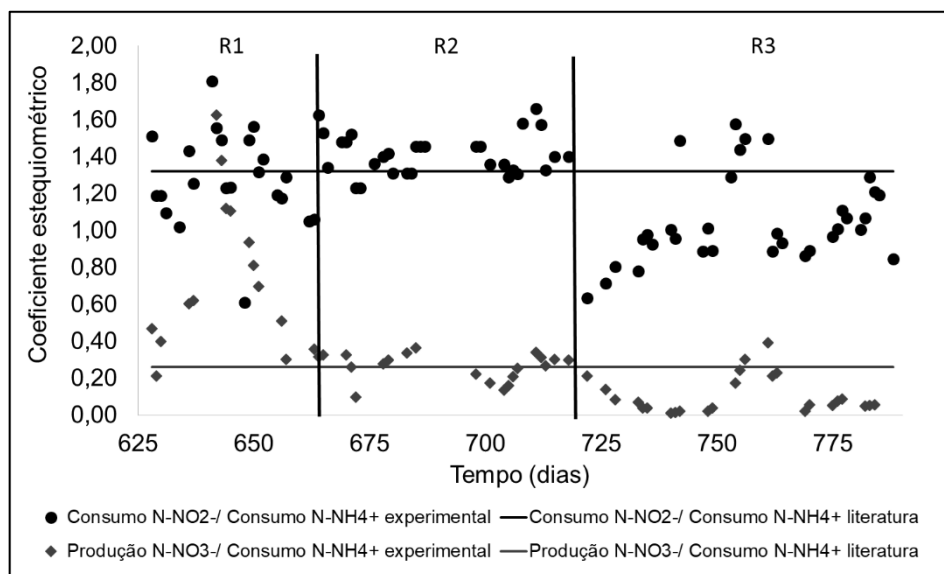
Após a recuperação da atividade anammox no RBS-Lab, o reator foi novamente alimentado com digestato de resíduo alimentar e suplementado com nitrito, em condições anaeróbias, durante o período denominado R3 (de 720 até 788 dias). Durante esse período, o digestato de resíduo alimentar voltou a ser diluído quatro vezes, resultando em concentrações bastante elevadas de  $\text{N-NH}_4^+$  afluentes, próximas a  $250 \text{ mg.L}^{-1}$ . O reator novamente alcançou elevadas eficiências de remoção de nitrogênio amoniacal, com mediana igual a 85%. O  $\text{N-NO}_2^-$ , que teve concentração afluente variando entre 150,3 e  $204,9 \text{ mg.L}^{-1}$ , foi completamente removido, com eficiência de remoção mediana igual a 100% durante este período (Figura 6.21; Tabela A7).



**Figura 6.21** - Dinâmica dos compostos nitrogenados (a) e eficiências de remoção de  $\text{N-NH}_4^+$  (b) durante o período de recuperação (R1, R2 e R3) da Fase 3 de operação do RBS-Lab

Os coeficientes estequiométricos para o consumo de  $\text{N-NO}_2^-$  / consumo de  $\text{N-NH}_4^+$  variaram bastante, especialmente durante R1, com valores entre 0,61 e 1,81. Para a produção de  $\text{N-NO}_3^-$  / consumo de  $\text{N-NH}_4^+$  os valores permaneceram entre 0,21 e 1,63. Valores próximos aos da estequiometria para reação anammox foram encontrados durante R2, com medianas iguais a 1,40 para o consumo de  $\text{N-NO}_2^-$  / consumo de  $\text{N-NH}_4^+$  e iguais a 0,29 para a produção de  $\text{N-NO}_3^-$  / consumo de  $\text{N-NH}_4^+$ . Durante R3, de maneira geral os valores para esses dois coeficientes estequiométricos foram menores em relação aos da literatura para o processo anammox. A mediana para o consumo de  $\text{N-NO}_2^-$  / consumo de  $\text{N-NH}_4^+$  foi igual 1,00 e para a produção de  $\text{N-NO}_3^-$  / consumo de  $\text{N-NH}_4^+$  igual a 0,05 (Figura 6.22; Tabelas A8 e A10). Durante R3 o processo anammox pode ter ocorrido acoplado à redução do nitrato a nitrito por bactérias

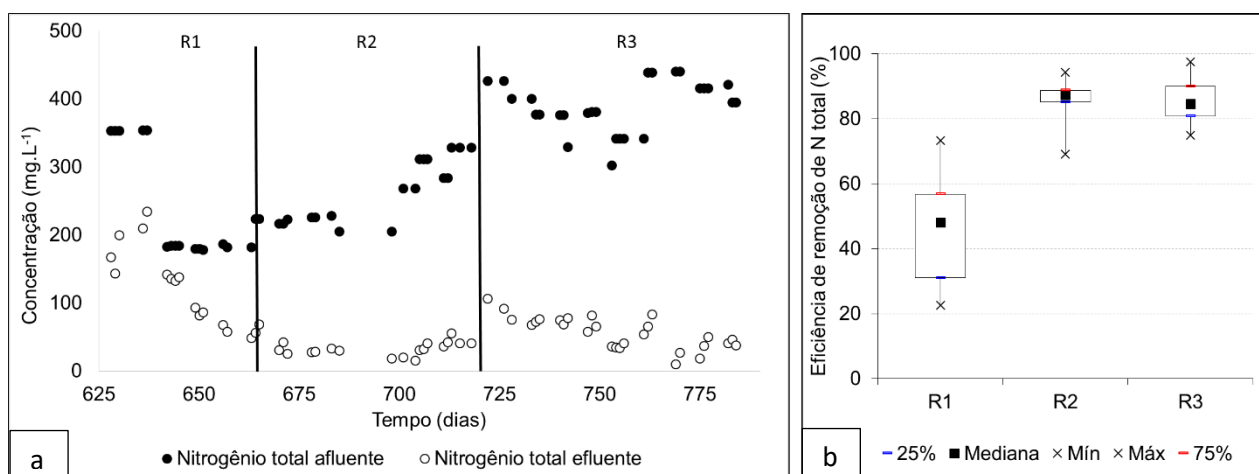
desnitrificantes. Segundo Waki *et al.* (2013) na presença de doadores de elétrons, como matéria orgânica, por exemplo, bactérias desnitrificantes reduzem o nitrato a nitrito, e bactérias anammox são capazes de competir pelo nitrito proveniente da redução do nitrato e utilizá-lo para a oxidação do íon amônio. Isso pode acontecer, especialmente quando o afluente possui baixa relação C/N, caso contrário, bactérias desnitrificantes acabam por vencer a competição pelo nitrito em detrimento de bactérias anammox. Esse processo é também chamado de desnitrificação parcial/ anammox (MA *et al.*, 2016). Vale ressaltar, que durante R3 a relação DQO/N afluente ao reator foi baixa, em torno de 1,0. Dessa forma, esta poderia ser uma explicação para o maior consumo de amônia em relação ao nitrito, entretanto, trata-se de uma hipótese, que necessitaria de maiores investigações para ser confirmada. Outra explicação se encontra apoiada no fato de que após o período de recuperação, o gênero predominante de bactéria anammox no RBS-Lab passou a ser *Ca. Jettenia*, que é capaz de realizar a redução desassimilatória do nitrato à amônia (RDNA) utilizando compostos orgânicos como doadores de elétrons (ALI *et al.*, 2015; HUANG *et al.*, 2014; LIANG *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2018). Por meio deste metabolismo, *Ca. Jettenia* poderia retirar nitrato do meio e produzir amônia, consumindo matéria orgânica. Isso explicaria os menores coeficientes obtidos em R3.



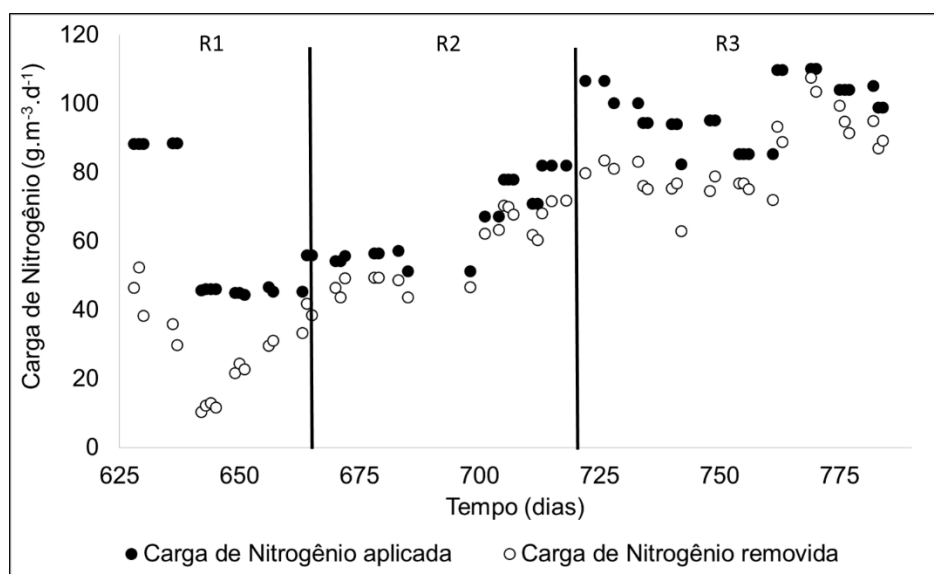
**Figura 6.22** - Coeficientes estequiométricos para o consumo de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> / consumo de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e para a produção de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> / consumo de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> durante o período de recuperação (R1, R2 e R3) da Fase 3 de operação do RBS-Lab

Em termos de nitrogênio total boas eficiências de remoção foram alcançadas durante R2 e R3, com medianas iguais a 87% e 85%, respectivamente (Figura 6.23). As cargas de nitrogênio removidas nestas fases, atingiram 71,9 g.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup> durante R2 e 107,6 g.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup> durante R3 (Figura

6.24). Isso resultou em baixas concentrações de nitrogênio total no efluente iguais a 32,9 mg.L<sup>-1</sup> durante R2 e 58,4 mg.L<sup>-1</sup> em R3.



**Figura 6.23** - Concentrações afluentes, efluentes (a) e eficiências de remoção (b) de nitrogênio total durante o período de recuperação (R1, R2 e R3) da Fase 3 de operação do RBS-Lab.

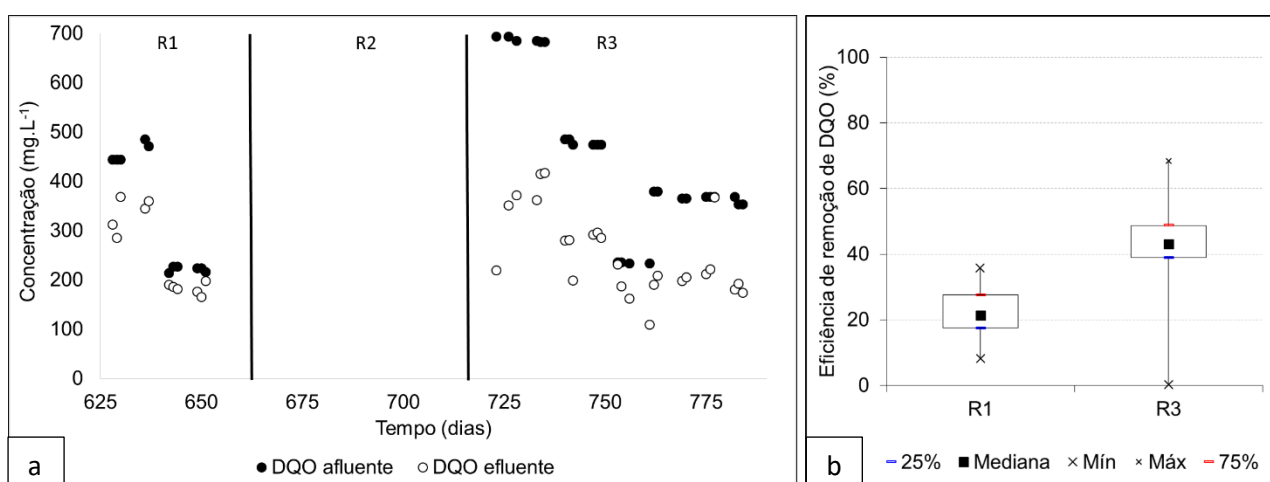


**Figura 6.24** - Cargas de nitrogênio aplicadas e removidas durante o período de recuperação (R1, R2 e R3) da Fase 3 de operação do RBS-Lab

Observou-se que houve perda de sólidos totais voláteis no RBS-Lab após o início do período de recuperação. Ao final de R1, a concentração de STV foi igual a 3,16 g.L<sup>-1</sup>, menor do que o obtido durante a estratégia de aeração E6 avaliada anteriormente, igual a 3,83 mg.L<sup>-1</sup>. Após o período R2, em que foi adicionado meio de cultura mineral e autotrófico, a concentração de biomassa diminuiu ainda mais atingindo 2,57 g.L<sup>-1</sup>. Provavelmente isso ocorreu devido à

seleção de micro-organismos anaeróbios e autotróficos no interior do reator, assim como foi observado ao final da Fase 1 de operação, como discutido anteriormente. Assim como observado também após a Fase 2, durante o período de recuperação R3, em que o reator foi novamente alimentado com digestato mais nitrito, houve um aumento da concentração de STV, atingindo valor igual a 3,61 g.L<sup>-1</sup> (Figura A2, Apêndice C). Durante os períodos de recuperação as relações A/M aumentaram gradualmente, sendo iguais a 0,01, 0,02 e 0,03 g N.g STV<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, durante R1, R2 e R3, respectivamente (Tabela A12, Apêndice C).

A DQO afluente variou durante R1, de 214,2 a 485,3 mg.L<sup>-1</sup>, mas em especial em R3 apresentou grande variabilidade (233,5 a 694,3 mg.L<sup>-1</sup>). As eficiências de remoção foram baixas com medianas iguais a 22% em R1 e 42% em R2 (Figura 6.24). A alcalinidade não foi monitorada em R1. Em R3, não foi observado consumo de alcalinidade, sendo que as concentrações medianas efluentes obtidas (601,0 mg.L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub>) foram maiores do que as afluentes (550,1 mg.L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub>), provavelmente devido à ocorrência de desnitrificação heterotrófica, da mesma maneira como foi observado durante a Fase 2 de operação do RBS (Tabela 6.4).



**Figura 6.25** - Concentrações afluentes, efluentes (a) e eficiências de remoção de DQO (b) durante o período de recuperação (R1, R2 e R3) da Fase 3 de operação do RBS-Lab

**Tabela 6.4** - Concentrações médias e medianas afluentes e efluentes de alcalinidade durante o período de recuperação R3 da Fase 3 de operação do RBS-Lab

	Alcalinidade afluente (mg CaCO <sub>3</sub> .L <sup>-1</sup> )	Alcalinidade efluente (mg CaCO <sub>3</sub> .L <sup>-1</sup> )
Média (DP)	622,6 (390,1)	620,2 (242,7)
Mediana	550,1	601,0

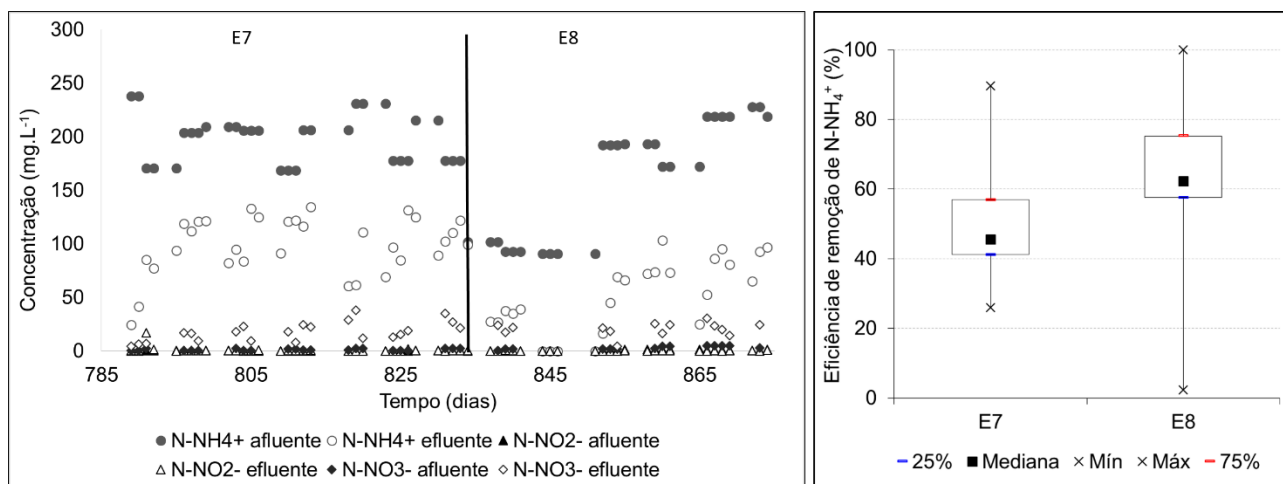
Bactérias anammox têm se mostrado micro-organismos bastantes resilientes quando submetidos a condições adversas. Alguns autores têm estudado de que maneira estes micro-organismos são capazes de sobreviver e se recuperar após condições de estresse, por exemplo na ausência ou em condições de limitação de substratos, como amônia e/ou nitrito. Segundo ZHANG *et al.* (2015) em condições adversas, bactérias anammox passam por processos endógenos de manutenção celular que inicialmente incluem a utilização de polímeros intracelulares como o glicogênio e exopolímeros (EPS), e dessa forma mantêm sua integridade e atividade celular. Em um segundo momento, processos de decaimento se iniciam, que podem levar à redução da quantidade e/ou atividade das bactérias no meio. Durante o presente trabalho, após o início das estratégias de aeração e o desenvolvimento de grupos microbianos aeróbios, que competem com bactérias anammox por substratos, como o nitrito, a atividade dessas bactérias parece ter ficado comprometida. Entretanto, essa inibição mostrou-se reversível, e quando fornecidas novamente condições ótimas para seu crescimento (durante o período de recuperação) esses micro-organismos foram capazes de se desenvolver novamente, assim como a performance do reator na remoção de nitrogênio foi recuperada, conforme discutido anteriormente.

#### **6.1.4 Otimização das condições de aeração visando obter maior controle do processo de nitrificação parcial**

Após a recuperação de atividade anammox no reator, de 789 até 875 dias de operação foram avaliadas mais duas estratégias de aeração (E7 e E8). A estratégia E7 consistiu de aeração intermitente com 15 minutos de aeração e 45 minutos de anoxia (assim como a estratégia E4), entretanto, durante E7 a taxa de ar aplicada foi reduzida em relação à E4, igual  $0,026 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}_{\text{reator}}^{-1}$ . A estratégia E8, por sua vez, foi semelhante à estratégia E3 (15 minutos de aeração e 30 minutos de anoxia), com a mesma taxa de ar aplicada em E7 ( $0,026 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}_{\text{reator}}^{-1}$ ).

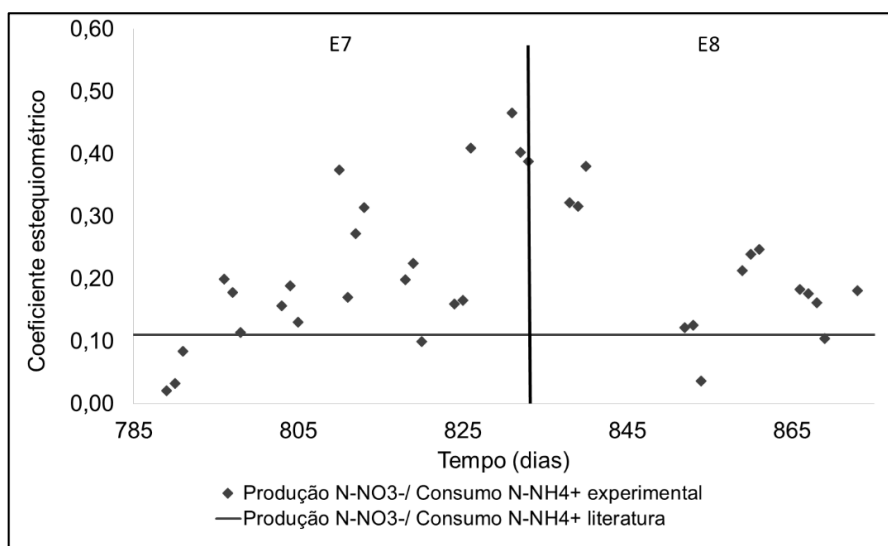
A Figura 6.26 apresenta a dinâmica dos compostos nitrogenados ( $\text{N-NH}_4^+$ ,  $\text{N-NO}_2^-$  e  $\text{N-NO}_3^-$ ) durante E7 e E8. Durante os dois últimos períodos de operação do RBS, as concentrações de  $\text{N-NH}_4^+$  afluente variaram de  $90,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (em E8) até  $238,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (em E7). As medianas das concentrações afluentes tiveram maiores valores em E7 (mediana igual a 205,8) do que em E8 ( $177,6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Isso influenciou para que valores maiores de eficiência de remoção de  $\text{N-NH}_4^+$  fossem obtidos em E8 (62%) se comparado à E7 (46%) (Figura 6.26; Tabela A7). Não obstante, as concentrações de  $\text{N-NH}_4^+$  removidas, foram bastantes semelhantes em E7 e E8, iguais a  $109,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  e  $109,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente.

As concentrações de nitrito efluentes permaneceram bem próximas de zero, com mediana igual a 0,4 mg.L<sup>-1</sup> em E7 e 0,1 mg.L<sup>-1</sup> em E8. Nitrato foi produzido em menor quantidade durante estas duas estratégias, se comparadas às estratégias avaliadas anteriormente (E1 até E6), com valores medianos iguais a 16,5 mg.L<sup>-1</sup> em E7 e 22,0 mg.L<sup>-1</sup> em E8 (Figura 6.26; Tabela A7).



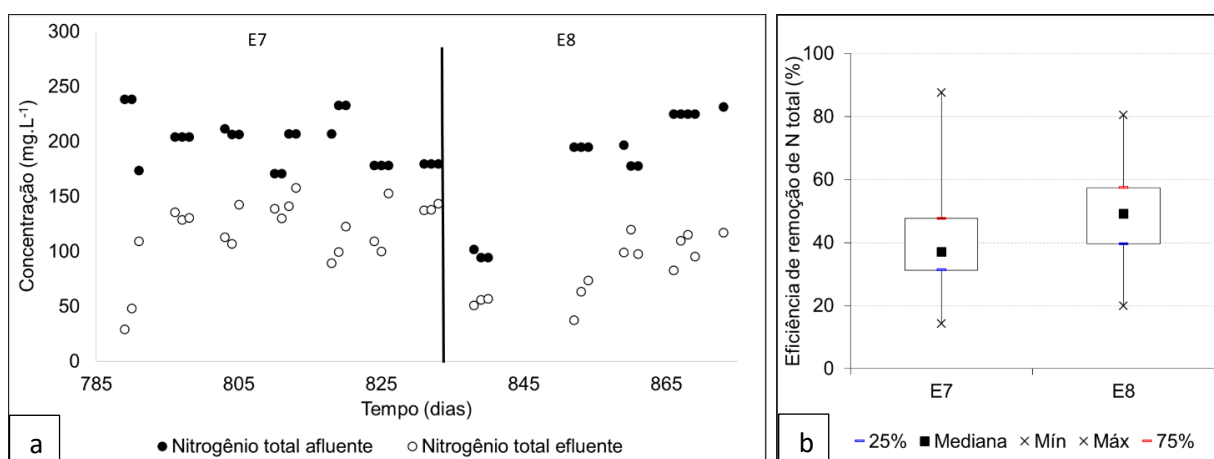
**Figura 6.26** - Dinâmica dos compostos nitrogenados (a) e eficiências de remoção de nitrogênio amoniacal (b) durante as estratégias de aeração E7 (15 min aeração/ 45 min anóxico; 0,026 L.min<sup>-1</sup>.L<sub>reator</sub><sup>-1</sup>) e E8 (15 min aeração/ 30 min anóxico; 0,026 L.min<sup>-1</sup>.L<sub>reator</sub><sup>-1</sup>) da Fase 3 de operação do RBS-Lab

As estratégias E7 e E8 foram as que apresentaram os coeficientes para a produção de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ consumo de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> mais próximos aos reportados na literatura para o processo de nitrificação parcial/ anammox, dentre as estratégias avaliadas. A Figura 6.27 apresenta os coeficientes obtidos ao longo desse período e na Tabela A8 do Apêndice A a estatística descritiva dos coeficientes é apresentada. Em E7 a mediana obtida para esse coeficiente foi igual a 0,17 e em E8 igual a 0,22. Esses resultados, juntamente com os resultados das concentrações de nitrato efluente, em que foi observada menor produção desse composto nestes dois últimos períodos, indicam que as menores taxas de ar aplicadas foram mais eficazes para controlar o processo de nitrificação parcial até nitrito, evitando, portanto, a nitrificação completa até nitrato.



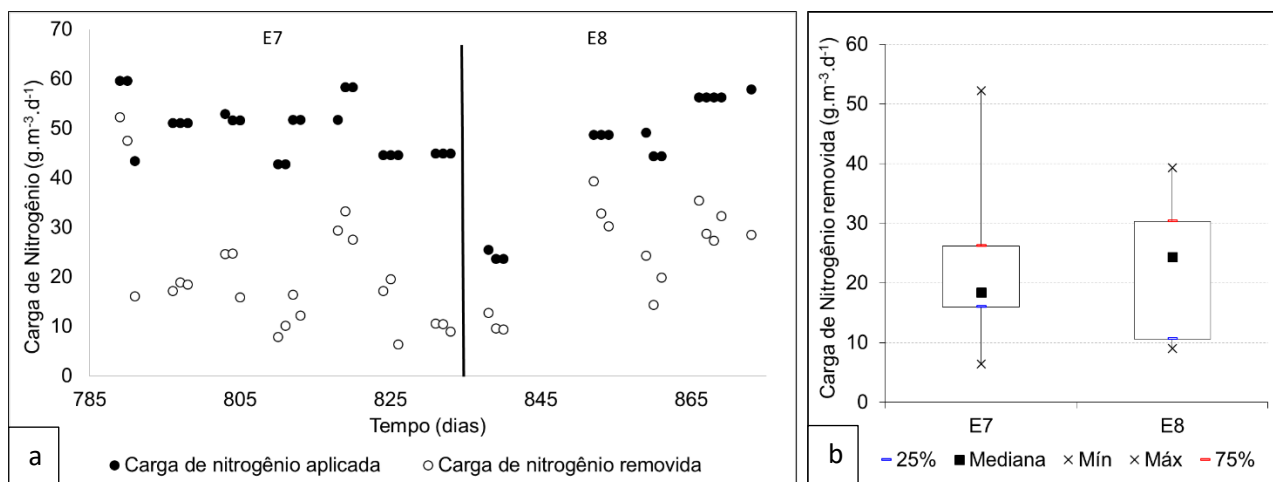
**Figura 6.27** - Coeficientes estequiométricos para a produção de  $\text{N-NO}_3^-$ / consumo de  $\text{N-NH}_4^+$  durante as estratégias de aeração E7 (15 min aeração/ 45 min anóxico;  $0,026 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}_{\text{reator}}^{-1}$ ) e E8 (15 min aeração/ 30 min anóxico;  $0,026 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}_{\text{reator}}^{-1}$ ) da Fase 3 de operação do RBS-Lab

As concentrações afluentes de nitrogênio total no digestato de resíduo alimentar durante E7 variou de 171,0 a 238,5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , sendo que o reator foi capaz de remover entre 14% a 88%, com mediana igual a 37% de eficiência de remoção, neste período. Em E8, as concentrações afluentes variaram de 94,8 até 231,7. Neste período o RBS removeu entre 20% a 81% do nitrogênio total afluente, com valor mediano mais elevado em relação à E7, igual a 49% (Figura 6.28; Tabela A7).



**Figura 6.28** - Concentrações afluentes, efluentes (a) e eficiências de remoção de nitrogênio total durante as estratégias de aeração E7 (15 min aeração/ 45 min anóxico;  $0,026 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}_{\text{reator}}^{-1}$ ) e E8 (15 min aeração/ 30 min anóxico;  $0,026 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}_{\text{reator}}^{-1}$ ) da Fase 3 de operação do RBS-Lab

As cargas de nitrogênio aplicadas variaram de 42,8 até 59,6  $\text{g.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$  em E7 e de 23,7 até 57,9  $\text{g.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$  em E8. Não houve diferença significativa entre as medianas das cargas nitrogenadas removidas em E7 (18,4  $\text{g.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ ) e E8 (24,3  $\text{g.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ ) segundo o teste U de *Mann-Whitney* a um nível de significância igual a 5% ( $p_{\text{valor}}=0,802320$ ) (Figura 6.29; Tabela A7).

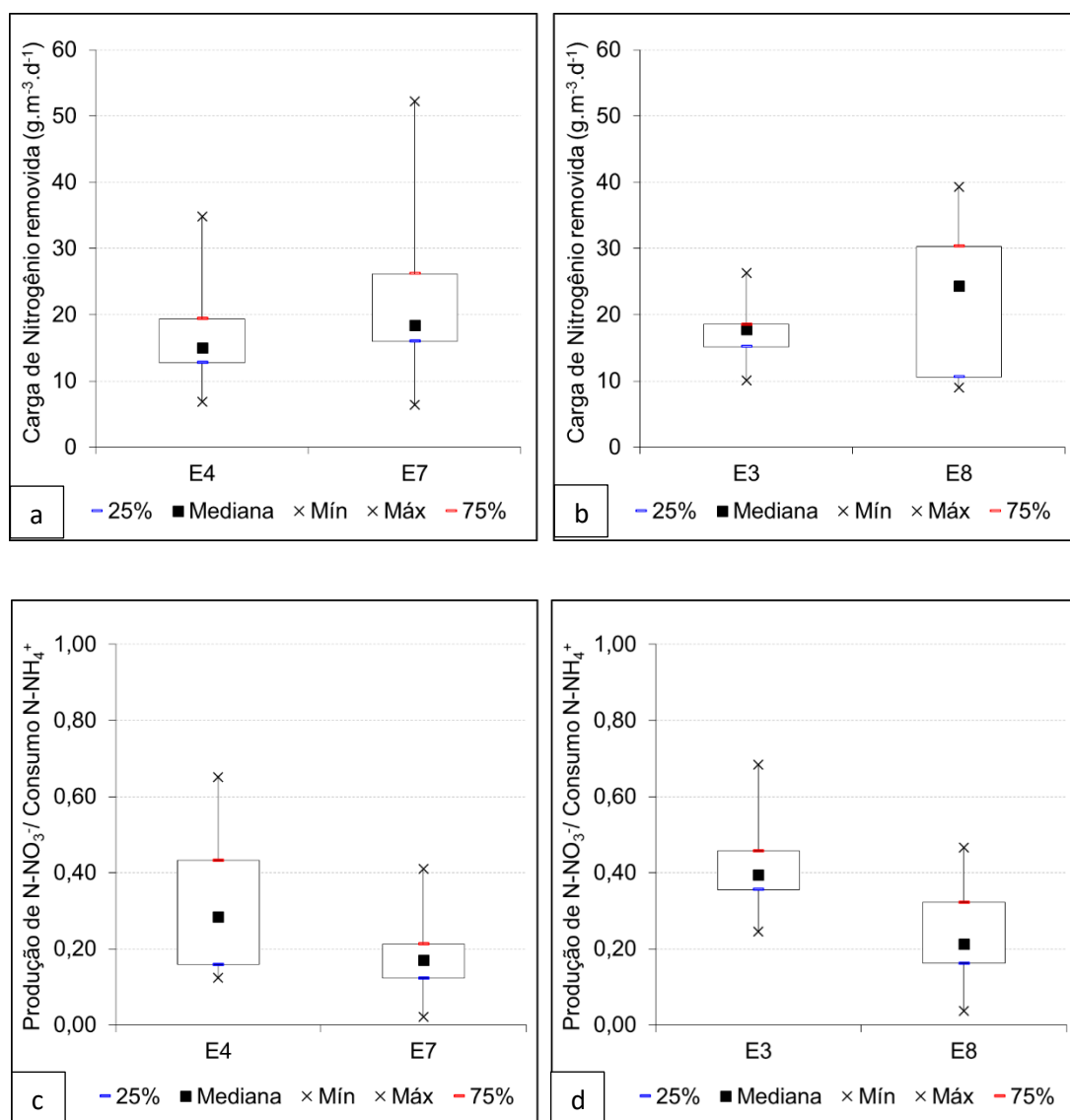


**Figura 6.29** - Cargas de nitrogênio aplicadas (a) e removidas (a e b) durante as estratégias de aeração E7 (15 min aeração/ 45 min anóxico;  $0,026 \text{ L.min}^{-1}.\text{L}_{\text{reator}}^{-1}$ ) e E8 (15 min aeração/ 30 min anóxico;  $0,026 \text{ L.min}^{-1}.\text{L}_{\text{reator}}^{-1}$ ) da Fase 3 de operação do RBS-Lab

Para avaliar se houve influência da redução da taxa de ar aplicada durante estas duas últimas estratégias de aeração avaliadas, na remoção de nitrogênio no RBS-Lab, os resultados de E7 foram comparados aos de E4 e os resultados de E8 foram comparados aos de E3 por meio de análises estatísticas (Figura 6.30).

Os resultados das análises estatísticas não demonstraram diferenças significativas entre as medianas das cargas nitrogenadas removidas em E4 (15,0  $\text{g.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ ) e E7 (18,4  $\text{g.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ ) ( $p_{\text{valor}}=0,190123$ ). Tão pouco foram diferentes estatisticamente as medianas das cargas removidas nas estratégias E8 (24,3  $\text{g.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ ) e E3 (17,8  $\text{g.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ ) ( $p_{\text{valor}}=0,261517$ ) (Figura 6.30 a e b). Dessa forma, no presente trabalho, as diferentes taxas de ar aplicadas não influenciaram na remoção de nitrogênio total durante as estratégias de aeração intermitentes com 15 minutos de aeração/ 45 minutos de anoxia e nem com 15 minutos de aeração/30 minutos de anoxia. Apesar disso, os coeficientes estequiométricos para a produção de  $\text{N-NO}_3^-$ /consumo de  $\text{N-NH}_4^+$  em E7 (0,17) e E8 (0,22) foram significativamente menores quando comparados à E4 (0,28) e E3 (0,39), respectivamente ( $p_{\text{valor}}=0,030177$  entre E7 e E4 e  $p_{\text{valor}}=0,000074$  entre E8 e E3) (Figura 5.30 c e d). Isso demonstrou que a diminuição da taxa de aeração levou a uma menor produção de nitrato, sem comprometer a remoção de amônia, sendo portanto, mais

eficiente no controle da nitrificação no reator, apesar de não ter sido capaz de promover aumento significativo da remoção de nitrogênio total nos reatores.

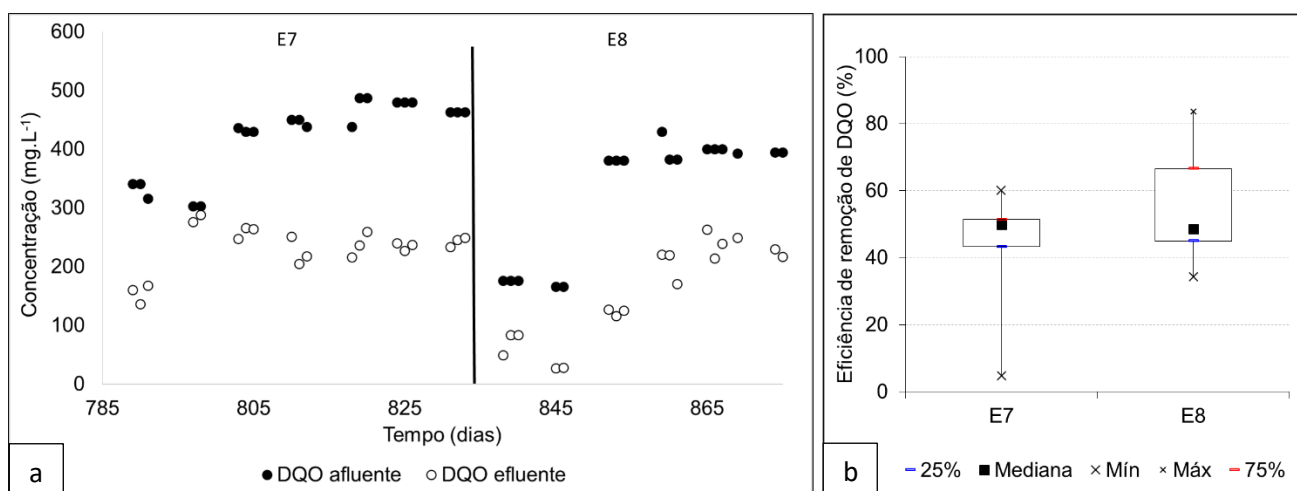


**Figura 6.30** - Cargas de nitrogênio removidas durante as estratégias de aeração E4 (15 min aeração/ 45 min anóxico; 0,125 L.min<sup>-1</sup>.L<sub>reator</sub><sup>-1</sup>) e E7 (15 min aeração/ 45 min anóxico; 0,026 L.min<sup>-1</sup>.L<sub>reator</sub><sup>-1</sup>) (a) e E3 (15 min aeração/ 30 min anóxico; 0,125 L.min<sup>-1</sup>.L<sub>reator</sub><sup>-1</sup>) e E8 (15 min aeração/ 30 min anóxico; 0,026 L.min<sup>-1</sup>.L<sub>reator</sub><sup>-1</sup>) (b) e coeficiente estequiométrico para produção de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ consumo de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> em E4 e E7 (c) e E3 e E8 (d)

Durante as duas últimas estratégias de aeração a concentração de STV no interior do reator novamente aumentou, em relação aos períodos anteriores (períodos de recuperação). A concentração de STV foi maior em E7 (4,17 g.L<sup>-1</sup>) em relação à E8 (3,87 g.L<sup>-1</sup>). Já a relação entre o substrato disponível (em termos de nitrogênio total) por massa de biomassa no RBS-

Lab durante E7 e E8 voltou a ser igual a  $0,01 \text{ gN.gSTV}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , assim como foi ao longo da maioria das demais estratégias de aeração avaliadas (Figura A2; Tabela A12, Apêndice C).

Os valores de DQO afluente variaram de 303,1 a  $487,2 \text{ mg.L}^{-1}$  em E7 e de 166,2 a  $380,7 \text{ mg.L}^{-1}$  em E8. As medianas das eficiências de remoção desse composto foram bem próximas durante as duas últimas estratégias de aeração avaliadas, iguais a 50% e 49% em E7 e E8, respectivamente (Figura 6.31; Tabela A10).



**Figura 6.31** - Concentrações afluentes e efluentes (a) e eficiências de remoção de DQO durante as estratégias de aeração E7 (15 min aeração/ 45 min anóxico;  $0,026 \text{ L.min}^{-1}.\text{L}_{\text{reator}}^{-1}$ ) e E8 (15 min aeração/ 30 min anóxico;  $0,026 \text{ L.min}^{-1}.\text{L}_{\text{reator}}^{-1}$ ) da Fase 3 de operação do RBS-Lab

De acordo com as concentrações afluentes e efluentes de alcalinidade apresentadas na Tabela 6.5, é possível observar que durante E7 houve um menor consumo de alcalinidade, estimado em cerca de  $493,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{CaCO}_3$ . Em E8, o consumo de carbono inorgânico foi igual a 638,4. Isso resultou em uma relação de consumo de alcalinidade/ consumo de  $\text{N-NH}_4^+$  igual a 4,5 para E7 e 5,8 para E8. Assim como observado para o coeficiente estequiométrico para a produção de  $\text{N-NO}_3^-$ / consumo de  $\text{N-NH}_4^+$ , a relação entre a alcalinidade e amônia consumida também foi mais baixo e mais próximo aos valores reportados na literatura para o processo de nitrificação parcial em E7.

**Tabela 6.5** – Concentrações médias e medianas de alcalinidade durante as estratégias de aeração E7 e E8 da Fase 3 de operação do RBS lab.

		<b>E7</b>	<b>E8</b>
Alcalinidade afluente (mg CaCO <sub>3</sub> .L <sup>-1</sup> )	Média (DP)	906,0 (50,8)	700,4 (234,2)
	Mediana	889,0	841,0
Alcalinidade efluente (mg CaCO <sub>3</sub> .L <sup>-1</sup> )	Média (DP)	437,1 (227,5)	199,7 (124,2)
	Mediana	395,5	202,6

### 6.1.5 Resumo dos parâmetros operacionais e resultados físico-químicos obtidos durante as estratégias de aeração avaliadas no RBS-Lab

A Fase 3 compreendeu um período total de 527 dias e teve como objetivo avaliar diferentes estratégias de aeração em busca daquela que possibilitasse melhor performance na remoção de nitrogênio de digestato de resíduo alimentar por meio do processo de nitrificação parcial/anammox. A Tabela 6.6 resume os parâmetros operacionais e os principais resultados físico-químicos durante todas as estratégias de aeração avaliadas (E1 a E8), a fim de permitir uma visão geral dos resultados obtidos durante a Fase 3 deste experimento, que já foram apresentados detalhadamente nos itens anteriores.

É possível observar que as concentrações de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> removido variaram ligeiramente com as diferentes estratégias de aeração avaliadas (intermitentes ou contínua) nem com as diferentes taxas de ar aplicadas, permanecendo entre 86,2 e 111,5 mg.L<sup>-1</sup>. Com relação à produção de nitrato, observou-se que estratégias com tempos de anoxia maiores em relação aos tempos de aeração e com menores taxas de ar aplicadas (E7 e E8) produziram menores concentrações de nitrato no efluente. Em E7 (15 min aeração/ 45 min anóxico) foram produzidos 16,5 mg.L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e em E8 (15 min aeração/ 30 min anóxico) foram produzidos 22,0 mg.L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. A redução das taxas de ar aplicadas durante estas duas estratégias, não comprometeram a remoção de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, sendo que os resultados foram comparáveis às estratégias com maiores taxas de ar aplicadas. Em E7 e E8, foram removidas 109,1 e 109,8 mg.L<sup>-1</sup> de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Tabela 6.6).

Cargas de nitrogênio total removidas tão baixas quanto 1,4 g N.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup> foram obtidas quando a estratégia de aeração consistiu de aeração intermitente com tempo de aeração igual a 45 minutos e de anoxia igual a 15 minutos, aliada à taxa de ar aplicada elevada (0,2 L.min<sup>-1</sup>.L<sub>reator</sub><sup>-1</sup>). Nestas condições a amônia oxidada parece ter sido totalmente convertida à nitrato, com acúmulo desse

composto no reator. Os maiores valores para as cargas de nitrogênio removidas, foram alcançados durante E7 e E8, com valores medianos iguais a 18,4 e 24,3 g N.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>, respectivamente. Esses valores não foram estatisticamente diferentes dos obtidos em E3 e E4, iguais a 17,8 e 15,0 g N.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>, respectivamente. Por esse motivo, as taxas de ar aplicada parecem não ter influenciado na remoção de nitrogênio total. Entretanto, durante E7 e E8, a aeração intermitente com maiores períodos anóxicos, iguais a 45 e 30 minutos, respectivamente, aliada à menor taxa de ar aplicada (0,026 L.min<sup>-1</sup>.L<sub>reator</sub><sup>-1</sup>) produziu efluentes com menores concentrações de nitrato e menores relações estequiométricas de produção de nitrato/ consumo de amônio, que foram mais próximos aos relatados na literatura para o processo de NP/A (Tabela 6.6). Dessa forma, dentre as alternativas avaliadas, as duas últimas estratégias (E7 e E8) foram mais eficazes para o controle do processo de nitrificação parcial da amônia até nitrito, sendo então recomendadas para serem utilizadas para o estabelecimento dos processos concomitantes de nitrificação parcial e anammox.

Ao longo das estratégias de aeração avaliadas houve uma tendência do aumento da concentração de STV no RBS-Lab (Tabela 6.6), especialmente a partir de E2. Esse aumento de biomassa provavelmente se deu em virtude do crescimento de bactérias aeróbias, que possuem crescimento mais rápido do que bactérias anaeróbias. Além de estratégias de aeração que envolvam baixas concentrações de oxigênio e aeração intermitente, o controle do tempo de retenção de sólidos (TRS) é também um parâmetro que pode ser controlado a fim de eliminar bactérias aeróbias, como as bactérias oxidadoras de nitrito (BON), que são prejudiciais ao processo de NP/A. No presente trabalho, o reator não foi operado com descarte de sólidos. Entretanto, em alguns trabalhos, como o realizado por Miao *et al.* (2016), foi avaliada a retirada de volumes que variaram entre 100 e 250 mL de lodo floculento, de um reator com volume de trabalho igual a 10 L, resultando em TRS (lodo floculento) variando entre 40 e 100 dias. Segundo os autores, o descarte de lodo na forma de flocos pode auxiliar na lavagem de BON do reator. O descarte de sólidos aliado à aplicação de estratégias de aeração intermitente resultou em bons resultados de remoção de nitrogênio, que alcançou 73 g N.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>, o que foi igual a aproximadamente 77% de eficiência de remoção, com baixa produção de nitrato, em torno de 1,4 mg.L<sup>-1</sup>.

**Tabela 6.6** - Resumo dos principais parâmetros operacionais avaliados durante as estratégias de aeração no RBS-Lab durante a Fase 3 de operação

	<b>E1</b>	<b>E2</b>	<b>E3</b>	<b>E4</b>	<b>E5</b>	<b>E6</b>	<b>E7</b>	<b>E8</b>
<b>Parâmetros operacionais</b>								
<b>Período aerado (min)</b>	45	15	15	15	contínuo	15	15	15
<b>Período anóxico (min)</b>	15	15	30	45	-	45	45	30
<b>Taxa de ar aplicada (L.min<sup>-1</sup>.L<sub>reator</sub><sup>-1</sup>)</b>	0,200	0,075	0,125	0,125	0,125	0,125	0,026	0,026
<b>Volume de ar aplicado (L<sub>ar</sub>.dia<sup>-1</sup>)</b>	1890,0	472,5	525,0	393,7	1575,0	393,7	81,9	109,2
<b>Temperatura (°C)</b>	35	35	35	35	35	35	35	35
<b>Adição de alcalinidade (mg.L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>)</b>	-	-	-	-	-	248 a 385	-	-
<b>pH<sup>a</sup></b>	5,39	6,85	6,87	7,45	4,97	7,87	7,83	7,49
<b>OD (%)<sup>a</sup></b>	98,6	1,00	1,35	2,90	61,3	0,45	0,90	0,60
<b>OD (mg.L<sup>-1</sup>)<sup>b</sup></b>	6,01	0,06	0,08	0,18	3,74	0,03	0,05	0,04
<b>STV (g.L<sup>-1</sup>)<sup>c</sup></b>	2,79	2,65	3,12	3,26	3,73	3,83	4,17	3,87
<b>Relação A/M<sup>d</sup></b>	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01

/Continua

	<b>E1</b>	<b>E2</b>	<b>E3</b>	<b>E4</b>	<b>E5</b>	<b>E6</b>	<b>E7</b>	<b>E8</b>
<b>Afluente</b>								
<b>N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	166,2	150,2	162,4	156,2	179,9	176,6	205,8	177,6
<b>N-NH<sub>3</sub><sup>+</sup> (mg.L<sup>-1</sup>)<sup>e</sup></b>	25,5	23,1	24,9	24,0	27,6	27,1	31,6	27,2
<b>Carga N (g.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>)</b>	42,7	38,3	41,8	39,7	47,5	45,0	51,6	48,8
<b>DQO total (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	329,1	326,6	262,0	265,8	419,1	501,3	438,3	392,2
<b>Alcalinidade (mg.L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>)</b>	606,0	683,1	683,5	710,0	836,0	1074,6	889,0	841,0
<b>Relação DQO/N<sub>total</sub></b>	1,9	2,1	1,5	1,7	2,2	2,8	2,1	2,1
<b>Relação Alcalinidade/ N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	3,6	4,5	4,2	4,5	4,6	6,1	4,3	4,7
<b>Efluente</b>								
<b>N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	61,8	50,5	49,7	70,0	76,4	65,1	96,7	67,8
<b>N-NH<sub>3</sub> (mg.L<sup>-1</sup>)<sup>e</sup></b>	0,02	0,42	0,43	2,24	0,01	5,20	7,10	3,42
<b>N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	109,5	59,5	44,3	26,0	50,5	32,5	16,5	22,0
<b>DQO total (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	225,8	125,4	70,3	84,2	128,0	233,6	237,2	217,3
<b>Removido</b>								
<b>N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	104,4	89,7	112,7	86,2	103,5	111,5	109,1	109,8
<b>Carga N (g.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>)</b>	1,4	8,8	17,8	15,0	14,1	17,5	18,4	24,3
<b>DQO total (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	103,3	201,2	191,7	181,6	291,0	267,7	201,1	174,9
<b>N removido (%)</b>	3	22	41	40	30	38	37	49

/Continua

	<b>E1</b>	<b>E2</b>	<b>E3</b>	<b>E4</b>	<b>E5</b>	<b>E6</b>	<b>E7</b>	<b>E8</b>
<b>Coefficientes estequiométricos</b>								
<b>Produção N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ consumo N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	1,01	0,66	0,39	0,28	0,57	0,30	0,17	0,21
<b>Consumo alcalinidade/ consumo N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	5,8	7,4	5,9	6,1	8,0	7,2	4,5	5,8

<sup>a</sup>As medições do pH e do oxigênio dissolvido (OD) apresentadas foram realizadas no final do ciclo de operação do reator; <sup>b</sup>A concentração de OD em mg.L<sup>-1</sup> foi estimada por meio de cálculos empíricos de acordo com Von Sperling (2005), com base na % de saturação de OD que era medido por sonda acoplada ao reator; <sup>c</sup>Concentração de STV no interior do reator; <sup>d</sup>Estimativa da relação alimento/micro-organismo (A/M), disponibilidade de substrato (em termos de nitrogênio total afluente) em relação à massa de biomassa presente no RBS-Lab (em termos de STV); <sup>e</sup>Os valores de amônia livre (N-NH<sub>3</sub>) no afluente e efluente foram estimados de acordo com Anthonisen *et al.* (1976); Os valores apresentados na Tabela são medianas dos resultados obtidos.

Não foram encontrados trabalhos na literatura que utilizassem o processo de nitrificação parcial/anammox (NP/A) para o tratamento de digestato de resíduo alimentar. Não obstante, experiências com outros tipos de efluentes, incluindo outros tipos de efluentes pré-digeridos anaerobiamente já foram relatadas em reatores de único estágio para NP/A. Na Tabela 6.7 algumas destas experiências são listadas para comparação com os resultados obtidos no presente trabalho.

É possível observar que cargas de nitrogênio removidas bastante elevadas foram obtidas utilizando o processo de NP/A para o tratamento de digestato de lodo de esgoto, alcançando  $830 \text{ g N.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$  com elevada eficiência de remoção de nitrogênio, igual a 89% (QIAO *et al.*, 2012). Eficiências de remoção de nitrogênio comparáveis ao presente trabalho, que atingiu um valor mediano igual a 49% durante a estratégia de aeração E8, foram obtidas em trabalhos conduzidos por Zhang *et al.* (2012), que obteve 48 a 51% de eficiência de remoção de nitrogênio total, durante a utilização do processo de NP/A em único estágio para tratamento de efluente de suinocultura pré-digerido anaerobiamente. Persson *et al.* (2017) também reportaram eficiências de remoção de nitrogênio variando entre 14 a 38%, quando utilizaram o processo de NP/A para tratamento de digestato de lodo de esgoto.

Os valores dos coeficientes estequiométricos para o consumo de nitrato em relação ao consumo de amônia obtidos neste trabalho foram, em geral, maiores do que os reportados na literatura para o processo de NP/A, que é igual a 0,11. Alguns dos trabalhos apresentados na Tabela 6.7 também reportam coeficientes maiores. Laureni *et al.* (2016) reportaram um valor igual a 0,16, que é semelhante ao obtido durante a estratégia E7, no presente trabalho, igual a 0,17. Persson *et al.* (2017) obtiveram valores variando entre 0,15 e 0,58 (Tabela 6.7). Esses valores são comparáveis aos encontrados durante as estratégias E3 a E8, no presente trabalho, que variaram de 0,17 a 0,57 (Tabela 6.6).

**Tabela 6.7** - Experiências com NP/ anammox em unico estágio para tratamento de diferentes tipos de efluentes

Tipo de reator	Volume (L)	T (°C)	Afluente	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> afluente (mg.L <sup>-1</sup> )	DQO/N afluente	Taxa de ar aplicada (L.min <sup>-1</sup> .L <sub>reator</sub> <sup>-1</sup> )	OD (mg/L <sup>-1</sup> )	Modo aeração	Carga N removida (g.m <sup>-3</sup> .d <sup>-1</sup> )	% N removido	Referência
RBS <sup>a</sup>	1,5	18-24	Efluente de suinocultura pré digerido anaerobiamente	245	1,71	1,3 a 2,8	0,2 a 0,4	Contínua	420	75	Figueroa <i>et al.</i> (2012)
RLF <sup>b</sup>	5,0	33	Digestato de lodo de esgoto	600-1010	-	-	5 a 6	Contínua	830	89	Qiao <i>et al.</i> (2012)
MBBR <sup>c</sup>	200	13	Digestato de lodo de esgoto	27-311	0,6 a 1,1	-	0,48 a 0,93	-	0,03 a 0,11 <sup>g</sup>	14 a 38	Persson <i>et al.</i> (2017)
MBBR	200	25	Digestato de lodo de esgoto	980	0,7	0,07 a 0,125	1,5 a 3,5	Contínua e Intermitente <sup>e</sup>	1,46 a 3,24 <sup>g</sup>	40 a 88	Yang <i>et al.</i> (2015)
RBSB <sup>d</sup>	6,5	30	Efluente de suinocultura pré digerido anaerobiamente	418	0,95	-	1,6 a 2	3h aeração/ 1h anóxico	96 a 133	48 a 51	Zhang <i>et al.</i> (2012)
RBS	12	15	Esgoto doméstico pré tratado anaerobiamente	21	3,2	-	0,15 a 0,18	Contínua <sup>f</sup>	20 a 40	70 a 90	Laureni <i>et al.</i> (2016)
RBS	10	28-31	Lixiviado de aterro sanitário	1950	1,0	0,11	<0,2	2h aeração/ ~3,5h anóxico	153	99	Zhang. <i>et al.</i> (2017c)
RBS <sup>h</sup>	10	35	Digestato de resíduo alimentar	177,6-205,8	2,1	0,026	0,04 a 0,05	15 min aeração/ 30 a 45 min anóxico	18,4 a 24,3	37 a 49	Este trabalho

<sup>a</sup>RBS: Reator em batelada sequencial; <sup>b</sup>RLF: Reator de leito fixo; <sup>c</sup>MBBR: Bioreator de membrana; <sup>d</sup>RBSB: Reator em batelada sequencial com biofilme; <sup>e</sup>Estratégias avaliadas consistiram de aeração contínua e intermitente com 45 min aeração/ 15 min anóxico e 30 min aeração/30 min anóxico, dependendo da fase de operação; <sup>f</sup>aeração regulada pela concentração de amônia no reator, baixas concentrações determinavam o final do ciclo de operação do RBS; <sup>g</sup>Cargas removidas reportadas em g.m<sup>-2</sup>.d<sup>-1</sup>; <sup>h</sup>Resultados das estratégias que apresentaram melhores resultados neste trabalho (E7 e E8).

Alguns dos trabalhos supracitados operam com sistema de aeração automatizado, o que é interessante para otimizar a remoção de nitrogênio durante o processo de NP/A. O RBS utilizado no experimento de Zhang. *et al.* (2017c) possuía sistema de controle de aeração em tempo real baseado no pH e na concentração de OD. Durante o período de anoxia, em que normalmente há um aumento do pH, com o consumo de nitrito, o sistema detectava o momento em que o valor de pH parava de aumentar e nesse momento o sistema de aeração era ligado novamente.

No biorreator de membrana operado por Persson *et al.* (2017) um controlador lógico programável mantinha as concentrações de OD nos níveis desejáveis, de modo que essa concentração não ultrapassasse  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  no reator. No RBS utilizado por Laurení *et al.* (2016) a aeração era controlada de acordo com a concentração de  $\text{N-NH}_4^+$  no interior do reator. Quando esses valores se encontravam abaixo de um *set point* determinado pelos pesquisadores, a aeração cessava e um novo ciclo de operação era iniciado no reator.

Uma das dificuldades encontradas no presente trabalho foi o controle da aeração, em especial durante as estratégias E1 e E5. Durante E1 em que se utilizou um período de aeração longo (45 minutos) em relação ao período anóxico (15 minutos) e taxa de ar maior em relação aos demais períodos, eram encontradas baixas concentrações de oxigênio no reator somente no início do ciclo de operação. Ao final do ciclo (após as 17 horas de reação) as concentrações eram normalmente elevadas, atingindo valores próximos aos da saturação (mediana igual a 98,6% de OD, o que foi estimado em aproximadamente  $6,01 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Em E5, em que a taxa de ar aplicada era menor e utilizou-se aeração contínua, valores elevados de OD também eram encontrados ao final do ciclo de operação, com medianas iguais a 61,3% de OD e concentração estimada em torno de  $3,74 \text{ mg.L}^{-1}$ . Em especial em E1, onde a concentração de OD foi mais elevada, o processo de nitrificação completa da amônia até nitrato parece ter sido favorecido, o que culminou em grande produção de nitrato e baixa carga de nitrogênio total removida durante esse período ( $1,4 \text{ g N.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ ).

Os efluentes gerados no RBS durante o período em que as diferentes estratégias de aeração foram avaliadas, tiveram ainda elevadas concentrações de  $\text{N-NH}_4^+$  (medianas entre 49,7 e  $96,7 \text{ mg.L}^{-1}$ ), além de concentração de DQO ainda elevada em alguns períodos (E1, E6, E7 e E8, com concentrações de DQO entre 217,3 e  $237,2 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Por esse motivo, esse efluente não poderia ser descartado em um corpo d'água uma vez que não satisfaz os padrões estabelecidos nas legislações que estabelecem as condições e padrões de lançamento de efluentes no estado

de Minas Gerais (Resolução CONAMA 430/2011 e DN COPAM 01/2008). Em nenhuma das estratégias avaliadas nesse trabalho foi possível atingir o padrão para nitrogênio amoniacal, igual a 20 mg.L<sup>-1</sup> (Resolução CONAMA 430/2011 e DN COPAM 01/2008). O padrão para DQO foi alcançado em quatro estratégias avaliadas (E2, E3, E4 e E5) em que os efluentes produzidos tiveram valores inferiores a 180 mg.L<sup>-1</sup>, como estabelecido na DN Copam 01/2008. Por esse motivo, esse efluente ou deveria receber tratamento adicional para polimento antes de ser lançado em um corpo hídrico ou poderiam ser avaliadas alternativas para sua reutilização.

Uma das alternativas que poderia ser avaliada, seria a recirculação do efluente produzido para ser utilizado na diluição do resíduo alimentar, gerando assim, economia de água na planta de tratamento do resíduo. Uma das preocupações associadas à recirculação de digestatos para o digestor anaeróbio são as elevadas concentrações de amônia livre que podem estar contidas nesse efluente que pode causar a inibição do processo de metanogênese (ZAMANZADEH *et al.*, 2016). A concentração de amônia livre varia em função da concentração do íon amônio, pH e temperatura e pode ser calculada utilizando a equação 6.2 (ANTHONISEN *et al.*, 1976).

$$C_{AL} = \frac{17}{14} \frac{N-NH_4^+ \times 10^{pH}}{e^{[6334/(273+T)]} + 10^{pH}} \quad (6.2)$$

Onde: C<sub>AL</sub> = concentração de amônia livre (mg.L<sup>-1</sup> N-NH<sub>3</sub>); N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> = Concentração de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (mg.L<sup>-1</sup>); T= temperatura (°C).

Com base na concentração de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, na temperatura e pH dos efluentes gerados neste trabalho, as concentrações de amônia livre no efluente do RBS-Lab foram estimadas e valores muito baixos foram encontrados, variando entre 0,01 e 7,10 mg.L<sup>-1</sup> N-NH<sub>3</sub> (Tabela 6.6). Dessa forma, como há um baixo teor de amônia livre neste efluente, ele poderia ser utilizado para a diluição dos resíduos, voltando para o sistema de tratamento do resíduo alimentar, sem causar efeitos inibitórios à metanogênese. Alguns autores tem relatado que valores variando entre 70 a 250 mg.L<sup>-1</sup> de NH<sub>3</sub> podem causar inibição da metanogênese (BUJOCZEK *et al.*, 2000; CALLAGHAN *et al.*, 2002; MURTO *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2012) . Sheng *et al.* (2013) avaliaram a recirculação de digestato de resíduo alimentar pós-tratado em sistema com nitrificação na inibição da metanogênese, encontrando valores maiores como inibitórios, acima de 1.400 mg.L<sup>-1</sup> de N-NH<sub>3</sub>. Além disso estimaram também as concentrações de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> capazes de causar redução da eficiência de produção de biogás. Os achados deste experimento, demonstraram que concentrações abaixo de 750 mg.L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> não foram capazes de inibir a metanogênese. Dessa forma, as concentrações de nitrato no efluente do presente trabalho, que

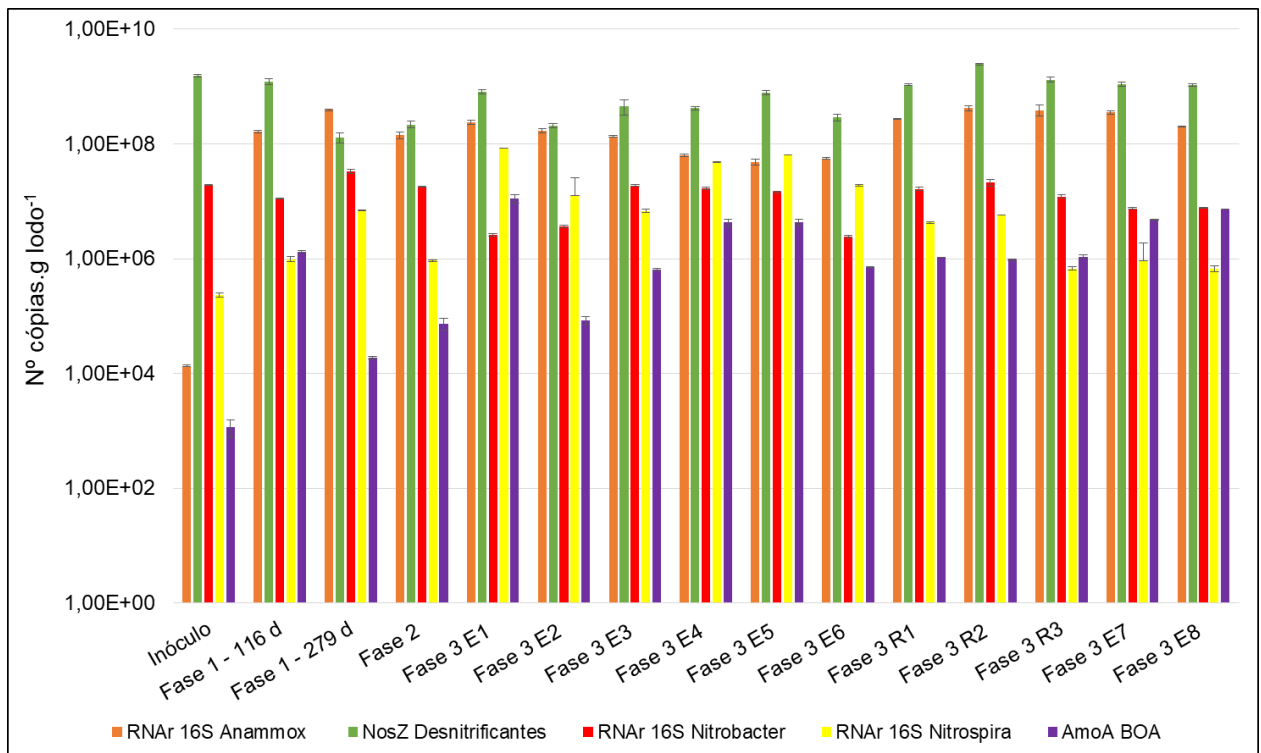
variaram de 16,5 até 109,5 mg.L<sup>-1</sup> durante as diferentes estratégias de aeração avaliadas também não seriam suficientes para inibir a metanogênese, caso o efluente fosse recirculado com o objetivo de diluir o resíduo alimentar antes do mesmo ser adicionado ao digestor anaeróbio. Assim, o efluente gerado tem potencial para tal tipo de reuso e esta seria uma alternativa a ser avaliada.

#### **6.1.6 Determinação da abundância dos grupos de bactérias do ciclo do nitrogênio por PCR quantitativo (qPCR) no RBS em escala laboratorial**

A abundância de bactérias envolvidas no ciclo do nitrogênio no RBS-Lab foi investigada por qPCR através da quantificação do número de cópias de genes de bactérias do ciclo de nitrogênio por grama de lodo. A abundância dos diferentes grupos foi estimada por meio da quantificação dos genes RNAr 16S de bactérias anammox e das bactérias oxidadoras de nitrito (BON) *Nitrospira* e *Nitrobacter* e dos genes funcionais *AmoA* (enzima amônia monoxigenase) de bactérias oxidadoras de amônia (BOA) e *nosZ* (enzima óxido nitroso redutase) de bactérias desnitrificantes.

As quantificações foram realizadas nas amostras do inóculo do RBS-Lab e da biomassa retirada do reator durante a Fase 1, de enriquecimento de bactérias anammox (aos 116 dias, logo após início da atividade anammox e aos 279 dias, no final da fase de enriquecimento), ao final da Fase 2 (adição de digestato de resíduo alimentar mais nitrito) e ao final de cada período da Fase 3 de operação (E1, E2, E3, E4, E5, E6, R1, R2, R3, E7 e E8).

Os resultados das análises de qPCR são apresentados na Figura 6.32. No Apêndice D são apresentados os parâmetros para cada reação de qPCR realizada, incluindo o valor do *Threshold*, as eficiências das reações, as equações das curvas padrões, assim como o coeficiente R<sup>2</sup> de cada curva padrão (Tabela A13).



**Figura 6.32** - Abundância dos genes de bactérias do ciclo do nitrogênio obtidos por qPCR nas amostras do RBS-Lab (ver Tabela 5.9 para detalhamento das amostras).

Os resultados obtidos demonstraram o sucesso do enriquecimento de bactérias anammox no reator durante a Fase 1. Foi observado um aumento de  $1,35 \times 10^4$  cópias.g lodo<sup>-1</sup> do gene RNAr 16S de anammox no inóculo para  $1,64 \times 10^8$  cópias.g lodo<sup>-1</sup> na amostra coletada aos 116 dias de operação do RBS, logo após o início da atividade anammox. Até o final desta fase, a abundância de anammox aumentou ainda mais, atingindo  $3,91 \times 10^8$  cópias.g lodo<sup>-1</sup> aos 279 dias de operação.

Na Fase 2, quando o reator passou a ser alimentado com digestato de resíduo alimentar e suplementado com nitrito, observou-se ligeira redução na abundância de bactérias anammox (igual a  $1,41 \times 10^8$  cópias.g lodo<sup>-1</sup> aos 347 dias de operação), mas esta população se manteve na mesma ordem de grandeza em relação à fase anterior. Esses resultados foram compatíveis com os resultados físico-químicos, uma vez que houve ligeira redução nas eficiências de remoção dos compostos nitrogenados durante a Fase 2 em relação à Fase 1, entretanto, sem alterar significativamente as cargas nitrogenadas removidas, como foi discutido no item 6.1.1.

Na Fase 3, quando as estratégias de aeração foram avaliadas, a fim de se estabelecer o processo de NP/A no reator, redução no número de cópias do gene de anammox foi observada, diminuindo de  $10^8$  para  $10^7$  em E6. Durante estas estratégias, a presença de oxigênio e menor

disponibilidade de nitrito possivelmente fez com que a competição por substratos entre bactérias anammox, BOA e BON se intensificasse, o que culminou na diminuição no número de cópias do gene RNAr 16S de anammox no reator. Além disso, é sabido que oxigênio pode ser tóxico para bactérias anammox. Quando o reator voltou a ser operado em condições anaeróbicas, durante o período de recuperação, a abundância das bactérias anammox aumentou novamente, atingindo  $10^8$  cópias.g lodo<sup>-1</sup>. Concentrações maiores foram obtidas durante o período de recuperação R2, quando o RBS foi alimentado com meio de cultura, em condições ótimas para o crescimento de bactérias anammox. Nesse período, a concentração do gene RNAr 16S de anammox no reator alcançou  $4,22 \times 10^8$  cópias.g lodo<sup>-1</sup>. Durante as duas últimas estratégias de aeração (E7 e E8) houve uma ligeira redução no n° de cópias deste gene, porém as concentrações permaneceram com valores da ordem de  $10^8$  cópias.g lodo<sup>-1</sup>.

É importante ressaltar que, após a etapa de enriquecimento de bactérias anammox, ao longo de todos os períodos de operação a abundância de bactérias anammox foi superior à abundância de BON, o que é um indício de que as bactérias anammox, apesar da lenta taxa de crescimento foi capaz de competir com BON pelo acceptor de elétrons, nitrito.

Com relação à abundância de BOA, observou-se grande variação nas concentrações ao longo dos períodos de operação ( $10^3$  a  $10^7$  n° de cópias.g lodo<sup>-1</sup>). Maior abundância destas bactérias foi encontrada durante o período E1 em que o o RBS foi operado sob modo de aeração intermitente com 45 minutos de aeração/ 15 minutos anóxico e foi aplicada uma alta taxa de ar no reator ( $0,2 \text{ L.min}^{-1}.\text{L}_{\text{reator}}^{-1}$ ). Durante este período elevadas concentrações de oxigênio dissolvido foram encontradas no reator, o que pode ter favorecido o crescimento de BOA. De maneira geral, a abundância de BOA foi menor (cerca de duas a tres ordens de grandeza) em relação as BON, o que também já foi observado em outros sistemas para NP/A (MIAO *et al.*, 2016). Apesar da abundância de BOA ter sido menor, elas provavelmente encontravam-se ativas, uma vez que foram capazes de produzir nitrito para manter as populações de BON e anammox, caso contrário, essas bactérias não teriam se desenvolvido no reator. Outra forma possível de produção de nitrito, seria por meio da desnitrificação parcial (redução do nitrato a nitrito), que alguns grupos de micro-organismos são capazes de realizar. Esse processo vem sendo recentemente estudado para suprir o nitrito necessário para o metabolismo de bactérias anammox em sistemas denominados Deamox (Desnitrificação parcial e anammox). O potencial desses sistemas no tratamento de efluentes para a remoção de nitrogênio vem sendo estudado (CAO *et al.*, 2016 a e b).

A menor abundância de BOA em relação aos demais grupos do ciclo do nitrogênio pode explicar, ao menos parcialmente, o consumo moderado de amônia no reator durante os períodos com aeração da Fase 3 (com medianas de eficiência de remoção entre 46 e 70%). Há que salientar que entre os grupos responsáveis pela oxidação da amônia, as concentrações do gene RNAr 16S de anammox foi sempre superior em relação ao gene *AmoA* de BOA (2 a 4 ordens de grandeza a mais). Esses dois grupos de micro-organismos, apesar de competirem pelo mesmo substrato (íon amônio) realizam uma associação sintrófica e sinérgica na remoção dos compostos nitrogenados em sistemas de NP/A, uma vez que as BOA são responsáveis pela produção do nitrito, que é consumido pelas bactérias anammox.

Com relação às BON, foi observado que, quando nitrito foi adicionado ao reator, durante as Fases 1 e 2 e durante o período de recuperação da Fase 3 (R1 a R3), foi observada maior abundância de *Nitrobacter* em relação a *Nitrospira*. Na maioria dos períodos de aeração, em que a disponibilidade do substrato nitrito diminuiu, *Nitrospira* foi mais abundante, em detrimento de *Nitrobacter*. Isso pode ser explicado pelo fato de *Nitrobacter* ser considerado um micro-organismo r-estrategista, possuindo baixa afinidade por substratos ( $O_2$  e  $NO_2^-$ ) enquanto *Nitrospira* é considerado k-estrategista, com maior afinidade por esses substratos (DAIMS *et al.*, 2001; GILBERT *et al.*, 2014). Dessa forma, o gênero *Nitrospira* geralmente é mais competitivo em ambientes com baixas concentrações de nitrito e oxigênio e perde para *Nitrobacter* quando estes substratos estão disponíveis em abundância no meio, como foi o caso das Fases 1, 2 e períodos de recuperação da Fase 3. Huang *et al.* (2010) encontraram correlação negativa entre a concentração de genes de *Nitrospira* e elevadas concentração de nitrito, quando estudaram a influência de parâmetros físico-químicos nas comunidades de BON em sistemas de lodos ativados.

Durante as duas últimas estratégias de aeração (E7 e E8) foi observada abundância consideravelmente inferior (da ordem de  $10^5$  n° de cópias.g lodo<sup>-1</sup>) de *Nitrospira* em relação às primeiras estratégias de aeração avaliadas, E1 a E6, em que as concentrações variaram entre  $10^6$  a  $10^7$  n° de cópias.g lodo<sup>-1</sup>. Isso refletiu em menor produção de nitrato durante as duas últimas fases de aeração, indicando que o controle da população de *Nitrospira*, que é a população mais competitiva em condições de limitação de substratos, foi importante para uma melhor performance do reator na remoção de nitrogênio.

O gene *nosZ* de bactérias desnitrificantes foi detectado em todos os períodos de operação do reator, com concentração variando entre  $10^8$  e  $10^9$  cópias.g lodo<sup>-1</sup>. Este gene foi o que

apresentou maiores concentrações em relação a todos os outros genes do ciclo do nitrogênio investigados durante todos os períodos avaliados, indicando maior abundância de desnitrificantes em relação aos outros grupos investigados. Exceção ocorreu com a amostra coletada no final da Fase 1, de enriquecimento de bactérias anammox (279 dias), em que a abundância de bactérias anammox foi superior à de desnitrificantes. Esse grupo de micro-organismos teve grande importância para a remoção de DQO no reator. A presença de organismos desnitrificantes, mesmo durante os períodos com aeração no reator, pode ser explicada devido à versatilidade metabólica dessas bactérias. De acordo com Madigan *et al.* (2010) diversos grupos de desnitrificantes podem respirar em condições aeróbias, mesmo quando o nitrato e nitrito estão presente. Além disso, outros aceptores de elétrons podem ser utilizados como por exemplo, o ferro férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) e alguns aceptores de elétrons orgânicos.

Miao *et al.* (2016) determinaram a abundância de bactérias anammox e de outras bactérias do ciclo do nitrogênio por qPCR em RBS com NP/A para pós-tratamento de esgoto doméstico. Observaram que no início da operação a abundância do gene RNAr 16S de anammox era da ordem de  $10^9$  n° de cópias.g lodo seco<sup>-1</sup>, mas quando foi introduzida aeração contínua no reator, houve diminuição de anammox (de  $10^9$  para  $10^8$  n° de cópias.g lodo seco<sup>-1</sup>). Isso foi acompanhado pelo aumento na abundância de *Nitrospira* (de  $10^8$  para  $10^{10}$  n° de cópias.g lodo seco<sup>-1</sup>) e acúmulo de nitrato no reator, o que acabou comprometendo a performance do reator. Com isso, estratégias de aeração intermitentes (7 minutos aeração/ 21 minutos anoxia) foram estabelecidas e foi possível controlar a população de *Nitrospira* e a produção de nitrato, refletindo no aumento da abundância de anammox (valores da ordem de  $10^9$  n° de cópias.g lodo seco<sup>-1</sup>) no RBS e em baixos níveis de nitrato no efluente.

A correlação de *Spearman* foi realizada para avaliar as interações entre a abundância dos grupos relacionados ao ciclo do nitrogênio e as cargas de nitrogênio removidas, o nitrato produzido e a relação entre o nitrato produzido/ amônio consumido no RBS-Lab (Tabela 6.8).

Houve correlação positiva e significativa entre as cargas de nitrogênio removidas e a abundância de bactérias anammox com  $R=0,61538$  ( $p<0,005$ ). O contrário ocorreu entre a abundância de *Nitrospira* e as cargas de nitrogênio removidas, em que a correlação foi significativa, porém negativa, com coeficiente igual a  $-0,70329$  ( $p<0,005$ ). Correlação positiva e significativa foi encontrada entre a abundância de *Nitrospira* e a produção de nitrato ( $R=0,57692$ ,  $p<0,005$ ) e para o coeficiente de produção de nitrato/ consumo de amônio ( $R=0,58791$ ,  $p<0,005$ ). Isso indica que *Nitrospira* provavelmente foi o micro-organismo

responsável por promover o acúmulo de nitrato no efluente, que ocorreu principalmente durante as primeiras estratégias de aeração avaliadas, os quais foram os períodos em que foram encontradas as maiores abundâncias de *Nitrospira*.

A abundância de *Nitrobacter* ao contrário de *Nitrospira*, teve correlação positiva com a carga de nitrogênio removida ( $R= 0,60439$ ,  $p<0,005$ ). Embora a abundância de *Nitrobacter* tenha sido menos variável ao longo dos períodos de operação em relação a *Nitrospira*, houve um ligeiro aumento da concentração do número de cópias do gene RNAr16S de *Nitrobacter* nos períodos em que o reator foi operado em condições anaeróbias, que foram os períodos em que foram obtidas as maiores cargas de nitrogênio removidas. Como já foi discutido anteriormente esse aumento provavelmente se deve à maior concentração do substrato nítrito durante esses períodos, que possibilitou maior desenvolvimento de *Nitrobacter* em relação à *Nitrospira*.

**Tabela 6.8** - Correlação entre a abundância de bactérias do ciclo de nitrogênio e a carga de nitrogênio removida, produção de nitrato e coeficiente N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> produzido/ N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> consumido no RBS lab

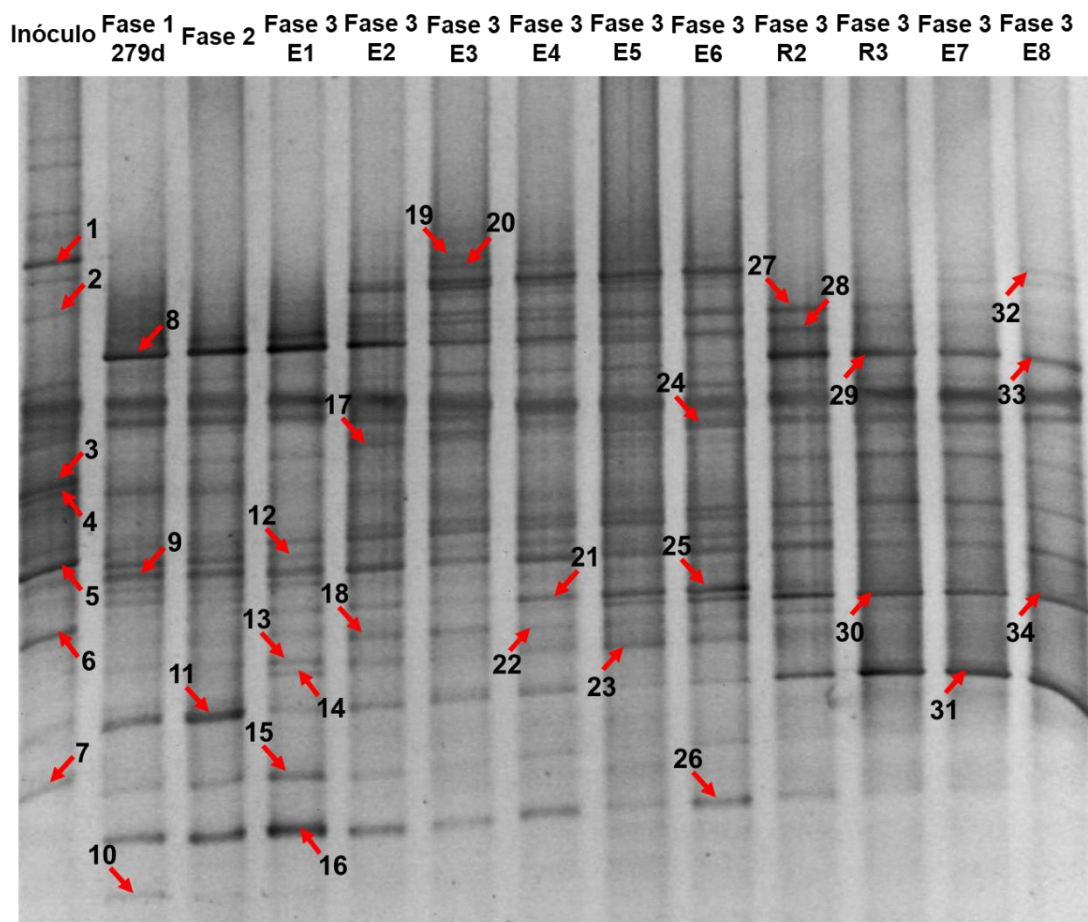
	<b>RNAr 16S Anammox</b>	<i>NosZ</i> <b>Desnitrificante</b>	<b>RNAr 16S <i>Nitrobacter</i></b>	<b>RNAr 16S <i>Nitrospira</i></b>	<i>AmoA</i> BOA	<b>CNR</b>	<b>N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> produzido</b>	<b>N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> produzido/ N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> consumido</b>
<b>RNAr 16S Anammox</b>	1,00000	0,46153	0,28571	-0,48351	-0,03846	<b>0,61538</b>	-0,40659	-0,35714
<i>NosZ</i> <b>Desnitrificante</b>		1,00000	-0,06043	-0,43956	<b>0,61538</b>	0,17032	-0,50000	-0,27472
<b>RNAr 16S <i>Nitrobacter</i></b>			1,00000	-0,15934	-0,48901	<b>0,60439</b>	-0,08241	-0,15934
<b>RNAr 16S <i>Nitrospira</i></b>				1,00000	0,02197	<b>-0,70329</b>	<b>0,57692</b>	<b>0,58791</b>
<b><i>AmoA</i> BOA</b>					1,00000	-0,41758	-0,25274	-0,08241
<b>CNR</b>						1,00000	-0,46703	-0,54945
<b>N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> Produzido</b>							1,00000	<b>0,91208</b>
<b>N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> produzido/ N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> consumido</b>								1,00000

CNR: Carga de Nitrogênio Removida; Valores em vermelho significam correlação significativa com base no Teste de Correlação de Spearman ( $\alpha=5\%$ ).

## 6.1.7 Análise do perfil da comunidade microbiana do RBS em escala laboratorial investigado por PCR-DGGE

### 6.1.7.1 PCR- DGGE do Domínio Bacteria

A Figura 6.33 apresenta o perfil da comunidade de bactérias durante todos os períodos de operação do RBS-Lab. As bandas mais predominantes foram excisadas do gel e tiveram seu DNA sequenciado. Os resultados do sequenciamento são apresentados na Tabela 6.9.



**Figura 6.33** - Perfis obtidos por PCR-DGGE para o Domínio *Bacteria* no RBS-Lab. As setas em vermelho indicam as bandas que foram excisadas do gel e sequenciadas (Ver Tabela 5.9 para detalhamento das amostras).

**Tabela 6.9** - Identificação das bandas do DGGE de *Bacteria* do RBS-Lab de acordo com as bases de dados RDP *Classifier* e *GenBank*

<b>Banda</b>	<b>Organismo mais próximo (RDP Classifier)</b>	<b>Organismo mais próximo (GenBank)</b>	<b>Identidade (%)</b>	<b>Nº de acesso</b>
1	Saccharibacteria	<i>Candidatus</i> Saccharibacteria	94	KP080954.1
2	Chitinophagaceae	<i>Chitinophaga</i> sp.	92	GU201550.1
3	Comamonadaceae	<i>Acidovorax</i> sp.	97	MF370622.1
4	Comamonadaceae	<i>Acidovorax</i> sp.	93	GU372409.1
5	Saprosiraceae	Saprosiraceae	96	EU177704.1
6	<i>Gordonia</i>	<i>Gordonia amarae</i>	98	AB862159.1
7	Bacteria	Planctomycetaceae	91	KM100462.1
8	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Brocadia sp.	98	MF000739.1
9	Bacteria	Clone_55 de cultura proveniente de enriquecimento de anammox	94	KM263553.1
10	Rhodospirillales	Acetobacteraceae	94	EU193085.1
11	Anaerolineaceae	Anaerolineaceae	98	HE648186.1
12	Bacteria	Chloroflexi	85	LC316002.1
13	Bacteria	Chloroflexi	93	MH040197.1
14	Chloroflexi	Chloroflexi	97	MH040197.1
15	Chloroflexi	Chloroflexi	98	MH040197.1
16	Chloroflexi	Chloroflexi	99	MH040197.1
17	Bacteria	Bacteroidetes	93	JN541167.1
18	Actinomycetales	<i>Propionibacterium</i> sp.	92	EU980607.1
19	<i>Blastocatella</i>	Acidobacteria	97	KC442541.1
20	<i>Blastocatella</i>	Acidobacteria	97	KC442541.1
21	<i>Nitrospira</i>	<i>Nitrospira</i> sp.	93	AB500062.1
22	Bacteria	<i>Propionibacterium</i> sp.	89	EU980607.1
23	Bacteria	<i>Nitrospira</i> sp.	89	AB500062.1
24	Burkholderiales	<i>Leptothrix</i> sp.	98	HM769661.1
25	Bacteria	<i>Nitrospira</i> sp.	85	AB500062.1
26	Chloroflexi	Chloroflexi	99	MH040197.1
27	Bacteria	Acidobacteria	90	AB500053.1
28	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Brocadia sp.	88	KY659581.1
29	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Jettenia sp.	98	KX027333.1
30	Planctomycetes	Planctomycetales	87	JN860385.1
31	Anaerolineaceae	Anaerolineaceae	99	HE648186.1
32	<i>Blastocatella</i>	Acidobacteria	96	KC442541.1
33	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Jettenia sp.	96	KX027333.1
34	Planctomycetes	Planctomycetales	85	JN860385.1

Pelo gel do DGGE é possível observar que o perfil da comunidade microbiana se modificou ao longo do tempo de operação do reator. Em particular, e como era esperado, no inóculo foi encontrado um perfil de bandas diferente das demais amostras, coletadas no RBS-Lab. Os táxons identificados na amostra do inóculo incluíram bactérias do filo *Candidatus* Saccharibacteria, Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria e Planctomycetes, apresentando maior diversidade de filós, em relação às demais amostras, coletadas no RBS.

A banda 1 presente apenas no inóculo está relacionada ao filo *Ca.* Saccharibacteria, também conhecido como *Ca.* à Divisão TM7. Os micro-organismos desse filo são conhecidos por serem ubíquos com sequências de RNAr 16S encontradas no solo, em sedimentos, em águas sistemas de tratamentos de efluentes, como lodos ativados, além de fontes associados à animais e humanos (FERRARI *et al.*, 2015). Estudos realizados por meio da técnica de FISH (Hibridação *in situ* fluorescente) revelaram a estrutura filamentosa desses micro-organismos e sua presença em sistemas de lodos ativados parece estar relacionado à problemas de entumescimento do lodo (*bulking*) (HUGENHOLTZ *et al.*, 2001). As bandas 2 e 5 são relacionadas ao filo Bacteroidetes, ordem Sphingobacterales. A banda 2 apresentou 92% de identidade com o DNA da bactéria *Chithinophaga* sp., quimiorganotróficos, aeróbios, capazes de lisar quitina e produzir mixósporos (SANGKHOBOL e SKERMAN, 1981). A presença deste gênero já foi relatada em amostras de solos e em sistemas de tratamento de efluentes (GONZALEZ-MARTINEZ *et al.*, 2014; WEON *et al.*, 2009). A banda 5 apresentou 96% de identidade com micro-organismo da família Saprospiraceae. Em lodos ativados, gênero pertencente a essa família denominado *Haliscomenobacter*, tem sido conhecido por crescer associado a outros micro-organismos filamentosos, fazendo parte de sua epiflora. Esses micro-organismos filamentosos podem causar problemas de entumescimento do lodo e nesse sentido, os membros da família Saprospiraceae têm ganhado importância uma vez que sua identificação pode auxiliar na identificação destes micro-organismos filamentosos indesejados em sistemas de lodos ativados (XIA *et al.*, 2008). Os DNAs das bandas 3 e 4 foram relacionados à sequências do micro-organismo *Acidovorax* sp., do filo *Proteobacteria*, família Comamonadaceae. Em sistemas de lodos ativados, esse gênero é encontrado em abundância e é reconhecido por seu papel na remoção de nitrogênio, uma vez que são capazes de realizar a desnitrificação heterotrófica (HEYLEN *et al.*, 2008; SCHULZE *et al.*, 1999). A banda 6, também exclusivamente presente no inóculo, está relacionada à espécie *Gordonia amarae* pertencente ao filo Actinobacteria e sua presença em sistemas de lodos ativados está associada com a formação de espuma nesses sistemas (ASVAPATHANAGUL *et al.*, 2012; CARR *et al.*, 2006). O inóculo também apresentou uma banda cujo DNA está relacionado ao Filo Planctomycetes, família

Planctomycetaceae (banda 7). Os micro-organismos desta família são caracterizados por possuírem compartimentalização intracelular, multiplicação por formação de botões esféricos, ovoides ou em forma de pêra, a partir da célula mãe e por possuir parede celular proteinácea ao invés da camada celular de peptidoglicano geralmente encontrada em procariotos (SCHEUNER *et al.*, 2014). Nesta família, está incluído o gênero de bactéria anammox *Ca. Anammoximicrobium* (KHRAMENKOV *et al.*, 2013). Entretanto, não foi possível identificar a banda 7 em nível de gênero por meio da técnica de PCR-DGGE.

A banda 8, que aparece no gel a partir da Fase 1, apresentou 98% de identidade com o gênero da bactéria anammox *Ca. Brocadia*. Esta banda permaneceu ao longo de todo o tempo de operação do RBS-Lab, confirmado pelo sequenciamento da banda 28, coletada na mesma altura da banda 8, a partir da canaleta correspondente à Fase 3, período de recuperação R2 e que também apresentou relação com este mesmo micro-organismo. Observa-se que, a partir do período R2, a intensidade desta banda torna-se menor no gel, e surgem com maior intensidade bandas na mesma altura das bandas 29 e 33, que estão relacionadas (com 98 e 96% de identidade, respectivamente) a outro gênero de bactéria anammox *Ca. Jettenia*. Estes resultados demonstram, que após o período de recuperação do reator, houve uma substituição do gênero de anammox *Ca. Brocadia* pelo gênero *Ca. Jettenia*, que passou a predominar no reator. Esta substituição foi confirmada tanto pelos resultados da PCR-DGGE de bactérias anammox, quanto por meio do sequenciamento de nova geração, como será apresentado nos itens subsequentes. Dentre os gêneros de bactérias anammox encontrados em sistemas de tratamentos de efluentes, *Ca. Brocadia* e *Ca. Jettenia* estão entre os que aparecem com maior frequência. Em reatores em escala de laboratório, alguns trabalhos também identificaram mudanças na comunidade de bactérias anammox ao longo do tempo, de acordo com as diferentes estratégias de operação e configurações de tais reatores (PARK *et al.*, 2015; PARK *et al.*, 2010; VAN DER STAR *et al.*, 2008). Isso sugere, que há uma diferenciação de nicho ecológico entre as diferentes espécies ou gêneros de bactérias anammox. Entretanto, esta diferenciação ainda não é bem compreendida. Isto faz com que alguns pesquisadores voltem sua atenção a este tema, devido à sua importância ecológica e prática, no que diz respeito à utilização desses micro-organismos no tratamento de efluentes (ZHANG *et al.*, 2017a). Os possíveis fatores que ocasionaram as mudanças na população de bactérias anammox durante o presente trabalho serão discutidas no próximo item (6.1.7.2), dedicado exclusivamente ao estudo da comunidade de bactérias anammox por PCR-DGGE.

Micro-organismos da ordem Planctomycetales também estiveram presentes nas canaletas referentes às últimas amostras coletadas no reator (Bandas 30 e 34). Dentro desta ordem está incluído o gênero *Ca. Anammoximicrobium*, entretanto, não foi possível confirmar se o DNA desta banda pertence a este micro-organismo, por meio da técnica de PCR-DGGE.

Bactérias oxidadoras de nitrito também foram observadas nas amostras do RBS-Lab. As bandas 21 e 25, que estiveram presentes nas amostras coletadas durante as primeiras estratégias de aeração avaliadas (E1 a E6) estão relacionadas ao gênero de oxidadora de nitrito *Nitrospira*. Durante estes períodos de aeração maiores vazões de ar foram aplicadas. A banda 23, também parece estar relacionada a este gênero de BON, entretanto, aparece em altura diferente no gel em relação às bandas 21 e 25, o que sugere que podem se tratar de espécies diferentes de *Nitrospira*. Observa-se que nenhuma das bandas relacionadas à *Nitrospira* esteve presente após o período de recuperação do RBS, incluindo as últimas estratégias de aeração avaliadas, em que foram aplicadas menores vazões de ar em relação às primeiras estratégias de aeração (E1 a E6). Isso pode ter sido benéfico para um maior controle do processo de nitrificação parcial durante as duas últimas estratégias de aeração (E7 e E8) avaliadas.

Bactérias do filo Chloroflexi estiveram presentes ao longo de todos períodos de operação do RBS (Bandas 11 e 31, relacionadas à Família Anaerolinaceae; bandas 12, 13, 14, 15, 16, 17 e 26, relacionadas ao filo Chloroflexi). Micro-organismos deste filo são quase sempre encontrados em grande abundância coexistindo com bactérias anammox em reatores que empregam estes micro-organismos na remoção de nitrogênio, conforme apresentado na Tabela 2.6, do item 2.6.2.1. A importância deste filo em reatores anammox ainda não está completamente explicada. Alguns autores apontam que seu papel está relacionado à utilização de compostos e metabólitos provenientes de morte celular, além de participarem da estrutura dos grânulos formados em reatores anammox, devido a morfologia filamentososa que apresentam diversas bactérias pertencentes a esse filo (CAO *et al.*, 2016a; KINDAICHI *et al.*, 2012).

As bandas 19, 20, 32 e 27, parecem estar relacionadas à micro-organismos do filo Acidobacteria. As Bandas 19, 20 e 32, especificamente, foram classificadas de acordo com a base de dados RDP *classifier* como sendo pertencentes ao gênero *Blastocatella*. Este gênero de bactéria é aeróbio e possui metabolismo quimiorganotrófico, sendo geralmente encontrado em solos (FOESEL *et al.*, 2013). Sua presença já foi relatada em biorreator de membrana (*non woven fabric* MBR – nMBR) com atividade anammox (REN *et al.*, 2015). No presente trabalho, este gênero pode estar envolvido na oxidação aeróbia da matéria orgânica. Importante ressaltar

que os resultados do sequenciamento de nova geração também demonstraram que micro-organismos da família Blastocatellaceae dentro da qual o gênero *Blastocatella* está inserido, foram abundantes, em especial a partir da Fase 3, estratégia de aeração E2, como será discutido adiante.

Bactérias do filo Actinobacteria, gênero *Propionibacterium* sp. estiveram presentes a partir da amostra da Fase 3, E2 até E6 (Bandas 18 e 22). Bactérias deste gênero são divididas em dois grupos filogenéticos distintos, de acordo com seu habitat. Um dos grupos é conhecido por habitar a pele e a mucosa do trato gastrointestinal de humanos e são patogênicos. As espécies do segundo grupo são conhecidas como cepas clássicas. Algumas subespécies deste segundo grupo são capazes de reduzir nitrato (PIWOWAREK *et al.*, 2018). Nitrato esteve presente em todos os períodos de operação do RBS-Lab, uma vez que foi produzido a partir do metabolismo de oxidação da amônia de bactérias anammox e de oxidação do nitrito de bactérias oxidadoras de nitrito. Outras subespécies de *Propionibacterium* sp. são de importância industrial, em especial para a indústria de laticínios, uma vez que são capazes de fermentar lactose e produzir metabólitos como o ácido propiônico, que é usado na produção de alguns tipos de queijos (PIWOWAREK *et al.*, 2018).

A banda 24 apresentou 98% de identidade com micro-organismo do gênero *Leptothrix* sp. e esteve presente ao longo de toda a operação do reator. Esse gênero está incluído no filo Proteobacteria e se caracteriza por possuir estrutura longa denominada bainha, dentro da qual a bactéria, que tem morfologia filamentosa, cresce. São comumente encontradas em sistemas de lodos ativados e filtros biológicos percoladores. *Leptothrix* é capaz de precipitar óxidos de ferro e armazenar em sua bainha. Isso acontece quando este micro-organismo oxida compostos orgânicos (como ácidos húmicos ou tânicos) ligados ao ferro transformando-os em óxidos de ferro. O ferro liga-se à bainha enquanto os compostos orgânicos são metabolizados e utilizados como fonte de carbono ou energia por *Leptothrix*. Esse micro-organismo também é capaz de oxidar  $Mn^{2+}$  a  $Mn^{4+}$ , além da oxidação do  $Fe^{2+}$  (MADIGAN *et al.*, 2010).

Os perfis de bandas obtidos por meio da técnica de PCR-DGGE foram agrupados por meio do software *BioNumerics* gerando o dendrograma apresentado na Figura 6.34. O agrupamento realizado considera grupos que compartilham características semelhantes (perfis de conjuntos de bandas) a partir de matriz de similaridade gerada, calculada com base na presença/ ausência de bandas contidas no gel de DGGE. Para o cálculo do coeficiente de similaridade foi levado

em consideração o número total de bandas presentes, bem como o número de bandas comuns presentes nas amostras.

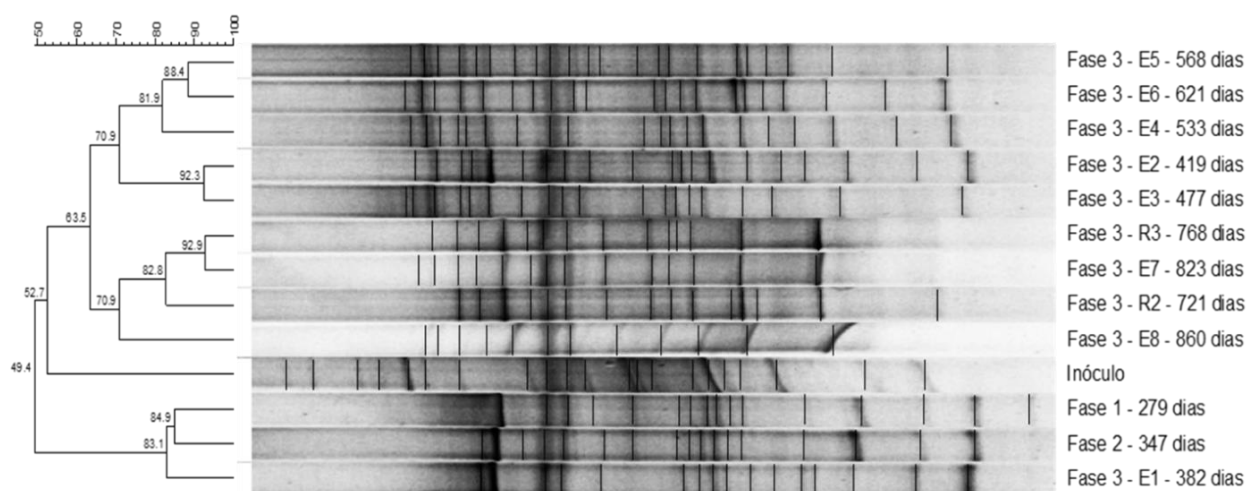
O dendrograma mostra uma tendência entre as amostras de se agruparem de acordo com as mudanças nas características operacionais do reator. O primeiro grande agrupamento pode ser observado entre as amostras das Fases 1, 2 e da primeira estratégia de aeração da Fase 3 (E1), que apresentaram 83,1% de similaridade entre si. Este agrupamento teve baixa similaridade (49,4 %) com as demais amostras do RBS-Lab, juntamente com amostra do inóculo, indicando, que houve uma mudança considerável na comunidade microbiana do reator durante a fase 3 de operação, especialmente a partir de E2. Estas mudanças na comunidade microbiana estão relacionadas às mudanças das condições operacionais do reator. Durante a Fase 3, oxigênio foi introduzido ao reator com intuito de promover os processos de nitrificação parcial e anammox simultaneamente. Nitrito parou de ser adicionado ao reator, sendo que sua provável fonte foi por meio da oxidação parcial da amônia a nitrito devido ao metabolismo de bactérias nitrificantes. Além disso, a partir da Fase 3 durante as diferentes estratégias de aeração avaliadas, o reator foi alimentado com menores cargas de nitrogênio total afluentes (com medianas entre 38,3 a 51,6 g N.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup> dependendo do período de operação) se comparado às Fases 1 (95,5 g N.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>) e 2 (98,8 g N.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>), uma vez que o nitrito não era adicionado. Acredita-se que todos estes fatores influenciaram para que essas mudanças na comunidade microbiana tenham ocorrido. Curiosamente, a amostra referente à primeira estratégia de aeração (E1) da Fase 3 teve maior similaridade com o perfil de bandas das fases 1 e 2, em relação às demais amostras da Fase 3. Isso pode ter acontecido devido ao fato das mudanças nas condições operacionais do reator a partir da Fase 3 não terem refletido de imediato na comunidade microbiana, e só puderam ser percebidas após a estratégia E2. Ressalta-se que o experimento foi realizado em série no reator, sem intervalos entre os diferentes períodos operacionais.

O inóculo apresentou perfil de bandas bastante peculiar em relação às demais amostras avaliadas com baixo coeficiente de similaridade com os demais perfis de bandas obtidos (49,4 % de similaridade com as amostras das Fases 1, 2 e 3 (E1) e 53,5% de similaridade com as demais amostras do RBS-Lab).

As amostras da Fase 3, estratégias de aeração E2 a E6, agruparam-se entre si, apresentando 70,9 % de similaridade entre si. Estas estratégias de aeração variaram bastante entre si, no que diz respeito aos tempos dos períodos anóxicos e aeróbios (Tabela 5.6). As vazões de ar aplicadas

foram diferentes apenas em E2 ( $0,075 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}_{\text{reator}}^{-1}$ ) em relação às estratégias E3 a E6 ( $0,125 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}_{\text{reator}}^{-1}$ ).

Quando o reator foi novamente submetido a condições anaeróbias de operação e alimentado com meio de cultura em (R2), o perfil da comunidade microbiana novamente mudou. A partir daí outro agrupamento se formou, constituído da amostra R2, R3 (período de recuperação com digestato mais nitrito) e das últimas estratégias de aeração (E7 e E8), em que menor taxa de ar foi aplicada ( $0,026 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}_{\text{reator}}^{-1}$ ) com coeficiente de similaridade igual a 70,9 %. Por sua vez, esse agrupamento apresentou menor coeficiente de similaridade, igual a 63,5 %, com o agrupamento formado pelas amostras coletadas após as primeiras estratégias de aeração (E2 a E6).

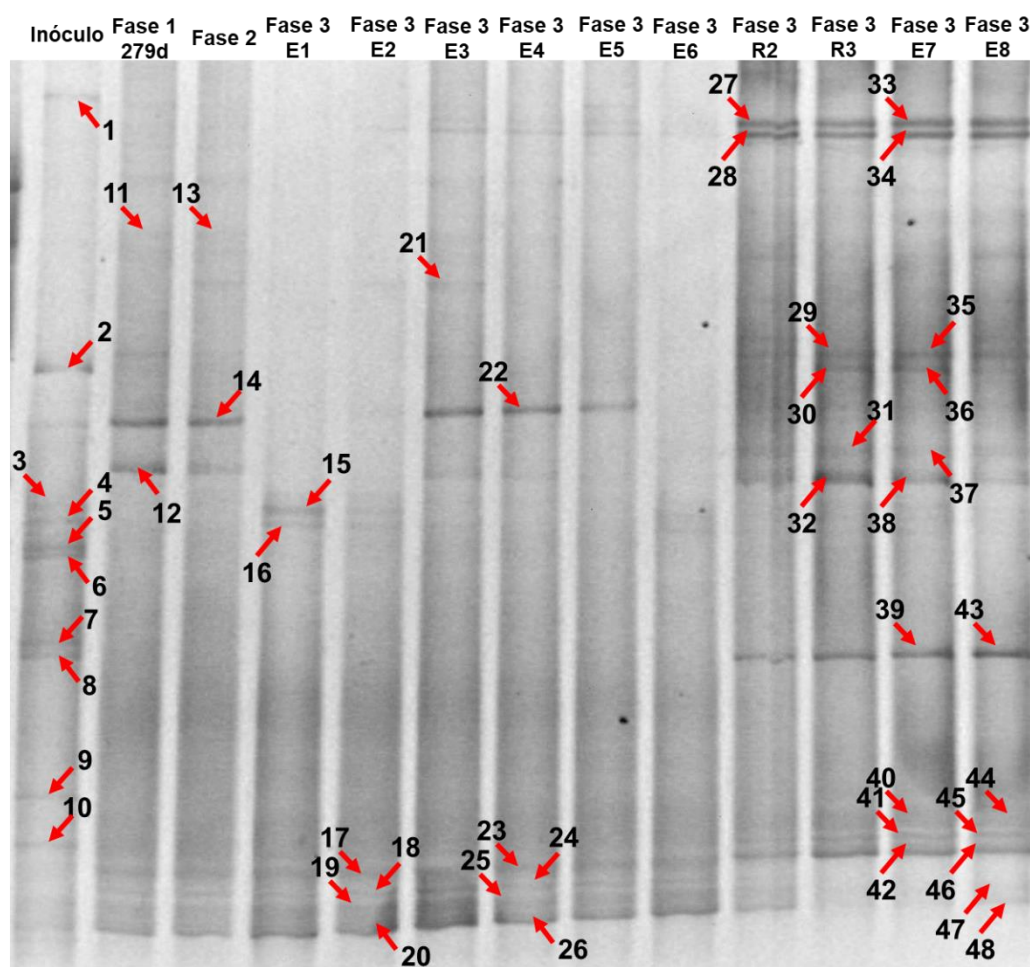


**Figura 6.34** - Dendrograma obtido para o perfil de bandas do RBS-Lab por meio da PCR-DGGE do Domínio Bacteria (coeficiente de similaridade de *Dice* e método de agrupamento UPGMA)

Em suma, os resultados indicam que a comunidade de bactérias desenvolvida no RBS-Lab foi modificada principalmente em três momentos: (i) após o enriquecimento de bactérias anammox, na Fase 1, que apresentou perfil distinto do inóculo; (ii) quando aeração foi introduzida, com o início dos testes com as diferentes estratégias de aeração, que pode ser observado principalmente após a estratégia E2 de operação, com perfis completamente diferentes das amostras coletadas nas fases de enriquecimento (Fase 1) e de aplicação de digestato de resíduo alimentar mais nitrito (Fase 2) e; (iii) após as estratégias de recuperação (R2 e R3), em que o reator novamente foi operado em condições totalmente anóxicas.

### 6.1.7.2 PCR-DGGE de bactérias anammox

Com vistas a investigar especificamente eventuais mudanças nas populações de bactérias anammox no RBS-Lab análise de PCR-DGGE utilizando iniciadores específicos (A438F/A684R) para esse grupo de bactérias foi realizado (SONTHIPHAND e NEUFELD, 2013). Os perfis de bandas obtidos a partir desta análise são apresentados na Figura 6.35. A identificação das bandas que foram excisadas do gel e sequenciadas é apresentada na Tabela 6.10.



**Figura 6.35** - Perfis obtidos por PCR-DGGE para bactérias anammox nas amostras do RBS-Lab. As setas em vermelho indicam as bandas que foram excisadas do gel e sequenciadas (Ver Tabela 5.9 para detalhamento das amostras).

**Tabela 6.10** - Identificação das bandas do DGGE de Anammox de acordo com bases de dados RDP *Classifier* e *GenBank*

<b>Banda</b>	<b>Organismo mais próximo (RDP <i>Classifier</i>)</b>	<b>Organismo mais próximo (<i>GenBank</i>)</b>	<b>Identidade (%)</b>	<b>Nº de acesso</b>
1	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Brocadia sp.	100	KY399802.1
2	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Brocadia sp.	100	KY399802.1
3	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Brocadia sp.	100	KY399802.1
4	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Brocadia sp.	100	KY399802.1
5	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Kuenenia sp.	100	KY399805.1
6	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Brocadia sp.	100	KY399802.1
7	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Brocadia sp.	100	KY399802.1
8	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Brocadia sp.	100	KY399802.1
9	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Kuenenia sp.	100	KY399805.1
10	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Brocadia sp.	100	KY399802.1
11	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Brocadia sp.	100	KY399802.1
12	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Brocadia sp.	100	KY399802.1
13	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Brocadia sp.	100	KY399802.1
14	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Brocadia sp.	100	KY399802.1
15	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Brocadia sp.	100	KY399802.1
16	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Brocadia sp.	100	KY399802.1
17	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Brocadia sp.	100	KY399802.1
18	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Brocadia sp.	100	KY399802.1
19	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Brocadia sp.	100	KY399802.1
20	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Brocadia sp.	100	KY399802.1
21	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Brocadia sp.	100	KY399802.1
22	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Brocadia sp.	100	KY399802.1
23	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Brocadia sp.	100	KY399802.1
24	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Brocadia sp.	100	KY399802.1
25	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Brocadia sp.	100	KY399802.1
26	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Brocadia sp.	100	KY399802.1
27	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Brocadia fulgida	97	KP663625.1
28	Bacteria	<i>Candidatus</i> Brocadia sp.	97	KY399802.1
29	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Jettenia sp.	99	KX022121.1
30	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Jettenia sp.	99	KX022121.1
31	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Jettenia sp.	100	KX022121.1
32	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Jettenia sp.	100	KX022121.1
33	Bacteria	<i>Candidatus</i> Brocadia fulgida	98	KM925898.1
34	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Brocadia sp.	94	KY399802.1
35	Bacteria	<i>Candidatus</i> Jettenia sp.	98	KX022121.1
36	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Jettenia sp.	99	KX022121.1
37	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Jettenia sp.	100	KX022121.1
38	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Jettenia sp.	100	KX022121.1
39	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Jettenia sp.	100	KX022121.1
40	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Jettenia sp.	100	KX022121.1
41	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Jettenia sp.	100	KX022121.1

/Continua

<b>Banda</b>	<b>Organismo mais próximo (RDP Classifier)</b>	<b>Organismo mais próximo (GenBank)</b>	<b>Identidade (%)</b>	<b>Nº de acesso</b>
42	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Jettenia sp.	100	KX022121.1
43	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Jettenia sp.	98	KX022121.1
44	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Jettenia sp.	99	KX022121.1
45	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Jettenia sp.	100	KX022121.1
46	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Jettenia sp.	100	KX022121.1
47	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Brocadia sp.	100	KY399802.1
48	Brocadiaceae	<i>Candidatus</i> Brocadia sp.	100	KY399802.1

Todas as bandas sequenciadas tiveram elevada porcentagem de identidade com gêneros de bactérias anammox (Tabela 6.10). Na amostra do inóculo, *Ca. Brocadia* foi o gênero dominante. Entretanto, as bandas 5 e 9 do inóculo apresentaram 100% de identidade com sequência do gênero *Ca. Kuenenia*.

O gênero *Ca. Brocadia* também foi o que predominou durante a fase de enriquecimento (Fase 1), durante a Fase 2 (aplicação de digestato mais nitrito) e ao longo das primeiras estratégias de aeração avaliadas (E1 a E6). Todas as bandas identificadas ao longo destes períodos (bandas 11 a 26) estão relacionadas com elevada porcentagem de identidade a sequências de *Ca. Brocadia*.

Bandas relacionadas à *Ca. Brocadia* (47 e 48) e mais especificamente à espécie *Ca. Brocadia fulgida* (27 e 33) também estiveram presentes a partir do período de recuperação do RBS-Lab (R2). Entretanto, novas bandas (29 a 32 e 35 a 46) surgem a partir deste período e predominam durante R2, R3, E7 e E8. Estas bandas, que não estavam presentes nas amostras anteriores, foram relacionadas a outro gênero de bactérias anammox, *Ca. Jettenia*. Estes resultados confirmaram os resultados obtidos pela PCR-DGGE do domínio bactéria, sendo possível identificar que houve mudança na comunidade de bactérias anammox, com substituição da dominância de *Ca. Brocadia* para *Ca. Jettenia*, após o período de recuperação R2. Esta substituição também foi observada por meio do sequenciamento de nova geração, como é apresentado adiante (Item 6.1.8).

Mudanças em populações de bactérias anammox têm sido relatadas em alguns trabalhos. Por exemplo, Park *et al.* (2010) verificaram em experimento de enriquecimento, que a população de bactérias anammox do inóculo, que foi obtido de lodo de reator anammox em escala piloto, era dominada por *Ca. Kuenenia* e foi substituída por *Ca. Brocadia* sp. 40 após enriquecimento. Após longo período de cultivo, o gênero *Ca. Brocadia* sp. 40 foi substituído por *Ca. Brocadia fulgida*. Van der Star *et al.* (2008) também observou mudança na dominância de *Ca. Brocadia*

para *Ca. kuenenia stuttgartiensis* durante experimento de enriquecimento e cultivo em biorreator de membrana (MBR). Os autores atribuíram tal mudança à maior afinidade de *Ca. K. stuttgartiensis* por nitrito, que foi um substrato limitante no meio. Similarmente, Park *et al.* (2015) também observaram mudanças na população de bactérias anammox em um biorreator de membrana com biofilme (MBBR), tanto na biomassa que cresceu em suspensão, quanto na biomassa que cresceu aderida ao biofilme. Em ambos os casos houve substituição de *Ca. Brocadia fulgida* por *Ca. Kuenenia stuttgartiensis*. Os autores também atribuíram esta mudança à maior afinidade de *Ca. Kuenenia* por nitrito, uma vez que as concentrações em suspensão deste substrato foram menores a partir dos 120 dias de operação, justamente quando *Ca. Kuenenia* começou a se tornar o gênero dominante. Isso também explicaria a mesma mudança ocorrida na biomassa que cresceu aderida ao biofilme. Para os autores, o acúmulo de biomassa no meio suporte no decorrer do experimento de cultivo proporcionou maior limitação para a difusão deste substrato para o interior do biofilme, o que conduziu a uma seleção preferencial de *Ca. Kuenenia* em detrimento de *Ca. Brocadia*.

Os trabalhos supracitados apontam para a hipótese de que há diferenciação de nichos ecológicos entre os diferentes gêneros/ espécies de bactérias anammox. Essa diferenciação, no entanto, ainda não está bem resolvida, apesar de que o conhecimento acerca desse tema ser de extrema importância, inclusive para a utilização desses micro-organismos no tratamento de efluentes. É hipotetizado que as diferenças entre as características cinéticas e fisiológicas das diferentes espécies de bactérias anammox são fatores-chave que determinam a diferenciação de nicho. Estudo recente realizado por Zhang *et al.* (2017a) avaliou a competição por nitrito entre diferentes espécies de bactérias com atividade anammox (*Ca. Brocadia sinica*, *Ca. Jettenia caeni* e *Ca. kuenenia stuttgartiensis*) em condições de limitação deste substrato (relação  $\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+ = 1$ ), em diferentes tipos de reatores (MBR e reator de coluna com biomassa imobilizada em gel) operados sob diferentes cargas de nitrogênio aplicadas. Os resultados demonstraram que as diferentes espécies de bactérias anammox foram capazes de desenvolver nichos específicos em resposta às diferentes cargas de nitrogênio aplicadas. Por exemplo, no MBR, *Ca. B. sinica* predominou quando altas cargas de nitrogênio foram aplicadas (de 100 a 170 g  $\text{N}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) e *Ca. J. caeni* quando baixas cargas de nitrogênio foram aplicadas (70 g  $\text{N}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ).

Os autores explicaram que a carga de nitrogênio aplicada por si só não é capaz de influenciar diretamente a competição baseada no modelo clássico de Monod, uma vez que a taxa de crescimento específica ( $\mu$ ) é determinada pela concentração do substrato limitante. De acordo com o modelo de Monod, e os parâmetros cinéticos atualmente disponíveis para *Ca. Brocadia*

sinica ( $\mu_{\max}$  ( $\text{h}^{-1}$ ) = 0,014 e  $K_s$  ( $\text{NO}_2^-$ ) = 34 mM) e *Ca. Jettenia caeni* ( $\mu_{\max}$  ( $\text{h}^{-1}$ ) = 0,0075 e  $K_s$  ( $\text{NO}_2^-$ ) = 35,6 mM), *Ca. Brocadia* venceria *Ca. Jettenia* sob qualquer concentração de nitrito. Os autores, portanto, contestam os valores de  $K_s$  estimados para *Ca. Jettenia*, uma vez que eles parecem ter sido determinados a partir de biomassa granular (com grânulos de 150  $\mu\text{m}$  de diâmetro) e por esse motivo, afirmam que o  $K_s$  determinado pode ter sido afetado pela existência de limitação de difusão de substrato. Os autores verificaram, que supondo cenários com menores valores de  $K_s$  para *Ca. Jettenia* (iguais a 0,1 e 5) e baixa concentração de  $\text{NO}_2^-$  (<4 mM), a taxa de crescimento específica desse micro-organismo poderia superar a de *Ca. Brocadia*. Dessa forma, os autores sugerem que o  $K_s$  para *Ca. Jettenia* deve ser reavaliado utilizando células em suspensão. Além da possibilidade da imprecisão no valor de  $K_s$ , os autores apontam outro fator que pode influenciar a competição por nitrito. Uma vez que bactérias anammox foram capazes de crescer em baixas cargas de nitrogênio aplicadas, a taxa de manutenção celular (decaimento endógeno) pode impactar significativamente a competição. Uma vez que a espécie *Ca. Brocadia sinica* foi superada por *Ca. Jettenia caeni* em reator com baixa carga de nitrogênio aplicada, mas não em reator com elevada carga de nitrogênio aplicada, os autores sugerem que *Ca. B. sinica* possuem uma taxa de manutenção celular mais alta e por isso perdem na competição por *Ca. Jettenia caeni* quando submetidos à baixas cargas de nitrogênio (ZHANG *et al.*, 2017a).

No presente trabalho, observou-se que *Ca. Brocadia* foi o gênero de bactéria anammox inicialmente enriquecido (Fase 1). Durante esta fase, maiores cargas de nitrogênio foram aplicadas no reator, com medianas iguais a 95,5  $\text{g N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$  e valores máximos alcançando 178  $\text{g N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$  (Tabela A3). Após as seis primeiras estratégias de aeração avaliadas, a população de bactérias anammox foi prejudicada, refletindo em perdas nas eficiências de remoção de nitrogênio. Os resultados obtidos por qPCR corroboram tal afirmação, pois foi verificada diminuição na abundância de bactérias anammox (da ordem de  $10^8$  para  $10^7$  n° de cópias.  $\text{g lodo}^{-1}$  da Fase 1 para a Fase 3 (E6)). Na etapa de recuperação, tanto a performance do reator quanto abundância de anammox (determinada por qPCR) foram recuperados. No entanto, outro gênero de anammox passou a predominar no reator, *Ca. Jettenia*. É importante ressaltar que durante R1 e R2, as cargas de nitrogênio aplicadas foram menores, com medianas iguais a 46,2 e 62,2  $\text{g N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$  (Tabela A7). As baixas cargas aplicadas predominantes durante este período de recuperação podem ter sido determinantes para o desenvolvimento de *Ca. Jettenia*, em detrimento de *Ca. Brocadia*, assim como no experimento realizado por Zhang *et al.* (2017a). Ressalta-se ainda que durante R1 e R3, em que foi aplicado digestato de resíduo alimentar mais nitrito, nitrito foi aplicado em relação estequiométrica menor do que a requerida para o processo

anammox ( $N\text{-NO}_2^-/N\text{-NH}_4^+$  em torno de 0,76), fazendo com que o nitrito se tornasse o substrato limitante para as bactérias anammox. Dessa forma, o presente trabalho também corrobora com a hipótese de que *Ca. Jettenia* tem maior habilidade por se desenvolver em ambientes em que baixas cargas de nitrogênio são aplicadas e em que há limitação de substratos.

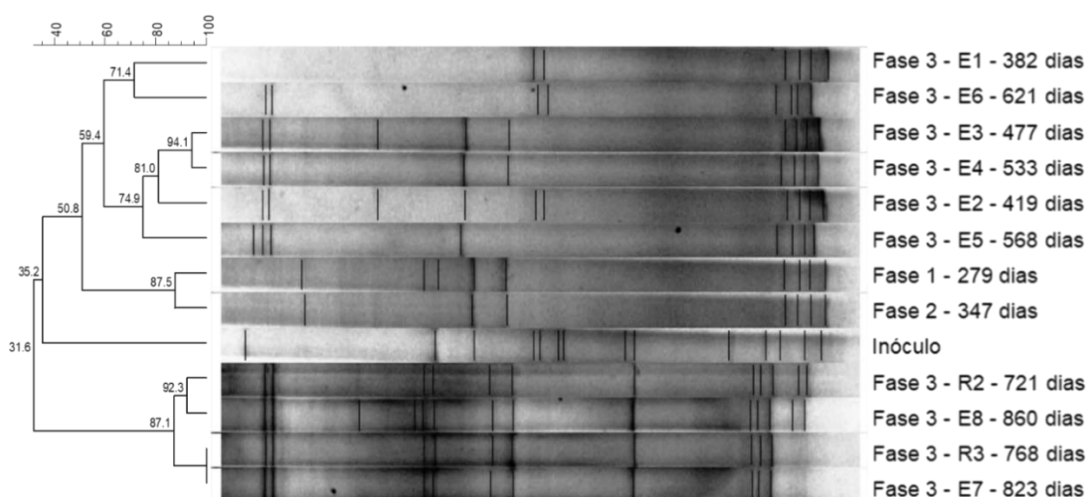
Sabe-se, que *Ca. Jettenia* é capaz de realizar a redução desassimiliatória do nitrato à amônia (RDNA), via nitrito (processo também chamado de amonificação respiratória) utilizando ácidos graxos como doadores de elétrons, como acetato e propionato (ALI *et al.*, 2015; HUANG *et al.*, 2014; LIANG *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2018). Liang *et al.* (2015) observaram em um reator anammox com configuração de reator UASB, a substituição da dominância de *Ca. kuenenia* por *Ca. Jettenia*, quando acetato e propionato foram adicionados. Da mesma forma, Yang *et al.* (2018) observaram que, após adição de quinolina, um composto orgânico aromático encontrado em efluentes industriais, a um reator com atividade anammox, o gênero *Ca. Jettenia* passou a predominar em relação à *Ca. Brocadia* e *Ca. Kuenenia*. Com base nos trabalhos supracitados, outra hipótese para a substituição de *Ca. Brocadia* por *Ca. Jettenia* após o período de recuperação no presente trabalho é possível. Isso pode ter ocorrido devido ao enriquecimento de bactérias anammox no período de recuperação ter se dado inicialmente com a adição de digestato alimentar mais nitrito (durante R1). Isso pode ter favorecido o crescimento de *Ca. Jettenia*, em detrimento de *Ca. Brocadia*. *Ca. Jettenia* é considerada uma bactéria anaeróbia oxidadora de amônia organotrófica, uma vez que pode realizar a (RDNA) com compostos orgânicos como doadores de elétrons e por isso, seu enriquecimento é benéfico em sistemas de tratamento de efluentes que possuem matéria orgânica. Apesar disso, esses micro-organismos crescem preferencialmente utilizando amônio e nitrito, como doador e acceptor de elétrons, respectivamente, e carbono inorgânico como fonte de carbono (HUANG *et al.*, 2014).

O dendrograma apresentado pela Figura 6.36 demonstra que houve um agrupamento entre as amostras coletadas após o período de recuperação no RBS-Lab (R2, R3, E7 e E8), com 87,1 % de similaridade entre si. Este agrupamento, por sua vez, divergiu bastante das demais amostras do RBS-Lab e inóculo com apenas 31,6 % de similaridade. Esta elevada divergência certamente ocorreu devido às mudanças nas condições operacionais a partir do período de recuperação, como explicado anteriormente, que afetou consideravelmente a comunidade de bactérias anammox, fazendo com que houvesse mudança no gênero predominante no reator, de *Ca. Brocadia* (antes do período de recuperação) para *Ca. Jettenia* (após o período de recuperação).

O inóculo também apresentou perfil bastante diferente das demais amostras, com apenas 35,2 % de similaridade com o agrupamento formado pelas amostras durante as Fases 1 e 2 e Fase 3 (E1 a E6). Os perfis de bandas obtidos para as Fases 1 e 2 foram bastante similares entre si (87,8%) e diferem dos perfis obtidos após o início das estratégias de aeração (Fase 3, E1 a E6) uma vez que o coeficiente de similaridade igual a 50,8 % foi obtido entre estes agrupamentos. Indicando que a introdução da aeração no sistema também ocasionou mudanças na comunidade de bactérias anammox.

Dentre as primeiras estratégias de aeração avaliadas na Fase 3, as amostras coletadas durante E1 e E6 foram agrupadas entre si com similaridade de 71,4%, e as demais amostras (coletadas durante as estratégias E2, E3, E4 e E5) agruparam-se com 74,9% de similaridade entre si.

Apesar das diferenças entre os perfis obtidos durante as Fases 1, 2 e primeiras estratégias de aeração avaliadas durante a Fase 3 (E1 a E6), todos as bandas sequenciadas do gel durante estes períodos estiveram relacionadas à bactéria anammox *Ca. Brocadia*. Provavelmente foram obtidas bandas em diferentes alturas no gel do DGGE, por causa de diferenças no conteúdo de G e C do DNAr 16S dentro deste gênero (*Ca. Brocadia*). Podem inclusive se tratar de diferentes espécies de *Ca. Brocadia*. Entretanto, a maioria das bandas não foram identificadas até o nível de espécie, por meio da técnica de PCR-DGGE. Tão pouco o sequenciamento de nova geração foi capaz de identificar esses micro-organismos até esse nível taxonômico, como é apresentado no item 6.1.8.

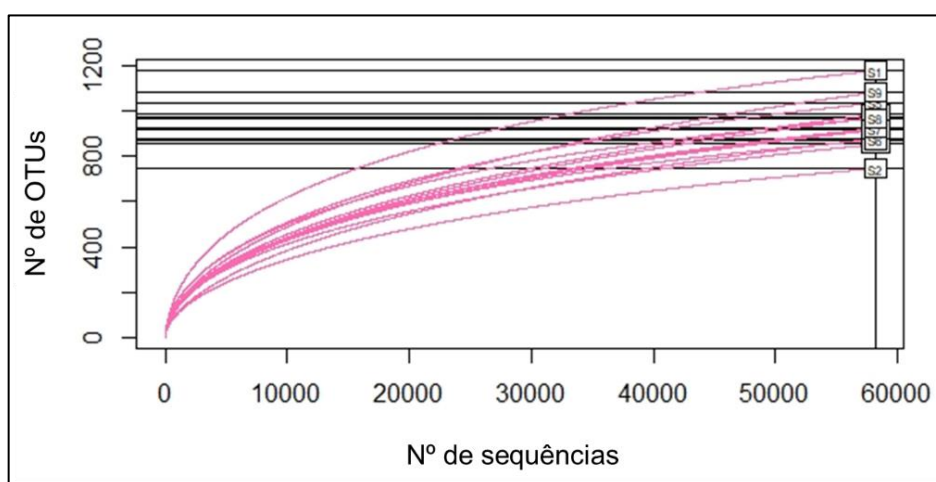


**Figura 6.36** - Dendrograma obtido para o perfil de bandas do RBS-Lab por meio da PCR-DGGE de bactérias anammox (coeficiente de similaridade de Dice e método de agrupamento UPGMA)

### 6.1.8 Análise da diversidade microbiana do RBS em escala laboratorial por sequenciamento de nova geração (SNG)

Com objetivo de investigar mais detalhadamente sobre a diversidade de micro-organismos ao longo da operação do RBS-Lab foi utilizada a técnica de sequenciamento de nova geração por meio da plataforma Illumina MiSeq. Foram obtidas de 58.183 até 181.379 sequências a partir das amostras do RBS-Lab (Tabela 6.11). Para o cálculo das curvas de rarefação, índices de diversidade alfa e índice de distância de *Bray-curtis*, reamostragem das sequências foi realizada a fim de que todas as amostras tivessem o mesmo número de sequências daquela com menor número de sequências recuperadas (Fase 3 – E5; 58.183 sequências).

As curvas de rarefação demonstraram que o sequenciamento foi capaz de cobrir a maior parte da diversidade de táxons presentes nas amostras (Figura 6.37). É possível observar que as curvas tendem a se estabilizar para todas as amostras, indicando que mesmo se um maior número de sequências tivesse sido recuperado nesta análise, isto não implicaria em uma maior riqueza de táxons amostrados. Pelas curvas de rarefação é possível observar que a amostra que apresentou maior diversidade de táxons foi a do inóculo (S1). Por sua vez, a que apresentou menor diversidade foi a amostra da Fase 1 (S2), que corresponde ao enriquecimento e cultivo de bactérias anammox com meio de cultivo mineral e autotrófico. Estes dados são consistentes com o que era esperado, uma vez que durante a fase de enriquecimento, condições foram fornecidas para que houvesse seleção de micro-organismos com atividade anammox no reator.



**Figura 6.37** - Curvas de rarefação obtidas para as amostras do RBS-Lab.

O número de OTUs nas diferentes amostras analisadas variou de 746 (Fase 1) a 1.178 (Inóculo) (Tabela 6.11). De acordo com o índice de diversidade *Chao1* a amostra coletada durante a Fase

1 foi a que apresentou menor diversidade (valor igual a 978,59) e a amostra coletada durante a estratégia de aeração E3 da Fase 3, a que apresentou maior diversidade (valor igual a 1631,15). Assim como os valores calculados para o índice de *Chao1*, o índice de *Shannon* também demonstrou que a amostra coletada durante a Fase 1 foi a que apresentou menor diversidade (valor igual a 2,94). Entretanto, de acordo com esse índice a amostra que apresentou maior diversidade foi a amostra coletada durante a estratégia de aeração E2 da Fase 1 (valor igual a 4,12).

Diferentes índices apontaram diferentes amostras como sendo mais diversas. Isso pode ser atribuído à forma como os diferentes índices de diversidade são calculados. O índice *Chao1* estima a riqueza de espécies dando grande peso às espécies raras presentes na amostra. Dessa forma, em seu cálculo são considerados o número de espécies representadas por apenas um indivíduo (*singletons*) e apenas dois indivíduos (*doubletons*) na amostra (COLWELL e CODDINGTON, 1994). Já o índice de diversidade de *Shannon* leva em consideração a riqueza de espécies e a equitabilidade das mesmas que diz respeito a como a abundância de espécies está distribuída na amostra. O índice de *Shannon* dá maior peso à riqueza de espécies e menos às espécies raras (MAGURRAN, 2004).

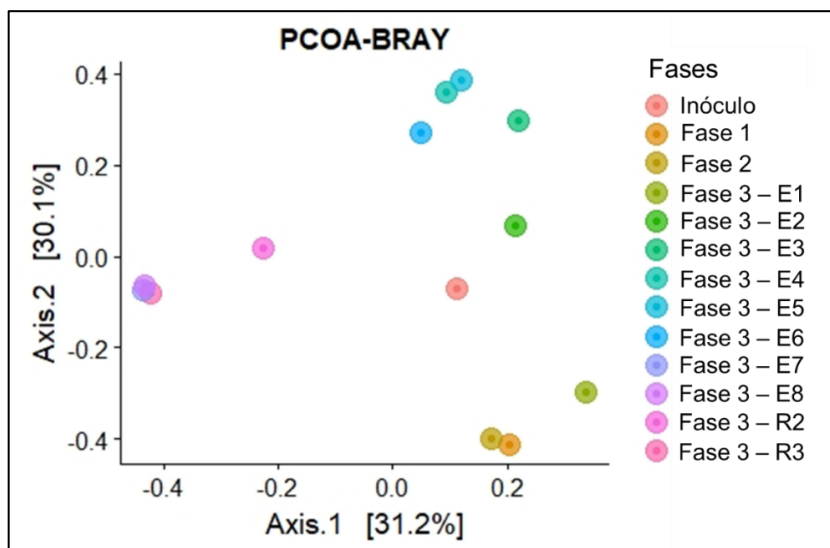
**Tabela 6.11** - Número de sequências, OTUs e índices de diversidade alfa *Chao1* e *Shannon* obtidos para as amostras do RBS-Lab

Amostras	Nº de sequências	Nº de sequências Normalizado	OTUs	Chao1	Shannon
<b>Inóculo</b>	79.421	58.183	1.178	1459,52	4,06
<b>Fase 1 - 279d</b>	85.837	58.183	746	978,59	2,94
<b>Fase 2</b>	134.336	58.183	877	1259,59	3,06
<b>Fase 3 E1</b>	133.702	58.183	971	1433,00	3,36
<b>Fase 3 E2</b>	82.258	58.183	1.053	1299,27	4,12
<b>Fase 3 E3</b>	71.873	58.183	872	1095,72	3,27
<b>Fase 3 E4</b>	109.398	58.183	923	1228,80	3,48
<b>Fase 3 E5</b>	58.183	58.183	968	1197,18	3,91
<b>Fase 3 E6</b>	181.379	58.183	1.083	1631,15	3,97
<b>Fase 3 R2</b>	118.960	58.183	853	1244,29	3,78
<b>Fase 3 R3</b>	137.932	58.183	986	1521,68	3,39
<b>Fase 3 E7</b>	125.012	58.183	920	1298,61	3,41
<b>Fase 3 E8</b>	130.552	58.183	916	1403,50	3,27

Análise de coordenadas principais baseada no índice de dissimilaridade de *Bray-curtis* é apresentada na Figura 6.38. De maneira geral, houve uma tendência das amostras em se

agruparem em função do tempo de operação e das condições operacionais do reator. O inóculo não se agrupou com nenhuma das amostras coletadas no RBS-Lab, sendo mais próximo da amostra coletada durante a estratégia de aeração E2 da Fase 3. As comunidades microbianas das amostras coletadas durante as Fases 1, 2 e primeira estratégia de aeração (E1) da Fase 3 foram bastante similares entre si, em especial as das Fases 1 e 2, em que o reator foi operado em condições anóxicas. Esses resultados indicam que a introdução do digestato de resíduo alimentar no reator com suplementação com nitrito não foi capaz de alterar consideravelmente a comunidade microbiana no mesmo.

As amostras coletadas durante as estratégias de aeração E3 até E6, formaram outro agrupamento, e foram distantes das amostras coletadas nos demais períodos operacionais. Estes resultados confirmam que a aeração promoveu mudanças na comunidade microbiana do RBS-Lab. Após o período de recuperação, ocorreram novamente, mudanças na comunidade microbiana, uma vez que, observa-se que as comunidades desenvolvidas durante os períodos R2, R3, E7 e E8, formam novo agrupamento entre si e foram bem distintas das demais amostras do RBS-Lab. Esses resultados foram, de maneira geral, compatíveis com os obtidos por meio da PCR-DGGE do domínio Bacteria, uma vez que os perfis de bandas obtidos formaram agrupamentos semelhantes entre as amostras analisadas, como pode ser observado no dendrograma da Figura 6.34.



**Figura 6.38** - Análise de coordenadas principais (PCoA) com base nos índices de dissimilaridade de *Bray-curtis*, representando a distância entre as comunidades microbianas das amostras do RBS-Lab.

#### 6.1.8.1 Diversidade em nível de Filo

A Figura 6.39 apresenta os filios mais representativos nas amostras do RBS-Lab, de acordo com os resultados do SNG. São apresentados, nesta figura, os filios que apresentaram abundância relativa maior ou igual a 1% em pelo menos uma das amostras. Dentre os doze filios apresentados na Figura 6.39, destacam-se cinco que apresentaram maior abundância relativa em todas as amostras avaliadas: Proteobacteria, Planctomycetes, Chloroflexi, Bacteroidetes e Acidobacteria. Juntos, esses filios compõem de 81% a 93% de todos os filios presentes nas amostras avaliadas. Como pode ser observado na Tabela 2.6, da Revisão de Literatura do presente trabalho, estes filios são constantemente encontrados em abundância em reatores com atividade anammox, independente da configuração do reator, das condições de operação e tipo de inóculo usado para a partida dos reatores. Isso sugere, que estes filios desempenham papéis-chave dentro desses sistemas, sendo importantes para o funcionamento dos processos que envolvem bactérias anammox.

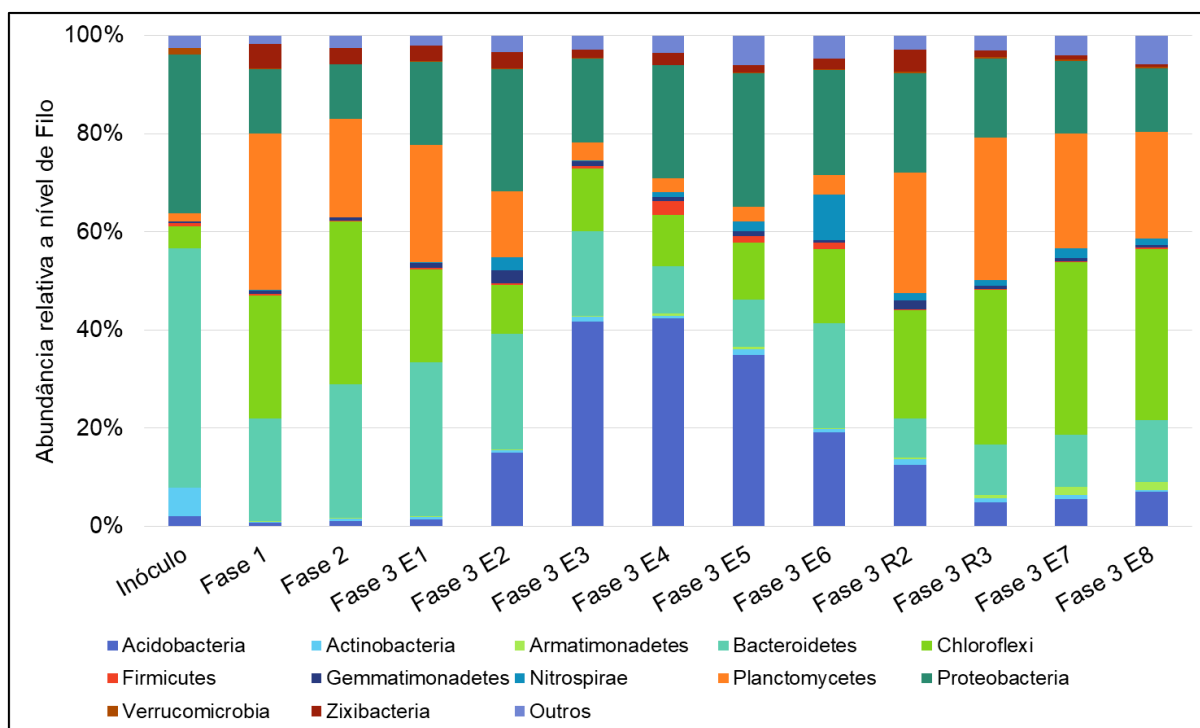
Os cinco filios mais abundantes (Proteobacteria, Planctomycetes, Chloroflexi, Bacteroidetes e Acidobacteria) são discutidos com maior nível de detalhes no item 6.1.8.2. Vale ressaltar a presença do filo Nitrospirae, ao qual pertence a bactéria oxidadora de nitrito *Nitrospira*. A maioria das sequências recuperadas dentro deste filo foram associadas ao gênero *Nitrospira*, com abundâncias relativas variando de 0,02% (Inóculo) até 9,35% (Fase 3 E6). Este é um grupo de bactérias oxidadoras de nitrito (BON), que oxidam este composto até nitrato. É bastante diverso filogeneticamente e está entre as BON mais difundidas ambientalmente, sendo muito encontrados em sistemas de tratamento de efluentes. Com a maioria de seus representantes não cultivados, pouco se sabe sobre sua ecofisiologia. Sabe-se que nem todos os membros desse grupo utilizam exclusivamente nitrito como fonte de energia. Algumas espécies encontradas em sistemas de lodos ativados, por exemplo, são mixotróficas, podendo utilizar compostos orgânicos simples, como piruvato, formiato, glicerol na assimilação de carbono e como fonte de energia, além de CO<sub>2</sub> e nitrito (KOCH *et al.*, 2015). Em sistemas de NP/A, a presença desses micro-organismos é indesejada, uma vez que eles podem competir com bactérias anammox pelo nitrito. No presente trabalho, em especial durante as primeiras estratégias de aeração avaliadas durante a Fase 3 (E1 a E6), em que maiores vazões de ar foram aplicadas, foram observadas elevadas concentrações de nitrato no efluente, indicando que esses micro-organismos estiveram bastante ativos durante este período. Os resultados obtidos por qPCR também confirmaram a presença do gene RNAr 16S dessas bactérias em elevadas concentrações nas amostras do reator, em especial durante as primeiras estratégias de aeração (E1 a E6), da ordem de 10<sup>7</sup> a 10<sup>8</sup> n° de

cópias.g lodo<sup>-1</sup> durante estes períodos. Em reatores com atividade anammox, *Nitrospira* é encontrado frequentemente, mesmo quando os reatores são operados em condições anóxicas ou em baixas concentrações de oxigênio (COSTA *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2014; PERSSON *et al.*, 2017; REN *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2014). O fato desses micro-organismos possuírem elevada afinidade por oxigênio e nitrito, como já foi discutido anteriormente pode fazer com que eles consigam se desenvolver em condições de limitação de substratos (GILBERT *et al.*, 2014).

Atenção deve ser dada ao filo Zixibacteria, que também foi encontrado em abundância elevada na maioria das amostras do RBS-Lab, atingindo 5,01% durante a Fase 1 de operação. A presença deste filo, anteriormente classificado com RBG-1, até onde se tem conhecimento, não é comumente reportada em reatores anammox. Estudos realizados por Castelle *et al.* (2013) revelaram este grupo de micro-organismos como dominantes em amostras de sedimento de aquífero adjacente ao rio Colorado, nos Estados Unidos. Estudo metagenômico revelou que esse grupo microbiano é bastante versátil metabolicamente, sendo que têm potencial metabólico para oxidar uma série de compostos orgânicos, como piruvato, glicose e provavelmente propionato e acetato, utilizando aceptores de elétrons óxicos e anóxicos. Parece ser capaz de metabolizar ácidos graxos complexos a ácidos de cadeia mais curta e tem também possuem genes envolvidos na degradação anaeróbia de compostos aromáticos, como benzoato. Provavelmente são organismos heterotróficos, uma vez que não foram encontrados em seu genoma, genes que codificam algumas enzimas para rotas autotróficas de crescimento.

No que diz respeito ao metabolismo do nitrogênio o genoma de Zixibacteria codifica enzima com função importante no processo de nitrificação, denominada nitrito/nitrato oxidoreductase (*NXR*). *NXR* é também identificada em *Nitrospira defluvi*, onde tem função de oxidação aeróbia do nitrito. Também aparece na bactéria anammox *Ca. Kuenenia stuttgartiensis*, onde é sugerido ter função na oxidação anaeróbia de nitrito a nitrato, fornecendo energia e poder redutor. Nesses três micro-organismos a enzima *NXR* é diferente dos demais (*Nitrobacter* e *Nitrococcus*, por exemplo), pois é orientada em direção ao periplasma e não ao citoplasma celular. Em *Ca. Kuenenia stuttgartiensis* pode ter a função de nitrato redutase, desempenhando papel na oxidação de compostos orgânicos menores, utilizando nitrato como acceptor de elétrons. É possível que tenha papel similar a esse em *Zixibacteria*, permitindo sua sobrevivência em condições anóxicas. Esses micro-organismos tem potencial para assimilação de amônio, via glutamato desidrogenase ou glutamato sintase (CASTELLE *et al.*, 2013). Tanto nitrato, quanto amônio em elevadas concentrações estiveram presentes no RBS-Lab. Dessa forma, esse micro-

organismo poderia estar desenvolvendo papel, tanto na redução do nitrato quanto na assimilação da amônia, dentro desse sistema, o que justificaria sua presença ao longo de todos os períodos de operação do RBS-Lab.



**Figura 6.39** – Abundância relativa dos filos mais representativos ( $\geq 1\%$ ) nas amostras do RBS-Lab (ver Tabela 5.9 para detalhamento das amostras).

#### 6.1.8.2 Diversidade em nível de Ordem

O filo Proteobacteria é bastante diverso filogeneticamente, incluindo micro-organismos com grande variedade de metabolismos (MADIGAN *et al.*, 2010). Este filo foi um dos mais abundantes na maioria das amostras do RBS, com abundância relativa variando de 11,2 % (Fase 2) a 32,3 % (Inóculo). Dentre as ordens mais abundantes dentro deste filo, é possível citar diversas que incluem micro-organismos desnitrificantes como Betaproteobacterales, Mixococcales, Rhizobiales e Xanthomonadales (Figura 6.40).

Dentro da ordem Betaproteobacterales, micro-organismos do gênero *Ottowia* foram encontrados. Esses micro-organismos são bastante encontrados em sistemas de lodos ativados e são anaeróbios facultativos, quimioheterotróficos e podem reduzir nitrato, quando em ambientes anóxicos, realizando dessa maneira desnitrificação heterotrófica (SPRING, 2004). Isso explica a elevada abundância desse gênero no inóculo (8,8%). Micro-organismos não classificados da família Burkholderiaceae também foram recuperados nas amostras do RBS-

Lab com abundâncias relativas elevadas, de 0,3 a 2,9%. Esse grupo também inclui potenciais micro-organismos desnitrificantes. Outro micro-organismo encontrado que está incluído dentro desta família pertence ao gênero *Limnobacter*. Este é um micro-organismo heterotrófico que é capaz de utilizar aerobiamente o tiosulfato como fonte de energia. Entretanto, estudos tem demonstrado que podem também crescer em condições anaeróbias, produzindo sulfato a partir de enxofre. Genes envolvidos na assimilação de nitrato/ nitrito foram encontrados nesta bactéria (*nasAB*), sugerindo que são capazes de produzir nitrogênio a partir de nitrato/ nitrito (CHEN *et al.*, 2016b). No RBS-Lab, *Limnobacter* esteve presente principalmente nos últimos períodos de operação, após a recuperação do reator, R2, R3, E7 e E8 com abundâncias relativas variando de 0,7 a 1,4%.

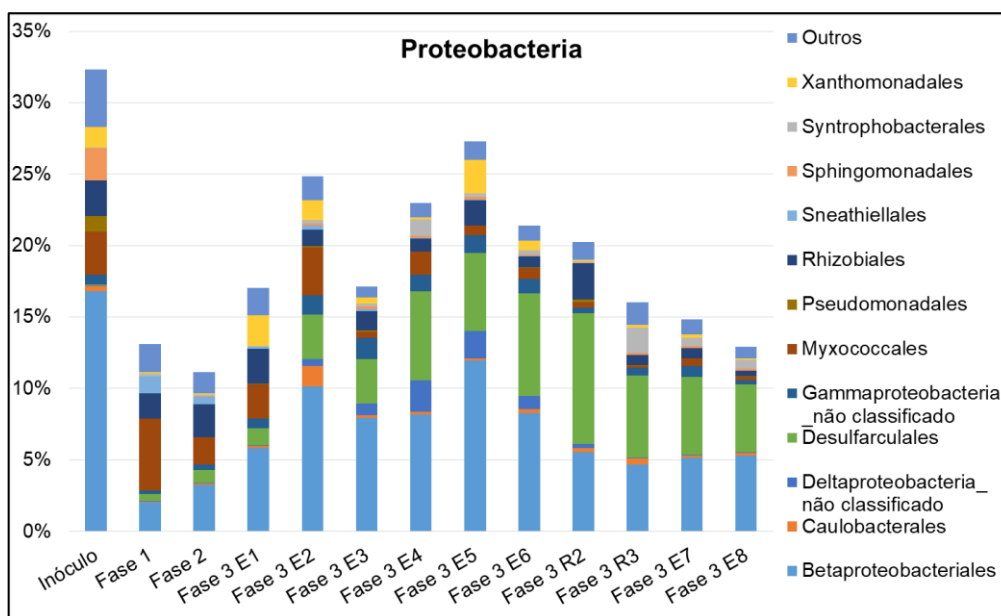
Outro gênero incluído na ordem Betaproteobacteriales que pode realizar a desnitrificação heterotrófica é *Denitratisoma* (família *Rhodocyclaceae*) (FAHRBACH, 2006). Esse gênero também foi encontrado nas amostras do RBS-Lab atingindo abundância relativa igual a 1,5% no último período da Fase 3 de operação (E8). A ordem Betaproteobacteriales também inclui a bactéria aeróbia oxidadora de amônia (BOA) *Nitrosomonas*, que foi encontrada em todas as amostras do RBS-Lab. Durante os períodos em que o reator foi operado em condições anaeróbias, menor abundância relativa desse gênero foi encontrada no RBS-Lab (0,03, 0,05, 0,2 e 0,3%, durante a Fase 1, Fase 2, Fase 3 R2 e Fase 3 R3). Abundâncias relativas maiores foram encontradas durante os testes com as diferentes estratégias de aeração (variando entre 0,3% e 2,5%), o que era esperado. BOA são essenciais ao processo de NP/A, uma vez que são os responsáveis pela oxidação parcial da amônia até nitrito. *Nitrosomonas* foi o único gênero de BOA identificado por meio do SNG.

Desulfarculales foi uma ordem bastante abundante no RBS-Lab, atingindo 9,2% durante o período de operação R2 da Fase 3 de operação. Este micro-organismo está associado à redução de sulfato à H<sub>2</sub>S utilizando compostos orgânicos como formato, butirato, acetato, propionato e ácidos graxos de cadeia longa, como fonte de carbono e energia (SUN *et al.*, 2010). Segundo Madigan *et al.* (2010) esses micro-organismos também podem reduzir nitrato. Sulfato não foi monitorado no digestato afluente ao RBS-Lab, entretanto, a elevada abundância relativa desse micro-organismo sugere a presença desse composto nesse efluente. Sulfatos podem estar presentes nos alimentos e na água, podendo, dessa maneira, serem constituintes do digestato tratado no RBS-Lab.

A ordem Myxococcales também esteve presente em todos os períodos de operação do RBS-Lab, com abundâncias relativas variando entre 0,2 e 5,0%. Esses micro-organismos também podem ter função dentro do ciclo do nitrogênio uma vez que possuem gene que codifica a enzima nitrito redutase *nrfA*, enzima chave no processo de redução desassimilatória do nitrato à amônio (RDNA). Nesse processo, compostos orgânicos são oxidados e o nitrato é reduzido à  $\text{NH}_4^+$ . Esse é um processo contrastante à desnitrificação. Enquanto a RDNA promove a retenção de nitrogênio no meio, a desnitrificação promove a perda de nitrogênio (BU *et al.*, 2017; WELSH *et al.*, 2014). Segundo Jensen *et al.* (2011) no oceano em zonas de oxigênio mínimo o processo de RDNA pode fornecer amônio para bactérias anammox, que oxidam esse composto até nitrogênio gasoso.

A ordem Rhizobiales, com sequências recuperadas em todas as amostras do RBS-Lab, com abundâncias relativas variando de 0,4% a 2,5% também são potenciais desnitrificantes heterotróficas. De acordo com Falk *et al.* (2010) a maioria dos membros desta ordem possuem todos os genes para a desnitrificação. Dentre os grupos de bactérias desnitrificantes incluídos neste grupo e que tiveram sequências recuperadas no RBS-Lab estão *Hyphomicrobium* e micro-organismos não classificados da família Xanthobacteraceae (BÁRTA *et al.*, 2017; MARTINEAU *et al.*, 2015). Outro grupo de bactérias desnitrificantes identificado foi Xanthomonadales, com sequências associadas à família Xanthomonadaceae e ao gênero de desnitrificantes *Thermomonas* (MERGAERT, 2003).

Proteobactérias da ordem Sphingomonadales e Syntrophobacterales também foram identificadas nas amostras do RBS-Lab. Sphingomonadales inclui micro-organismos capazes de degradar compostos aromáticos, como as bactérias do gênero *Novosphingobium*, cujas sequências recuperadas perfizeram 2,0% da abundância relativa na amostra do inóculo. No RBS-Lab, a abundância desse micro-organismo foi bastante baixa (0,01% a 0,1%) (SEGURA *et al.*, 2017). A ordem Syntrophobacterales inclui o gênero *Syntrophobacter*, que está associado à oxidação do propionato. Essas bactérias são conhecidas por crescerem em simbiose com bactérias metanogênicas, que utilizam os produtos da degradação do propionato (como acetato) na produção de metano. *Syntrophobacter* também pode crescer associado a bactérias redutoras de sulfato. Além disso, foi demonstrado que elas podem crescer lentamente na presença de propionato com sulfato como aceptor de elétrons (LIU *et al.*, 1999).



**Figura 6.40** – Ordens mais representativas do filo Proteobacteria nas amostras do RBS-Lab (ver Tabela 5.9 para detalhamento das amostras)

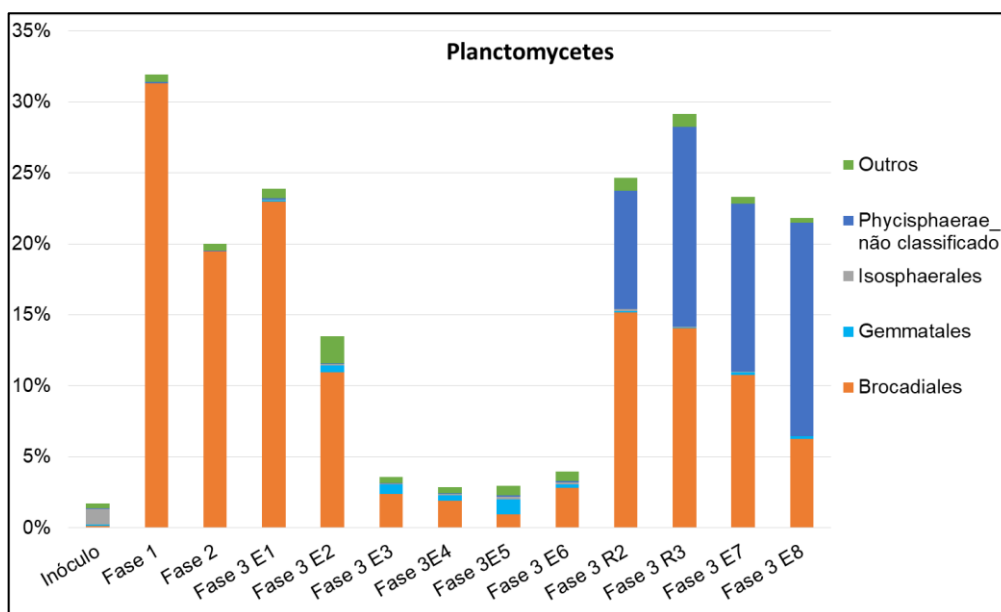
O Filo Planctomycetes também foi um dos filos dominantes na maioria das amostras do RBS-Lab (Figura 6.41). A abundância relativa deste filo no inóculo foi baixa, igual a 1,7% do total de sequências e aumentou consideravelmente durante a Fase 1, de enriquecimento e cultivo de bactérias anammox, atingindo 31,9%. Dentro da ordem Brocadiales, incluída neste filo, estão os dois gêneros de bactérias anammox encontrados no RBS-Lab, *Ca. Brocadia* e *Ca. Jettenia* (QUAN *et al.*, 2008; STROUS *et al.*, 1999a). O aumento da abundância relativa de sequências relacionadas à ordem Brocadiales após a Fase 1 (de 0,1% no inóculo para 31,3 % após a Fase 1), indica que o cultivo dessas bactérias foi bem-sucedido no RBS-Lab. Após a aplicação de digestato de resíduo alimentar durante a Fase 2, observou-se que houve diminuição da abundância relativa da ordem Brocadiales, com valores iguais a 19,5%. Um dos fatores que contribuiu para esta diminuição da abundância de bactérias anammox nesta fase, foi a introdução de matéria orgânica contida no efluente do reator, que favoreceu o crescimento de outros grupos microbianos, com metabolismo heterotrófico. Entretanto, pelos resultados físico-químicos apresentados no item 6.1.3, não houve diminuição na performance do reator na remoção de nitrogênio durante a Fase 2, em relação à Fase 1.

Quando os primeiros testes de aeração foram avaliados, observou-se considerável diminuição da abundância relativa de sequências da ordem Brocadiales. As primeiras estratégias de aeração avaliadas, durante as quais foram aplicadas as maiores taxas de aeração no RBS-Lab parecem ter afetado as bactérias anammox, o que refletiu também em perdas nas eficiências de remoção

de nitrogênio no reator. Após o período de recuperação do reator observou-se novamente um aumento da abundância relativa da ordem Brocadiales, que alcançou 15,2% durante o período R2 da Fase 3. Conseqüentemente, atividade anammox no reator foi recuperada. Após os últimos testes de aeração (E7 e E8), em que foram aplicadas menores vazões de ar em relação às primeiras estratégias de aeração avaliadas, novamente a abundância relativa de anammox começou a decair, alcançando 6,3% de abundância relativa durante E8. Entretanto, durante estas duas últimas estratégias, foi possível um maior controle do processo de NP/A, conforme discutido anteriormente.

Nos primeiros períodos de operação do reator (da Fase 1 até o período E6 da Fase 3) predominou o gênero de anammox *Ca. Brocadia*. Já após o período de recuperação (a partir do período R2 até E8 da Fase 3) o gênero *Ca. Brocadia* foi substituído por *Ca. Jettenia*. Esta substituição também foi observada pela técnica de PCR-DGGE, sendo confirmado pelo SNG, como pode ser observado na Figura 6.45.

Durante os quatro últimos períodos de operação do reator uma outra classe de planctomicetos surgiu em abundância elevada (variando de 8,3% a 15,0%). Bactérias não classificadas da classe Phycisphaerae, que contém planctomicetos não cultivados inicialmente recuperados de solos contaminados com compostos organoclorados se desenvolveram no RBS-Lab. RNAr 16S desses organismos também já foram recuperados em águas subterrâneas ricas em enxofre e sulfeto, em vários solos e em zonas de transição contendo sulfato e metano, em sedimentos continentais (FUERST, 2013). São anaeróbios facultativos e também podem reduzir nitrato à nitrito (FUKUNAGA *et al.*, 2009).

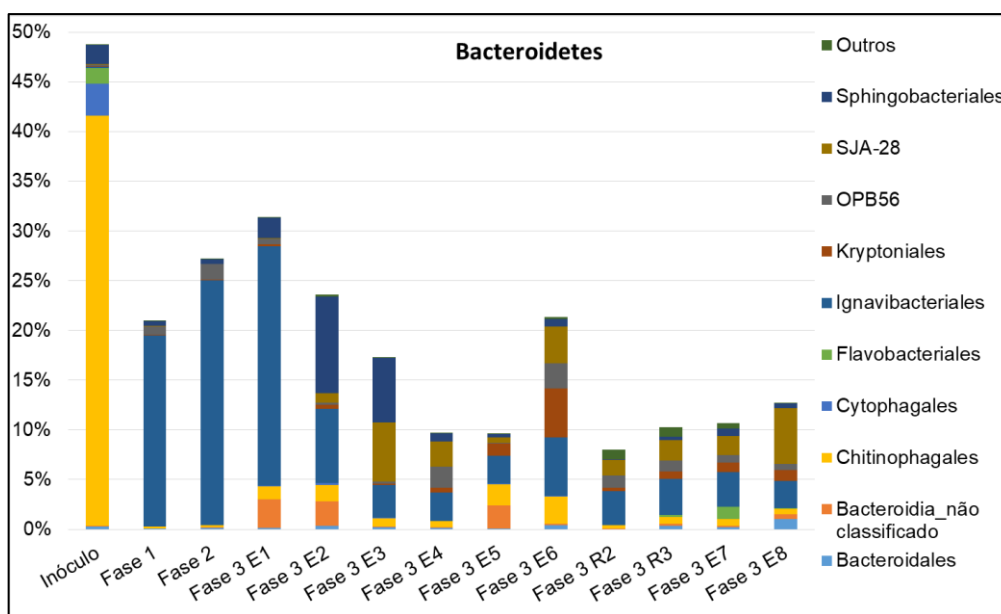


**Figura 6.41** – Ordens mais representativas dentro do Filo Planctomycetes nas amostras do RBS-Lab (ver Tabela 5.9 para detalhamento das amostras)

Bacteroidetes foi um filo bastante abundante, especialmente no inóculo, onde alcançou abundância relativa igual a 48,7% (Figura 6.42). Nesta amostra predominaram micro-organismos da ordem Chitinophagales. Dentro desta ordem, estão incluídos gêneros frequentemente encontrados em lodos ativados como *Terrimonas* (ZHAO *et al.*, 2014), micro-organismo aeróbio estrito, que já foi encontrado em solos contaminados com antraceno, e por isso tem sido sugerido que ele exerce papel na degradação desse composto (ZHANG *et al.*, 2011). *Ferruginibacter* também foi encontrado no inóculo e é um gênero de bactérias aeróbias estritas, heterotróficas e algumas de suas espécies tem sido isoladas de sistemas de tratamentos de efluentes como lodos ativados e *wetlands* (KANG *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2014). O táxon mais abundante no inóculo dentro da ordem Chitinophagales pertence ao gênero *OLB8*, família Saprospiraceae. Pouco se sabe acerca deste gênero, mas micro-organismos desta família também fazem parte da microbiota de sistemas de lodos ativados (XIA *et al.*, 2008; ZHAO *et al.*, 2014).

A ordem mais abundante de *Bacteroidetes* na maioria das amostras do RBS-Lab foi Ignavibacterales que esteve presente em abundâncias relativas variando entre 2,4% e 24,6%. Dentro desta ordem, diversos micro-organismos não classificados e gêneros não descritos estiveram presentes, fazendo parte da microbiota do RBS-Lab (*BSV26*, *OPB56*, *PHOS\_HE36* e *SJA-28*). O gênero *Ignavibacterium* também foi encontrado e é um grupo de bactérias estritamente anaeróbia e heterotrófica e sua presença tem sido reportada em diversos reatores

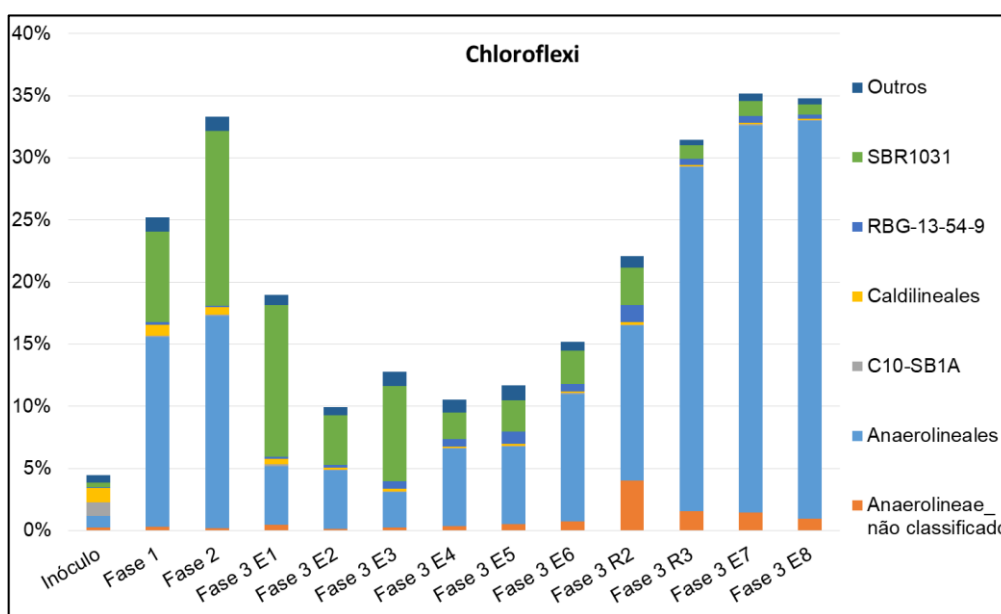
anammox (GONZALEZ-GIL *et al.*, 2015; GONZALEZ-MARTINEZ *et al.*, 2015a; LINO *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2014). Sua presença em reator anammox foi reportada recentemente com função de degradação de proteínas acoplada à redução do nitrato à nitrito. Isso poderia reciclar nitrito (que geralmente é um substrato limitante) a partir de nitrato no reator e ao mesmo tempo, produzir amônio por meio da degradação de aminoácidos, o que seria muito benéfico para as bactérias anammox uma vez que *Ignavibacterium* poderia fornecer dois substratos essenciais para o crescimento das bactérias anammox (LAWSON *et al.*, 2017). A ordem Ignavibacterales tem sido classificada dentro do filo *Chlorobi* como o único membro não-fototrófico pertencente a este filo (LIU *et al.*, 2012). Entretanto, a base de dados utilizada para classificação das sequências obtidas pelo SNG no presente trabalho (SILVA – *Hight quality ribossomal RNA databases*; <https://www.arb-silva.de/browser/ssu-132/AB478415>) classifica o gênero *Ignavibacterium* dentro do filo Bacteroidetes, o que sugere que este micro-organismo pode estar sendo reclassificado.



**Figura 6.42** – Ordens mais representativas dentro do filo Bacteroidetes nas amostras do RBS-Lab (ver Tabela 5.9 para detalhamento das amostras)

Bactérias pertencentes ao filo Chloroflexi também estiveram presentes em elevada abundância (variando de 4,5% a 35,2%) no RBS-Lab (Figura 6.43). Observou-se que a abundância de Chloroflexi foi maior, durante os períodos em que as melhores performances em termos de remoção de nitrogênio no reator foram obtidas (Fases 1, 2 e Fase 3, períodos R2, R3, E7 e E8, com 25,2, 33,3, 22,1, 31,4, 35,2, e 34,8 % de abundância relativa deste filo, respectivamente), sendo que a abundância deste filo diminuiu durante as primeiras estratégias de aeração

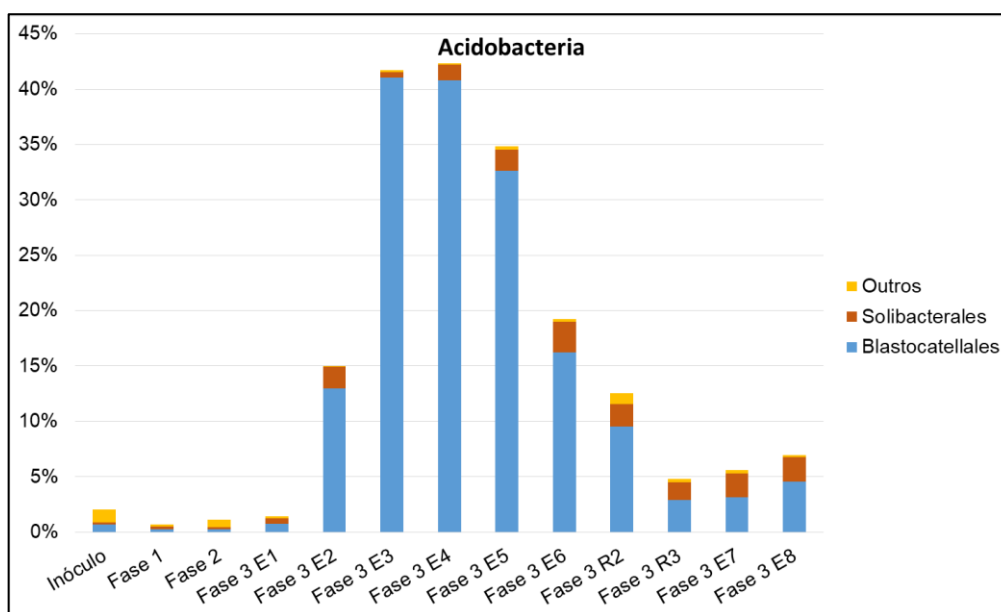
avaliadas (E1 a E6). A ordem dominante na maioria das amostras foi Anaerolineales, seguida da ordem *SBR1031*, que inclui micro-organismos filamentosos identificados inicialmente a partir de um RBS (HUGENHOLTZ *et al.*, 2002). Chloroflexi, está sempre presente em reatores anammox, como pode ser observado nos trabalhos apresentados na Tabela 2.6, do capítulo Revisão de Literatura. Estudos sugerem que esses micro-organismos são importantes em reatores anammox uma vez que são capazes de degradar e utilizar compostos provenientes de células microbianas mortas e metabólitos produzidos por bactérias anammox. Por esse motivo, podem prevenir o acúmulo de resíduos orgânicos nesses sistemas (KINDAICHI *et al.*, 2012). Cao *et al.* (2016a) sugerem que micro-organismos deste filo fazem parte da estrutura de grânulos em reatores anammox.



**Figura 6.43** – Ordens mais representativas dentro do filo Chloroflexi nas amostras do RBS-Lab (Ver Tabela 5.9 para detalhamento das amostras)

Durante as primeiras estratégias de aeração avaliadas no RBS-Lab (E2 a E6), bactérias pertencentes à ordem Blastocatellales, do filo Acidobacteria dominaram o reator, com maior abundância relativa igual a 41,1% durante o período E3 da Fase 3 de operação. Esta ordem inclui membros microaeróbios, quimioheterotróficos capazes de crescer em ambientes com baixa disponibilidade de nutrientes. São capazes de crescer utilizando compostos proteínicos e carboidratos complexos, sendo que pequena faixa de substratos é utilizada para o crescimento. Se desenvolvem principalmente em ambientes com pHs ácidos ou neutros (PASCUAL *et al.*, 2015). A presença de oxigênio e as condições predominantemente ácidas no reator durante os períodos das estratégias de aeração avaliadas, em especial durante E1 até E6 da Fase 3,

provavelmente favoreceram o crescimento desses organismos, que passaram a dominar o RBS-Lab durante estes períodos. A presença de micro-organismos desta ordem tem sido reportada em reatores com NP/A (CHANG *et al.*, 2018; SPETH *et al.*, 2016). Possivelmente estes micro-organismos estão envolvidos na degradação aeróbia da matéria orgânica. Ressalta-se, que durante os períodos das estratégias E3, E4 e E5, foram obtidas as mais elevadas eficiências de remoção de DQO (com medianas entre 70 e 74%; Figura 6.15 b). Ao mesmo tempo, durante estes períodos, houve dominância de micro-organismos da ordem Blastocatellales (Figura 6.44), o que leva a concluir que essas bactérias tiveram papel importante na remoção de DQO durante esses períodos.



**Figura 6.44** – Ordens mais representativas dentro do filo Acidobacteria no RBS-Lab nas amostras (Ver Tabela 5.9 para detalhamento das amostras)

### 6.1.8.3 Principais táxons relacionados ao ciclo do nitrogênio

A Figura 6.45 apresenta um *Heatmap* com os táxons mais abundantes (com mais de 1% de abundância relativa em pelo menos uma das amostras) identificados com potenciais funções dentro do ciclo do nitrogênio.

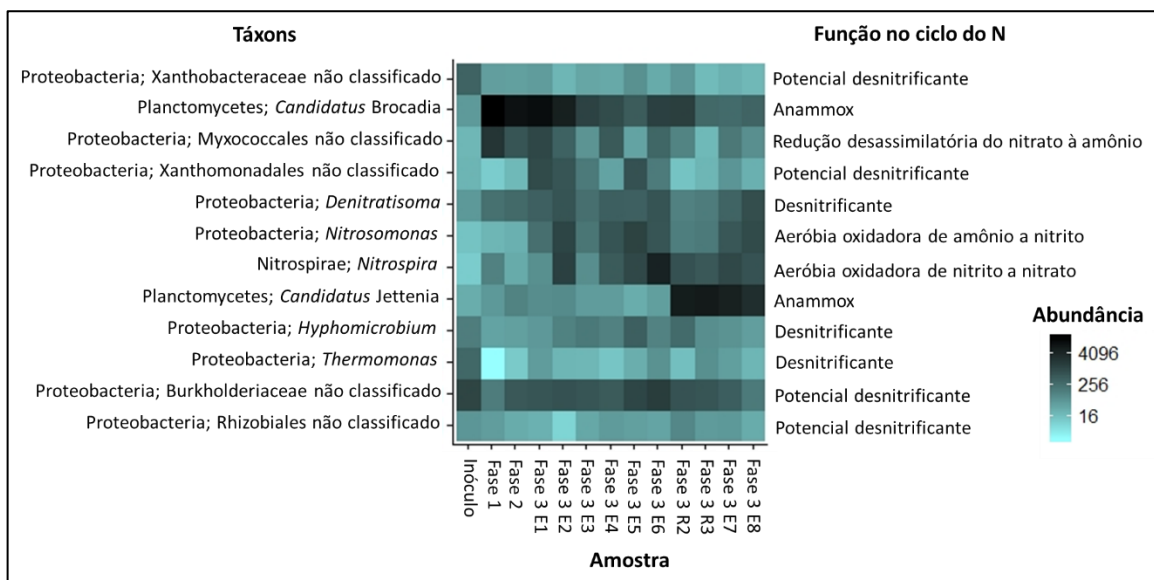
Conforme já discutido anteriormente, bactérias anammox do gênero *Ca. Brocadia* predominaram nos primeiros períodos operacionais do reator (Fase 1 até Fase 3 E6), sendo que a abundância desse micro-organismo diminuiu durante as primeiras estratégias de aeração (de 22,8 % atingindo 0,9 % após E5). Após o período de recuperação (a partir de R2) o gênero *Ca. Jettenia* passou a ser o gênero dominante no RBS-Lab, alcançando 13,5 % durante R3.

A bactéria *Ignavibacterium* esteve presente em elevada abundância (1,1 a 4,8 %) em todos os períodos de operação do RBS-Lab. Essa bactéria pode ter exercido papel fundamental na manutenção das populações de anammox no reator, uma vez que elas podem degradar proteínas, reduzindo o nitrato à nitrito, reciclando, dessa maneira, os substratos essenciais (amônio e nitrito) para o crescimento de bactérias anammox.

A abundância da BOA *Nitrosomonas*, de maneira geral foi maior durante os períodos em que as estratégias de aeração foram avaliadas (E1 a E6; E7 e E8). A BON *Nitrospira*, esteve presente em todos os períodos operacionais, inclusive em alguns períodos em que o reator foi operado em condições anóxicas (Fase 1, Fase 3 R2 e R3), alcançando maior abundância relativa durante a estratégia de aeração E6 da Fase 3 (9,4 %). Nesse período, a adição de alcalinidade pode ter favorecido o crescimento destas bactérias nitrificantes, uma vez que elas utilizam carbono inorgânico como fonte de carbono.

Diversos táxons relacionados a bactérias desnitrificantes heterotróficas estiveram presentes em elevada abundância nas amostras do RBS-Lab, como bactérias não cultivadas pertencentes às ordens Rhizobiales, Xanthomonadales, das famílias Burkholderiaceae, Xanthobacteraceae e bactérias do gênero *Hyphomicrobium* e *Denitratisoma*. Esses micro-organismos exerceram papel importante no reator na remoção de matéria orgânica, além de reduzirem nitrato ou nitrito à nitrogênio gasoso, por meio do processo de desnitrificação. Processos em que a NP/A ocorrem simultaneamente à desnitrificação, são também chamados SNAD (do inglês, *Simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification*) (ZHANG *et al.*, 2017d).

A presença de micro-organismos da ordem Myxococcales sugerem que nitrato pode ter sido reduzido à amônio por esses organismos por meio do processo de redução desassimilatória do nitrato à amônio. A presença dessa ordem pode ter contribuído para o consumo de nitrato e produção de amônio no reator fornecendo esse substrato para bactérias anammox.



**Figura 6.45** – Heatmap com os táxons mais abundantes dentro do ciclo do nitrogênio nas amostras do RBS-Lab (Ver Tabela 5.9 para detalhamento das amostras)

### 6.1.9 Conclusões dos experimentos realizados em escala laboratorial – Etapa 1

Atividade anammox no RBS-Lab foi obtida a partir de aproximadamente 100 dias de operação. Durante esta fase de enriquecimento, mediana de nitrogênio total removido igual a  $81,9 \text{ g N.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$  foi obtida. A remoção de amônio e nitrito ocorreu em proporções bem próximas às da estequiometria proposta para o processo anammox:  $1,35 \text{ mol de N-NO}_2^-$  foi consumido e  $0,26 \text{ mol de N-NO}_3^-$  foi produzido para cada mol de  $\text{N-NH}_4^+$  oxidado.

A aplicação de digestato de resíduo alimentar ao reator, com adição de nitrito, não foi capaz de alterar a performance na remoção de nitrogênio por meio do processo anammox. Durante essa fase,  $77,5 \text{ gN.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$  foram removidos no RBS, sendo que essa carga de nitrogênio removida não foi diferente estatisticamente da carga de nitrogênio removida durante a fase anterior, de enriquecimento, indicando que o reator anammox tem potencial para tratamento de digestato de resíduo alimentar. Adicionalmente, DQO também foi removida nesse período.

Na fase operacional em que de diferentes estratégias de aeração foram avaliadas, foi observada redução nas eficiências de remoção de nitrogênio. Durante as estratégias de aeração E1 a E5, diferentes taxas de ar aplicadas e modos de aeração intermitente e contínuo foram avaliados. Os melhores resultados obtidos, em termos de remoção de nitrogênio total foram encontrados durante as estratégias E3 (aeração intermitente – 15min aeração/30 min anóxico), E4 (aeração intermitente – 15 min aeração/ 45 min anóxico) e E5 (aeração contínua). Em todas estas estratégias foi aplicada taxa de aeração igual a  $0,125 \text{ L.min}^{-1}.\text{L}_{\text{reator}}^{-1}$ . Cargas nitrogenadas

removidas iguais a 17,8, 15,0 e 14,1 gN.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup> foram obtidas durante E3, E4 e E5, respectivamente. Durante estes períodos, observou-se acúmulo de nitrato em todas as estratégias de aeração avaliadas, o que motivou a avaliação da aplicação de menor taxa de ar no reator, com intuito de controlar mais eficientemente o processo de nitrificação. Remoção de DQO foi possível, com maiores eficiências de remoção alcançadas durante E3 e E4, próximo a 70% de eficiência.

A adição de alcalinidade durante o período E6 da Fase 3, não alterou significativamente a remoção de nitrogênio, quando esse período foi comparado com período semelhante (E4) em que não foi adicionada solução contendo carbono inorgânico.

Novas estratégias de aeração com menor taxa de ar aplicada (0,026 L.min<sup>-1</sup>.L<sub>reator</sub><sup>-1</sup>) foram avaliadas em E7 (intermitente- 15 min aeração/ 45 min anóxico) e E8 (intermitente – 15 min aeração/ 30 min anóxico). Entretanto, quando estas estratégias foram comparadas às estratégias semelhantes (E4 e E3), porém, com maior taxa de ar aplicada (0,125 L.min<sup>-1</sup>.L<sub>reator</sub><sup>-1</sup>) não foram identificadas diferenças significativas na remoção de nitrogênio total. Não obstante, menores concentrações de nitrato foram produzidas no reator durante E7 e E8, com valores de coeficientes de produção de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ consumo de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> mais próximos aos relatados na literatura para o processo de NP/A, iguais a 0,17 e 0,21, respectivamente. Portanto, os resultados obtidos indicam que estratégias de aeração que utilizam aeração intermitente com maiores períodos anóxicos em relação aos aerados, aliados a baixas vazões de ar aplicadas são mais eficientes para o controle do processo de nitrificação parcial e anammox.

A presença de bactérias anammox foi confirmada por meio de todas as técnicas utilizadas para a análise de comunidades microbianas. A técnica de qPCR demonstrou que a abundância de bactérias anammox diminuiu quando as estratégias de aeração foram avaliadas, entretanto, aumentou após o período de recuperação do reator. Tanto a técnica de PCR-DGGE quanto o SNG revelaram que *Ca. Brocadia* foi o gênero de bactérias anammox dominante da Fase 1 até o período E6 da Fase 3. Esse gênero foi substituído por *Ca. Jettenia* a partir do período de recuperação da Fase 3 e predominou até o final do experimento, sugerindo que existem nichos bem definidos para diferentes grupos de bactérias anammox. Uma das hipóteses para esta substituição está baseada no fato de que o gênero *Ca. Jettenia* é capaz de utilizar compostos orgânicos como doador de elétrons, realizando a redução desassimilatória do nitrato a amônio e por esse motivo, foi o gênero enriquecido durante o período de recuperação, em que o reator

foi inicialmente alimentado com digestato de resíduo alimentar suplementado com nitrito, substituindo o gênero *Ca. Brocadia*.

Além de Planctomycetes, filo em que as bactérias anammox estão incluídas, outros grupos como Proteobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes e Chloroflexi foram abundantes no RBS-Lab. Muitos micro-organismos pertencentes a esses filos exercem papéis importantes no ciclo do nitrogênio e na degradação de compostos orgânicos. Além de bactérias anammox foram encontradas bactérias nitrificantes (como *Nitrosomonas*, *Nitrobacter* e *Nitrospira*) e desnitrificantes, que exercem funções bem conhecidas em reatores com NP/Anammox. Ademais, outros micro-organismos que podem ter funções igualmente importantes estiveram presentes. Por exemplo, a bactéria *Ignavibacterium*, encontrada em elevada abundância nas amostras do reator, parece estar relacionada à reciclagem de nitrito a partir de nitrato em reatores com NP/A, o que poderia impulsionar a atividade de bactérias anammox nesses reatores, uma vez que o nitrito é geralmente um substrato limitante.

A introdução de aeração no RBS-Lab alterou a comunidade microbiana, especialmente, quando maiores taxas de aeração foram aplicadas (de E1 a E6) reduzindo a abundância de bactérias anammox e de bactérias do filo Chloroflexi e aumentando a população de micro-organismos aeróbios, como *Nitrosomonas* e bactérias pertencentes à ordem Blastocatellales, por exemplo, que são aeróbios heterotróficos e possivelmente estiveram envolvidos na remoção de matéria orgânica durante os primeiros períodos de aeração do reator.

## **6.2 Experimentos realizados durante a Etapa 2 da pesquisa**

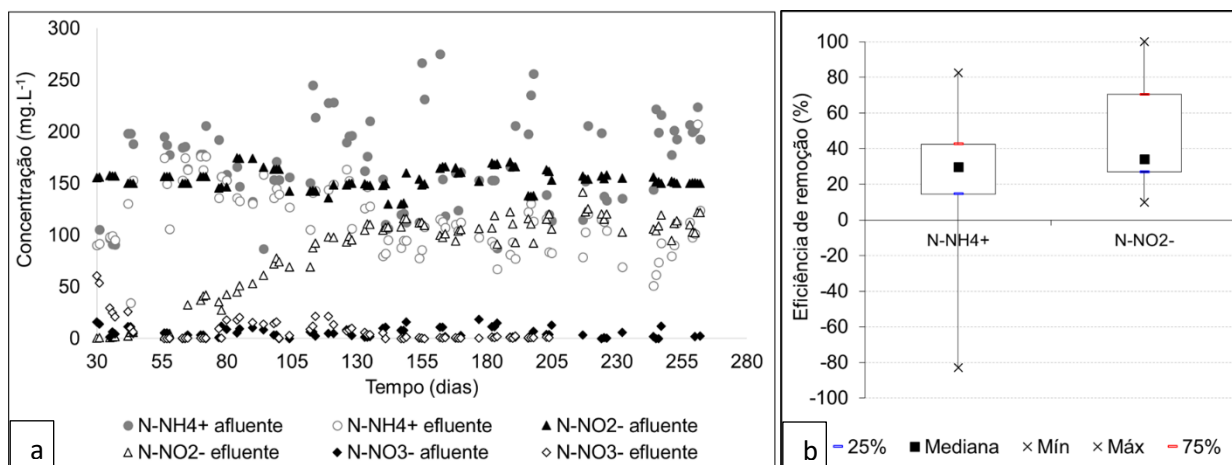
### **6.2.1 Enriquecimento de bactérias anammox em RBS em escala piloto alimentado com digestato de resíduo alimentar e suplementado com nitrito**

Após a inoculação do RBS-Piloto, durante os trinta primeiros dias de operação, o reator foi alimentado apenas com solução contendo nitrato ( $\text{NaNO}_3$ ) diariamente, de modo que a concentração de  $\text{N-NO}_3^-$  no interior do reator permanecesse em torno de  $20 \text{ mg.L}^{-1}$ . A adição desta solução objetivou estimular o processo de desnitrificação heterotrófica, com intuito de degradar parte da matéria orgânica presente no lodo de inóculo. A mediana efluente da concentração de  $\text{N-NO}_3^-$  foi igual a  $1,75 \text{ mg.L}^{-1}$ , indicando intenso consumo deste composto no reator.

A partir dos 30 dias de operação o reator foi alimentado com digestato de resíduo alimentar diluído quatro vezes e suplementado com solução de nitrito de sódio, com concentração em torno de  $150 \text{ mg.L}^{-1}$ . O reator foi operado durante aproximadamente 260 dias em condições anóxicas.

A Figura 6.46 apresenta os resultados das concentrações afluentes e efluentes dos compostos nitrogenados monitorados no RBS-Piloto e a estatística descritiva das eficiências de remoção de  $\text{N-NH}_4^+$  e  $\text{N-NO}_2^-$ . A estatística descritiva dos resultados também é apresentada na Tabela A14 do Apêndice E.

Durante os primeiros 100 dias de operação a remoção do íon amônio foi baixa, sendo que em algumas situações as concentrações de nitrogênio amoniacal efluentes foram maiores que as concentrações afluentes, resultando em eficiências negativas de remoção (Figura 6.46 b). Isso é reportado em diversos trabalhos que envolvem o enriquecimento de bactérias anammox, geralmente durante a partida dos reatores, devido ao processo de amonificação que pode ocorrer em decorrência da morte e lise de células microbianas no reator. A partir de 100 dias de operação, foi observado um ligeiro aumento nas eficiências de remoção de nitrogênio amoniacal, entretanto, o reator não demonstrou estabilidade na remoção desse composto. Vale ressaltar que as concentrações de  $\text{N-NH}_4^+$  afluentes variaram consideravelmente ao longo da operação do reator, de  $71,3$  até  $275,4 \text{ mg.L}^{-1}$  o que pode ter contribuído para a instabilidade na remoção desse composto. De 30 a aproximadamente 60 dias de operação, o  $\text{N-NO}_2^-$  foi intensamente consumido no reator, sendo que a partir de 60 dias o consumo diminuiu, indicando que a atividade de desnitrificação começou a diminuir a partir desse período. Nitrito se acumulou no reator, resultando em uma baixa eficiência de remoção desse composto. Considerando o período de operação do reator, a partir do momento em que efluente mais nitrito começou a ser adicionado (a partir dos 30 dias), foram obtidas eficiências de remoção medianas iguais a 30% e 34%, respectivamente, para o nitrogênio amoniacal e nitroso. Nitrato não foi adicionado ao reator durante esse período e suas concentrações foram relativamente baixas no afluente ao RBS-Piloto (com medianas iguais a  $4,6 \text{ mg.L}^{-1}$ ). As concentrações efluentes, foram igualmente baixas, com valor mediano igual a  $1,3 \text{ mg.L}^{-1}$  (Figura 6.46a; Tabela A14).



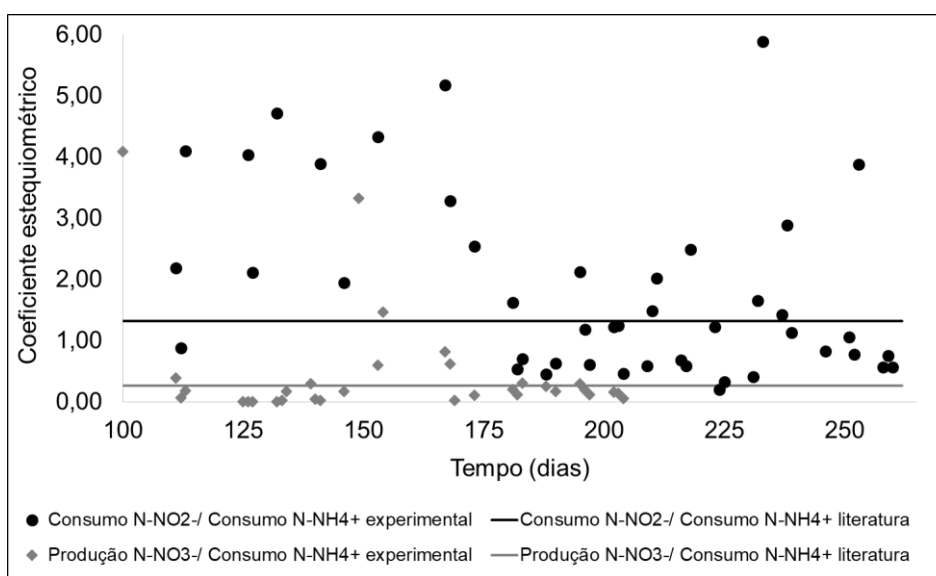
**Figura 6.46** – Dinâmica dos compostos nitrogenados (a) e eficiências de remoção de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (b) durante a operação do RBS-Piloto.

Os coeficientes estequiométricos para o consumo de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/ consumo de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e produção de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ consumo de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> foram calculados e são apresentados na Figura 6.47. Para o cálculo dos coeficientes, foram considerados apenas os resultados obtidos a partir dos 100 dias de operação, uma vez que, a partir desse período não foram observados eventos de eficiências negativas de remoção do íon amônio. Considerando todo o período avaliado (a partir dos 100 dias de operação), as medianas obtidas para o consumo de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/ consumo de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e produção de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ consumo de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> foram iguais a 0,69 e 0,03, respectivamente. Ambos abaixo do esperado para a reação anammox (Tabela A14).

Considerando que o processo anammox foi a única via para a remoção do íon amônio no reator, uma vez que o mesmo foi operado em condições anóxicas durante todo o tempo de operação, a ocorrência de outros processos como a amonificação poderia justificar o menor coeficiente obtido para o consumo de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/ consumo de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Observou-se ao longo da operação do RBS-Piloto, períodos com elevadas concentrações de DQO total efluentes, em alguns momentos, atingindo concentrações maiores que as afluentes, como é apresentado adiante. Isso pode indicar a ocorrência de morte celular com liberação de compostos orgânicos e nitrogenados celulares provenientes de morte de parte da biomassa. Dessa forma o nitrogênio orgânico liberado possivelmente foi transformado em N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> por meio do processo de amonificação. O menor valor para o N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> produzido/ N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> consumida pode ser atribuído à ocorrência de desnitrificação heterotrófica.

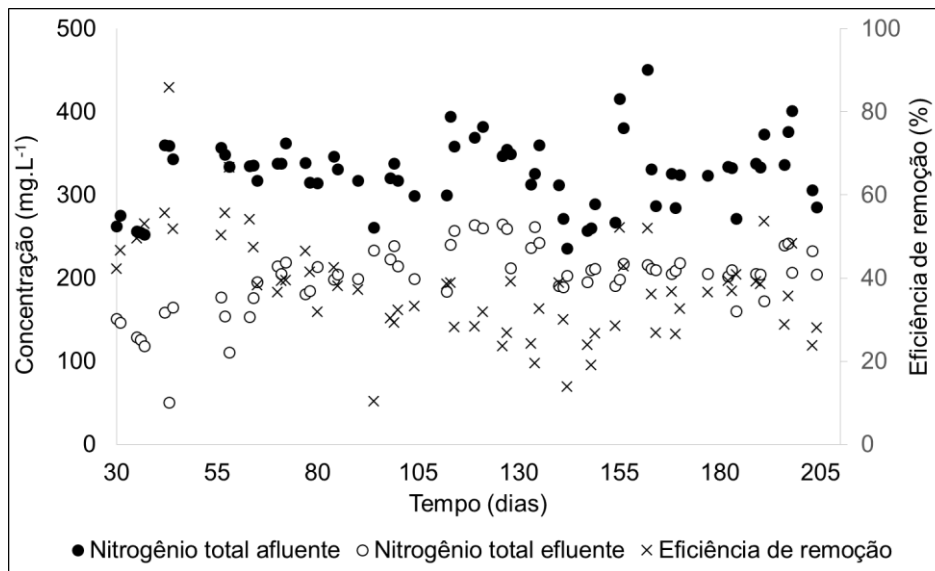
De maneira geral, os coeficientes estequiométricos começaram a se aproximar aos coeficientes reportados na literatura para o processo anammox, a partir dos 175 dias de operação (Figura

6.47). Por meio das análises microbiológicas, observou-se que aos 182 dias de operação, foi obtida a maior abundância de bactérias anammox, dentre todas as amostras avaliadas deste reator, tanto por meio da técnica de qPCR ( $5,92 \times 10^5$  n° de cópias.g lodo<sup>-1</sup>) quanto por meio do SNG, com 3,9 % de abundância relativa da bactéria anammox *Ca. Anammoximicrobium*, gênero de anammox enriquecido neste reator, como é apresentado nos itens 6.2.3 e 6.2.4. Estes resultados sugerem o início de atividade anammox no reator, entretanto, ainda assim os coeficientes estequiométricos divergiram dos reportados na literatura para a oxidação anaeróbia da amônia (Figura 6.47).

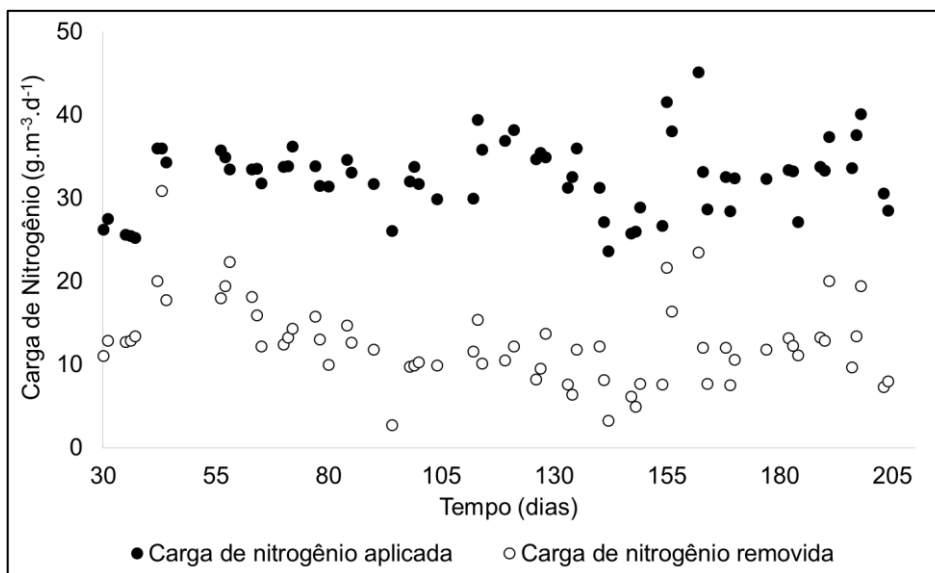


**Figura 6.47** – Coeficientes estequiométricos para o consumo de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> / Consumo de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e Produção de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> / Consumo de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> durante a operação do RBS-Piloto

As Figuras 6.48 e 6.49 apresentam as concentrações afluentes e efluentes de nitrogênio total (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> + N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e as cargas nitrogenadas aplicadas e removidas até os 205 dias de operação. As concentrações afluentes de nitrogênio total variaram de 253,2 a 451,3 mg.L<sup>-1</sup>, sendo que o reator foi capaz de remover 38% do nitrogênio afluente (Figura 6.48), resultando em carga nitrogenada removida com mediana igual a 12,2 gN.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup> (Figura 6.49; Tabela A14).



**Figura 6.48** – Concentrações afluentes, efluentes e eficiências de remoção de nitrogênio total no RBS-Piloto.



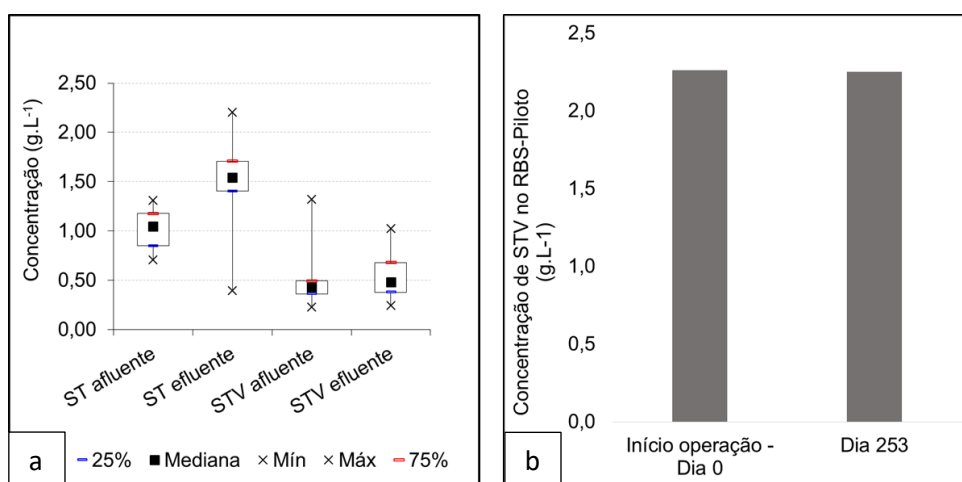
**Figura 6.49** – Cargas de nitrogênio aplicadas e removidas no RBS-Piloto.

A baixa remoção de nitrogênio obtida no reator está associada ao fato do processo de enriquecimento de bactérias anammox ter se dado por meio da alimentação do reator com efluente real (digestato de resíduo alimentar). Ou seja, a biomassa inoculada no reator (proveniente de sistemas de lodos ativados de estação de tratamento de esgotos domésticos) não passou por processo de aclimação e seleção com meio de cultura mineral e autotrófico, como ocorreu no reator em escala laboratorial. Experiências com reatores em escala real demonstraram que foi necessário longo tempo para obtenção de estabilidade na remoção de nitrogênio por meio do processo anammox. Van der Star *et al.* (2007) relataram que foram

necessários mais de dois anos para *start-up* de reator anammox de 70 m<sup>3</sup> de volume alimentado com digestato de lodo de estação de tratamento. De acordo com estes pesquisadores, somente após os primeiros 530 dias de operação foi possível observar alguma conversão de amônia, em torno de 20 gN.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>. E durante todo esse período de operação não foi observada significativa produção de nitrato. Ressalta-se que a este reator, foi adicionado, por diversas vezes, volumes variando de 24 a 500 L de lodo anammox enriquecido, totalizando 9,6 m<sup>3</sup> de lodo anammox, prática que não foi adotada no presente trabalho, devido à baixa disponibilidade de biomassa enriquecida para a inoculação de novos reatores.

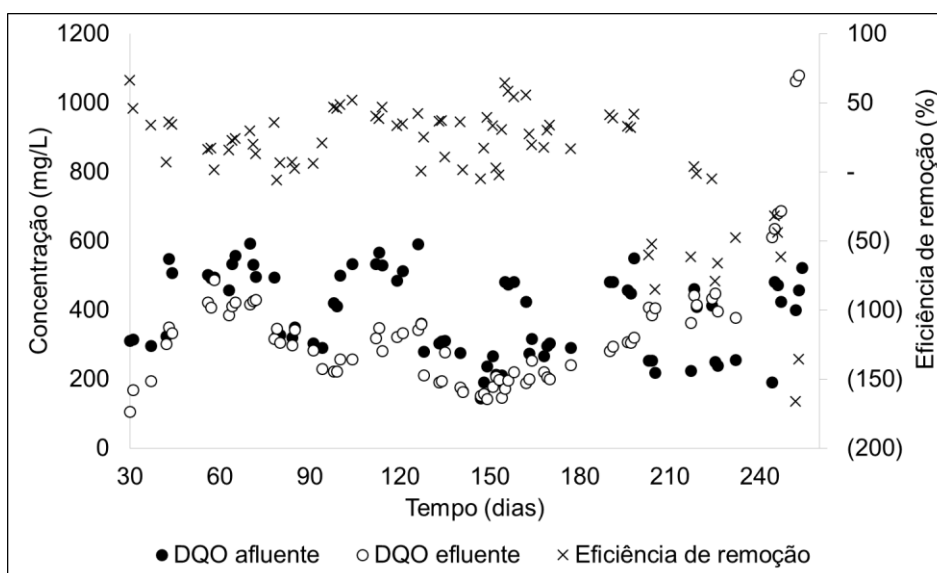
Van der Star *et al.* (2007) obtiveram, a partir de 800 dias de operação, cargas nitrogenadas removidas aumentadas gradativamente, além de crescimento considerável no n<sup>o</sup> de cópias de bactérias anammox. mL<sup>-1</sup> de lodo, conforme avaliado por qPCR. Após dois anos e meio de *start-up*, esse reator alcançou cargas de nitrogênio removidas iguais a 7,5 KgN.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>. E o lodo excedente tem sido utilizado para *start-up* de diversos reatores anammox.

Estatística descritiva das concentrações afluentes e efluentes de ST e STV no RBS-Piloto é apresentada na Figura 6.50 a. Observou-se que houve perda de ST com o efluente do RBS-Piloto. Com relação às concentrações de STV as medianas foram bem semelhantes, na entrada e saída do reator. No interior do reator, não houve alteração na concentração de biomassa ao longo dos 253 dias de operação, uma vez que a concentração inicial de STV no início da operação foi igual a 2,26 g.L<sup>-1</sup> e aos 253 dias foi semelhante, igual a 2,25 g.L<sup>-1</sup> como é apresentado na Figura 6.50b. A relação A/M foi estimada de acordo com a Equação 6.1 e foi igual a 0,01 g N. gSTV<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> para o RBS-Piloto.



**Figura 6.50** - Concentrações afluentes e efluentes de ST e STV (a) e concentração de STV no interior do RBS-Piloto no dia 0 e 253 de operação (b).

O monitoramento da DQO total no afluente e efluente do RBS-Piloto indicou que as eficiências de remoção de matéria orgânica alcançadas foram baixas no reator (Figura 6.51; Tabela A15, Apêndice E). As concentrações de DQO afluentes foram bastante variáveis, de 144,3 a 593,1 mg.L<sup>-1</sup>. Considerando todo o período de operação, a eficiência mediana de remoção de DQO foi igual a 21%. Entretanto, após o dia 205 de operação, as eficiências de remoção desse composto diminuíram substancialmente, atingindo valores negativos.



**Figura 6.51** – Concentrações afluentes, efluentes e eficiências de remoção de DQO total no RBS-Piloto

Fatores associados a problemas operacionais da plataforma de tratamento de resíduos, que impediram a alimentação regular do RBS-Piloto, podem ter favorecido a instabilidade tanto na remoção de DQO, quanto na remoção de nitrogênio. Em diversas ocasiões o digestor anaeróbio não foi alimentado por problemas relacionados ao transporte dos resíduos, inviabilizando a alimentação do RBS-Piloto. Próximo ao 200º dia de operação, problemas relacionados à colmatação nos leitos de secagem ocorreram, impedindo a alimentação do RBS-Piloto pelo período de uma semana. Poucos dias após, aos 227 dias de operação, problemas com o triturador de resíduo alimentar impediu a alimentação do digestor por mais duas semanas, impedindo, novamente a alimentação regular do RBS-Piloto durante esse período. A falta de alimentação do reator pode ter ocasionado a morte de micro-organismos com consequentes perdas de matéria orgânica e nitrogênio com o efluente.

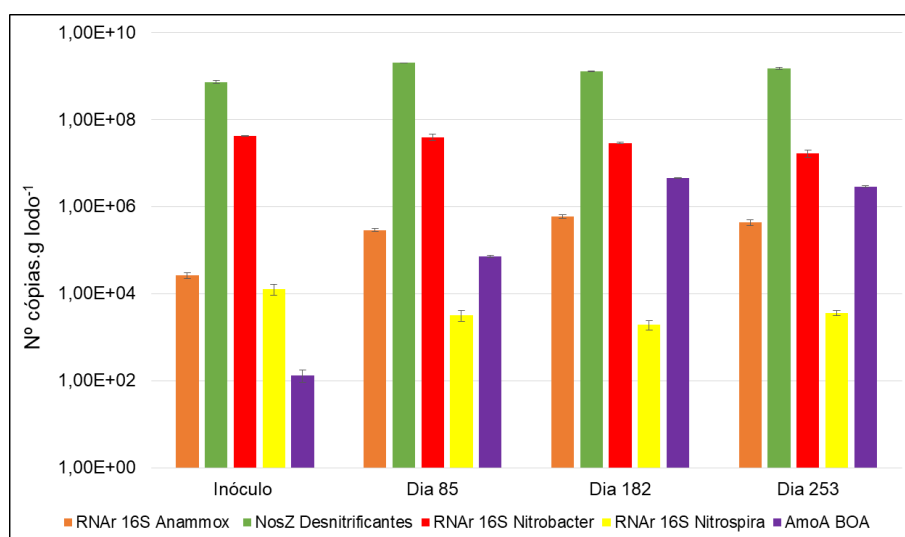
Com relação ao carbono inorgânico, de maneira geral, houve baixo consumo no RBS-Piloto (Tabela 6.12), sendo que as medianas das concentrações afluentes e efluentes foram relativamente próximas, iguais a 668,7 e 619,2 mg CaCO<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

**Tabela 6.12** - Estatística descritiva das concentrações afluentes e efluentes de alcalinidade (mg CaCO<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup>)

	Alcalinidade afluente (mg CaCO <sub>3</sub> .L <sup>-1</sup> )	Alcalinidade efluente (mg CaCO <sub>3</sub> .L <sup>-1</sup> )
Nº de dados	14	14
Média (DP)	696,4 (234,8)	658,8 (211,6)
Mediana	668,7	619,2
Mínimo	364,8	327,5
Máximo	1079,0	944,6
Percentil 25%	499,2	513,6
Percentil 75%	880,3	859,2

### 6.2.2 Determinação da abundância dos grupos de bactérias do ciclo do nitrogênio por qPCR no RBS em escala piloto

A abundância de bactérias do ciclo do nitrogênio foi estimada por qPCR ao longo da operação do RBS-Piloto (Figura 6.52). Na Tabela A16 do Apêndice F são apresentadas as eficiências das reações, o valor do *Threshold*, as curvas padrão e o coeficiente R<sup>2</sup> para todas as reações de qPCR realizadas.



**Figura 6.52** – Abundância dos genes de bactérias do ciclo do nitrogênio obtidos por qPCR nas amostras do RBS-Piloto

A abundância de bactérias anammox aumentou no RBS piloto ao longo dos 85 dias de operação, da ordem de  $10^4$  para  $10^5$  n° cópias.g lodo<sup>-1</sup>. A concentração de bactérias anammox se manteve nessa ordem de grandeza até o final do experimento (253 dias). Em comparação com o RBS-Lab, a abundância de bactérias anammox no reator piloto foi menor (Figura 6.32). No RBS-Lab, ao final da fase de enriquecimento (273 dias de operação), que foi realizado por meio da adição de meio de cultura mineral e autotrófico, a abundância de bactérias anammox era da ordem de  $10^8$  n° cópias. g lodo<sup>-1</sup>. Essas diferenças obtidas durante o *start up* dos dois reatores (Laboratorial e Piloto) evidenciam as dificuldades em se obter culturas com elevadas concentrações de bactérias anammox em maiores escalas a partir de inóculos não enriquecidos previamente. No experimento conduzido por Van der Star *et al.* (2007), em que reator em escala plena foi inoculado com lodo nitrificante, foi observado que ao longo dos primeiros 250 dias de operação, as concentrações do gene RNAr 16S de bactérias anammox variaram entre  $10^4$  a  $10^6$  n° de cópias.mL<sup>-1</sup> de lodo, valores próximos aos obtidos no presente trabalho.

Bactérias desnitrificantes estiveram presentes ao longo de todo o período de operação do RBS-Piloto em elevada abundância, o que foi evidenciado pela abundância do gene *NosZ* que permaneceu em torno de  $10^9$  n° de cópias.g lodo<sup>-1</sup> nas amostras coletadas no reator aos 85, 182 e 253 dias de operação. Assim como no RBS-Lab, as bactérias desnitrificantes foram mais abundantes em todas as amostras avaliadas no RBS-Piloto. A presença de matéria orgânica e de nitrito e nitrato no efluente que alimentou o reator, podem justificar a elevada concentração dos micro-organismos desnitrificantes. Ademais, uma ampla gama de micro-organismos é capaz de realizar a desnitrificação heterotrófica completa, o que também justifica a presença do gene *nosZ* em elevada abundância no RBS-Piloto.

Assim como foi observado durante as fases anaeróbias de operação do RBS-Lab em que houve adição de nitrito, no RBS-Piloto, que foi operado sob estas mesmas condições ao longo de todo o tempo, predominaram populações de *Nitrobacter* (com valores da ordem de  $10^7$  n° de cópias.g lodo<sup>-1</sup>) em relação à de *Nitrospira* ( $10^3$  n° de cópias.g lodo<sup>-1</sup>). A presença de elevadas concentrações do substrato nitrito, pode ter permitido a sobrevivência desses micro-organismos no interior do reator, uma vez que ele é considerado r-estrategista e tende a se desenvolver melhor em ambientes com elevadas concentrações de substratos.

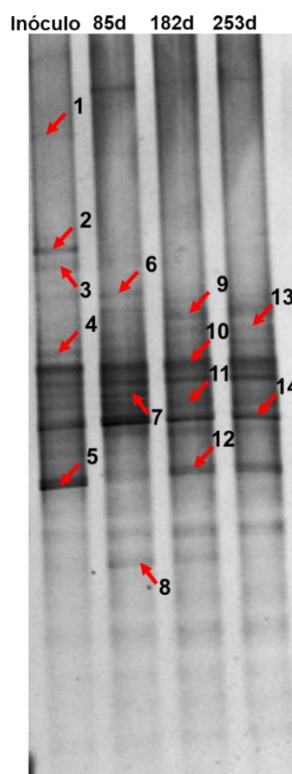
O gene *amoA* de BOA também foi encontrado, sendo que após a inoculação do reator as concentrações desse gene tenderam a aumentar de  $10^2$  no inóculo para  $10^6$  na amostra coletada aos 253 dias de operação. O RBS-Piloto foi operado em condições anóxicas e medições da

concentração de oxigênio dissolvido realizadas, demonstraram que concentrações próximas de 0 mg.L<sup>-1</sup> eram predominantes no mesmo. Apesar disso, foram observadas populações de bactérias nitrificantes aeróbias no reator, o que também já foi observado em outros reatores anammox operados sob condições de anoxia (COSTA *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2014). Li *et al.* (2009) e Zhang (2014) apontam que algumas espécies de *Nitrosomonas* são capazes de desenvolver metabolismo de oxidação anaeróbia da amônia utilizando o dióxido de nitrogênio como aceptor de elétrons, em condições anóxicas ou microaeróbias.

### **6.2.3 Análise do perfil da comunidade microbiana do RBS em escala piloto por PCR-DGGE**

#### **6.2.3.1 PCR-DGGE do domínio Bacteria**

Os perfis das comunidades microbianas obtidos por PCR-DGGE ao longo da operação do RBS-Piloto são apresentados na Figura 6.53. A identificação das bandas que foram excisadas do gel e sequenciadas é apresentada na Tabela 6.12. De maneira geral, os perfis obtidos, em especial das amostras coletadas do RBS-Piloto aos 85, 182 e 253 dias de operação foram similares (Figura 6.54).



**Figura 6.53** – Perfis obtidos por PCR-DGGE para o Domínio Bacteria no RBS-Piloto. As setas em vermelho indicam as bandas que foram excisadas do gel e sequenciadas.

**Tabela 6.13** – Identificação das bandas do DGGE de *Bacteria* do RBS-Piloto de acordo com as bases de dados RDP *Classifier* e *GenBank*.

Banda	Organismo mais próximo (RDP <i>Classifier</i> )	Organismo mais próximo ( <i>GenBank</i> )	Identidade (%)	Nº de acesso
1	Bacteria	<i>Xanthomonas translucens</i>	98	GU902285.1
2	Saccharibacteria	<i>Candidatus</i> Saccharibacteria	94	AB861999.1
3	Saccharibacteria	<i>Candidatus</i> Saccharibacteria	95	AB861999.1
4	Bacteria	<i>Candidatus</i> Saccharibacteria	88	AB862034.1
5	<i>Gordonia</i>	<i>Gordonia amarae</i>	99	AB862159.1
6	Bacteria	Bacteroidetes não cultivado	87	KP717530.1
7	Bacteria	Chloroflexi não cultivado	89	CU921446.1
8	Bacteria	Planctomycetaceae	90	KM100462.1
9	Anaerolinaceae	Chloroflexi não cultivado	94	CU922265.1
10	Bacteria	Anaerolinaceae não cultivado	82	HQ075889.1
11	Bacteria	Chloroflexi não cultivado	95	CU921446.1
12	Bacteria	Gemmatimonadetes	91	AY922119.1
13	Bacteria	Chloroflexi não cultivado	89	CU923317.1
14	Bacteria	Chloroflexi não cultivado	98	CU921446.1

Dentre os micro-organismos identificados no inóculo está a proteobactéria pertencente à espécie *Xanthomonas translucens*, bactéria patogênica que causa doença em plantas (LANGLOIS *et al.*, 2017). A banda 1 teve 98% de identidade com sequência desse micro-organismo. Essa banda foi identificada apenas na amostra do inóculo. As bandas 2, 3 e 4 estão relacionadas a bactérias pertencente ao filo *Ca. Sacharibacteria*, anteriormente classificadas como candidatos à divisão TM7. A banda 4 esteve presente em todas as amostras avaliadas. Esses organismos são comuns em sistemas de lodos ativados (FERRARI *et al.*, 2015). A banda 5, presente exclusivamente no inóculo, assim como no caso do RBS-Lab, está associada ao actinomiceto *Gordonia amarae*.

Bactérias do filo Chloroflexi predominaram no RBS-Piloto, sendo encontradas diversas bandas relacionadas à micro-organismos desse filo (Bandas 7, 9, 10, 11, 13 e 14). Algumas dessas bandas (10 e 14) apareceram com bastante intensidade e estiveram presentes em todas as amostras, do inóculo e RBS-Piloto. A importância desses micro-organismos em reatores anammox já foi discutida nos itens 6.1.6 e 6.1.7.

A banda 8 teve 90% de identidade com sequência de micro-organismo da família Planctomycetaceae. Esta banda esteve presente apenas nas amostras do RBS com 85 e 182 dias de operação. Embora a maioria dos micro-organismos anammox sejam classificados dentro da família Brocadiaceae, um dos gêneros descritos, descoberto na Rússia, *Ca. Anammoximicrobium* é estreitamente relacionado com o planctomiceto *Pirellula staleyi* e pertence à família Planctomycetaceae. A banda 8 pode estar relacionada a essa bactéria anammox, uma vez que por meio da análise da PCR-DGGE específica para bactérias anammox foram encontradas diversas bandas relacionadas à micro-organismos da ordem Planctomycetales (como será discutido no item 6.2.3.2), assim como o sequenciamento de nova geração demonstrou que o gênero de anammox predominante no RBS-Piloto foi *Ca. Anammoximicrobium* (Item 6.2.4).

A banda 12 foi associada ao filo Gemmatimonates e esteve presente em todas as amostras coletadas do reator. Esse filo, foi identificado pela primeira vez em amostra de RBS aeróbio/anóxico em sistema de tratamento de efluente em condições para remoção de fósforo. Seu representante mais conhecido é a espécie *Gemmatimonas aurantica*, bactéria aeróbia, gram-negativa capaz de acumular polifosfato (ZHANG, 2003). A concentração de fosfatos não foi monitorada no afluente e efluente dos reatores no presente trabalho. Entretanto, é sabido que efluentes provenientes da digestão anaeróbia de resíduos orgânicos, geralmente contêm

elevadas concentrações de fosfatos (DE LA RUBIA *et al.*, 2010). Isso justificaria o crescimento desses micro-organismos no RBS-Piloto.

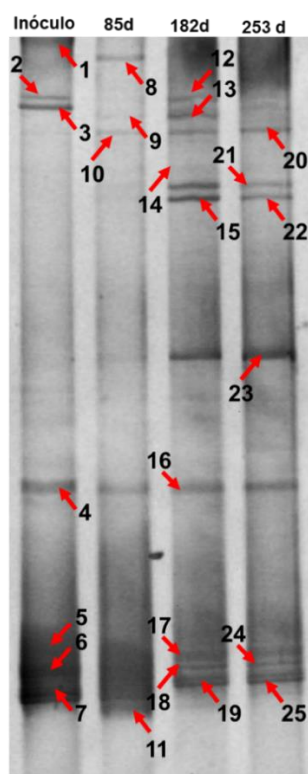
O dendrograma construído para os perfis do gel de DGGE do domínio Bacteria mostrou que as amostras do RBS-Piloto (85, 182 e 253 dias) apresentaram perfis bastante similares entre si, com 84,7% de similaridade (Figura 6.54). Estas amostras, por sua vez, diferiram do inóculo, com 40,6% de divergência. Dentre as amostras do RBS-Piloto, as que apresentaram maior similaridade entre si, foram as duas últimas (182 e 253 dias) com 91,7%. Assim, no RBS-Piloto, a comunidade bacteriana parece não ter sofrido alterações muito expressivas ao longo do tempo de operação.



**Figura 6.54** – Dendrograma obtido para o perfil de bandas do RBS-Piloto por meio da PCR-DGGE do Domínio Bacteria (coeficiente de similaridade de Dice e método de agrupamento UPGMA)

#### 6.2.3.2 PCR-DGGE de bactérias anammox

Os perfis obtidos por meio da análise de PCR-DGGE específica para bactérias anammox é apresentado na Figura 6.55 e a identificação das bandas sequenciadas na Tabela 6.14.



**Figura 6.55** – Perfis obtidos por PCR-DGGE para bactérias anammox no RBS-Piloto. As setas em vermelho indicam as bandas que foram excisadas do gel e sequenciadas.

**Tabela 6.14** – Identificação das bandas do DGGE de bactérias anammox do RBS-Piloto de acordo com as bases de dados RDP Classifier e GenBank

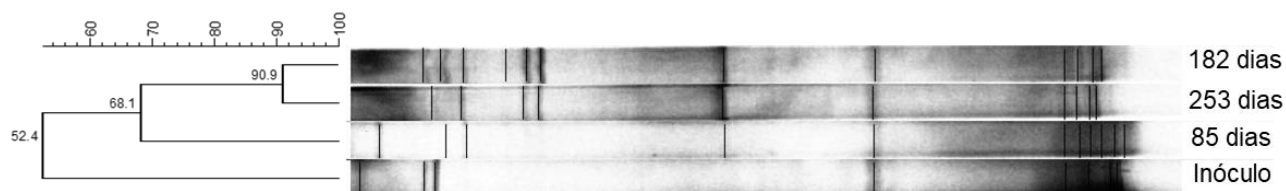
Banda	Organismo mais próximo (RDP Classifier)	Organismo mais próximo (GenBank)	Identidade (%)	Nº de acesso
1	Bacteria	<i>Candidatus Brocadia</i>	98	KY399802.1
2	Bacteria	<i>Candidatus Brocadia fulgida</i>	98	KM925898.1
3	Bacteria	<i>Candidatus Brocadia fulgida</i>	97	KM925898.1
4	Brocadiaceae	<i>Candidatus Brocadia</i>	100	KY399802.1
5	Brocadiaceae	<i>Candidatus Brocadia</i>	100	KY399802.1
6	Brocadiaceae	<i>Candidatus Brocadia</i>	100	KY399802.1
7	Brocadiaceae	<i>Candidatus Brocadia</i>	100	KY399802.1
8	Brocadiaceae	<i>Candidatus Brocadia fulgida</i>	98	KU217695.1
9	Bacteria	<i>Candidatus Brocadia fulgida</i>	98	KU217695.1
10	Planctomycetia	<i>Planctomycetales</i> não cultivado	99	KC565685.1
11	Brocadiaceae	<i>Candidatus Kuenenia</i>	99	KY399805.1
12	Planctomycetia	<i>Planctomycetales</i> não cultivado	98	HM775407.1
13	Planctomycetia	<i>Planctomycetales</i> não cultivado	98	HM775407.1

/Continua

Banda	Organismo mais próximo (RDP Classifier)	Organismo mais próximo (GenBank)	Identidade (%)	Nº de acesso
14	Planctomycetia	Planctomycetales não cultivado	100	HM775407.1
15	Planctomycetia	Planctomycetales não cultivado	100	HM775407.1
16	Planctomycetia	Planctomycetales não cultivado	98	HM775407.1
17	Planctomycetia	Planctomycetales não cultivado	100	HM775407.1
18	Planctomycetia	Planctomycetales não cultivado	100	HM775407.1
19	Planctomycetia	Planctomycetales não cultivado	100	HM775407.1
20	Planctomycetia	Planctomycetales não cultivado	98	GU084014.1
21	Planctomycetia	Planctomycetales não cultivado	100	HM775407.1
22	Planctomycetia	Planctomycetales não cultivado	100	HM775407.1
23	Bacteria	Planctomycetales não cultivado	93	JQ919107.1
24	Planctomycetia	Planctomycetales não cultivado	100	HM775407.1
25	Planctomycetia	Planctomycetales não cultivado	100	HM775407.1

Todas as bandas sequenciadas que foram encontradas na canaleta referente ao inóculo foram identificadas como sendo bactérias anammox do gênero *Ca. Brocadia* (Bandas 1 a 7), sendo que as bandas 1 e 2 tiveram respectivamente 98 e 97% de identidade com *Ca. Brocadia fulgida*. Bandas relacionadas a essa mesma espécie apareceram também na amostra coletada aos 85 dias de operação (Bandas 8 e 9), mas essa banda parece não estar presente nas duas últimas amostras avaliadas (182 e 253 dias). Da mesma forma, a banda 11, relacionada à *Ca. Kuenenia*, com 99% de identidade, esteve presente apenas na amostra coletada aos 85 dias de operação. Nas amostras coletadas aos 182 e 253 dias de operação, predominaram bactérias anammox pertencentes à ordem Planctomycetales (Bandas 12 a 25). A única bactéria anammox incluída dentro desta ordem é *Ca. Anammoximicrobium* (KHRAMENKOV *et al.*, 2013). Os resultados do SNG confirmaram que no RBS-Piloto esse foi o gênero de bactéria anammox enriquecido, conforme será apresentado adiante.

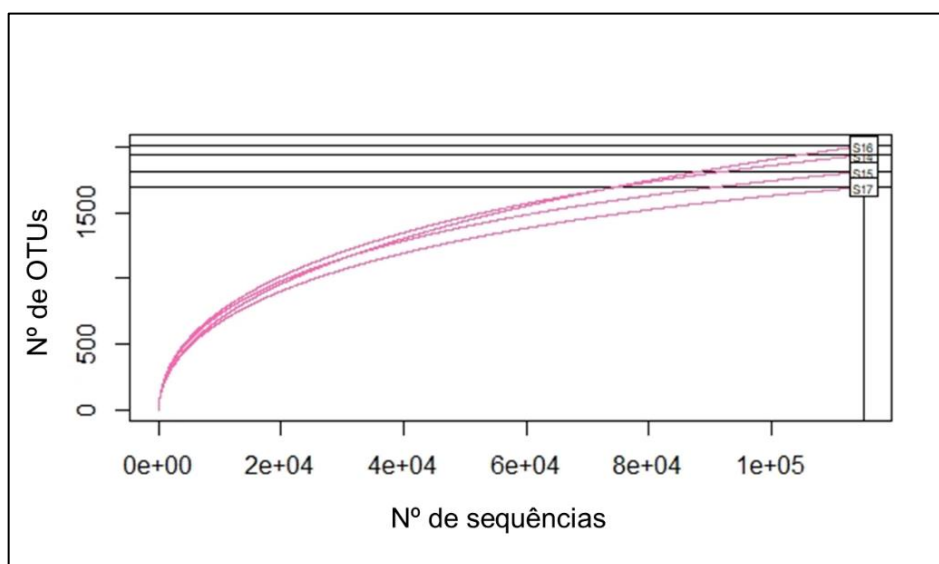
O dendrograma apresentado na Figura 6.56 revelou que houve mudanças na comunidade de bactérias anammox ao longo do tempo, uma vez que a amostra coletada aos 85 dias de operação teve similaridade relativamente baixa (68,1%) com as demais amostras, coletadas aos 182 e 253 dias de operação. Estas duas amostras, por sua vez apresentaram perfis mais similares entre si (90,9%). E todas as amostras do RBS-Piloto foram bastante divergentes do inóculo, com apenas 52,4% de similaridade.



**Figura 6.56** – Dendrograma obtido para o perfil de bandas do RBS-Piloto por meio da PCR-DGGE de bactérias anammox (coeficiente de similaridade de Dice e método de agrupamento UPGMA)

#### 6.2.4 Análise da diversidade microbiana do RBS em escala piloto por SNG

Sequenciamento de nova geração do gene RNAr 16S usando a plataforma *MiSeq Illumina* foi utilizada também para avaliar a diversidade de micro-organismos no RBS-Piloto. Foram obtidas de 115.057 até 279.908 sequências a partir das amostras do RBS-Piloto (Tabela 6.15). Para o cálculo dos índices de diversidade e dissimilaridade as sequências foram subamostradas resultando em um total de 115.507 sequências em cada amostra. As curvas de rarefação demonstraram que o sequenciamento recuperou boa parte da diversidade de táxons presentes na amostra (Figura 6.57). Com base nas curvas de rarefação, a amostra que apresenta maior diversidade de táxons é a amostra do RBS-Piloto aos 182 dias de operação (S16). Em contrapartida, a amostra coletada aos 253 dias (S17) foi a que apresentou menor número de OTUs (Figura 6.57; Tabela 6.15).



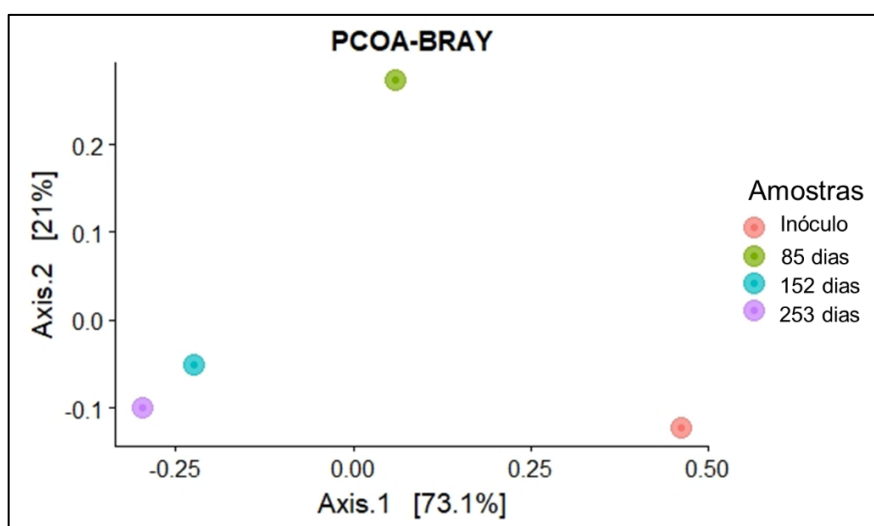
**Figura 6.57** – Curvas de rarefação obtidas para as amostras do RBS-Piloto

O índice de diversidade de *Chao1* demonstrou que a amostra mais diversa foi a amostra coletada aos 182 dias de operação. Já de acordo com o índice de *Shannon*, maior valor foi obtido para a amostra referente ao inóculo, igual a 4,59. Entretanto os valores obtidos para o índice de *Shannon* foram bastante semelhantes entre todas as amostras do RBS-Piloto (Tabela 6.15).

**Tabela 6.15** – Número de sequências, OTUs e índices de diversidade alfa *Chao1* e *Shannon* obtidos para as amostras do RBS-Piloto

Amostras	Nº de sequências	Nº de sequências Normalizado	OTUs	<i>Chao1</i>	<i>Shannon</i>
<b>Inóculo</b>	130.906	115.507	1936	2.382,97	4,59
<b>85 dias</b>	132.074	115.507	1810	2.223,38	4,39
<b>182 dias</b>	279.908	115.507	2008	2.941,96	4,56
<b>253 dias</b>	115.057	115.507	1692	2.021,46	4,50

Análise de coordenadas principais baseada no índice de dissimilaridade de *Bray-curtis* é apresentada na Figura 6.58. Por meio dessa análise é possível observar que as amostras do RBS-Piloto coletadas aos 152 e 253 dias são as mais semelhantes entre si. As demais amostras (inóculo e RBS-Piloto 85 dias) não se agruparam, mostrando que em termos de comunidades microbianas foram mais diferentes entre si e também em relação às demais amostras.



**Figura 6.58** – Análise de coordenadas principais (PcoA) com base nos índices de dissimilaridade de *Bray-curtis*, representando a distância entre as comunidades microbianas das amostras coletadas no RBS-Piloto.

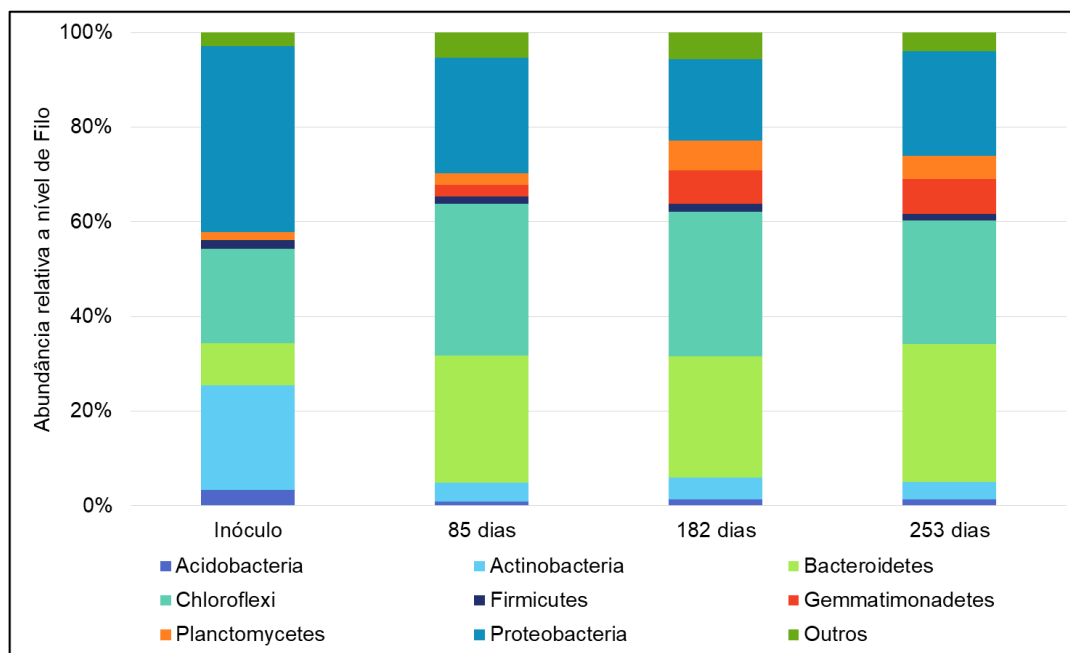
#### 6.2.4.1 Diversidade em nível de Filo

No RBS-Piloto os filos Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Gemmatimonadetes, Planctomycetes e Proteobacteria foram os mais predominantes, uma vez que, mais de 91,4% das sequências recuperadas foram pertencentes a esses filos em todas as amostras analisadas. Na Figura 6.59 é possível observar que as comunidades microbianas foram semelhantes, em especial nas amostras do RBS-Piloto coletadas aos 182 e 253 dias de operação.

O filo Actinobacteria, foi bastante abundante no inóculo (22,0 %), mas também esteve presente em amostras do RBS-Piloto com abundâncias relativas consideráveis, iguais a 3,9, 4,7 e 3,6 % nas amostras coletadas aos 85, 152 e 253 dias de operação, respectivamente. No inóculo, duas ordens foram mais abundantes dentro deste filo, Corynebacterales e Micrococcales. Dentro da ordem Corynebacterales, o gênero predominante foi *Gordonia*. Esse gênero também foi identificado no inóculo por meio da análise de PCR-DGGE nos dois reatores estudados. É comum em sistemas de lodos ativados e estão associados à problemas com formação de espuma nesses sistemas (ASVAPATHANAGUL *et al.*, 2012; SEVIOUR *et al.*, 2006). *Gordonia* esteve presente em abundância no inóculo (10,3 %), quase desaparecendo ao longo da operação do reator (com abundâncias entre 0,02 e 0,06 %). *Gordonia* é um gênero de bactérias heterotróficas e aeróbias (ARENSKOTTER *et al.*, 2004). As condições predominantemente anaeróbias no reator podem ter influenciado na diminuição da abundância relativa desse gênero no mesmo. Bactérias da ordem Micrococcales estiveram presentes no inóculo (com abundância igual a 8,0%) e nas amostras do RBS-Piloto (com abundâncias entre 1,25 e 2,26 %). A família Intrasporangiaceae, classificada dentro desta ordem foi predominante no reator e compreende táxons muito diversos filogeneticamente. Alguns gêneros incluídos nesta família, como *Tetrasphaera* (com algumas sequências identificadas no RBS-Piloto) são de importância para o tratamento de efluentes, uma vez que podem remover fosfatos nesses sistemas (STACKEBRANDT *et al.*, 2014).

Outras bactérias que crescem acumulando fosfatos são as do filo Gemmatimonadetes (ZHANG, 2003). Esse filo esteve presente no reator sendo que sua abundância relativa aumentou ao longo da operação do RBS-Piloto, com valores iguais a 0,1 %, 2,5 %, 7,1 % e 7,4 % no inóculo, RBS 85 dias, 152 dias e 253 dias, respectivamente. Esses micro-organismos também foram identificados por meio da técnica de PCR-DGGE nas amostras do RBS-Piloto. Isso sugere que o consórcio microbiano desenvolvido no RBS-Piloto também esteve envolvido na remoção de fosfatos do digestato de resíduo alimentar.

Os filos Proteobacteria, Planctomycetes, Bacteroidetes e Chloroflexi serão discutidos mais detalhadamente no item subsequente (6.2.4.2).



**Figura 6.59** - Abundância relativa dos filos mais representativos ( $\geq 1\%$ ) nas amostras do RBS-Piloto

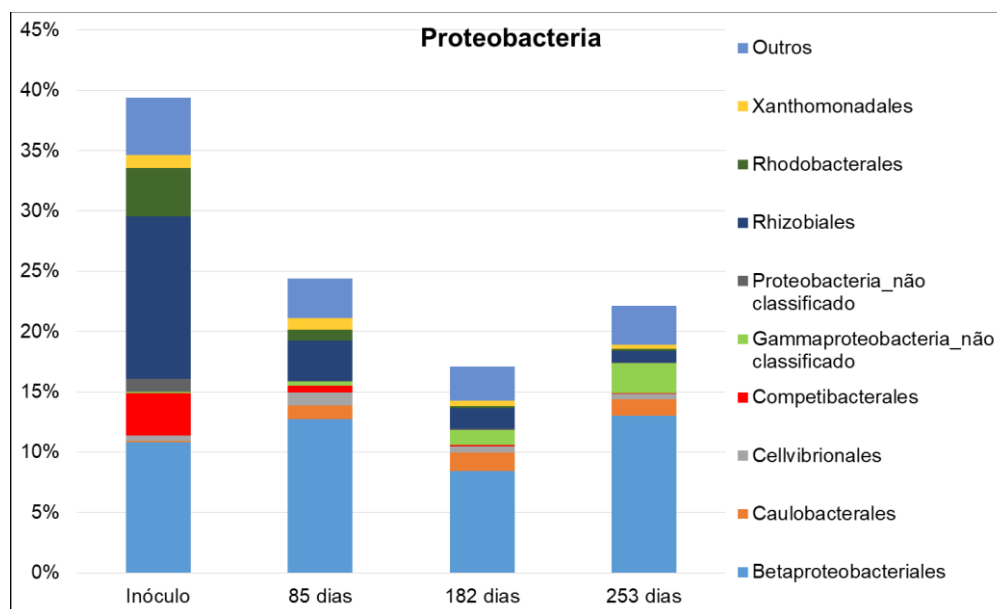
#### 6.2.4.2 Diversidade em nível de Ordem

O filo Proteobacteria foi mais abundante na amostra do inóculo, com 39,4 % das sequências recuperadas. Menor abundância relativa desse filo foi encontrada na amostra do RBS-Piloto coletada aos 182 dias de operação (8,4 %) (Figura 6.60). Uma das ordens mais abundantes dentro do filo Proteobacteria foi Betaproteobacterales (8,4 a 13,1 % de abundância relativa nas amostras). Dentro desta ordem, vale destacar a presença de micro-organismos que podem realizar a desnitrificação como *Denitratisoma*, *Ottowia*, e alguns micro-organismos da família Burkholderiaceae não classificados (CHEN *et al.*, 2016a; FAHRBACH 2006; SPRING 2004). Bactérias do gênero *Nitrosomonas*, que também estão incluídas na ordem Betaproteobacterales foram encontradas em baixas concentrações tanto no inóculo, quanto nas amostras do RBS-Piloto (0,02 a 0,6 %). Isso era esperado uma vez que o reator foi operado em condições anaeróbias.

Micro-organismos da ordem Rhizobiales, que possui diversos membros desnitrificantes também foram identificados com abundância elevada no RBS-Piloto (FALK *et al.*, 2010). A abundância relativa dessa ordem no inóculo foi igual a 13,5 % e foi diminuindo gradativamente alcançando 1,0 % aos 253 dias de operação. Dentro desta ordem o gênero *Hyphomicrobium* e

micro-organismos não classificados dentro da família Xanthobacteraceae, ambos capazes de realizar desnitrificação heterotrófica, foram identificados, com maior abundância relativa nas amostras do inóculo em relação às amostras do RBS-Lab (BÁRTA *et al.*, 2017; MARTINEAU *et al.*, 2015). Dentro da ordem Rhizobiales também foram encontradas sequências da família Beijerinckiaceae, única família da classe Alphaproteobacteria que inclui micro-organismos metanotróficos. Bactérias metanotróficas são capazes de oxidar metano utilizando oxigênio, sulfato ou nitrito como aceptores de elétrons (TAMAS *et al.*, 2014).

A ordem Caulobacterales, que teve abundância relativa entre 1,2 e 1,6 % nas amostras do RBS-Piloto, compreende bactérias oligotróficas e quimiorganotróficas com metabolismo aeróbio (GARRITY *et al.*, 2005). Já foi encontrada em sistemas de lodos ativados convencionais tratando efluente de refinaria de petróleo (SILVA *et al.*, 2010). Micro-organismos da família Hyphomonadaceae, que estiveram presentes nas amostras do RBS-Piloto, embora em baixa abundância (em torno de 0,1%) podem reduzir nitrato, sendo potenciais desnitrificantes (ABRAHAM e ROHDE, 2014). Outro grupo de bactérias desnitrificantes encontrado foi *Thermomonas*, que está classificado dentro da ordem Xanthomonadales (MERGAERT, 2003). A abundância relativa deste gênero no inóculo foi igual a 1,0 %, sendo que diminuiu para 0,1 % nas demais amostras do RBS-Piloto.



**Figura 6.60** - Ordens mais representativas dentro do filo Proteobacteria nas amostras do RBS-Piloto

A abundância relativa do filo Planctomycetes no inóculo foi igual a 1,6 % e ao longo da operação do RBS-Piloto aumentou, atingindo seu valor máximo (6,4 %) na amostra coletada aos 182 dias de operação (Figura 6.61).

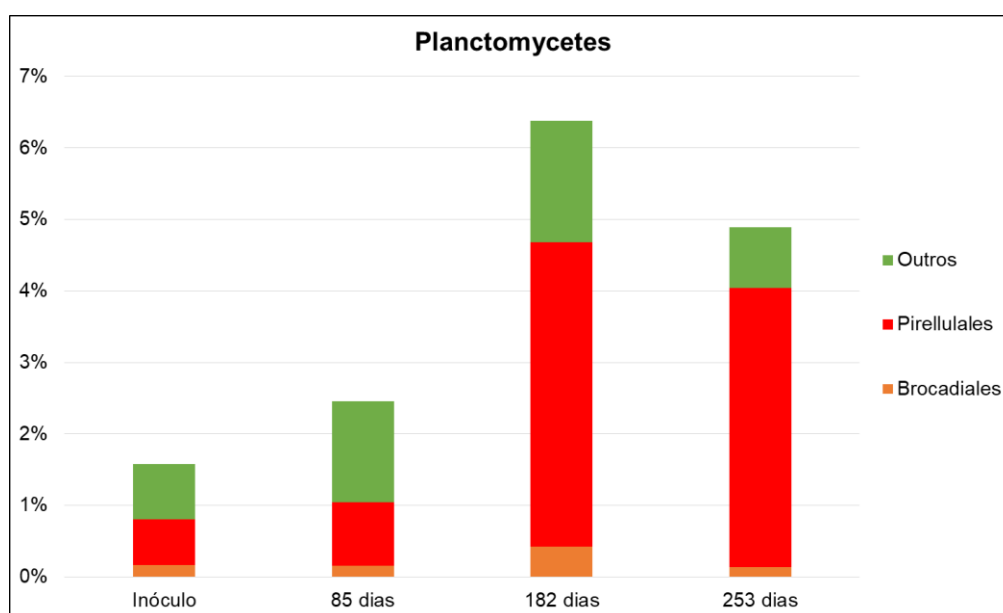
A principal ordem identificada dentro desse filo foi Pirellulales, sendo que o único gênero identificado dentro desta ordem nas amostras do RBS-Piloto foi a bactéria anammox *Ca. Anammoximicrobium*. A abundância relativa desta bactéria foi igual a 0,01% no inóculo, e aumentou ao longo da operação do RBS-Piloto, com abundâncias relativas iguais a 0,6, 3,9 e 3,7 % nas amostras coletadas aos 85, 182 e 253 dias de operação, respectivamente. Sabe-se que esta bactéria era inicialmente classificada como sendo da ordem Planctomycetales, família Planctomycetaceae (KHRAMENKOV *et al.*, 2013). Entretanto, a base de dados utilizada para a classificação das sequências obtidas pelo SNG (SILVA – *High quality ribosomal RNA databases*; <https://www.arb-silva.de/browser/ssu-132/AB478415>) classifica essa bactéria anammox como sendo da família Pirellulaceae, ordem Pirellulales. Sabe-se que *Ca. Anammoximicrobium* é bem próximo filogeneticamente do gênero *Pirellula staley* e mais distante das demais bactérias anammox identificadas até o momento (KHRAMENKOV *et al.*, 2013).

Estudo sobre a fisiologia de *Ca. Anammoximicrobium* demonstrou que esse gênero possui uma taxa de crescimento bastante baixa, com tempo de duplicação igual 32 dias. Constantes de meia saturação para amônio e nitrito foram iguais a 0,41 e 0,38 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente. O pH ideal para seu crescimento está entre 7,8 e 8,3 e a temperatura ótima de crescimento é igual a 20 °C, mais baixa em relação à temperatura ótima para os demais gêneros de bactérias anammox. Além disso concentrações iguais a 120 mg.L<sup>-1</sup> foram reportadas como inibidoras para *Ca. Anammoximicrobium*. Entretanto, esse micro-organismo parece ser bastante resiliente na ausência de substratos. Experimentos demonstraram que reator enriquecido com este gênero de anammox, mesmo após 90 dias sem nenhuma alimentação, conseguiu recuperar sua taxa original de oxidação de amônio e nitrito, apenas dois dias após a alimentação ser re-estabelecida (KHRAMENKOV *et al.*, 2013).

Características intrínsecas a este gênero de bactérias podem explicar, ao menos parcialmente, o porquê dele ter sido enriquecido no RBS-Piloto, em detrimento de outros gêneros de bactérias anammox. O RBS-Piloto, ao contrário do RBS-Lab, foi mantido à temperatura ambiente (com mediana igual a 24,8 °C). Isso pode ter favorecido o crescimento de *Ca. Anammoximicrobium*, já que sua temperatura ótima de crescimento é em torno de 20 °C. Sua capacidade de resiliência

frente à ausência de substratos, pode também ser um fator que favoreceu seu crescimento, já que por diversas ocasiões e motivos (principalmente devido à problemas operacionais na plataforma de tratamento do resíduo) o RBS-Piloto passou por períodos de mais de uma semana sem alimentação. Além disso, a lenta taxa de crescimento desse micro-organismo pode ter resultado em baixas cargas de nitrogênio removidas, mesmo com a adição de nitrito, ou seja, sem que esse substrato fosse limitante no meio. Ademais, a atividade desses micro-organismos pode ter sido parcialmente comprometida, já que eram adicionadas concentrações próximas a  $150 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_2^-$  no RBS-Piloto, e Khramenkov *et al.* (2013) reportaram que valores maiores que  $120 \text{ mg.L}^{-1}$  desse composto podem causar inibição de *Ca. Anammoximicrobium*.

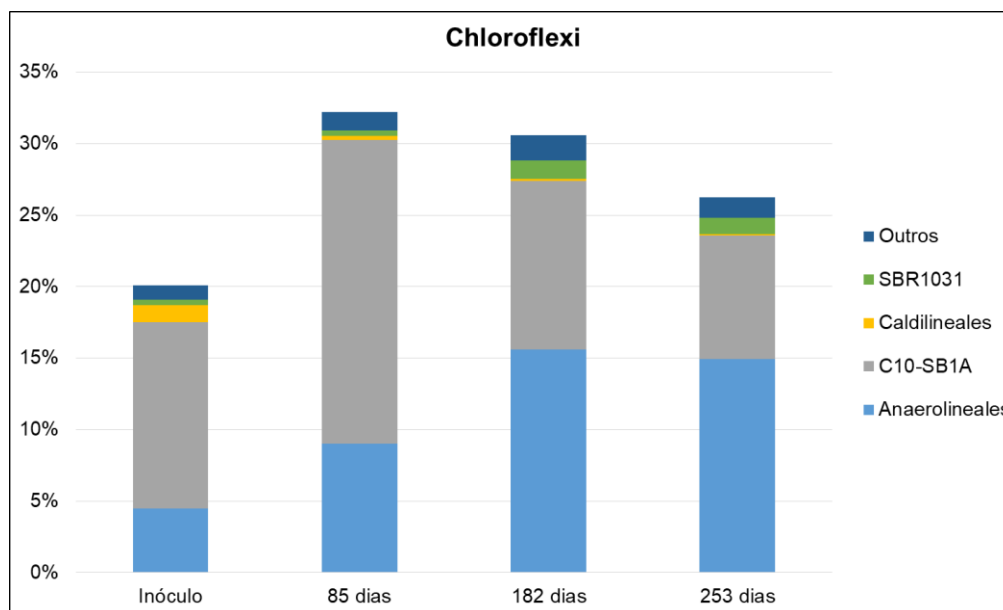
Vale ressaltar que micro-organismos da ordem Brocadiales, que inclui os demais gêneros de bactérias anammox, estiveram presentes em baixa abundância, iguais a 0,2 % no inóculo, 0,2 % aos 85 dias, 0,5% aos 182 dias e 0,1 % aos 253 dias de operação. Dentro desta ordem, sequencias de *Ca. Brocadia* foram recuperadas com abundâncias relativas variando de 0,1 a 0,4% e de *Ca. Jettenia* com abundâncias relativas entre 0,04 e 0,1 % nas amostras.



**Figura 6.61** - Ordens mais representativas dentro do filo Planctomycetes nas amostras do RBS-Piloto

No RBS-Piloto, Chloroflexi foi o filo mais abundante em algumas das amostras (182 e 253 dias de operação). A abundância relativa deste filo variou entre 20,1 e 32,2 % nas amostras do reator (Figura 6.62). As ordens mais predominantes foram Anaerolinales e C10-SB1A. Informações não foram encontradas acerca da ordem C10-SB1A. Dentro de Anaerolinales, um dos gêneros identificados e classificado foi o gênero *Leptolinea* (com abundância relativa entre 1,0 e 20,5

% nas amostras), que compreende bactérias filamentosas, inicialmente identificadas em grânulos de reator UASB e pode fermentar uma ampla gama de açúcares e ácidos graxos. Estudo do genoma desse micro-organismo sugere que ele pode também crescer em condições microaeróbias (WARD *et al.*, 2015).

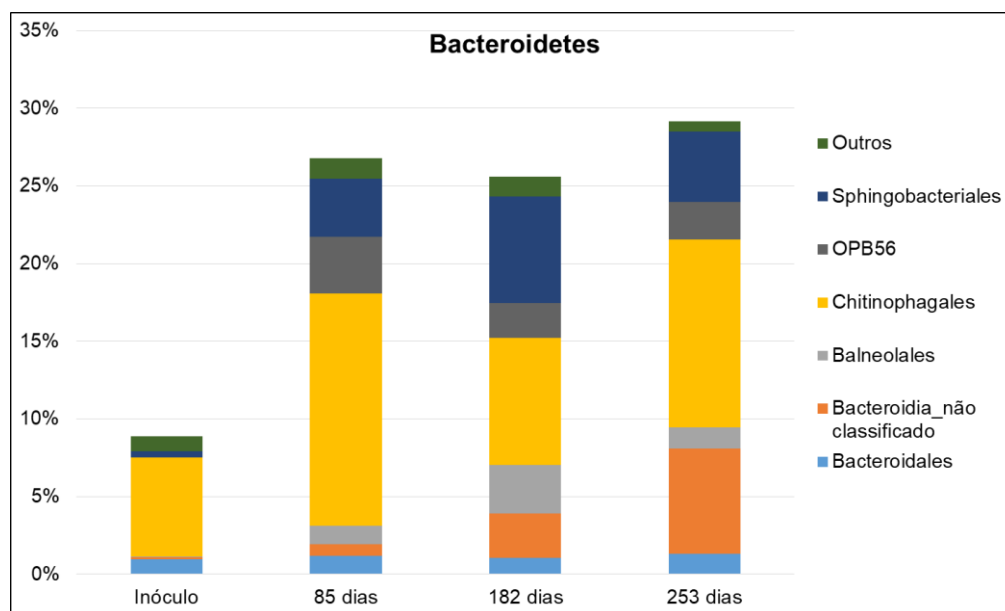


**Figura 6.62** - Ordens mais representativas dentro do filo Chloroflexi nas amostras do RBS-Piloto

Houve um aumento considerável na abundância relativa de sequências de micro-organismos relacionados ao filo Bacteroidetes a partir do inóculo (8,9 %) para as amostras coletadas ao longo da operação do reator (26,8, 25,6 e 29,1 % para as amostras coletadas aos 85, 182 e 253 dias de operação) (Figura 6.63). Diversas sequências de micro-organismos não classificados dentro da ordem Bacteroidia foram recuperadas do RBS-Piloto, aumentando de 0,1 % no inóculo para 6,8 % aos 253 dias de operação. A ordem Balneolales com abundâncias relativas variando entre 0,02 % (inóculo) a 3,2 % (RBS 182 dias) inclui micro-organismos halofílicos inicialmente encontrados em ambientes marinhos (XIA *et al.*, 2016).

Chitinophagales foi a ordem mais abundante em todas as amostras investigadas do RBS-Piloto, com abundâncias relativas entre 6,4 e 15,0 %. Dentro desta ordem gêneros como *Ferruginibacter* (0,2 a 2,3 % de abundância relativa) e *Terrimonas* (1,0 a 5,8% de abundância relativa) estiveram presentes, assim como também foram identificadas no RBS-Lab. Sequências de bactérias do gênero *Niabella* (1,3 a 2,1 % de abundância relativa) também foram identificados nas amostras do RBS-Piloto. Esse gênero compreende bactérias aeróbias, e já foram encontradas em reator anammox com biomassa granular operado em condições anóxicas,

alimentado com efluente sintético (LV *et al.*, 2016). A ordem OPB56, encontrada com abundância relativamente elevada, nas amostras coletadas do RBS-Piloto (2,3 a 3,7%) está relacionada à micro-organismos inicialmente isolados em fontes termais do *Yellowstone National Park*. Detalhada filogenia e função desse grupo permanece ainda desconhecida (HIRAS *et al.*, 2016). Sequências de micro-organismos relacionados à ordem Sphingobacterales estiveram presentes no RBS-Piloto, com abundância relativa elevada nas amostras, igual a 3,8, 6,8 e 4,5 % aos 85, 182 e 253 de operação, respectivamente. Organismos desta mesma ordem já foram identificados em lagoas costeiras urbanas e também em ambientes prístinos como águas doces preservadas da mata atlântica (SALLOTO *et al.*, 2012). Entretanto, não há muita informação sobre possíveis funções desse grupo nestes ambientes, tampouco em sistemas de tratamento de efluentes.



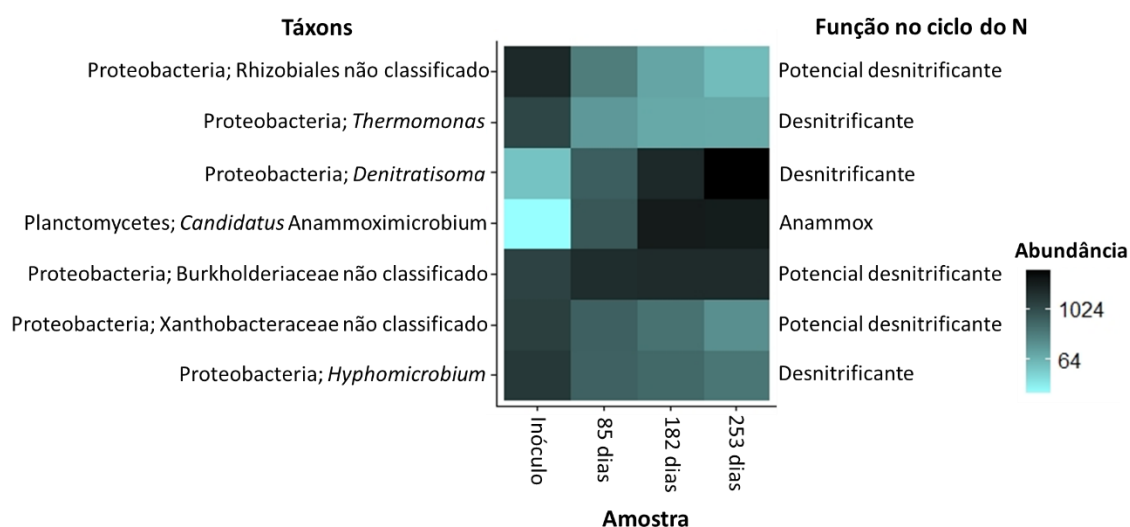
**Figura 6.63** - Ordens mais representativas dentro do Filo Bacteroidetes nas amostras do RBS-Piloto

#### 6.2.4.3 Principais táxons relacionados ao ciclo do nitrogênio

*Heatmap* com os micro-organismos mais abundantes (acima de 1% em pelo menos uma das amostras) identificados com potenciais funções no ciclo do nitrogênio é apresentado na Figura 6.64.

Somente bactérias com potencial para desnitrificação e bactérias anammox foram identificadas com abundância relativa acima de 1%. Isso era esperado, uma vez que o reator foi operado em condições anóxicas. *Ca. Anammoximicrobium* foi o gênero de bactérias enriquecido no RBS-

Piloto, com maiores abundâncias relativas nas duas últimas amostras coletadas no reator (182 e 253 dias). Observou-se que a maioria dos micro-organismos com potencial para desnitrificação (*Rhizobiales*, *Thermomonas*, *Xanthobacteraceae*, *Hyphomicrobium*) foram mais abundantes na amostra do inóculo, sendo que a abundância desses micro-organismos foi diminuindo ao longo da operação do RBS-Piloto. Exceção se deu para o gênero de desnitrificante *Denitratisoma* e para a família *Burkholderiaceae*. A abundância relativa desses dois grupos aumentou ao longo do tempo de operação do reator. Dessa forma, é possível dizer que poucos gêneros de desnitrificantes dominaram o RBS-Piloto. Isso pode explicar a baixa remoção de matéria orgânica obtida nesse reator, uma vez que o mesmo foi operado em condições anóxicas, e dessa forma, era esperada a ocorrência de desnitrificação nesse sistema.



**Figura 6.64** - Heatmap com os táxons mais abundantes dentro do ciclo do nitrogênio nas amostras do RBS-Piloto

### 6.2.5 Conclusões dos experimentos realizados em escala piloto – Etapa 2

Até onde se tem conhecimento esta foi a primeira experiência de enriquecimento de bactérias anammox em escala piloto (0,5 m<sup>3</sup>) no Brasil, a partir de lodo ativado de estação de tratamento de efluente em reator alimentado com efluente real (digestato de resíduo alimentar). Até então os experimentos foram realizados em escalas laboratoriais.

Ao longo do período operacional, baixa e instável remoção de nitrogênio amoniacal e nitroso foi obtida no RBS-Piloto. As medianas das eficiências de remoção de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> foram iguais a 30 e 34%, respectivamente, considerando todo o período de operação. Isso resultou em cargas de nitrogênio removidas iguais a 12,2 g N.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>. Os coeficientes obtidos para o consumo de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/ consumo de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e para a produção de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ consumo de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

foram iguais a 0,69 e 0,03, respectivamente, mais baixos, portanto do que os reportados na literatura para o processo anammox. Observou-se a partir dos 175 dias de operação, que esses coeficientes tenderam a se aproximar aos da literatura, entretanto, ainda permaneceram instáveis.

Aos 182 dias de operação, abundância relativa de *Ca. Anammoximicrobium*, gênero de bactéria anammox enriquecido no reator, atingiu seu maior valor, conforme verificado pelos resultados do SNG e também por qPCR. Esse gênero de bactéria anammox possui a mais lenta taxa de crescimento entre os gêneros reportados na literatura, com tempo de duplicação igual a 32 dias. O enriquecimento desse micro-organismo com menor taxa de crescimento, em detrimento dos outros gêneros de bactérias anammox, certamente teve influência na baixa remoção de nitrogênio alcançada no RBS-Piloto. A técnica de PCR-DGGE também evidenciou diversas bandas com sequências relacionadas à ordem Planctomycetales, a qual está incluída *Ca. Anammoximicrobium*, como sendo dominantes nos perfis obtidos para as amostras do RBS-Piloto.

Além de Planctomycetes, outros filos abundantes no RBS-Piloto foram Proteobacteria, Chloroflexi, Bacteroidetes, Actinobacteria e Gemmatimonadetes. Diversos gêneros relacionados a bactérias desnitrificantes foram identificados, entretanto os grupos de micro-organismos, *Denitratisoma* e *Burkholderiaceae* foram os mais abundantes no reator. A baixa diversidade de micro-organismos desnitrificantes no RBS-Piloto pode explicar a baixa eficiência de remoção de DQO alcançada no mesmo, com mediana igual a 21% apenas.

## 7 CONCLUSÕES GERAIS

- **Em relação ao objetivo específico 1:**

Os resultados obtidos permitiram concluir que o reator em escala laboratorial (RBS-Lab) foi capaz de remover nitrogênio de digestato de resíduo alimentar em condições anóxicas com adição de nitrito, alcançando  $77,5 \text{ g N.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$  de nitrogênio total removido. Esse valor não foi significativamente diferente do obtido durante a fase de enriquecimento de bactérias anammox no reator, igual a  $81,9 \text{ g N.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ . A alimentação do reator com digestato diminuiu a abundância relativa de bactérias anammox, entretanto, esta redução não comprometeu a performance do reator em termos de remoção de nitrogênio. Esses resultados confirmam a Hipótese 1, de que o processo anammox é aplicável ao tratamento de digestato de resíduo alimentar.

- **Em relação ao objetivo específico 2:**

Quando diferentes estratégias de aeração intermitentes e contínua foram comparadas, observou-se que não houve diferença significativa entre as cargas de nitrogênio removidas e nem entre o coeficiente obtido para o nitrato produzido/ amônio consumido, durante as estratégias E3 (intermitente: 15 min anóxico/30 min aerado), E4 (intermitente: 15 min anóxico/ 45 min aerado) e E5 (contínua), operadas sob mesmas condições de taxa de aeração ( $0,125 \text{ L.min}^{-1}.\text{L}_{\text{reator}}^{-1}$ ). Dessa forma, não foi possível confirmar a Hipótese 2 da presente tese, de que estratégias de aeração intermitentes resultam em melhores resultados em termos de remoção de nitrogênio total.

- **Em relação ao objetivo específico 3:**

Apesar de ter sido observado ligeiro aumento na abundância relativa de bactérias anammox (de 1 % para 2,8 %, conforme resultados do SNG), a suplementação de alcalinidade ao reator não alterou significativamente as cargas de nitrogênio removidas no mesmo. Durante o período em que foi adicionada alcalinidade (E6), carga nitrogenada removida igual a  $17,5 \text{ g.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$  foi obtida, sendo que esse valor não diferiu significativamente do valor obtido durante a estratégia E4 ( $15 \text{ g.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ ), que foi igual a E6, porém sem adição de bicarbonato de potássio. Dessa forma, a Hipótese 3, de que a suplementação com alcalinidade poderia favorecer o controle do processo de nitrificação parcial e anammox, resultando em melhores resultados em termos de remoção de nitrogênio, foi refutada.

- **Em relação ao objetivo específico 4:**

A redução na taxa de aeração do reator aliada as estratégias de aeração intermitentes com períodos anóxicos maiores (30 e 45 minutos) em relação ao período aerado (15 minutos) foram mais eficazes para controlar o processo de nitrificação parcial da amônia até nitrito. Durante estas estratégias foram obtidos resultados de produção de nitrato/ consumo de amônio mais próximos aos reportados na literatura para o processo de nitrificação parcial e anammox (iguais a 0,17 e 0,21 para E7 e E8, respectivamente), além de permitir menor produção de nitrato sem diminuir o consumo de nitrogênio amoniacal. Esses coeficientes foram significativamente menores, quando comparados aos obtidos com estas mesmas estratégias intermitentes e maior taxa de ar aplicada (iguais a 0,28 e 0,39 para E4 e E3, respectivamente). Apesar disso, as cargas de nitrogênio removidas não foram significativamente diferentes quando menores taxas de aeração foram aplicadas. Por esse motivo, a Hipótese 4 foi confirmada parcialmente, uma vez que menor taxa de aeração foi mais eficiente para controlar o processo de nitrificação da amônia até nitrito, entretanto, não foi obtida maior remoção de nitrogênio total.

- **Em relação ao objetivo específico 5**

As condições operacionais impostas ao RBS-Lab selecionaram diferentes comunidades microbianas. As bactérias anammox foram afetadas pela aeração ao longo das diferentes estratégias avaliadas e tiveram sua abundância reduzida. Não obstante, após período de recuperação do reator em condições anóxicas, a abundância desses micro-organismos novamente aumentou. Esta nova condição alterou a população de bactérias anammox, havendo substituição do gênero dominante, de *Ca. Brocadia* para *Ca. Jettenia*. Bactérias desnitrificantes também foram encontradas no RBS-Lab e atuaram no polimento do efluente em termos de matéria orgânica, juntamente com bactérias heterotróficas aeróbias. Ampla gama de táxons com potenciais metabolismos relacionados ao ciclo do nitrogênio foram encontrados no RBS-Lab em elevada abundância, indicando que em reatores de NP/Anammox, a remoção dos compostos nitrogenados envolve grande diversidade de micro-organismos que são capazes de realizar diferentes rotas metabólicas (como por exemplo, anammox, nitrificação, desnitrificação, redução desassimilatória do nitrato a amônio, redução de nitrato a nitrito acoplada à amonificação). Foi observado, que estratégias de aeração intermitentes aliadas a baixas taxas de ar aplicadas foram mais eficazes para controlar populações de bactérias nitrificantes e permitir o crescimento de bactérias anammox, dessa forma, a Hipótese 5, de que estratégias de aeração intermitentes são mais efetivas para controlar a população de BON e permitir o

crescimento de bactérias anammox pôde ser confirmada apenas parcialmente, uma vez que outros fatores parecem ter sido determinantes para que isso acontecesse, como a taxa de aeração do reator.

De maneira geral, os resultados obtidos no reator em escala laboratorial demonstram o potencial de processos que envolvem a atividade de bactérias anammox para o tratamento de digestato de resíduo alimentar, para redução das concentrações de nitrogênio e matéria orgânica. O efluente produzido tem potencial para reuso na própria plataforma de tratamento do resíduo, podendo ser utilizado, por exemplo, na diluição do resíduo a ser tratado no digestor anaeróbio.

- **Em relação aos objetivos específicos 6 e 7**

Em reator em escala piloto (RBS-Piloto), inoculado com lodo ativado e alimentado com digestato de resíduo alimentar com adição de nitrito, a remoção de nitrogênio foi instável ao longo de todo o período de operação, refletindo a dificuldade em desenvolver o processo anammox em escala piloto a partir de lodo não enriquecido e alimentando o reator com efluente real e à temperatura ambiente. Baixa carga de nitrogênio foi alcançada no reator, com mediana igual a  $12,2 \text{ g.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ . Apesar disso, observou-se aumento da abundância de bactérias anammox no reator ao longo do período de operação, dessa forma, a Hipótese 6, de que é possível desenvolver o processo anammox em reator em escala piloto a partir de lodo ativado e com alimentação do reator com digestato de resíduo alimentar mais nitrito, foi confirmada. Apesar de *Ca. Brocadia* ter sido detectada no RBS-Piloto, *Ca. Anammoximicrobium* foi o gênero de anammox selecionado, tornando-se dominante no reator, indicando que as condições operacionais impostas (alimentação com efluente real e operação à temperatura ambiente) favoreceram este micro-organismo de crescimento lento (tempo de duplicação de 32 dias). Micro-organismos desnitrificantes foram encontrados no RBS-Piloto, entretanto poucos táxons de desnitrificantes foram observados com elevada abundância neste reator, o que pode ter contribuído para as baixas eficiências de remoção de DQO alcançadas.

De maneira geral, os resultados deste trabalho demonstraram o potencial de processos que envolvem a atividade de bactérias anammox para o tratamento de digestato de resíduo alimentar. A combinação dos processos de nitrificação parcial e anammox com processos anaeróbios (biodigestores e reatores UASB), configuração de tratamento utilizada neste trabalho, é muito interessante em termos de economia de recursos e diminuição da geração de impactos ambientais (como por exemplo, emissão de gases de efeito estufa). Por esse motivo, acredita-se que a utilização de tais processos deve ser encorajada de modo a fazer parte, em um

futuro próximo, da realidade das estações de tratamento de resíduos e de efluentes, especialmente no Brasil, que possui clima bastante favorável à aplicação de processos biológicos. Dessa forma, ressalta-se a importância de dar continuidade aos estudos nessa linha de pesquisa com intuito de otimizar o processo de nitrificação parcial para que o mesmo se torne mais eficiente para ser aplicado em conjunto com o processo anammox. Ademais as experiências obtidas com a aplicação do processo anammox em escala piloto demonstraram que o aumento de escala desses reatores não é tarefa fácil, entretanto, entender os obstáculos para sua aplicação em maiores escalas é de extrema importância para sua utilização em uma escala plena.

## 8 RECOMENDAÇÕES

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho recomenda-se a continuação dos estudos nas seguintes linhas de pesquisa:

- Além de estudos do gene RNAr 16S da comunidade microbiana, estudos envolvendo o metagenoma poderiam promover mais a fundo compreensão sobre o potencial metabólico da biomassa desenvolvida em reatores com atividade anammox.
- Uma vez que foram encontrados micro-organismos capazes de remover compostos como sulfatos e fosfatos, recomenda-se investigar o potencial dos reatores estudados na remoção desses compostos a partir do digestato de resíduo alimentar.
- Diversas sequências recuperadas dos reatores por meio do sequenciamento de nova geração foram associadas a micro-organismos desconhecidos, alguns não classificados, sendo que muitos deles estiveram presentes em elevada abundância nos reatores. Foi encontrada pouca ou nenhuma informação sobre a fisiologia de tais organismos na literatura. Investigações sobre a função desses organismos poderiam auxiliar na compreensão dos papéis exercidos pelos mesmos nos reatores avaliados.
- Recomenda-se avaliar o desenvolvimento do processo de nitrificação parcial e anammox no RBS em escala piloto utilizando estratégia de aeração intermitente com maiores períodos anóxicos em relação aos períodos aerados e com menores vazões de ar aplicadas, uma vez que esta estratégia de aeração favoreceu o controle do processo de nitrificação parcial e anammox no RBS-Lab.
- Aumentar gradativamente as cargas afluentes de nitrogênio e matéria orgânica por meio da redução gradativa da diluição do digestato de resíduo alimentar, a fim de avaliar o potencial para o tratamento deste efluente pelo processo de nitrificação parcial e anammox sem a necessidade de diluição do digestato.
- Pesquisar os processos de nitrificação parcial e anammox em dois estágios, a fim de avaliar se esta configuração seria mais efetiva para o controle do processo de nitrificação parcial.
- Estudar o processo de desnitrificação parcial do nitrato até nitrito, bem como os organismos capazes de realizar esse metabolismo, a fim de aplicar tal processo juntamente com o processo anammox.

## 9 REFERÊNCIAS

ABMA, W. R.; DRIESSEN, W.; HAARHUIS, R.; LOOSDRECHT, M. C. M. VAN. Upgrading of sewage treatment plant by sustainable and cost-effective separate treatment of industrial wastewater. *Water Science and Technology*, v. 61, n. 7, p. 1715–1722, 2010.

ABRAHAM, W. R.; ROHDE, M. The Family Hyphomonadaceae. In: *The Prokaryotes*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. p. 283–299, 2014.

AHN, Y. H. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. *Process Biochemistry*, v. 41, n. 8, p. 1709–1721, 2006.

ALI, M.; HAROON, M. F.; NARITA, Y.; ZHANG, L.; RANGEL SHAW, D.; OKABE, S.; SAIKALY, P. E. Draft Genome Sequence of the Anaerobic Ammonium-Oxidizing Bacterium “ Candidatus Brocadia sp. 40”. *Genome Announcements*, v. 4, n. 6, p. 1-2, 2016.

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

ALI, M.; OSHIKI, M.; AWATA, T.; ISOBE, K.; KIMURA, Z.; YOSHIKAWA, H.; HIRA, D.; KINDAICHI, T.; SATOH, H.; FUJII, T.; OKABE, S. Physiological characterization of anaerobic ammonium oxidizing bacterium ‘ Candidatus Jettenia caeni’. *Environmental Microbiology*, v. 17, n. 6, p. 2172–2189, 2015.

ANTHONISEN, A. C.; LOEHR, R. C.; PRAKASAM, T. B.; SRINATH, E. G. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Journal - Water Pollution Control Federation*, v. 48, n. 5, p. 835–52, 1976.

APHA. AWWA; WEF. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 20. ed. Washington: APHA, 2012.

ARAÚJO, J. C.; CAMPOS, A. C.; CORREA, M. M.; SILVA, E. C.; MATTÉ, M. H.; MATTÉ, G. R.; SPERLING, M. VON; CHERNICHARO, C. A. L. Anammox bacteria enrichment and characterization from municipal activated sludge. *Water Science & Technology*, v. 64, n. 7, p. 1428, set. 2011.

ARAÚJO, J. C. DE; CAMPOS, A. P.; CORREA, M. M. DE S.; SILVA, E. C.; SPERLING, M. VON; CHERNICHARO, C. A. DE L. Enriquecimento de bactérias anaeróbias oxidadoras de amônia - anammox. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, v. 15, n. 2, p. 205–212, 2010.

ARENSKOTTER, M.; BROKER, D.; STEINBUCHER, A. Biology of the Metabolically Diverse Genus *Gordonia*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, n. 6, p. 3195–3204, 2004.

ASVAPATHANAGUL, P.; HUANG, Z.; GEDALANGA, P. B.; BAYLOR, A.; OLSON, B. H. Interaction of Operational and Physicochemical Factors Leading to *Gordonia amarae*-Like Foaming in an Incompletely Nitrifying Activated Sludge Plant. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 78, n. 23, p. 8165–8175, 2012.

AZARI, M.; WALTER, U.; REKERS, V.; GU, J.-D.; DENECKE, M. More than a decade of experience of landfill leachate treatment with a full-scale anammox plant combining activated sludge and activated carbon biofilm. *Chemosphere*, v. 174, p. 117–126, 2017.

BAGCHI, S.; BISWAS, R.; NANDY, T. Alkalinity and dissolved oxygen as controlling parameters for ammonia removal through partial nitritation and ANAMMOX in a single-stage bioreactor. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 37, n. 8, p. 871–876, 2010.

BAO, H. X.; MA, X. P.; WANG, J.; JING, K.; SHEN, M. L.; WANG, A. J. Performance of Denitrifying Phosphorous Removal Process Employing Nitrite as Electron Acceptor and the Characterization of Dominant Functional Populations. *Advanced Materials Research*, v. 455–456, p. 1019–1024, jan. 2012.

BÁRTA, J.; TAHOVSKÁ, K.; ŠANTRŮČKOVÁ, H.; OULEHLE, F. Microbial communities with distinct denitrification potential in spruce and beech soils differing in nitrate leaching. *Scientific Reports*,

v. 7, n. 1, p. 9738, 2017.

BLACKBURNE, R.; YUAN, Z.; KELLER, J. Partial nitrification to nitrite using low dissolved oxygen concentration as the main selection factor. *Biodegradation*, v. 19, n. 2, p. 303–312, 2008.

BLISTAD, T.; MADLAND, M.; ESPEDAL, E.; HANSEN, P. H. Membrane separation of raw and anaerobically digested pig manure. *Water Science and Technology*, v. 25, p. 19–26, 1992.

BONMATÍ, A.; FLOTATS, X. Air stripping of ammonia from pig slurry: characterisation and feasibility as a pre- or post-treatment to mesophilic anaerobic digestion. *Waste Management*, v. 23, n. 3, p. 261–272, 2003.

BOTHE, H.; FERGUSON, S. J.; NEWTON, W. E. *Biology of the Nitrogen Cycle*. Elsevier. 2007, 427 p.

BRANDSMA, J. *et al.* A multi-proxy study of anaerobic ammonium oxidation in marine sediments of the Gullmar Fjord, Sweden. **Environmental Microbiology Reports**, v. 3, n. 3, p. 360–366, jun. 2011.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. 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. Resolução CONAMA nº 430 de 13 de maio de 2011. Brasil, 2011. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res11>>. Acesso em 01 de junho de 2018.

BRASIL. Ministério das Cidades. Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental - SNSA. Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento. Diagnóstico do Manejo de Resíduos Sólidos Urbanos - 2016. Brasília.: MCIDADES.SNSA, 2016.

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

BU, C.; WANG, Y.; GE, C.; AHMAD, H. A.; GAO, B.; NI, S.-Q. Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium in the Yellow River Estuary: Rates, Abundance, and Community Diversity. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 6830, 28 dez. 2017.

BUJOCZEK, G.; OLESZKIEWICZ, J.; SPARLING, R.; CENKOWSKI, S. High Solid Anaerobic Digestion of Chicken Manure. *Journal of Agricultural Engineering Research*, v. 76, n. 1, p. 51–60, maio 2000.

CABEZAS, A.; ARAUJO, J. C. DE; CALLEJAS, C.; GALÈS, A.; HAMELIN, J.; MARONE, A.; SOUSA, D. Z.; TRABLY, E.; ETCHEBEHERE, C. How to use molecular biology tools for the study of the anaerobic digestion process? *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, v. 14, n. 4, p. 555–593, 2015.

CALLAGHAN, F. J.; WASE, D. A. J.; THAYANITHY, K.; FORSTER, C. F. Continuous co-digestion of cattle slurry with fruit and vegetable wastes and chicken manure. *Biomass and Bioenergy*, v. 22, n. 1, p. 71–77, 2002.

CAMP, N. E. Methemoglobinemia. *Journal of Emergency nursing*, v. 33, n. 2, p. 172–174, 2007.

CAMPOS, A. P. *Enriquecimento e caracterização de bactérias anammox para a remoção de nitrogênio amoniacal de efluentes*. Belo Horizonte, 2010, 122 p. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

CAMPUZANO, R.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S. Characteristics of the organic fraction of municipal solid waste and methane production: A review. *Waste Management*, v. 54, p. 3–12, 2016.

CAO, Y.; LOOSDRECHT, M. C. M. VAN; DAIGGER, G. T. Mainstream partial nitritation–anammox in municipal wastewater treatment: status, bottlenecks, and further studies. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 101, n. 4, p. 1365–1383, 2017.

CAO, S.; DU, R.; LI, B.; REN, N.; PENG, Y. High-throughput profiling of microbial community structures in an ANAMMOX-UASB reactor treating high-strength wastewater. *Applied Microbiology*

and *Biotechnology*, v. 100, n. 14, p. 6457–6467, 2016a.

CAO, S.; DU, R.; NIU, M.; LI, B.; REN, N.; PENG, Y. Integrated anaerobic ammonium oxidization with partial denitrification process for advanced nitrogen removal from high-strength wastewater. *Bioresource Technology*, v. 221, p. 37–46, 2016b.

CAO, S.; PENG, Y.; DU, R.; WANG, S. Feasibility of enhancing the DENitrifying AMmonium OXidation (DEAMOX) process for nitrogen removal by seeding partial denitrification sludge. *Chemosphere*, v. 148, p. 403–407, 2016c.

CAPORASO, J. G.; LAUBER, C. L.; WALTERS, W. A.; BERG-LYONS, D.; LOZUPONE, C. A.; TURNBAUGH, P. J.; FIERER, N.; KNIGHT, R. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 108, n. Supplement\_1, p. 4516–4522, 15 mar. 2011.

CARR, E. L.; EALES, K. L.; SEVIOUR, R. J. Substrate uptake by *Gordonia amarae* in activated sludge foams by FISH-MAR. *Water Science & Technology*, v. 54, n. 1, p. 39, 2006.

CARVAJAL-ARROYO, J. M.; PUYOL, D.; LI, G.; SIERRA-ÁLVAREZ, R.; FIELD, J. A. The role of pH on the resistance of resting- and active anammox bacteria to NO<sub>2</sub> – inhibition. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 111, n. 10, p. 1949–1956, 2014a.

CARVAJAL-ARROYO, J. M.; PUYOL, D.; LI, G.; SWARTWOUT, A.; SIERRA-ALVAREZ, R.; FIELD, J. A. Starved anammox cells are less resistant to NO<sub>2</sub>- inhibition. *Water Research*, v. 65, p. 170–176, 2014b.

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, n. 1, p. 22–27, 2013.

CASTELLE, C. J.; HUG, L. A.; WRIGHTON, K. C.; THOMAS, B. C.; WILLIAMS, K. H.; WU, D.; TRINGE, S. G.; SINGER, S. W.; EISEN, J. A.; BANFIELD, J. F. Extraordinary phylogenetic diversity and metabolic versatility in aquifer sediment. *Nature Communications*, v. 4, n. 1, p. 2120, 2013.

CAVALCANTI, J. E. W. A. *Manual de Tratamento de Efluentes Industriais*. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo: Engenho editora Técnica Ltda, 2012, 500 p.

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, n. 9, p. 3331–3336, 2008.

CHANG, Q.; WANG, W.; CHEN, J.; WANG, Y. Keeping a Completely Autotrophic Nitrogen Removal over Nitrite System Effective in Treating Low Ammonium Wastewater by Adopting an Alternative Low and High Ammonium Influent Regime. *BioMed Research International*, v. 2018, p. 1–9, 2018.

CHEN, G.-J.; XIA, J.; WANG, X.-Q.; LING, S.-K.; DU, Z.-J. *Aliifodinibius halophilus* sp. nov., a moderately halophilic member of the genus *Aliifodinibius*, and proposal of *Balneolaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 66, n. 6, p. 2225–2233, 2016a.

CHEN, Y.; FENG, X.; HE, Y.; WANG, F. Genome Analysis of a *Limnobacter* sp. Identified in an Anaerobic Methane-Consuming Cell Consortium. *Frontiers in Marine Science*, v. 3, p. 8, 2016b.

CHENG, J.; QING, Y.; XU, J.; YANG, Z.; ZHOU, J.; CEN, K. Improving pollutants removal by microalgae *Chlorella* PY-ZU1 with 15% CO<sub>2</sub> from undiluted anaerobic digestion effluent of food wastes with ozonation pretreatment. *Bioresource Technology*, v. 216, p. 273–279, 2016.

CHO, S.; TAKAHASHI, Y.; FUJII, N.; YAMADA, Y.; SATOH, H.; OKABE, S. Nitrogen removal performance and microbial community analysis of an anaerobic up-flow granular bed anammox reactor. *Chemosphere*, v. 78, n. 9, p. 1129–1135, 2010.

CLAUS, G.; KUTZNER, H. Autotrophic denitrification by *Thiobacillus denitrificans* in a packed bed reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 22, n. 4, 1985.

COLWELL, R. K.; CODDINGTON, J. A. Estimating Terrestrial Biodiversity through Extrapolation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 345, n. 1311, p. 101–118, 1994.

COSTA, M. C. M. S. *et al.* Impact of inocula and operating conditions on the microbial community structure of two anammox reactors. *Environmental technology*, v. 35, n. 13–16, p. 1811–22, 2014.

COSTA, M. C. M. S. *Impacto do tipo de inóculo e das condições operacionais sobre a estrutura da comunidade bacteriana e desempenho do processo anammox em biofiltros usando espuma de poliuretano como meio suporte dos micro-organismos*. Belo Horizonte, 2013, 127 p. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

DAIMS, H. *et al.* Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature*, v. 528, n. 7583, p. 504–509, 2015.

DAIMS, H.; NIELSEN, J. L.; NIELSEN, P. H.; SCHLEIFER, K.-H.; WAGNER, M. In Situ Characterization of *Nitrospira*-Like Nitrite-Oxidizing Bacteria Active in Wastewater Treatment Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 11, p. 5273–5284, 2001.

DAPENA-MORA, A.; FERNÁNDEZ, I.; CAMPOS, J. L.; MOSQUERA-CORRAL, 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.

DAPENA-MORA, A.; HULLE, S. W. VAN; LUIS CAMPOS, J.; MÉNDEZ, R.; VANROLLEGHEM, P. A.; JETTEN, M. Enrichment of Anammox biomass from municipal activated sludge: experimental and modelling results. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 79, n. 12, p. 1421–1428, 2004.

DATE, Y.; ISAKA, K.; IKUTA, H.; SUMINO, T.; KANEKO, N.; YOSHIE, S.; TSUNEDA, S.; INAMORI, Y. Microbial diversity of anammox bacteria enriched from different types of seed sludge in an anaerobic continuous-feeding cultivation reactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 107, n. 3, p. 281–286, 2009.

DE PRÁ, M.; KUNZ, A.; BORTOLI, M.; PERONDI, T.; CHINI, A.; SOARES, H. M. Partial nitritation + ANAMMOX process for nitrogen removal from swine wastewater (ASABE, Ed.) ANNUAL INTERNATIONAL MEETING SPONSORED BY ASABE. **Anais...**Dallas: 2012

DESLOOVER, J.; CLIPPELEIR, H. DE; BOECKX, P.; LAING, G. DU; COLSEN, J.; VERSTRAETE, W.; VLAEMINCK, S. E. Floc-based sequential partial nitritation and anammox at full scale with contrasting N<sub>2</sub>O emissions. *Water Research*, v. 45, n. 9, p. 2811–2821, 2011.

DOSTA, J.; VILA, J.; SANCHO, I.; BASSET, N.; GRIFOLL, M.; MATA-ÁLVAREZ, J. Two-step partial nitritation/Anammox process in granulation reactors: Start-up operation and microbial characterization. *Journal of Environmental Management*, v. 164, p. 196–205, 2015.

DU, R.; CAO, S.; LI, B.; WANG, S.; PENG, Y. Simultaneous domestic wastewater and nitrate sewage treatment by DENitrifying AMmonium OXidation (DEAMOX) in sequencing batch reactor. *Chemosphere*, v. 174, p. 399–407, 2017.

DU, R.; PENG, Y.; CAO, S.; WU, C.; WENG, D.; WANG, S.; HE, J. Advanced nitrogen removal with simultaneous Anammox and denitrification in sequencing batch reactor. *Bioresource Technology*, v. 162, p. 316–322, 2014.

EDGAR, R. C.; HAAS, B. J.; CLEMENTE, J. C.; QUINCE, C.; KNIGHT, R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, v. 27, n. 16, p. 2194–2200, 2011.

EGLI, K.; LANGER, C.; SIEGRIST, H.-R.; ZEHNDER, A. J. B.; WAGNER, M.; MEER, J. R. VAN DER. Community Analysis of Ammonia and Nitrite Oxidizers during Start-Up of Nitritation Reactors. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 6, p. 3213–3222, 2003.

EICHELBERGER, L.; MURPHY, G.; ETEMADI, A.; ABNET, C. C.; ISLAMI, F.; SHAKERI, R.; MALEKZADEH, M.; DAWSEY, S. M. Risk of Gastric Cancer by Water Source: Evidence from the

Golestan Case-Control Study. *PLOS ONE*, v. 10, n. 5, p. 1–13, 2015.

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.

ESPEJO-HERRERA, N.; CANTOR, K. P.; MALATS, N.; SILVERMAN, D. T.; TARDÓN, A.; GARCÍA-CLOSAS, R.; SERRA, C.; KOGEVINAS, M.; VILLANUEVA, C. M. Nitrate in drinking water and bladder cancer risk in Spain. *Environmental Research*, v. 137, p. 299–307, 2015.

FAHRBACH, M. Denitratisoma oestradiolicum gen. nov., sp. nov., a 17beta-oestradiol-degrading, denitrifying betaproteobacterium. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 56, n. 7, p. 1547–1552, 2006.

FALK, S.; LIU, B.; BRAKER, G. Isolation, genetic and functional characterization of novel soil nirK-type denitrifiers. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 33, n. 6, p. 337–347, out. 2010.

FAO. *Food and Agriculture Organization of United States. Global food losses and food waste*. Rome: [s.n.].

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

FERNÁNDEZ, I.; DOSTA, J.; FAJARDO, C.; CAMPOS, J. L.; MOSQUERA-CORRAL, A.; MÉNDEZ, R. Short- and long-term effects of ammonium and nitrite on the Anammox process. *Journal of Environmental Management*, v. 95, p. S170–S174, 2012.

FERRARI, B.; WINSLEY, T.; JI, M.; NEILAN, B. Insights into the distribution and abundance of the ubiquitous Candidatus Saccharibacteria phylum following tag pyrosequencing. *Scientific Reports*, v. 4, n. 1, p. 3957, 2015.

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.

FIGUEROA, M.; VÁZQUEZ-PADÍN, J. R.; MOSQUERA-CORRAL, A.; CAMPOS, J. L.; MÉNDEZ, R. Is the CANON reactor an alternative for nitrogen removal from pre-treated swine slurry? *Biochemical Engineering Journal*, v. 65, p. 23–29, 2012.

FOESEL, B. U.; ROHDE, M.; OVERMANN, J. Blastocatella fastidiosa gen. nov., sp. nov., isolated from semiarid savanna soil – The first described species of Acidobacteria subdivision 4. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 36, n. 2, p. 82–89, 2013.

FUCHSMAN, C. A.; STALEY, J. T.; OAKLEY, B. B.; KIRKPATRICK, J. B.; MURRAY, J. W. Free-living and aggregate-associated Planctomycetes in the Black Sea. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 80, n. 2, p. 402–416, 2012.

FUERST, J. A. *Planctomycetes: Cell Structure, Origins and Biology*. Totowa, NJ: Humana Press, 2013.

FUERST, J. A.; SAGULENKO, E. Beyond the bacterium: planctomycetes challenge our concepts of microbial structure and function. *Nature Reviews Microbiology*, v. 9, n. 6, p. 403–413, 2011.

FUKUNAGA, Y.; KURAHASHI, M.; SAKIYAMA, Y.; OHUCHI, M.; YOKOTA, A.; HARAYAMA, S. Phycisphaera mikurensis gen. nov., sp. nov., isolated from a marine alga, and proposal of Phycisphaeraeaceae fam. nov., Phycisphaerales ord. nov. and Phycisphaerae classis nov. in the phylum Planctomycetes. *The Journal of general and applied microbiology*, v. 55, n. 4, p. 267–75, 2009.

FUX, C.; SIEGRIST, H. Nitrogen removal from sludge digester liquids by nitrification/denitrification or partial nitrification/anammox: environmental and economical considerations. *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research*, v. 50, n. 10, p. 19–

26, 2004.

GAO, T.; TAO, Y. Versatility and application of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 91, p. 887–894, 2011.

GARCIA, J. L.; PATEL, B. K. .; OLLIVIER, B. Taxonomic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of Methanogenic Archaea. *Anaerobe*, v. 6, n. 4, p. 205–226, 2000.

GARRITY, G.; BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer [s.l.: s.n.].

GILBERT, E. M.; AGRAWAL, S.; BRUNNER, F.; SCHWARTZ, T.; HORN, H.; LACKNER, S. Response of Different Nitrospira Species To Anoxic Periods Depends on Operational DO. *Environmental Science & Technology*, v. 48, n. 5, p. 2934–2941, 2014.

GONZALEZ-GIL, G.; SOUGRAT, R.; BEHZAD, A. R.; LENS, P. N. L.; SAIKALY, P. E. Microbial Community Composition and Ultrastructure of Granules from a Full-Scale Anammox Reactor. *Microbial Ecology*, v. 70, n. 1, p. 118–131, 2015.

GONZALEZ-MARTINEZ, A.; MORILLO, J. A.; GARCIA-RUIZ, M. J.; GONZALEZ-LOPEZ, J.; OSORIO, F.; MARTINEZ-TOLEDO, M. V.; LOOSDRECHT, M. C. M. VAN. Archaeal populations in full-scale autotrophic nitrogen removal bioreactors operated with different technologies: CANON, DEMON and partial nitrification/anammox. *Chemical Engineering Journal*, v. 277, p. 194–201, 2015a.

GONZALEZ-MARTINEZ, A.; OSORIO, F.; RODRIGUEZ-SANCHEZ, A.; MARTINEZ-TOLEDO, M. V.; GONZALEZ-LOPEZ, J.; LOTTI, T.; LOOSDRECHT, M. C. M. VAN. Bacterial community structure of a lab-scale anammox membrane bioreactor. *Biotechnology Progress*, v. 31, n. 1, p. 186–193, 2015b.

GONZALEZ-MARTINEZ, A.; RODRIGUEZ-SANCHEZ, A.; RODELAS, B.; ABBAS, B. A.; MARTINEZ-TOLEDO, M. V.; LOOSDRECHT, M. C. M. VAN; OSORIO, F.; GONZALEZ-LOPEZ, J. 454-Pyrosequencing Analysis of Bacterial Communities from Autotrophic Nitrogen Removal Bioreactors Utilizing Universal Primers: Effect of Annealing Temperature. *BioMed Research International*, v. 2015, p. 1–12, 2015c.

GONZALEZ-MARTINEZ, A.; RODRIGUEZ-SANCHEZ, A.; MARTINEZ-TOLEDO, M. V.; GARCIA-RUIZ, M.-J.; HONTORIA, E.; OSORIO-ROBLES, F.; GONZALEZ-LOPEZ, J. Effect of ciprofloxacin antibiotic on the partial-nitrification process and bacterial community structure of a submerged biofilter. *Science of The Total Environment*, v. 476–477, p. 276–287, 2014.

GOODWIN, S.; MCPHERSON, J. D.; MCCOMBIE, W. R. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, v. 17, n. 6, p. 333–351, 2016.

GORI, F.; TRINGE, S. G.; KARTAL, B.; MACHIORI, E.; JETTEN, M. S. M. The metagenomic basis of anammox metabolism in Candidatus 'Brocadia fulgida'. *Biochemical Society Transactions*, v. 39, n. 6, p. 1799–1804, 2011.

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.

GUVEN, D. *et al.* Propionate Oxidation by and Methanol Inhibition of Anaerobic Ammonium-Oxidizing Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 2, p. 1066–1071, 1 fev. 2005.

HE, S.; NIU, Q.; MA, H.; ZHANG, Y.; LI, Y.-Y. The Treatment Performance and the Bacteria Preservation of Anammox: A Review. *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 226, n. 5, p. 163, 2015.

HELLINGA, C.; SCHELLEN, A. A. J. C.; MULDER, J. W.; LOOSDRECHT, M. C. M. VAN; HEJINEN, J. J. The sharon process: An innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich waste water. *Water Science and Technology*, v. 37, n. 9, 1998.

HEYLEN, K.; LEBBE, L.; VOS, P. DE. *Acidovorax caeni* sp. nov., a denitrifying species with

- genetically diverse isolates from activated sludge. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 58, n. 1, p. 73–77, 2008.
- HIRAS, J.; WU, Y.-W.; EICHORST, S. A.; SIMMONS, B. A.; SINGER, S. W. Refining the phylum Chlorobi by resolving the phylogeny and metabolic potential of the representative of a deeply branching, uncultivated lineage. *The ISME Journal*, v. 10, n. 4, p. 833–845, 2016.
- HONG, Y.-G.; LI, M.; CAO, H.; GU, J.-D. Residence of Habitat-Specific Anammox Bacteria in the Deep-Sea Subsurface Sediments of the South China Sea: Analyses of Marker Gene Abundance with Physical Chemical Parameters. *Microbial Ecology*, v. 62, n. 1, p. 36–47, 2011.
- HU, Z.; SPETH, D. R.; FRANCOIJS, K.-J.; QUAN, Z.-X.; JETTEN, M. S. M. Metagenome Analysis of a Complex Community Reveals the Metabolic Blueprint of Anammox Bacterium “Candidatus Jettenia asiatica”. *Frontiers in Microbiology*, v. 3, n. 366, p. 1–9, 2012.
- HU, B.; ZHENG, P.; TANG, C.; CHEN, J.; BIEZEN, E. VAN DER; ZHANG, L.; NI, B.; JETTEN, M. S. M.; YAN, J.; YU, H.-Q.; KARTAL, B. Identification and quantification of anammox bacteria in eight nitrogen removal reactors. *Water Research*, v. 44, n. 17, p. 5014–5020, 2010.
- HUANG, X.-L.; GAO, D.-W.; TAO, Y.; WANG, X.-L. C2/C3 fatty acid stress on anammox consortia dominated by Candidatus Jettenia asiatica. *Chemical Engineering Journal*, v. 253, p. 402–407, 2014.
- HUANG, Z.; GEDALANGA, P. B.; ASVAPATHANAGUL, P.; OLSON, B. H. Influence of physicochemical and operational parameters on Nitrobacter and Nitrospira communities in an aerobic activated sludge bioreactor. *Water Research*, v. 44, n. 15, p. 4351–4358, 2010.
- HUGENHOLTZ, P.; TYSON, G. W.; BLACKALL, L. L.; BJÖRNSSON, L. Filamentous Chloroflexi (green non-sulfur bacteria) are abundant in wastewater treatment processes with biological nutrient removal. *Microbiology*, v. 148, n. 8, p. 2309–2318, 2002.
- HUGENHOLTZ, P.; TYSON, G. W.; WEBB, R. I.; WAGNER, A. M.; BLACKALL, L. L. Investigation of Candidate Division TM7, a Recently Recognized Major Lineage of the Domain Bacteria with No Known Pure-Culture Representatives. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 1, p. 411–419, 2001.
- IINO, T.; MORI, K.; UCHINO, Y.; NAKAGAWA, T.; HARAYAMA, S.; SUZUKI, K. -I. Ignavibacterium album gen. nov., sp. nov., a moderately thermophilic anaerobic bacterium isolated from microbial mats at a terrestrial hot spring and proposal of Ignavibacteria classis nov., for a novel lineage at the periphery of green sulfur bacteria. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 60, n. 6, p. 1376–1382, 2010.
- INOUE, J.; OSHIMA, K.; SUDA, W.; SAKAMOTO, M.; IINO, T.; NODA, S.; HONGO, Y.; HATTORI, M.; OHKUMA, M. Distribution and Evolution of Nitrogen Fixation Genes in the Phylum Bacteroidetes. *Microbes and environments*, v. 30, n. 1, p. 44–50, 2015.
- IPEA. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. *Diagnóstico dos Resíduos Sólidos Urbanos*. Brasília: IPEA., 2012.
- ISANTA, E.; BEZERRA, T.; FERNÁNDEZ, I.; SUÁREZ-OJEDA, M. E.; PÉREZ, J.; CARRERA, J. Microbial community shifts on an anammox reactor after a temperature shock using 454-pyrosequencing analysis. *Bioresource Technology*, v. 181, p. 207–213, 2015.
- JANG, H. M.; KIM, M.-S.; HA, J. H.; PARK, J. M. Reactor performance and methanogenic archaea species in thermophilic anaerobic co-digestion of waste activated sludge mixed with food wastewater. *Chemical Engineering Journal*, v. 276, p. 20–28, 2015.
- JEANNINGROS, Y.; VLAEMINCK, S. E.; KALDATE, A.; VERSTRAETE, W.; GRAVELEAU, L. Fast start-up of a pilot-scale deammonification sequencing batch reactor from an activated sludge inoculum. *Water Science & Technology*, v. 61, n. 6, p. 1393, 2010.
- 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.

JENSEN, M. M.; LAM, P.; REVSBECH, N. P.; NAGEL, B.; GAYE, B.; JETTEN, M. S. M.; KUYPERS, M. M. M. Intensive nitrogen loss over the Omani Shelf due to anammox coupled with dissimilatory nitrite reduction to ammonium. *Geomicrobiology and Microbial Contribution to Geochemical Cycles*, v. 5, p. 1660–1670, 2011.

JETTEN, M. S. M.; NIFTRIK, L. VAN; STROUS, M.; KARTAL, B.; KELTJENS, J. T.; OP DEN CAMP, H. J. M. Biochemistry and molecular biology of anammox bacteria. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, v. 44, n. 2–3, p. 65–84, 2009.

JETTEN, M. S.; STROUS, M.; PAS-SCHOONEN, K. T. VAN DE; SCHALK, J.; DONGEN, U. G. VAN; GRAAF, A. A. VAN DE; LOGEMANN, S.; MUYZER, G.; LOOSDRECHT, M. C. VAN; KUENEN, J. G. The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS microbiology reviews*, v. 22, n. 5, p. 421–37, 1998.

JIANG, A.; ZHANG, T.; ZHAO, Q.-B.; LI, X.; CHEN, S.; FREAR, C. S. Evaluation of an integrated ammonia stripping, recovery, and biogas scrubbing system for use with anaerobically digested dairy manure. *Biosystems Engineering*, v. 119, p. 117–126, 2014.

JIN, R.-C.; YANG, G.-F.; YU, J.-J.; ZHENG, P. The inhibition of the Anammox process: A review. *Chemical Engineering Journal*, v. 197, p. 67–79, 2012.

JOSS, A.; DERLON, N.; CYPRIEN, C.; BURGER, S.; SZIVAK, I.; TRABER, J.; SIEGRIST, H.; MORGENROTH, E. Combined Nitritation - Anammox : Advances in Understanding Process Stability. *Environmental Science & Technology*, v. 45, p. 9735–9742, 2011.

JOSS, A.; SALZGEBER, D.; EUGSTER, J.; KÖNIG, R.; ROTTERMANN, K.; BURGER, S.; FABIJAN, P.; LEUMANN, S.; MOHN, J.; SIEGRIST, H. Full-Scale Nitrogen Removal from Digester Liquid with Partial Nitritation and Anammox in One SBR. *Environmental Science & Technology*, v. 43, n. 14, p. 5301–5306, 2009.

KANG, H.; JOH, K.; JOUNG, Y.; JANG, T. Y.; KIM, H. *Ferruginibacter paludis* sp. nov., isolated from wetland freshwater, and emended descriptions of *Ferruginibacter lapsinanis* and *Ferruginibacter alkalilentus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 65, n. 8, p. 2635–2639, 2015.

KARTAL, B.; NIFTRIK, L. VAN; RATTRAY, J.; VOSENBERG, J. L. C. M. VAN DE; SCHMID, M. C.; SINNINGHE DAMSTÉ, J.; JETTEN, M. S. M.; STROUS, M. Candidatus “*Brocadia fulgida*”: an autofluorescent anaerobic ammonium oxidizing bacterium. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 63, n. 1, p. 46–55, 2008.

KARTAL, B.; RATTRAY, J.; NIFTRIK, L. A. VAN; VOSENBERG, J. VAN DE; 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, n. 1, p. 39–49, 2007.

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, n. 5, p. 628–636, 2013.

KINDAICHI, T.; ITO, T.; OKABE, S. Ecophysiological Interaction between Nitrifying Bacteria and Heterotrophic Bacteria in Autotrophic Nitrifying Biofilms as Determined by Microautoradiography-Fluorescence In Situ Hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, n. 3, p. 1641–1650, 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.

- KINDAICHI, T.; YURI, S.; OZAKI, N.; OHASHI, A. Ecophysiological role and function of uncultured Chloroflexi in an anammox reactor. *Water Science & Technology*, v. 66, n. 12, p. 2556, 2012.
- KOCH, H.; LÜCKER, S.; ALBERTSEN, M.; KITZINGER, K.; HERBOLD, C.; SPIECK, E.; NIELSEN, P. H.; WAGNER, M.; DAIMS, H. Expanded metabolic versatility of ubiquitous nitrite-oxidizing bacteria from the genus *Nitrospira*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 112, n. 36, p. 11371–11376, 2015.
- KOZICH, J. J.; WESTCOTT, S. L.; BAXTER, N. T.; HIGHLANDER, S. K.; SCHLOSS, P. D. Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence Data on the MiSeq Illumina Sequencing Platform. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 79, n. 17, p. 5112–5120, 2013.
- KUAI, L.; VERSTRATE, W. Ammonium Removal by the Oxygen-Limited Autotrophic Nitrification-Denitrification System. *Applied and environmental microbiology*, v. 64, n. 11, p. 4500–4506, 1998.
- LA RUBIA, M. Á. DE; WALKER, M.; HEAVEN, S.; BANKS, C. J.; BORJA, R. Preliminary trials of in situ ammonia stripping from source segregated domestic food waste digestate using biogas: Effect of temperature and flow rate. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 24, p. 9486–9492, 2010.
- LACKNER, S.; GILBERT, E. M.; VLAEMINCK, S. E.; JOSS, A.; HORN, H.; LOOSDRECHT, M. C. M. VAN. Full-scale partial nitritation/anammox experiences - An application survey. *Water Research*, v. 55, n. 0, p. 292–303, 2014.
- LANGLOIS, P. A.; SNELLING, J.; HAMILTON, J. P.; BRAGARD, C.; KOEBNIK, R.; VERDIER, V.; TRIPLETT, L. R.; BLOM, J.; TISSERAT, N. A.; LEACH, J. E. Characterization of the *Xanthomonas translucens* Complex Using Draft Genomes, Comparative Genomics, Phylogenetic Analysis, and Diagnostic LAMP Assays. *Phytopathology*, v. 107, n. 5, p. 519–527, maio 2017.
- LARA, B. S. *Avaliação e comparação de diferentes estratégias para o enriquecimento de bactérias anammox*. Belo Horizonte, 2009, 109 p. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.
- LAURENI, M.; FALÅS, 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.
- LAUTERBOCK, B.; ORTNER, M.; HAIDER, R.; FUCHS, W. Counteracting ammonia inhibition in anaerobic digestion by removal with a hollow fiber membrane contactor. *Water Research*, v. 4861–4869, 2012.
- 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. *Nature Communications*, v. 8, p. 15416, 2017.
- LEAL, C. D.; PEREIRA, A. D.; NUNES, F. T.; FERREIRA, L. O.; COELHO, A. C. C.; BICALHO, S. K.; CONELL, E. F. A. MAC; RIBEIRO, T. B.; LEMOS CHERNICHARO, C. A. DE; ARAÚJO, J. C. DE. 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.
- LEI, X.; MAEKAWA, T. Electrochemical treatment of anaerobic digestion effluent using a Ti/Pt–IrO<sub>2</sub> electrode. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 3521–3525, 2007.
- LI-DONG, S.; AN-HUI, H.; REN-CUN, J.; DONG-QING, C.; PING, Z.; XIANG-YANG, Z.; BAO-LAN, X. Enrichment of anammox bacteria from three sludge sources for the startup of monosodium glutamate industrial wastewater treatment system. *Journal of Hazardous Materials*, v. 199–200, p. 193–199, 2012.
- LI, H.; CHEN, S.; MU, B.-Z.; GU, J.-D. Molecular Detection of Anaerobic Ammonium-Oxidizing (Anammox) Bacteria in High-Temperature Petroleum Reservoirs. *Microbial Ecology*, v. 60, n. 4, p.

771–783, 2010.

LI, X.-R.; DU, B.; FU, H.-X.; WANG, R.-F.; SHI, J.-H.; WANG, Y.; JETTEN, M. S. M.; QUAN, Z.-X. The bacterial diversity in an anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) reactor community. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 32, n. 4, p. 278–289, 2009.

LIANG, Y.; LI, D.; ZHANG, X.; ZENG, H.; YANG, Y.; ZHANG, J. Nitrate removal by organotrophic anaerobic ammonium oxidizing bacteria with C2/C3 fatty acid in upflow anaerobic sludge blanket reactors. *Bioresource Technology*, v. 193, p. 408–414, 2015.

LIANG, Z.; LIU, J. Landfill leachate treatment with a novel process: Anaerobic ammonium oxidation (Anammox) combined with soil infiltration system. *Journal of Hazardous Materials*, v. 151, n. 1, p. 202–212, 2008.

LIN, L.; YANG, L.; XU, F.; MICHEL, F. C.; LI, Y. Comparison of solid-state anaerobic digestion and composting of yard trimmings with effluent from liquid anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, v. 169, p. 439–446, 2014.

LINDSAY, M. R.; WEBB, R. I.; STROUS, M.; JETTEN, M. S.; BUTLER, M. K.; FORDE, R. J.; FUERST, J. A. Cell compartmentalisation in planctomycetes: novel types of structural organisation for the bacterial cell. *Archives of microbiology*, v. 175, n. 6, p. 413–29, 2001.

LIU, Z.; FRIGAARD, N.-U.; VOGL, K.; IINO, T.; OHKUMA, M.; OVERMANN, J.; BRYANT, D. A. Complete Genome of *Ignavibacterium album*, a Metabolically Versatile, Flagellated, Facultative Anaerobe from the Phylum Chlorobi. *Frontiers in Microbiology*, v. 3, 2012.

LIU, S.; GONG, Z.; YANG, F.; ZHANG, H.; SHI, L.; FURUKAWA, K. Combined process of urea nitrogen removal in anaerobic Anammox co-culture reactor. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 6, p. 1722–1728, 2008a.

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, n. 15, p. 6817–6825, 2008b.

LIU, Y.; BALKWILL, D. L.; ALDRICH, H. C.; DRAKE, G. R.; BOONE, D. R. Characterization of the anaerobic propionate-degrading syntrophs *Smithella propionica* gen. nov., sp. nov. and *Syntrophobacter wolinii*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 49, n. 2, p. 545–556, 1999.

LÓPEZ, H.; PUIG, S.; GANIGUÉ, R.; RUSCALLEDA, M.; BALAGUER, M. D.; COLPRIM, J. Start-up and enrichment of a granular anammox SBR to treat high nitrogen load wastewaters. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 83, n. 3, p. 233–241, 2008.

LV, Y.; JU, K.; WANG, L.; SUN, T.; MIAO, R.; WANG, X.; WEI, F.; XIA, S. In situ probing of microbial activity within anammox granular biomass with microelectrodes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 121, n. 4, p. 450–456, 2016.

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. 981–990, 2016.

MA, Y.; SUNDAR, S.; PARK, H.; CHANDRAN, K. The effect of inorganic carbon on microbial interactions in a biofilm nitrification-anammox process. *Water Research*, v. 70, p. 246–254, 2015.

MA, W. L.; QI, R.; ZHANG, Y.; WANG, J.; LIANG, C. Z.; YANG, M. Performance of a successive hydrolysis, denitrification and nitrification system for simultaneous removal of COD and nitrogen from terramycin production wastewater. *Biochemical Engineering Journal*, v. 45, n. 1, p. 30–34, 2009.

MAC CONELL, E. F. A. *Caracterização da comunidade bacteriana de filtros biológicos percoladores tratando efluente anaeróbio*. Belo Horizonte, 2014, 159 p. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. *Microbiologia de Brock*. 12<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1128 p.

- MAGRÍ, A.; BÉLINE, F.; DABERT, P. Feasibility and interest of the anammox process as treatment alternative for anaerobic digester supernatants in manure processing e An overview. *Journal of Environmental Management*, v. 131, p. 170–184, 2013.
- MAGURRAN, A. E. *Measuring Biological Diversity*. Blackwel Science Ltd.
- MAO, N.; REN, H.; GENG, J.; DING, L.; XU, K. Engineering application of anaerobic ammonium oxidation process in wastewater treatment. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 33, n. 8, p. 153, 2017.
- MARTINEAU, C.; MAUFFREY, F.; VILLEMUR, R. Comparative Analysis of Denitrifying Activities of *Hyphomicrobium nitratorans*, *Hyphomicrobium denitrificans*, and *Hyphomicrobium zavarzinii*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 81, n. 15, p. 5003–5014, 2015.
- MCBRIDE, M. J.; ZHU, Y. Gliding Motility and Por Secretion System Genes Are Widespread among Members of the Phylum Bacteroidetes. *Journal of Bacteriology*, v. 195, n. 2, p. 270–278, 2013.
- MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, v. 8, n. 4, p. e61217, 2013.
- MERGAERT, J. *Thermomonas fusca* sp. nov. and *Thermomonas brevis* sp. nov., two mesophilic species isolated from a denitrification reactor with poly(ε-caprolactone) plastic granules as fixed bed, and emended description of the genus *Thermomonas*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 53, n. 6, p. 1961–1966, 2003.
- MIAO, L.; WANG, S.; CAO, T.; PENG, Y.; ZHANG, M.; LIU, Z. Advanced nitrogen removal from landfill leachate via Anammox system based on Sequencing Biofilm Batch Reactor (SBBR): Effective protection of biofilm. *Bioresource Technology*, v. 220, p. 8–16, 2016a.
- MIAO, Y.; ZHANG, L.; YANG, Y.; PENG, Y.; LI, B.; WANG, S.; ZHANG, Q. Start-up of single-stage partial nitrification-anammox process treating low-strength swage and its restoration from nitrate accumulation. *Bioresource Technology*, v. 218, p. 771–779, 2016b.
- MIURA, Y.; WATANABE, Y.; OKABE, S. Significance of Chloroflexi in Performance of Submerged Membrane Bioreactors (MBR) Treating Municipal Wastewater. *Environmental Science & Technology*, v. 41, n. 22, p. 7787–7794, 2007.
- MOLINUEVO, B.; GARCIA, M.; KARAKASHEV, D.; ANGELIDAKI, I. 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.; GRAAF, A. A. VAN DE; 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.
- MURTO, M.; BJÖRNSSON, L.; MATTIASSON, B. Impact of food industrial waste on anaerobic co-digestion of sewage sludge and pig manure. *Journal of Environmental Management*, v. 70, n. 2, p. 101–107, 2004.
- NAKAJIMA, J.; SAKKA, M.; KIMURA, T.; FURUKAWA, K.; SAKKA, K. Enrichment of anammox bacteria from marine environment for the construction of a bioremediation reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 77, n. 5, p. 1159–1166, 2008.
- NARITA, Y.; ZHANG, L.; KIMURA, Z.; ALI, M.; FUJII, T.; OKABE, S. Enrichment and physiological characterization of an anaerobic ammonium-oxidizing bacterium ‘*Candidatus Brocadia sapporoensis*’. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 40, n. 7, p. 448–457, 2017.
- NHAT, P. T.; BIEC, H. N.; MAI, N. T. T.; THANH, B. X.; DAN, N. Application of a partial nitrification and anammox system for the old landfill leachate treatment. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 95, p. 144–150, 2014.
- 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.
- NIFTRIK, L. A.; FUERST, J. A.; DAMSTÄD, J. S. S.; KUENEN, J. G.; JETTEN, M. S. M.; STROUS, M. The anammoxosome: an intracytoplasmic compartment in anammox bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, v. 233, n. 1, p. 7–13, 2004.
- NIKOLAEV, Y. A. *et al.* Candidatus “*Jettenia moscovienalis*” sp. nov., a new species of bacteria carrying out anaerobic ammonium oxidation. *Microbiology*, v. 84, n. 2, p. 256–262, 2015.
- NKOA, R. Agricultural benefits and environmental risks of soil fertilization with anaerobic digestates: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, v. 34, n. 2, p. 473–492, 2014.
- OBAJA, D.; MACÉ, S.; COSTA, J.; SANS, C.; MATA-ALVAREZ, J. Nitrification, denitrification and biological phosphorus removal in piggery wastewater using a sequencing batch reactor. *Bioresource Technology*, v. 87, n. 1, p. 103–111, 2003.
- OH, S. E.; YOO, Y. B.; YOUNG, J. C.; KIM, I. S. Effect of organics on sulfur-utilizing autotrophic denitrification under mixotrophic conditions. *Journal of Biotechnology*, v. 92, n. 1, p. 1–8, 2001.
- OKABE, S.; KINDAICHI, T.; ITO, T. Fate of <sup>14</sup>C-Labeled Microbial Products Derived from Nitrifying Bacteria in Autotrophic Nitrifying Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 7, p. 3987–3994, 2005.
- OKSANEN, J.; BLANCHET, F. G.; KINDT, R.; LEGENDRE, P.; MINCHIRN, P. R. Vegan: community ecology package. *R package*, v. 2, p. 0–10, 2013.
- OSHIKI, M.; SHIMOKAWA, M.; FUJII, N.; SATOH, H.; OKABE, S. Physiological characteristics of the anaerobic ammonium-oxidizing bacterium “Candidatus *Brocadia sinica*”. *Microbiology*, v. 157, n. 6, p. 1706–1713, 2011.
- OSHIKI, M.; SHINYAKO-HATA, K.; SATOH, H.; OKABE, S. Draft Genome Sequence of an Anaerobic Ammonium-Oxidizing Bacterium, “Candidatus *Brocadia sinica*”. *Genome Announcements*, v. 3, n. 2, p. e00267-15, 2015.
- PARK, H.; BROTT, A. C.; LOOSDRECHT, M. C. M. VAN; CHANDRAN, K. Discovery and metagenomic analysis of an anammox bacterial enrichment related to Candidatus “*Brocadia caroliniensis*” in a full-scale glycerol-fed nitritation-denitritation separate centrate treatment process. *Water Research*, v. 111, p. 265–273, 2017.
- PARK, H.; SUNDAR, S.; MA, Y.; CHANDRAN, K. Differentiation in the microbial ecology and activity of suspended and attached bacteria in a nitritation-anammox process. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 112, n. 2, p. 272–279, 2015.
- PARK, H.; ROSENTHAL, A.; JEZEK, R.; RAMALINGAM, K.; FILLOS, J.; CHANDRAN, K. Impact of inocula and growth mode on the molecular microbial ecology of anaerobic ammonia oxidation (anammox) bioreactor communities. *Water Research*, v. 44, n. 17, p. 5005–5013, 2010a.
- PARK, H.; ROSENTHAL, A.; RAMALINGAM, K.; FILLOS, J.; CHANDRAN, K. Linking Community Profiles, Gene Expression and N-Removal in Anammox Bioreactors Treating Municipal Anaerobic Digestion Reject Water. *Environmental Science & Technology*, v. 44, n. 16, p. 6110–6116, 15 ago. 2010b.
- PASCUAL, J.; WÜST, P. K.; GEPPERT, A.; FOESEL, B. U.; HUBER, K. J.; OVERMANN, J. Novel isolates double the number of chemotrophic species and allow the first description of higher taxa in Acidobacteria subdivision 4. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 38, n. 8, p. 534–544, 2015.
- PEREIRA, A. D. *Caracterização microbiana e avaliação do efeito do fenol em um reator em batelada sequencial com atividade anammox*. Belo Horizonte, 2013, 128 p. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.
- PEREIRA, A. D.; LEAL, C. D.; DIAS, M. F.; ETCHEBEHERE, C.; CHERNICHARO, C. A. L.; ARAÚJO, J. C. DE. 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.
- PERSSON, F.; SUAREZ, C.; HERMANSSON, M.; PLAZA, E.; SULTANA, R.; WILÉN, B.-M. Community structure of partial nitrification-anammox biofilms at decreasing substrate concentrations and low temperature. *Microbial Biotechnology*, v. 10, n. 4, p. 761–772, 2017.
- PIWOWAREK, K.; LIPÍŃSKA, E.; HAĆ-SZYMAŃCZUK, E.; KIELISZEK, M.; ŚCIBISZ, I. Propionibacterium spp.—source of propionic acid, vitamin B12, and other metabolites important for the industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 102, n. 2, p. 515–538, 2018.
- QIAO, S.; NISHIYAMA, T.; FUJII, T.; BHATTI, Z.; FURUKAWA, K. Rapid startup and high rate nitrogen removal from anaerobic sludge digester liquor using a SNAP process. *Biodegradation*, v. 23, n. 1, p. 157–164, 2012.
- 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 Microbiology*, v. 10, n. 11, p. 3130–3139, 2008.
- QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F. O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, v. 41, n. D1, p. D590–D596, 2012.
- RAJAGOPAL, R.; ROUSSEAU, P.; BERNET, N.; BÉLINE, F. Combined anaerobic and activated sludge anoxic/oxic treatment for piggery wastewater. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 3, p. 2185–2192, 2011.
- REN, L.-F.; LIANG, S.; NGO, H. H.; GUO, W.; NI, S.-Q.; LIU, C.; ZHAO, Y.-K.; HIRA, D. Enhancement of anammox performance in a novel non-woven fabric membrane bioreactor (nMBR). *RSC Advances*, v. 5, n. 106, p. 86875–86884, 2015.
- 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.
- RUSCALLEDA, M.; LÓPEZ, H.; GANIGUÉ, R.; PUIG, S.; BALAGUER, M. D.; COLPRIM, J. Heterotrophic denitrification on granular anammox SBR treating urban landfill leachate. *Water Science & Technology*, v. 58, n. 9, p. 1749, 2008.
- SALLOTO, G. R. B.; CARDOSO, A. M.; COUTINHO, F. H.; PINTO, L. H.; VIEIRA, R. P.; CHAIA, C.; LIMA, J. L.; ALBANO, R. M.; MARTINS, O. B.; CLEMENTINO, M. M. Pollution Impacts on Bacterioplankton Diversity in a Tropical Urban Coastal Lagoon System. *PLoS ONE*, v. 7, n. 11, p. e51175, 2012.
- SÁNCHEZ GUILLÉN, J. A.; YIMMAN, Y.; LOPEZ VAZQUEZ, C. M.; BRDJANOVIC, D.; LIER, J. B. VAN. Effects of organic carbon source, chemical oxygen demand/N ratio and temperature on autotrophic nitrogen removal. *Water Science & Technology*, v. 69, n. 10, p. 2079, 2014.
- SANGKHOBOL, V.; SKERMAN, V. B. D. Chitinophaga, a New Genus of Chitinolytic Myxobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 31, n. 3, p. 285–293, 1981.
- SANTOS, C. E. D.; MOURA, R. B.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; FORESTI, E. Influence of COD/N ratio and carbon source on nitrogen removal in a structured-bed reactor subjected to recirculation and intermittent aeration (SBRRIA). *Journal of Environmental Management*, v. 166, p. 519–524, 2016.
- SCAGLIONE, D.; FICARA, E.; CORBELLINI, V.; TORNOTTI, G.; TELI, A.; CANZIANI, R.; MALPEI, F. Autotrophic nitrogen removal by a two-step SBR process applied to mixed agro-digestate. *Bioresource Technology*, v. 176, p. 98–105, 2015.
- SCHAEUNER, C. *et al.* Complete genome sequence of Planctomyces brasiliensis type strain (DSM 5305T), phylogenomic analysis and reclassification of Planctomycetes including the descriptions of Gimesia gen. nov., Planctopirus gen. nov. and Rubinisphaera gen. nov. and emended des. *Standards in Genomic Sciences*, v. 9, n. 1, p. 10, 2014.

- SCHIMID, M.; TWACHTMANN, U.; KLEIN, M. Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 23, p. 93–106, 2000.
- SCHLOSS, P. D. *et al.* Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, n. 23, p. 7537–7541, 2009.
- SCHMID, M. *et al.* Candidatus “Scalindua brodae”, sp. nov., Candidatus “Scalindua wagneri”, sp. nov., Two New Species of Anaerobic Ammonium Oxidizing Bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 26, n. 4, p. 529–538, 2003.
- SCHULZE, R.; SPRING, S.; AMANN, R.; HUBER, I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.-H.; KÄMPFER, P. Genotypic Diversity of Acidovorax Strains Isolated from Activated Sludge and Description of Acidovorax defluvii sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 22, n. 2, p. 205–214, 1999.
- SCHUSTER, S. C. Next-generation sequencing transforms today’s biology. *Nature Methods*, v. 5, n. 1, p. 16–18, 19 jan. 2008.
- SEGURA, A.; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, V.; MARQUÉS, S.; MOLINA, L. Insights in the regulation of the degradation of PAHs in Novosphingobium sp. HR1a and utilization of this regulatory system as a tool for the detection of PAHs. *Science of The Total Environment*, v. 590–591, p. 381–393, 2017.
- SHAW, L. J.; NICOL, G. W.; SMITH, Z.; FEAR, J.; PROSSER, J. I.; BAGGS, E. M. Nitrospira spp. can produce nitrous oxide via a nitrifier denitrification pathway. *Environmental Microbiology*, v. 8, n. 2, p. 214–222, fev. 2006.
- SHEETS, J. P.; YANG, L.; GE, X.; WANG, Z.; LI, Y. Beyond land application: Emerging technologies for the treatment and reuse of anaerobically digested agricultural and food waste. *Waste Management*, v. 44, p. 94–115, 2015.
- SHENG, K.; CHEN, X.; PAN, J.; KLOSS, R.; WEI, Y.; YING, Y. Effect of ammonia and nitrate on biogas production from food waste via anaerobic digestion. *Biosystems Engineering*, v. 116, n. 2, p. 205–212, 2013.
- SHIN, D. Y.; CHO, H. U.; UTOMO, J. C.; CHOI, Y.; PARK, J. M. Biodiesel production from Scenedesmus bijuga grown in anaerobically digested food wastewater effluent. *Bioresource Technology*, v. 184, p. 215–221, 2015.
- SHOKRALLA, S.; SPALL, J. L.; GIBSON, J. F.; HAJIBABAEI, M. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular Ecology*, v. 21, n. 8, p. 1794–1805, 2012.
- SILVA, C. C.; JESUS, E. C.; TORRES, A. P. R.; SOUSA, M. P.; SANTIAGO, V. M. J.; OLIVEIRA, V. M. Investigation of bacterial diversity in membrane bioreactor and conventional activated sludge processes from petroleum refineries using phylogenetic and statistical approaches. *Journal of microbiology and biotechnology*, v. 20, n. 3, p. 447–59, 2010.
- SIMON, C.; DANIEL, R. Metagenomic Analyses: Past and Future Trends. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, n. 4, p. 1153–1161, 2011.
- SLIEKERS, A. Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite in one single reactor. *Water Research*, v. 36, n. 10, p. 2475–2482, 2002.
- SMART, G. The effect of ammonia exposure on gill structure of the rainbow trout (Salmo gairdneri). *Journal of Fish Biology*, v. 8, p. 471–475, 1976.
- SONTHIPHAND, P.; NEUFELD, J. D. Evaluating Primers for Profiling Anaerobic Ammonia Oxidizing Bacteria within Freshwater Environments. *PLoS ONE*, v. 8, n. 3, p. e57242, 2013.
- SPETH, D. R.; IN ’T ZANDT, M. H.; GUERRERO-CRUZ, S.; DUTILH, B. E.; JETTEN, M. S. M. Genome-based microbial ecology of anammox granules in a full-scale wastewater treatment system.

*Nature Communications*, v. 7, p. 11172, 2016.

SPRING, S. *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, n. 1, p. 99–106, 2004.

STACKEBRANDT, E.; SCHEUNER, C.; GÖKER, M.; SCHUMANN, P. The Family Intrasporangiaceae. In: *The Prokaryotes*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. p. 397–424.

STROUS, M. *et al.* Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature*, v. 440, n. 7085, p. 790–794, 2006.

STROUS, M.; FUERST, J. A.; KRAMER, E. H. M.; LOGEMANN, S.; MUYZER, G.; PAS-SCHOONEN, K. T. VAN DE; WEBB, R.; KUENEN, J. G.; JETTEN, M. S. M. Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature*, v. 400, n. 6743, p. 446–449, 1999a.

STROUS, M.; KUENEN, J. G.; JETTEN, M. S. Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. *Applied and environmental microbiology*, v. 65, n. 7, p. 3248–50, 1999b.

STROUS, M.; HEIJNEN, J. J.; KUENEN, J. G.; JETTEM, 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, p. 589–596, 1998.

SU, C.; LEI, L.; DUAN, Y.; ZHANG, K.-Q.; YANG, J. Culture-independent methods for studying environmental microorganisms: methods, application, and perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 93, n. 3, p. 993–1003, 2012.

SUN, H. *et al.* Complete genome sequence of *Desulfarculus baarsii* type strain (2st14T). *Standards in Genomic Sciences*, v. 3, n. 3, p. 276–284, 2010.

SZATKOWSKA, B.; TRELA, J.; PLAZA, E. Partial nitrification/Anammox and CANON Nitrogen removal systems followed by conductivity measurements. Polish-Swedish seminars, Cracow March 17-18, 2005. *Anais...Cracow: 2005*

TAMAS, I.; SMIRNOVA, A. V.; HE, Z.; DUNFIELD, P. F. The (d)evolution of methanotrophy in the Beijerinckiaceae—a comparative genomics analysis. *The ISME Journal*, v. 8, n. 2, p. 369–382, 2014.

TAMPIO, E.; MARTTINEN, S.; RINTALA, J. Liquid fertilizer products from anaerobic digestion of food waste: mass, nutrient and energy balance of four digestate liquid treatment systems. *Journal of Cleaner Production*, v. 125, p. 22–32, 2016.

TAMPIO, E.; ERVASTI, S.; RINTALA, J. Characteristics and agronomic usability of digestates from laboratory digesters treating food waste and autoclaved food waste. *Journal of Cleaner Production*, v. 94, p. 86–92, 2015.

TANG, C.-J.; ZHENG, P.; ZHANG, L.; CHEN, J.-W.; MAHMOOD, Q.; CHEN, X.-G.; HU, B.-L.; WANG, C.-H.; YU, Y. Enrichment features of anammox consortia from methanogenic granules loaded with high organic and methanol contents. *Chemosphere*, v. 79, n. 6, p. 613–619, 2010.

THI, N. B. D.; KUMAR, G.; LIN, C. An overview of food waste management in developing countries: Current status and future perspective. *Journal of Environmental Management*, v. 157, p. 220–229, 2015.

TIGINI, V.; FRANCHINO, M.; BONA, F.; VARESE, G. C. Is digestate safe? A study on its ecotoxicity and environmental risk on a pig manure. *Science of The Total Environment*, v. 551–552, p. 127–132, 2016.

TOH, S.; ASHBOLT, N. Adaptation of anaerobic ammonium-oxidising consortium to synthetic coke-ovens wastewater. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 59, n. 2–3, p. 344–352, 2002.

TOH, S. K.; WEBB, R. I.; ASHBOLT, N. J. Enrichment of Autotrophic Anaerobic Ammonium-

- Oxidizing Consortia from Various Wastewaters., v. 43, n. 1, p. 154–167, 2002.
- TSUSHIMA, I.; OGASAWARA, Y.; KINDAICHI, T.; SATOH, H.; OKABE, S. Development of high-rate anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) biofilm reactors. *Water Research*, v. 41, n. 8, p. 1623–1634, 2007.
- ULLHYAN, A.; GOSH, K. Biodegradation of phenol with immobilized *Pseudomonas putida* activated carbon packed bio-filter tower. *African Journal of Biotechnology*, v. 11, n. 85, p. 15160–15167, 2012.
- VAN DE GRAAF, A. A.; BRUIJN, P.; ROBERTSON, L. A.; JETTEN, M. S. M.; KUENEN, J. G. Autotrophic growth anaerobic ammonium-oxidation micro-organisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology*, v. 142, p. 2187–2196, 1996.
- VAN DER STAR, W. R. L.; MICLEA, A. I.; DONGEN, U. G. J. M. VAN; MUYZER, G.; PICIOREANU, C.; LOOSDRECHT, M. C. M. VAN. The membrane bioreactor: A novel tool to grow anammox bacteria as free cells. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 101, n. 2, p. 286–294, 2008.
- VAN 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.; OP DEN CAMP, H. J. M.; KARTAL, B.; JETTEN, M. S. M.; LÜCKER, S. Complete nitrification by a single microorganism. *Nature*, v. 528, n. 7583, p. 555–559, 2015.
- VANEECKHAUTE, C.; MEERS, E.; MICHELS, E.; CHRISTIAENS, P.; TACK, F. M. G. Fate of Macronutrients in Water Treatment of Digestate Using Vibrating Reversed Osmosis. *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 223, n. 4, p. 1593–1603, 2012.
- VANOTTI, M. B.; SZOGI, A. A.; ROTHROCK, M. J. *Novel anammox bacterium isolate*, 2011. US Patent Application No. 13/013,874. US Patent & Trademark Office, Washington, DC, 2011.
- VÁZQUEZ-PADÍN, J. R.; POZO, M. J.; JARPA, M.; FIGUEROA, M.; FRANCO, A.; MOSQUERA-CORRAL, A.; CAMPOS, J. L.; MÉNDEZ, R. Treatment of anaerobic sludge digester effluents by the CANON process in an air pulsing SBR. *Journal of Hazardous Materials*, v. 166, n. 1, p. 336–341, 2009.
- VIANCELLI, A.; KUNZ, A.; ESTEVES, P. A.; BAUERMAN, F. V.; FURUKAWA, K.; FUJII, T.; ANTÔNIO, R. V.; VANOTTI, M. Bacterial biodiversity from an anaerobic up flow bioreactor with ANAMMOX activity inoculated with swine sludge. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 54, n. 5, p. 1035–1041, 2011.
- VON SPERLIN, M. *Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos*. 3ª ed. Belo Horizonte: DESA, UFMG, 2005.
- VON SPERLING, M. *Lodos ativados*. 2º ed. ed. Belo Horizonte: UFMG, 2002.
- VOSSENBERG, J. VAN DE *et al.* The metagenome of the marine anammox bacterium ‘*Candidatus Scalindua profunda*’ illustrates the versatility of this globally important nitrogen cycle bacterium. *Environmental Microbiology*, v. 15, n. 5, p. 1275–1289, 2013.
- WAKI, M.; YASUDA, T.; FUKUMOTO, Y.; KURODA, K.; SUZUKI, K. Effect of electron donors on anammox coupling with nitrate reduction for removing nitrogen from nitrate and ammonium. *Bioresource Technology*, v. 130, p. 592–598, 2013.
- WALKER, M.; IYER, K.; HEAVEN, S.; BANKS, C. J. Ammonia removal in anaerobic digestion by biogas stripping: An evaluation of process alternatives using a first order rate model based on experimental findings. *Chemical Engineering Journal*, v. 178, p. 138–145, 2011.
- WANG, G.; XU, X.; ZHOU, L.; WANG, C.; YANG, F. A pilot-scale study on the start-up of partial nitrification-anammox process for anaerobic sludge digester liquor treatment. *Bioresource Technology*, v. 241, p. 181–189, 2017.

- WANG, B.; PENG, Y.; GUO, Y.; ZHAO, M.; WANG, S. Illumina MiSeq sequencing reveals the key microorganisms involved in partial nitrification followed by simultaneous sludge fermentation, denitrification and anammox process. *Bioresource Technology*, v. 207, p. 118–125, 2016a.
- WANG, Z.; PENG, Y.; MIAO, L.; CAO, T.; ZHANG, F.; WANG, S.; HAN, J. Continuous-flow combined process of nitrification and ANAMMOX for treatment of landfill leachate. *Bioresource Technology*, v. 214, p. 514–519, 2016b.
- WANG, X.; YANG, G.; FENG, Y.; REN, G.; HAN, X. Optimizing feeding composition and carbon–nitrogen ratios for improved methane yield during anaerobic co-digestion of dairy, chicken manure and wheat straw. *Bioresource Technology*, v. 120, p. 78–83, set. 2012.
- WANG, T.; ZHANG, H.; GAO, D.; YANG, F.; YANG, S.; JIANG, T.; ZHANG, G. Enrichment of Anammox bacteria in seed sludges from different wastewater treating processes and start-up of Anammox process. *Desalination*, v. 271, n. 1–3, p. 193–198, 2011.
- WANG, Q.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M.; COLE, J. R. Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, n. 16, p. 5261–5267, 2007.
- WANTAWIN, C.; JUATEEA, J.; NOOPHAN, P. L.; MUNAKATA-MARR, J. Autotrophic nitrogen removal in sequencing batch biofilm reactors at different oxygen supply modes. *Water Science & Technology*, v. 58, n. 10, p. 1889–1994, 2008.
- WARD, L. M.; HEMP, J.; PACE, L. A.; FISCHER, W. W. Draft Genome Sequence of *Leptolinea tardivitalis* YMTK-2, a Mesophilic Anaerobe from the Chloroflexi Class Anaerolineae. *Genome Announcements*, v. 3, n. 6, p. e01356-15, 2015.
- WARD, N. L. *et al.* Three Genomes from the Phylum Acidobacteria Provide Insight into the Lifestyles of These Microorganisms in Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, n. 7, p. 2046–2056, 2009.
- WELSH, A.; CHEE-SANFORD, J. C.; CONNOR, L. M.; LÖFFLER, F. E.; SANFORD, R. A. Refined NrfA Phylogeny Improves PCR-Based nrfA Gene Detection. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 80, n. 7, p. 2110–2119, 2014.
- WEON, H.-Y.; YOO, S.-H.; KIM, Y.-J.; SON, J.-A.; KIM, B.-Y.; KWON, S.-W.; KOO, B.-S. *Chitinophaga niabensis* sp. nov. and *Chitinophaga niastensis* sp. nov., isolated from soil. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, v. 59, n. 6, p. 1267–1271, 2009.
- WETT, B. Development and implementation of a robust deammonification process. *Water Science & Technology*, v. 56, n. 7, p. 81, out. 2007.
- WETT, B. Solved upscaling problems for implementing deammonification of rejection water. *Water science and technology*, v. 53, n. 12, p. 121–8, 2006.
- WIRTHENSOHN, T.; WAEGER, F.; JELINEK, L.; FUCHS, W. Ammonium removal from anaerobic digester effluent by ion exchange. *Water Science and Technology*, v. 60, n. 1, p. 201–210, 2009.
- 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. A microdiversity study of anammox bacteria reveals a novel *Candidatus Scalindua* phylotype in marine oxygen minimum zones. *Environmental Microbiology*, v. 10, n. 11, p. 3106–3119, 2008.
- XIA, Y.; KONG, Y.; THOMSEN, T. R.; HALKJAER NIELSEN, P. Identification and Ecophysiological Characterization of Epiphytic Protein-Hydrolyzing Saprospiraceae (“*Candidatus Epiflobacter*” spp.) in Activated Sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, n. 7, p. 2229–2238, 2008.
- XU, G.; ZHOU, Y.; YANG, Q.; LEE, Z. M.-P.; GU, J.; LAY, W.; CAO, Y.; LIU, Y. The challenges of mainstream deammonification process for municipal used water treatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 99, n. 6, p. 2485–2490, 2015.

- YANG, T.; LIU, Q.; HAO, Q.; FU, Z. Quinoline's influence on nitrogen removal performance and microbial community composition of the anammox process. *Environmental Technology*, p. 1–13, 2018.
- YANG, J.; TRELA, J.; ZUBROWSKA-SUDOL, M.; PLAZA, E. Intermittent aeration in one-stage partial nitrification/anammox process. *Ecological Engineering*, v. 75, p. 413–420, 2015.
- YANG, G.-F.; JIN, R.-C. The joint inhibitory effects of phenol, copper (II), oxytetracycline (OTC) and sulfide on Anammox activity. *Bioresource Technology*, v. 126, p. 187–192, 2012.
- YE, L.; LI, D.; ZHANG, J.; ZENG, H. Resuscitation of starved anaerobic ammonium oxidation sludge system: Impacts of repeated short-term starvation. *Bioresource Technology*, v. 263, p. 458–466, 2018.
- ZAMANZADEH, M.; HAGEN, L. H.; SVENSSON, K.; LINJORDET, R.; HORN, S. J. Anaerobic digestion of food waste - effect of recirculation and temperature on performance and microbiology. *Water Research*, v. 96, p. 246–254, 2016.
- ZHANG, L.; NARITA, Y.; GAO, L.; ALI, M.; OSHIKI, M.; ISHII, S.; OKABE, S. Microbial competition among anammox bacteria in nitrite-limited bioreactors. *Water Research*, v. 125, p. 249–258, 2017a.
- 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, 2017b.
- ZHANG, X.; ZHANG, F.; ZHAO, Y.; LI, Z. Start-Up and Aeration Strategies for a Completely Autotrophic Nitrogen Removal Process in an SBR. *BioMed Research International*, v. 2017, p. 1–8, 2017c.
- ZHANG, F.; PENG, Y.; MIAO, L.; WANG, Z.; WANG, S.; LI, B. A novel simultaneous partial nitrification Anammox and denitrification (SNAD) with intermittent aeration for cost-effective nitrogen removal from mature landfill leachate. *Chemical Engineering Journal*, v. 313, p. 619–628, 2017d.
- ZHANG, X.; ZHANG, H.; YE, C.; WEI, M.; DU, J. Effect of COD/N ratio on nitrogen removal and microbial communities of CANON process in membrane bioreactors. *Bioresource Technology*, v. 189, p. 302–308, 2015a.
- ZHANG, Z.-Z.; BUAYI, X.; CHENG, Y.-F.; ZHOU, Y.-H.; WANG, H.-Z.; JIN, R.-C. Anammox endogenous metabolism during long-term starvation: Impacts of intermittent and persistent modes and phosphates. *Separation and Purification Technology*, v. 151, p. 309–317, 2015b.
- ZHANG, J.; ZHOU, J.; HAN, Y.; ZHANG, X. Start-up and bacterial communities of single-stage nitrogen removal using anammox and partial nitrification (SNAP) for treatment of high strength ammonia wastewater. *Bioresource Technology*, v. 169, p. 652–657, 2014a.
- ZHANG, Z.; LIU, S. Hot topics and application trends of the anammox biotechnology: a review by bibliometric analysis. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 220, 2014b.
- ZHANG, Z.; LI, Y.; CHEN, S.; WANG, S.; BAO, X. Simultaneous nitrogen and carbon removal from swine digester liquor by the Canon process and denitrification. *Bioresource Technology*, v. 114, p. 84–89, 2012.
- ZHANG, S.; WANG, Q.; WAN, R.; XIE, S. Changes in bacterial community of anthracene bioremediation in municipal solid waste composting soil. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, v. 12, n. 9, p. 760–768, 2011.
- ZHANG, H. *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov., a Gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum Gemmatimonadetes phyl. nov. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, v. 53, n. 4, p. 1155–1163, 2003.
- ZHAO, D.; HUANG, R.; ZENG, J.; YU, Z.; LIU, P.; CHENG, S.; WU, Q. L. Pyrosequencing analysis of bacterial community and assembly in activated sludge samples from different geographic regions in China. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 98, n. 21, p. 9119–9128, 13 nov. 2014.

## APÊNDICE A - Estatística descritiva dos compostos nitrogenados e DQO durante as Fases 1, 2 e 3 de operação do RBS-Lab.

**Tabela A1** – Estatística descritiva das concentrações e eficiências de remoção de  $\text{N-NH}_4^+$ ,  $\text{N-NO}_2^-$  e  $\text{N-NO}_3^-$  no RBS-Lab durante a Fase 1 de operação

<b>Período I (0-84 dias) – atividade desnitrificante predominante</b>					
	<b>N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> afluente (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Eficiência de remoção N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (%)</b>	<b>N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> afluente (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Eficiência de remoção N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (%)</b>	<b>N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> efluente (mg.L<sup>-1</sup>)</b>
Nº de dados	33	33	33	33	
Média (DP)	45,8 (14,5)	-117 (141)	55,3 (11,0)	98 (5)	
Mediana	50,7	-28	60,7	100	
Mínimo	16,5	-435	32,5	79	NA
Máximo	62,3	20	65,4	100	
Percentil 25%	42,4	-245	56,6	99	
Percentil 75%	55,0	-12	61,4	100	
<b>Período II (85-100 dias) – diminuição da atividade desnitrificante</b>					
	<b>N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> afluente (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Eficiência de remoção N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (%)</b>	<b>N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> afluente (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Eficiência de remoção N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (%)</b>	<b>N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> efluente (mg.L<sup>-1</sup>)</b>
Nº de dados	10	10	10	10	
Média (DP)	63,9 (5,7)	26 (17)	75,0 (11,0)	53 (15)	
Mediana	66,4	29	60,7	47	
Mínimo	53,2	-6	32,5	32	NA
Máximo	67,1	48	65,4	85	
Percentil 25%	65,7	20,9	56,6	45	
Percentil 75%	67,1	36	61,4	55	
<b>Período III (100-285 dias) – atividade anammox predominante</b>					
	<b>N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> afluente (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Eficiência de remoção N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (%)</b>	<b>N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> afluente (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Eficiência de remoção N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (%)</b>	<b>N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> efluente (mg.L<sup>-1</sup>)</b>
Nº de dados	125	125	125	125	48
Média (DP)	138,3 (50,6)	96 (4)	184,3 (74,0)	99 (3)	32,8 (17,9)
Mediana	141,0	98	185,8	100	30,2
Mínimo	60,4	81	80,1	86	0,6
Máximo	224,2	100	333,7	100	82,4
Percentil 25%	91,6	95	122,4	100	21,8
Percentil 75%	193,1	100	253,5	100	44,3

<sup>a</sup> Não avaliado.

**Tabela A2** – Estatística descritiva dos coeficientes estequiométricos obtidos durante o Período III da Fase 1 de operação do RBS-Lab

	<b>Consumo N-NO<sub>2</sub>/ Consumo N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	<b>Produção N-NO<sub>3</sub>/ Consumo N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>
Nº de dados	125	48
Média (DP)	1,36 (0,16)	0,25 (0,13)
Mediana	1,35	0,26
Mínimo	0,96	0,01
Máximo	1,74	0,66
Percentil 25%	1,25	0,18
Percentil 75%	1,49	0,29

**Tabela A3** – Estatística descritiva das concentrações afluentes e efluentes, cargas aplicadas e removidas e eficiências de remoção de nitrogênio total (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> + N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) durante o período III da Fase 1 de operação do RBS-Lab

	<b>NT afluente (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>NT efluente (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Carga de NT aplicada (g.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>)</b>	<b>Carga de NT removida (g.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>)</b>	<b>Eficiência de remoção de NT (%)</b>
Nº de dados	48	48	48	48	48
Média (DP)	306,0 (115,7)	37,2 (19,4)	97,9 (37,0)	86,0 (33,6)	88 (6)
Mediana	298,5	37,7	95,5	81,9	88
Mínimo	141,7	1,0	45,3	35,5	65
Máximo	557,8	84,6	178,5	166,1	99
Percentil 25%	200,1	25,8	64,0	52,7	86
Percentil 75%	387,7	46,9	124,1	111,1	91

**Tabela A4** – Estatística descritiva das concentrações afluentes e efluentes, eficiências de remoção e cargas aplicadas e removidas dos compostos nitrogenados durante a Fase 2 de operação do RBS-Lab

	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> afluente (mg.L <sup>-1</sup> )	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> efluente (mg.L <sup>-1</sup> )	Eficiência remoção N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (%)	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> afluente (mg.L <sup>-1</sup> )	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> afluente (mg.L <sup>-1</sup> )	Eficiência remoção N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (%)	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> afluente (mg.L <sup>-1</sup> )	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> efluente (mg.L <sup>-1</sup> )	NT afluente (mg.L <sup>-1</sup> )	NT efluente (mg.L <sup>-1</sup> )	Carga de NT aplicada (g.m <sup>-3</sup> .d <sup>-1</sup> )	Carga de NT removida (g.m <sup>-3</sup> .d <sup>-1</sup> )	Eficiência remoção NT (%)
Nº de dados	38	38	38	38	38	38	22	22	22	22	22	22	22
Média	167,3	17,72	90	252,1	25,2	91	6,3	62,5	436,2	110,5	109,5	81,4	75
(DP)	(28,7)	(17,5)	(10)	(78,2)	(34,0)	(9)	(10,6)	(28,7)	(102,4)	(59,5)	(25,6)	(19,8)	(10)
Mediana	141,0	11,9	92	250,0	9,8	95	2,2	66,9	395,1	90,4	98,8	77,5	76
Mínimo	60,4	0,0	62	80,0	0,0	61	0,5	7,7	345,3	25,3	86,3	52,1	53
Máximo	224,2	64,3	100	400,0	155,3	100	38,3	120,9	619,8	284,1	155,0	134,8	93
Percentil 25%	147,3	0,0	80	200,0	3,5	86	1,4	50,2	368,1	57,2	92,0	71,1	69
Percentil 75%	175,4	34,1	100	250,0	37,7	98	5,2	81,7	435,6	147,8	108,9	84,7	83

**Tabela A5** – Estatística descritiva dos coeficientes estequiométricos Consumo de N-NO<sub>2</sub>-/ Consumo de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e Produção de N-NO<sub>3</sub>-/ Consumo de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> durante a Fase 2 de operação do RBS-Lab.

	Consumo N-NO <sub>2</sub> -/ Consumo N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Produção N-NO <sub>3</sub> -/ Consumo N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
Nº de dados	38	22
Média (DP)	1,52 (0,29)	0,43 (0,20)
Mediana	1,60	0,48
Mínimo	0,44	0,06
Máximo	1,91	0,86
Percentil 25%	1,25	0,32
Percentil 75%	1,49	0,55

**Tabela A6** - Estatística descritiva das concentrações afluentes, efluentes e da eficiência de remoção de DQO total durante a Fase 2 de operação do RBS-Lab

	DQO <sub>total</sub> afluente (mg.L <sup>-1</sup> )	DQO <sub>total</sub> efluente (mg.L <sup>-1</sup> )	Eficiência de remoção de DQO (%)
Nº de dados	26	26	26
Média (DP)	297,0 (54,6)	182,4 (51,6)	39 (13)
Mediana	290,2	188,0	41
Mínimo	236,1	73,7	16
Máximo	386,9	281,4	72
Percentil 25%	243,6	141,3	31
Percentil 75%	337,0	216,5	46

**Tabela A7** – Concentrações afluentes, efluentes e eficiências de remoção dos compostos nitrogenados durante a Fase 3 de operação do RBS-Lab

		<b>E1</b>	<b>E2</b>	<b>E3</b>	<b>E4</b>	<b>E5</b>	<b>E6</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>E7</b>	<b>E8</b>
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> afluente (mg.L <sup>-1</sup> )	N° de dados	24	34	41	20	25	38	23	30	33	27	30
	Média	163,8	148,2	164,4	166,9	180,0	176,3	127,5	102,8	214,0	200,5	164,4
	(DP)	(15,7)	(14,7)	(10,0)	(29,2)	(20,9)	(13,4)	(48,7)	(18,2)	(37,0)	(22,7)	(52,5)
	Mediana	166,2	150,2	162,4	156,2	179,9	176,6	99,4	94,3	224,7	205,8	177,6
	Mínimo	127,3	94,8	145,2	131,6	151,9	147,6	91,7	83,7	136,9	168,9	90,8
	Máximo	181,8	166,2	179,9	229,0	218,6	204,9	206,7	136,8	274,7	238,1	228,1
	Percentil 25%	163,7	143,4	157,9	148,2	161,0	171,8	94,5	89,0	194,3	178,0	101,8
	Percentil 75%	172,2	157,5	173,1	185,5	194,7	184,9	195,4	112,2	237,8	209,3	209,9
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> efluente (mg.L <sup>-1</sup> )	N° de dados	24	34	41	20	25	38	23	30	33	27	30
	Média	58,7	59,0	49,8	72,2	75,6	69,4	68,4	2,7	37,1	97,8	60,2
	(DP)	(22,0)	(9,7)	(11,0)	(24,1)	(10,5)	(36,2)	(34,3)	(6,6)	(25,2)	(29,0)	(36,9)
	Mediana	61,8	60,5	49,7	70,0	76,4	65,1	62,1	0,0	34,3	96,7	67,8
	Mínimo	13,4	38,2	31,0	23,9	48,4	4,4	21,5	0,0	0,0	24,7	0,0
	Máximo	92,6	92,6	70,4	109,8	94,4	132,0	124,2	23,4	79,2	134,6	122,2
	Percentil 25%	48,8	51,3	40,7	58,8	70,2	42,9	42,5	0,0	15,3	83,2	29,5
	Percentil 75%	76,5	64,6	56,6	93,3	82,5	98,0	101,5	0,8	60,4	121,2	92,1
Eficiência remoção N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (%)	N° de dados	24	34	41	20	25	38	22	30	33	27	30
	Média	63	60	70	57	58	61	50	97	83	50	65
	(DP)	(16)	(7)	(7)	(13)	(7)	(20)	(13)	(7)	(11)	(16)	(22)
	Mediana	63	61	70	57	57	65	46	100	85	46	62
	Mínimo	32	46	56	32	45	24	35	75	58	26	2
	Máximo	92	73	82	87	71	97	77	100	100	90	100
	Percentil 25%	56	54	63	49	53	45	40	99	75	41	58
	Percentil 75%	72	61	75	63	61	76	54	100	91	57	75

/Continua

		<b>E1</b>	<b>E2</b>	<b>E3</b>	<b>E4</b>	<b>E5</b>	<b>E6</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>E7</b>	<b>E8</b>
N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> afluente (mg.L <sup>-1</sup> )	N° de dados	24	34	41	23	25	38	23	30	33	27	30
	Média	0,2	0,6	0,8	0,6	3,0	1,1	100,2	146,2	180,3	0,2	0,7
	(DP)	(0,4)	(0,4)	(0,7)	(0,4)	(1,2)	(0,7)	(35,8)	(25,8)	(25,2)	(0,1)	(0,5)
	Mediana	0,0	0,6	0,8	0,6	3,4	1,3	77,7	130,1	201,1	0,1	0,6
	Mínimo	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	75,1	121,8	150,3	0,1	0,1
	Máximo	1,0	1,7	2,0	1,2	3,8	3,4	155,3	191,7	204,9	0,5	1,3
	Percentil 25%	0,0	0,3	0,1	0,3	3,3	0,7	77,2	128,9	151,7	0,1	0,2
	Percentil 75%	0,2	0,8	1,3	0,7	3,5	1,3	150,0	177,1	201,2	0,3	1,2
N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> efluente (mg.L <sup>-1</sup> )	N° de dados	24	34	41	23	25	38	23	30	33	27	30
	Média	0,0	0,2	0,1	0,2	0,1	0,5	25,7	5,5	0,8	1,0	0,2
	(DP)	(0,1)	(0,4)	(0,2)	(0,2)	(0,1)	(0,2)	(21,6)	(7,9)	(2,0)	(3,2)	(0,3)
	Mediana	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,5	20,7	0,2	0,1	0,4	0,1
	Mínimo	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Máximo	0,3	2,0	1,2	0,6	0,4	1,1	66,1	30,1	9,3	17,1	1,0
	Percentil 25%	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,3	5,8	0,0	0,0	0,2	0,0
	Percentil 75%	0,0	0,1	0,1	0,2	0,1	0,6	44,5	9,5	0,3	0,5	0,3
Eficiência remoção N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (%)	N° de dados	-	-	-	-	-	-	23	30	33	-	-
	Média	-	-	-	-	-	-	77	96	100	-	-
	(DP)	-	-	-	-	-	-	(20)	(6)	(1)	-	-
	Mediana	-	-	-	-	-	-	77	100	100	-	-
	Mínimo	-	-	-	-	-	-	34	77	94	-	-
	Máximo	-	-	-	-	-	-	100	100	100	-	-
	Percentil 25%	-	-	-	-	-	-	64	95	100	-	-
	Percentil 75%	-	-	-	-	-	-	95	100	100	-	-

/Continua

		<b>E1</b>	<b>E2</b>	<b>E3</b>	<b>E4</b>	<b>E5</b>	<b>E6</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>E7</b>	<b>E8</b>
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> afluente (mg.L <sup>-1</sup> )	Nº de dados	14	27	27	15	15	22	16	-	25	19	17
	Média	3,1	1,5	1,5	1,1	7,0	5,5	7,4	-	0,3	1,0	2,9
	(DP)	(1,4)	(1,4)	(1,5)	(0,7)	(4,1)	(3,4)	(2,5)	-	(0,6)	(0,8)	(1,4)
	Mediana	2,6	1,0	1,5	0,9	9,4	3,7	7,7	-	0,0	0,6	2,2
	Mínimo	1,4	0,2	0,0	0,0	0,0	2,2	3,3	-	0,0	0,2	0,0
	Máximo	6,0	4,7	4,8	2,0	11,1	12,7	10,7	-	1,6	2,6	4,8
	Percentil 25%	2,4	0,4	0,2	0,8	4,9	2,8	6,4	-	0,0	0,4	1,9
Percentil 75%	3,9	1,9	2,8	1,7	9,5	7,5	9,1	-	0,0	2,0	4,2	
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> efluente (mg.L <sup>-1</sup> )	Nº de dados	15	25	26	15	15	21	15	21	25	19	17
	Média	102,0	59,2	45,8	27,6	54,2	32,1	38,6	26,7	18,5	16,4	21,8
	(DP)	(34,0)	(15,0)	(10,2)	(13,6)	(14,5)	(17,1)	(11,3)	(8,7)	(16,7)	(8,5)	(6,7)
	Mediana	109,5	59,5	44,3	26,0	50,5	32,5	40,2	27,6	12,2	16,5	22,0
	Mínimo	21,6	27,5	32,5	12,5	35,0	5,0	17,5	8,9	1,4	4,5	4,5
	Máximo	148,0	78,5	75,0	63,0	84,0	63,0	60,2	41,4	53,9	38,0	35,0
	Percentil 25%	93,1	52,5	40,1	17,3	45,0	20,0	32,8	20,2	5,9	9,5	18,5
Percentil 75%	123,5	71,0	48,5	34,3	61,0	43,5	45,3	33,4	29,8	20,8	24,5	
Nitrogênio total afluente (mg.L <sup>-1</sup> )	Nº de dados	15	25	26	14	15	21	15	20	27	19	17
	Média	168,4	150,0	166,4	170,6	187,0	183,4	239,6	261,2	389,8	202,9	182,5
	(DP)	(12,0)	(15,6)	(11,4)	(34,4)	(21,9)	(17,8)	(83,4)	(46,1)	(38,0)	(22,6)	(44,9)
	Mediana	170,7	153,3	167,3	155,7	190,2	180,0	184,9	248,7	395,4	206,6	195,1
	Mínimo	129,5	96,4	145,7	134,0	160,1	151,3	178,1	205,5	302,8	171,0	94,8
	Máximo	184,4	168,9	183,9	230,6	228,3	217,5	353,9	328,5	441,1	238,5	231,7
	Percentil 25%	167,2	145,2	160,2	149,5	164,7	176,2	181,9	223,5	376,3	178,5	177,8
Percentil 75%	174,0	155,0	175,5	179,4	204,4	193,8	353,3	312,2	418,7	209,5	225,1	

/Continua

		<b>E1</b>	<b>E2</b>	<b>E3</b>	<b>E4</b>	<b>E5</b>	<b>E6</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>E7</b>	<b>E8</b>
Nitrogênio total efluente (mg.L <sup>-1</sup> )	Nº de dados	15	25	26	14	15	21	15	20	27	19	17
	Média	163,1	119,5	96,9	103,2	127,2	108,3	129,4	36,0	57,0	115,3	94,1
	(DP)	(33,9)	(14,5)	(11,2)	(17,7)	(19,2)	(22,9)	(56,8)	(13,3)	(23,7)	(32,9)	(33,1)
	Mediana	163,4	122,0	95,9	101,5	127,2	110,2	135,7	32,9	58,3	122,8	98,1
	Mínimo	114,2	90,1	75,0	76,3	84,5	70,1	48,5	15,3	10,5	29,4	38,0
	Máximo	210,1	174,2	124,5	136,9	166,2	147,1	234,4	69,1	107,0	158,0	144,0
	Percentil 25%	135,4	106,8	89,7	89,6	118,7	91,1	84,5	28,4	37,4	103,8	63,7
Percentil 75%	192,8	131,0	104,7	117,7	133,1	127,4	155,7	41,6	75,5	137,6	117,6	
Eficiência de remoção N total (%)	Nº de dados	15	25	26	14	15	21	15	20	27	19	17
	Média	2	19	42	38	32	41	46	86	85	42	47
	(DP)	(25)	(14)	(8)	(12)	(10)	(11)	(16)	(6)	(6)	(19)	(16)
	Mediana	3	22	41	40	30	38	48	87	85	37	49
	Mínimo	-54	-9	24	19	17	24	23	69	75	14	20
	Máximo	34	46	57	60	51	61	73	94	98	88	81
	Percentil 25%	-9	6	36	33	24	34	31	85	81	31	40
Percentil 75%	22	32	45	46	35	48	57	89	90	48	57	
Carga de nitrogênio aplicada (g.m <sup>-3</sup> .d <sup>-1</sup> )	Nº de dados	15	25	26	15	15	21	15	20	25	19	17
	Média	42,1	37,5	41,6	42,5	46,7	45,8	59,9	65,3	98,4	50,7	45,6
	(DP)	(3,0)	(3,9)	(2,9)	(8,3)	(5,5)	(4,5)	(20,8)	(11,5)	(8,8)	(5,7)	(11,2)
	Mediana	42,7	38,3	41,8	39,7	47,5	45,0	46,2	62,2	98,8	51,6	48,8
	Mínimo	32,4	24,1	36,4	33,5	40,0	37,8	44,5	51,4	82,5	42,8	23,7
	Máximo	46,1	42,2	46,0	57,7	57,1	54,4	88,5	82,1	110,3	59,6	57,9
	Percentil 25%	41,8	36,3	40,1	37,5	41,2	44,1	45,5	55,9	94,1	44,6	44,5
Percentil 75%	43,5	38,7	43,9	43,4	51,1	48,4	88,3	78,1	105,3	52,4	56,3	

/Continua

	<b>E1</b>	<b>E2</b>	<b>E3</b>	<b>E4</b>	<b>E5</b>	<b>E6</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>E7</b>	<b>E8</b>
N ° de dados	15	25	26	15	15	21	15	20	25	19	17
Média	1,3	7,6	17,4	16,7	14,9	18,8	27,6	56,3	84,0	21,9	22,1
(DP)	(9,6)	(5,6)	(4,1)	(7,5)	(5,7)	(5,4)	(12,7)	(11,4)	(10,8)	(12,1)	(10,6)
Mediana	1,4	8,8	17,8	15,0	14,1	17,5	29,7	54,9	81,2	18,4	24,3
Mínimo	-17,6	-2,2	10,1	6,9	7,0	9,9	10,3	38,6	63,1	6,4	9,0
Máximo	14,6	18,9	26,3	34,8	28,8	30,2	52,4	71,9	107,6	52,3	39,3
Percentil 25%	-4,1	2,3	15,2	12,7	10,7	15,7	17,3	46,7	76,2	16,0	10,6
Percentil 75%	9,1	12,1	18,5	19,4	17,0	20,9	34,6	67,9	91,6	26,2	30,3

**Tabela A8** – Estatística descritiva para os coeficientes estequiométricos produção de N-NO<sub>3</sub>-/ consumo de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> durante a Fase 3 de operação do RBS-Lab

	<b>E1</b>	<b>E2</b>	<b>E3</b>	<b>E4</b>	<b>E5</b>	<b>E6</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>E7</b>	<b>E8</b>
Nº de dados	14	25	26	15	14	21	15	20	25	19	17
Média (DP)	1,07 (0,52)	0,70 (0,43)	0,41 (0,30)	0,32 (0,14)	0,54 (0,33)	0,30 (0,16)	0,74 (0,42)	0,26 (0,07)	0,11 (0,10)	0,18 (0,07)	0,24 (0,12)
Mediana	1,01	0,66	0,39	0,28	0,57	0,30	0,69	0,29	0,05	0,17	0,21
Mínimo	0,28	0,27	0,25	0,12	0,31	0,08	0,21	0,10	0,01	0,02	0,04
Máximo	2,50	1,18	0,68	0,65	0,75	0,48	1,63	0,36	0,39	0,41	0,47
Percentil 25%	0,81	0,52	0,36	0,16	0,45	0,23	0,43	0,22	0,04	0,12	0,16
Percentil 75%	1,26	0,90	0,46	0,43	0,63	0,41	1,02	0,32	0,17	0,21	0,32

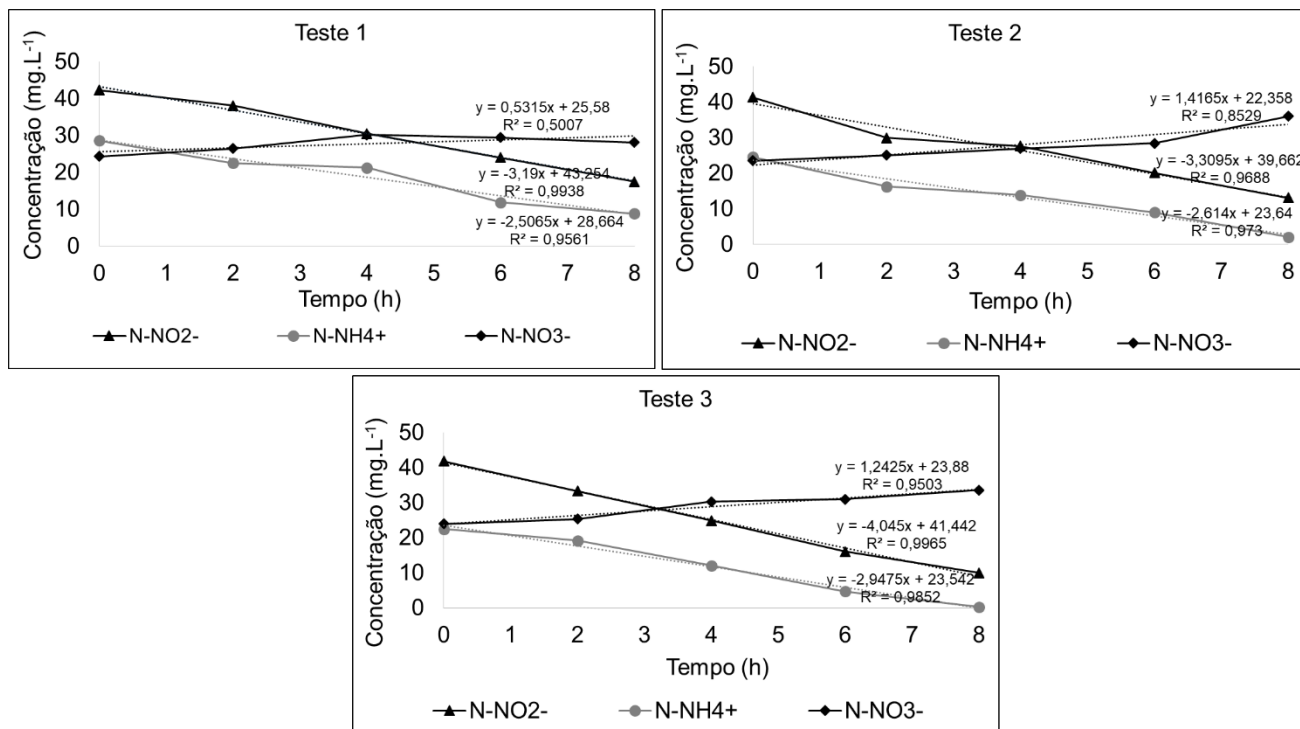
**Tabela A9** – Estatística descritiva das concentrações afluentes, efluentes e eficiência de remoção de DQO durante a Fase 3 de operação do RBS-Lab

		<b>E1</b>	<b>E2</b>	<b>E3</b>	<b>E4</b>	<b>E5</b>	<b>E6</b>	<b>R1</b>	<b>R3</b>	<b>E7</b>	<b>E8</b>
DQO total afluente (mg.L <sup>-1</sup> )	N° de dados	15	21	26	15	15	21	11	26	17	21
	Média	317,3	312,0	268,9	285,8	394,6	476,8	329,5	446,4	417,1	350,8
	(DP)	(37,5)	(36,2)	(58,7)	(51,8)	(45,0)	(59,1)	(123,7)	(154,7)	(67,5)	(105,7)
	Mediana	329,1	326,6	262,0	265,8	419,1	501,3	227,6	379,3	438,3	392,2
	Mínimo	231,3	191,0	198,7	236,4	311,3	384,6	214,2	233,5	303,1	166,2
	Máximo	354,7	347,4	403,2	373,3	433,6	541,3	485,3	694,3	487,2	462,8
	Percentil 25%	311,9	293,2	225,3	253,7	388,0	415,8	224,2	365,2	341,4	380,7
Percentil 75%	335,2	341,0	277,6	315,9	420,2	535,8	444,2	486,0	479,4	400,7	
DQO total efluente (mg.L <sup>-1</sup> )	N° de dados	15	21	24	15	15	21	11	26	17	21
	Média	214,7	125,6	72,3	76,1	122,9	236,8	252,0	254,6	229,4	172,0
	(DP)	(68,3)	(70,0)	(32,6)	(34,1)	(53,2)	(105,4)	(82,3)	(83,5)	(42,0)	(79,8)
	Mediana	225,8	125,4	70,3	84,2	128,0	233,6	198,7	220,9	237,2	217,3
	Mínimo	78,6	0,0	4,2	24,2	33,6	92,4	165,3	110,2	136,4	27,3
	Máximo	281,9	258,8	132,0	133,1	243,6	429,1	368,7	417,7	288,3	262,9
	Percentil 25%	204,4	82,1	60,1	46,4	91,9	125,8	184,2	194,4	216,1	116,2
Percentil 75%	267,4	156,6	91,4	98,6	140,8	343,6	329,2	295,6	259,4	233,9	
Eficiência de remoção de DQO (%)	N° de dados	15	21	24	15	15	21	11	26	17	21
	Média	34	60	71	73	70	51	22	41	44	54
	(DP)	(18)	(21)	(13)	(12)	(12)	(21)	(8)	(15)	(15)	(14)
	Mediana	33	59	71	74	70	47	21	41	50	49
	Mínimo	10	26	50	50	41	8	8	0	5	34
	Máximo	66	100	99	91	89	82	36	68	60	84
	Percentil 25%	16	48	64	67	67	37	18	39	43	45
Percentil 75%	40	76	78	80	75	70	28	49	51	67	

**Tabela A10** – Estatística descritiva para os coeficientes estequiométricos consumo de N-NO<sub>2</sub>-/ consumo de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> durante o período de recuperação (R1, R2 e R3) da Fase 3 de operação do RBS-Lab

	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>
Nº dados	22	30	33
Média (DP)	1,28 (0,25)	1,41 (0,11)	1,05 (0,24)
Mediana	1,24	1,41	0,98
Mínimo	0,61	1,23	0,64
Máximo	1,81	1,66	1,58
Percentil 25%	1,18	1,33	0,89
Percentil 75%	1,48	1,48	1,19

## APÊNDICE B – Experimento de Atividade anammox específica durante o período de recuperação R2 do RBS-Lab

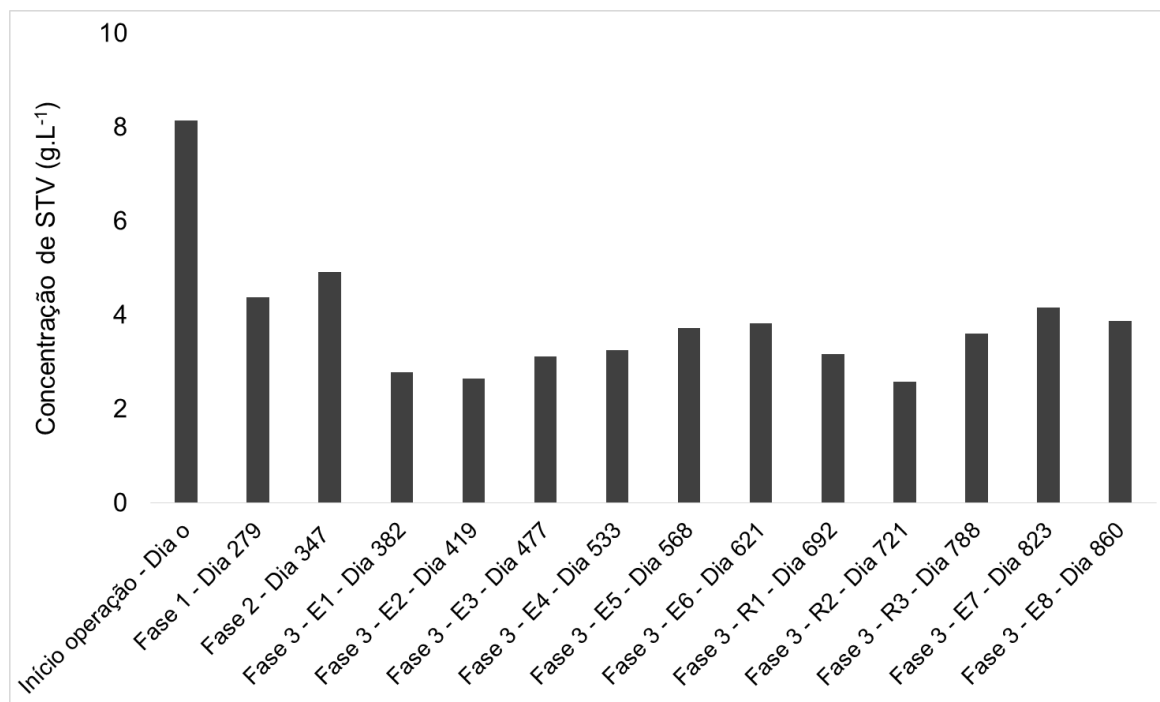


**Figura A1** – Dinâmica dos compostos nitrogenados ao longo dos testes de atividade anammox específica durante o período R2 de operação do RBS-Lab

**Tabela A11** – Resultados obtidos nos experimentos de atividade anammox específica no RBS lab durante o período R2 de operação

	STV (g.L <sup>-1</sup> )	Volume reator (L)	Taxa de consumo/ Produção (mg.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Atividade anammox específica (mgN.L <sup>-1</sup> .gSTV <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	2,57	10	-2,69	-2,51
N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	2,57	10	-3,51	-3,28
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	2,57	10	1,06	0,99

## APÊNDICE C – Estimativa das concentrações de sólidos totais voláteis (STV) ao longo dos períodos operacionais do RBS-Lab e relação alimento/micro-organismo (A/M)



**Figura A2** – Estimativa da concentração de STV ao longo dos períodos operacionais do RBS-Lab

**Tabela A12** - Estimativa da relação A/M em termos de carga de nitrogênio aplicada por massa de sólidos totais voláteis ao longo da operação do RBS-Lab

Período operacional	Carga N aplicada (g.d <sup>-1</sup> )	Massa de STV (g)	Relação A/M
Fase 1 – Dia 279	0,955	43,81	0,02
Fase 2 – Dia 347	0,988	49,18	0,02
Fase 3 – E1 – Dia 382	0,427	27,92	0,02
Fase 3 – E2 – Dia 419	0,383	26,54	0,01
Fase 3 – E3 – Dia 477	0,418	31,15	0,01
Fase 3 – E4 – Dia 533	0,397	32,60	0,01
Fase 3 – E5 – Dia 568	0,475	37,25	0,01
Fase 3 – E6 – Dia 621	0,45	38,25	0,01
Fase 3 – R1 – Dia 692	0,462	31,65	0,01
Fase 3 – R2 – Dia 721	0,622	25,75	0,02
Fase 3 – R3 – Dia 788	0,988	36,13	0,03
Fase 3 – E7 – Dia 823	0,516	41,65	0,01
Fase 3 – E8 – Dia 860	0,488	38,75	0,01

## APÊNDICE D – Resultados obtidos nos ensaios de qPCR do RBS-Lab

**Tabela A13** – Resultados obtidos nos ensaios de qPCR no RBS-Lab

Amostra	Treshould	Eficiência (%)	Equação da Retas	R <sup>2</sup>	N <sup>o</sup> cópias.g lodo <sup>-1</sup>	DP
<b>RNAr 16S Anammox</b>						
<b>Inóculo - Dia 0</b>	0,033899	90,014	y=-3,587x+39,379	0,998	1,35E+04	4,78E+02
<b>Fase 1 - Dia 116</b>	0,033899	90,014	y=-3,587x+39,379	0,998	1,64E+08	1,04E+07
<b>Fase 1 - Dia 279</b>	0,033899	90,014	y=-3,587x+39,379	0,998	3,91E+08	1,64E+07
<b>Fase 2 - Dia 347</b>	0,033899	90,014	y=-3,587x+39,379	0,998	1,41E+08	2,03E+07
<b>Fase 3 E1 - Dia 382</b>	0,033899	90,014	y=-3,587x+39,379	0,998	2,39E+08	1,67E+07
<b>Fase 3 E2 - Dia 419</b>	0,033899	90,014	y=-3,587x+39,379	0,998	1,71E+08	1,37E+07
<b>Fase 3 E3 - Dia 477</b>	0,033899	90,014	y=-3,587x+39,379	0,998	1,34E+08	5,40E+06
<b>Fase 3 E4 - Dia 533</b>	0,033899	90,014	y=-3,587x+39,379	0,998	6,38E+07	3,38E+06
<b>Fase 3 E5 - Dia 568</b>	0,033899	90,014	y=-3,587x+39,379	0,998	4,83E+07	5,63E+06
<b>Fase 3 E6 - Dia 621</b>	0,033899	90,014	y=-3,587x+39,379	0,998	5,57E+07	1,60E+06
<b>Fase 3 R1 - Dia 692</b>	0,033899	84,307	y=-3,766x+40,864	0,998	2,69E+08	3,75E+06
<b>Fase 3 R2 - Dia 721</b>	0,033899	84,307	y=-3,766x+40,864	0,998	4,22E+08	4,09E+07
<b>Fase 3 R3- Dia 788</b>	0,033899	84,307	y=-3,766x+40,864	0,998	3,87E+08	8,26E+07
<b>Fase 3 E7 - Dia 823</b>	0,033899	84,307	y=-3,766x+40,864	0,998	3,54E+08	2,29E+07
<b>Fase 3 E8 - Dia 860</b>	0,033899	90,969	y=-3559x+39,897	0,999	2,00E+08	4,15E+06
<b>NosZ Desnitrificante</b>						
<b>Inóculo - Dia 0</b>	0,012911	90,537	y=-3572x+43,73	0,993	1,53E+09	8,89E+07
<b>Fase 1 - Dia 116</b>	0,012911	90,537	y=-3572x+43,73	0,993	1,23E+09	1,45E+08
<b>Fase 1 - Dia 279</b>	0,012911	90,537	y=-3572x+43,73	0,993	1,28E+08	2,60E+07
<b>Fase 2 - Dia 347</b>	0,012911	90,537	y=-3572x+43,73	0,993	2,18E+08	2,84E+07
<b>Fase 3 E1 - Dia 382</b>	0,012911	90,537	y=-3572x+43,73	0,993	8,09E+08	6,41E+07
<b>Fase 3 E2 - Dia 419</b>	0,012911	90,537	y=-3572x+43,73	0,993	2,10E+08	1,84E+07
<b>Fase 3 E3 - Dia 477</b>	0,012911	90,537	y=-3572x+43,73	0,993	4,51E+08	1,37E+08
<b>Fase 3 E4 - Dia 533</b>	0,012911	90,537	y=-3572x+43,73	0,993	4,20E+08	2,60E+07
<b>Fase 3 E5 - Dia 568</b>	0,012911	90,537	y=-3572x+43,73	0,993	7,86E+08	5,90E+07
<b>Fase 3 E6 - Dia 621</b>	0,012911	90,537	y=-3572x+43,73	0,993	2,91E+08	4,22E+07
<b>Fase 3 R1 - Dia 692</b>	0,012911	90,061	y=-3,586x+43,319	0,999	1,07E+09	3,09E+07
<b>Fase 3 R2 - Dia 721</b>	0,012911	90,061	y=-3,586x+43,319	0,999	2,44E+09	1,14E+08
<b>Fase 3 R3- Dia 788</b>	0,012911	90,061	y=-3,586x+43,319	0,999	1,32E+09	1,33E+08
<b>Fase 3 E7 - Dia 823</b>	0,012911	90,061	y=-3,586x+43,319	0,999	1,10E+09	8,10E+07
<b>Fase 3 E8 - Dia 860</b>	0,012911	90,061	y=-3,586x+43,319	0,999	1,07E+09	5,89E+07
<b>RNAr 16S Nitrobacter</b>						
<b>Inóculo - Dia 0</b>	0,043685	93,401	y=-3,41x+36,938	0,999	1,92E+07	5,42E+05
<b>Fase 1 - Dia 116</b>	0,043685	93,401	y=-3,41x+36,938	0,999	1,10E+07	2,30E+05
<b>Fase 1 - Dia 279</b>	0,043685	93,401	y=-3,41x+36,938	0,999	3,36E+07	2,77E+06
<b>Fase 2 - Dia 347</b>	0,043685	93,401	y=-3,41x+36,938	0,999	1,78E+07	2,09E+05
<b>Fase 3 E1 - Dia 382</b>	0,043685	98,012	y=-3,37x+32,87	0,998	2,56E+06	1,27E+05
<b>Fase 3 E2 - Dia 419</b>	0,043685	93,401	y=-3,41x+36,938	0,999	3,68E+06	1,70E+05
<b>Fase 3 E3 - Dia 477</b>	0,043685	93,401	y=-3,41x+36,938	0,999	1,87E+07	5,96E+05
<b>Fase 3 E4 - Dia 533</b>	0,043685	93,401	y=-3,41x+36,938	0,999	1,67E+07	8,42E+05
<b>Fase 3 E5 - Dia 568</b>	0,043685	93,401	y=-3,41x+36,938	0,999	1,44E+07	7,21E+05
<b>Fase 3 E6 - Dia 621</b>	0,043685	93,401	y=-3,41x+36,938	0,999	2,45E+06	1,14E+05
<b>Fase 3 R1 - Dia 692</b>	0,043685	93,401	y=-3,41x+36,938	0,999	1,65E+07	1,23E+06
<b>Fase 3 R2 - Dia 721</b>	0,043685	93,401	y=-3,41x+36,938	0,999	2,12E+07	2,72E+06
<b>Fase 3 R3- Dia 788</b>	0,043685	93,401	y=-3,41x+36,938	0,999	1,21E+07	6,67E+05
<b>Fase 3 E7 - Dia 823</b>	0,043685	93,401	y=-3,41x+36,938	0,999	7,51E+06	1,83E+05
<b>Fase 3 E8 - Dia 860</b>	0,043685	93,401	y=-3,41x+36,938	0,999	7,63E+06	1,96E+05

/Continua

Amostra	Treshould	Eficiência (%)	Equação da Retas	R <sup>2</sup>	N <sup>o</sup> cópias.g lodo <sup>-1</sup>	DP
<b>RNAr 16S Nitrospira</b>						
Inóculo - Dia 0	0,667825	91,37	y=-3,584x+36,075	0,996	2,35E+05	1,94E+04
Fase 1 - Dia 116	0,667825	91,37	y=-3,584x+36,075	0,996	9,80E+05	9,78E+04
Fase 1 - Dia 279	0,667825	91,37	y=-3,584x+36,075	0,996	6,96E+06	3,94E+04
Fase 2 - Dia 347	0,667825	91,37	y=-3,584x+36,075	0,996	9,19E+05	3,12E+04
Fase 3 E1 - Dia 382	0,667825	91,37	y=-3,584x+36,075	0,996	8,43E+07	1,34E+06
Fase 3 E2 - Dia 419	0,667825	91,37	y=-3,584x+36,075	0,996	1,25E+07	1,33E+07
Fase 3 E3 - Dia 477	0,667825	91,37	y=-3,584x+36,075	0,996	6,77E+06	4,21E+05
Fase 3 E4 - Dia 533	0,667825	91,37	y=-3,584x+36,075	0,996	4,83E+07	9,98E+05
Fase 3 E5 - Dia 568	0,667825	91,37	y=-3,584x+36,075	0,996	6,43E+07	6,30E+05
Fase 3 E6 - Dia 621	0,667825	91,37	y=-3,584x+36,075	0,996	1,90E+07	8,51E+05
Fase 3 R1 - Dia 692	0,667825	91,37	y=-3,584x+36,075	0,996	4,29E+06	1,35E+05
Fase 3 R2 - Dia 721	0,667825	91,37	y=-3,584x+36,075	0,996	5,78E+06	4,07E+04
Fase 3 R3- Dia 788	0,667825	91,37	y=-3,584x+36,075	0,996	6,76E+05	4,62E+04
Fase 3 E7 - Dia 823	0,667825	91,37	y=-3,584x+36,075	0,996	9,19E+05	9,40E+05
Fase 3 E8 - Dia 860	0,667825	91,37	y=-3,584x+36,075	0,996	6,72E+05	7,44E+04
<b>AmoA Bactérias Oxidadoras de Amônia</b>						
Inóculo - Dia 0	0,086005	86,693	y=-3,688x+31,961	0,998	1,16E+03	4,09E+02
Fase 1 - Dia 116	0,086005	87,784	y=-3,654x+32,631	0,999	1,33E+06	3,33E+04
Fase 1 - Dia 279	0,086005	87,784	y=-3,654x+32,631	0,999	1,90E+04	9,87E+02
Fase 2 - Dia 347	0,086005	87,784	y=-3,654x+32,631	0,999	7,40E+04	1,70E+04
Fase 3 E1 - Dia 382	0,086005	87,784	y=-3,654x+32,631	0,999	1,13E+07	1,90E+06
Fase 3 E2 - Dia 419	0,086005	87,784	y=-3,654x+32,631	0,999	8,39E+04	1,33E+04
Fase 3 E3 - Dia 477	0,086005	87,784	y=-3,654x+32,631	0,999	6,40E+05	3,51E+04
Fase 3 E4 - Dia 533	0,086005	87,784	y=-3,654x+32,631	0,999	4,25E+06	6,68E+05
Fase 3 E5 - Dia 568	0,086005	87,784	y=-3,654x+32,631	0,999	4,28E+06	5,92E+05
Fase 3 E6 - Dia 621	0,086005	86,693	y=-3,688x+31,961	0,998	7,18E+05	1,74E+04
Fase 3 R1 - Dia 692	0,086005	87,784	y=-3,654x+32,631	0,999	1,06E+06	2,30E+03
Fase 3 R2 - Dia 721	0,086005	87,784	y=-3,654x+32,631	0,999	9,64E+05	3,51E+04
Fase 3 R3- Dia 788	0,086005	87,784	y=-3,654x+32,631	0,999	1,08E+06	6,81E+04
Fase 3 E7 - Dia 823	0,086005	87,784	y=-3,654x+32,631	0,999	4,74E+06	5,56E+04
Fase 3 E8 - Dia 860	0,086005	87,784	y=-3,654x+32,631	0,999	7,29E+06	9,22E+04
<b>RNAr 16S Bactérias</b>						
Inóculo - Dia 0	0,016384	98,177	y=-3,366x+35,628	0,995	1,45E+09	7,87E+07
Fase 1 - Dia 116	0,016384	98,177	y=-3,366x+35,628	0,995	1,72E+09	3,55E+07
Fase 1 - Dia 279	0,016384	98,177	y=-3,366x+35,628	0,995	7,20E+08	2,01E+07
Fase 2 - Dia 347	0,016384	98,177	y=-3,366x+35,628	0,995	5,68E+08	3,92E+07
Fase 3 E1 - Dia 382	0,016384	98,177	y=-3,366x+35,628	0,995	1,29E+09	4,85E+07
Fase 3 E2 - Dia 419	0,016384	98,177	y=-3,366x+35,628	0,995	1,36E+09	5,70E+07
Fase 3 E3 - Dia 477	0,016384	98,177	y=-3,366x+35,628	0,995	1,81E+09	9,99E+07
Fase 3 E4 - Dia 533	0,016384	98,177	y=-3,366x+35,628	0,995	1,73E+09	5,95E+07
Fase 3 E5 - Dia 568	0,016384	98,177	y=-3,366x+35,628	0,995	1,63E+09	1,76E+07
Fase 3 E6 - Dia 621	0,016384	98,177	y=-3,366x+35,628	0,995	1,42E+09	1,25E+08
Fase 3 R1 - Dia 692	0,016384	90,523	y=-3,572x+34,994	0,998	1,03E+09	1,76E+08
Fase 3 R2 - Dia 721	0,016384	90,523	y=-3,572x+34,994	0,998	2,22E+09	4,98E+07
Fase 3 R3- Dia 788	0,016384	90,523	y=-3,572x+34,994	0,998	1,30E+09	4,68E+07
Fase 3 E7 - Dia 823	0,016384	90,523	y=-3,572x+34,994	0,998	1,00E+09	1,39E+07
Fase 3 E8 - Dia 860	0,016384	90,523	y=-3,572x+34,994	0,998	1,52E+09	6,80E+07

## APÊNDICE E – Estatística descritiva das concentrações dos compostos nitrogenados e DQO no RBS-Piloto

**Tabela A14** – Estatística descritiva das concentrações afluentes e efluentes, eficiências de remoção e cargas aplicadas e removidas dos compostos nitrogenados no RBS-Piloto

	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> afluente (mg.L <sup>-1</sup> )	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> efluente (mg.L <sup>-1</sup> )	Eficiência remoção N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (%)	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> afluente (mg.L <sup>-1</sup> )	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> efluente (mg.L <sup>-1</sup> )	Eficiência remoção N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (%)	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> afluente (mg.L <sup>-1</sup> )	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> efluente (mg.L <sup>-1</sup> )	NT afluente (mg.L <sup>-1</sup> )	NT efluente (mg.L <sup>-1</sup> )	Carga de NT aplicada (g.m <sup>-3</sup> .d <sup>-1</sup> )	Carga de NT removida (g.m <sup>-3</sup> .d <sup>-1</sup> )	Eficiência remoção NT (%)
N° de dados	86	86	86	86	86	86	65	65	66	66	66	66	66
Média	167,9	115,7	28,34	152,1	81,3	46,49	5,6	7,8	325,7	199,9	32,6	12,6	38
(DP)	(44,9)	(32,3)	(23,1)	(19,2)	(41,4)	(27,5)	(4,9)	(12,0)	(42,9)	(39,6)	(4,3)	(4,9)	(12,5)
Mediana	166,1	112,3	29,7	152,7	100,1	34,3	4,6	1,3	332,1	205,1	33,2	12,2	38
Mínimo	71,3	34,8	-82,78	12,8	0,5	9,86	0,0	0,0	236,2	50,7	23,6	2,7	11
Máximo	275,4	207,3	82,47	174,8	141,8	100,0	18,4	60,8	451,3	256,7	45,1	30,9	86
Percentil 25%	136,1	93,2	14,6	149,5	53,2	26,9	1,5	0,6	299,1	184,0	29,0	9,8	29
Percentil 75%	198,8	139,8	42,5	159,5	101,5	70,4	9,1	12,0	349,4	218,0	45,7	14,2	46

**Tabela A15** – Estatística descritiva das concentrações afluentes e efluentes de DQO total no RBS-Piloto

	<b>DQO<sub>total</sub> afluente</b> <b>(mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>DQO<sub>total</sub> efluente</b> <b>(mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Eficiência de remoção de</b> <b>DQO (%)</b>
Nº de dados	77	77	77
Média (DP)	381,7 (121,6)	331,4 (172,7)	8 (51)
Mediana	399,6	306,7	21
Mínimo	144,3	105,3	-220
Máximo	593,1	1079,6	66
Percentil 25%	281,0	207,7	1,3
Percentil 75%	485,6	406,1	36,8

## APÊNDICE F – Resultados obtidos nos experimentos de qPCR no RBS-Piloto

**Tabela A16 – Resultados obtidos nos ensaios de qPCR no RBS-Lab**

Amostra	Treshould	Eficiência (%)	Equação da Retas	R <sup>2</sup>	N° cópias.g lodo <sup>-1</sup>	DP
<b>RNAr 16S Anammox</b>						
<b>Inóculo</b>	0,033899	84,307	y=-3,766x+40,864	0,998	2,62E+04	4,11E+03
<b>Dia 85</b>	0,033899	84,307	y=-3,766x+40,864	0,998	2,88E+05	2,37E+04
<b>Dia 182</b>	0,033899	84,307	y=-3,766x+40,864	0,998	5,92E+05	5,27E+04
<b>Dia 253</b>	0,033899	90,969	y=-3,559x+39,897	0,999	4,30E+05	6,00E+04
<b>NosZ Desnitrificantes</b>						
<b>Inóculo</b>	0,012911	90,061	y=-3,586+43,319	0,999	7,20E+08	5,83E+07
<b>Dia 85</b>	0,012911	90,061	y=-3,586+43,319	0,999	1,97E+09	3,19E+07
<b>Dia 182</b>	0,012911	90,061	y=-3,586+43,319	0,999	1,26E+09	1,80E+07
<b>Dia 253</b>	0,012911	90,061	y=-3,586+43,319	0,999	1,48E+09	1,02E+07
<b>RNAr 16S Nitrobacter</b>						
<b>Inóculo</b>	0,043685	93,401	y=-3,401x+36,938	0,999	4,16E+07	1,18E+06
<b>Dia 85</b>	0,043685	93,401	y=-3,401x+36,938	0,999	3,85E+07	6,52E+06
<b>Dia 182</b>	0,043685	93,401	y=-3,401x+36,938	0,999	2,87E+07	9,85E+05
<b>Dia 253</b>	0,043685	93,401	y=-3,401x+36,938	0,999	1,65E+07	2,98E+06
<b>RNAr 16S Nitrospira</b>						
<b>Inóculo</b>	0,667825	101,5	y=-3,286x+38,208	0,999	1,26E+04	3,48E+03
<b>Dia 85</b>	0,667825	101,5	y=-3,286x+38,208	0,999	3,15E+03	8,62E+02
<b>Dia 182</b>	0,667825	101,5	y=-3,286x+38,208	0,999	1,90E+03	4,74E+02
<b>Dia 253</b>	0,667825	101,5	y=-3,286x+38,208	0,999	3,60E+03	5,23E+02
<b>AmoA Bactéria oxidadora de amônia</b>						
<b>Inóculo</b>	0,086005	86,693	y=-3,688x+31,961	0,998	1,34E+02	4,12E+01
<b>Dia 85</b>	0,086005	87,784	y=-3,654x+32,631	0,999	7,15E+04	5,22E+03
<b>Dia 182</b>	0,086005	87,784	y=-3,654x+32,631	0,999	4,49E+06	1,60E+05
<b>Dia 253</b>	0,086005	87,784	y=-3,654x+32,631	0,999	2,88E+06	1,25E+05
<b>RNAr 16S Domínio Bacteria</b>						
<b>Inóculo</b>	0,016384	90,523	y=-3,572x+34,994	0,998	1,43E+08	8,50E+05
<b>Dia 85</b>	0,016384	90,523	y=-3,572x+34,994	0,998	1,68E+09	2,49E+08
<b>Dia 182</b>	0,016384	90,523	y=-3,572x+34,994	0,998	1,27E+09	2,55E+08
<b>Dia 253</b>	0,016384	90,523	y=-3,572x+34,994	0,998	1,30E+09	5,30E+08