

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

Brenda Gonçalves Piteira Carvalho

**NITRIFICAÇÃO PARCIAL/ANAMMOX APLICADA A EFLUENTE ANAERÓBIO  
DOMÉSTICO: investigação de parâmetros operacionais e configurações do sistema com  
vistas à otimização do processo**

Belo Horizonte

2024

Brenda Gonçalves Piteira Carvalho

**NITRIFICAÇÃO PARCIAL/ANAMMOX APLICADA A EFLUENTE ANAERÓBIO  
DOMÉSTICO: investigação de parâmetros operacionais e configurações do sistema com  
vistas à otimização do processo**

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

Área de concentração: Saneamento

Linha de pesquisa: Tratamento de Águas Residuárias

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Calábria de Araújo

Coorientador: Prof. Dr. Renato Pereira Ribeiro

Belo Horizonte

2024

C331n Carvalho, Brenda Gonçalves Piteira.  
Nitrificação parcial/anammox aplicada a efluente anaeróbio doméstico [recurso eletrônico] : investigação de parâmetros operacionais e configurações do sistema com vistas à otimização do processo / Brenda Gonçalves Piteira Carvalho. – 2024.  
1 recurso online (139 f.: il., color.) : pdf.

Orientadora: Juliana Calábria de Araújo.  
Coorientador: Renato Pereira Ribeiro.

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

Apêndice: f. 139;

Bibliografia: f. 130-138.

1. Engenharia sanitária - Teses. 2. Saneamento - Teses. 3. Efluente - Qualidade - Teses. 4. Nitrificação - Teses. 5. Otimização - Teses. 6. Metano - Teses. I. Araújo, Juliana Calábria de. II. Ribeiro, Renato Pereira. 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

## **FOLH DE APROVAÇÃO**

"Nitrificação Parcial/anammox Para Remoção de Nitrogênio de Águas Residuárias: Investigação de Diferentes Parâmetros Operacionais e Configurações do Sistema Com Vistas À Otimização do Processo"

**BRENDA GONÇALVES PITEIRA CARVALHO**

Tese defendida e aprovada pela banca examinadora constituída pelos Senhores:

Profa Juliana Calábria de Araújo

Prof. Renato Pereira Ribeiro

Profa Miriam Cristina Santos Amaral Moravia

Prof. Theo Syrto Octavio de Souza

Profa Savia Gavazza dos Santos Pessoa

Profa Claudia Etchebehere

Profa. Priscilla Macedo Moura

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

Coordenadora

Orientadora

Belo Horizonte, 02 de fevereiro de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **Theo Syrto Octavio de Souza, Usuário Externo**, em 02/02/2024, às 18:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renato Pereira Ribeiro, Usuário Externo**, em 05/02/2024, às 15:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sávia Gavazza dos Santos Pessoa, Usuária Externa**, em 06/02/2024, às 12:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Claudia Etchebere Arenas, Usuário Externo**, em 11/03/2024, às 11:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Miriam Cristina Santos Amaral Moravia, Professora do Magistério Superior**, em 11/03/2024, às 17:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Calabria de Araujo, Professora do Magistério Superior**, em 16/05/2024, às 14:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Priscilla Macedo Moura, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 21/05/2024, às 16:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador

2990030 e o código CRC 679C963C.

*Dedico este trabalho à minha mãe Plácida  
Piteira.*

## AGRADECIMENTOS

Ao povo brasileiro, pelo financiamento não só no curso de doutorado, mas em toda a minha trajetória no ensino superior na rede pública, que proporcionou a execução deste trabalho. Em especial, àqueles que não têm acesso à educação, ao saneamento e a direitos humanos básicos.

Às políticas públicas que me deram condições de acesso à educação superior e de qualidade, à Universidade Federal de Minas Gerais e ao CNPq e CAPES pela bolsa de doutorado, ainda que não a tenha recebido durante todo o período de doutorado.

Aos professores que ensinaram, inspiraram e motivaram durante a minha trajetória na educação até aqui, criando condições para que eu pudesse realizar esta pesquisa de doutorado e, além disso, amar ensinar e aprender. De maneira especial, agradeço aos professores da escola CESEP (Sérgio Marinho, Mateus Pena, Maria do Carmo, Dirceu Costa, Alfredo e Rubem Soares), professores da escola Ideal (Joáurio Batista - *in memoriam* –, Marcos Gonçalves, Carlos Viana), professores da UFPA (Luiza Girard, Germana Menescal, Neyson Mendonça, Hélio Almeida (*in memoriam*) e João Vital e professores da UFMG (Valtér Pádua, Léo Heller, Thiago Alencar Neves, Maria Clara Starling, César Rossas Mota, Letícia Lima, Nilo Nascimento, Fabiana Passos, Uende Gomes, Silvia Maria, Marcos Von Sperling, Carlos Chernicharo) e ao professor Renato Pereira Ribeiro do IFRJ.

Aos membros da banca de qualificação Márcia Helena Rissato e Airton Kunz, pelas valiosas contribuições para aprimorar esta pesquisa.

Aos membros da banca examinadora da tese, Claudia Etchebehere, Savia Gavazza, Theo Syrto e Miriam Amaral, pela disponibilidade de avaliação deste trabalho e palavras gentis durante a defesa, que certamente auxiliou o aprimoramento do trabalho.

À professora Juliana Calábria Araújo como orientadora, captadora de recursos e líder do grupo de pesquisa.

Ao professor Renato Pereira Ribeiro, pela coorientação, partilha de conhecimentos valiosos a ponto de viajar do Rio de Janeiro para Belo Horizonte para estar no laboratório e ensinar técnicas e análises presencialmente, pelo tratamento sempre respeitoso, pelo tempo para reuniões e revisões em meio à tantas atividades e pela parceria.

Aos porteiros da Escola de Engenharia, em especial, ao Sr. Renato e ao Sr. André, que me ensinaram que a gentileza é poderosa e por terem garantido a minha segurança no DESA, principalmente nos momentos da pandemia em que estive sozinha no laboratório

À equipe responsável pela limpeza do quarto andar da escola de engenharia, especialmente Sra. Eliane, Sra. Patrícia, Sra. Luciana e Sra. Andréia. Obrigada pela imensa ajuda com a limpeza dos laboratórios, que muito auxiliaram no desenvolvimento das análises e pelo companheirismo, conversas e torcida.

Aos motoristas do ônibus interno da UFMG, que garantiram meu deslocamento para a universidade e para casa.

À equipe de transporte da reitoria e da escola de engenharia, em especial, ao Sr. Walney, Sr. Edmilson e Sr. José Augusto, que garantiram o transporte para as coletas de efluentes e que, em muitos momentos, também ajudaram a carregar e descarregar as bombonas cheias.

Aos trabalhadores da COPASA, desde a gerência que permitiu nosso acesso aos operadores, especialmente à Carine, Fifi, Sirley, Ernani e todos os operadores que ajudaram nas coletas de campo.

Ao Erick Centena pela imensa ajuda no transporte de efluente do CePTS e à Camila Trein, Juliana Bohrer, Luyara e Daniel Abreu pela operação dos reatores, especialmente nas fases de restrições pela pandemia de Covid-19.

Aos pesquisadores de iniciação científica que contribuíram para este trabalho: Filipe Gomes, Daniel Abreu, Maria Eduarda Simião, Ana Luiza, Samara e Amélia.

Aos colegas e pesquisadores do laboratório de análises físico-químicas, especialmente ao Igor Guideoli, Amélia, Jonas Karl, Tatiana, Raquel Bento, Diogo, prof. Thiago Neves e Pedro Alves. Essas pessoas queridas ajudaram muito com análises, empréstimo de reagentes, de soluções e também ao compartilhar a rotina de trabalho.

À Cíntia Leal e à Bruna Coelho pela oportunidade de treinamento para a análise de qPCR e à Gabriela Coelho pelo treinamento para o processamento dos resultados de qPCR.

Aos colegas que cooperaram com auxílio e empréstimo de materiais, especialmente à Ana, Teresa e Fernando do GruPOA; Amanda Leão, Thais, Vitor e Fábio do laboratório de

membranas e Gabriela Coelho, Amanda Teodoro, Bruna Coelho, Yasmin Vidal e Polyana do laboratório de Microbiologia.

Aos muitos amigos, especialmente Juliana Mattos, Alex Werneck, Paula Rafaela Fonseca, Maria da Penha Passos, Joelma Aparecida, Letícia Leila, William, Alex, Camila Trein, Gabriela Coelho e Bruna Coelho.

Ao meu companheiro Március Herculano pela escuta atenciosa, amor e cuidado e momentos incríveis que me deram energia para finalizar este trabalho.

À minha mãe Plácida pelo investimento na minha educação à duras penas e principalmente por me transmitir valores para olhar o mundo e as pessoas com respeito, amorosidade e dignidade, à família Piteira pelo incentivo e apoio, por celebrarem cada passo e conquista como se fossem seus (porque, na realidade, são) e ao meu pai Airton pelo apoio e incentivo, pela ajuda financeira principalmente nos longos meses em que estive sem bolsa de estudos.

Ao Eliakim Sassim pela partilha e apoio em muitos momentos durante o doutorado.

Aos amigos e trabalhadores do Grupo de Fraternidade Albino Teixeira, Cantinho de Jesus e Casa de Caridade Vovô Candinho.

Ao psicólogo Marcos Boson por tanto apoio. Sem o teu trabalho, eu não estaria aqui tão feliz e forte, apesar de tudo.

Aos trabalhadores e amigos da academia Power Fit. Em especial, Liandra, Everaldo Marques, e aos amigos (“meus bacanos”) Plínio, Thaís, Vinícius, Nathália e Felipe Cassiano.

Ao pai celestial e amigos e protetores espirituais, por não permitirem que eu caminhasse só, por toda proteção, amparo e amor.

“(…) A forma da nossa sociedade é violenta. A nossa sociedade é oligárquica, hierárquica, verticalizada. Nela sempre aparece um, que é aquele que é superior e manda, e o outro como aquele que é inferior e obedece. (…) A sociedade brasileira é incapaz de lidar com a noção de direitos, ela lida sempre com a relação de dominação, de opressão, de mando e de obediência. Por isso, ela tem dentro dela um autoritarismo que está nos corações e nas mentes das pessoas, e que torna tão difícil a democracia, entendida como criação e conservação de direitos. Uma sociedade que aceita a exclusão; transforma a diferença em desigualdade; transforma a desigualdade em monstruosidade (…)”

Marilene Chauí, professora emérita de História da Filosofia Moderna na Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas da Universidade de São Paulo

“Esta festa, como tantas outras que se fazem, frequentemente exalta as vitórias. A verdade é que deveria também haver festas para exaltar as derrotas, os empecos, os obstáculos que fazem parte da vida de quem trabalha, e que nem sempre são devidamente levados em conta. (...) Se a universidade pede aos seus participantes que se calem, ela está se condenando ao silêncio, isto é, à morte, pois seu destino é falar. (...) O intelectual tem que saber, e a professora Maria Adélia de Souza já o lembrou, que a nossa meta não é o poder, mas o prestígio, que são duas coisas diferentes. E a universidade atual, talvez no mundo inteiro, mas certamente no Brasil, confunde essas duas coisas. Prestígio não é poder, o poder não leva ao prestígio, o prestígio não necessita de poder. (...) Diante dessas circunstâncias, talvez seja mais fácil culpar o mundo em que vivemos, em vez de culpar a universidade. Mas, para os intelectuais, não basta culpar o mundo, ele tem que ser entendido. Esse é o papel da universidade: interpretar este mundo e a partir daí propor modificá-lo (...).

O intelectual, a universidade estagnada e o dever da crítica (Discurso pronunciado por Milton Santos ao receber o título de professor emérito da Faculdade de Fisologia, Letras e Ciências Humanas da Universidade de São Paulo, em 1997)

“É necessário sempre acreditar que o sonho é possível; que o céu é o limite e você, truta, é imbatível; que o tempo ruim vai passar, é só uma fase; que o sofrimento alimenta mais a sua coragem; que a sua família precisa de você, lado a lado se ganhar, pra te apoiar se perder (...). A ambição é como um véu que cega os irmão, que nem um carro guiado na estrada da vida, sem farol no deserto das trevas perdidas (...). No mundo moderno as pessoas não se falam. Ao contrário, se calam, se pisam, se traem, se matam (...). O que é bom é pra si e o que sobra é do outro, que nem o sol que aquece, mas também apodrece o esgoto (...). Enfim, quero vencer sem pilantrar com ninguém, quero dinheiro sem pisar na cabeça de alguém. O certo é certo na guerra ou na paz (...). Não espere o futuro mudar a sua vida porque o futuro será a consequência do presente (...). Corrida hoje, vitória amanhã. Nunca esqueça disso, irmão. Acreditar e sonhar.”

A vida é Desafio, canção de Racionais MC's (Mano Brown – Dr. Pedro Paulo Soares Pereira -, Ice Blue – Dr. Paulo Eduardo Salvador -, Edi Rock - Dr. Edivaldo Pereira Alves - e KL Jay – Dr. Kléber Geraldo Lelis Simões -, Doutores Honoris Causa reconhecidos como intelectuais públicos que dialogam com o pensamento social brasileiro)

## RESUMO

O processo de nitrificação parcial/anammox (NP/A) é promissor para alcançar a sustentabilidade em estações de tratamento de esgotos (ETEs). No entanto, sua aplicação para diferentes efluentes e cargas aplicadas, os impactos da configuração de reator, de diferentes estratégias de aeração e da temperatura não estão totalmente compreendidos. Além disso, a partida de novos sistemas anammox na ausência de inóculos com atividade anammox têm sido um desafio para a implementação de novos sistemas. Assim, este trabalho teve como objetivos: 1) avaliar diferentes estratégias (de aeração e temperatura) para desenvolvimento do processo de NP/A para remoção de nitrogênio efluentes anaeróbios domésticos; 2) avaliar a dinâmica de óxido nitroso ( $N_2O$ ) e metano ( $CH_4$ ) em diferentes condições de aeração e carga afluyente para NP/A; 3) verificar a viabilidade de partida de sistema anammox aplicando efluente anaeróbio doméstico e aeração para NP/A, utilizando lodos ativados como inóculo e 4) investigar os efeitos da aplicação de efluentes de baixa e alta carga na NP/A  $N_2O$  e  $CH_4$  e na comunidade microbiana. Para isto, reatores em bateladas sequenciais e de leito fixo em espuma com fluxo contínuo foram utilizados. Os principais resultados referentes ao objetivo 1 mostram que a diminuição da temperatura de  $35^\circ C$  para temperatura ambiente ( $20$  a  $29^\circ C$ ) não limitou o processo anammox (remoções de NT 71 e 75%, respectivamente) e que a melhor estratégia de aeração intermitente consistiu em 7 min on/14 min off, resultando em eficiência mediana de NT de 59%, e efluente com concentração mediana de NT de 15 mg/L. Quanto ao objetivo 2, foi verificado que o tempo de aeração para NP/A (1 a 7 min) favoreceu a redução das taxas de emissão de  $N_2O$ . O grupo microbiano com maior diversidade foram as bactérias desnitrificantes heterotróficas. Os resultados do objetivo 3 mostram eficiência de remoção de NT de 63 e 45% nos reatores alimentados (desde a partida) com meio de cultura autotrófico e efluente anaeróbio doméstico sob aeração, respectivamente. A remoção de nitrogênio em ambos os reatores foi maior após 60-70 dias da partida. Foi verificado nos resultados do objetivo 4 que o aumento de carga ocasionado pela alimentação com efluente anaeróbio doméstico e lodo anaeróbio (3:1) ocasionou remoção de NT de 43% e emissão de  $N_2O$  e  $CH_4$  por carga aplicada de NT e DQO de 0,021 e 1,022 %, respectivamente. Este estudo contribui na elucidação questões relacionadas às estratégias operacionais de reatores anammox e para sua difusão no Brasil e regiões de clima tropical em geral.

**PALAVRAS-CHAVE:** aeração intermitente; comunidade microbiana; efluente anaeróbio doméstico; nitrificação parcial/anammox; óxido nitroso.

## ABSTRACT

The partial nitrification/anammox (PN/A) process is promising for achieving sustainability in wastewater treatment plants (WWTPs). However, its application for different wastewaters and applied loads, the impacts of reactor configuration, different aeration strategies and temperature are not fully understood. Furthermore, the startup of new anammox reactors in the absence of inoculum with anammox activity has been a challenge for implementing new anammox systems. Therefore, this work had the following objectives: 1) to evaluate different strategies (aeration and temperature) for developing the PN/A process for removing nitrogen from anaerobically pretreated sewage; 2) to evaluate the dynamics of nitrous oxide ( $N_2O$ ) and methane ( $CH_4$ ) under different aeration conditions and influent load for PN/A; 3) to verify the feasibility of starting anammox system by applying both anaerobically pretreated sewage and aeration to PN/A, using activated sludge as inoculum and 4) to investigate the effects of applying low and high load effluents on PN/A,  $N_2O$  emission and  $CH_4$  and in the microbial community. For this, sequential batch and fixed-bed foam with continuous flow reactors were used. The main results regarding objective 1 show that the decrease in temperature from 35°C to room temperature (20 to 29°C) did not limit the anammox process (TN removals 71 and 75%, respectively) and that the best aeration strategy intermittent consisted of 7 min on/14 min off, resulting in a median NT efficiency of 59%, and effluent with a median TN concentration of 15 mg/L. Regarding objective 2, it was verified that the aeration time for NP/A (1 to 7 min) favored the reduction of  $N_2O$  emission rates. The most diverse group of microorganisms were heterotrophic denitrifying bacteria. The results of objective 3 show TN removal efficiency of 63 and 45% in reactors fed (from start-up) with autotrophic culture medium and anaerobically pretreated sewage under aeration, respectively. Nitrogen removal in both reactors increased after 60-70 days of start of operation. It was verified in the results of objective 4 that the increase in load caused by feeding with domestic anaerobic effluent and anaerobic sludge (3:1) caused TN removal of 43% and emission of  $N_2O$  and  $CH_4$  per applied load of NT and COD of 0.021 and 1.022%, respectively. Finally, this study helps to elucidate issues related to operational strategies in anammox reactors and contribute to the dissemination of this technology in Brazil and warm climate regions in general.

**KEYWORDS:** anaerobically pretreated sewage; intermittent aeration; microbial community; nitrous oxide; partial nitrification/anammox.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2-1 – Distribuição mundial de estações de tratamento de esgotos com aplicação do processo anammox em escala plena .....	35
Figura 2-2 - Esquema da competição por substrato entre BOA, anammox, BON, bactérias heterotróficas em geral e bactérias heterotróficas desnitrificantes .....	41
Figura 2-3 - Ciclo do nitrogênio com processos de (1) fixação; (2) amonificação; (3a) e (3b) nitrificação; (4) nitratação; (5a), (5b) e (5c) assimilação do nitrato; (6a) e (6b) desassimilação do nitrato; (7a), (7b), (7c) e (7d) desnitrificação heterotrófica e (8a),(8b) e (8c) anammox.....	48
Figura 5-1 - Fluxograma do planejamento experimental, com resumo das fases previstas .....	55
Figura 5-2 - Representação esquemática do RBS e seus componentes: (1) temporizador automático; (2) compressor de ar; (3) registro regulador da vazão de ar; (4) mangueira de ar com pedra porosa; (5) agitador; (6) sensores de pH, temperatura, OD, agitação e níveis máximo e mínimo; (7) afluente; (8) bomba para entrada do afluente; (9) bomba para saída do efluente tratado; (10) coleta do efluente tratado; (11) painel de controle, programação e armazenamento de dados do RBS e (12) exportação dos dados armazenados.....	57
Figura 5-3 - Representação esquemática do RFC 1 e 2 e seus componentes: (1) temporizador automático; (2) compressor de ar; (3) registro regulador da vazão de ar; (4) saída de efluente; (5) entrada para sondas; (6) entrada para adição de nitrogênio gasoso e saída de gases; (7) frasco de armazenamento de afluente; (8) bomba peristáltica para alimentação; (9) entrada de efluente; (10) meio suporte e (11) pedra porosa.....	58
Figura 6-1 - Dinâmica das concentrações de $N-NH_4^+$ (mg/L), $N-NO_3^-$ produzido/ $N-NH_4^+$ consumido, limite de descarte de $N-NH_4^+$ (A); concentrações de AT (mg/L), TA consumida/ $N-NH_4^+$ consumido (B), concentrações de DQO and DBO (mg/L), limite de descarte de DBO (C) e concentrações de NT, $N-NO_2^-$ e $N-NO_3^-$ (mg/L) nas fases de 1 a 7 (D). .....	69
Figura 6-2 – Abundância ( $n^\circ$ cópias/gSSV) de anammox, <i>Nitrobacter</i> , <i>Nitrospira</i> (como gene RNAr 16s), BOA (como gene <i>AmoA</i> ) e DHB (como gene <i>NosZ</i> ) nas fases operacionais de 1 a 7 e da biomassa suplementada no sistema, com barra de padrão .....	75
Figura 7-1 – Dinâmica do fluxo de $N_2O$ e $CH_4$ durante os períodos com aeração no início (A) e final (B) e (C) da fase 4 (1min on/14min off).....	82
Figura 7-2 - Resumo da dinâmica de emissão de $N_2O$ e $CH_4$ na fase 5 (5 min on/14 min off) com valores medianos de emissões e de cargas aplicadas de NT e DQO .....	83
Figura 7-3 - Resumo da dinâmica de emissão de $N_2O$ e $CH_4$ na fase 7 (7 min on/14 min off) com valores medianos de emissões e de cargas aplicadas de NT e DQO .....	85

Figura 8-1 - Dinâmica de concentrações (mg/L) e eficiências de remoção (%) de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> nos reatores RFC1 (1A) e RFC2 (2A) e de NT nos reatores RFC1 (1B) e RFC2 (2B).....	96
Figura 8-2 - Abundância relativa (n° de cópias/gSSV) de bactérias anammox, dos gêneros <i>Nitrospira</i> e <i>Nitrobacter</i> , BOA e BDH, na biomassa dispersa do RFC 1 (A) e RFC 2 (B) e na biomassa aderida do RFC 1 (C) e RFC 2 (D).....	101
Figura 8-3 – Gráfico de barra da abundância dos microrganismos do ciclo do nitrogênio e de bactérias metanotróficas na biomassa aderida dos reatores RFC 1 e RFC 2.....	103
Figura 9-1 - Dinâmica do fluxo de N <sub>2</sub> O e CH <sub>4</sub> durante os períodos com aeração na fase 1 (alimentação com efluente anaeróbio doméstico) .....	115
Figura 9-2 - Dinâmica do fluxo de N <sub>2</sub> O e CH <sub>4</sub> durante os períodos sem aeração na fase 1 (alimentação com efluente anaeróbio doméstico) .....	116
Figura 9-3 – Dinâmica do fluxo de N <sub>2</sub> O e CH <sub>4</sub> durante os períodos com aeração na fase 2 (alimentação com efluente anaeróbio e sobrenadante de lodo).....	117
Figura 9-4 - Dinâmica do fluxo de N <sub>2</sub> O e CH <sub>4</sub> durante os períodos sem aeração na fase 2 (alimentação com efluente anaeróbio e sobrenadante de lodo).....	118
Figura 9-5 – Abundância relativa de microrganismos do ciclo do nitrogênio (n° de cópias/gSSV) no RBS ao longo da operação, incluindo duas amostras da fase 1 (dia 0 e dia 70) e duas amostras da fase 2 (dia 250 e 451) .....	120

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2-1 – Constantes cinéticas de BOA, BON, Anammox e bactérias heterotróficas.....	42
Tabela 2-2 - Resumo de pesquisas utilizando o processo de NP/A com diferentes configurações de reatores, estratégias de aeração, concentração de OD e alimentação .....	49
Tabela 4-1 – Premissas, objetivos específicos e hipóteses da pesquisa .....	53
Tabela 5-1 - Características de concepção e operação do reator UASB utilizado para tratamento de efluente doméstico bruto.....	56
Tabela 5-2 - Características da concepção do RFC e seus principais componentes .....	59
Tabela 6-1– Estratégias operacionais no RBS para estabelecer atividade anammox (fases 1, 2 e 3); processo de NP/A (fases 4, 5 e 7) e recuperação de atividade anammox (fases 6.1 e 6.2).	66
Tabela 6-2- Principais características do efluente de reator UASB tratando efluente doméstico utilizado nesta pesquisa .....	67
Tabela 6-3 – Mediana e coeficiente de variação (C.V.) das eficiências de remoção de N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , NT, AT e DBO (%), taxas de N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> produzido/N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> consumido e AT <sub>consumida</sub> /N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> consumido e concentrações efluentes de N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , NT, AT, DBO, N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> e N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> nas fases de 1 a 7. ....	71
Tabela 7-1- Descrição das estratégias operacionais adotadas na operação do RBS2L .....	81
Tabela 7-2 – Resumo da dinâmica de emissão de N <sub>2</sub> O e CH <sub>4</sub> na fase 4 (1 min on/14 min off) com valores medianos de emissões e de cargas aplicadas de NT e DQO .....	83
Tabela 7-3 - Resumo da dinâmica de emissão de N <sub>2</sub> O e CH <sub>4</sub> na fase 5 (5 min on/14 min off) com valores medianos de emissões e de cargas aplicadas de NT e DQO .....	85
Tabela 7-4 - Resumo da dinâmica de emissão de N <sub>2</sub> O e CH <sub>4</sub> na fase 7 (7 min on/14 min off) com valores medianos de emissões e de cargas aplicadas de NT e DQO .....	87
Tabela 7-5 - Microorganismos do ciclo do nitrogênio e de bactérias metanotrófica com abundância relativa igual ou superior a 1% em pelo menos uma das amostras. ....	90
Tabela 8-1 – Caracterização do meio de cultura para bioaugmentação de bactérias anammox utilizado como afluente do RFC 1 e do efluente anaeróbico doméstico utilizado com efluente do RFC2.....	96
Tabela 8-2 – Caracterização dos efluentes dos reatores RFC 1 e RFC 2 .....	100
Tabela 8-3 – Eficiência de remoção dos compostos dos reatores RFC1 e RFC2 .....	101
Tabela 8-4 –Microorganismos do ciclo do nitrogênio e bactérias metanotróficas (≤ 1% ) no inóculo nos reatores e na biomassa aderida no RFC1 e RFC2.....	105
Tabela 9-1 – Caracterização do efluente anaeróbico doméstico e da combinação de efluente anaeróbico doméstico e sobrenadante de lodo de reator UASB (proporção de 3:1).....	112

Tabela 9-2 – Eficiência de remoção dos compostos nitrogenados e carbonáceos e consumo de alcalinidade (%) no RBS nas fases 1 e 2. ....	113
Tabela 9-3 – Concentrações das variáveis (mg/L) e coeficientes cinéticos do efluente do RBS na fase 1 e 2. ....	115
Tabela 9-4 – Valores medianos de emissão de N <sub>2</sub> O e CH <sub>4</sub> nas fases 1 (alimentação com efluente anaeróbio doméstico) e fase 2 (alimentação com efluente anaeróbio doméstico e sobrenadante de lodo na proporção 3:1). ....	120
Tabela 9-5 – Diversidade microbiana do RBS ao final das fases 1 (dia 250) e 2 (dia 451), com microrganismos do ciclo do nitrogênio e de bactérias metanotróficas (abundância igual ou superior a 1% em pelo menos uma das amostras) ....	123
Tabela A-1 - Informações complementares da análise de bioinformática dos resultados de NGS (número de sequências recuperadas, índice de diversidade de Chao1, índice de diversidade de Shannon, índice de diversidade de Gini-Simpson e índice de diversidade de Simpson inverso .....)	139

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anammox	Oxidação anaeróbia do amônio (do inglês, <i>Anaerobic ammonium oxidation</i> )
APHA	<i>American Public Health Association</i>
AOA	Arquéias oxidadoras de amônio (do inglês, <i>Ammonium oxidizing archaea</i> )
BOA	Bactérias oxidadoras de amônio (do inglês, <i>Ammonium oxidizing bacteria</i> )
BON	Bactérias oxidadoras de nitrito (do inglês, <i>Nitrite oxidizing bacteria</i> )
CePTS	Centro de pesquisa e treinamento em saneamento
CH <sub>4</sub>	Metano
C/N	Carbono/nitrogênio
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
COPASA	Companhia de Saneamento de Minas Gerais
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DESA	Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental
BDH	Bactérias heterotróficas desnitrificantes (do inglês, <i>Denitrifying heterotrophic bacteria</i> )
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DQO	Demanda química de oxigênio
DQO/DBO	Demanda química de oxigênio/Demanda bioquímica de oxigênio
ETE	Estação de tratamento de esgoto
GEE	Gases de efeito estufa
H <sub>2</sub> S	Sulfeto de hidrogênio
IFAS	Reator de lodos ativados com biofilme fixo integrado (do inglês, <i>Integrated fixed film activated sludge</i> )
N	Nitrogênio
N-damo	Oxidação do metano dependente do nitrito (do inglês, <i>nitrite-dependent anaerobic methane oxidation</i> )
NGS	Sequenciamento de nova geração (do inglês, <i>new generation sequencing</i> )
NH <sub>3</sub>	Amônia livre

NaOH	Hidróxido de sódio
N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrito
N-HNO <sub>2</sub>	Ácido nitroso livre
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrato
N-NO	Óxido nítrico
N-N <sub>2</sub> O	Óxido nitroso
N-N <sub>2</sub>	Nitrogênio gasoso
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Íon amônio
NP/A	Nitrificação parcial/anammox
NTK	Nitrogênio total Kjeldahl
OD	Oxigênio dissolvido
pH	Potencial hidrogeniônico
PCR	Reação da polimerase em cadeia (do inglês, <i>polymerase chain reaction</i> )
qPCR	Reação da polimerase em cadeia quantitativo
RBS	Reator em bateladas sequenciais
rpm	Rotações por minuto
SNAD	Nitrificação parcial, anammox e desnitrificação simultâneos (do inglês, <i>Simultaneous nitritation, anammox and denitrification</i> )
SNIS	Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento
TDH	Tempo de detenção hidráulica
TRS	Tempo de retenção de sólidos
UASB	Reator anaeróbio de manta de lodo e fluxo ascendente (do inglês, <i>up flow anaerobic sludge blanket</i> )
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>24</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>28</b>
2.1	Impactos antrópicos no ciclo do nitrogênio .....	28
2.2	Nitrogênio em águas residuárias .....	31
2.3	Sistemas para remoção de nitrogênio de águas residuárias .....	33
2.4	Sistemas de remoção de nitrogênio com aplicação do processo anammox.....	34
2.4.1	Inoculação e partida de reatores anammox.....	35
2.4.2	Águas residuárias oriundas de processos anaeróbios .....	37
2.5	Comunidade microbiana envolvida no tratamento de águas residuárias visando a remoção de nitrogênio .....	40
2.6	Configurações de sistemas para NP/A.....	44
2.6.1	NP/A tratando a fase líquida em ETEs.....	44
2.6.2	Estratégias de aeração.....	46
2.7	Emissões gasosas na remoção biológica de nitrogênio.....	47
2.7.1	Estratégias operacionais para redução de óxido nitroso em sistemas de NP/A..	49
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>51</b>
3.1	Objetivo geral.....	51
3.2	Objetivos específicos .....	51
<b>4</b>	<b>PREMISSAS E HIPÓTESES</b> .....	<b>52</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>54</b>
5.1	Planejamento experimental.....	54
5.2	Efluente anaeróbio doméstico e sobrenadante de lodo .....	55
5.3	Reatores utilizados para avaliação de NP/A .....	56
5.3.1	Reator de mistura completa em bateladas sequenciais .....	56
5.3.2	Reatores de fluxo contínuo .....	56
5.3.3	Inoculação dos reatores, amostragem e análises da biomassa.....	58

<b>6 ETAPA 1 – NITRIFICAÇÃO PARCIAL/ANAMMOX PARA REMOÇÃO DE NITROGÊNIO DE EFLUENTE ANAERÓBIO DOMÉSTICO EM REGIÃO DE CLIMA TROPICAL: ESTRATÉGIAS DE AERAÇÃO E COMUNIDADE BACTERIANA DO CICLO DO NITROGÊNIO (DADOS DO CAPÍTULO PUBLICADO NA REVISTA ENVIRONMENTAL TECHNOLOGY)</b> .....	61
6.1 Introdução .....	61
6.2 Materiais e métodos .....	63
6.2.1 Efluente anaeróbio doméstico .....	63
6.2.2 RBS.....	63
6.2.3 Inóculo .....	63
6.2.4 Estratégias operacionais do RBS .....	64
6.2.5 Análises físico-químicas.....	64
6.2.6 Extração de DNA e qPCR .....	64
6.3 Resultados e discussão .....	65
6.3.1 Características do efluente anaeróbio .....	65
6.3.2 Partida do RBS com lodos ativados como inóculo.....	66
6.3.3 Alimentação com efluente anaeróbio doméstico com suplementação de nitrito sob 35°C e sob temperatura ambiente .....	67
6.3.4 Estratégias de aeração com curtos períodos de aeração (1 e 5 min de aeração e 14 min de não-aeração).....	70
6.3.5 Fase de recuperação e nova estratégia de aeração (7 min de aeração/ 14 min sem aeração) 72	
6.3.6 Bactérias do ciclo do nitrogênio .....	74
6.4 Conclusão.....	76
<b>7 ETAPA 2 – ESTRATÉGIAS DE AERAÇÃO INTERMITENTE PARA NITRIFICAÇÃO PARCIAL/ANAMMOX APLICADA AO TRATAMENTO DE EFLUENTE ANAERÓBIO DOMÉSTICO: DINÂMICA DA EMISSÃO DE GASES DE EFEITO ESTUFA E AVALIAÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA</b> .....	77
7.1 Introdução .....	77

7.2	Materiais e métodos .....	78
7.2.1	Configurações do reator.....	78
7.2.2	Estratégias operacionais .....	79
7.2.3	Efluente anaeróbio doméstico .....	79
7.2.4	Amostragem e análises físico-químicas da fase líquida e gasosa.....	79
7.2.5	Avaliação da diversidade microbiana.....	80
7.3	Resultados.....	81
7.3.1	Fase 4 (1 min on/14 min off).....	81
7.3.2	Fase 5 (5 min on/14 min off).....	82
7.3.3	Fase 7 (7 min on/14 min off).....	84
7.3.4	Comunidade microbiana (NGS) .....	87
7.4	Conclusões .....	90

**8 ETAPA 3 - INVESTIGAÇÃO DE PARTIDA DE REATORES DE LEITO IMOBILIZADO EM ESPUMA COM EFLUENTE ANAERÓBIO DOMÉSTICO REAL SOB AERAÇÃO INTERMITENTE PARA NITRIFICAÇÃO PARCIAL/ANAMMOX**

**91**

8.1	Introdução .....	91
8.2	Materiais e métodos .....	92
8.2.1	Reatores de leito fixo em espuma e fluxo contínuo.....	92
8.2.2	Análises físico-químicas.....	93
8.2.3	Análises microbiológicas.....	93
8.3	Resultados e discussão .....	94
8.3.1	Caracterização do meio de cultura autotrófico (alimentação do RFC1) e efluente anaeróbio doméstico (alimentação do RFC2) .....	94
8.3.2	Desempenho dos reatores e remoção de nitrogênio .....	96
8.3.3	qPCR de microrganismos do ciclo no nitrogênio .....	101
8.3.4	Diversidade microbiana (NGS) .....	102
8.4	Conclusões .....	104

<b>9 ETAPA 4: CO-TRATAMENTO DE EFLUENTE DOMÉSTICOS DOMÉSTICOS: EFEITOS NA NITRIFICAÇÃO PARCIAL/ANAMMOX, DINÂMICA DE EMISSÃO DE ÓXIDO NITROSO E METANO E COMUNIDADE MICROBIANA.....</b>	<b>106</b>
9.1 Introdução .....	106
9.2 Materiais e métodos .....	108
9.2.1 Reator em bateladas sequenciais .....	108
9.2.2 Efluente anaeróbico doméstico e sobrenadante de lodo anaeróbico.....	108
9.2.3 Estratégias operacionais do RBS.....	108
9.2.4 Análises físico-químicas na fase líquida .....	109
9.2.5 Análise de N <sub>2</sub> O e CH <sub>4</sub> na fase gasosa.....	109
9.2.6 Variáveis microbiológicas .....	109
9.3 Resultados e discussão.....	110
9.3.1 Características do efluente anaeróbico doméstico e da mistura de efluente anaeróbico e lodo anaeróbico.....	110
9.3.2 Desempenho do RBS nas fases 1 e 2.....	112
9.3.3 Dinâmica de N <sub>2</sub> O e CH <sub>4</sub> .....	114
9.3.4 Abundância relativa de microorganismos do ciclo do nitrogênio (qPCR).....	119
9.3.5 Diversidade microbiana (NGS) .....	121
9.4 Conclusões .....	124
<b>10 CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>125</b>
<b>11 RECOMENDAÇÕES.....</b>	<b>128</b>
<b>12 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>129</b>
<b>APÊNDICE A – Informações complementares da análise de bioinformática dos resultados de NGS (número de sequências recuperadas, índice de diversidade de Chao1, índice de diversidade de Shannon, índice de diversidade de Gini-Simpson e índice de diversidade de Simpson inverso .....</b>	<b>138</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Dentre as problemáticas ambientais alarmantes, destaca-se a disseminação indevida de nitrogênio nas diversas matrizes ambientais devido à assimilação excessiva deste nutriente, principalmente após o advento do processo Haber-Bosh para a produção de fertilizantes (ROCKSTRÖM et al., 2009; STEIN; KLOTZ, 2016). Na América Latina, um dos principais desafios ambientais consiste no lançamento de efluentes sem o devido tratamento e contendo nutrientes como o nitrogênio, o que potencializa danos aos corpos hídricos e, conseqüentemente, à água para consumo humano, agricultura e atividades aquáticas como pesca e lazer (FURLEY et al., 2018).

Este cenário reforça a necessidade de gerenciamento correto do nitrogênio, com destaque às águas residuárias, por serem uma fonte expressiva de lançamento indevido deste composto em matrizes ambientais. Além da importância das iniciativas de recuperação de nitrogênio, o atual cenário de excesso de nitrogênio fixado demanda também processos de remoção de compostos de nitrogênio fixados a nitrogênio gasoso ( $N_2$ ). Dentre os processos de remoção de nitrogênio, as vias biológicas têm maior aplicação e interesse pela viabilidade econômica em comparação a processos físico-químicos.

O processo clássico, usualmente utilizado para remoção biológica de nitrogênio, com nitrificação total seguida de desnitrificação heterotrófica é associado à alta demandas de oxigênio e depende da disponibilidade de matéria orgânica suficiente para garantir a desnitrificação (PIJUAN et al., 2020). No entanto, as estações de tratamento de esgotos (ETEs) estão sob constante demanda para se tornarem mais sustentáveis, ao mesmo tempo em que precisam garantir a qualidade do efluente final (HAUSHERR et al., 2021). Nesse sentido, a seleção de tecnologias para remoção de nutrientes requer sustentabilidade econômica e desempenho adequado, de forma a garantir a segurança hídrica dos corpos receptores.

Nesse sentido, a aplicabilidade do processo anammox tem sido amplamente investigada, pois os processos combinados de nitrificação parcial e anammox (NP/A) são capazes de promover economias e outras vantagens significativas na remoção de nitrogênio de águas residuárias. Uma vez que a NP/A é um sistema completamente autótrofo, reduz os custos de aeração, demanda de carbono e geração de lodo em até 60, 100 e 100%, respectivamente (LACKNER et al., 2014). Além disso, a contribuição do processo de nitrificação parcial e anammox (NP/A)

para alcançar autarquia energética em ETEs, quando implementado na fase líquida é inegável (PEDROUSO et al., 2021).

A NP/A depende da atividade conjunta de bactérias aeróbias oxidadoras de amônio (BOA) e de bactérias anaeróbias oxidadoras de amônio (anammox), que converte o amônio em nitrogênio gasoso (SEUNTJENS et al., 2020). No entanto, a taxa de crescimento de anammox é menor em comparação a outros microrganismos envolvidos no ciclo do nitrogênio e interferentes na remoção deste composto de águas residuárias devido à competição por substratos (LACKNER et al. 2008; LOTTI et al., 2014). Por esta razão, apesar das vantagens do processo de NP/A, a aplicação é desafiadora e requer redução dos fatores intervenientes neste processo.

Por este motivo, algumas estratégias operacionais têm sido investigadas e aplicadas com o intuito de garantir a remoção de nitrogênio via NP/A, através da alta atividade de bactérias anammox e controle de atividade dos demais microrganismos. Estas condições operacionais dependem do tipo de sistema de NP/A, como carga de nitrogênio e outras características do afluente, como teor de matéria orgânica e outros compostos; configuração do reator de NP/A, temperatura no reator e demais variáveis de controle (LACKNER et al., 2014; CAO et al., 2017; GANI et al., 2020; WANG et al., 2022).

O tratamento anaeróbio de águas residuárias domésticas é uma das principais tecnologias aplicadas no Brasil e outros países com clima tropical e subtropical, com notórias vantagens devido ao potencial de recuperação energética (CHERNICHARO et al., 2018). Segundo os autores, a maioria das ETEs no Brasil ainda não conta com unidades para remoção de nitrogênio e as poucas existentes baseiam-se no sistema clássico de nitrificação total e desnitrificação heterotrófica, que frequentemente é intensivamente energético. Além disso, este sistema clássico requer altas demandas de alcalinidade para a nitrificação total e de matéria orgânica como fonte de carbono para a desnitrificação heterotrófica. Estes compostos podem estar indisponíveis nos efluentes pós remoção prévia de matéria orgânica para garantir a remoção adequada de nitrogênio.

Por esse motivo, investigações da aplicabilidade da NP/A em efluentes provenientes de tratamento anaeróbio (denominados como efluentes anaeróbios) são importantes para aprimorar a qualidade do tratamento de águas residuárias no Brasil, através de soluções sustentáveis e altamente eficientes de remoção de nitrogênio. Para isso, fatores como estratégias de aeração,

aplicabilidade em temperatura ambiente e a recuperação dos sistemas devem ser incluídos nas pesquisas de NP/A.

A demanda por sistemas de ETEs cada vez mais sustentáveis requer, além de adequada qualidade final do efluente, atenção à possíveis lançamentos de gases de efeito estufa (GEE). Nesse sentido, ETEs podem representar significativas emissões de GEEs, como o metano ( $\text{CH}_4$ ), subproduto da remoção anaeróbia de matéria orgânica e óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ). Nesse sentido, o processo anammox também apresenta vantagens, pois tem o potencial de redução das emissões de  $\text{CH}_4$  e  $\text{N}_2\text{O}$  (GANI et al., 2020; PIJUAN et al., 2020).

Outro desafio a respeito da aplicação do processo de NP/A é a implementação em localidades sem inóculo anammox com alta atividade, além da frequente aclimação da biomassa com meio de cultura autotrófico. Estes dois pontos dificultam a instalação de novos reatores anammox, em escala plena, principalmente, devido à complexidade operacional e de obtenção de inóculo. Portanto, investigações sobre o aprimoramento de partidas de reatores com inóculo alternativo – como lodos ativados –, que são comumente encontrados, devem ser exploradas.

Há também dificuldade de implementar a NP/A em efluentes domésticos pelas menores cargas de nitrogênio. No caso de efluentes anaeróbios, há um segundo grande desafio, que é a presença em maiores teores (em comparação com efluente proveniente de tratamento aeróbio) de matéria orgânica, composto conhecido como interveniente e dificultador da NP/A. Assim, o co-tratamento de efluentes com maiores e menores concentrações de nitrogênio tem o potencial de equalizar choques de carga e também aumentar a concentração de nitrogênio e assim favorecer o processo de NP/A. Nesse sentido, o co-tratamento surge como contribuição para tratar diversos tipos de efluentes em ETEs.

O processo e as bactérias anammox têm sido estudados ao longo de quinze anos no Programa de Pós-Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos da Universidade Federal de Minas Gerais (SMARH/UFMG). As primeiras pesquisas foram voltadas para a investigação do cultivo e enriquecimento de biomassa anammox, utilizando meio de cultura sintético e inóculo alternativo proveniente de outros sistemas de tratamento de águas residuárias (CAMPOS, 2011; COSTA, 2013; LARA, 2009). Após, avanços foram feitos em termos de avaliação de compostos tóxicos na inibição de bactérias anammox, como fenol e matéria orgânica sintética (LEAL, 2015; PEREIRA, 2013). A aplicação de efluentes reais (efluente anaeróbio doméstico e digestato de resíduos alimentares, porém sem aeração para NP/A e

utilizando suplementação de  $\text{NO}_2^-$  foram realizadas posteriormente (FERNANDES., 2017; PEREIRA, 2018). Os efeitos de diferentes temperaturas controladas, na aplicação de efluentes reais com suplementação de  $\text{NO}_2^-$  também foram avaliados (FERNANDES, 2017). A NP/A foi investigada para remoção de nitrogênio de digestato de resíduos alimentares em sistema sob temperatura controlada e temperatura ambiente, com altas eficiências de remoção (CARVALHO, 2019), no entanto, a experiência tentando adotar as mesmas condições para efluente anaeróbio doméstico não alcançou a NP/A, havendo instabilidade no sistema e acúmulo de nitrogênio (FERNANDES, 2019).

Este trabalho justifica-se pela necessidade de aperfeiçoar tecnologias sustentáveis de remoção de nitrogênio de efluentes, devido ao frequente lançamento deste composto em corpos d'água. Devido às vantagens econômicas e ambientais do processo conjugado de NP/A, muitas pesquisas têm sido desenvolvidas a fim de elucidar, otimizar e ampliar a aplicabilidade do processo, desde o descobrimento das bactérias e do processo anammox, na década de 1990.

No entanto, estas pesquisas têm se concentrado na Europa e na China, sendo menos frequentes no Brasil. Uma vez que ETEs brasileiras tipicamente utilizam tecnologias de tratamento anaeróbio (reatores UASB), o processo de NP/A tem potencial de ser aplicado com sucesso como pós tratamento destes efluentes. No entanto, pouco se sabe sobre quais seriam os impactos da própria composição destes efluentes - matéria orgânica, gases dissolvidos, níveis de nitrogênio, alcalinidade, dentre outros - no processo, qual a configuração de reator mais adequada (reator de mistura completa com grânulos sob bateladas sequenciais, reator de leito fixo e fluxo contínuo, entre outros), estratégias de aeração, inoculação e crescimento de bactérias anammox, especificidades operacionais sob efluentes anaeróbios com diferentes concentrações de nitrogênio, desempenho e lançamento de emissões gasosas.

Além disso, a temperatura tropical/subtropical brasileira é vantajosa para a aplicação de processos baseados em vias anaeróbias - como processo anammox - sem necessidade de adaptação de inóculo ou aquecimento de reatores, como frequentemente ocorre com sistemas de digestão anaeróbia de lodos ativados em países de clima temperado (LACKNER et al., 2014). Porém, há muitas lacunas a serem preenchidas no âmbito do processo de NP/A em condições brasileiras, mesmo que haja potencial vantagem em virtude da temperatura moderada, ainda há questões não elucidadas como aplicabilidade aos efluentes reais brasileiros, em especial, provenientes de sistemas anaeróbios e sistemas com baixas concentrações de nitrogênio em geral (efluentes domésticos).

Adicionalmente, não há consenso na literatura mundial sobre estratégias de aeração e configurações de reatores e suas adaptações para diferentes tipos de efluentes, contendo maiores e menores concentrações de nitrogênio, matéria orgânica, entre outros compostos. Compostos estes que, principalmente a matéria orgânica, têm se mostrado como inibidores do processo anammox. Há dificuldade em estabelecer a NP/A em efluentes domésticos, onde há menores concentrações de nitrogênio em comparação a centrados e lixiviados, por exemplo.

Dessa forma, o presente trabalho visa contribuir para o avanço de pesquisas no SMARH e no Brasil sobre a aplicabilidade do processo anammox em temperaturas ambientes no brasileiro (no caso desta pesquisa, no Sudeste brasileiro), para a remoção de nitrogênio de efluentes reais, verificando a viabilidade deste processo como pós-tratamento de reator UASB, uma vez que é uma das tecnologias mais empregadas em ETEs no país.

As diversas condições operacionais, como características dos efluentes, estratégias de aeração, vazão de ar e tempo de detenção hidráulica (TDH) -, pretendem verificar o desempenho do sistema diante de mudanças e, principalmente, as melhores estratégias para manter adequada remoção de nitrogênio. Por fim, este trabalho busca não somente tópicos inéditos a serem abordados, mas principalmente uma real contribuição para o avanço científico na área de saneamento, com aperfeiçoamento de processos anaeróbios que até então têm sido utilizados para remoção de matéria orgânica, mas com alto potencial de também remover nitrogênio. Especialmente no Brasil, onde há um considerável déficit nos âmbitos da tratabilidade de águas residuárias e da sustentabilidade, as contribuições no âmbito das tecnologias de tratamento de águas residuárias poderão refletir diretamente na qualidade de vida da população e qualidade ambiental.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Impactos antrópicos no ciclo do nitrogênio**

As interferências no ciclo do nitrogênio (N) causadas por atividades antrópicas e suas consequências são historicamente reportadas na literatura científica. Com grande destaque, encontra-se o excessivo lançamento de N em ambientes aquáticos, bem como lançamentos de compostos nitrogenados poluentes na atmosfera e solo. Os efeitos notórios destes impactos incluem eutrofização, aumento da produção de gases de efeito estufa, riscos à saúde humana, dentre outros impactos. (ROCKSTRÖM et al., 2009) observaram as interferências e mudanças no ciclo do nitrogênio, juntamente com as mudanças climáticas e a taxa de perda da

biodiversidade, são processos que já excederam seus limites e comprometem significativamente os principais componentes de funcionamento do ambiente terrestre.

Apesar de sua relevância para a maioria dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Organização das Nações Unidas (ONU), a poluição por nitrogênio ainda carece de ampla visibilidade e governança global coordenada (Sutton et al., 2021). Segundo os autores, apesar do surgimento de agências mundiais e convenções para tratar sobre questões relacionadas ao N, os resíduos de N continuam aumentando no meio ambiente, triplicando sua magnitude nas últimas quatro décadas.

Naturalmente, a fixação de nitrogênio no ambiente terrestre é realizada através de processos biológicos, bem como a conversão do nitrogênio fixado em gás dinitrogênio ( $N_2$ ) através do processo de desnitrificação. Contudo, na década de 1990 já era reportado que atividades antrópicas mais do que duplicaram a taxa global de fixação de nitrogênio, de 130 teragramas (Tg)/ano no período pré-industrial para 280 Tg/ano (Kinzig & Socolow, 1994). Segundo os autores, a taxa de fixação de nitrogênio para fins de fertilização era de aproximadamente 90 Tg/ano. Mundialmente, a destinação de nitrogênio para cultivo agrícola, incluindo fertilizantes sintéticos e orgânicos, fixação biológica e deposição atmosférica quadruplicou desde a década de 1960 (em média, 40 Tg/ano) até 2010 (em média, 161 Tg/ano) (Zhang et al., 2021).

O processo industrial de fixação de  $N_2$  é essencial para a produção de alimentos, mas atualmente apresenta altos prejuízo ambiental e à saúde pública (Erismann et al., 2013; Zhang et al., 2021; Sutton et al., 2021). Apesar do aumento do uso para cultivos, o excesso de fertilização utilizando N pode ter efeito inverso ao desejado crescimento acelerado das diversas culturas, através da inibição do crescimento do plantio, redução da fertilidade do solo por acidificação, aumento de espécies invasoras, e no ambiente aquático com mortalidade de peixes e outras espécies alimentícias, por intoxicação causada por excesso de algas tóxicas (Townsend et al., 2003).

Uma vez que o aumento populacional foi significativo desde a década de 1990 até os dias atuais, as fontes de lançamento de nitrogênio intensificaram este processo, por meio do consequente aumento da produção de diversos tipos de águas residuárias (domésticos e industriais), queima de combustíveis fósseis e da fertilização agrícola em decorrência da demanda por alimento (Townsend et al., 2003; Erismann et al., 2013). Desse modo, Mahmud et al. (2021) elencou uma

série de estratégias de plantio agrícola sustentável, com foco na mitigação da poluição global causada por N, com menor aplicação de N sem redução de desempenho.

No Brasil, a fixação de nitrogênio devido a atividades antrópicas duplicou de 1995 a 2002, principalmente devido à excessiva fixação biológica de nitrogênio em sistemas agrícolas (Filoso et al., 2006). Segundo os autores, no ano de 2002, a produção de soja, que ocupa área de mais de 20 milhões de hectares, foi responsável por um terço da fixação de nitrogênio causada por atividades antrópicas mundialmente. Além disso, as áreas de pastagem, que correspondem a 70% das áreas agrícolas do país, também têm influência significativa na fixação excessiva de nitrogênio (Filoso et al., 2006). De acordo com Zhang et al. (2021), juntamente com a China, Índia e Estados Unidos, o Brasil foi responsável por 56 a 66% das entradas e saídas de nitrogênio a nível mundial.

As altas concentrações de N no ar, água e solo gera impactos não somente nos compartimentos ambientais, mas também na saúde humana (Kinzig & Socolow, 1994; Townsed et al., 2003; Erisman et al., 2013). À medida que atividades agrícolas e industriais se intensificam, as perdas de N no meio ambiente têm efeitos diretos e indiretos na saúde humana Townsend et al. (2003). Os autores observaram correlações entre compostos de nitrogênio em excesso em corpos hídricos e na atmosfera com doenças respiratórias, doenças cardíacas e diversos tipos de câncer, além do aumento de alergias à pólen e distúrbios na dinâmica de diversos vetores de doença, incluindo o vírus do Nilo Ocidental, malária e cólera. Os benefícios da aplicação de altos teores de N para produção global de alimentos é evidente, no entanto, o gerenciamento do nitrogênio, evitando concentrações excessivas em matrizes ambientais é uma questão de saúde pública.

De acordo com Townsed et al. (2003), mesmo com a recomendação da Organização Mundial de Saúde (OMS) para concentração de máxima de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) de 10 mg/L em água de abastecimento humano, visando a segurança dos consumidores, este composto tem estado acima deste limite em muitos países, pelo uso excessivo de fertilizantes. Segundo os autores, os riscos à saúde associados à ingestão de altos teores de  $\text{NO}_3^-$  incluem problemas reprodutivos, metahemoglobinemia e câncer.

A aplicação de fertilizantes no solo produz óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), aumentando a concentração e o lançamento deste gás de efeito estufa (Kinzig & Socolow, 1994; Mahmud et al., 2021). Além disso, a disposição excessiva de nitrogênio em matrizes ambientais aumenta a concentração de ozônio e de material particulado na atmosfera – o que implica em riscos à população – e diminui

a concentração de ozônio na estratosfera, contribuindo para a intensificação do aquecimento global (Erisman et al., 2013). Uma vez que ecossistemas terrestres naturalmente têm limitada disponibilidade de nitrogênio, o aumento deste composto favorece a produtividade primária, causando diferença e alterações na composição de comunidades ecossistêmicas e redução de biodiversidade (Kinzig & Socolow, 1994; Erisman et al., 2013).

## 2.2 Nitrogênio em águas residuárias

A sustentabilidade está sempre na lista de prioridades de formuladores de legislações e pesquisadores quanto ao tratamento de águas residuárias, visando reduzir impactos quanto a mudanças climáticas e menor consumo de recursos (Gani et al., 2020). Considerando o histórico cenário de fixação excessiva de N e seus impactos, esforços para desenvolver e aprimorar tecnologias de remoção de nitrogênio estão sendo executados através de diversas pesquisas. Nesse sentido, o foco tem se mantido em águas residuárias, visando aperfeiçoar o tratamento e evitar lançamento de N em corpos hídricos.

Por outro lado, diversos estudos têm sido desenvolvidos objetivando a recuperação de N de águas residuárias. Beckinghausen et al. (2020) reporta que através do reaproveitamento de N de águas residuárias, há significativa redução tanto de custos quanto de impactos ambientais no uso de N reaproveitado para produção de fertilizantes. No entanto, devido aos grandes impactos da fixação excessiva de N somada à tendência de cultivos agrícolas cada vez mais sustentáveis com redução da demanda de N sem prejuízo no desempenho do processo, é igualmente necessário desenvolver técnicas sustentáveis para remoção de N.

Visando identificar questões prioritárias para alcançar o desenvolvimento sustentável na América Latina, Furley et al. (2018) observaram desafios intensos relacionados a geração de efluentes e resíduos sólidos. Os autores ressaltam que o lançamento de efluentes contendo nitrogênio potencializa o surgimento de florações algais, comprometendo a qualidade ambiental e saúde pública. No Brasil, visando reduzir os impactos decorrentes da gestão inadequada de resíduos e efluentes e proteger corpos hídricos, foram estabelecidas diretrizes normativas prescritas na Política Nacional de Resíduos Sólidos (MMA, 2010) e em Resoluções do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) nº 357 e 430 (CONAMA, 2005; CONAMA, 2011) No entanto, após mais de uma década destes marcos legais, o cenário ainda é desafiador.

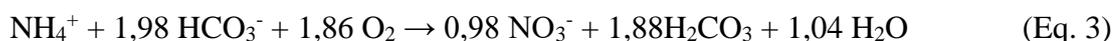
De acordo com o Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgoto do ano de 2019 (SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES SOBRE SANEAMENTO - SNIS, 2020), apenas 49,1% dos esgotos gerados no Brasil são tratados, com as regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul apresentando os maiores índices, que ainda não são ideais (57, 56 e 47%, respectivamente. No entanto, Chernicharo et al. (2018) constataram que na maioria das estações de tratamento de esgoto (ETEs) localizadas nestas Regiões prevalecem sistemas com utilização de lodos ativados e também de reatores de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB, do inglês, *upflow anaerobic sludge blanket*), estes últimos que funcionam na maioria das ETES como primeiro estágio de tratamento, já que, por ser um processo anaeróbio, tem economias significativas de custo de operação, além da possibilidade de aproveitamento energético. Tecnologias anaeróbias de tratamento de águas residuárias tem se tornado mais populares recentemente por sua ampla gama de aplicações, alta taxa carregamento volumétrico, baixa produção de lodo, baixo consumo de energia e capacidade de recuperação energética (Wang et al., 2020).

Apesar das significativas vantagens da aplicação de reatores UASB para o tratamento de esgotos, são necessários tratamentos complementares para adequada disposição do efluente final, visando a remoção de compostos orgânicos e inorgânicos, matéria orgânica, nutrientes e patógenos (Khan et al., 2011). Visando alcançar processos de tratamento sustentáveis do ponto de vista ambiental e econômico, diversos métodos para tratamento de efluentes anaeróbios têm sido investigados e aperfeiçoados, o que contribui não só para a melhoria do processo de tratamento e mitigação de impactos, como também para a ampliação e democratização do acesso ao saneamento em países com déficit neste setor, como o Brasil.

Apesar das deficiências e desafios, o setor de tratamento de esgotos no Brasil em 2019 apresentou expressivos gastos. Considerando apenas custos relacionados à energia elétrica, foram utilizados 760 milhões de reais (sistema nacional de informações sobre saneamento - SNIS, 2020). Dessa forma, a implementação de tecnologias com aproveitamento energético para geração de energia em ETES através da digestão anaeróbia e de outros processos robustos e de baixo custo representam tendências promissoras para melhorar os índices e a qualidade do tratamento de esgotos. Além disso, o desafio para processos de gerenciamento de N em efluentes, como digestatos e efluentes domésticos previamente tratados, também requer sustentabilidade econômica para viabilizar sua maior aplicação.

### 2.3 Sistemas para remoção de nitrogênio de águas residuárias

A etapa de nitrificação geralmente divide-se em duas etapas: oxidação do amônio a nitrito e oxidação do nitrito e nitrato, realizados por BOA/AOA e BON, respectivamente, conforme mostram com estequiométricas apresentadas nas Equações 1 e 2 (WIESMANN, 1994; STEIN & KLOTZ, 2016). Assim, a nitrificação total pode ser definida pela estequiometria apresentada na Equação 3 (HENZE, 2010).



De acordo WEF (2010), o processo de nitrificação total, envolvendo a oxidação de amônio a nitrito (nitritação ou nitrificação parcial) e a posterior oxidação de nitrito a nitrato (nitratação ou nitrificação total) é um processo que envolve alta demanda tanto de oxigênio (4,3g de oxigênio para cada 1g de amônio oxidada a nitrato) quanto de alcalinidade (7,2g de alcalinidade para cada 1g. de amônio oxidada a nitrato).

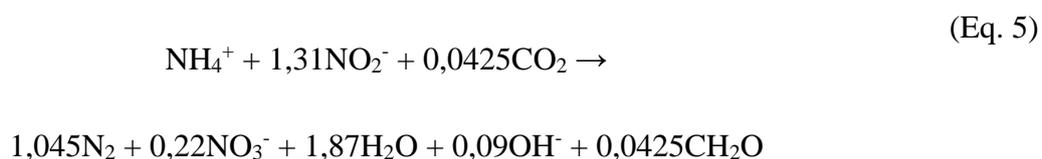
De acordo com Ahn (2006), o processo de desnitrificação do nitrato, realizado por microrganismos desnitrificantes heterotróficos utilizando fonte externa de carbono pode ser descrito conforme a Equação 4. De acordo com os autores, neste processo, para cada 1g de nitrato desnitrificado, são consumidos 2,47 g de carbono externo (como o metanol) e sem considerar a síntese celular, este valor é reduzido para 1,90. De acordo com WEF (2010), na etapa de desnitrificação heterotrófica, são produzidos 3,57g de alcalinidade para cada 1g de nitrato reduzido.



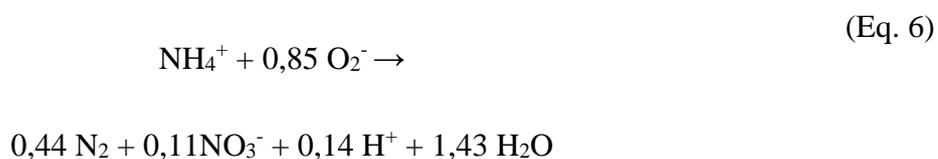
O processo clássico de lodos ativados tem sido reportado desde a década de 1990 como uma alternativa ampla e mundialmente utilizada para remoção de carbono e também de nitrogênio, com a utilização do carbono presente nas próprias águas residuárias, e eventualmente com

adição de metanol (HENZE et al., 1991). Este sistema clássico conta com processos biológicos envolvendo a nitrificação total e desnitrificação heterotrófica, intensivamente energéticos.

Na década de 1990, foi descoberto o processo anaeróbico de oxidação do íon amônio (anammox), que encurta o ciclo do nitrogênio e as etapas para a desnitrificação. O processo anammox é autotrófico, utilizando CO<sub>2</sub> como única fonte de carbono (STROUS et al., 1998a). Van de Graff et al. (1996) propôs a estequiometria apresentada na Equação 5 para este processo.



O processo clássico de nitrificação com aeração e desnitrificação com fonte externa de carbono pode ser substituído pelo processo anammox, uma alternativa com menor demanda de aeração e sem necessidade de fonte externa de carbono (Gani et al., 2020). Assim, esforços têm sido feitos para a aplicação do processo anammox em diversos tipos de águas residuárias, em substituição ao processo clássico. No entanto, o nitrogênio presente em águas residuárias está na forma de íon amônio, prioritariamente (SLIEKERS, 2002), dessa forma, é preciso oxidar parcialmente o nitrito, para fornecer substrato adequadamente para a reação anammox, conforme a Equação 5, num processo chamado nitrificação parcial/anammox. Este processo combinado é realizado através da equação estequiométrica apresentada na Equação 6.



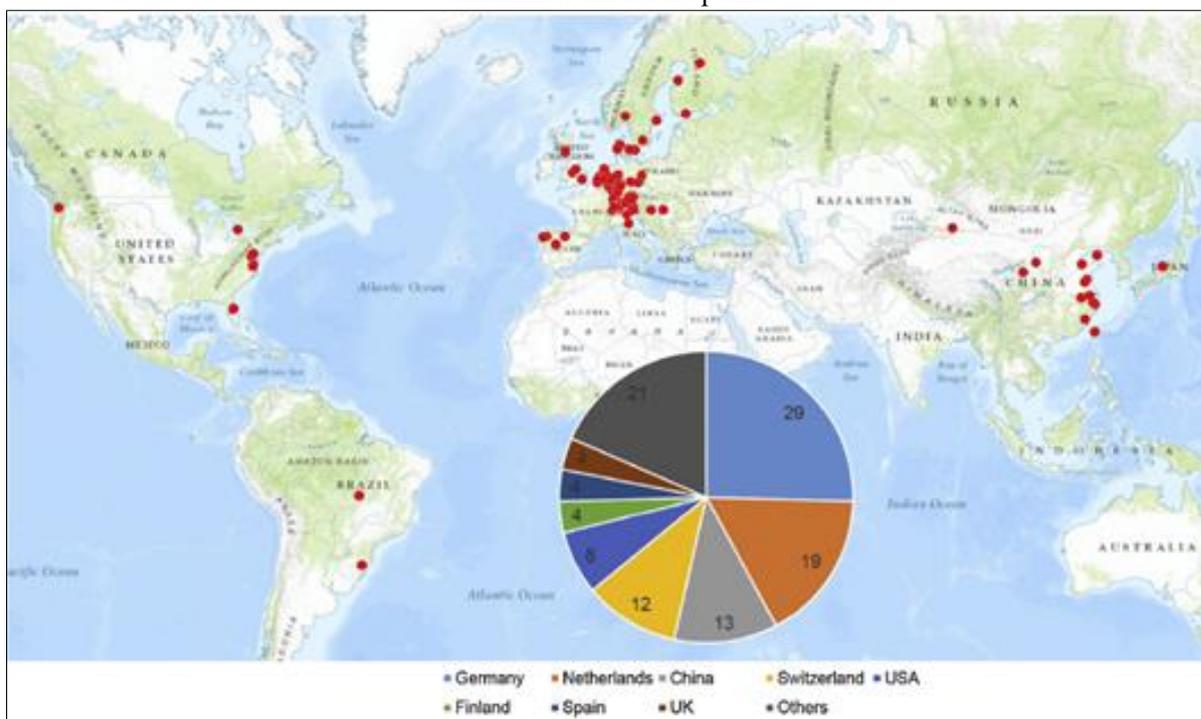
Em comparação ao sistema tradicional para remoção biológica de nitrogênio, o processo anammox consome menores taxas de oxigênio e alcalinidade (WEF), 2010. Adicionalmente, por se tratar de um processo totalmente autótrofo, não há demanda externa de carbono, além da menor produção de lodo (LACKNER et al., 2014).

#### 2.4 Sistemas de remoção de nitrogênio com aplicação do processo anammox

Até o ano de 2015, mais de cem ETEs aplicavam o processo anammox para a remoção biológica de nitrogênio no mundo em escala plena (LACKNER et al., 2014; ALI & OKABE, 2015). De acordo com Lackner et al. (2014), mais de 50% das ETEs com processo anammox em escala plena utilizavam reatores em bateladas sequenciais, 88% contavam com reatores de estágio

único para o processo combinado de nitrificação parcial e anammox, e mais de 75% tratavam o digestato proveniente da digestão anaeróbia da fase sólida destas ETEs. De acordo com Ali & Okabe (2015), estas ETEs estavam concentradas na Europa (Alemanha, Holanda, Suíça e Espanha, principalmente), na China e nos Estados Unidos (Figura 2 1).

Figura 2 1 – Distribuição mundial de estações de tratamento de esgotos com aplicação do processo anammox em escala plena



Fonte: ALI & OKABE (2015).

Recentemente, outras ETEs com processo anammox em escala plena estão consolidadas para os mais diversos tipos de efluentes, como digestato de suinocultura (ISHIMOTO et al., 2021; CHEN et al. (2021), lixiviado de aterro sanitário (MAGRI et al., 2021) e a fase líquida de ETEs (WANG et al., 2021). No entanto, fatores relacionados ao clima (regiões de ambientes temperados) e às próprias características das águas residuárias – como presença de sólidos, carbono, controle de aeração - têm sido reportados como dificuldades em sistemas de NP/A (LACKNER et al., 2014). Em geral, os resultados da aplicação do processo anammox em regiões tropicais são mais promissoras em comparação às regiões temperadas (CAO et al., 2017).

#### 2.4.1 Inoculação e partida de reatores anammox

O inóculo para novos sistemas anammox pode ser proveniente de reatores com atividade anammox em operação, o que usualmente proporciona uma rápida partida destes novos

sistemas, tanto àqueles com suplementação de nitrito (LEAL et al., 2016), como também para o processo de NP/A (DE PRÁ et al., 2021). No entanto, em caso de impossibilidade de obtenção de inóculo de reatores anammox, o lodo proveniente da linha de recirculação de sistemas de lodos ativados tem sido utilizado para a partida de novos reatores anammox (FERNANDES et al., 2018; PEREIRA et al., 2019; AUGUSTO et al., 2018). Os autores observaram que bactérias Anammox estão presentes nesse inóculo, ainda que em proporções menores em relação a outros grupos do ciclo do nitrogênio. Nestes casos, anteriormente à aplicação de efluentes reais, têm sido utilizado meio de cultura sintético, a fim proporcionar atividade anammox adequada, observada usualmente dentro de noventa dias.

No entanto, pesquisas têm provado ser possível a partida de novos reatores anammox sem alimentação com meio de cultura em meio anóxico para a bioaugmentação de bactérias anammox. Qiu et al. (2019) reportaram a partida de reator anammox para remoção de nitrogênio via aeração intermitente para alcançar a NP/A, utilizando lodos ativados como inóculo. Os autores observaram que após 225 dias, o reator foi capaz de alcançar eficiência de remoção de nitrogênio total de até 81,5%.

Choi et al. (2020) reportaram a partida de reator anammox de estágio único para remoção de digestato proveniente da metanização da fase sólida de ETE (concentração de amônio de  $688 \pm 4$  mg/L). A bioaugmentação de BOA e Anammox foi realizada anteriormente à inoculação do reator de NP/A (por 75 dias), com dois reatores inoculados com lodos ativados – o primeiro, para bioaugmentação de BOA foi alimentado com digestato sob aeração intermitente, e o segundo, para bioaugmentação de Anammox foi alimentado com digestato e nitrito. Após, ambas as biomassas foram utilizadas o reator de NP/A, que atingiu eficiência de remoção de nitrogênio de mais de 82% no 9º dia de operação.

Miao et al. (2020) observaram o estabelecimento de NP/A em reator inoculado com 96,2% de lodo nitrificante e 3,8% de lodo anammox, sob aeração intermitente (8 min on/21 min off) em 75 dias, com eficiência de remoção de nitrogênio de 85,4% sob temperatura ambiente (22 a 26°C). Zhang et al. (2021) alcançaram remoções de nitrogênio acima de 80% em três sistemas de NP/A inoculados com variantes de lodos ativados (de sistemas nitrificante, nitrificação parcial e de remoção de fósforo) após 120 dias de operação. Os autores utilizaram aeração intermitente para promover a nitrificação parcial, e alimentação com efluente doméstico aeróbio, e observaram que sistemas inoculados com diferentes biomassas responderam de maneira similar, obtendo alto desempenho de NP/A.

Zuo et al. (2020) observaram a partida de sistema com NP/A após 77 dias da inoculação com lodos ativados em sistema alimentado com digestato de suinocultura suplementado com nitrito, com concentração de nitrogênio removido de 227 mg/L no 106º dia de operação.

A aplicação do processo de NP/A na fase líquida de ETEs permite a remoção do carbono e nitrogênio e amplia a recuperação energética através da produção de biogás via digestão anaeróbia (CAO et al., 2017).

Altas relações C/N podem resultar em uma ampla fração de bactérias heterotróficas no lodo, resultando na redução da população e atividade de BOA e anammox e, conseqüentemente, em baixas taxas de remoção de nitrogênio (CAO et al., 2017).

#### 2.4.2 Águas residuárias oriundas de processos anaeróbios

A fim de complementar o tratamento de efluentes anaeróbios, muitos métodos de tratamento têm sido desenvolvidos. De acordo com Khan et al. (2011), numerosos processos aeróbios têm sido aplicados no tratamento de efluentes de reatores UASB, com base no processo biológico de nitrificação total seguido de desnitrificação heterotrófica, como lodos ativados, reatores de leito fluidizado, filtros biológicos, reatores em bateladas sequenciais (RBS), com processo de nitrificação total e desnitrificação heterotrófica, reatores biológicos de leito móvel, reatores com espuma suspensa e fluxo descendente, entre outros. Ainda de acordo com os autores, a redução de custos com energia elétrica em processos aeróbios e em processos combinando reatores UASB com processos aeróbios de tratamento é de 195 para 74 KW-h/1.000 m<sup>3</sup>.d. Sistemas de lagoas de estabilização e *wetlands* construídos são alternativas de tratamento, não só de efluentes anaeróbios, mas de esgoto bruto, conferindo soluções de baixo custo, mas aplicáveis em locais com disponibilidade de área para a implementação.

A integração de tecnologias de tratamento anaeróbio utilizando o processo anammox é uma opção sustentável de tratamento de águas residuárias para remoção de carbono e nitrogênio (GANI et al., 2020). Ainda de acordo com os autores, os impactos conhecidos quanto ao lançamento de efluentes contendo nitrogênio merecem atenção especialmente em efluentes anaeróbios. Isto ocorre pelo fato de que a remoção biológica de carbono por via anaeróbia não envolve processos de remoção de nitrogênio.

Em comparação com tratamentos aeróbios, a demanda química de oxigênio (DQO) de efluentes anaeróbios é maior (WANG et al., 2022). Efluentes anaeróbios contêm metano dissolvido,

sulfeto, pH flutuante, carbono orgânico e sólidos suspensos que podem impactar negativamente o processo anammox, resultando no lançamento de espécies nitrogenadas no ambiente receptor (CAO et al., 2017; GANI et al., 2020). O controle das concentrações de DQO e de sólidos suspensos em efluentes anaeróbios tem se tornado um fator crítico que determina a estabilidade de acoplar a digestão anaeróbia ao processo anammox (WANG et al., 2020).

Pijuan et al. (2020) observaram que a presença de DQO aumenta a atividade de comunidades microbianas desnitrificantes, capazes de consumir DQO utilizando nitrito ou nitrato como acceptor de elétrons, sem que o composto iniba diretamente a atividade anammox. Assim, o desafio para a aplicação de NP/A em efluentes contendo DQO consiste em estratégias operacionais para limitar a atividade de bactérias desnitrificantes.

A presença de altas concentrações de compostos sulfurados, como sulfato ( $\text{SO}_4^-$ ) e sua redução a sulfeto ( $\text{H}_2\text{S}$ ) pode interferir no crescimento de bactérias anammox devido à toxicidade do  $\text{H}_2\text{S}$  (GANI et al., 2020; WANG et al., 2022). No entanto, a aclimatização da biomassa anammox pode aumentar sua resistência ao  $\text{H}_2\text{S}$  (Gani et al., 2022). Além disso, os autores reportam que algumas bactérias podem utilizar  $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}_3^-$  para reduzir enxofre elementar ( $\text{S}_0$ ), processo no qual há consumo demorado de alcalinidade (4,57 mg  $\text{CaCO}_3$  por mg  $\text{NO}_3^-$ ). De acordo com Wang et al. (2022), algumas medidas podem eliminar os compostos de sulfetos de efluentes anaeróbios, como aeração e escape para atmosfera.

Ao mesmo tempo em que há compostos em efluentes anaeróbios com potenciais impactos no processo anammox, alguns destes também podem aperfeiçoar a remoção biológica de nitrogênio. Segundo Gani et al. (2020), o nitrato gerado no processo de NP/A (11% do total de amônio consumido) necessita da presença de fonte externa de carbono para ser removido via desnitrificação heterotrófica. Assim, a presença de carbono orgânico remanescente pode auxiliar na maior remoção de nitrogênio em sistemas anammox contendo atividade de bactérias desnitrificantes heterotróficas (BDH). O processo anammox pode ser acoplado a outros processos para este fim, como os processos simultâneos de nitrificação parcial, anammox e desnitrificação (SNAD) e processo anammox acoplado a desnitrificação parcial (PD-A).

De acordo com Gani et al. (2020), uma vez que em torno de 30% do metano produzido nos processos anaeróbios é perdido como gás dissolvido no efluente e além disso, há desafios relacionados à recuperação desta fração devido aos custos associados, o processo de oxidação anaeróbia desnitrificante do metano (DAMO) é uma excelente rota para eliminar tanto a

pequena fração do  $\text{NO}_3^-$  produzido no processo de NP/A, quanto o  $\text{CH}_4$  remanescente de efluentes anaeróbios, reduzindo o lançamento deste gás de efeito estufa.

Apesar do tratamento anaeróbio gerar subprodutos que podem interferir negativamente em sistemas de remoção de nitrogênio com processo anammox, é reportado na literatura que o processo anammox tem sido bem sucedido para remoção de nitrogênio desses efluentes (LEAL et al., 2016; FERNANDES et al., 2018; PEREIRA et al., 2019; CARVALHO et al., 2021; CHINI et al., 2020).

Leal et al. (2016) desenvolveu o processo anammox com altas eficiências de remoção de amônio e nitrito (84 a 99%) em sistema alimentado com efluente doméstico proveniente de reator UASB com DQO média de 150 mg/L, com suplementação de nitrito. Fernandes et al. (2018) também observou altas eficiências de remoção de amônio e nitrito (>90%) em reator anammox alimentado com efluente doméstico de reator UASB e suplementação de nitrito, mesmo em diferentes temperaturas operacionais (35, 25 e 20°C). Esses resultados demonstram o potencial de aplicação de NP/A em efluentes anaeróbios domésticos sob temperatura ambiente do Sudeste brasileiro (média de 20°C).

Efluentes anaeróbios de alta carga também podem ser aplicados na NP/A, como digestato de suinocultura (CHINI et al., 2020) e de resíduos alimentares (CARVALHO et al., 2021), sob temperaturas de 25°C e 26 a 30°C e com eficiências de remoção de nitrogênio de 83 e 66%, respectivamente. No entanto, a aplicação direta de efluentes de alta carga sem diluição pode inibir Anammox (SCAGLIONE et al., 2016), por isso, frequentemente adota-se a diluição dos efluentes anaeróbios de alta carga com água (PEREIRA et al., 2019; CARVALHO et al., 2021; CHINI et al., 2020).

Assim, uma medida mais sustentável para a aplicação de efluentes anaeróbios de alta carga em sistemas de NP/A sem a diluição com água seria o co-tratamento de efluentes de baixa carga (domésticos) com efluentes mais concentrados. Esta tendência tem sido pouco estudada, mas há relatos na literatura no co-tratamento de lixiviado de aterro sanitário com efluente doméstico via NP/A e desnitrificação heterotrófica (WU et al., 2015; ZHANG et al., 2021). No entanto, este processo seria facilitado no tratamento de efluentes de alta e baixa carga dentro de ETEs, uma vez que a viabilidade seria facilitada sem a necessidade de transporte de efluentes a longa distância.

## 2.5 Comunidade microbiana envolvida no tratamento de águas residuárias visando a remoção de nitrogênio

A comunidade microbiana frequentemente presente em sistemas de tratamento de águas residuárias para remoção de nitrogênio é bastante diversa devido à diversidade de compostos químicos presentes no meio. Dentre os os grupos microbianos responsáveis por diferentes reações, como a oxidação de  $\text{N-NH}_4^+$  por BOA/AOA, oxidação de  $\text{N-NO}_2^-$  por BON, bactérias heterotróficas e bactérias anammox, há competição por certos substratos, assim como a dependência da atividade das demais para produção de substratos.

Os grupos de BOA, NOB e bactérias heterotróficas (incluindo desnitrificantes heterotróficas e possivelmente organismos acumuladores de fósforo (PAO) e organismos acumuladores de glicogênio (GAO) competem por oxigênio; BOA e anammox competem por amônio; BON, anammox e bactérias desnitrificantes heterotróficas competem por nitrito – o substrato limitante para anammox na maioria dos casos - e bactérias heterotróficas e organismos heterotróficos em geral competem por carbono orgânico (CAO et al., 2017). A Figura 2 2 resume as interações entre microrganismos e substratos envolvidos na remoção de nitrogênio.

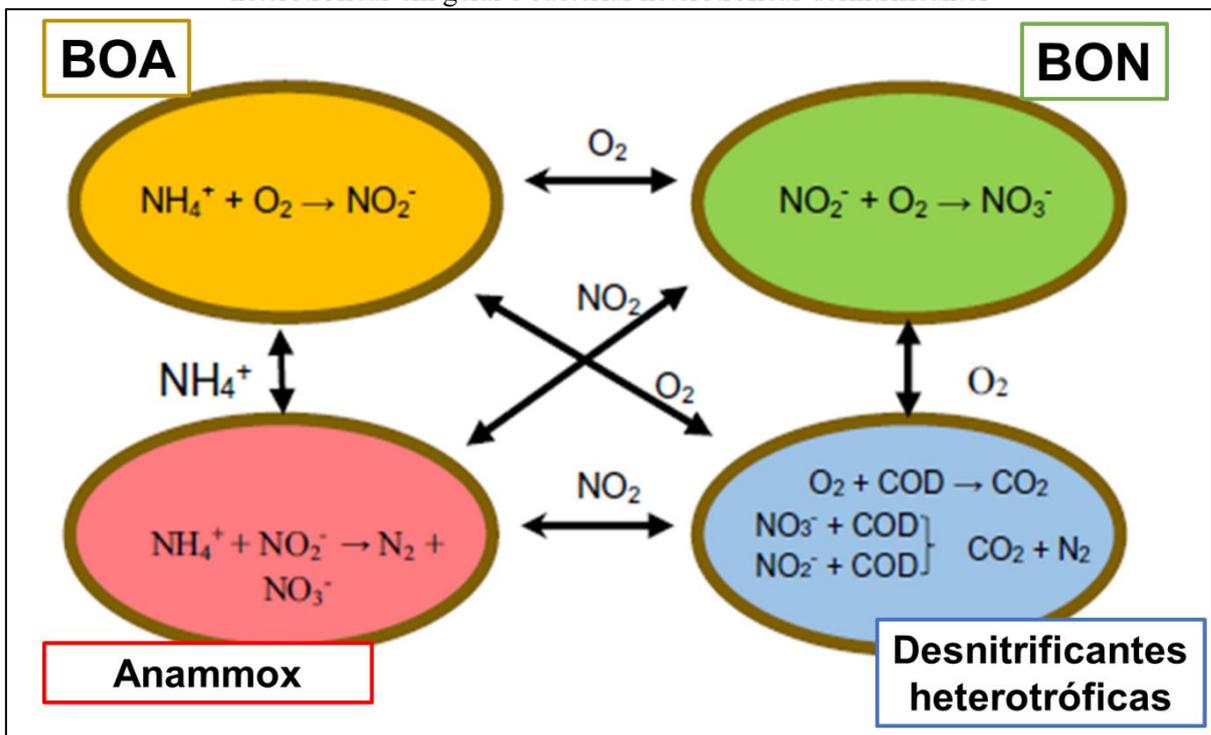
As comunidades microbianas BOA e BON e suas respectivas cinéticas podem se alterar de acordo com as mudanças ambientais e operacionais impostas (CAO et al., 2017). O conhecimento da cinética dos microrganismos envolvidos na remoção de nitrogênio de águas residuárias é fundamental para limitar ou facilitar a atividade de determinados microrganismos, como as bactérias anammox, através do controle das condições operacionais. De forma geral, é reportado na literatura científica algumas constantes cinéticas, aplicáveis para populações microbianas de BOA, BON, anammox e bactérias heterotróficas (Tabela 2 1).

Evidentemente, estes valores cinéticos sofrem alteração de acordo com as condições de temperatura, com as especificidades dos diferentes gêneros microbianos em que se encontram os grupos de BOA, BON, anammox e bactérias heterotróficas. No entanto, de maneira geral, percebe-se que a taxa de crescimento de bactérias anammox é muito inferior em comparação aos outros grupos. Adicionalmente, a constante de inibição por oxigênio inerente à anammox é baixa ( $0,01 \text{ gOD/m}^3$ ), fato que deve ser observado em sistemas anammox, especialmente em estágio único.

Por outro lado, a constante de afinidade de BOA por oxigênio é maior em comparação a BON, o que significa que BON pode ter vantagem na competição por oxigênio. Enquanto bactérias

heterotróficas tem vantagem maior ainda, uma vez que a constante de afinidade por oxigênio é menor do que dos dois outros grupos. No entanto, o consumo de oxigênio por BOA é de vital importância para o êxito do processo anammox, para que ocorra a nitrificação parcial, e ambos os substratos da reação anammox – amônio e nitrito – estejam disponíveis, além de consumir o oxigênio no meio, eliminando a toxicidade que este composto causa em bactérias anammox. Existem ainda microrganismos metabolicamente adaptados, capazes de realizar as oxidações de amônia e nitrito, em processo denominado “Comammox” (do inglês, *complete ammonium oxidation*) (SOBOTKA et al., 2018). De acordo com os autores, estes microrganismos pertencem ao gênero *Nitrospira*.

Figura 2 2 - Esquema da competição por substrato entre BOA, anammox, BON, bactérias heterotróficas em geral e bactérias heterotróficas desnitrificantes



Fonte: CAO et al. (2017).

Para alcançar altas remoções de nitrogênio em sistemas de NP/A, é necessário inibir BON, que competem com Anammox por nitrito (SEUNTJENS *et al.*, 2020). Conhecendo a cinética inerente aos grupos microbianos presentes em sistemas de NP/A (Tabela 2-1), observa-se que Anammox têm vantagem na competição de substrato em comparação a BOA, BON e bactérias heterotróficas, pelo menor coeficiente de meia saturação desse grupo para amônio e nitrito. Assim, torna-se cineticamente possível que bactérias Anammox sejam dominantes em sistemas de NP/A, coexistindo com outros grupos microbianos.

Tabela 2-1 – Constantes cinéticas de BOA, BON, Anammox e bactérias heterotróficas

<b>Bactérias oxidadoras de amônio (BOA)</b>				
<b>Coef. cinético</b>	<b>Unidade</b>	<b>Descrição</b>	<b>Valores</b>	<b>Referência</b>
$\mu_{BOA}$	$d^{-1}$	Taxa máxima de crescimento específico de BOA	2,05	Wiesmann 94 <sup>1</sup>
$Y_{BOA}$	$gdQO.gN^{-1}$	Produção de BOA	0,15	Wiesmann 94 <sup>1</sup>
$K_{NH_4,BOA}$	$gNH_4.m^{-3}$	Constante de meia saturação de BOA para $NH_4^+$	2,4	Wiesmann 94 <sup>1</sup>
$K_{O_2,BOA}$	$gO_2.m^{-3}$	Constante de meia saturação de BOA para $O_2$	0,6	Wiesmann 94 <sup>1</sup>
$b_{BOA}$	$d^{-1}$	Taxa de decaimento de BOA	0,13	Wiesmann 94 <sup>1</sup>
$iNXB_{BOA}$	$gN/gDQO^{-1}$	Teor de nitrogênio em BOA	0,083	Hubaux, 2014
<b>Bactérias oxidadoras de nitrito (BON)</b>				
$\mu_{BON}$	$d^{-1}$	Taxa máxima de crescimento específico de BON	1,45	Wiesmann 94 <sup>1</sup>
$Y_{BON}$	$gdQO.gN^{-1}$	Produção de BON	0,08	Jubany, 2008 <sup>2</sup>
$K_{NO_2,BON}$	$gNH_4.m^{-3}$	Constante de meia saturação de BON para $NO_2^-$	0,5	Wiesmann,94 <sup>2</sup>
$K_{O_2,BON}$	$gO_2.m^{-3}$	Constante de meia saturação de BON para $O_2$	0,4	Guisasola, 05 <sup>2</sup>
$b_{BON}$	$d^{-1}$	Taxa de decaimento de BON	0,06	Kock 2000 <sup>1</sup>
$iNXB_{BON}$	$gN/gDQO^{-1}$	Teor de nitrogênio em BON	0,083	Hubaux, 2014
<b>Bactérias anaeróbias oxidadoras de amônio - (anammox)</b>				
$\mu_{anammox}$	$d^{-1}$	Taxa máxima de crescimento específico de anammox	0,21	Lotti, 2014
$Y_{anammox}$	$gdQO.gN^{-1}$	Produção de anammox	0,17	Strous, 98 <sup>2</sup>
$K_{NH_4, anammox}$	$gNH_4.m^{-3}$	Constante de meia saturação de anammox para $NH_4^+$	0,03	Volcke, 2010 <sup>2</sup>
$K_{NO_2, anammox}$	$gNO_2.m^{-3}$	Constante de meia saturação de anammox para $NO_2^-$	0,005	Volcke, 2010 <sup>2</sup>
$K_{O_2, anammox}$	$gO_2.m^{-3}$	Constante de inibição de anammox por $O_2$	0,01	Hao, 2002 <sup>2</sup>
$b_{anammox}$	$d^{-1}$	Taxa de decaimento de anammox	0,00036	Volcke, 2010 <sup>2</sup>
$iNXB_{anammox}$	$gN/gDQO^{-1}$	Teor de nitrogênio em anammox	0,058	Hubaux, 2014
<b>BDH</b>				
$\mu_{BDH}$	$d^{-1}$	Taxa máxima de crescimento específico de BDH	6	Henze, 2000
$Y_{BDH}$	$gdQO.gN^{-1}$	Produção de BDH	0,67	Henze, 2000
$K_{BDH, DQO}$	$gdQO.m^{-3}$	Constante de meia saturação de BDH para DQO	20	Henze, 2000
$K_{BDH, O_2}$	$gO_2.m^{-3}$	Constante de meia saturação de BDH para $O_2$	0,2	Henze, 2000
$K_{BDH, NO_2}$	$gNO_2.m^{-3}$	Constante de meia saturação de BDH para $NO_2^-$	0,3	Alpkist, 2006
$K_{BDH, NO_3}$	$gNO_3.m^{-3}$	Constante de meia saturação de BDH para $NO_3^-$	0,3	Alpkist, 2006
$b_{BDH}$	$d^{-1}$	Taxa de decaimento de BDH	0,62	Alpkist, 2006
$iNXB_{BDH}$	$gN/gDQO^{-1}$	Teor de nitrogênio em BDH	0,083	Hubaux, 2014
<b>Constante de difusividade e transferência de massa</b>				
$D_{NH_4^+}$	$m^2.d^{-1}$	Difusividade de $NH_4^+$ na água	$1,5.10^{-4}$	Williamson & McCarty, 76 <sup>1</sup>
$D_{NO_2}$	$m^2.d^{-1}$	Difusividade de $NO_2^-$ na água	$1,4.10^{-4}$	
$D_{NO_3}$	$m^2.d^{-1}$	Difusividade de $NO_3^-$ na água	$1,4.10^{-4}$	Picioreanu, 97 <sup>1</sup>
$D_{N_2}$	$m^2.d^{-1}$	Difusividade de $N_2$ na água	$2,2.10^{-4}$	
$D_{DQO}$	$m^2.d^{-1}$	Difusividade de DQO na água	$1.10^{-4}$	Hao & van Loosdrecht, 2004 <sup>1</sup>
$D_{O_2}$	$m^2.d^{-1}$	Difusividade de $O_2$ na água	$2,2.10^{-4}$	

Fonte: Adaptado de Lackner *et al.* (2008) e Lotti *et al.* (2014).

Compreender as relações atividade-temperatura dos principais grupos microbianos é essencial para desenvolver potenciais estratégias de otimização do projeto e operação de sistemas de NP/A (CAO *et al.*, 2017). É necessário utilizar métodos apropriados para eliminar bactérias oxidadoras de nitrito (BON) baseados nas diferentes fisiológicas e metabólicas de BON e BOA (Wang *et al.*, 2022). Segundo os autores, algumas das técnicas para inibição de BON em sistemas de NP/A incluem a concentração de amônia livre (1-10mg/L) e ácido nitroso livre (0,1-1 mg/L), temperaturas maiores que 25°C, concentrações de OD > 0,5 mg/L, aeração intermitente, baixas concentrações de  $N_2O$  e adição de substâncias inibidoras.

Baixas concentrações de OD e de TRS pode eliminar bactérias BON, mas também inibir a atividade de BOA, resultando em baixas taxas de remoção de nitrogênio, além do que BON são adaptáveis à baixas concentrações de OD (Wang *et al.*, 2022). Portanto, estratégias operacionais devem ser melhor investigadas com o intuito de garantir a NP/A.

Zhang *et al.* (2022) observaram alta abundância de BON do gênero *Nitrospira* (na ordem de  $10^9$  a  $10^{10}$  cópias/L) em reator de NP/A sob aeração intermitente. No entanto, houve aumento nessas bactérias no lodo floculento, enquanto foi observada diminuição no biofilme (meio suporte com espuma). O contrário foi observado para Anammox e BOA, com abundância relativa maior no biofilme. Esses resultados sugerem que a utilização de sistemas com biofilme utilizando espuma tem potencial de limitar a abundância de BON e garantir a permanência de BOA e anammox em reatores de NP/A em estágio único.

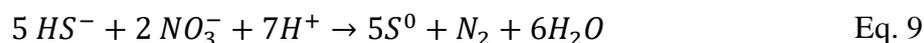
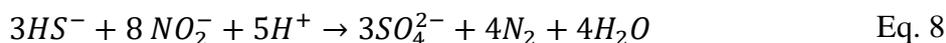
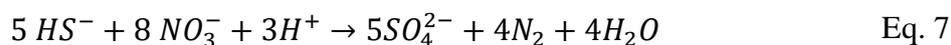
A presença de carbono orgânico aumenta a competição por oxigênio entre bactérias heterotróficas e bactérias oxidadoras de amônio (BOA), resultando em competição entre anammox e bactérias heterotróficas desnitrificantes por  $\text{NO}_2^-$  (Gani *et al.*, 2020). No entanto, de acordo com Cao *et al.* (2017), a presença de bactérias heterotróficas tem sido inevitável em sistemas anammox, correspondendo a mais de 50% da população microbiana, mesmo em sistemas com ausência de carbono exógeno, uma vez que os próprios produtos solúveis endógenos provenientes da decomposição microbiana cumprem este papel.

Se por um lado, a desnitrificação heterotrófica total pode resultar no aumento da competição de Anammox com outros grupos microbianos pelo substrato, a desnitrificação parcial pode beneficiar o processo anammox, fornecendo nitrito (ZHANG *et al.*, 2022).

Arqueas oxidadoras anaeróbias do metano dependente de nitrito são capazes de oxidar metano e reduzir nitrito a nitrato (CORGET *et al.*, 2019). Segundo os autores, este processo pode ser interessante em sistemas de NP/A aplicado à fase líquida de ETEs com tratamento anaeróbio, pela redução de custos e de emissões de gases do efeito estufa de \$ 0,303 para \$ 0,300/d/m<sup>3</sup> e 1,72 para 1,65 kg equiv.CO<sub>2</sub>/d/m<sup>3</sup>, respectivamente.

A desnitrificação heterotrófica também pode ocorrer tendo compostos de enxofre como doadores de elétrons, utilizando nitrito ou nitrato como o aceptor de elétrons (MORAES *et al.*, 2012; DI CAPIA *et al.*, 2019). O sulfeto pode existir na água como sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) e/ou espécies iônicas não voláteis, ou seja, íons de hidrossulfeto (HS<sup>-</sup>) e sulfeto (S<sub>2</sub><sup>-</sup>) dependendo do pH (DI CAPIA *et al.*, 2019). A desnitrificação autotrófica, por sua vez,

utilizando sulfeto como doador de elétrons e nitrito ou nitrato como acceptor de elétrons ocorre de acordo com as Equações 7, 8, 9 e 10 (MORAES et al., 2012).



Wang *et al.* (2020) identificou o gênero de bactérias anammox *Candidatus Brocadia* (com abundância relativa de até 8%) como dominante em sistema anammox tratando efluente anaeróbio doméstico no reator anammox pertencente à sistema de NP/A de duplo estágio. Mesmo com reator em bateladas sequenciais de mistura completa para promoção de nitrificação parcial, os autores identificaram no reator anammox bactérias heterotróficas desnitrificantes (com abundância relativa de 1,73%), especificamente os gêneros *Denitratisoma* (1,40%), *Dokdonella* (0,35%), *Pseudomonas* (0,40%) e *Thermomonas* (0,22%).

*Ca. Brocadia* tem sido o gênero de bactérias anammox mais observado em sistemas de NP/A (WANG *et al.*, 2020, ZHANG *et al.*, 2022). Zhang *et al.* (2022) também observaram o gênero *Nitrosomonas* como BOA dominante, *Nitrospira* como BON dominante e *Denitratisoma* como BDH dominante.

## 2.6 Configurações de sistemas para NP/A

### 2.6.1 NP/A tratando a fase líquida em ETEs

Nos últimos anos, a investigação de aplicações da NP/A na fase líquida de ETEs tratamento efluentes domésticos tem aumentando. No entanto, há alguns desafios para a aplicação do deste processo na remoção de nitrogênio da fase líquida, incluindo: i) baixas temperaturas em comparação ao digestato proveniente da metanização de fase sólida, ocasionando longos períodos para partida ii) baixas taxas de remoção de nitrogênio e iii) competição com outros grupos microbianos por nitrito, comprometendo o processo e a qualidade do efluente final (PIJUAN *et al.*, 2020). Por outro lado, regiões de clima tropical, como o Sudeste brasileiro, têm significativas vantagens para a aplicação de processos dependentes de temperaturas moderadas, o que pode também contribuir para aumentar a taxa de remoção de nitrogênio, bem como conferir vantagem a bactérias anammox em relação a outros grupos microbianos competidores de substratos.

Além disso, a mistura de esgoto doméstico bruto com efluente de reator apenas de nitrificação parcial, para aplicação em reator anammox tornou-se uma possibilidade com altas remoções de nitrogênio (CHEN *et al.*, 2020). No entanto, tratando-se da realidade brasileira, onde a aplicação de processos anaeróbios para remoção de carbono visando o aproveitamento energético, o desvio de efluente com alta taxa de carbono para a desnitrificação heterotrófica causaria menor produção de biogás e, como consequência, menor potencial de recuperação energética.

Uma vez que no processo anammox aplicado à fase líquida de ETES, há uma baixa produção de biomassa devido às reduzidas concentrações de N, manter elevado o tempo de detenção de sólidos (TDS) para garantir a concentração da biomassa é um critério essencial para o processo anammox aplicado à fase líquida principal de ETES (Gani *et al.*, 2020). Nesse sentido, os autores ressaltam que a granulação em reatores anammox pode ser útil para a retenção de biomassa. Além disso, em sistemas com baixas concentrações de nitrogênio, a taxa de crescimento de bactérias anammox pode ser menor, ocasionando longo período de partida e baixas taxas de remoção de N (Wang *et al.*, 2022).

De acordo com Wang *et al.* (2022), de forma a garantir adequado TDS em sistemas anammox tratando a fase líquida principal, lodo granular e meios suportes para crescimento de biofilmes são adequados, apesar do longo período para a formação do biofilme ser um desafio, requerendo meios suportes de aumentem a afinidade dos microrganismos. Segundo Cao *et al.* (2017), em sistemas anammox com biomassa suspensa, Anammox pode ser protegida da inibição por oxigênio com a criação de zonas anóxicas, no entanto, biofilmes e meios suporte podem melhor proteger Anammox, auxiliando no aumento da atividade deste grupo. No entanto, segundo os mesmos autores, na presença de matéria orgânica, o crescimento de bactérias heterotróficas pode ser estimulado na superfície de grânulos e biofilmes em geral, comprometendo o processo de NP/A.

No entanto, uma vez que a população BON cresce preferencialmente na fração floculenta da biomassa de sistemas NP/A em estágio único, a eliminação de parte desta fração de biomassa pode reduzir a abundância e a atividade deste grupo microbiano (SEUNTJENS *et al.* 2020; ZHANG *et al.*, 2022). No entanto, Miao *et al.* (2016) observaram diminuição na remoção de nitrogênio com a redução do TDS. Já Seunjtens *et al.* (2020) observaram em reator híbrido (com biomassa floculenta dispersa e aderida a meio suporte) que a retirada gradual (TDS 60 dias) apenas da biomassa floculenta pode inibir BON com sucesso, mantendo altas eficiências de remoção de nitrogênio via NP/A.

Para Cao *et al.* (2017), a combinação do processo de NP/A em estágio único, isto é, em apenas um reator reduz significativamente os custos de construção e operação dos sistemas, além de reduzir no lançamento de compostos nitrogenados de efeito estufa, no entanto, a competição por nitrito entre anammox e BON é inevitável. Nesse sentido, de acordo com Seuntjens *et al.* (2022), reatores híbridos, com biomassa floculenta e com biofilmes (com presença de grânulos ou de meio suporte) podem ser adequados para criar zonas aeróbias/anaeróbias no sistema e favorecer a NP/A. No entanto, os autores ressaltam que o sucesso da NP/A nesta configuração de reator também depende de estratégias de aeração – com intermitência e/ou controle da concentração de OD.

### 2.6.2 Estratégias de aeração

De acordo com Cao *et al.* (2017), a aeração intermitente, com anoxia transitória, é um método eficaz para reduzir a atividade de BON, uma vez que a fase de latência da atividade deste grupo é causada pela ausência de nitrito e oxigênio no início dos períodos de aeração e inativação dos mecanismos metabólicos de recuperação e adaptação comparado ao grupo BOA em condições de aeração.

De acordo com Chen *et al.* (2020), a aeração intermitente tem vantagens relacionadas ao menor consumo de energia em comparação à aeração contínua, e pode ser uma estratégia para alcançar a NP/A no tratamento da fase líquida de ETEs. No entanto, os autores ressaltam que a alternância entre fases aeróbias e anóxicas também favorecer o consumo de nitrito por bactérias heterotróficas desnitrificantes, ocasionando escassez de substrato para bactérias anammox.

A remoção de nitrogênio e a atividade de BON pode apresentar diferentes tendências sob diferentes condições de aeração intermitente (ZHANG *et al.*, 2022). De acordo com os autores, períodos sem aeração curtos podem não ser suficientes para inibir BON, no entanto, períodos sem aeração muito longos podem reduzir a efetividade dos períodos sob aeração, comprometendo a estabilidade dos reatores.

De modo geral, não há consenso na literatura sobre a estratégia mais eficaz para implementação do processo de NP/A. Tabela 2 2 apresenta investigações sobre o processo de NP/A com diferentes configurações de reatores e com diferentes estratégias operacionais e resultados obtidos em termos de remoção de nitrogênio.

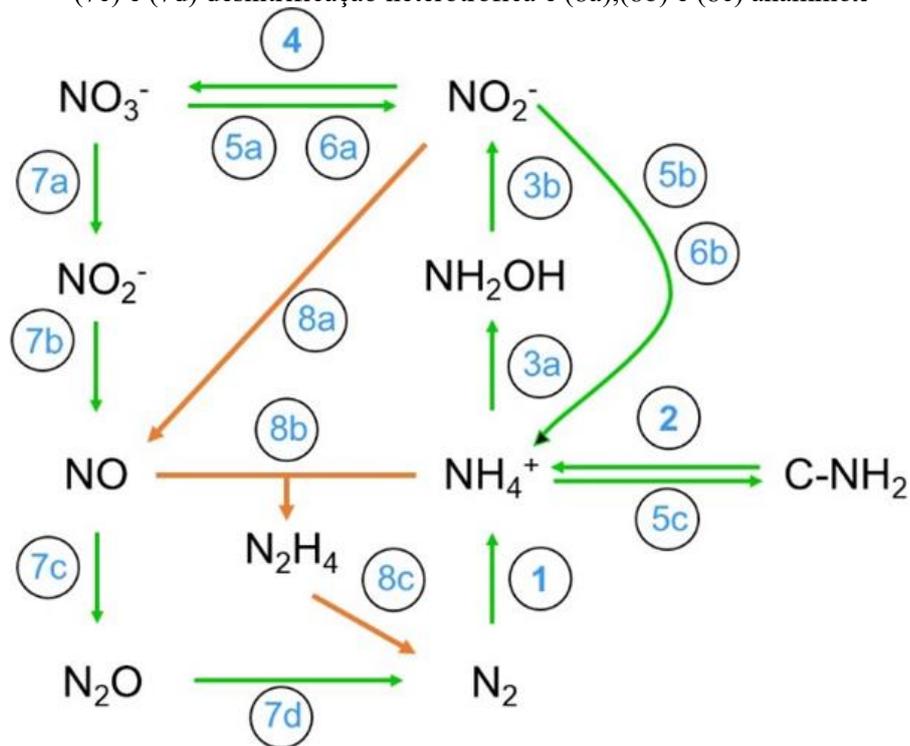
Tabela 2 2 – Resumo de pesquisas utilizando o processo de NP/A com diferentes configurações de reatores, estratégias de aeração, concentração de OD e alimentação

Sistema	Alimentação	OD (mg/L)	Taxa de aeração	Aeração	Remoção de NT	Referência
NP/A em duplo estágio, reator em bateladas sequenciais para NP/A e reator granular de fluxo ascendente para processo anammox	Efluente anaeróbio doméstico proveniente de biorreator de membranas	0,2 a 0,6	2,33 a 4,04 L/min.L	Intermitente, 3s on/ 2s off	85%	Wang <i>et al.</i> (2020)
NP/A em duplo estágio, dois reatores em bateladas sequenciais para NP/A para o processo anammox, separadamente	Efluente anaeróbio doméstico bruto misturado a efluente do reator de nitrificação parcial	1,5 a 2,6	0,27 L/min.L	Intermitente 30min on/30 a 10 min off	70 a 100%	Chen <i>et al.</i> (2020)
NP/A em duplo estágio, dois reatores em bateladas sequenciais para NP/A para o processo anammox, separadamente	Esgoto doméstico pós decantação primária e pós reator para nitrificação parcial	0,2 a 8,0	0,15 a 0,75L/min.L	Contínua	88 ± 5 a 91 ± 2%	Pedrouso <i>et al.</i> (2021)
NP/A em estágio único, em reator integrado de lodo ativado com biofilme em leito móvel	Efluente sintético simulando concentrações de nitrogênio e DQO de efluentes doméstico (65 a 75 mg/L e 190 a 240 mg/L, respectivamente)	0,8 ± 0,4		Intermitente 9 min on/ 21 min off	88,5 ± 1,8%	Zhang <i>et al.</i> (2022)
NP/A em estágio único, em reator integrado de lodo ativado com biofilme em leito móvel	Efluente sintético simulando efluente doméstico, concentração de nitrogênio (50 a 50 mg/L) e relação N/DQO biodegradável de 0,5-1.	10 min a 0,07 a 0,13 e 5 min a 0,27 a 0,43	0,02 a 0,22 L/min.L	Contínua	73 ± 13 % (122 ± 23 mgN/L.d)	Seuntijens <i>et al.</i> (2020)
NP/A em estágio único em reator em bateladas sequenciais, com inoculação de lodo nitrificante (96,2%) e anammox (3,8%)	Efluente doméstico aeróbio (proveniente de lodos ativados)	8 min on/ 21 min off	0,5 a 1,5 mg/L	Intermitente	53 a 80%	Miao <i>et al.</i> (2020)
NP/A em estágio único, em reator em bateladas sequenciais com biofilme	Efluente doméstico aeróbio (proveniente de lodos ativados)	Dependente da concentração de OD	0,7 ± 0,3 mg/L	Intermitente	86%	Zhang <i>et al.</i> (2021)

## 2.7 Emissões gasosas na remoção biológica de nitrogênio

O ciclo do nitrogênio compreende os processos de fixação do dinitrogênio gasoso, amonificação, nitrificação e nitratação, assimilação e desassimilação do nitrato e desnitrificação por via heterotrófica ou via anammox (Figura 2 3). Uma vez que em águas residuárias - como as fases líquida e sólida de esgotos domésticos – o nitrogênio encontra-se prioritariamente na forma de nitrogênio amoniacal com diminutas parcelas de nitrogênio orgânico (VON SPERLING, 2014), os processos biológicos de remoção de nitrogênio conhecidos atualmente ocorrem de acordo com o ciclo exemplificado (Figura 2 3).

Figura 2 3 - Ciclo do nitrogênio com processos de (1) fixação; (2) amonificação; (3a) e (3b) nitritação; (4) nitratação; (5a), (5b) e (5c) assimilação do nitrato; (6a) e (6b) desassimilação do nitrato; (7a), (7b), (7c) e (7d) desnitrificação heterotrófica e (8a),(8b) e (8c) anammox



Fonte: Adaptado de Stein & Klutz (2016) e Madigan et al. (2016).

Observa-se que dois dos compostos intermediários da desnitrificação heterotrófica são os óxidos nítrico e nitroso, conhecidos por serem gases de efeito estufa. O óxido nitroso pode ser convertido a óxido nítrico na atmosfera, que reage com o ozônio e forma nitrato, que retorna à Terra como ácido nítrico (MADIGAN et al., 2016). Ainda de acordo com os autores, a contribuição para o aquecimento global em virtude da emissão de óxido nitroso é 300 vezes maior em comparação à emissão de dióxido de carbono. Assim, caso a desnitrificação total não seja realizada, a desnitrificação parcial pode ocasionar emissão destes gases. De acordo com Desloover et al. (2012), estima-se que a emissão de óxido nitroso em sistemas de tratamento de águas residuárias seja correspondente a 10% do total de óxido nitroso lançado por via antrópica.

Uma vez que emissões gasosas no tratamento de águas residuárias pode causar grandes impactos ambientais, entender quais as circunstâncias favorecem esta emissão é essencial para mitigá-las (CASTRO-BARROS et al., 2015). Dessa forma, a desnitrificação heterotrófica ocorrendo com reduzidas emissões de óxidos nítrico e nitroso pode auxiliar na emissão de outro gás de efeito estufa: o metano. Sistemas anaeróbios de remoção de carbono de águas residuárias emitem mais gases do efeito estufa, na forma de metano, em comparação a sistemas de tratamento aeróbios (CALIR & STENSTROM, 2005). Assim, a desnitrificação heterotrófica -

com metano como doador de elétrons -da parcela de nitrato produzida na NP/A pode auxiliar não só da redução de nitrato efluente, como na redução da emissão de metano.

### 2.7.1 Estratégias operacionais para redução de óxido nitroso em sistemas de NP/A

Segundo Pijuan et al. (2020), apesar do processo anammox não gerar como subproduto o óxido nitroso, alguns fatores podem estimular a acumulação deste gás de efeito estufa em sistemas de desnitrificação, como a presença de nitrito e a disponibilidade de matéria orgânica. Em sistemas de NP/A, a inibição de BON e a mitigação do lançamento de óxido nitroso são dois importantes objetivos (AL-HAZMI et al., 2020). Algumas estratégias operacionais tem sido utilizada em sistemas de NP/A para reduzir a emissão de óxido nitroso, dentre as quais destacam-se a adesão a sistemas de estágio único em vez de sistema de duplo estágio (CONNAN et al., 2018), visto que este último tende a produzir maiores concentrações de óxido nitroso devido às altas concentrações de nitrito do primeiro estágio de nitrificação parcial (PEREIRA et al., 2019b). Além disso, a aeração intermitente também tem sido observada como fator de mitigação não só da atividade nitrificante excessiva, como também de produção de óxido nitroso devido ao efetivo controle do acúmulo de compostos nitrogenados intermediários (BLUM et al., 2018).

Sistemas com atividade anammox com partida relativamente recente (dois anos) inoculados com lodos ativados e/ou alimentados com efluentes contendo matéria orgânica biodisponível são conhecidos pela presença de DHB na composição microbiana (WANG et al., 2020; PIJUAN et al., 2020). Apesar da presença de DHB potencializar a emissão de óxido nitroso, a aplicação de águas residuárias com baixo teor de matéria orgânica biodegradável juntamente à competição entre outras bactérias heterotróficas, podem ser fatores limitantes da atividade de DHB e, conseqüentemente, para a emissão de óxido nitroso.

Além disso, estratégias operacionais adequadas podem reduzir emissão de óxido nitroso apesar da alimentação com efluentes com alto teor de matéria orgânica. Pijuan et al. (2020) observaram que em um sistema anammox com adição de DQO de até 250 mg/L, a concentração de óxido nitroso foi de 0,01 a 0,14 mg/L, com maiores concentrações no início dos ciclos operacionais, causada pela presença de nitrito. Desloover et al. (2011) observaram emissão de óxido nitroso correspondendo de 5,1 a 6,6% da carga total de nitrogênio afluente, em virtude de altas concentrações de nitrito no reator de nitrificação parcial em sistema de duplo estágio para NP/A. Assim, espera-se que em sistemas de NP/A em estágio único com aeração intermitente sob curtos períodos aerados – o que ocasiona geração gradual de nitrito ao longo do ciclo – as concentrações de óxido nitroso sejam menores. Além disso, os autores identificaram que as

maiores concentrações de óxido nitroso dissolvido foram obtidas alguns dias após a interrupção da adição de DQO. Quando a adição de DQO foi interrompida, bactérias heterotróficas desnitrificantes provavelmente continuaram ativas, tentando reduzir nitrito ou nitrato sob limitação de DQO (PIJUAN et al., 2020).

Corroborando o benefício da presença da matéria orgânica para reduzir emissão de gases do efeito estufa, Wan et al. (2019) analisaram as condições para emissão de óxido nitroso através de observações em reator anammox, que culminaram no desenvolvimento de modelo matemático capaz de simular estas condições. Os autores observaram que a presença de matéria orgânica em águas residuárias aplicadas a reatores anammox reduz a emissão de óxido nitroso, uma vez que permitem a completa desnitrificação a dinitrogênio gasoso. Al-Hazmi et al. (2021) investigaram diferentes estratégias operacionais em NP/A em estágio único através de simulação matemática, observando que a aeração intermitente e baixas concentrações de OD (0,7 mg/L) apresentaram os melhores resultados, tanto de remoção de nitrogênio quando de emissão de óxido nitroso (menor que 2% do nitrogênio total removido).

Devido às frequentes mudanças das condições de potencial de oxirredução durante o regime de aeração intermitente, a produção e emissão de óxido nitroso são dinâmicas (BLUM et al., 2018). Por este motivo, amostragem e coleta de biogás para avaliação das concentrações de óxido nitroso requer investigação das circunstâncias operacionais responsáveis pela maior ou menor emissão deste gás. Por exemplo, em sistemas de NP/A em estágio único com aeração intermitente, faz-se necessário avaliar a emissão de óxido nitroso nos períodos com e sem aeração, além da fração que, como ocorre com o metano, fica retida no sistema.

Blum et al. (2018) observaram que cerca de 80% do total de óxido nitroso produzido em sistema de NP/A foi emitido durante as fases de aeração, em virtude da presença de nitrito nestas fases, resultando em 1,1 no nitrogênio total removido sendo emitido na forma deste gás. No entanto, quanto maior a intermitência de aeração (com menores períodos de aeração), mais escassa se torna a presença de nitrito, uma vez que, conforme é produzido em pequenas taxas, é rapidamente consumido no meio. Assim, esta estratégia operacional aliada à baixas concentrações de OD pode reduzir emissões de óxido nitroso.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Contribuir para elucidar a aplicação da nitrificação parcial/anammox para remoção de nitrogênio de efluente doméstico proveniente de tratamento anaeróbio sob diferentes parâmetros operacionais e configurações do sistema.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Desenvolver a NP/A utilizando diferentes estratégias de aeração para remoção de nitrogênio de efluente anaeróbio doméstico;
- Aplicar a NP/A sob temperatura ambiente e verificar seus efeitos no desempenho e na partida de sistemas de NP/A;
- Investigar os efeitos de diferentes condições operacionais na dinâmica de N<sub>2</sub>O e CH<sub>4</sub> para estabelecimento de estratégias mitigadoras de emissão de GEE;
- Viabilizar a partida de reator de NP/A alimentado com efluente anaeróbio doméstico utilizando lodos ativados como inóculo e comparar com reator alimentado com meio de cultura autotrófico para partida;
- Estabelecer a NP/A para co-tratamento de efluente anaeróbio doméstico e sobrenadante de lodo anaeróbio
- e caracterizar as comunidades microbianas dos sistemas ao longo das etapas operacionais aplicadas.

#### 4 PREMISSAS E HIPÓTESES

As premissas e hipóteses relacionadas aos objetivos específicos deste trabalho são apresentadas na Tabela 4-1.

Tabela 4 1 – Premissas, objetivos específicos e hipóteses da pesquisa

<b>Premissas</b>	<b>Objetivos específicos</b>	<b>Hipóteses</b>
A aplicação da NP/A ainda é desafiadora em efluentes domésticos, que possuem baixas concentrações de nitrogênio (GANI et al., 2020). No entanto, a aeração intermitente possibilita o desempenho deste processo em efluentes domésticos provenientes de lodos ativados (MIAO et al., 2020), e é um método promissor para NP/A em efluentes domésticos anaeróbios	1) Desenvolver a NP/A utilizando diferentes estratégias de aeração para remoção de nitrogênio de efluente anaeróbio doméstico	Estratégias adequadas de aeração propiciam a NP/A para remoção de nitrogênio de efluente anaeróbio doméstico
A NP/A é favorecida sob temperaturas moderadas (CAO et al., 2017). Assim, embora climas tropicais sejam ideias para a NP/A, o clima subtropical do Sudeste brasileiro, com temperatura média anual de 22°C, pode beneficiar a NP/A, uma vez que outros processos anaeróbios de tratamento de efluentes domésticos já são consolidados sob temperatura ambiente nesta região (CHERNICHARO et al., 2018)	2) Aplicar a NP/A sob temperatura ambiente e verificar seus efeitos no desempenho e na partida de sistemas de NP/A	Temperaturas tropicais e subtropicais possibilitam a NP/A, incluindo a partida de novos reatores, sem a necessidade de aquecimento de reatores
Em sistemas de NP/A, comumente também ocorre desnitrificação heterotrófica parcial, razão pela qual pode haver emissão de N <sub>2</sub> O (PIJUAN et al., 2020). Além disso, efluentes provenientes de tratamentos anaeróbios potencializam a emissão de CH <sub>4</sub> em unidades posteriores (Ribeiro et al., 2018). No entanto, as estratégias operacionais adotadas para NP/A influenciam no potencial emissor destes gases (AL-HAZMI et al., 2020).	3) Investigar os efeitos de diferentes condições operacionais na dinâmica de N <sub>2</sub> O e CH <sub>4</sub> para estabelecimento de estratégias mitigadoras de emissão de GEE	A aeração intermitente promove reduzida emissão de N <sub>2</sub> O e CH <sub>4</sub> em sistemas de NP/A alimentados com efluente anaeróbio doméstico

/Continua

<p>A partida de reatores de NP/A com lodos ativados como inóculo e aeração já foi observada utilizando uma pequena porção de biomassa com alta atividade anammox (MIAO et al., 2020) e com efluente sintético simulando lixiviado (QIU et al., 2019). Portando, a partida de novos sistemas de NP/A alimentados com efluente anaeróbio doméstico sob aeração intermitente é promissora, sem etapa prévia de alimentação com meio de cultura sintético ou suplementação de nitrito</p>	<p>4) Viabilizar a partida de reator de NP/A alimentado com efluente anaeróbio doméstico utilizando lodos ativados como inóculo e comparar com reator alimentado com meio de cultura autotrófico para partida</p>	<p>A NP/A pode ser obtida em reator com lodos ativados como inóculo alimentado desde a partida com efluente anaeróbio doméstico através da aplicação de aeração intermitente</p>
<p>Uma vez que o desempenho da NP/A é favorecido com alimentação de efluentes com altas concentrações de nitrogênio, como digestatos e lixiviados (LACKNER et al., 2014; PEREIRA et al., 2019; CARVALHO et al., 2021), a aplicação conjunta de efluente doméstico anaeróbio e sobrenadante de lodo tem potencial de aprimorar e viabilizar o processo de NP/A, além de contribuir para fechar ciclos em ETEs</p>	<p>5) Estabelecer a NP/A para co-tratamento de efluente anaeróbio doméstico e sobrenadante de lodo anaeróbio</p>	<p>O co-tratamento de efluente doméstico e sobrenadante de lodo anaeróbio favorece a NP/A devido ao aumento da concentração de nitrogênio afluente</p>
<p>A comunidade microbiana em sistemas com atividade anammox sofre alterações de acordo com as condições operacionais impostas (ZHANG et al., 2022). Da mesma forma, sistemas anammox inoculados com lodos ativados e alimentados com efluente real apresentam alta diversidade de bactérias que competem com bactérias anammox pelo substrato e que influenciam no desempenho de sistemas anammox (LEAL et al., 2016; FERNANDES et al., 2018; PEREIRA et al., 2019). O conhecimento a respeito da comunidade microbiana auxilia na tomada de decisão na NP/A.</p>	<p>6) Avaliar e comparar as comunidades microbianas dos sistemas ao longo das etapas operacionais aplicadas</p>	<p>Diferentes configurações e condições operacionais de sistemas de NP/A modificam a comunidade microbiana, sendo possível a dominância de bactérias anammox</p>

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta seção visa a apresentação geral dos materiais e métodos utilizados no presente estudo, com planejamento experimental das quatro etapas executadas, que serão apresentadas em forma de capítulos a seguir. Além do planejamento experimental, serão descritos em detalhes os reatores utilizados, os sistemas dos quais os efluentes utilizados foram provenientes, descrição do gerenciamento da biomassa, o método de coleta da biomassa e a justificativa das análises de biologia molecular utilizadas. As demais análises, específicas de cada capítulo, serão descritas individualmente em seção adequada.

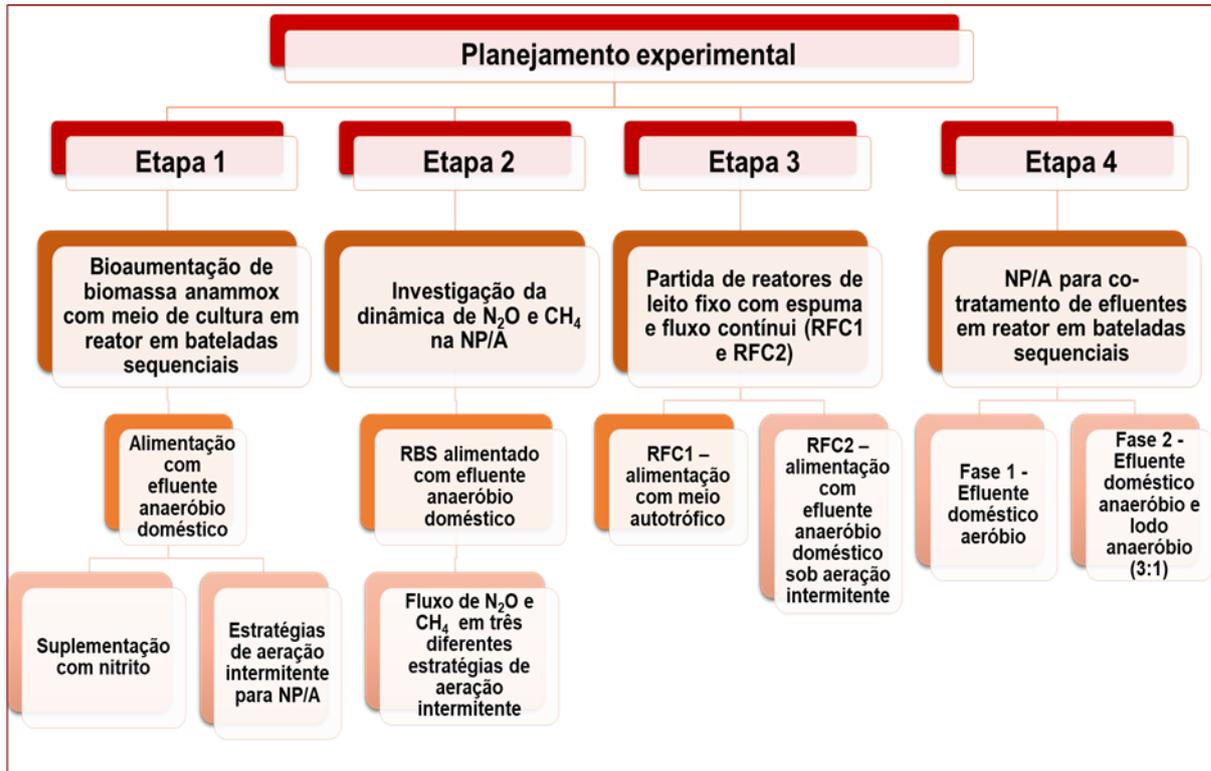
### 5.1 Planejamento experimental

O planejamento experimental divide-se em quatro etapas, consistindo em: etapas 1, 2, 3 e 4 (Figura 5-1). A etapa 1 consistiu na partida de reator de mistura completa e bateladas sequenciais, visando cultivo e aumento de concentração e atividade de biomassa anammox, utilizando lodos ativados como inóculo e meio de cultura sintético sob anaerobiose. Nesta etapa, após a fase de cultivo e aumento de biomassa e atividade anammox estável, foi aplicado efluente doméstico proveniente de tratamento anaeróbico (denominado efluente anaeróbico), com suplementação de nitrito. Em seguida, houve etapas somente com efluente anaeróbico e sob aeração intermitente para investigação do processo de NP/A. Utilizando reator de mesma configuração da etapa 1, a etapa 2 consistiu na investigação do fluxo – em termos de emissão – de  $\text{CH}_4$  e  $\text{NO}_2$  sob três diferentes condições de aeração intermitente e alimentação em todas as fases com efluente anaeróbico doméstico.

A etapa 3 consistiu na partida simultânea de dois reatores de leito fixo com espuma e fluxo contínuo, alimentados com efluente anaeróbico doméstico sob aeração intermitente para estabelecimento da NP/A e alimentado com meio de cultura autotrófico para aumento da concentração e atividade de bactérias anammox, respectivamente. Em ambos os reatores, foi utilizado lodos ativados como inóculo.

Por fim, a etapa 4 deste estudo incluiu a investigação de NP/A aplicada a efluente anaeróbico doméstico (fase 1) e a aplicação de mistura de efluente anaeróbico doméstico com sobrenadante de lodo de reator UASB (centrifugado) (fase 2). As fases previstas no planejamento experimental estão apresentadas no fluxograma da Figura 5-1. Maiores detalhes sobre essas fases serão explicados nos capítulos subsequentes.

Figura 5-1 - Fluxograma do planejamento experimental, com resumo das fases previstas



## 5.2 Efluente anaeróbico doméstico e sobrenadante de lodo

O efluente anaeróbico doméstico e o sobrenadante de lodo utilizados neste estudo foram provenientes de um reator UASB localizado no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento (CePTS), situado nas dependências da Estação de Tratamento de Esgotos da Bacia do Ribeirão Arrudas (ETE Arrudas), em Belo Horizonte, Minas Gerais.

O reator UASB recebe parte da vazão de efluente doméstico bruto encaminhado a ETE Arrudas, após as etapas de tratamento preliminar contendo grade grossa de limpeza manual, grade fina mecanizada e desarenador. Esse reator vem sendo utilizado por diversas pesquisas realizadas no SMARH/UFMG, principalmente em sistemas de pós-tratamento, e algumas de suas características de concepção e operação estão contidas na Tabela 5-1.

Tabela 5-1 - Características de concepção e operação do reator UASB utilizado para tratamento de efluente doméstico bruto

Volume útil (m <sup>3</sup> )	14
Diâmetro (m)	2
Altura útil	4,5
Material	Ferrocimento
Vazão de operação (m <sup>3</sup> .d <sup>-1</sup> )	34 a 37
TDH (h)	6 a 16
Velocidade ascensional (m.h <sup>-1</sup> )	0,45 a 0,50

### 5.3 Reatores utilizados para avaliação de NP/A

#### 5.3.1 Reator de mistura completa em bateladas sequenciais

O reator de mistura completa, modelo *New Brunswick*<sup>TM</sup> Bioflo®/CelliGen® 115, utilizado neste trabalho nas etapas 1, 2 e 4 foi programado para operação em bateladas sequenciais (RBS) (Figura 5-2). Este reator possui volume de trabalho de 2L e dispõe de sondas para medição de temperatura (°C), pH e oxigênio dissolvido (%). Adicionalmente, o reator possui sondas de nível, para ajuste do volume afluente e efluente ao reator. A entrada e saída de líquido foi feita com auxílio de bombas, que eram desativadas automaticamente com auxílio dos sensores de nível. O sistema conta com mecanismo de mistura sob agitação controlada de 50 rpm.

O reator foi mantido protegido da luz para evitar o crescimento de algas que poderiam assimilar o nitrogênio do meio. Para promover a nitrificação parcial através da aeração intermitente, foi adicionado ao reator um sistema de aeração com compressor de ar conectado a mangueira de silicone e pedra porosa para geração de microbolhas. A vazão de ar foi controlada com auxílio de válvula reguladora e mantida de 50 a 200 mL/min. A vazão de ar foi medida com auxílio de seringa esmerilhada. O acionamento e desligamento do compressor de ar foi feito com auxílio de temporizador automático.

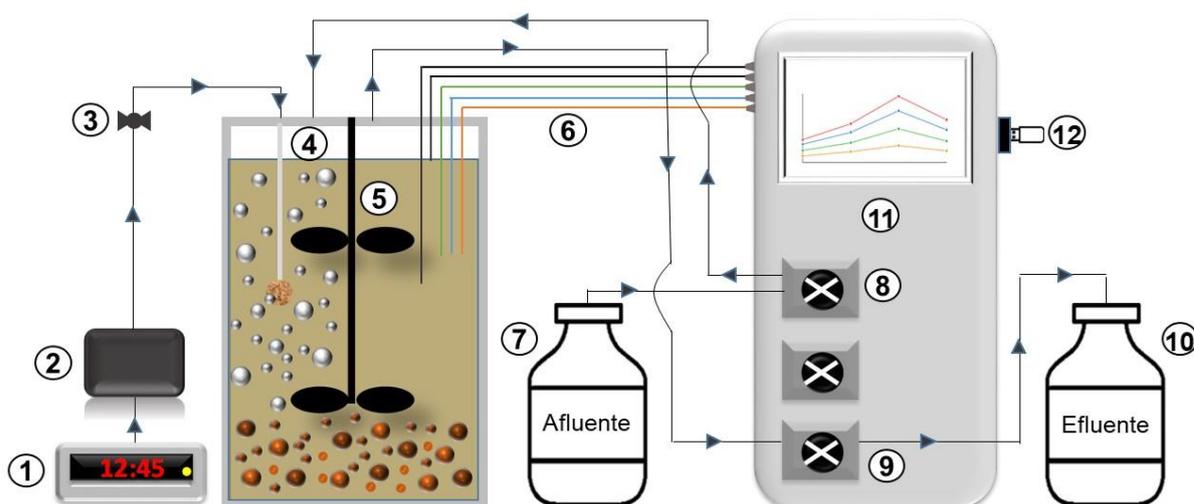
A operação do reator RBS dividiu-se em 4 etapas, que compõem ciclos curto e longo, de 8 e 16 horas, respectivamente, sendo elas: 1) alimentação (5 min) – na qual a bomba de entrada do reator e a agitação eram ativadas e um volume afluente de 1-1,8 L é bombeado para o reator; 2) reação (16-48h) – etapa na qual houve reação da biomassa com o meio de cultura ou efluente adicionado sob agitação e aeração intermitente (este último, somente nas etapas de aeração); 3) sedimentação (20 min) – havendo interrupção da mistura, de forma a possibilitar a sedimentação da biomassa e sua retenção do RBS e 4) retirada de efluente (5 min)– onde a bomba de saída do reator era ativada, sendo retirado volume de 1-1,8 L. O TDH do reator foi variável de acordo com as fases experimentais (segunda a sexta).

#### 5.3.2 Reatores de fluxo contínuo

Dois reatores de leito fixo com espuma e fluxo contínuo (RFC 1 e RFC 2) com a mesma configuração foram utilizados nesta pesquisa, para atender os objetivos da etapa 3. Estes reatores (Figura 5-3) têm formato cilíndrico e material acrílico, com sistema alimentação contínua e fluxo ascendente. No interior, os reatores foram preenchidos com meio suporte, que consiste em pequenas mídias de espuma de poliuretano revestidas de material plástico. O

objetivo destas mídias foi a fixação da biomassa, possibilitando proteção contra possíveis agentes inibidores no meio líquido e retenção no reator, principalmente nas etapas de aeração.

Figura 5-2 - Representação esquemática do RBS e seus componentes: (1) temporizador automático; (2) compressor de ar; (3) registro regulador da vazão de ar; (4) mangueira de ar com pedra porosa; (5) agitador; (6) sensores de pH, temperatura, OD, agitação e níveis máximo e mínimo; (7) afluente; (8) bomba para entrada do afluente; (9) bomba para saída do efluente tratado; (10) coleta do efluente tratado; (11) painel de controle, programação e armazenamento de dados do RBS e (12) exportação dos dados armazenados



Na parte superior (*headspace*), havia tampa de acrílico com borracha para vedar a transferência de gases com o ambiente externo aos reatores. Essa tampa tem uma abertura de 5 cm de diâmetro para inserir sonda de medição de redox, OD, pH e temperatura. Na base do reator havia pedra porosa para geração de microbolhas, que foi utilizada tanto para adicionar nitrogênio gasoso e expulsar o oxigênio no meio líquido na etapa de enriquecimento com meio de cultura, quanto para aerar o meio na etapa de desenvolvimento de nitrificação parcial/anammox através de aeração. As dimensões e outros componentes pertinentes dos reatores de fluxo contínuo são apresentados na Tabela 5-2.

Quanto ao uso de pedra porosa, seu principal objetivo, além da aeração para geração de substratos necessários ao processo anammox ( $\text{NO}_2^-$ ) foi também melhorar a hidrodinâmica do reator, de modo que as microbolhas geradas proporcionem mistura e previnam o surgimento de zonas mortas ou caminhos preferenciais. Conforme o RBS apresentado no item anterior, os RFC 1 e 2 também foram aerados por meio de compressor de ar ligado a um temporizador automático para garantir a intermitência da aeração, com vazão ajustável e controlada através de registro. Os RFC 1 e 2 também foram protegidos da luz para evitar o crescimento de algas

em seu interior. Adicionalmente, a principal vantagem do uso destes reatores consiste em flexibilizar o TDH em tempos menores que 24h pela propriedade de fluxo de entrada do afluente e saída de efluente contínuos.

Figura 5-3 - Representação esquemática do RFC 1 e 2 e seus componentes: (1) temporizador automático; (2) compressor de ar; (3) registro regulador da vazão de ar; (4) saída de efluente; (5) entrada para sondas; (6) entrada para adição de nitrogênio gasoso e saída de gases; (7) frasco de armazenamento de afluente; (8) bomba peristáltica para alimentação; (9) entrada de efluente; (10) meio suporte e (11) pedra porosa.

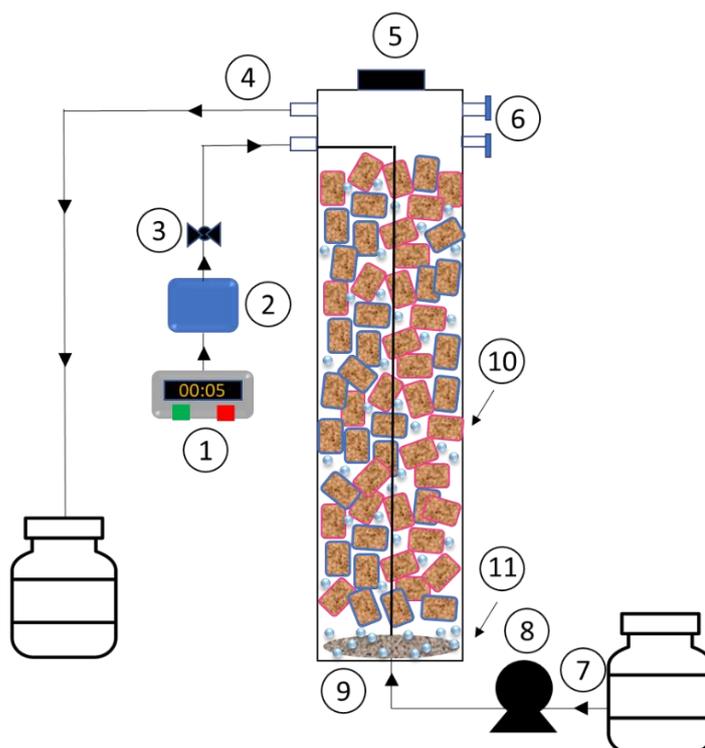


Tabela 5-2 - Características da concepção do RFC e seus principais componentes

Altura (cm)	53
Diâmetro interno (cm)	9,5
Volume total (L)	3,6
Volume útil aproximado (L)	2,0
Diâmetro da pedra porosa (cm)	3-4
Aresta do meio suporte (cm)	2,0
Número de peças do meio suporte	Aproximadamente 500

### 5.3.3 Inoculação dos reatores, amostragem e análises da biomassa

A inoculação dos reatores utilizados neste estudo foi realizada utilizando lodos ativados proveniente da linha de recirculação. Para os reatores RBSs, o lodo foi lavado com solução padrão de fostato, centrifugado e adicionado no reator por abertura no *headspace*. Após coleta do lodo, este permaneceu refrigerado por 1 a 24h a cerca de 4°C antes do preparo e inoculação.

Para os reatores com biomassa imobilizada em espuma, imediatamente após a coleta, o inóculo permaneceu em contato com o meio suporte por sete dias e anteriormente à sua disposição nos reatores, houve fornecimento de oxigênio através de compressor de ar, para facilitar a adesão da biomassa no meio suporte.

A amostragem de biomassa no reator RBS foi realizada com pequena abertura no *headspace* e inserção de tubulação acoplada a seringa, promovendo fluxo de saída da biomassa (com o equipamento de mistura do reator ativado), com volume aproximado de 50 mL. No caso de adesão da biomassa às paredes do reator, a tubulação feita de silicone promovia o desprendimento do biofilme aderido às paredes do reator, que em seguida era retirado com auxílio de seringa.

A amostragem nos reatores com biomassa imobilizada em espuma foi feita separadamente: da biomassa aderida aos meios suporte e da biomassa dispersa no reator. No caso da biomassa aderida, foi realizada coleta de vinte mídias, de todas as camadas do reator, que foram lavadas com solução de fosfato e centrifugadas, até a retirada total da biomassa. Após a retirada de todas as mídias, 25 mL do líquido no interior misturado com biomassa eram retirados, lavados e centrifugados.

A biomassa coletada foi armazenada sob  $-20^{\circ}\text{C}$  para extração de DNA e parte da biomassa foi utilizada para análise de sólidos suspensos voláteis (SSV), de acordo com APHA (2017). Devido à baixa disponibilidade de água para ser filtrada nas amostras, estas foram pesadas e a massa foi substituída pelo volume na fórmula de determinação de SSV (considerando peso específico da amostra igual ao da água). Além disso, não houve filtração, sendo o material de coleta depositado diretamente nas cápsulas de porcelana da análise.

Quanto à coloração das amostras de biomassa, de maneira geral, não ficaram visivelmente avermelhadas como comumente são observadas biomassas com atividade anammox, mas em tons de marrom mais claros, com alguns grânulos alaranjados (no caso do RBS) e alaranjadas nos reatores de fluxo contínuo, principalmente a biomassa aderida no meio suporte. A utilização de efluente real permite o crescimento de outros microrganismos e devido à presença de materiais inertes nos sólidos do reator justificam a coloração da biomassa.

No entanto, técnicas de biologia molecular foram utilizadas para a correta quantificação de bactérias anammox e outros microrganismos envolvidos no ciclo do nitrogênio (análise de reação em cadeia da polimerase quantitativa - qPCR), bem como avaliação da diversidade

microbiana, considerando todo o domínio de bactérias e arqueas (sequenciamento de nova geração – NGS). Os primers utilizados na qPCR foram descritos por Pereira (2018). Na análise de NGS, foi realizada amplificação do DNA com primers para região de interesse 16S V4, com inclusão dos barcodes, pool das amostras, quantificação do pool e sequenciamento (2x150pb ou 2x250pb, média de cobertura de 40.000 paired-end reads por amostra). Para identificação taxonômica, foi utilizado programa QIIME™, com aplicação de Amplicon Sequence Variant (ASV) para análise das sequências obtidas.

Informações complementares da análise de bioinformática (número de sequências recuperadas, índice de diversidade de Chao1, índice de diversidade de Shannon, índice de diversidade de Gini-Simpson e índice de diversidade de Simpson inverso estão contidas no Apêndice A.

**6 ETAPA 1 – NITRIFICAÇÃO PARCIAL/ANAMMOX PARA REMOÇÃO DE NITROGÊNIO DE EFLUENTE ANAERÓBIO DOMÉSTICO EM REGIÃO DE CLIMA TROPICAL: ESTRATÉGIAS DE AERAÇÃO E COMUNIDADE BACTERIANA DO CICLO DO NITROGÊNIO (DADOS DO CAPÍTULO PUBLICADO NA REVISTA ENVIRONMENTAL TECHNOLOGY)**

**RESUMO**

A combinação da digestão anaeróbia e da NP/A pode tornar ETes energeticamente autossuficientes. No entanto, a aplicação da NP/A tem sido um desafio em águas residuárias contendo baixas concentrações de nitrogênio; além do mais, sua aplicação em efluentes anaeróbios domésticos, bem como as estratégias de aeração e investigação do processo sob temperatura ambiente são pouco explorados. Este estudo, que teve duração de 729 dias, investigou a PN/A em RBS, tratando efluente anaeróbio doméstico. Após a partida do sistema, o RBS foi alimentado com efluente real sob 35°C e sob temperatura ambiente sem diminuição na remoção de nitrogênio (71 e 75%, respectivamente). As remoções medianas de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e NT sob aeração de 7 min on/14 min off foram de 66 e 59%, respectivamente, com efluente em acordo com a legislação de lançamento de efluentes brasileira. Os resultados da qPCR mostram a abundância de bactérias anammox na ordem de magnitude entre 10<sup>8</sup> e 10<sup>9</sup> n<sup>o</sup> cópias/gSSV. Estes resultados mostram que é possível estabelecer a NP/A como pós-tratamento de efluentes anaeróbios domésticos sob temperatura ambiente.

**6.1 Introdução**

A digestão anaeróbia para remoção de matéria orgânica é uma alternativa promissora para regiões de clima quente e tem ganhado destaque no tratamento de águas residuárias domésticas em regiões tropicais e subtropicais devido à condição climática favorável, menor demanda energética e potencial de geração de energia (SOUZA; OKADA; FORESTI, 2018; STAZI; TOMEI, 2018). Reatores UASB consistem no principal sistema para tratamento anaeróbio de águas residuárias no Brasil (CHERNICHARO et al., 2015).

No entanto, na digestão anaeróbia, a remoção de matéria orgânica é menor em comparação a processos aeróbios, como lodos ativados, exigindo frequentemente processos de pós-tratamento para atender aos critérios de descarte ou reuso (CHERNICHARO et al., 2015). Apesar da limitação de altas remoções de DQO (~70%), o tratamento anaeróbio pode converter 70% de DQO em metano (SANDRA C et al., 2017).

As técnicas tradicionais para a remoção de nitrogênio (com nitrificação total e desnitrificação heterotrófica) podem não ser adequadas como pós-tratamento de efluentes domésticos anaeróbios, uma vez que estes contêm uma fração de DBO, mas não suficiente para suprir a demanda de matéria orgânica na desnitrificação heterotrófica, afetando o desempenho do processo (Chernicharo et al., 2015). Além disso, o desvio de matéria orgânica do esgoto bruto para garantir a remoção de nitrogênio reduziria a geração de biogás e, conseqüentemente, e recuperação energética (LAURENI et al., 2015).

A introdução do processo de NP/A como pós-tratamento de efluentes domésticos permite a separação da remoção de carbono e de nitrogênio e maximiza a recuperação energética através do pré-tratamento de matéria orgânica em digestor anaeróbio (ou reator UASB) para a geração de biogás (CAO; VAN LOOSDRECHT; DAIGGER, 2017). No entanto, um dos maiores desafios da NP/A em efluentes domésticos consiste no controle da população de BON (MIAO et al., 2017) e nesse sentido, a aeração intermitente tem sido uma alternativa para inibir BON e garantir a PN/A (MA et al., 2015b; MIAO et al., 2020a; XU et al., 2020). A NP/A para a remoção de nitrogênio de efluentes domésticos tem sido aplicada com sucesso (JUAN-DÍAZ; PÉREZ; CARRERA, 2021; LAURENI et al., 2016; MA et al., 2015a; MIAO et al., 2016). No entanto, sua aplicação tem tido o foco em efluentes aeróbios domésticos e a aplicação em efluentes anaeróbios domésticos tem sido pouco investigada.

Regiões de clima quente podem favorecer o processo de NP/A e favorecer a remoção de nitrogênio de efluentes anaeróbios domésticos. Fernandes et al. (2018) observaram altas atividade anammox e remoção de nitrogênio em RBS alimentado com efluente anaeróbio doméstico e com suplementação de nitrito sob 35, 25 e 20°C. A NP/A foi estabelecida em RBS alimentado com digestato de resíduo alimentar sob temperatura ambiente do Sudeste brasileiro (Carvalho et al., 2021). No entanto, a adequabilidade da NP/A em temperatura ambiente para remoção de nitrogênio de efluente anaeróbio doméstico não está totalmente compreendida.

A aeração intermitente com curtos períodos de aeração e não aeração e baixas concentrações de oxigênio podem controlar as populações de BOA e DHB, inibir BON e promover a atividade anammox (MIAO et al., 2017; XU et al., 2020). A vazão de ar aplicada é um parâmetro crucial para as estratégias de aeração (PEREIRA et al., 2019a). Contudo, o equilíbrio entre as vazões de ar aplicadas e períodos de aeração/não aeração não estão totalmente exploradas, especialmente na aplicação de NP/A em efluentes domésticos, devido à dificuldade de inibir BON.

Portanto, os objetivos deste trabalho são: i) avaliar o processo anammox para remoção de nitrogênio de efluente doméstico anaeróbico sob temperatura controlada e sob temperatura ambiente; ii) investigar estratégias de aeração com diferentes períodos de aeração (1, 5 e 7 min) e a influência da vazão de ar aplicada e iii) analisar a dinâmica da comunidade bacteriana do ciclo do nitrogênio. Este estudo auxilia em melhor compreensão da PN/A em efluentes domésticos, especialmente anaeróbios, bem como na interferência da temperatura ambiente e efeitos das estratégias de aeração.

## 6.2 Materiais e métodos

### 6.2.1 Efluente anaeróbico doméstico

O afluente do RBS consistiu em efluente anaeróbico doméstico de reator UASB em escala de demonstração (14 m<sup>3</sup>) com TDH de 6 a 16h, localizado em Belo Horizonte, Brasil (latitude 19°30'42"S e longitude 43°20'42"W), no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento (CePTS) da UFMG. O efluente foi armazenado em recipientes sob 6°C e mantido por 1 a 5 semanas anteriormente à aplicação no sistema.

### 6.2.2 RBS

Um RBS com volume útil de 2 a 2,3L (modelo New Brunswick™ Bioflo®/CelliGen® 115) foi utilizado nesta pesquisa durante 729 dias. O RBS continha sondas de temperatura (°C), pH, OD (% e mg/L), controle de agitação (rpm) e software para armazenamento e exportação de dados. A agitação foi controlada a 50 rpm e o TDH variou entre 16 e 32h (exceto em finais de semana e períodos de restrição devido à pandemia de Covid-19).

Os ciclos operacionais do reator incluíam: (i) alimentação (5 min); (ii) reação (450 a 1.350 min); (iii) sedimentação (20 min) e (iv) descarte de efluente (5 min). Um compressor de ar externo foi conectado ao RBS com temporizador para garantir a alternância entre períodos com e sem aeração. A vazão de ar foi controlada através de válvula reguladora conectada à mangueira de aeração e monitorada com auxílio de seringa esmerilhada. Não houve descarte de sólidos do sistema (exceto em situações em que parte destes foi arrastado pelo fluxo de saída de efluente do reator), ocasionando alto TDS.

### 6.2.3 Inóculo

O RBs foi inoculado com 12L de lodos ativados proveniente da linha de recirculação de ETE Arrudas, operada pela Companhia de Saneamento de Minas Gerais (COPASA). O lodo foi

centrifugado a 12000 rpm por 20 min e adicionado no reator. A concentração de sólidos no lodo centrifugado foi de 76.5 gSSV.L.

#### 6.2.4 Estratégias operacionais do RBS

As fases operacionais incluíram: fase 1- alimentação com meio de cultura autotrófico descrito por Dapena-Mora et al. (2004) e Van de Graaf et al. (1996) para aumento de cópias e atividade de bactérias anammox, com concentração de nitrogênio total de 60 a 200 mg/L -; fase 2 e 3 (alimentação com efluente anaeróbio doméstico suplementado com nitrito, sob 35°C e temperatura ambiente, respectivamente); fases 4, 5 e 7 (alimentação com efluente anaeróbio doméstico e aeração intermitente para NP/A, sob condições de aeração/não aeração de 1 min/14 min, 5 min/14 min e 7 min/14 min, respectivamente) e fases 6.1 e 6.2 (com suplementação de biomassa com atividade anammox para recuperação de remoção de nitrogênio e alimentação com meio autotrófico e efluente anaeróbio doméstico e nitrito, respectivamente). Mais detalhes sobre as estratégias operacionais são apresentados na Tabela 6-1.

#### 6.2.5 Análises físico-químicas

As concentrações afluentes e efluentes(mg/L) dos compostos nitrogenados (Nitrogênio total Kjeldahl – NTK -, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), DBO, DQO e alcalinidade total (AT) foram investigadas de acordo com APHA (2017). As eficiências e taxas de remoção/consumo destes compostos foram analisadas em estatística descritiva e os resultados, apresentados em tabelas e gráficos utilizando o software Office Excel 2020.

#### 6.2.6 Extração de DNA e qPCR

As coletas de biomassa incluíram o inóculo e amostras do RBS ao final de cada fase operacional, para análises de SSV (de acordo com APHA, 2017) e para extração de DNA (utilizando o kit Fast DNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, USA e seguindo os procedimentos descritos pelo fabricante). O n° de cópias/gSSV do gene RNAr 16s (anammox, *Nitrospira*, *Nitrobacter*) e genes funcionais (*AmoA* para BOA e *NosZ* para bactérias desnitrificantes que convertem N<sub>2</sub>O a N<sub>2</sub>) foram estimados através de PCR quantitativo (qPCR) utilizando mix *SYBR Green* e *primers* e plasmídeos (para curva padrão). Mais detalhes sobre coleta, primers utilizados e condições da qPCR foram previamente descritos por Pereira et al. (2019a).

Tabela 6-1– Estratégias operacionais no RBS para estabelecer atividade anammox (fases 1, 2 e 3); processo de NP/A (fases 4, 5 e 7) e recuperação de atividade anammox (fases 6.1 e 6.2)

Fases	Período	Duração (dias)	Alimentação	TDH	Aeração (on/off)	Vazão de ar (L/min.L)	Temp. (°C)
1	20/3/2020 to 13/1/2021	300	Meio de cultura autotrófico	24h-14 dias			35
2	18/1/21 to 19/3/21	61	Efluente anaeróbio doméstico e nitrito	24-32h			35
3	9/4/21 to 11/6/21	64	Efluente anaeróbio doméstico e nitrito	16-32h			Ambiente
4	17/6/21 to 5/8/21	50	Efluente anaeróbio doméstico e ar	16h	1/14	0.020-0.150	Ambiente
5	6/8/21 to 18/10/21	74	Efluente anaeróbio doméstico e ar	16h	5/14	0.0045-0,120	Ambiente
6.1	26/10/21 to 9/11/21	15	Meio de cultura autotrófico	32h			Ambiente
6.2	11/11/21 to 28/1/22	79	Efluente anaeróbio doméstico e nitrito	15-32h	7/14		Ambiente
7	1/2/22 to 18/3/22	46	Efluente anaeróbio doméstico e ar	31h		0.025-0.050	Ambiente

### 6.3 Resultados e discussão

#### 6.3.1 Características do efluente anaeróbio

As principais características do efluente anaeróbio doméstico proveniente de reator UASB são apresentadas na Tabela 6-2. O composto nitrogenado predominante é o  $N-NH_4^+$  (mediana de 38,1 mg/L), seguido de uma porção de nitrogênio orgânico (mediana de NTK de 43 mg/L). A matéria orgânica também é presente (mediana de DQO e DBO de 91,3 e 42,4 mg/L, respectivamente), resultando em mediana de taxa C/N de 1,40 e mediana de DQO/DBO de 2,6). A matéria orgânica biodegradável não é expressiva e a maior parte da matéria orgânica é composta por fração inerte. Estes resultados indicam que a atividade de BDH pode ser limitada, reduzindo a competição por bactérias anammox por substrato. Outras características do efluente anaeróbio doméstico consistem na presença de  $CH_4$  7-25 mg/L) e  $S^{2-}$  (7-23 mg/L) (CABRAL et al., 2020).

O processo tradicional de remoção biológica de nitrogênio de águas residuárias (com nitrificação total e desnitrificação heterotrófica) requer 2,86 mg de DQO (sem considerar o crescimento bacteriano) por mg de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> removido (GÜVEN, 2009) e 7,07 mg de AT por mg de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> oxidado a N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Ahn, 2006). As medianas dos valores de DQO/N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e de AT/N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> no efluente anaeróbio doméstico foram de 1,40 e 5,89, respectivamente (Tabela 6-2). Estes resultados sugerem que não há DQO e AT suficiente para garantir o processo tradicional de remoção de nitrogênio. No entanto, uma vez que a demanda de DQO e de AT para a NP/A é de 0 e 3,57 (TA<sub>afluente</sub>/N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup><sub>afluente</sub>) (Ahn, 2006), as concentrações destes compostos no efluente anaeróbio doméstico são adequadas para a NP/A. Lauren et al. (2015) observaram que efluentes aeróbios domésticos também não apresentam matéria orgânica suficiente para a desnitrificação heterotrófica, e os resultados da presente pesquisa mostram que o efluente anaeróbio doméstico tem comportamento similar, embora haja menor remoção de matéria orgânica em tratamentos anaeróbios em comparação com tratamentos aeróbios.

Tabela 6-2- Principais características do efluente de reator UASB tratando efluente doméstico utilizado nesta pesquisa

Variável	n	Mediana	Média aritmética	C.V.
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/L)	135	38.1	37.5	0.20
NTK (mg/L)	130	43.0	43.3	0.22
N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	21	0.24	0.37	1.19
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	21	0.58	0.72	0.92
AT (mgCaCO <sub>3</sub> /L)	101	218.9	224.0	0.18
COD <sub>total</sub> (mg/L)	93	91.3	108.9	0.67
DBO <sub>5</sub> (mg/L)	78	42.4	45.6	0.49
DQO/DBO	74	2.6	2.7	0.58
DBO/NT	66	0.68	0.75	0.56
TA <sub>afluente</sub> /N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> <sub>afluente</sub>	93	5.89	6.23	0.30

n: número de amostras e C.V.: coeficiente de variação (desvio padrão/média aritmética).

### 6.3.2 Partida do RBS com lodos ativados como inóculo

A partida do RBS foi feita utilizando lodos ativados como inóculo e os primeiros 300 dias de operação consistiram em alimentação com meio de cultura autotrófico para a aumento de bactérias anammox, conforme descrito anteriormente (Dapena-Mora et al., 2004; van de Graaf et al., 1996). A remoção dos compostos nitrogenados nesta fase foi instável (Figura 6-1),

provavelmente devido à atípica operação (com longos e flutuantes TDHs) do sistema, devido às restrições em virtude da pandemia de Covid-19. Contudo, carga mediana de nitrogênio total removido foi de 116 mg/L.d foi obtida nesta fase. Este valor é próximo a carga de nitrogênio total removido observado por Pereira et al. (2019) em RBS inoculado com lodos ativados (mediana de 82 mg/L.d em 300 dias de operação com meio de cultura autotrófico para bioaumentação de biomassa anammox). A mediana da taxa  $N\text{-NO}_3^- \text{ produzido} / N\text{-NH}_4^+ \text{ consumido}$  (0,60) foi maior do que a taxa teórica da reação anammox (0,26) (STROUS et al., 1998b), o que também é reportado sobre sistemas anammox inoculados com lodos ativados, mesmo quando alimentados com meio de cultura autotrófico (Fernandes et al., 2018; Leal et al., 2016; Pereira et al., 2019), devido à presença de BOA e BON.

O coeficiente  $N\text{-NO}_3^- \text{ produzido} / N\text{-NH}_4^+ \text{ consumido}$  apresentou valores discrepantes ao longo das fases operacionais, inclusive com valores negativos, próximos a -21 (Figura 6-1), é resultado do acúmulo de  $N\text{-NO}_3^-$  no reator em alguns ciclos operacionais e do baixo consumo de  $N\text{-NH}_4^+$ . O alto TDH do sistema aliado à retirada parcial de volume efluente e à nitrificação excessiva seguida de nitrificação insuficiente favorece este cenário.

Os dados da série nitrogenada e de alcalinidade total no sistema apresentados na Figura 6-1 foram produzidos a partir do 120 e 200º dia de operação do sistema, respectivamente, uma vez que anteriormente a este momento, havia impossibilidade de acesso ao laboratório para as análises em virtude das restrições provocadas pela pandemia de Covid-19.

### 6.3.3 Alimentação com efluente anaeróbio doméstico com suplementação de nitrito sob 35°C e sob temperatura ambiente

Após o período para o aumento da atividade de bactérias anammox, o RBS foi alimentado com efluente anaeróbio doméstico suplementado com nitrito (com proporção de 1  $N\text{-NH}_4^+ / 1,5 N\text{-NO}_2^-$ ) para a reação anammox (fases 2 e 3). Na fase 2, a temperatura foi mantida a 35°C, como na fase anterior. As eficiências medianas de remoção de  $N\text{-NH}_4^+$  e de NT foram de 74 e 71%, respectivamente (Tabela 6-3).

A presença de DQO e DBO não diminuiu a remoção de nitrogênio em comparação à fase anterior com meio de cultura autotrófico como alimentação (Figura 6-1). A AT também foi consumida na fase 2 (mediana de 19%), mesmo sem fornecimento de ar. Este consumo pode ser uma medida indireta da nitrificação total, devido à atividade de BOA e BON, uma vez que a mediana da taxa de  $N\text{-NO}_3^- \text{ produzido} / N\text{-NH}_4^+ \text{ consumido}$  foi de 0,79, maior do que o valor teórico

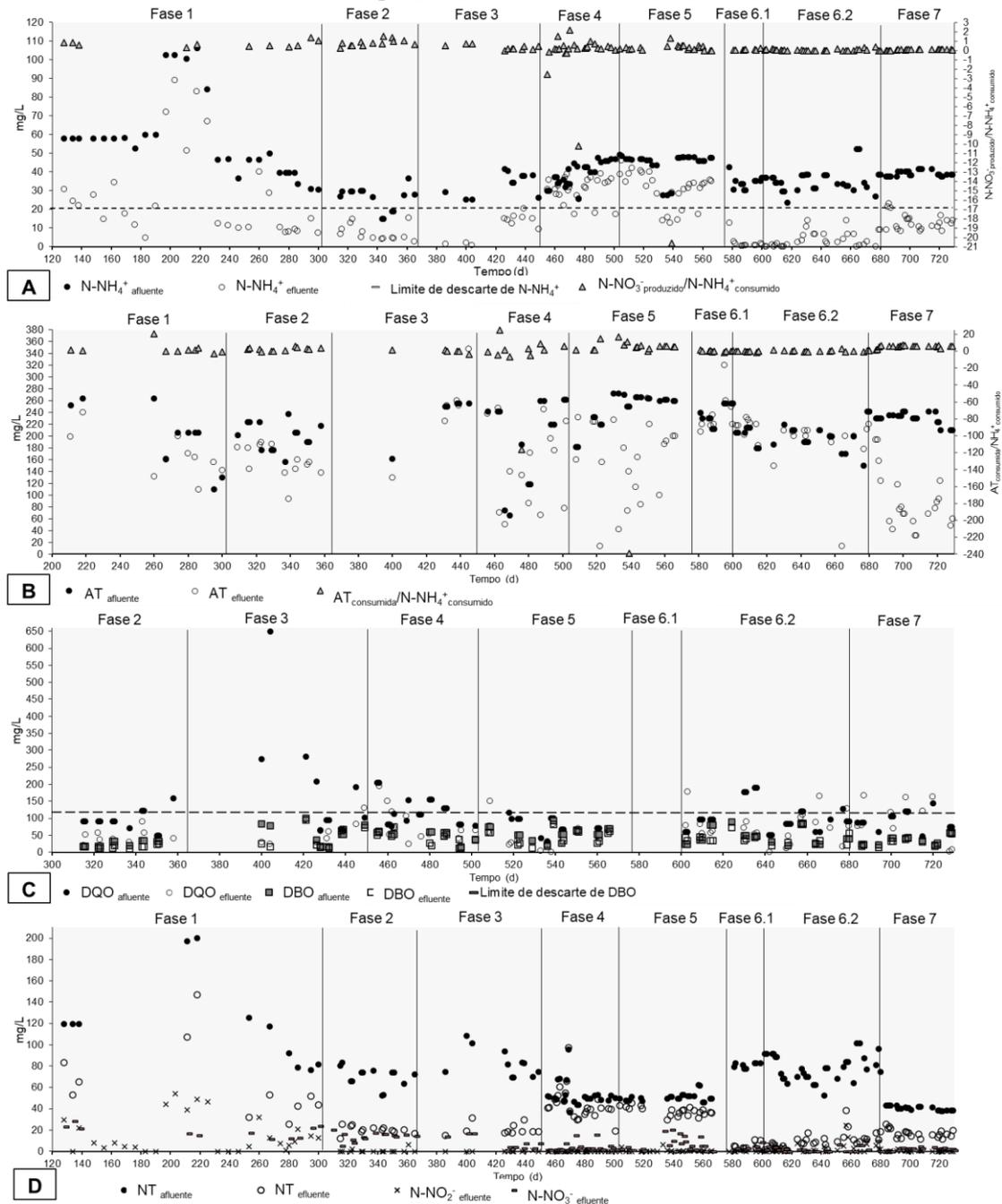
da reação anammox de 0,26 (Strous et al., 1998). A atividade de BOA e BON mesmo sem aeração é comum em reatores anammox inoculados com lodos ativados, aumentando a taxa de  $N\text{-NO}_3^-$  produzido/ $N\text{-NH}_4^+$  consumido (Fernandes et al., 2018; Leal et al., 2016; Pereira et al., 2019), uma vez que estes microrganismos são adaptados a limitação de OD e podem emergir em meio com excesso de nitrogênio (NOWKA; DAIMS; SPIECK, 2015; VAL DEL RIO et al., 2019; YU et al., 2020), que é o caso do RBS com alimentação com  $N\text{-NH}_4^+$  afluyente (efluente anaeróbio doméstico) e  $N\text{-NO}_2^-$  (suplementado no efluente) com concentrações de 38,1 e 60 mg/L, respectivamente.

O maior consumo de DBO (mediana de 38%) foi observado na fase 2, possivelmente devido a presença simultânea de matéria orgânica e  $N\text{-NO}_2^-$ , o que favorece a desnitrificação heterotrófica, de acordo com pesquisas prévias em sistemas anammox alimentados com efluente anaeróbio doméstico e suplementação de nitrito (Fernandes et al., 2018; Leal et al., 2016). Contudo, bactérias anammox podem ser dominantes nestes sistemas, mesmo com DHB e matéria orgânica (LAURENI et al., 2015).

A partir da fase 3, o reator foi operado sob temperatura ambiente. As medianas de eficiências de remoção de  $N\text{-NH}_4^+$  e NT foram de 64 e 75 %, respectivamente. A mediana da taxa  $N\text{-NO}_3^-$  produzido/ $N\text{-NH}_4^+$  consumido foi de 0,22, menor do que a taxa teórica da reação anammox de 0,26, o que significa que parte do  $N\text{-NO}_3^-$  produzido pela reação anammox pode ser sido consumo juntamente com a DBO (mediana de consumo de 24%) por DHB, o que foi observado em estudos anteriores (JUAN-DÍAZ; PÉREZ; CARRERA, 2021; LAURENI et al., 2015).

A redução da temperatura na fase 3 (de 35°C para temperatura ambiente de 20 a 29°C) não diminuiu a remoção de nitrogênio (de 71 para 75%), de acordo com estudos prévios com diminuição da temperatura de 35 para 25 e 20°C (Fernandes et al., 2018). Alguns estudos sugerem que um longo período (um ano) é necessário para a aclimação de bactérias anammox diante da redução da temperatura (20°C) para sistemas anammox alimentados com efluente doméstico pré-tratado (Juan-Díaz et al., 2021). No entanto, este estudo mostra que a aclimação de sistemas com atividade anammox sob temperaturas ambientes em regiões tropicais (20-29°C) pode ser rápida, o que facilita a implementação do processo anammox. Apesar da temperatura ótima de bactérias anammox de 37°C (ISAKA et al., 2008) e de BON entre 25 e 30°C (MEHRANI et al., 2020), os resultados da presente pesquisa mostram que é possível alcançar altas eficiências de remoção de nitrogênio tratamento efluente anaeróbio doméstico sob temperatura ambiente em sistemas anammox, limitando a atividade de BON.

Figura 6-1– Dinâmica das concentrações de  $\text{N-NH}_4^+$  (mg/L),  $\text{N-NO}_3^-$  produzido/ $\text{N-NH}_4^+$  consumido, limite de descarte de  $\text{N-NH}_4^+$  (A); concentrações de AT (mg/L),  $\text{TA}_{\text{consumida}}/\text{N-NH}_4^+$  consumido (B), concentrações de DQO and DBO (mg/L), limite de descarte de DBO (C) e concentrações de NT,  $\text{N-NO}_2^-$  e  $\text{N-NO}_3^-$  (mg/L) nas fases de 1 a 7 (D).



A temperatura ambiente, que foi medida a cada minuto diariamente, variando de 20 a 29°C ao longo do período sem controle de temperatura, resultou em menores consumos de DBO e AT, o que indica indiretamente a diminuição das atividades de BOA, BON e DHB em comparação à operação sob 35°C. Estes resultados estão de acordo com Juan-Díaz et al. (2021), considerando a diminuição de DHB com a diminuição da temperatura em sistemas anammox alimentados com efluente doméstico.

Tabela 6-3 – Mediana e coeficiente de variação (C.V.) das eficiências de remoção de  $\text{N-NH}_4^+$ , NT, AT e DBO (%), taxas de  $\text{N-NO}_3^-$  produzido/ $\text{N-NH}_4^+$  consumido e  $\text{AT}_{\text{consumida}}/\text{N-NH}_4^+$  consumido e concentrações efluentes de  $\text{N-NH}_4^+$ , NT, AT, DBO,  $\text{N-NO}_2^-$  e  $\text{N-NO}_3^-$  nas fases de 1 a 7.

Fases	Eficiências de remoção (%)												Taxas					
	$\text{N-NH}_4^+$			NT			AT			DBO			$\text{N-NO}_3^-$ produzido/ $\text{N-NH}_4^+$ consumido			$\text{AT}_{\text{consumida}}/\text{N-NH}_4^+$ consumida		
	n	Mediana	C.V.	n	Mediana	C.V.	n	Mediana	C.V.	n	Mediana	C.V.	n	Mediana	C.V.	n	Mediana	C.V.
1	29	56	0,45	12	46	0,31	10	13	2,30	-	-	-	11	0,60	0,46	11	1,04	2,66
2	14	74	0,16	13	71	0,11	14	19	0,95	11	38	0,49	13	0,79	0,44	12	2,34	0,92
3	11	64	0,25	11	75	0,08	6	0	-15,29	9	24	1,69	11	0,22	0,74	6	0,06	-7,65
4	26	22	1,09	25	18	0,85	11	27	4,07	9	12	-10,85	25	0,22	-14,92	11	1,10	-4,67
5	28	30	0,58	21	26	0,40	18	31	0,75	13	22	1,09	21	0,33	-6,84	18	5,23	-7,60
6.1	8	98	0,01	6	96	0,05	8	-1	-4,65	-	-	-	6	0,08	0,69	8	-0,06	-4,51
6.2	32	93	0,13	32	89	0,11	24	-1	15,95	19	3	-12,52	32	0,02	1,53	24	-0,07	20,46
7	23	66	0,18	21	59	0,15	21	68	0,34	12	10	1,64	21	0,09	0,59	21	5,98	0,28

Fases	Concentrações efluentes (mg/L)																	
	$\text{N-NH}_4^+$			NT			AT			DBO			$\text{N-NO}_2^-$			$\text{N-NO}_3^-$		
	n	Mediana	C.V.	n	Mediana	C.V.	n	Mediana	C.V.	n	Mediana	C.V.	n	Mediana	C.V.	n	Mediana	C.V.
1	29	17,8	0,88	12	53,0	0,54	10	162,0	0,22	-	-	-	29	7,90	1,15	11	17,50	0,30
2	14	5,1	0,58	13	20,5	0,18	14	158,0	0,17	11	16,3	0,29	14	0,00	2,88	14	14,50	0,28
3	11	14,5	0,61	11	18,6	0,26	6	252,0	0,29	10	23,8	0,76	11	0,00	2,26	11	4,08	0,81
4	26	31,9	0,21	25	40,7	0,34	14	156,0	0,48	11	46,6	0,42	26	0,00	3,84	25	2,58	1,09
5	28	33,0	0,32	21	38,1	0,11	21	180,0	0,42	15	35,1	0,48	28	0,14	2,55	23	4,82	1,04
6.1	8	0,6	0,54	6	3,3	0,70	8	233,0	0,14	-	-	-	8	0,82	1,66	6	2,47	0,73
6.2	32	2,2	1,09	32	8,3	0,77	24	209,0	0,22	19	39,1	0,42	32	0,40	1,90	32	0,65	1,44
7	23	12,3	0,32	21	15,9	0,23	21	76,0	0,54	12	31,4	0,43	22	0,05	1,85	21	2,44	0,63

n: número de dados; C.V: coeficiente de variação (desvio padrão/média aritmética).

Em contraste, Fernandes et al. (2018) observaram aumento no consumo de matéria orgânica (como DQO) com a redução da temperatura em reator com atividade anammox alimentado com efluente anaeróbico doméstico e suplementado com  $\text{N-NO}_2^-$ . Contudo, os autores aplicaram a alimentação com taxa de  $\text{NH}_4^+:\text{NO}_2^-$  de 1,80 a 2,00 (no presente estudo, esta taxa foi de 1,50), maior do que a estequiometria da reação anammox (1,32) proposta por Strous et al. (1998).

#### 6.3.4 Estratégias de aeração com curtos períodos de aeração (1 e 5 min de aeração e 14 min de não-aeração)

A fase 4 foi conduzida sob temperatura ambiente e foi a primeira sob aeração intermitente para estabelecer a NP/A (1 min on/14 min off). As médias de OD (mg/L), temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e pH na fase 4 foram de 0,70, 27,0 e 6,72, respectivamente. As condições de aeração ocasionaram baixa remoção de nitrogênio (de -2 a 68%) e o aumento da vazão de ar aplicada de 0,020 a 0,150

L/min.L não aumentaram a eficiência de remoção de nitrogênio, uma vez que as concentrações afluentes e efluentes mantiveram-se muito próximas (Figura 6 1). Portanto, mesmo com o aumento da vazão de ar aplicada, os curtos períodos de aeração limitaram a NP/A. Surpreendentemente, apesar das baixas eficiências medianas de remoção de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e de NT (22 e 18%, respectivamente), a taxa mediana de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> produzido/N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> consumido foi de 0,22, o que corresponde ao dobro do valor teórico para a NP/A (0,11) (SLIEKERS et al., 2002) (Tabela 6 3). Contudo, a remoção de DBO (mediana de 12%, Tabela 6 3) diminuiu em comparação às fases anteriores, provavelmente devido à redução de desnitrificação heterotrófica por ausência da suplementação de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.

Na fase 5, o período aerado aumentou de 1 para 5 min. As medianas de OD (mg/L), temperatura (°C) e pH foram de 0,36, 27,3 e 6,69, respectivamente. No entanto, as eficiências medianas de remoção de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e de NT não aumentaram o suficiente em relação à fase anterior (30 e 26%, respectivamente) (Tabela 6-3). Como na fase 4 anterior, o aumento da vazão de ar (de 0,0045 a 0,120 L/min.L) não aumentou a remoção de nitrogênio (Figura 6-1). A mediana da taxa de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> produzido/N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> consumido aumentou para da fase 4 (0,22) em relação à fase 5 (0,33), o que mostra que a nitrificação total também aumentou ao adotar o período aerado de 5 min. Apesar da baixa remoção de nitrogênio na fase 5, o consumo de AT foi alto, com valores efluentes de AT iguais a zero (Figura 6-1), levando à taxa mediana de AT consumida/N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> consumido de 5,23, maior que o valor teórico de 3,57 da NP/A.

Em conclusão, ambas as estratégias de aeração intermitente, com 1 e 5 min on/14 min off nas fases 4 e 5, respectivamente, não foram adequadas para desenvolver o processo de NP/A, além de promoverem nitrificação total, observada indiretamente pelos altos valores observados na taxa de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> produzido/N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> consumido. Nestes fases, os curtos períodos de aeração foram aplicados com taxas de vazões de ar de 0,0045 e 0,020 a 0,150 e 0,120 L/min.L, respectivamente. É possível que estas condições ocasionaram a instabilidade do sistema (Figura 6-1), com inibição de bactérias anammox e maior atividade de BOA e BON em relação à atividade de bactérias anammox, ainda que a remoção de nitrogênio tenha sido insuficiente.

Desempenhos similares com baixa remoção de NT (de 22 a 41%) e altas taxas de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> produzido/N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> consumido (de 0,28 a 0,66) foram observados por Pereira et al. (2019) em sistema de NP/A com longos períodos de aeração e não-aeração (de 15 a 45 min) na aeração intermitente em comparação a este estudo (1 a 5 min on/14 min off), taxas de vazão de ar de 0,026 a 0,200 L/min.L e concentrações de OD de 0,06 a 3,67 mg/L. Do mesmo modo, Miao et al., (2016)

observaram resultados similares, com baixa remoção de NT (14,7%) e altas taxas de  $N\text{-NO}_3^-$  produzido/ $N\text{-NH}_4^+$  consumido (0,88), aplicando aeração contínua na NP/A aplicada à efluente doméstico aeróbio, com baixo OD ( $0,17 \pm 0,08$  mg/L). Em contraste ao presente estudo, Azari et al. (2021) observaram remoção de NT de 33 a 91% in sistema de PN/A com aeração de  $4 \pm 1$  min on/  $21 \pm 1$  min off (OD de 0,2 a 0,7 mg/L) alimentado com efluente sintético simulando efluente doméstico em termos de concentração de nitrogênio ( $N\text{-NH}_4^+$  de 63 mg/L). Contudo, os autores mostraram que suplementação de biomassa anammox foi necessária para garantir bom desempenho.

A aeração intermitente tem sido uma ferramenta adequada para estabelecer a PN/A, uma vez que pode limitar atividade de BOA e inibir BON, principalmente em condições de limitação de OD. Mesmo sob aeração intermitente, o controle das concentrações de OD e períodos com e sem aeração são parâmetros cruciais. Curtos períodos de aeração têm sido aplicados com sucesso em processos de NP/A para pós-tratamento de efluentes domésticos em reator de estágio único (Azari et al., 2021; Laurení et al., 2016; Ma et al., 2015; Miao et al., 2016; Pedrouso et al., 2019; Xu et al., 2020). Contudo, os resultados da presente pesquisa mostram que mesmo com curtos períodos de aeração e baixas concentrações de OD (médias de 0,70 e 0,36 mg/L), é possível que ocorra nitrificação total devido à excessiva atividade de BON.

Há algumas hipóteses que justificam este comportamento. O primeiro é o fato da atividade de BON observada nas fases anteriores (sem aeração) ter interferido nas duas primeiras fases de aeração. A segunda hipótese é relacionada ao acúmulo de OD em alguns ciclos operacionais, o que resulta no aumento da atividade de BOA e BON (MIAO et al., 2016; XU et al., 2020). Além disso, altas vazões de ar aplicadas aumentam a disponibilidade de OD, tornando difícil a limitação de BON (XU et al., 2020), mesmo com períodos de aeração curtos (1 a 5 min). Além disso, as concentrações de meia saturação de  $N\text{-NH}_4^+$ ,  $N\text{-NO}_2^-$ , OD de BOA, BON e anammox mostram que BOA e BON tem melhor atividade em ambientes com disponibilidade de OD e substrato (LAURENI et al., 2015). Em conclusão, períodos curtos de aeração não são suficientes para prevenir a atividade de BON e garantir bom desempenho do processo de NP/A.

#### 6.3.5 Fase de recuperação e nova estratégia de aeração (7 min de aeração/ 14 min sem aeração)

A fase 6 consistiu em recuperação do sistema com suplementação de biomassa com atividade anammox (5g). Durante 15 dias, o RBS foi alimentado com meio de cultura autotrófico (fase 6.1), resultando em remoção mediana de NT de 96% e concentração mediana efluente de 3,3

mg/L (Tabela 6-3)., o que significa que a recuperação da atividade anammox. Após, o RBS foi alimentado com efluente anaeróbio doméstico com suplementação de  $\text{N-NO}_2^-$  (fase 6.2), com remoção mediana de NT de 89% (Tabela 6-3). As concentrações efluentes de  $\text{N-NH}_4^+$  (mediana de 8,3 mg/L) permaneceram em conformidade com o limite brasileiro de lançamento de efluente (Brasil, 2011) abaixo de 20 mg/L. A suplementação de biomassa com atividade anammox é descrita como uma boa estratégia para aumentar a remoção de nitrogênio em sistemas de NP/A após períodos de instabilidade (MIAO et al., 2016). Azari et al. (2021) aplicaram suplementação de biomassa anammox em grânulos por nove dias para aumentar a remoção de nitrogênio (33-91%). Os resultados da presente pesquisa mostram que uma pequena porção de biomassa com atividade anammox para suplementação foi efetiva para aumentar a atividade anammox e a remoção de nitrogênio em curto período.

Finalmente, na fase 7, as remoções medianas de  $\text{N-NH}_4^+$  e NT de 68 e 59%, respectivamente, devido à nova estratégia de aeração (7 min on/14 min off) e o efluente (concentrações medianas de  $\text{N-NH}_4^+$  e DBO de 12,3 e 31,4mg/L, respectivamente) estava de acordo com os limites de lançamento de 20 e 120 mg/L, respectivamente (BRASIL, 2011). As médias de OD (mg/L), temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e pH foram de 0,09, 25,4 e 6,43, respectivamente. Estes resultados estão de acordo com Xu et al. (2020), que observaram melhor desempenho na NP/A tratando efluente doméstico com o aumento do período de aeração e redução das concentrações de OD.

Em comparação às fases 4 e 5 (1 e 5 min com aeração, respectivamente, e 14 min sem aeração, com vazões de ar de 0,020-0,150 e 0,045-0,120 L/min.L, respectivamente), a fase 7 com aumento da aeração (7 min on/14 min off) e redução da vazão de ar (0,025-0,050 L/min.L) melhorou a NP/A e a remoção de nitrogênio. A taxa  $\text{N-NO}_3^-_{\text{produzido}}/\text{N-NH}_4^+_{\text{consumido}}$  na fase 7 (mediana de 0,09) mostrou melhor controle das atividades de BOA e BON, uma vez que esta taxa estava próxima a da NP/A de 0,11 (Sliemers et al., 2002).

As concentrações de NT (mediana de 15,9 mg/L) foram similares aos resultados obtidos por Juan-Díaz et al. (2021) em sistema de NP/A de duplo estágio, tratando efluente aeróbio doméstico, com relação C/N de 1,40 (NT efluente de 9-15 mg/L). Estes resultados indicam que o processo de NP/A como pós-tratamento de efluentes domésticos pode alcançar bom desempenho em sistemas de NP/A em estágio único mesmo com afluentes com alta concentração de matéria orgânica em relação às concentrações de nitrogênio (C/N).

Miao et al. (2016) observaram remoção de NT de 57 a 77% em sistema de NP/A de estágio único como pós-tratamento de efluente doméstico em estratégias similares de aeração intermitente (7 min on/21 min off) ao presente estudo, porém com descarte frequente de biomassa para o controle de BOA e BON e para evitar redução na remoção de nitrogênio. Os resultados da presente pesquisa mostram que não é necessário descarte da biomassa para alcançar boa eficiência de remoção de NT (mediana de 59%), uma vez que uma das vantagens do processo anammox consiste em reduzir o descarte de lodo (Ahn 2006).

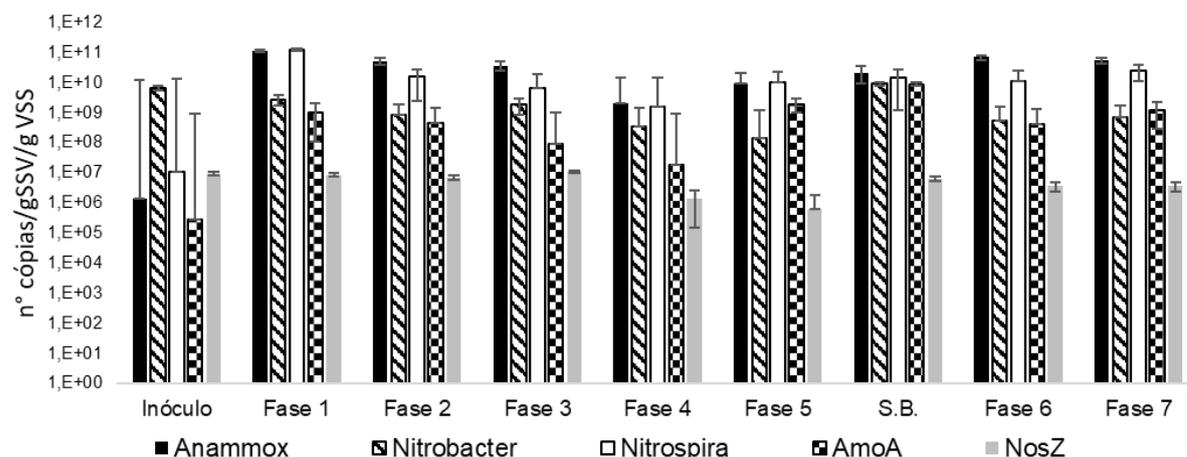
As configurações de reatores têm um grande impacto nas condições de aeração para NP/A. (Malovanyy et al. (2015) remoção de NT de 36-70% em sistema de NP/A alimentado com efluente doméstico pré-tratado em reator de lodos ativados com biofilme fixo integrado (IFAS), sob aeração com 15 min on/45 min off e OD de 0,28 a 0,46 mg/L. Contudo, os autores observaram a dependência de alta relação C/N no afluente (1,8) para aumentar garantir a remoção de nitrogênio devido à desnitrificação heterotrófica. Nossos resultados sugerem que em reator RBS a demanda de oxigênio é menor e que a remoção de nitrogênio pode ser alcançada para efluentes anaeróbios domésticos com relação C/N de 1,4, uma vez que a máxima remoção de matéria orgânica é desejada no pré-tratamento para aumentar a produção de biogás.

### 6.3.6 Bactérias do ciclo do nitrogênio

Os resultados de qPCR mostram que do inóculo (lodos ativados da linha da recirculação) para o final da fase 1 (alimentação com meio de cultura autotrófico), não apenas a abundância de bactérias anammox aumentou (de  $1.38E+06$  para  $1.15E+11$  cópias/gSSV) no sistema, mas também os grupos nitrificantes, incluindo BON (*Nitrospira* – de  $1.07E+07$  para  $1.24E+11$  cópias/gSSV) e BOA (*AmoA*) (de  $2.74E+05$  para  $1.05E+09$  cópias/gSSV).

O maior aumento em termos de abundância foi observado para *Nitrospira*, seguido de bactérias anammox (Figura 6-2). Miao et al. (2016) reportaram que baixas concentrações de OD não são suficientes para a completa inibição de BON. Os autores observaram aumento da população de BON sob OD de 0,17 mg/L. Assim, isto explica a bioaugmentação de BON no presente estudo, uma vez que mesmo sem aeração nas fases de 1 a 3, não foi possível estabelecer um ambiente completamente livre de OD. Adicionalmente, a constante de meia saturação de oxigênio ( $k_o$ ) de *Nitrospira* de 0,13 (BLACKBURNE et al., 2007) e a taxa de decaimento de BON menor em comparação à de BOA e DHB (LAURENI et al., 2015) pode explicar a bioaugmentação de BON na fase 1.

**Figura 6-2** – Abundância (n° cópias/gSSV) de anammox, *Nitrobacter*, *Nitrospira* (como gene RNAr 16s), BOA (como gene *AmoA*) e DHB (como gene *NosZ*) nas fases operacionais de 1 a 7 e da biomassa suplementada no sistema, com barra de padrão



S. B.: suplementação de biomassa.

DHB (como *NosZ*) foi o grupo menos abundante do ciclo do nitrogênio observado neste estudo, incluindo o inóculo, fases operacionais e a biomassa suplementada no RBS entre as fases 5 e 6. Estes resultados estão em contraste com os resultados observados por Fernandes et al. (2018) e Leal et al. (2016) em sistemas anammox alimentados com efluente anaeróbio doméstico. Os autores observaram que a abundância de DHB foi maior que a abundância de bactérias anammox em todas as temperaturas operacionais (35, 25 e 20°C).

As fases com aeração intermitente (4, 5 e 7) obtiveram as menores abundâncias de DHB, provavelmente devido à escassez de  $N-NO_2^-$  em comparação às fases com suplementação de  $N-NO_2^-$ . Isto pode ser atribuído à limitação de DHB. Estes resultados estão de acordo com o consumo de DBO observado. A presença de DHB confirma sua influência na remoção de  $N-NO_3^-$ , resultando em taxas de  $N-NO_3^-_{produzido}/N-NH_4^+_{consumido}$  nas fases 3, 6.1, 6.2 e 7 menores do que a estequiometria do processo anammox e NP/A, como foi observado em estudos prévios (Carvalho et al., 2021; Juan-Díaz et al., 2021; Ma et al., 2015).

As abundâncias de *Nitrobacter* e DHB aumentaram da fase 2 para a fase 3 (RBS alimentado com efluente anaeróbio doméstico) com a redução da temperatura de 35°C para temperatura ambiente. Contudo, a remoção de DBO e a taxa  $N-NO_3^-_{produzido}/N-NH_4^+_{consumido}$  diminuíram da fase 2 para a fase 3. Isto pode ter sido ocasionado devido a taxa de crescimento máximo de DHB (6,0) e BON (1,45) e a reduzida taxa de decaimento de BON (0,06) (LAURENI et al., 2015). Além disso, *Nitrobacter* tem vantagens sob redução da temperatura em comparação a

*Nitrospira* (HUANG et al., 2010), o que explica o aumento da abundância de *Nitrobacter* e a diminuição da abundância de *Nitrospira* com a redução de temperatura.

As duas primeiras estratégias de aeração (1 min on/14 min off e 5 min on/14 min off, respectivamente) foram as piores em termos de abundâncias de bactérias anammox ( $2.02E+09$  and  $9.14E+09$  cópias/gSSV, respectivamente). Na fase 7, após a suplementação de biomassa e recuperação da atividade anammox, a abundância de bactérias anammox foi de  $5.40E+10$  cópias/gSSV. A abundância de anammox é similar a valores observados por Ma et al. (2015) em sistema de NP/A em estágio único (de  $1.89E+10$  a  $2.33E+10$  cópias/gSSV) inoculado com biomassa proveniente de reator de NP/A.

A abundância de *Nitrospira* foi maior do que as abundâncias de BOA e *Nitrobacter* em todas as amostras, com exceção do inóculo, em que a abundância de BOA foi maior. Da fase 1 a 4, a abundância de *Nitrospira* diminuiu bem como as abundâncias de anammox e BOA. A maior abundância de *Nitrospira* em comparação a *Nitrobacter* foi observada em diversos sistemas de NP/A com baixo OD e sob aeração intermitente (Carvalho et al., 2021; Miao et al., 2016, 2017). As constantes de meia saturação de oxigênio e de substrato de *Nitrospira* são menores o que de *Nitrobacter* (BLACKBURNE et al., 2007), o que explica a vantagem de *Nitrospira* sob condições de limitação de substrato, como sob aeração intermitente e baixo OD.

#### 6.4 Conclusão

O processo anammox foi aplicado com sucesso para remoção de nitrogênio de efluente anaeróbio doméstico, mesmo com a redução da temperatura de  $35^{\circ}\text{C}$  para temperatura ambiente ( $20\text{-}29^{\circ}\text{C}$ ), a remoção mediana de NT foi de 75%. Para NP/A, a aeração intermitente com curtos períodos de aeração (1 e 5 min) ocasionaram baixa remoção de NT e nitrificação total (aumento da taxa de  $\text{N-NO}_3^-/\text{N-NH}_4^+$ ). A suplementação de pequena porção de biomassa com atividade anammox (5g) foi suficiente para melhorar a eficiência de remoção de nitrogênio. A melhor estratégia de aeração foi de 7 min on/14 min off, com remoções medianas de  $\text{N-NH}_4^+$  e NT de 66 e 59%, respectivamente. A abundância de bactérias anammox durante o estudo permaneceu na ordem de magnitude de  $10^9$  a  $10^{10}$  cópias/gSSV.

## 7 ETAPA 2 – ESTRATÉGIAS DE AERAÇÃO INTERMITENTE PARA NITRIFICAÇÃO PARCIAL/ANAMMOX APLICADA AO TRATAMENTO DE EFLUENTE ANAERÓBIO DOMÉSTICO: DINÂMICA DA EMISSÃO DE GASES DE EFEITO ESTUFA E AVALIAÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA

### 7.1 Introdução

A NP/A é um processo robusto e energeticamente eficiente para a remoção de nitrogênio de águas residuárias (AL-HAZMI et al., 2021). Neste processo, o  $N-NH_4^+$  é parcialmente oxidado a  $N-NO_2^-$  por BOA sob aeração para que, em seguida, a reação anammox ocorra, com conversão destes dois compostos nitrogenados em  $N_2$  (CASTRO-BARROS et al., 2015). Contudo, o potencial de emissão de  $N_2O$ , um dos mais potentes GEE, pode comprometer a sustentabilidade da NP/A (WAN et al., 2021).

A geração de  $N_2O$  pode ocorrer por vias metabólicas de grupos microbianos comumente encontrados em sistemas de NP/A: por BOA (oxidação subsequente de  $N-NH_4^+$  a hidroxilamina ( $NH_2OH$ ) a  $NO$  e em seguida a  $N_2O$ ); por BOA (na redução de  $N-NO_2^-$  a  $N-NH_4^+$  e em seguida, pelo processo descrito anteriormente) e durante a desnitrificação heterotrófica de  $N-NO_2^-$  e  $N-NO_3^-$ , uma vez que um dos compostos intermediários para a geração de  $N_2$  é o  $N_2O$  (STEIN, 2011).

Algumas condições podem potencializar o lançamento de  $N_2O$  em sistemas de NP/A, como limitação da concentração de OD e elevadas concentrações de  $N-NO_2^-$  (AL-HAZMI et al., 2021), dessa forma, sistemas de NP/A de duplo estágio emitem mais  $N_2O$  em comparação a sistemas de estágio único (CONNAN et al., 2018).

Altas remoções de nitrogênio e baixas emissões de  $N_2O$  em sistemas de NP/A dependem de muitos fatores, como a carga de nitrogênio aplicada no sistema, o regime de aeração, pH, temperatura, composição do afluente e configuração da biomassa no sistema (AL-HAZMI et al., 2021). Adequadas estratégias de aeração têm sido observadas como fator crucial para mitigar o lançamento de  $N_2O$  na NP/A (CASTRO-BARROS et al., 2015; AL-HAZMI et al., 2021). Nesse sentido, a aeração intermitente tem sido uma estratégia operacional efetiva para a redução de emissões de  $N_2O$ , possivelmente devido ao efetivo controle de compostos nitrogenados intermediários (BLUM et al., 2018).

Na aeração intermitente, a dinâmica de emissão de  $N_2O$  é distinta nos períodos de aeração e não aeração, e pode ser maior nos períodos de aeração, correspondendo a cerca de 80% das emissões totais (AL-HAZMI et al., 2021). No entanto, o regime de emissão de GEE em diferentes estratégias operacionais de aeração intermitente, bem como o acúmulo nos sistemas de NP/A ainda não está totalmente compreendido. Da mesma forma, a influência da presença de matéria orgânica sob diferentes condições operacionais de aeração pode aumentar a eficiência de remoção de nitrogênio e reduzir a produção de  $N_2O$  (WAN et al., 2021). No entanto, mais investigações sobre este processo são necessárias.

O tratamento anaeróbico de efluentes pode emitir mais gases de efeito estufa ( $CH_4$ ) em comparação ao tratamento aeróbico, a não ser que haja processo para recuperação de  $CH_4$  dissolvido no efluente (CAKIR; STENSTROM, 2005). Esta é, portanto, um dos desafios da aplicação de efluentes anaeróbios em reatores de NP/A, uma vez que a matéria orgânica biodegradável (DBO) e o metano dissolvido podem estimular a atividade de DHB (CAO et al., 2017). Por outro lado, o processo N-damo, que pode ser observado em reatores de NP/A, pode oxidar o  $CH_4$  simultaneamente à redução de  $N-NO_3^-$  a  $N-NO_2^-$  (COGERT et al., 2019), reduzindo, portanto, a emissão de GEE.

Dessa forma, esta etapa teve o objetivo de investigar a dinâmica de GEE ( $CH_4$  e  $N_2O$ ) em sistema de NP/A sob diferentes estratégias de aeração intermitente, para remoção de nitrogênio de efluente anaeróbico doméstico em RBS sob temperatura ambiente, bem como investigar a dinâmica da comunidade microbiana ao longo das etapas operacionais.

## 7.2 Materiais e métodos

### 7.2.1 Configurações do reator

O reator utilizado nesta pesquisa foi um reator em bateladas sequenciais (RBS) com volume útil de 2-2,3L. A agitação no RBS foi controlada sob 50 rpm. O sistema dispunha de sondas de oxigênio dissolvido, pH e temperatura. Para promover a NP/A, foram adotadas diferentes estratégias de aeração intermitente.

O RBS foi inoculado com lodos ativados (12L) proveniente da linha de recirculação da ETE Arrudas, operada pela COPASA (Belo Horizonte, MG). O lodo foi centrifugado a 12.000 rpm por 20 min antes de ser adicionado no reator. A concentração de sólidos do lodo centrifugado por de 67,5 gSSV/L.

### 7.2.2 Estratégias operacionais

Para o aumento da concentração e da atividade de biomassa anammox, nos primeiros 300 dias (fase 1), o reator foi alimentado com meio de cultura autotrófico. Após este período, o RBS foi alimentado com efluente anaeróbio doméstico proveniente de reator UASB suplementado com nitrito em proporção de  $\text{NH}_4^+:\text{NO}_2^-$  de 1:1,50, com temperatura a 35°C e temperatura ambiente (fases 2 a 3, respectivamente). O intuito destas etapas foi promover a aclimatação da biomassa com efluente anaeróbio doméstico.

Nas fases 4 e 5, o RBS foi alimentado com efluente anaeróbio doméstico sem nitrito, mas com aeração intermitente para desenvolvimento da NP/A. Após estas fases, uma fase de recuperação foi realizada, com suplementação de biomassa com atividade anammox (5g de biomassa centrifugada) e alimentação com efluente anaeróbio e nitrito. Finalmente, a fase 7 foi a última fase de aeração intermitente e alimentação com efluente anaeróbio. Os detalhes das fases são descritos em detalhes na Tabela 7-1.

### 7.2.3 Efluente anaeróbio doméstico

O afluente do RBS nas fases 2, 3, 4, 5, 6.2 e 7 consistiu em efluente anaeróbio doméstico proveniente de reator UASB em escala de demonstração (14 m<sup>3</sup>) operado com TDH de 6-16h, localizado em Belo Horizonte, MG (latitude 19°53'04" S e longitude 43°52'04" W) no CePTS. O efluente foi armazenado em bombonas de 20L sob 6°C durante 4-5 semanas.

As principais características (medianas, em mg/L) do efluente anaeróbio doméstico utilizado para alimentação do RBS2L são: NTK de 43,0; N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> de 38,1; N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> de 0,24; N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> de 0,58; DQO de 91,3; DOB de 42,4 e AT de 218,9.

### 7.2.4 Amostragem e análises físico-químicas da fase líquida e gasosa

Neste estudo, foram realizadas de uma a duas coletas no início e no final das fases com aeração intermitente. As amostras foram coletadas por cerca de 8 h, a partir do início do ciclo operacional (imediatamente após o final da alimentação do RBS). Amostras da fase líquida para análise de NTK, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e DQO foram realizadas no afluente e efluente do ciclo operacional e analisadas de acordo com (APHA, 2017).

As amostras de biogás foram divididas em i) períodos com aeração (no mínimo, 10 amostras) e ii) períodos sem aeração (o número de amostras dependeu da vazão de biogás. Foram calculadas a taxa (%) e o fluxo (mg/h.m<sup>2</sup>) de N<sub>2</sub>O e CH<sub>4</sub> de acordo com Ribeiro et al. (2021).

A emissão de N<sub>2</sub>O e CH<sub>4</sub> foi calculada somando os valores obtidos nos períodos com e sem aeração.

Tabela 7-1- Descrição das estratégias operacionais adotadas na operação do RBS2L

Fases	Duração (dias)	Alimentação	TDH	Aeração (on/off)	Temperatura (°C)
1	300	Meio de cultura autotrófico	24h-14 dias	off	35
2	61	Efluente anaeróbio e nitrito	24-32h	off	35
3	64	Efluente anaeróbio e nitrito	16-32h	off	Ambiente
<b>4</b>	<b>50</b>	<b>Efluente anaeróbio sob aeração</b>	<b>16h</b>	<b>1/14</b>	<b>Ambiente</b>
<b>5</b>	<b>74</b>	<b>Efluente anaeróbio sob aeração</b>	<b>16h</b>	<b>5/14</b>	<b>Ambiente</b>
6.1	15	Meio de cultura autotrófico	32h	off	Ambiente
6.2	79	Efluente anaeróbio e nitrito	15-32h	off	Ambiente
<b>7</b>	<b>46</b>	<b>Efluente anaeróbio sob aeração</b>	<b>31h</b>	<b>7/14</b>	<b>Ambiente</b>

Em negrito, fases com aeração intermitente com amostragem da fase líquida e gasosa.

### 7.2.5 Avaliação da diversidade microbiana

Foi realizada coleta de biomassa do reator ao final de cada fase operacional (de 1 a 7). Para a extração do DNA, cerca de 25mL de biomassa foi centrifugada a 8.000 rpm por 20 minutos e lavada com solução padrão de fosfato. A extração de DNA foi feita utilizando o kit Fast DNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, USA), de acordo com o procedimento do fabricante. A composição da comunidade microbiana foi realizada através de sequenciamento genético de nova geração (NGS) utilizando a plataforma Illumina MiSeq (realizada por NGS Soluções Genômicas, São Paulo, Brasil). Para o NGS foram utilizados os primers 515F e 806R da região V4 do gene rRNA 16s para os domínios Bacteria e Archaea (média de cobertura de 40.000 paired-end reads por amostra).

Para tratamento dos dados, as sequências brutas foram analisadas utilizando o software QUIIME<sup>TM</sup> 2.0. Sequências duplicadas, barcodes e sequências com tamanho inferior a 150 bp foram removidas. Quimeras e ruídos também foram removidos. Após o filtro de qualidade, as sequências remanescentes foram clusterizadas em Amplicon Sequence Variant (ASV) com nível de similaridade de 97%. As sequências representativas classificadas utilizando a

plataforma BLASTn foram atribuídas taxonomicamente utilizando os bancos de dados RDP II (<http://rdp.cme.msu.edu>) e NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

### 7.3 Resultados

#### 7.3.1 Fase 4 (1 min on/14 min off)

Na fase 4 foi adotada estratégia de aeração intermitente (1 min on/14 min off) para desenvolvimento da NP/A com vazão de ar aplicada de  $0,15 \text{ L/min.L}_{\text{reator}}$ . Como consequência destas condições operacionais, com curto tempo de aeração (1 min) e alta taxa de ar aplicada, a carga de nitrogênio removida foi reduzida (Tabela 7-2). Detalhes da fase 4 foram descritos no Capítulo 6.

Para avaliação da dinâmica de  $\text{N}_2\text{O}$  e  $\text{CH}_4$ , foram realizados monitoramentos no início e no final desta fase (Figura 7-1). Foi observada redução gradual na emissão de  $\text{CH}_4$  (3.400 a 0  $\text{mg/m}^2\cdot\text{h}$ ) ao longo do ciclo operacional e taxas de emissão de  $\text{N}_2\text{O}$  com valores muito menores (0,25 a 1,6  $\text{mg/m}^2\cdot\text{h}$ ) em relação ao  $\text{CH}_4$ . No entanto, houve pico da emissão de  $\text{N}_2\text{O}$  no início e no final do monitoramento. Os picos de  $\text{N}_2\text{O}$  no início do ciclo operacional pode ser reflexo do acúmulo de  $\text{N}_2\text{O}$  do ciclo anterior, pois não é esperado que haja  $\text{N}_2\text{O}$  no efluente anaeróbio doméstico de reator UASB, já que os compostos nitrogenados neste sistema não sofrem nitrificação pela escassez de oxigênio.

Foi observada variabilidade nos picos de emissão de metano do início dos monitoramentos (Figura 7-1), provavelmente ocasionado pela perda de metano dissolvido devido ao armazenamento do efluente anaeróbio utilizado para alimentar o reator e/ou pela mudança das características do efluente gerado no UASB (esperado em sistemas reais). Apesar das maiores taxas de emissão de metano, elas se concentraram no início do ciclo operacional, chegando a valores nulos ao longo do ciclo.

Na fase 4, as emissões de  $\text{N}_2\text{O}$  e  $\text{CH}_4$  durante a aeração foram maiores em comparação aos períodos sem aeração (Tabela 7-2). Provavelmente nas fases com aeração houve emissão do biogás acumulado no reator durante os períodos sem aeração. As taxas de emissão de  $\text{CH}_4$  foram maiores em relação a  $\text{N}_2\text{O}$ , o que pode ter relação com a carga removida de DQO, que foi superior a carga de nitrogênio removida nesta fase. As taxas de emissão por carga afluente foram de 0,010 e 1,167% para  $\text{N}_2\text{O}$  e  $\text{CH}_4$ , respectivamente, e as taxas de emissão por carga removida foram de 0,032 e 1,406% para  $\text{N}_2\text{O}$  e  $\text{CH}_4$ , respectivamente (Tabela 7-2).

Figura 7-1 – Dinâmica do fluxo de  $N_2O$  e  $CH_4$  durante os períodos com aeração no início (A) e final (B) e (C) da fase 4 (1min on/14min off)

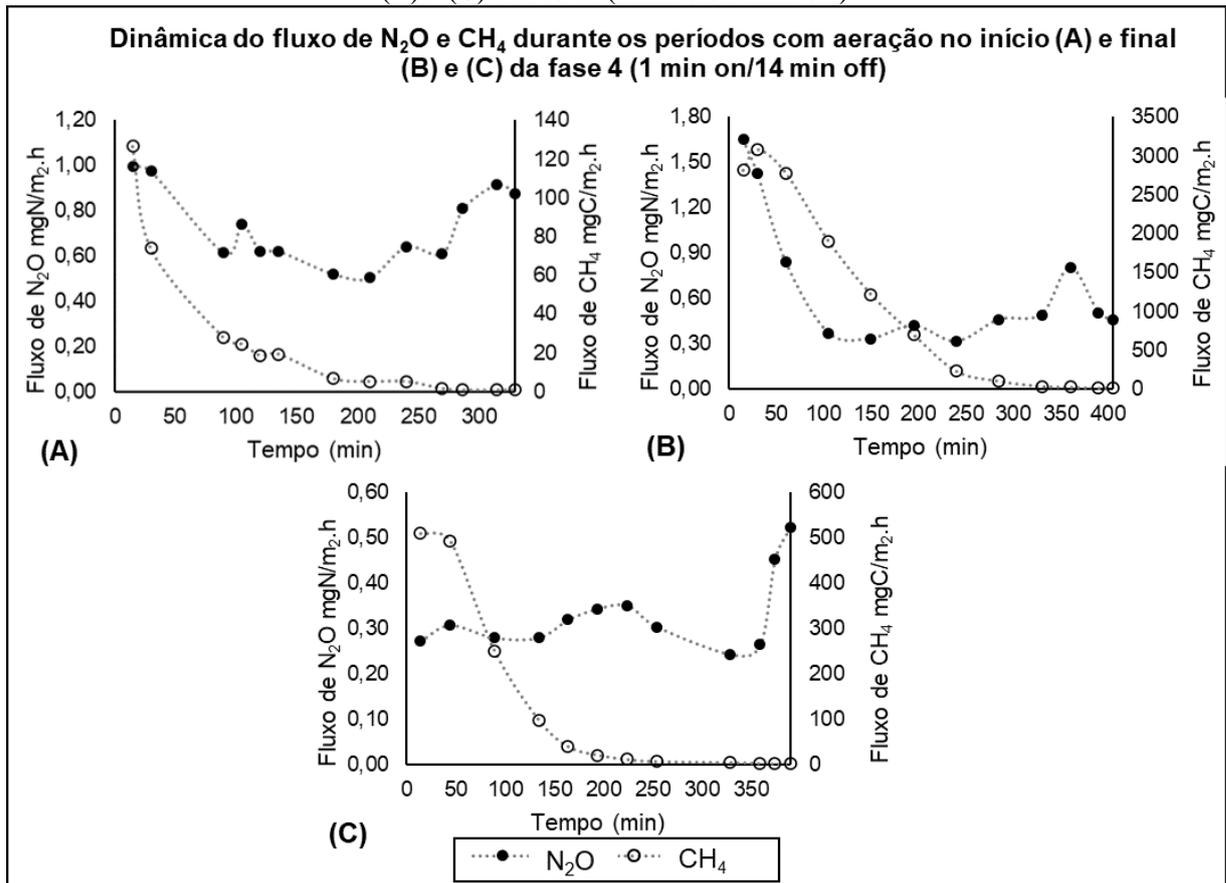


Tabela 7-2 – Resumo da dinâmica de emissão de  $N_2O$  e  $CH_4$  na fase 4 (1 min on/14 min off) com valores medianos de emissões e de cargas aplicadas de NT e DQO

<b>Valores medianos de emissão de <math>N_2O</math> e <math>CH_4</math> na Fase 4</b>		
	<b><math>N_2O</math></b>	<b><math>CH_4</math></b>
Com aeração (mg/ciclo)	0,007	1,363
Sem aeração (mg/ciclo)	0,000	0,001
Total emitido (mg/ciclo)	0,007	1,368
Taxa de emissão/carga afluente (%)	0,010	1,167
Taxa de emissão/carga removida (%)	0,032	1,406
	<b>NT</b>	<b>DQO</b>
Carga aplicada (mg/ciclo)	65,2	117,0
Carga removida (mg/ciclo)	17,0	97,1

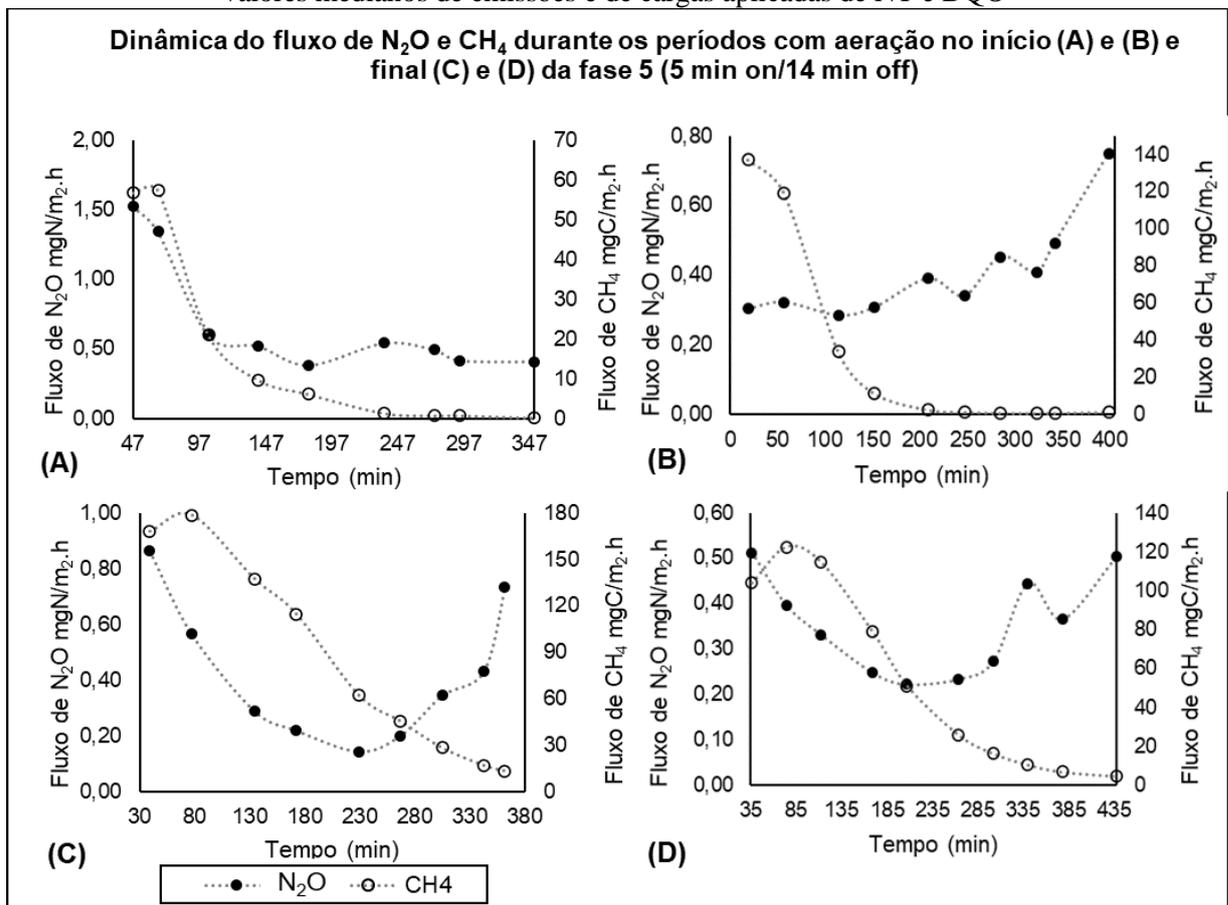
### 7.3.2 Fase 5 (5 min on/14 min off)

A estratégia de aeração adotada na fase 5 consistiu em intermitência na aeração (5 min on/14 min off) com vazões de ar aplicadas de 0,120 e 0,025 L/min.L<sub>reator</sub> no início e no final do ciclo,

respectivamente. Apesar do aumento do período com aeração e da redução de vazão de ar aplicada em relação à fase anterior (fase 4), a carga de nitrogênio removida também foi reduzida (Tabela 7-3).

Foi observado que as tendências da fase 4 anterior se mantiveram nesta fase, mesmo com diferentes condições operacionais. A redução gradual na emissão de CH<sub>4</sub> ao longo do ciclo operacional, fluxos de emissão de N<sub>2</sub>O inferiores aos fluxos de emissão de CH<sub>4</sub> e os picos de emissão de N<sub>2</sub>O no início e no final do monitoramento também foram observados na fase 5 (Figura 7-2).

Figura 7-2 - Resumo da dinâmica de emissão de N<sub>2</sub>O e CH<sub>4</sub> na fase 5 (5 min on/14 min off) com valores medianos de emissões e de cargas aplicadas de NT e DQO



A emissão de N<sub>2</sub>O e CH<sub>4</sub> durante os períodos com aeração continuou maior em relação aos períodos sem aeração. Na fase 5, a emissão total de N<sub>2</sub>O e CH<sub>4</sub> (0,004 e 0,452 mg/ciclo, respectivamente), as taxas de emissão de N<sub>2</sub>O e CH<sub>4</sub> por cargas de NT e DQO aplicadas (0,006 e 0,377 %, respectivamente) e as taxas de emissão de N<sub>2</sub>O e CH<sub>4</sub> por cargas de NT e DQO removidas (0,016 e 0,920 %, respectivamente) (Tabela 7-3) foram menores em relação aos valores obtidos na fase 4.

A redução destes valores na fase 5 pode ter sido obtida em virtude da mudança de estratégia operacional, principalmente pela redução das vazões de ar aplicadas, que pode favorecer o acúmulo de biogás no reator, impedindo que sejam emitidos. O aumento da carga removida de NT (26,6 mg/ciclo) em relação à fase 4 (17,0 mg/ciclo) pode ter contribuído para a redução das emissões de N<sub>2</sub>O. No entanto, em relação às emissões reduzidas de CH<sub>4</sub> na fase 5, a carga removida de DQO nesta fase durante o monitoramento de biogás (25,20 mg/ciclo) foi menor em relação à fase 4 (97,1 mg/ciclo).

Tabela 7-3 - Resumo da dinâmica de emissão de N<sub>2</sub>O e CH<sub>4</sub> na fase 5 (5 min on/14 min off) com valores medianos de emissões e de cargas aplicadas de NT e DQO

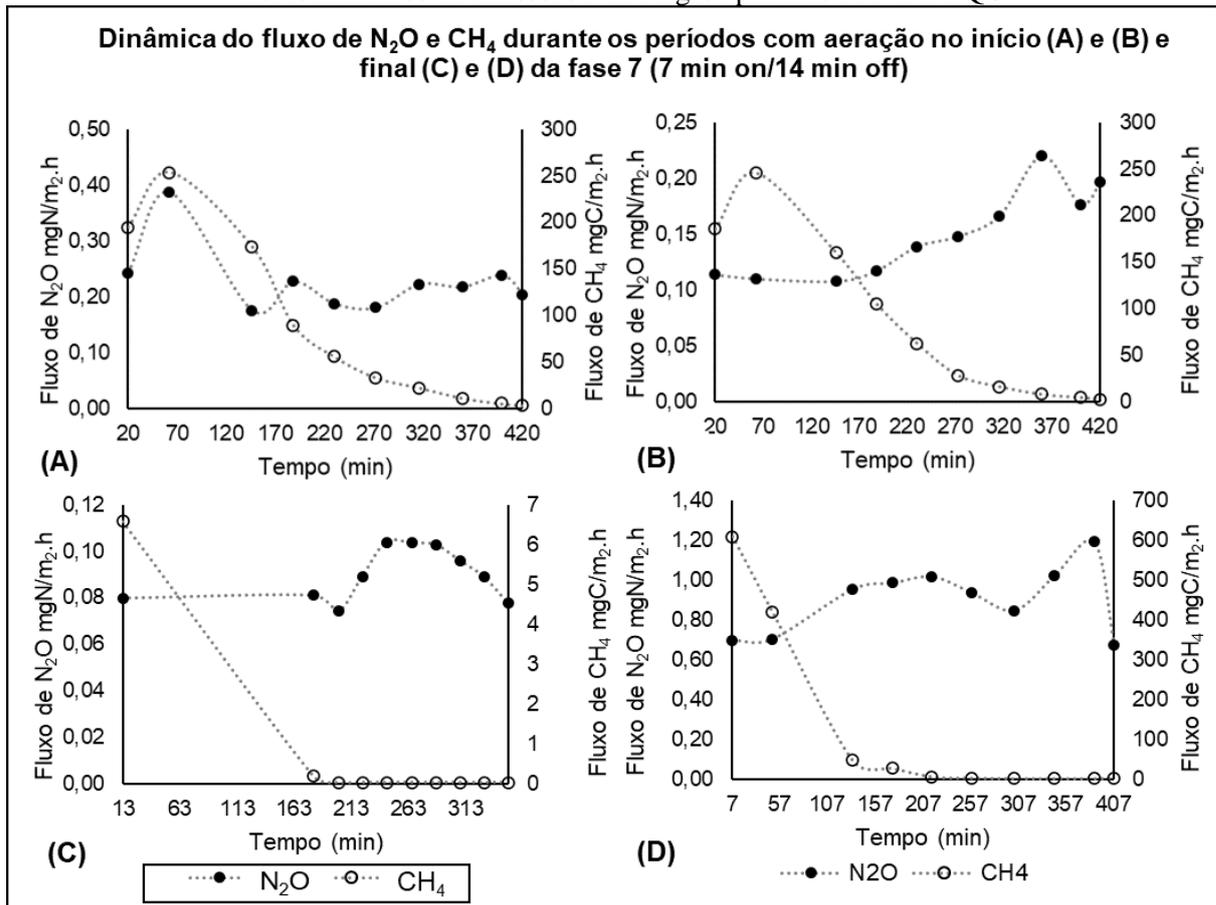
<b>Valores medianos de emissão de N<sub>2</sub>O e CH<sub>4</sub> na Fase 5</b>		
	<b>N<sub>2</sub>O</b>	<b>CH<sub>4</sub></b>
Com aeração (mg/ciclo)	0,004	0,451
Sem aeração (mg/ciclo)	0,000	0,000
Total emitido (mg/ciclo)	0,004	0,452
Taxa de emissão/carga afluente (%)	0,006	0,377
Taxa de emissão/carga removida (%)	0,016	0,920
	<b>NT</b>	<b>DQO</b>
Carga aplicada (mg/ciclo)	75,450	128,950
Carga removida (mg/ciclo)	26,580	25,200

### 7.3.3 Fase 7 (7 min on/14 min off)

Na fase 7 foi adotada a maior duração do tempo de aeração (7 min on/14 min off) com variação nas vazões de ar aplicadas (0,022 L/min.L<sub>reator</sub> no início do ciclo e 0,29 L/min.L<sub>reator</sub> no final do ciclo). Nesta fase foram obtidos os melhores resultados em relação à carga de nitrogênio removida (55,9 mg/ciclo) (Tabela 7-4) em relação às fases anteriores de aeração intermitente para desenvolvimento de NP/A.

Apesar da mudança de condição operacional e do melhor desempenho em relação à remoção de NT, as tendências observadas nas fases 4 e 5 anteriores foram observadas nesta fase (redução gradual na emissão de CH<sub>4</sub> ao longo do ciclo operacional, fluxos de emissão de N<sub>2</sub>O inferiores aos fluxos de emissão de CH<sub>4</sub> e os picos de emissão de N<sub>2</sub>O no início e no final do monitoramento também foram observados na fase 5 - Figura 7-3).

Figura 7-3 - Resumo da dinâmica de emissão de  $N_2O$  e  $CH_4$  na fase 7 (7 min on/14 min off) com valores medianos de emissões e de cargas aplicadas de NT e DQO



Na fase 7, as emissões de  $N_2O$  e  $CH_4$  durante os períodos com aeração (0,002 e 1,133 mg/ciclo, respectivamente) foi maior em relação aos períodos sem aeração (0,000 e 0,001 mg/ciclo, respectivamente), assim como foi observado nas fases anteriores. A emissão total de  $N_2O$  e  $CH_4$  (0,002 e 1,136 mg/ciclo, respectivamente), as taxas de emissão de  $N_2O$  e  $CH_4$  por cargas de NT e DQO aplicadas (0,005 e 0,510 %, respectivamente) e as taxas de emissão de  $N_2O$  e  $CH_4$  por cargas de NT e DQO removidas (0,007 e 24,8 %, respectivamente) foram menores para  $N_2O$  e maiores para  $CH_4$  em relação às fases anteriores (Tabela 7-4).

Na fase 7, observou-se a maior carga de NT removida (mediana de 55,9 mg/ciclo, Tabela 7-4) e o melhor desempenho da NP/A (conforme discutido no Capítulo 6). Além disso, houve redução de carga de DQO removida, com valores negativos devido ao incremento de DQO no efluente em relação ao afluente (-33,8, Tabela 7-4). A remoção de NT e incremento de DQO pode ter afetado a dinâmica da emissão de  $N_2O$  e  $CH_4$  na fase 7.

A maior produção de  $N_2O$  durante os períodos aerados nas fases 4 (1 min on/14 min off, 5 (5 min on/14 min off e 7 (7 min on/14 min off) está de acordo com os resultados observados por

Al-Hamzi et al. (2021). Os autores atribuíram este comportamento a dois fatores: a liberação de biogás facilitada durante os períodos de aeração e o consumo de  $N_2O$  pela comunidade de BDH durante longas fases sem aeração em relação às fases com aeração. A desnitrificação incompleta gera  $N_2O$  e, se houver aeração durante este processo, há emissão deste gás (RASSAMEE et al., 2011).

Tabela 7-4 - Resumo da dinâmica de emissão de  $N_2O$  e  $CH_4$  na fase 7 (7 min on/14 min off) com valores medianos de emissões e de cargas aplicadas de NT e DQO

<b>Valores medianos de emissão de <math>N_2O</math> e <math>CH_4</math> na Fase 7</b>		
	<b><math>N_2O</math></b>	<b><math>CH_4</math></b>
Com aeração (mg/ciclo)	0,002	1,133
Sem aeração (mg/ciclo)	0,000	0,001
Total emitido (mg/ciclo)	0,002	1,136
Taxa de emissão/carga afluente (%)	0,005	0,510
Taxa de emissão/carga removida (%)	0,007	24,837
	<b>NT</b>	<b>DQO</b>
Carga aplicada (mg/ciclo)	72,000	237,600
Carga removida (mg/ciclo)	55,900	-33,800

A aeração intermitente em sistemas de NP/A auxilia na mitigação de emissão de  $N_2O$  em comparação à aeração contínua, uma vez que evita o acúmulo de  $NO_2^-$  (MA et al., 2022). Os autores verificaram taxas de emissão de  $N_2O$  correspondendo a 0,37 e 2,35% da carga afluente de NT com aeração intermitente (6 min on/ 6 min off) e contínua, respectivamente.

Rassamme et al. (2011) observaram resultados de emissão de  $N_2O$  similares ao adotar aeração intermitente de 30 min on/60 min off (0,39% em relação à carga de NT afluente). Os autores destacam que longos períodos sem aeração (60 min) contribuem para a desnitrificação heterotrófica parcial e, conseqüentemente, maior produção de  $N_2O$ . Altas concentrações de  $NO_2^-$  em reatores favorecem a emissão de  $N_2O$  ((PEREIRA et al., 2019b), enquanto o adequado controle da aeração minimiza esta emissão (CASTRO-BARROS et al., 2015).

No presente estudo, as taxas de emissão de  $N_2O$  foram menores (0,005-0,010 %), o que significa que o tempo sem aeração de 14 min pode ter contribuído para a redução de emissão de  $N_2O$  por controlar os níveis de  $NO_2^-$  no sistema e a desnitrificação parcial. Resultados similares foram obtidos por Ribeiro et al. (2021) em sistema de filtro biológico com aeração natural (0,005 %) como pós-tratamento de efluente doméstico proveniente de reator UASB.

A tendência de aumento gradual no fluxo de emissão de N<sub>2</sub>O durante os períodos com aeração também foi verificado por Blum et al. (2018) em RBS com aeração intermitente para desenvolvimento da NP/A. Os autores observaram taxa emissão de N<sub>2</sub>O por NT consumido de  $1,1 \pm 0,5\%$ , enquanto no presente estudo, essa taxa foi de 0,036 a 0,007 %. Altas concentrações de OD ( $1,5 \pm 0,2$  mg/L e acúmulo de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (6 mg/L) podem contribuir para o aumento da emissão de N<sub>2</sub>O.

Blum et al. (2018) observaram correlação positiva entre o aumento da remoção de nitrogênio total e o aumento das taxas de emissão de N<sub>2</sub>O. Entretanto, no presente estudo foi observado o contrário: nas fases 4, 5 e 7 com cargas medianas de NT removido de 17, 27 e 56 mg/ciclo, respectivamente, as taxas medianas de emissão de N<sub>2</sub>O por carga de NT removida foram de 0,036, 0,016 e 0,007 (%), respectivamente. Ainda de acordo com os autores, baixas concentrações de OD diminuem a emissão de N<sub>2</sub>O. No presente estudo, embora a remoção de NT tenha sido crescente ao longo das fases de operação com tempo de aeração prolongado (1, 5 e 7 min), a vazão de ar aplicada foi gradualmente reduzida, o que pode ter relação com a redução de emissão de N<sub>2</sub>O.

Embora a emissão de CH<sub>4</sub> tenha se concentrado nos primeiros minutos no ciclo de operação do RBS2L até atingir valores nulos constantes em todas as fases operacionais, as taxas de emissão por carga afluyente de DQO observadas (1,167 a 0,377 %) foram superiores às taxas observadas por Ribeiro et al. (2021) em sistema de lodos ativados (0,054%) e em filtro biológico como pós-tratamento de reator UASB (0,015%).

#### 7.3.4 Comunidade microbiana (NGS)

A comunidade microbiana foi investigada no inóculo, nas fases operacionais de 1 a 7 e da biomassa suplementada no sistema (B.S.) e os microorganismos do ciclo do nitrogênio (bactérias anammox, BOA e AOA, BON e BDH) e bactérias metanotróficas com abundância relativa igual ou superior a 1% em pelo menos uma das amostras foram selecionados (Tabela 7-5).

As bactérias anammox do RBS percentem aos gêneros *Ca. Jettenia* e *Ca. Brocadia*. A partir da fase 2, houve aumento expressivo de bactérias anammox, com dominância do gênero *Ca. Jettenia* até a fase 4 e dominância do gênero *Ca. Brocadia* a partir da fase 5 e na biomassa suplementada. A substituição do gênero *Ca. Jettenia* por *Ca. Brocadia* em sistemas de NP/A em estágio único com aeração intermitente foi observada em estudos anteriores (GONÇALVES

PITEIRA CARVALHO et al., 2021). No presente estudo, as abundâncias relativas de bactérias anammox foram elevadas, com valores de até 54%.

De maneira geral, a abundância de bactérias anammox nas fases com alimentação com efluente anaeróbio doméstico e nitrito (de 42, 43 e 46 %f nas fases 2, 3 e 6, respectivamente) foi maior em comparação às fases com aeração intermitente (de 54, 14 e 26%, nas fases 4, 5 e 7, respectivamente), o que é esperado devido ao aumento da competição por substratos sob aeração. Uma exceção deste comportamento foi identificada na fase 4, que obteve os menores valores de eficiência de remoção de nitrogênio (Capítulo 6) e a maior abundância de bactérias anammox. Este resultado pode ser explicado pelo estresse que os microorganismos do ciclo do nitrogênio foram submetidos nesta fase (pouca amonificação) e consequente redução de AOA, BON e BDH, que cineticamente apresentam índices de decaimento maior em comparação à bactérias anammox (LAURENI et al., 2015).

A abundância de BOA/AOA foi menor em comparação a de bactérias anammox em todas as amostras a partir da fase 3. No entanto, cinco gêneros foram identificados com abundância maior que 1%, incluindo arqueas da família Nitrososphaeraceae nas fases 6 e 7. Na fase 7, a abundância de AOA (3,3 %) superou a abundância da soma da abundância de BOA (3,1). Esse resultado sugere que algumas condições operacionais adotadas no presente trabalho são favoráveis para AOA, como aeração e OD reduzidos e longo TDH (YANG et al., 2021).

O gênero *Nitrospira* foi dominante no grupo de BON, com expressiva abundância na biomassa suplementada e também na fase 7, onde se obteve os melhores resultados de NP/A e, em consequência, de remoção de nitrogênio. O gênero *Nitrospira* é conhecido por ser adaptável às condições variadas de carga nitrogenada aplicada, OD e temperatura, além de incluir espécies capazes de oxidar  $\text{NH}_4^+$  em  $\text{NO}_3^-$  (comammox) (LATOCHESKI et al., 2022).

O grupo de BDH foi o mais abundante, com 28 gêneros de bactérias. As altas abundâncias relativas de BDH desde o inóculo (46,7 %) e na biomassa suplementada (28,6 %) juntamente com a alimentação com efluente anaeróbio doméstico, que contém, além de nitrogênio, matéria orgânica remanescente favorece a permanência destes microrganismos no sistema.

Além de microrganismos do ciclo do nitrogênio, também foram identificadas bactérias metanotróficas (KOLB et al., 2003) do gênero *Methylosarcina*, com abundâncias de até 2,1% na fase 7. A presença destes microrganismos pode estar associada à gradual redução na emissão de  $\text{CH}_4$  ao longo das primeiras horas dos ciclos operacionais, observada no item 7.3.3.

Tabela 7-5 - Microorganismos do ciclo do nitrogênio e de bactérias metanotrófica com abundância relativa igual ou superior a 1% em pelo menos uma das amostras.

Domínio	Família	Gênero	Inóculo	Fase 1	Fase 2	Fase 3	Fase 4	Fase 5	B.S.	Fase 6	Fase 7
<b>Anammox</b>											
Bacteria	Brocadiaaceae	<i>Ca. Jettenia</i>	0,0	0,0	31,1	37,2	50,8	0,0	0,0	0,9	0,5
Bacteria	Brocadiaaceae	<i>Ca. Brocadia</i>	0,0	0,0	11,3	5,5	2,9	13,6	20,7	45,2	25,6
<b>Total</b>			<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>42,4</b>	<b>42,6</b>	<b>53,6</b>	<b>13,6</b>	<b>20,7</b>	<b>46,2</b>	<b>26,1</b>
<b>BOA/AOA</b>											
Archaea	Nitrososphaeraceae	#N/D	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	2,2	3,3
Bacteria	Nitrosomonadaceae	<i>Ellin6067</i>	0,0	0,0	2,1	1,2	0,2	0,0	0,0	1,2	0,6
Bacteria	Nitrosomonadaceae	<i>Nitrosospira</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,4	0,0	0,0
Bacteria	Nitrosomonadaceae	<i>Nitrosomonas</i>	0,0	0,0	0,0	0,2	0,2	1,3	1,4	0,3	1,2
Bacteria	Pirellulaceae	#N/D	0,0	0,0	0,3	0,4	0,1	0,0	1,0	1,4	1,6
<b>Total</b>			<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>2,4</b>	<b>1,8</b>	<b>0,5</b>	<b>1,3</b>	<b>4,8</b>	<b>5,1</b>	<b>6,7</b>
<b>BON</b>											
Bacteria	Nitrospiraceae	<i>Nitrospira</i>	0,0	0,0	1,7	1,0	0,7	0,0	3,7	2,4	5,4
<b>Total</b>			<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>1,7</b>	<b>1,0</b>	<b>0,7</b>	<b>0,0</b>	<b>3,7</b>	<b>2,4</b>	<b>5,4</b>
<b>BDH</b>											
Bacteria	Chitinophagaceae	<i>Ferruginibacter</i>	2,1	1,7	0,0	0,0	0,0	0,2	1,4	0,5	0,6
Bacteria	Chitinophagaceae	<i>Terrimonas</i>	8,3	7,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0
Bacteria	Saprosiraceae	<i>OLB8</i>	5,3	6,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Bacteria	Saprosiraceae	#N/D	3,3	5,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9	1,3
Bacteria	Verrucomicrobiaceae	<i>Prostheco bacter</i>	1,4	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
Bacteria	Gaiellaceae	<i>Gaiella</i>	0,0	0,0	0,5	0,1	0,1	0,0	2,3	0,9	1,5
Bacteria	Intrasporangiaceae	<i>Tetrasphaera</i>	1,5	1,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Bacteria	Ignavibacteriaceae	<i>Ignavibacterium</i>	0,0	0,0	0,8	0,9	0,2	0,7	3,0	0,7	1,1
Bacteria	Sphingomonadaceae	<i>Novosphingobium</i>	1,3	3,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2
Bacteria	Beijerinckiaceae	#N/D	1,9	1,7	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1
Bacteria	Rhodobacteraceae	#N/D	1,2	0,9	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,5	0,2
Bacteria	Rhodobacteraceae	<i>Rhodobacter</i>	1,1	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Bacteria	Bdellovibrionaceae	<i>Bdellovibrio</i>	1,1	0,4	0,0	0,0	0,0	0,2	0,2	0,0	0,0
Bacteria	Haliangiaceae	<i>Haliangium</i>	0,6	0,1	1,2	0,3	0,0	0,0	0,2	0,0	0,2
Bacteria	Blastocatellaceae	<i>OLB17</i>	0,0	0,0	0,3	0,0	0,2	0,7	1,1	0,6	0,6
Bacteria	Blastocatellaceae	<i>JGI 0001001-H03</i>	1,3	1,0	0,0	0,0	0,0	6,0	1,9	0,6	0,4
Bacteria	Rhodanobacteraceae	<i>Dokdonella</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,6	1,9	0,0	0,2
Bacteria	Xanthomonadaceae	<i>Thermomonas</i>	1,2	0,9	0,0	0,0	0,0	1,8	0,2	0,0	0,0
Bacteria	Burkholderiaceae	<i>Limnobacter</i>	0,2	0,2	3,9	6,3	6,0	0,9	1,3	8,1	5,6
Bacteria	Rhodocyclaceae	<i>Denitratisoma</i>	0,0	0,0	4,1	4,6	1,7	12,9	6,3	3,2	1,6
Bacteria	Comamonadaceae	#N/D	5,4	6,8	0,2	0,9	0,3	4,1	3,8	2,9	2,1
Bacteria	Comamonadaceae	<i>Ottowia</i>	7,3	5,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Bacteria	Comamonadaceae	<i>Simplicispira</i>	1,4	1,7	0,0	0,0	0,0	4,7	0,2	0,0	0,0
Bacteria	Hydrogenophilaceae	<i>Thiobacillus</i>	0,0	0,0	0,0	2,2	1,9	0,0	0,0	0,8	0,1
Bacteria	Steroidobacteraceae	<i>Steroidobacter</i>	0,0	0,0	0,0	1,1	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0
Bacteria	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	0,0	0,0	0,4	0,2	0,2	0,2	1,5	0,9	0,9
Bacteria	Gemmatimonadaceae	#N/D	0,0	0,5	1,6	1,7	0,9	0,1	1,3	0,4	0,8
Bacteria	Anaerolineaceae	#N/D	0,9	1,0	4,4	8,1	9,6	0,5	1,3	3,9	5,0
<b>Total</b>			<b>46,7</b>	<b>47,0</b>	<b>17,5</b>	<b>26,7</b>	<b>22,0</b>	<b>36,6</b>	<b>28,6</b>	<b>24,8</b>	<b>22,7</b>
<b>Bactérias metanotróficas</b>											
Bacteria	Methylomonadaceae	<i>Methylosarcina</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,2	2,1
<b>Total</b>			<b>0,0</b>	<b>1,2</b>	<b>2,1</b>						

B.S.: Biomassa suplementada

O gênero *Denitratisoma* apresentou o aumento mais expressivo durante as fases com aeração intermitente (1,7, 12,9 e 1,6 % nas fases 4, 5 e 7, respectivamente). Este gênero está relacionado à produção de N<sub>2</sub>O (GE et al., 2018). Por outro lado, foram identificados gêneros como *Ignavibacterium*, relacionados ao consumo de N<sub>2</sub>O, transformando este composto em N<sub>2</sub> (SUN

et al., 2023). A baixa emissão de  $N_2O$  também por estar relacionada à presença de BDH das classes Alphaproteobacteria e Deltaproteobacteria, conhecidas pela capacidade de consumir  $N_2O$  (DING et al., 2019).

#### 7.4 Conclusões

Apesar das diferentes estratégias operacionais estabelecidas (1min on/14 min off, 5 min on/14 min off e 7 min on/14 min off), resultando em desempenhos diferentes quanto à remoção de NT e DQO, a dinâmica de emissão de  $N_2O$  e  $CH_4$  apresentou similaridades. De maneira geral, houve maior emissão de  $CH_4$  do que de  $N_2O$ . Nos períodos com aeração, a emissão de  $CH_4$  foi decrescente até ser nula, enquanto a emissão de  $N_2O$  apresentou picos no início e no final das amostragens. A medida em que os tempos aerados foram aumentados (1 a 7 min da fase 5 a 7), a emissão (%) de  $N_2O$  diminuiu e a de  $CH_4$  aumentou. O grupo mais abundante, em termos de número de gêneros, na comunidade microbiana foram as BDH, com 28 gêneros. O gênero de metanotróficas *Methylosarcina* também foi identificado, com abundância de 0,0 a 2,1%.

## **8 ETAPA 3 - INVESTIGAÇÃO DE PARTIDA DE REATORES DE LEITO IMOBILIZADO EM ESPUMA COM EFLUENTE ANAERÓBIO DOMÉSTICO REAL SOB AERAÇÃO INTERMITENTE PARA NITRIFICAÇÃO PARCIAL/ANAMMOX**

### 8.1 Introdução

O tratamento anaeróbico de águas residuárias tem sido aplicado amplamente em regiões tropicais e subtropicais, devido às vantagens em termos de redução de custos operacionais, menor demanda de área e ao potencial de recuperação energética (CHERNICHARO et al., 2015; SILVA et al., 2018). No entanto, a remoção de nitrogênio é desprezível neste processo, sendo necessário processo de pós-tratamento para remoção deste composto (COSTA et al., 2022). No Brasil, reatores UASB são a terceira tecnologia mais empregada para o tratamento de efluentes domésticos (CHERNICHARO et al., 2015), e pós-tratamentos para remoção de nitrogênio incluem o processo tradicional de nitrificação e desnitrificação heterotrófica, que é excessivamente energético (SILVA et al., 2018). Assim, a combinação do tratamento anaeróbico para remoção de matéria orgânica e do processo anammox para remoção de nitrogênio promove a sustentabilidade de ETEs, possibilitando que sejam energeticamente autossustentáveis (GANI et al., 2021; SIEGRIST et al., 2008).

Apesar das conhecidas vantagens do processo anammox, como redução da demanda energética, menor produção de lodo e menor emissão de gases de efeito estufa (WANG et al., 2022), o crescimento lento de bactérias anammox limita a aplicação do processo na ausência de biomassa anammox para partida de novos sistemas (LACKNER et al., 2014). Além disso, a competição com outros grupos microbianos, potencializada na aplicação do processo de NP/A para pós-tratamento de efluentes domésticos, a presença de matéria orgânica e elevada relação C/N, bem como as condições operacionais (estratégias de aeração e condições climáticas) também são um desafio (CAO et al., 2017).

Para a partida de novos sistemas de NP/A, frequentemente utiliza-se como inóculo biomassa proveniente de outros sistemas de NP/A (DE PRÁ et al., 2021; MA et al., 2015b; MIAO et al., 2016), ou lodos ativados e neste último caso, empregando alimentação com meio de cultura autotófico para garantir a atividade anammox usualmente após 90 dias (AUGUSTO et al., 2018; DE ALMEIDA FERNANDES et al., 2018; LEAL et al., 2016; PEREIRA et al., 2019a). No entanto, para a aplicação do processo em escala real, estas possibilidades podem ser indisponíveis, seja pela ausência de inóculo de NP/A, ou pela dificuldade em alimentar reatores em escala real com meio autotrófico. Portanto, pesquisas recentes estão sendo desenvolvidas

no sentido de investigar a partida de sistemas de NP/A utilizando lodos ativados como inóculo – por ser maior disponibilidade de acesso em comparação a biomassa de NP/A – sob alimentação com efluentes reais e aeração intermitente para NP/A (MIAO et al., 2020a; QIU et al., 2019; ZHANG et al., 2021b).

Com relação às estratégias operacionais para desenvolvimento da NP/A, a aeração intermitente com baixas concentrações de OD tem sido muito utilizada para garantir a atividade de bactérias anammox e limitar a atividade de BOA e BON (CARVALHO et al., 2021; MA et al., 2015b; MIAO et al., 2020b). Sistemas de NP/A de estágio único, embora apresentem maior simplicidade operacional e menores emissões de gases de efeito estufa em comparação à sistemas de duplo estágio (LACKNER et al., 2014) também estão mais suscetíveis ao acúmulo de OD, ocasionando desequilíbrio ao sistema em virtude da inibição de bactérias anammox e aumento da atividade de BOA e BON (CARVALHO et al., 2021; LACKNER et al., 2014). Portanto, sistemas com biomassa imobilizada em espuma podem ser muito úteis para garantir a proteção de bactérias anammox e o bom desempenho de sistemas de NP/A.

Sistemas de pós-tratamento de efluentes domésticos com biomassa imobilizada em espuma são amplamente utilizados, e no Brasil são a tecnologia mais empregada (BRESSANI-RIBEIRO et al., 2018). No entanto, a remoção biológica de nitrogênio pelo processo convencional de nitrificação total/desnitrificação heterotrófica pode não ser aplicável em efluentes domésticos pré-tratados, devido à reduzida disponibilidade de matéria orgânica para tal (CHERNICHARO et al., 2015). Assim, o processo de NP/A em reatores com biomassa imobilizada em espuma é uma alternativa promissora para pós-tratamento de efluentes anaeróbios domésticos (WATARI et al., 2021).

Ainda, este trabalho busca elucidar as lacunas no conhecimento em relação à partida de novos sistemas anammox com lodos ativados e comparar o desempenho de reatores de leito fixo com espuma e fluxo contínuo alimentados com meio de cultura autotrófico e efluente anaeróbio doméstico real, respectivamente, além de comparar a dinâmica das comunidades microbianas.

## 8.2 Materiais e métodos

### 8.2.1 Reatores de leito fixo em espuma e fluxo contínuo

Dois reatores de leito fixo em espuma e fluxo contínuo em acrílico (RFC 1 e RFC 2) com volume útil de 2L e fluxo ascendente foram utilizados simultaneamente, sob temperatura ambiente. Os reatores foram alimentados de forma contínua utilizando bomba peristáltica de

deslocamento positivo com vazão de 2L/d, resultando em TDH de 24 h. O efluente dos reatores foi coletado por gravidade. Para imobilização e crescimento da biomassa, o reator foi preenchido com mídias de espuma de poliuretano envoltas de estrutura plástica para estruturação com tamanho de aproximadamente 2cmx3cm.

Os reatores foram inoculados com 4L de lodos ativados, provenientes da linha de recirculação da ETE Arrudas (Belo Horizonte, MG), operada pela COPASA. Para garantir a adesão da biomassa ao meio suporte utilizado – espuma de poliuretano com estrutura plástica externa -, ambos ficaram em contato em recipiente por 7 dias, antes de serem adicionados aos reatores. Após este período, o meio suporte foi adicionado aos reatores, com adição de N<sub>2</sub> e ar nos RFC 1 e 2, respectivamente, de modo a garantir a aderência da biomassa no meio suporte. Os reatores estiveram em operação de julho de 2021 a junho de 2023, com o intuito de avaliar o desempenho a longo prazo.

O RFC 1 foi alimentado com meio de cultura autotrófico (VAN DE GRAAF et al., 1996; DAPENA-MORA et al., 2004) com concentrações de nitrogênio total (na forma de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) de 45-50 mg/L. O RFC 2 foi alimentado com efluente anaeróbico doméstico proveniente de reator UASB em escala de demonstração. Maiores detalhes deste sistema foram descritos no Capítulo 6. Para desenvolvimento de NP/A no RFC2, houve fornecimento de ar. A estratégia de aeração adotada consistiu em 1 min on/14 min off nos primeiros 30 dias, para limitar atividade de BOA e BON, característicos do lodo nitrificante utilizado como inóculo. Após este período, a estratégia de aeração intermitente adotada consiste em 5 min on/14 min off, com variação da taxa de aeração, de 0,005 a 0,150 (média aritmética de 0,041) mL/min.L.

### 8.2.2 Análises físico-químicas

Na fase líquida, foram coletadas amostras simples do afluente e efluente dos reatores RFC1 e RFC2. Foi analisado o pH e temperatura (°C) imediatamente após a coleta. Foram analisados compostos da série nitrogenada (NTK, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e NT), da série carbonácea (DQO e DBO), além da AT, em mg/L. Os procedimentos de armazenamento e análise foram realizados de acordo com APHA (2017).

### 8.2.3 Análises microbiológicas

No inóculo e ao longo da operação do reator foram coletadas amostras de biomassa. As amostras foram lavadas com solução padrão de fosfato e centrifugadas a 8.000 rpm. A biomassa retirada dos reatores foi dividida em dispersa (biomassa floculenta localizada na parte externa

do meio suporte do reator) e aderida (biomassa localizada no interior do meio suporte, que ficou submerso em solução padrão de fosfato para retirada desta biomassa).

A extração de DNA foi feita utilizando o kit Fast DNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, USA), de acordo com o procedimento do fabricante. Amostras do inóculo, da biomassa aderida e da biomassa dispersa dos reatores RFC 1 e RFC 2 (dos dias de operação 51, 202, 547 e 696) foram coletadas para análise de SSV (de acordo com procedimentos de APHA, 2017) e para análise de qPCR. O n° de cópias/gSSV do gene RNAr 16s (*anammox*, *Nitrospira*, *Nitrobacter*) e genes funcionais (*AmoA* para BOA e *NosZ* para bactérias desnitrificantes que convertem N<sub>2</sub>O a N<sub>2</sub>) foram estimados através de PCR quantitativo (qPCR) utilizando mix *SYBR Green* e *primers* e plasmídeos (para curva padrão). Mais detalhes sobre coleta, primers utilizados e condições da qPCR foram previamente descritos por (PEREIRA et al., 2019a).

Amostras no inóculo e da biomassa aderida dos reatores RFC 1 e RFC 2 (dos dias de operação 51 e 547) foram coletadas para análise da comunidade microbiana. A composição da comunidade microbiana foi realizada através de NGS utilizando a plataforma Illumina MiSeq (realizada por NGS Soluções Genômicas, São Paulo, Brasil). Para o NGS foram utilizados os primers 515Fe 806R da região V4 do gene RNAr 16s para os domínios Bacteria e Arquea (média de cobertura de 40.000 paired-end reads por amostra).

Para tratamento dos dados, as sequências brutas foram analisadas utilizando o software QUIIME<sup>TM</sup> 2.0. Sequências duplicadas, barcodes e sequências com tamanho inferior a 150 bp foram removidas. Quimeras e ruídos também foram removidos. Após o filtro de qualidade, as sequências remanescentes foram clusterizadas em Amplicon Sequence Variant (ASV) com nível de similaridade de 97%. As sequências representativas classificadas utilizando a plataforma BLASTn foram atribuídas taxonomicamente utilizando os bancos de dados RDP II (<http://rdp.cme.msu.edu>) e NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

### 8.3 Resultados e discussão

#### 8.3.1 Caracterização do meio de cultura autotrófico (alimentação do RFC1) e efluente anaeróbio doméstico (alimentação do RFC2)

Ao longo da operação, incluindo a partida dos reatores inoculados com lodos ativados, foi utilizado meio de cultura autotrófico e efluente anaeróbio doméstico nos reatores RFC1 e RFC2, respectivamente. As principais características dos afluentes dos reatores estão apresentada na Tabela 8-1.

A composição da série nitrogenada do efluente anaeróbio doméstico aplicado no RFC2 teve predominância de  $\text{N-NH}_4^+$ , com concentração mediana de 39,8 mg/L e de NT de 42,8 mg/L. A composição do meio de cultura autotrófico para cultivo de bactérias anammox utilizado no RFC1 apresentou concentrações medianas de  $\text{N-NH}_4^+$ ,  $\text{N-NO}_2^-$  e NT de 15,7, 25,7 e 42,5 mg/L, respectivamente. As concentrações de NT foram ajustadas para valores similares às concentrações de NT do afluente doméstico utilizado no RFC2. A relação média  $\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$  do afluente do RFC1 foi de 1,65. As concentrações de NT aplicadas nos reatores foram semelhantes, facilitando a comparação entre os dois sistemas.

As concentrações medianas de AT no afluente do RFC 1 e 2 foram de 124,0 e 210,0 mg/L, respectivamente, resultando em razões  $\text{AT}/\text{NH}_4^+$  de 8,2 e 5,7, respectivamente. O efluente anaeróbio doméstico apresentou concentrações medianas de DQO e DBO de 11,3 e 39,2 mg/L, respectivamente, resultando em razões medianas DQO/DBO, DQO/NT e DBO/NT de 3,0, 2,7 e 1,0, respectivamente.

Tabela 8-1 – Caracterização do meio de cultura para bioaugmentação de bactérias anammox utilizado como afluente do RFC 1 e do efluente anaeróbio doméstico utilizado com efluente do RFC2.

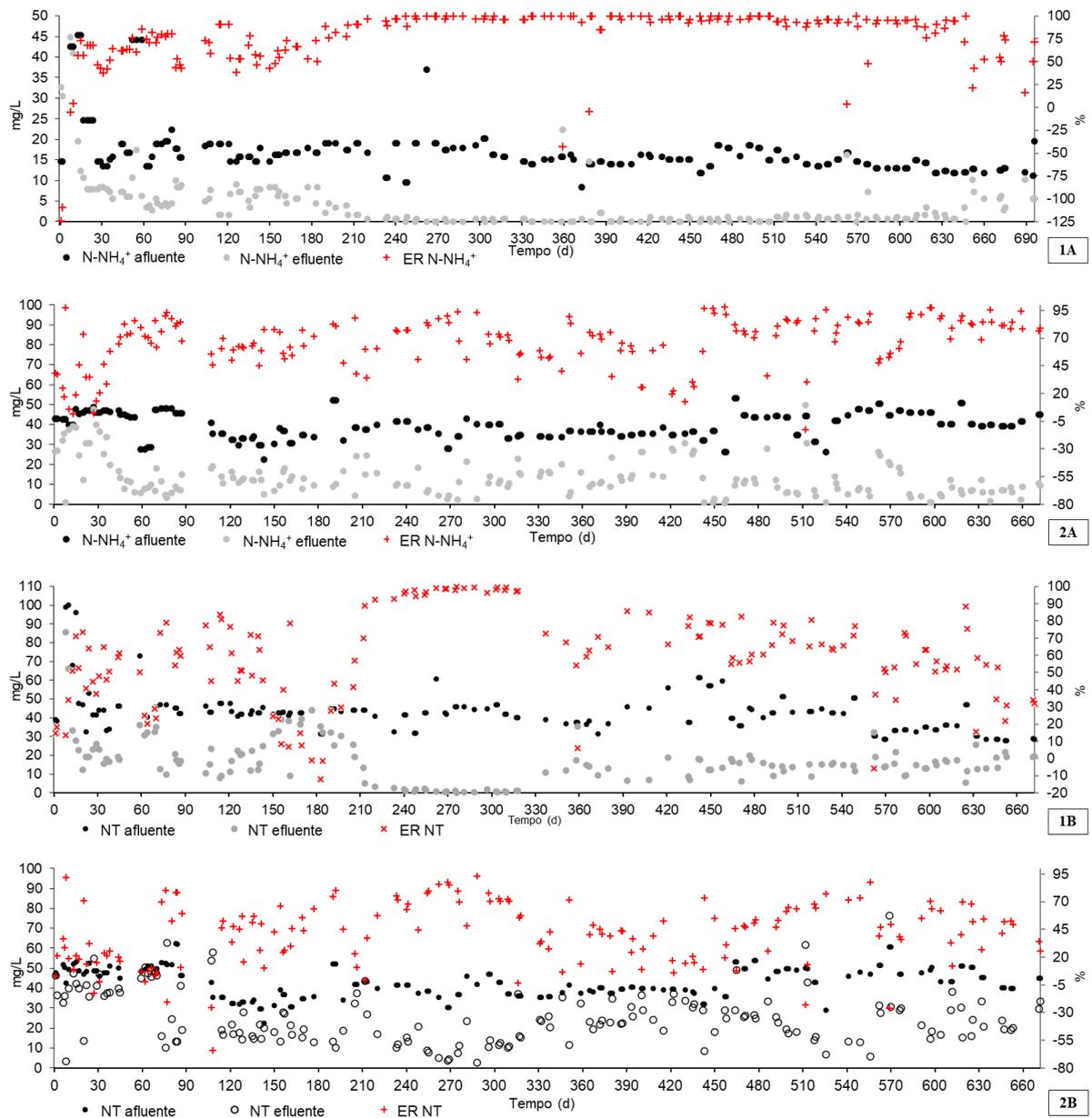
Variáveis de estudo	Meio de cultura autotrófico para alimentação do RFC1					Efluente anaeróbio doméstico para alimentação do RFC 2				
	n	Med	Máx	Mín	CV	n	Med	Máx	Mín	CV
Temperatura	84	22,9	28,0	18,4	0,1	84	23,0	28,6	17,7	0,1
pH	77	7,8	8,3	7,0	0,0	84	7,2	8,2	6,6	0,0
NTK (mg/L)	-	-	-	-	-	188	43,4	84	22,4	0,2
$\text{N-NH}_4^+$ (mg/L)	186	15,7	45,4	8,4	0,4	188	39,8	53,2	22,4	0,2
$\text{N-NO}_2^-$ (mg/L)	186	25,7	56,5	8,0	0,3	87	0,0	1,9	0,0	3,4
$\text{N-NO}_3^-$ (mg/L)	11	0,2	1,2	0,0	1,0	63	0,4	2,4	0,0	0,9
NT	152	42,5	100,3	27,8	0,3	167	42,8	85,4	22,4	0,2
AT (mg/L)	144	124,0	200,0	50,0	0,2	157	210,0	300,0	84,0	0,2
$\text{AT}/\text{NH}_4^+$	144	8,2	16,4	1,6	0,2	156	5,7	9,9	2,0	0,2
DQO (mg/L)						134	111,3	313,0	19,7	0,5
DBO (mg/L)						144	39,2	117,7	11,4	0,6
DQO/DBO						108	3,0	19,4	0,7	0,8
DQO/NT						118	2,7	7,2	0,3	0,5
DBO/NT						126	1,0	2,9	0,1	0,6

n: número de dados; Med: mediana; Máx: valor máximo; Mín: valor mínimo; CV: coeficiente de variação.

### 8.3.2 Desempenho dos reatores e remoção de nitrogênio

A dinâmica dos compostos nitrogenados apresentou comportamentos distintos ao longo da operação e entre os reatores RFC1 (alimentado com meio de cultura autotrófico) e o RFC2 (alimentado com efluente anaeróbico doméstico sob aeração intermitente), que foram partidos com lodos ativados como inóculo e operados por mais de 690 dias. As concentrações afluentes e efluentes de  $\text{N-NH}_4^+$  e NT nos reatores estão apresentadas em séries históricas na Figura 8-1.

Figura 8-1 - Dinâmica de concentrações (mg/L) e eficiências de remoção (%) de  $\text{NH}_4^+$  nos reatores RFC1 (1A) e RFC2 (2A) e de NT nos reatores RFC1 (1B) e RFC2 (2B)



Após aproximadamente 210 dias de operação, o RFC1, alimentado com meio de cultura autotrófico foi capaz de remover completamente a  $\text{NH}_4^+$  de maneira estável, resultando em altas

eficiências de remoção deste composto (Figura 8-1, 1A). Por outro lado, o RFC2, alimentado com efluente anaeróbio doméstico sob aeração intermitente para desenvolvimento da NP/A, apresentou remoção instável de  $\text{NH}_4^+$ . Estes resultados eram esperados, uma vez que reatores alimentados com efluentes reais estão sujeitos à maiores flutuações de concentração de nitrogênio e de outros compostos, como matéria orgânica e alcalinidade, além da aeração intermitente. A mudança da estratégia de aeração intermitente de 1 min on/14 min off nos primeiros 30 dias para 5 min on/14 min off após este período resultou em eficiências de remoção de amônio que variaram predominantemente de 45 a 95% (Figura 8-1, 1A).

A dinâmica nas concentrações e eficiências de remoção de NT no RFC1 foram menos instáveis, com as melhores eficiências de remoção entre os dias 210 e 300 (Figura 8-1, 1B). A instabilidade no RFC1 pode ser sido causada pela influência da atividade de BON, causando nitrificação total e contribuindo para menores eficiências de remoção de NT. Mesmo utilizando meio de cultura autotrófico, a atividade de BOA/AOA e BON é comum em reatores inoculados com lodos ativados (DE ALMEIDA FERNANDES et al., 2018; GONÇALVES PITEIRA CARVALHO et al., 2021; PEREIRA et al., 2019a).

Foi observada variação nas eficiências de remoção de NT no RFC2, que pode ter sido ocasionada também pela influência da atividade excessiva de BOA/AOA e BON, favorecidas pela aeração no sistema. No entanto, valores altos de eficiência de remoção de NT (70 a 95%) foram observados, principalmente entre os dias 220 e 320 e 520 a 570 (Figura 8-1, 2B). Xu et al. (2020) observaram eficiências de remoção de 80-89% em RBS com biofilme em espuma para NP/A sob aeração intermitente para pós-tratamento de efluente doméstico. No presente estudo foi observado que, além dos benefícios de aeração intermitente para a NP/A, é possível iniciar novos sistemas sob estas condições, utilizando efluentes reais.

Altas eficiências de remoção de NT foram notadas nos reatores RFC1 e RFC2 cerca de 80 dias após o início da operação e partida dos reatores. Remoções de nitrogênio expressivas, bem como aumento da atividade anammox, foram observadas após cerca de 50 dias de operação do RFC1 e 75-80 dias de operação do RFC2. Estes resultados sugerem que é possível estabelecer a NP/A em sistemas inoculados com lodos ativados e iniciados com alimentação com efluente real sob aeração intermitente. Além disso, a aeração intermitente beneficia o desenvolvimento de NP/A desde o início da operação de novos sistemas. Estudos prévios de partida de novos sistemas anammox (RBS) alimentados com meio de cultura autotrófico sugerem partida do sistema após 90 dias no início da operação (DE ALMEIDA FERNANDES et al., 2018; LEAL

et al., 2016; PEREIRA et al., 2019a), que pode ser reduzido para 48 dias de operação em reatores com biofilme em membrana aerada (AUGUSTO et al., 2018).

Os valores medianos de temperatura e pH nos respectivos efluentes dos reatores RFC 1 e 2 foram de 23,2°C, 7,5, 23,0 e 6,7, respectivamente. O valor mediano de pH ligeiramente ácido do efluente do RFC2 foi ocasionado pela nitrificação neste sistema, com consumo de alcalinidade e redução de pH.

Comparando a qualidade dos efluentes gerados (Tabela 8-2), as concentrações medianas de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> foram de 1,7 e 11,1 no RFC1 e RFC2, respectivamente. Não houve geração expressiva de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> no RFC 1 e 2, com concentrações medianas efluentes de 0,2 e 0,0 mg/L, respectivamente. No entanto, a concentração mediana de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> foi maior no RFC1 (11,3 mg/L) em comparação ao RFC2 (6,4 mg/L). Os valores medianos efluentes de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> obtidos nos reatores estão dentro dos padrões de lançamento estabelecidos (20 mg/L) por Brasil (2011), apesar da pouca restrição que esta legislação determina. Em comparação trabalhos prévios utilizando reatores com atividade anammox alimentados com efluente doméstico, com biomassa previamente aclimatada, onde as concentrações de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> no efluente foram de 0 a 8 mg/L (DE ALMEIDA FERNANDES et al., 2018) e de 0-2 mg/L (MA et al., 2015), o presente trabalho obteve maiores concentrações medianas de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> efluente nos reatores RFC 1 e 2, apesar de episódios de remoção total do composto Figura 8-1. Portanto, o desafio para o alto desempenho não consistiu na ausência de inóculo com alta atividade anammox e sim em manter condições favoráveis à NP/A no âmbito operacional.

O valor mediano do coeficiente de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> produzido/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> consumido no RFC1 foi de 0,83, superior ao coeficiente do processo anammox de 0,26 (AHN, 2006) (Tabela 8-3). O valor mediano do coeficiente de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> produzido/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> consumido no RFC2 (0,27) também foi superior ao valor proposto na NP/A de 0,11 (AHN, 2006). No entanto, a estratégia de aeração de 1 min on/14 min off nos primeiros 30 dias de operação do RFC2 foi capaz de controlar a nitrificação, uma vez que a mediana do coeficiente de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> produzido/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> consumido neste período foi de 0,07. Ainda que a remoção mediana de nitrogênio neste período inicial tenha sido baixa (19%), a nitrificação foi controlada num curto período de tempo, criando condições para o favorecimento de bactérias anammox em seguida.

Nos primeiros 30 dias de operação do RFC1, a eficiência mediana de remoção de NT foi de 44%, com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> produzido/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> consumido de 0,19, o que significa que a nitrificação foi controlada

desde o início da operação do sistema, com maior eficiência de remoção de NT em relação ao RFC2. Este resultado era esperado, uma vez que o meio de cultura utilizado no RFC1 auxilia a obtenção de maiores eficiência de remoção de nitrogênio em comparação à utilização de efluentes reais.

Ambos reatores RFC1 e RFC2 tiveram valores medianos dos coeficientes  $\text{NO}_3^-$  produzido/ $\text{NH}_4^+$  consumido abaixo dos valores estabelecidos para NP/A (0,11 - SLIEKERS et al., 2002) e do processo anammox (0,26 - AHN, 2006). Tal resultado deve-se à atividade de BDH, que consomem  $\text{N-NO}_3^-$  juntamente com a matéria orgânica no meio, proveniente do decaimento microbiano ou da própria matéria orgânica presente no efluente anaeróbico (DE ALMEIDA FERNANDES et al., 2018; MA et al., 2015b).

Tabela 8-2 – Caracterização dos efluentes dos reatores RFC 1 e RFC 2

	RFC 1					RFC 2				
	n	Med	Máx	Mín	CV	n	Med	Máx	Mín	CV
NTK	-	-	-	-	-	188	11,9	67,5	1,1	0,7
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/L)	186	1,7	44,8	0,0	1,6	188	11,1	49,8	0,6	0,7
N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	186	0,2	39,8	0,0	2,4	189	0,0	2,7	0,0	1,9
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	152	11,3	35,7	0,0	0,8	168	6,4	42,1	0,0	1,0
$\text{NO}_3^-$ produzido/ $\text{NH}_4^+$ consumido	152	0,83	26,2	-1,9	2,1	165	0,27	2,4	0,0	1,2
NT	152	15,6	85,5	0,0	0,7	167	23,2	76,5	2,8	0,5
AT	144	90,0	176,0	20,0	0,3	157	64,0	520,0	0,0	0,9
AT <sub>c</sub> /NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> <sub>c</sub>	144	3,1	103,3	-5,2	2,2	154	5,3	67,9	-9,7	1,1
DQO (mg/L)						124	68,0	393,0	11,3	0,7
DBO (mg/L)						144	32,9	98,3	3,4	0,5

n: número de dados; Med: mediana; Máx: valor máximo; Mín: valor mínimo; CV: coeficiente de variação.

As concentrações medianas de DQO e DBO efluentes do RFC2 foram de 68,0 e 32,9 mg/L, respectivamente. Os valores de DBO também estão de acordo com os padrões de lançamento (limite de 120 mg/L) de Brasil (2011), apesar da pouca restrição desta legislação para esta variável. Portanto, o reator não só removeu nitrogênio como também foi capaz de remover parcialmente a matéria orgânica do sistema. O consumo de matéria orgânica dos reatores era esperado uma vez que o inóculo utilizado (lodos ativados) contém bactérias heterotróficas consumidoras de matéria orgânica (apresentado em maior detalhes no subtópico referente à composição da comunidade microbiana), pela composição do afluente com matéria orgânica (efluente anaeróbico doméstico) e presença de  $\text{N-NO}_2^-$  e  $\text{N-NO}_3^-$ . O consumo de matéria

orgânica em reatores anammox é frequentemente observado na literatura (DE ALMEIDA FERNANDES et al., 2018; GONÇALVES PITEIRA CARVALHO et al., 2021; MA et al., 2015).

Tabela 8-3 – Eficiência de remoção dos compostos dos reatores RFC1 e RFC2

	RFC 1					RFC 2				
	n	Med	Máx	Mín	CV	n	Med	Máx	Mín	CV
NTK	-	-	-	-	-	188	72	98	-12	0,4
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	186	91	100	-124	0,4	188	72	98	-13	0,3
N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	186	99	100	-3	0,1					
NT	152	63	100	-12	0,4	167	45	93	-64	0,7
AT	144	31	84	-125	0,8	157	69	100	-117	0,5
DQO (mg/L)						134	50	100	-325	1,4
DBO (mg/L)						144	31	88	-210	2,9

n: número de dados; Med: mediana; Máx: valor máximo; Mín: valor mínimo; CV: coeficiente de variação.

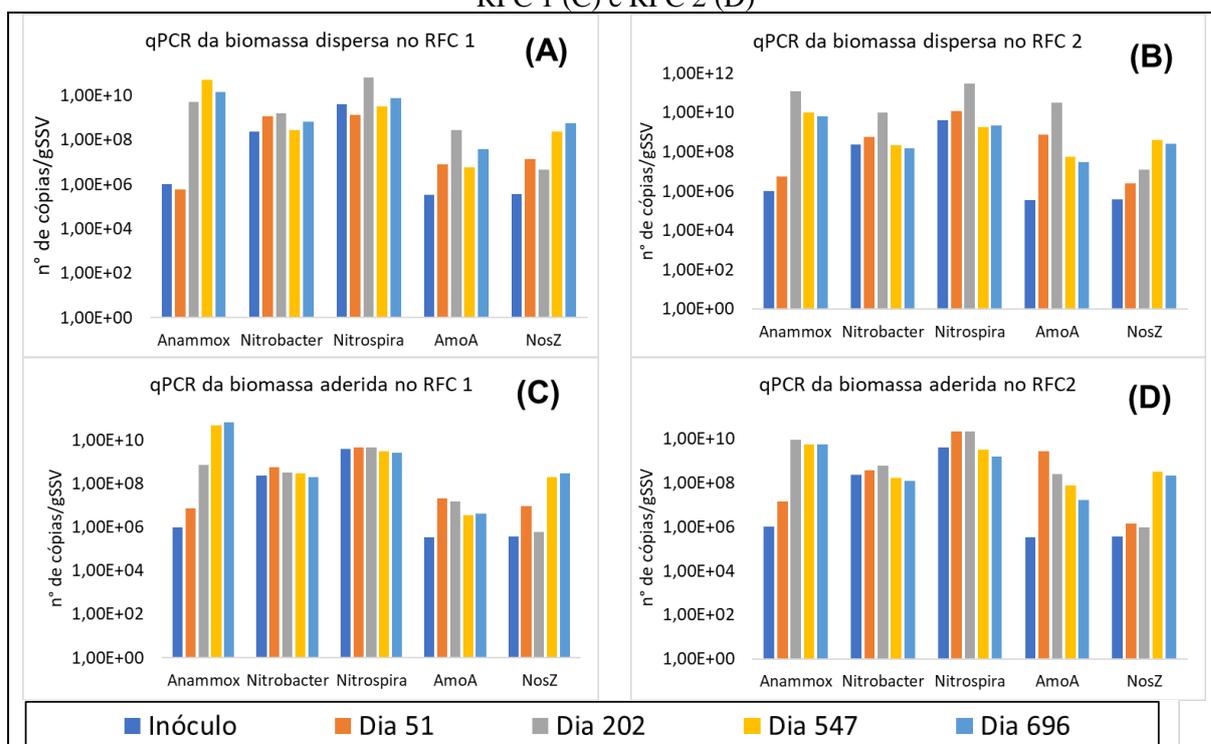
As eficiências medianas de remoção de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e de NT no RFC1 e RFC2 foram de 91 e 72% e de 63 e 45%, respectivamente (Tabela 8-3). As cargas medianas removidas no RFC1 de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e NT foram de 13,4 e 21,8 mg/L.d, respectivamente. Já as cargas medianas removidas no RFC2 de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e NT foram de 26,6 e 16,8 mg/L.d, respectivamente. O consumo de alcalinidade do RFC1 (mediana de 69%) foi maior em comparação ao RFC2 (mediana de 31%) em virtude da aeração para promoção de nitrificação parcial. Estes resultados são similares aos resultados observados em MBBR alimentação com efluente sintético (50mg/L de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) e inoculado com lodos ativados, onde a remoção de NT no dia 53 atingiu valores de 85% (LV et al., 2019). Em comparação a resultados obtidos em reator de leito imobilizado em espuma com eficiências de remoção de NT de 78% após 400 dias de operação (alimentação com 50 mg/L de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e 50 mg/L de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), o presente trabalho demonstrou partida em menor tempo nos reatores RFC1 e 2, com eficiências satisfatórias de remoção de NT (SÁNCHEZ GUILLÉN et al., 2015).

Embora o desempenho em termos de remoção de nitrogênio tenha sido maior no RFC1, alimentado com meio de cultura autotrófico, o RFC2, alimentado com efluente anaeróbio doméstico obteve resultados satisfatórios para remoção de nitrogênio. Estes resultados sugerem que é possível estabelecer a partida de reatores com NP/A com eficiências de remoção de nitrogênio de até 93% utilizando lodos ativados como inóculo e com alimentação com efluente real e sob aeração intermitente para a partida de novos sistemas de NP/A.

### 8.3.3 qPCR de microrganismos do ciclo no nitrogênio

As abundâncias relativas de microrganismos do ciclo do nitrogênio obtidas através de qPCR (Figura 8-2) revelam que a abundância de bactérias anammox no inóculo ( $1,02 \times 10^6 \pm 5,17 \times 10^4$  n° cópias/gSSV) foi menor do que a abundância dos gêneros de BON *Nitrospira* e *Nitrobacter* ( $2,33 \times 10^8 \pm 2,36 \times 10^7$  e  $4,03 \times 10^9 \pm 3,47 \times 10^8$  n° cópias/gSSV, respectivamente).

Figura 8-2 - Abundância relativa (n° de cópias/gSSV) de bactérias anammox, dos gêneros *Nitrospira* e *Nitrobacter*, BOA e BDH, na biomassa dispersa do RFC 1 (A) e RFC 2 (B) e na biomassa aderida do RFC 1 (C) e RFC 2 (D)



Após 51 dias de operação, a abundância de bactérias anammox na biomassa dispersa no RFC1 diminuiu e no RFC2 aumentou em relação ao inóculo. Já na biomassa aderida, a abundância de bactérias anammox tanto do RFC1 quanto no RFC2 aumentou em relação ao inóculo. No entanto, o aumento foi mais expressivo no RFC2 ( $1,42 \times 10^7 \pm 1,73 \times 10^4$  n° de cópias/gSSV), demonstrando que foi possível bioaumentar bactérias anammox melhor no reator alimentado com efluente real em comparação ao reator alimentado com meio de cultura autotrófico.

Após o dia 201, houve diminuição da abundância de bactérias anammox no RFC2, enquanto aumento gradual foi observado no RFC1. Esses resultados sugerem que a dinâmica dos compostos nitrogenados impactou a abundância relativa de bactérias anammox. Enquanto no RFC1 foram criadas condições favoráveis pela a atividade de bactérias anammox, com destaque para a alimentação com meio de cultura autotrófico com concentrações fixas, que ocasionou

aumento na remoção de nitrogênio, as condições mais adversas no RFC2, destacando alimentação com efluente real sob aeração, contribuíram para as oscilações na abundância de bactérias anammox e, conseqüentemente, da remoção de nitrogênio também.

O gênero de BON *Nitrospira* foi mais abundante que o gênero *Nitrobacter* em todas as amostras analisadas, tanto do RFC1 quanto do RFC2, ainda que estes reatores tenham operado com condições operacionais distintas. Em ambos os reatores RFC 1 e RFC 2, nos dois tipos de biomassa (aderida e dispersa), a concentração de bactérias anammox foi superior à de *Nitrospira* nos dias 547 e 696 de operação. Este resultado significa que em reatores com atividade anammox sob operação a longo prazo, bactérias anammox tendem a ser dominantes em relação à BON. As condições operacionais como limitação de nitrito e oxigênio no meio aliada à velocidade ascensional adequada podem contribuir para a retirada de BON do reator.

A abundância do gene funcional *AmoA* revela que BOA foram bioaumentadas tanto no RFC1 quanto no RFC2 e que as maiores abundâncias relativas deste grupo foram obtidas na biomassa aderida ao meio suporte. Estes resultados estão em contraste com os resultados obtidos por Xu et al. (2020), que identificaram maiores abundâncias de BON e BOA na biomassa dispersa em relação à biomassa aderida no meio suporte.

O contrário do comportamento de BOA (com maiores abundâncias relativas a biomassa aderida ao meio suporte) foi observado para o gene funcional *NosZ* (pertence à BDH), uma vez que estes microrganismos apresentaram abundâncias relativas a biomassa dispersa dos reatores RFC1 e RFC2 maiores em relação à biomassa aderida ao meio suporte.

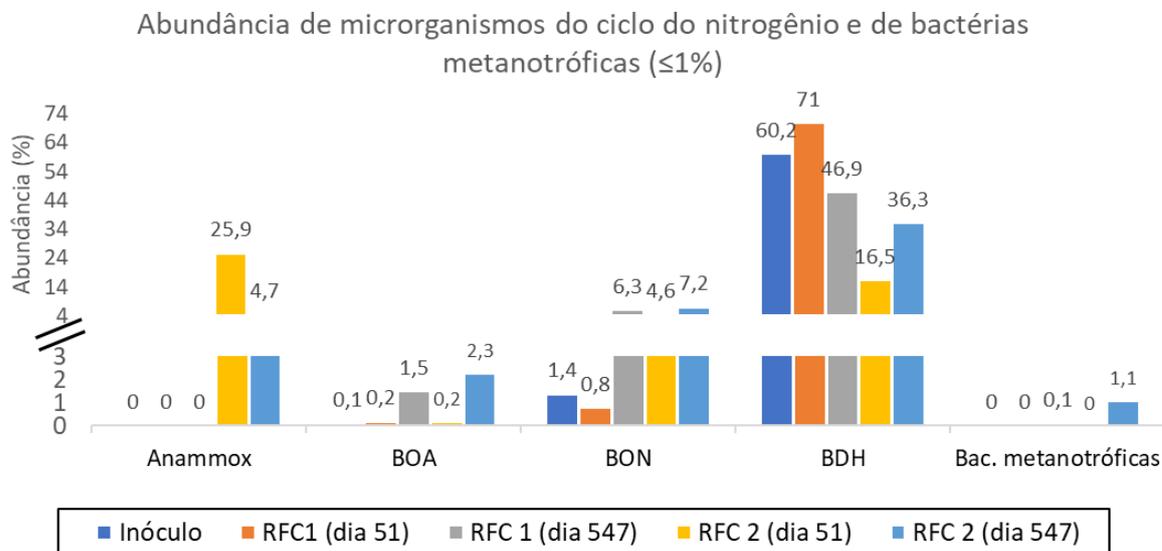
#### 8.3.4 Diversidade microbiana (NGS)

A diversidade microbiana das amostras da biomassa aderida ao meio suporte nos reatores RFC1 e RFC2, obtida através da análise de NGS, revela que o grupo mais abundante foi de BDH (Figura 8-3). Além disso, não houve aumento da abundância de bactérias anammox (%) no RFC1 em relação ao inóculo. No entanto, no RFC2, as abundâncias foram de 25,9 e 4,7% nos dias 51 e 547, respectivamente.

O gênero de bactérias anammox dominante foi *Ca. Brocadia* (Tabela 8-4). Em contraste, Lv et al. (2019) observaram *Ca. Jettenia* como gênero anammox dominante (42%) após 53 dias de partida de MBBR alimentado com efluente sintético ( $\text{NH}_4^+$  de 50 mg/L). *Ca. Brocadia* foi o gênero dominante na biomassa aderida em biofilme (0,7 %) em RBS com meio suporte em

espuma integrado (XU et al., 2020). Em estudo prévio, foi observado em RBS com NP/A para pós-tratamento de efluente doméstico, foi identificado o gênero anammox *Ca. Kuenenia* como dominante no sistema (abundância de 3,23 %) após 101 dias de partida (WU et al., 2020).

Figura 8-3 – Gráfico de barra da abundância dos microrganismos do ciclo do nitrogênio e de bactérias metanotróficas na biomassa aderida dos reatores RFC 1 e RFC 2



Houve bioaugmentação de BOA e BON dos gêneros *Nitrosomonas* e *Nitrospira*, respectivamente, tanto no RFC1 quanto no RFC2, com maiores abundâncias (até 2,3 e 7,2 %, respectivamente) no RFC2. A presença de nitrificantes em sistemas anammox alimentados com meio de cultura autotrófico se dá pela capacidade de adaptação destes microrganismos à reduzidas concentrações de OD (ZHANG et al.2020). Possivelmente as condições operacionais adotadas no RFC2 (aeração intermitente) favoreceram o crescimento destes grupos microbianos. No entanto, no dia 51 de operação, a abundância de bactérias anammox foi superior à abundância de BOA e BON no RFC2.

Foram identificados 32 gêneros de BDH com abundância relativa igual ou superior a 1% em pelo menos uma das amostras. As abundâncias de BDH no RFC1 (71,0 e 46,9 %) foram superiores às abundâncias no RFC2 (16,5 e 36,6 %). A disponibilidade de  $N-NO_2^-$  no meio autotrófico utilizado para alimentação no RFC1 pode ter favorecido a dominância de BDH.

Bactérias do gênero *Methylosarcina* foram identificadas com abundância de até 1,1% no RFC2. Estas bactérias são consideradas metanotróficas por serem capazes de assimilar  $CH_4$  (KOLB et al., 2003). A presença destas bactérias pode estar relacionada à presença de metano dissolvido no efluente anaeróbio doméstico utilizado para alimentação do RFC2.

Tabela 8-4 –Microorganismos do ciclo do nitrogênio e bactérias metanotróficas ( $\leq 1\%$ ) no inóculo nos reatores e na biomassa aderida no RFC1 e RFC2.

Filo	Família	Gênero	Inóculo	RFC1 (dia 51)	RFC 1 (dia 547)	RFC 2 (dia 51)	RFC 2 (dia 547)
<b>Anammox</b>							
Planctomycetota	Brocadiaceae	<i>Candidatus Brocadia</i>	0,0	0,0	0,0	25,9	4,7
<b>Total</b>			<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>25,9</b>	<b>4,7</b>
<b>BOA</b>							
Proteobacteria	Nitrosomonadaceae	<i>Nitrosomonas</i>	0,1	0,2	1,5	0,2	2,3
<b>Total</b>			<b>0,1</b>	<b>0,2</b>	<b>1,5</b>	<b>0,2</b>	<b>2,3</b>
<b>BON</b>							
Nitrospirota	Nitrospiraceae	<i>Nitrospira</i>	1,4	0,8	6,3	4,6	7,2
<b>Total</b>			<b>1,4</b>	<b>0,8</b>	<b>6,3</b>	<b>4,6</b>	<b>7,2</b>
<b>BDH</b>							
Bacteroidota	Chitinophagaceae	<i>Terrimonas</i>	4,2	19,6	8,1	0,2	0,1
Proteobacteria	Rhodocyclaceae	<i>Denitratisoma</i>	0,3	7,9	2,9	10,1	12,8
Actinobacteriota	Nocardiaceae	<i>Gordonia</i>	11,0	0,2	0,8	0,1	0,0
Proteobacteria	Xanthomonadaceae	<i>Thermomonas</i>	1,0	14,5	0,7	0,1	0,1
Proteobacteria	Comamonadaceae	<i>Ottowia</i>	5,7	7,9	2,8	0,1	0,7
Proteobacteria	Rhodanobacteraceae	<i>Rhodanobacter</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	11,1
Proteobacteria	Comamonadaceae	<i>Alicyclophilus</i>	5,0	1,5	0,4	0,1	0,0
Proteobacteria	Rhodocyclaceae	<i>Thauera</i>	0,6	5,8	1,2	0,0	0,0
Proteobacteria	Burkholderiaceae	<i>Limnobacter</i>	0,0	0,3	0,0	0,5	1,9
Bacteroidota	Ignavibacteriaceae	<i>Ignavibacterium</i>	0,0	0,0	0,0	1,1	0,8
Proteobacteria	Rhodocyclaceae	<i>Dechlorobacter</i>	4,0	0,2	1,3	0,0	0,0
Acidobacteriota	Blastocatellaceae	<i>OLB17</i>	0,0	0,0	0,0	1,8	2,8
Bacteroidota	Saprosiraceae	<i>OLB8</i>	3,2	0,9	1,2	0,0	0,0
Bacteroidota	Chitinophagaceae	<i>Ferruginibacter</i>	3,9	2,1	5,7	0,7	0,5
Proteobacteria	Rhodobacteraceae	<i>Rhodobacter</i>	1,1	2,0	0,2	0,0	0,0
Proteobacteria	Rhodocyclaceae	<i>Dechloromonas</i>	0,6	0,5	8,4	0,0	0,1
Proteobacteria	Sphingomonadaceae	<i>Novosphingobium</i>	3,3	0,4	0,5	0,0	0,2
Proteobacteria	Hydrogenophilaceae	<i>Thiobacillus</i>	0,0	1,7	0,2	0,0	0,1
Proteobacteria	Rhodocyclaceae	<i>Zoogloea</i>	2,9	0,0	2,1	0,0	0,0
Myxococcota	Haliangiaceae	<i>Haliangium</i>	4,7	0,0	4,8	0,1	1,0
Proteobacteria	Competibacteraceae	<i>Candidatus Competibacter</i>	2,2	0,2	1,8	0,0	0,0
Bacteroidota	Flavobacteriaceae	<i>Flavobacterium</i>	1,8	0,1	0,1	0,0	0,0
Proteobacteria	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	1,1	0,7	0,0	0,1	0,5
Chloroflexi	Anaerolineaceae	<i>Longilinea</i>	0,0	0,6	0,0	1,0	0,0
Proteobacteria	Rhodocyclaceae	<i>Candidatus Accumulibacter</i>	1,3	0,0	0,8	0,0	0,0
Acidobacteriota	Holophagaceae	<i>Geothrix</i>	0,5	0,0	2,4	0,0	0,0
Proteobacteria	Rhodanobacteraceae	<i>Dokdonella</i>	0,3	0,0	0,1	0,1	2,0
Proteobacteria	Xanthomonadaceae	<i>Pseudoxanthomonas</i>	0,0	1,2	0,0	0,1	0,0
Desulfobacterota	Syntrophobacteraceae	<i>Desulforhabdus</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	1,2
Proteobacteria	Rhodocyclaceae	<i>Sterolibacterium</i>	0,0	1,1	0,2	0,2	0,5
Actinobacteriota	Intrasporangiaceae	<i>Tetrasphaera</i>	1,6	0,0	0,2	0,0	0,0
Proteobacteria	Xanthomonadaceae	<i>Arenimonas</i>	0,0	1,3	0,0	0,0	0,0
<b>Total</b>			<b>60,2</b>	<b>71,0</b>	<b>46,9</b>	<b>16,5</b>	<b>36,3</b>
<b>Bactérias metanotróficas</b>							
Proteobacteria	Methylomonadaceae	<i>Methylosarcina</i>	0,0	0,0	0,1	0,0	1,1
<b>Total</b>			<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,1</b>	<b>0,0</b>	<b>1,1</b>

#### 8.4 Conclusões

As remoções medianas de  $N-NH_4^+$  foram de 91 e 72% e para NT foram de 63 e 45%, respectivamente, no RFC1 e RFC2. Houve maior abundância de BOA na biomassa aderida e

de BDH na biomassa dispersa em ambos os reatores. Foi observada alta abundância de bactérias anammox do RFC2 após 51 dias de operação (25,9 %), e maior abundância de bactérias anammox no RFC2 em relação ao RFC1. O gênero anammox dominante foi *Ca. Brocadia*. Este trabalho mostra a possibilidade de bioaumentar biomassa anammox em novos sistemas de NP/A com lodos ativados, sem a necessidade de inóculo proveniente de sistemas anammox e sem a necessidade de aclimação do sistema com meio de cultura autotrófico, o que implica em contribuições reais para a maior aplicação do processo anammox em ETEs.

## **9 ETAPA 4: CO-TRATAMENTO DE EFLUENTE DOMÉSTICOS DOMÉSTICOS: EFEITOS NA NITRIFICAÇÃO PARCIAL/ANAMMOX, DINÂMICA DE EMISSÃO DE ÓXIDO NITROSO E METANO E COMUNIDADE MICROBIANA**

### 9.1 Introdução

Tradicionalmente, sistemas de NP/A são aplicáveis para a remoção de nitrogênio de efluentes de alta carga, com baixa relação C/N, como “centrado” de lodo – fase líquida proveniente da digestão do lodo (LACKNER et al., 2014; SIEGRIST et al., 2008). No entanto, a necessidade de criar alternativas mais sustentáveis para a remoção de nitrogênio de efluentes domésticos pré-tratados levou ao êxito das pesquisas nesse sentido, com aplicação cada vez mais frequente de NP/A como pós-tratamento de efluentes domésticos (JUAN-DÍAZ et al., 2021; MALOVANYY et al., 2015; MIAO et al., 2020; PEDROUSO et al., 2019).

Contudo, dificuldades inerentes à aplicação de NP/A em efluentes de baixa carga, como os efluentes domésticos, ainda é um desafio, principalmente devido à dificuldade de inibir BON e garantir o crescimento e atividade adequadas de bactérias anammox, comprometida em virtude da menor oferta de substrato (CAO et al., 2017). Por outro lado, efluentes com alta carga aplicados sem diluição também podem inibir o processo de NP/A devido a choques de carga, tanto de substrato como de substâncias inibidoras (SCAGLIONE et al., 2017).

A demanda por sustentabilidade nos processos de tratamento de esgotos são cada vez maiores e fechar ciclos dentro da ETE tem sido uma destas. ETEs com sistemas biológicos de tratamento frequentemente geram efluentes contendo nitrogênio na fase líquida e sólida. A mistura destes efluentes com concentrações diferentes de nitrogênio pode também ser vantajoso para melhorar a performance do processo anammox através da aplicação simultânea de efluentes de alta e baixa carga, equalizando a concentração de nitrogênio nos reatores de NP/A.

Reatores de lodos ativados e reatores UASB são a primeira e a terceira tecnologia mais utilizada para tratamento de efluentes domésticos no Brasil, respectivamente (CHERNICHARO et al., 2018). Visto que o Brasil ainda apresenta déficit de tratamento de esgotos de quase 50% (SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES SOBRE SANEAMENTO - SNIS, 2020), espera-se que mais ETEs sejam construídas para mitigar esta realidade. Em sistemas centralizados de tratamento, os volumes de lodo produzido, tanto em sistemas de lodos ativados quanto em UASBs são expressivos, ainda que nos sistemas aeróbios a produção seja maior, com demanda de descarte mais frequente. Nestes dois casos, devido à fatores como área de

construção limitada, o desaguamento mecanizado de lodos é uma alternativa que vem sendo aplicada com frequência, e que inclui o uso de centrífuga para separação sólido/líquido (LOBATO et al., 2018).

O líquido proveniente da separação de fases do lodo pode retornar a ETE desde o tratamento primário para remoção de matéria orgânica. No entanto, pode também ser direcionado a sistemas de pós-tratamento para remoção de nitrogênio, como o sistema de NP/A, uma vez que este processo aumentaria a concentração afluyente de nitrogênio, podendo favorecer o processo anammox. Apesar das recentes pesquisas a respeito do co-tratamento de efluentes de alta e baixa carga em sistemas anammox (WU et al., 2015; ZHANG et al., 2021), a viabilidade do tratamento de efluentes anaeróbios e aeróbios domésticos e seus respectivos sobrenadantes do lodo de excesso, bem como os efeitos de diferentes proporções de mistura no desempenho do sistema, em termos de remoção de nitrogênio, alteração da comunidade microbiana e emissão de GEE ainda é uma lacuna no conhecimento.

O tratamento de águas residuárias requer cada vez mais alternativas sustentáveis, não só considerando fatores de eficiência dos sistemas, otimização como redução de custos operacionais, mas também a mitigação de GEE. Entre estes, o  $N_2O$  é conhecido por ser mais prejudicial em comparação ao  $CH_4$  e  $CO_2$  como GEE (CAKIR; STENSTROM, 2005). Sabe-se que sistemas biológicos de tratamento de efluentes podem ser *hotspots* para a emissão de GEE, e apesar da reação anammox não produzir  $N_2O$ , outro acúmulo de nitrito e a desnitrificação heterotrófica parcial podem gerá-lo em sistemas com atividade anammox, como reatores de NP/A (AL-HAZMI et al., 2021). A presença da matéria orgânica é um fator que potencializa a emissão de  $N_2O$ , bem como as estratégias de aeração e a configuração de reator e disposição da biomassa (WAN et al., 2021). Em geral, a aplicação de NP/A em efluentes anaeróbios domésticos é pouco explorada, no entanto, a concentração maior de matéria orgânica nestes efluentes pode ser um fator favorável à emissão de  $N_2O$ , requerendo mais investigações.

Portanto, esta etapa do trabalho visa esclarecer estas lacunas através da investigação do co-tratamento de efluente anaeróbio doméstico e sobrenadante de lodo de reator UASB através do processo de NP/A, visando investigar o desempenho do processo e as dinâmicas de emissão de  $N_2O$  e  $CH_4$  e da comunidade microbiana

## 9.2 Materiais e métodos

### 9.2.1 Reator em bateladas sequenciais

Neste estudo foi utilizado RBS com volume útil de 2,3L (modelo New Brunswick<sup>TM</sup> Bioflo®/CelliGen® 115). A agitação do reator foi mantida a 70 rpm e o TDH foi de 31h. No início da operação, o sistema continha biomassa com atividade de NP/A, em virtude da operação descrita no Capítulo 6. Os ciclos operacionais do reator incluíram: (i) alimentação (5 min); (ii) reação (1.440 min); (iii) sedimentação (20 min) e (iv) descarte de efluente (5 min). O fluxo de afluente e efluente do reator foi realizado por ação da gravidade, dispensando o uso de bombas.

Um compressor de ar externo foi conectado ao RBS com temporizador para garantir aeração intermitente, com alternância entre períodos com e sem aeração. A vazão de ar foi controlada através de válvula reguladora conectada à mangueira de aeração e monitorada com auxílio de seringa esmerilhada. Não houve descarte de sólidos do sistema (exceto em situações em que parte destes foi arrastado pelo fluxo de saída de efluente do reator), ocasionando alto TDS.

### 9.2.2 Efluente anaeróbio doméstico e sobrenadante de lodo anaeróbio

O efluente anaeróbio doméstico utilizado para alimentação do RBS foi proveniente de reator UASB em escala de demonstração (14 m<sup>3</sup>) com TDH de 6 a 16h, localizado em Belo Horizonte, Brasil (latitude 19°53'04"S e longitude 43°52'04"W), no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento (CePTS) da UFMG. Deste mesmo sistema, foi coletado lodo de excesso (altura de 60 cm) para aplicação no RBS em conjunto com o efluente anaeróbio doméstico. Anteriormente à aplicação no RBS, o lodo de excesso foi centrifugado a 4000 rpm por 20 min e o sobrenadante foi misturado ao efluente anaeróbio doméstico em proporção de 1:3 (diluição de 4x). Os efluentes utilizados foram armazenados em recipientes sob 6°C e mantido por 1 a 5 semanas anteriormente à aplicação no sistema.

### 9.2.3 Estratégias operacionais do RBS

O RBS foi operado por 451 dias. Nos primeiros 250 dias (fase 1), o reator foi alimentado com efluente anaeróbio doméstico sob aeração intermitente (7 min on/ 14 min off). Do dia 251 ao dia 451 (fase 2), o sistema foi alimentado com efluente anaeróbio doméstico e sobrenadante de lodo anaeróbio na proporção de 3:1 (diluição de 4x) sob o mesmo regime de aeração intermitente (7 min on/ 14 min off). Ao longo de toda a operação, o RBS foi mantido sem

controle de temperatura, estando sob temperatura ambiente. Na fase 1, foram aplicadas vazões de ar de 0,034 a 0,052 L/min.L<sub>reator</sub> e na fase 2, de 0,012 a 0,130 L/min.L<sub>reator</sub>.

#### 9.2.4 Análises físico-químicas na fase líquida

Na fase líquida, foram coletadas amostras simples do afluente e efluente dos reatores RFC1 e RFC2. Foi analisado o pH e temperatura (°C) imediatamente após a coleta. Foram analisados compostos da série nitrogenada (NTK, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e NT), da série carbonácea (DQO e DBO) somente no RFC2, que recebeu efluente doméstico anaeróbico real, além da AT, em mg/L. Os procedimentos de armazenamento e análise foram realizados de acordo com APHA (2017).

#### 9.2.5 Análise de N<sub>2</sub>O e CH<sub>4</sub> na fase gasosa

Neste estudo, foram realizadas duas coletas para monitoramento de N<sub>2</sub>O e CH<sub>4</sub> no início e no final das fases 1 e 2. As amostras foram coletadas por cerca de 8 h, a partir do início do ciclo operacional (imediatamente após o final da alimentação do RBS). Amostras da fase líquida para análise de NTK, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e DQO foram realizadas no afluente e efluente do ciclo operacional e analisadas de acordo com (APHA, 2017).

As amostras de biogás foram divididas em i) períodos com aeração (no mínimo, 10 amostras), ii) períodos sem aeração (coletadas imediatamente após a coleta dos períodos com aeração), iii) biogás dissolvido no afluente utilizado para alimentação do RBS e iv) biogás dissolvido no RBS no início, após 7-8h de reação e no final do ciclo operacional. As duas últimas amostragens foram realizadas de acordo com Ribeiro et al. (2021). Foram calculadas a taxa (%) e o fluxo (mg/h.m<sup>2</sup>) de N<sub>2</sub>O e CH<sub>4</sub> de acordo com Ribeiro et al. (2021). A emissão de N<sub>2</sub>O e CH<sub>4</sub> foi calculada somando os valores obtidos nos períodos com e sem aeração.

#### 9.2.6 Variáveis microbiológicas

Nos dias 0, 70, 250 e 451 de operação do RBS, foram coletadas amostras de biomassa. As amostras foram lavadas com solução padrão de fosfato e centrifugadas a 8.000 rpm. A extração de DNA foi feita utilizando o kit Fast DNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, USA), de acordo com o procedimento do fabricante.

Foi realizada análise de SSV (de acordo com procedimentos de APHA, 2017) e análise de qPCR em todas as amostras coletadas. O n° de cópias/gSSV do gene RNAr 16s (anammox, *Nitrospira*, *Nitrobacter*) e genes funcionais (*AmoA* para BOA e *NosZ* para bactérias desnitrificantes que

convertem  $N_2O$  a  $N_2$ ) foram estimados através de PCR quantitativo (qPCR) utilizando mix *SYBR Green* e *primers* e plasmídeos (para curva padrão). Mais detalhes sobre coleta, primers utilizados e condições da qPCR foram previamente descritos por (PEREIRA et al., 2019a).

Amostras do final das fases 1 e 2 (dia 250 e dia 452) foram coletadas para análise da comunidade microbiana. A composição da comunidade microbiana foi realizada através de NGS utilizando a plataforma Illumina MiSeq (realizada por NGS Soluções Genômicas, São Paulo, Brasil). Para o NGS foram utilizados os primers 515Fe 806R da região V4 do gene RNAr 16s para os domínios Bacteria e Arquea (média de cobertura de 40.000 paired-end reads por amostra).

Para tratamento dos dados, as sequências brutas foram analisadas utilizando o software QUIIME™ 2.0. Sequências duplicadas, barcodes e sequências com tamanho inferior a 150 bp foram removidas. Quimeras e ruídos também foram removidos. Após o filtro de qualidade, as sequências remanescentes foram clusterizadas em Amplicon Sequence Variant (ASV) com nível de similaridade de 97%. As sequências representativas classificadas utilizando a plataforma BLASTn foram atribuídas taxonomicamente utilizando os bancos de dados RDP II (<http://rdp.cme.msu.edu>) e NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

### 9.3 Resultados e discussão

#### 9.3.1 Características do efluente anaeróbio doméstico e da mistura de efluente anaeróbio e lodo anaeróbio

As principais características do efluente anaeróbio doméstico e da mistura deste efluente com lodo anaeróbio são apresentadas na Tabela 9-1. Houve aumento expressivo nas concentrações medianas de  $N-NH_4^+$  e NT na mistura de efluente anaeróbio doméstico e lodo anaeróbio (88,4 e 115,5 mg/L, respectivamente) em relação às concentrações medianas de  $N-NH_4^+$  e NT do efluente anaeróbio doméstico (36,4 e 39,8 mg/L, respectivamente). As concentrações de  $NO_2^-$  e  $NO_3^-$  foram reduzidas (medianas menores que 1 mg/L), em virtude da ausência de nitrificação no reator UASB.

A carga volumétrica de NT afluente (90,4 mg/L.d) no presente estudo na fase 2 com a mistura de efluente anaeróbio doméstico com sobrenadante de lodo (concentração mediana de NT, volume do reator e vazão de 115,5 mg/L, 2,3 L e 1,8 L.d, respectivamente) foi próxima a carga volumétrica de NT de digestato de resíduos alimentares diluído quatro vezes utilizado por Gonçalves Piteira Carvalho et al. 2021) de 119,4 mg/L.d (considerando concentração mediana

de NT, volume do reator e vazão de 361,9 mg/L, 10 L e 3,3 L/d, respectivamente) e o valor observado por (PEREIRA et al., 2019a) de 67,9 mg/L.d (considerando concentração mediana de NT de 205,8 mg/L, volume de reator de 10L e vazão de 3,3 L.d), aplicados em reator de NP/A.

Tabela 9-1 – Caracterização do efluente anaeróbio doméstico e da combinação de efluente anaeróbio doméstico e sobrenadante de lodo de reator UASB (proporção de 3:1).

	Efluente anaeróbio doméstico (alimentação do RBS na fase 1)					Mistura de efluente anaeróbio doméstico e sobrenadante de lodo de reator UASB (3:1) (alimentação do RBS na fase 2)				
	n	Med	Máx	Mín	CV	n	Med	Máx	Mín	CV
Temperatura	43	23,3	28,60	18,50	0,1	29	22,3	25,6	20,9	0,1
pH	43	7,1	8,7	6,8	0,0	29	7,2	7,7	6,8	0,1
NTK (mg/L)	86	39,2	53,2	29,1	0,2	50	114,8	192,6	44,8	0,4
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/L)	86	36,4	53,2	24,1	0,2	50	88,4	131,6	40,3	0,4
N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	72	0,0	6,4	0,0	5,0	18	0,0	1,4	0,0	2,3
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	54	0,4	2,1	0,0	0,9	8	0,9	1,4	0,0	0,7
NT	86	39,8	54,3	29,1	0,1	50	115,5	192,6	44,8	0,4
AT (mg/L)	76	210,0	260,0	164,0	0,1	42	345,0	560,0	112,0	0,5
AT/NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	79	5,75	9,14	0,00	0,2	42	4,22	10,1	1,3	0,5
DQO (mg/L)	53	123,0	261,3	59,7	0,4	44	263,8	764,7	84,7	0,6
DBO (mg/L)	68	41,5	117,7	19,4	0,5	27	66,0	164,8	22,0	0,7
DQO/DBO	48	3,7	7,9	1,2	0,5	27	4,9	11,4	0,0	0,6
DQO/NT	52	3,1	5,4	1,6	0,3	27	2,3	2,0	0,2	0,7
DBO/NT	64	1,0	2,8	0,5	0,6	45	2,6	12,2	0,0	0,8

n: número de dados; Med: mediana; Máx: valor máximo; Mín: valor mínimo; CV: coeficiente de variação.

A relação DQO/NT do presente estudo (3,1 na fase 1 e 2,3 na fase 2) foram superiores às relações DQO/NT de digestato de resíduos alimentares diluído, aplicado em reator de NP/A em estudos prévios (1,4 a 2,1) (GONÇALVES PITEIRA CARVALHO et al., 2021; PEREIRA et al., 2019a). O aumento da relação C/N é considerado um fator potencial de degradação do processo anammox devido ao aumento da população de BDH, que competem com bactérias anammox por substratos.

Houve aumento da AT no afluente da fase 2 (345,0 mg/L) em relação ao efluente da fase 1 (210,0). No entanto, os valores medianos da relação AT/NH<sub>4</sub> dos afluentes das fases 1 e 2 foram de 5,75 e 4,22, sendo possível a aplicação da NP/A, onde a demanda de AT/NH<sub>4</sub> é de 3,57 (AHN, 2006). As concentrações de DQO e DBO na mistura de efluente anaeróbio doméstico e

lodo anaeróbio (medianas de 263,8 e 66,0 mg/L, respectivamente) também foram maiores em relação ao efluente anaeróbio doméstico (medianas de 123,0 e 41,5 mg/L, respectivamente).

### 9.3.2 Desempenho do RBS nas fases 1 e 2

O RBS foi operado por 451 dias sob aeração intermitente para NP/A. A operação foi dividida na fase 1 (dia 0 a 250, utilizando efluente anaeróbio doméstico para alimentação) e fase 2 (do dia 251 a 451, utilizando efluente anaeróbio doméstico e sobrenadante de lodo na proporção 3:1 para alimentação).

Os valores medianos de temperatura e pH nos respectivos efluentes do RBS nas fases 1 e 2 foram muito próximos, de 29,9°C, 7,1 e 22,7 e 7,2, respectivamente. No entanto, o aumento das concentrações afluentes de nitrogênio e matéria orgânica (em termos de DQO e DBO) ocasionaram diferenças no desempenho do RBS nas fases 1 e 2 (Tabela 9-2). Houve redução nas eficiências de remoção de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e NT entre as fases 1 (72 e 64%, respectivamente) e 2 (45 e 43%, respectivamente). Apesar deste resultado, a remoção de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e NT na fase 2 atingiu valores de até 97 e 86%, respectivamente. A remoção de NT na fase 1 foi similar a resultados obtidos (remoção de NT de 72 ± 11 %) em trabalho anterior (PEDROUSO et al., 2019), utilizando efluente doméstico de reator UASB em reator de NP/A.

Tabela 9-2 – Eficiência de remoção dos compostos nitrogenados e carbonáceos e consumo de alcalinidade (%) no RBS nas fases 1 e 2.

	Fase 1					Fase 2				
	n	Med	Máx	Mín	CV	n	Med	Máx	Mín	CV
NTK	86	71	100	18	0,4	50	46	93	-95	0,9
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	86	72	100	-7	0,4	50	45	97	-102	1,1
NT	86	64	96	-20	0,5	50	43	86	-95	1,2
AT	76	68	99	0	0,3	42	45	100	-21	0,8
DQO (mg/L)	42	51	88	-59	0,8	40	40	87	-99	1,5
DBO (mg/L)	68	49	84	-129	1,3	27	2	63	-140	28,9

n: número de dados; Med: mediana; Máx: valor máximo; Mín: valor mínimo; CV: coeficiente de variação

As eficiências máximas de NT nas fases 1 e 2 (96 e 86 %, respectivamente) são próximas à valores em RBS de NP/A como pós-tratamento de efluentes domésticos (81-87 % de remoção de NT) de estudos prévios (WU et al., 2020). Similar ao presente estudo, em estudo prévio, o

aumento das concentrações de NT ( $48,9 \pm 4,1$  para  $66,1 \pm 13,4$  mg/L) e de DQO ( $121,9 \pm 19,9$  para  $192,4 \pm 42,6$  mg/L) levaram à diminuição da remoção de NT (efluente de 4,8 para 35,2 mg/L) em estudo prévio em sistema de NP/A para efluente anaeróbio doméstico (JIN et al., 2019). Ao contrário, em sistemas com alta atividade desnitrificante heterotrófica, a redução da relação C/N (1,8 para 1,3) pode diminuir a remoção de NT (70 para 52%) (MALOVANY et al., 2015). No entanto, em sistemas de pós-tratamento de efluentes anaeróbios, a prioridade da utilização de matéria orgânica é usualmente para geração de  $\text{CH}_4$ , constituindo a aplicação da NP/A vantagem em virtude de que o processo não demanda carbono externo.

As cargas medianas removidas na fase 1 de  $\text{N-NH}_4^+$  e NT foram de 20,8 e 21,5 mg/L.d, respectivamente. Já as cargas medianas removidas na fase 2 de  $\text{N-NH}_4^+$  e NT foram de 24,4 e 32,2 mg/L.d, respectivamente. Apesar da diminuição de remoção de eficiência de nitrogênio e aumento da concentração de nitrogênio efluente na fase 2, nesta fase houve maior mediana de cargas de nitrogênio removidas, similares aos valores de carga de NT removida ( $37 \pm 3$  mg/L.d) obtida em estudo prévio (PEDROUSO et al., 2019), onde efluente anaeróbio doméstico foi aplicado em reator de NP/A.

A diminuição das eficiências de remoção ocasionou efluentes com qualidades distintas em termos de concentração de nitrogênio (Tabela 9-3). As concentrações medianas de  $\text{N-NH}_4^+$  e de NT no efluente na fase 1 foram de 9,8 e 15,3 mg/L, respectivamente. Estes valores estão dentro do padrão de lançamento de efluentes brasileiro, com limite de  $\text{N-NH}_4^+$  de 20 mg/L (BRASIL, 2011). No entanto, na fase 2, as concentrações medianas de  $\text{N-NH}_4^+$  e NT no efluente foram de 36,7 e 59,1 mg/L, respectivamente. Zhang et al. (2024) observaram resultados diferentes, com remoção de NT reduzida (de 85 para 75 %) ao reduzir a taxa de C/N afluente de 3,4 para 1,7. No presente estudo, as taxas de DBO/NT nas fases 1 e 2 foram de 1,0 e 2,6, respectivamente.

Os valores medianos do coeficiente de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  foram de 0,13 e 0,18 nas fases 1 e 2, respectivamente. Na fase 1, este valor foi próximo ao valor da reação de NP/A de 0,11 (AHN, 2006). Portanto, apesar da diminuição da remoção de  $\text{N-NH}_4^+$  e de NT na fase 2, houve aumento da produção de  $\text{N-NO}_3^-$ , caracterizando nitrificação total. Já os valores medianos do coeficiente de  $\text{AT}_c/\text{NH}_4^+$  na fase 2 (3,55) foram menores em relação à fase 1 (4,43) e mais próximos ao valor da reação de NP/A (3,57, Ahn, 2006). Este resultado está de acordo com a diminuição do consumo de alcalinidade entre as fases 1 (68%) e 2 (45%).

Também houve diminuição na remoção de matéria orgânica na fase 2 em comparação com a fase 1, sendo esta diminuição mais acentuada para DBO (medianas de 49% na fase 1 e de 2% na fase 2). A concentração mediana de DBO efluente na fase 2 (128,1 mg/L) esteve próxima do limite de lançamento brasileiro de até 120mg/L (BRAZIL, 2011), mas não atendeu a este padrão.

Tabela 9-3 – Concentrações das variáveis (mg/L) e coeficientes cinéticos do efluente do RBS na fase 1 e 2.

	Fase 1					Fase 2				
	n	Med	Máx	Mín	CV	n	Med	Máx	Mín	CV
NTK	86	11,8	31,9	0,0	0,7	50	37,0	235,8	6,7	0,8
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/L)	86	9,8	30,8	0,0	0,8	50	36,7	116,5	4,5	0,7
N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	86	0,0	3,5	0,0	2,2	50	0,0	12,7	0,0	4,4
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	80	3,6	22,3	0,0	1,0	33	10,0	48,1	0,0	1,1
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> <sub>r</sub>	80	0,13	1,89	-4,90	4,0	33	0,18	4,76	-0,07	2,14
NT (mg/L)	86	15,3	46,9	1,6	0,6	50	59,1	236,1	14,0	0,7
AT (mg/L)	79	74,4	200,0	2,0	0,5	42	150,0	550,0	2,0	0,9
AT <sub>c</sub> /NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> <sub>c</sub>	79	4,43	10,45	-2,35	0,4	42	3,55	19,64	-0,68	1,0
DQO (mg/L)	54	49,7	354,7	16,3	0,8	40	128,0	549,7	34,7	0,8
DBO (mg/L)	68	27,0	86,9	3,7	0,6	27	69,5	189,0	8,2	0,7

n: número de dados; Med: mediana; Máx: valor máximo; Mín: valor mínimo; CV: coeficiente de variação.

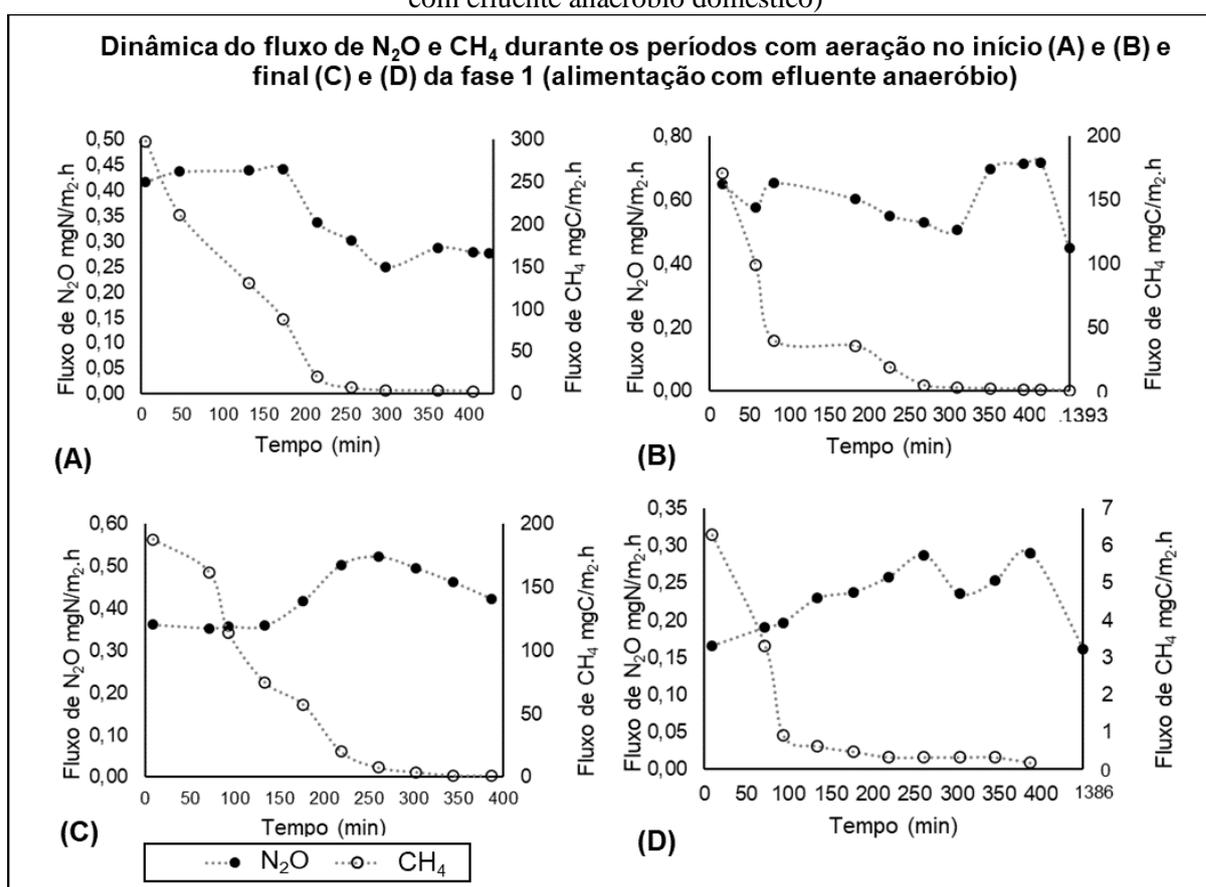
### 9.3.3 Dinâmica de N<sub>2</sub>O e CH<sub>4</sub>

Na fase 1 (alimentação com efluente anaeróbico doméstico sob aeração intermitente de 7 min on/14min off), durante os períodos sob aeração, o fluxo de CH<sub>4</sub> variou de 0 a 300 mg/m<sup>2</sup>.h, com concentração dos maiores valores no início do ciclo operacional e decaimento gradual ao longo do ciclo (Figura 9-1). Já o fluxo de N<sub>2</sub>O variou de 0 a 0,77 mg/m<sup>2</sup>.h, com aumento gradual no início do ciclo operacional e redução ao final do monitoramento (Figura 9-1).

Considerando os fluxos de CH<sub>4</sub> e N<sub>2</sub>O durante os períodos sem aeração na fase 1 (Figura 9-2), a emissão de N<sub>2</sub>O foi inferior à emissão de CH<sub>4</sub> em todos os dias de monitoramento, assim como nos períodos com aeração. Adicionalmente, também foi observada a redução gradual na emissão de CH<sub>4</sub> até atingir valores nulos ao longo do ciclo e também picos de emissão de N<sub>2</sub>O. Os valores de fluxo de CH<sub>4</sub> (0 a 5 mg/m<sup>2</sup>.h) e de N<sub>2</sub>O (0 a 10,5 µg/m<sup>2</sup>.h) nos períodos sem aeração foram inferiores em comparação aos resultados dos períodos com aeração.

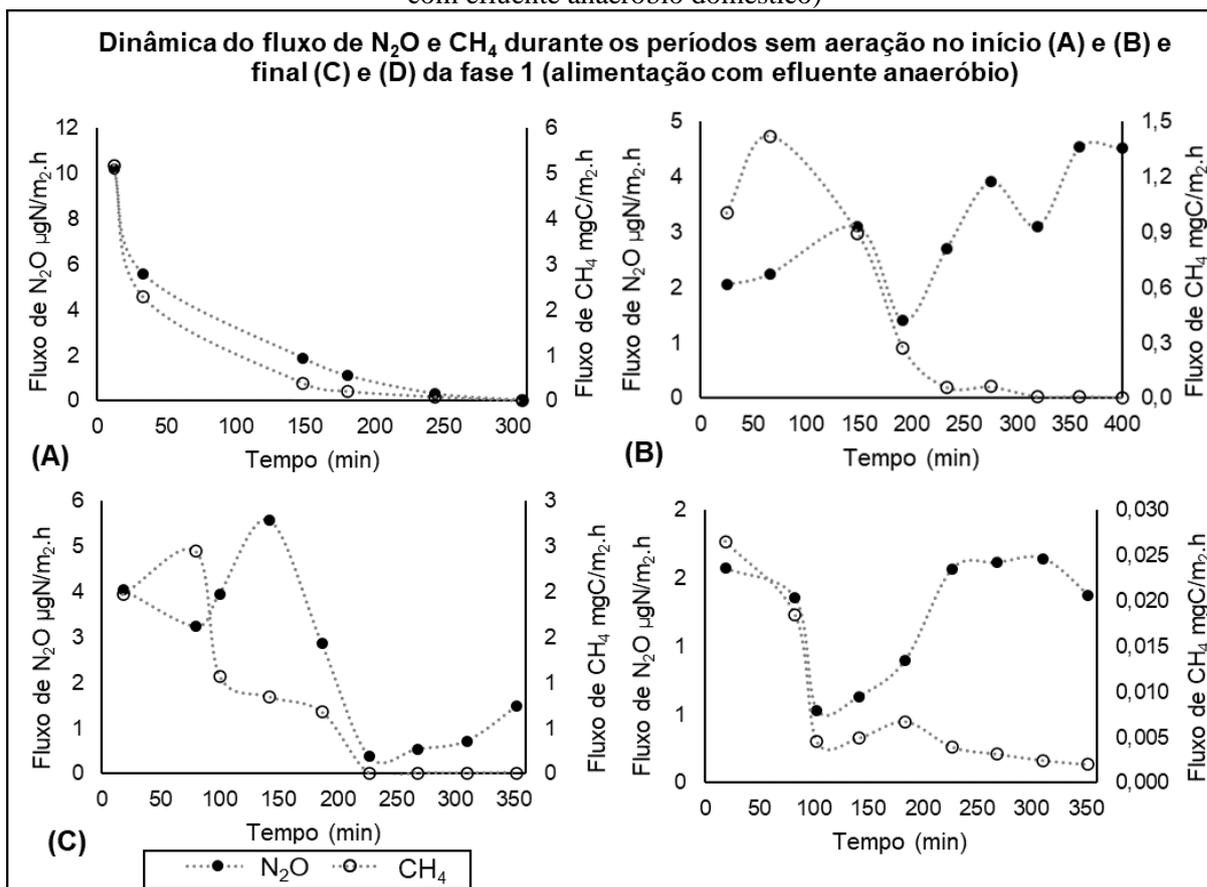
De acordo com Al-hazmi et al. (2021), a aeração pode resultar no aumento da produção e da emissão de  $N_2O$ , tanto por favorecer o desprendimento de gases da fase líquida, quanto por aumentar o consumo de  $N-NH_4^+$ . No entanto, os autores ressaltam que períodos longos sem aeração são cruciais para estabelecer a NP/A e reduzir a emissão de  $N_2O$ . O presente estudo corrobora com estes resultados, uma vez que na fase 1 o valor mediano da relação  $NO_3^-$  produzido/ $NH_4^+$  consumido de 0,13, próximo ao coeficiente da NP/A, juntamente com a eficiência mediana de NT de 64% implicam que o processo de NP/A foi estabelecido com sucesso, com fluxo de emissão de  $N_2O$  de até 0,77  $mg/m^2.h$ .

Figura 9-1 - Dinâmica do fluxo de  $N_2O$  e  $CH_4$  durante os períodos com aeração na fase 1 (alimentação com efluente anaeróbio doméstico)



Na fase 2 (alimentação com efluente anaeróbio doméstico e lodo anaeróbio sob aeração intermitente de 7 min ob/14 min off), durante os períodos sob aeração, o fluxo de  $CH_4$  variou entre 3.200 a 0  $mg/m^2.h$ . Foi observada diminuição gradual na emissão de  $CH_4$  durante os períodos com aeração ao longo do ciclo operacional. O fluxo de  $N_2O$  durante os períodos com aeração na fase 2 variou de 9 a 0,8  $mg/m^2.h$ . Apesar do menor fluxo em relação ao fluxo de  $CH_4$ , foram observados aumentos graduais no fluxo de  $N_2O$  ao longo da operação (Figura 9-3).

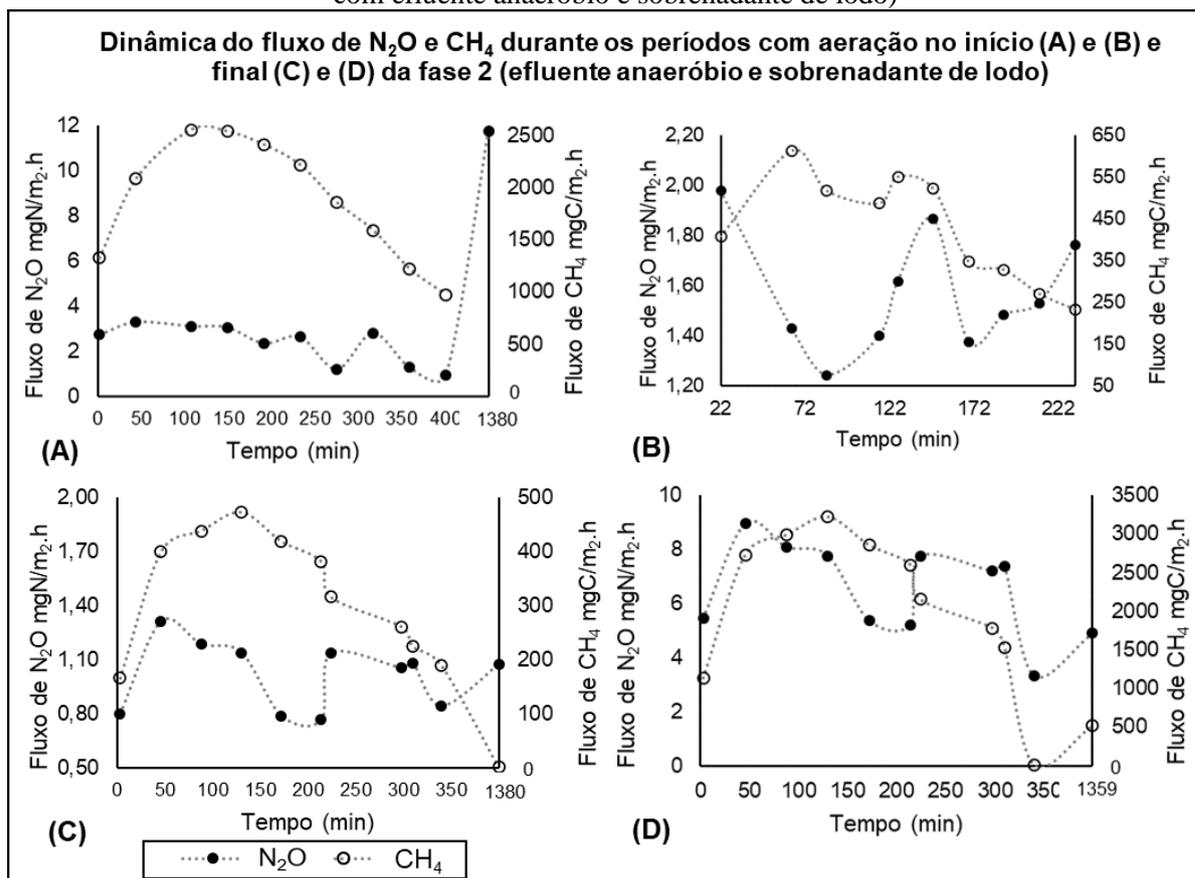
Figura 9-2 - Dinâmica do fluxo de  $N_2O$  e  $CH_4$  durante os períodos sem aeração na fase 1 (alimentação com efluente anaeróbio doméstico)



O aumento gradual de emissão de  $N_2O$  observado no presente estudo está em acordo com os resultados obtidos em estudo prévio em RBS com aeração intermitente para NP/A tratamento efluente doméstico, onde houve aumento da emissão  $N_2O$  ao longo do ciclo nas primeiras dez horas de operação, com valores de 1 a 1,2 mg/L (AL-HAZMI et al., 2021). O aumento da emissão de  $N_2O$  no início do ciclo operacional pode ser explicado pelo aumento das cargas de nitrogênio e DQO (uma vez que o reator funcionava em bateladas sequenciais), propiciando a desnitrificação parcial, ainda que os valores de emissão de  $N_2O$  observados tenham sido reduzidos.

Nos períodos sem aeração ao longo da fase 2, houve redução acentuada no fluxo de  $CH_4$  (de 6 a 0  $\text{mg}/\text{m}^2\cdot\text{h}$ ) em relação aos períodos com aeração. Assim como nos períodos com aeração, houve diminuição gradual de  $CH_4$  nos períodos sem aeração ao longo do ciclo operacional do RBS. O fluxo de  $N_2O$  também apresentou acentuada diminuição nos períodos sem aeração (de 16 a 0,5  $\mu\text{g}/\text{m}^2\cdot\text{h}$ ) em relação aos períodos com aeração. Em três dias de monitoramento, de quatro da fase 2, o pico de emissão de  $N_2O$  no período sem aeração foi observado ao final do ciclo operacional (Figura 9-4).

Figura 9-3 – Dinâmica do fluxo de  $N_2O$  e  $CH_4$  durante os períodos com aeração na fase 2 (alimentação com efluente anaeróbio e sobrenadante de lodo)



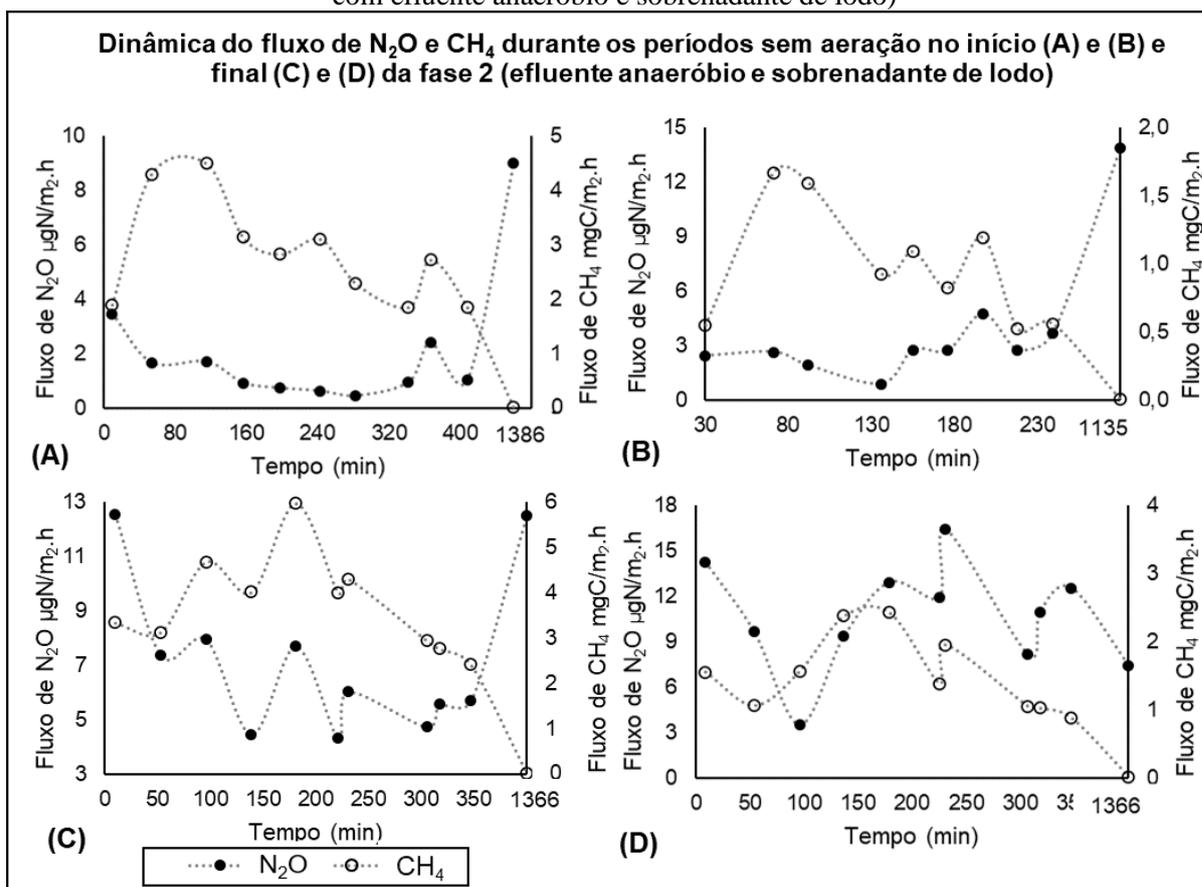
Em termos de comparação de emissão de  $CH_4$  e  $N_2O$  nas fases 1 (alimentação com efluente anaeróbio) e 2 (alimentação com efluente anaeróbio e sobrenadante de lodo), o aumento de carga de nitrogênio total e DQO na fase 2 em relação à fase 1 ocasionou o aumento na emissão destes gases, incluindo os períodos com e sem aeração, e a taxa de emissão por carga afluente e por carga removida (Tabela 9-4).

As medianas de emissão de  $N_2O$  nos períodos com aeração foram de 0,005 e 0,038 mg/ciclo nas fases 1 e 2, respectivamente. Já as medianas de emissão de  $N_2O$  nos períodos sem aeração foi de 0,000 e 0,001 mg/ciclo nas fases 1 a 2, respectivamente. As medianas de taxa de emissão de  $N_2O$  por carga de nitrogênio total afluente nas fases 1 e 2 foram de 0,006 e 0,021%, respectivamente. E as medianas de taxa de emissão de  $N_2O$  por carga de nitrogênio total removida nas fases 1 e 2 foram de 0,006 e 0,114 %, respectivamente.

As medianas de emissão de  $CH_4$  nos períodos com aeração foram de 0,423 e 7,127 mg/ciclo nas fases 1 e 2, respectivamente. Já as medianas de emissão de  $CH_4$  nos períodos sem aeração foi de 0,065 e 0,265 mg/ciclo nas fases 1 a 2, respectivamente. As medianas de taxa de emissão

de  $\text{CH}_4$  por carga de DQO afluente nas fases 1 e 2 foram de 0,164 e 1,022 %, respectivamente. E as medianas de taxa de emissão de  $\text{CH}_4$  por carga de DQO removida nas fases 1 e 2 foram de 0,221 e 1,313 %, respectivamente. A maior emissão de  $\text{CH}_4$  em relação à emissão de  $\text{N}_2\text{O}$  está de acordo com estudo prévio que observou que o  $\text{CH}_4$  dissolvido em efluentes anaeróbios é a principal causa de produção de GEE, especialmente em efluentes de baixa carga, como os domésticos (CAKIR; STENSTROM, 2005).

Figura 9-4 - Dinâmica do fluxo de  $\text{N}_2\text{O}$  e  $\text{CH}_4$  durante os períodos sem aeração na fase 2 (alimentação com efluente anaeróbio e sobrenadante de lodo)



Os valores de emissão de  $\text{N}_2\text{O}$  obtidos no presente estudo são menores em relação a trabalho prévio de investigação de NP/A sob aeração intermitente em reatores múltiplos de tanques anóxicos/óxicos, onde foi observada remoção máxima de NT de 91,5% e emissão de  $\text{N}_2\text{O}$  de 60,7%, principalmente durante a nitrificação e acentuada pela presença de compostos orgânicos (SUN et al., 2019).

Na fase 1, a carga de NT removida e emissão de  $\text{N}_2\text{O}$  por carga removida foram de 77,6  $\text{mg}/\text{ciclo}$  e 0,006%, respectivamente. Na fase 2, a carga de NT removida e emissão de  $\text{N}_2\text{O}$  por carga de NT removida foram de 42,3 e 0,114%. Portanto, a diminuição da carga de NT

removida ocasionou aumento da emissão de N<sub>2</sub>O, o que está em contraste com estudo prévio Al-hazmi et al. (2021) que a taxa de produção de N<sub>2</sub>O foi independente da taxa de remoção de amônio. Considerando o aumento da atividade nitrificante, observado indiretamente pelos aumentos da relação NO<sub>3</sub><sup>-</sup><sub>produzido</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup><sub>consumido</sub> e da concentração de DQO e DBO na fase 2, a maior emissão de N<sub>2</sub>O pode ter sido favorecida pelo aumento da nitrificação e favorecimento de BDH pela maior disponibilidade de matéria orgânica no reator.

Tabela 9-4 – Valores medianos de emissão de N<sub>2</sub>O e CH<sub>4</sub> nas fases 1 (alimentação com efluente anaeróbico doméstico) e fase 2 (alimentação com efluente anaeróbico doméstico e sobrenadante de lodo na proporção 3:1).

	Fase 1		Fase 2	
	N <sub>2</sub> O	CH <sub>4</sub>	N <sub>2</sub> O	CH <sub>4</sub>
Com aeração (mg/ciclo)	0,005	0,423	0,038	7,127
Sem aeração (mg/ciclo)	0,000	0,065	0,001	0,265
Total emitido (mg/ciclo)	0,006	0,488	0,039	7,273
Taxa de emissão/carga afluente (%)	0,006	0,164	0,021	1,022
Taxa de emissão/carga removida (%)	0,006	0,221	0,114	1,313
	NT	DQO	NT	DQO
Carga aplicada (mg/ciclo)	87,190	312,845	168,850	707,400
Carga removida (mg/ciclo)	77,595	218,995	42,300	519,000

#### 9.3.4 Abundância relativa de microorganismos do ciclo do nitrogênio (qPCR)

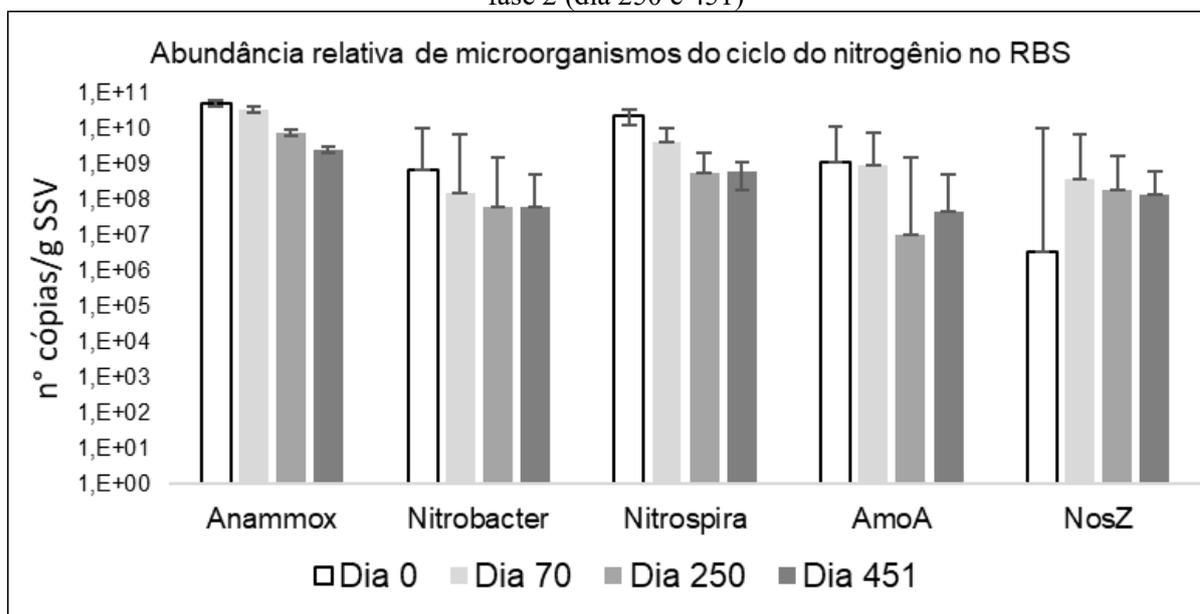
Os resultados da qPCR mostraram diminuição gradual da abundância relativa de bactérias anammox, BON dos gêneros *Nitrobacter* e *Nitrospira*, BOA (considerando o gene funcional *AmoA* ao longo da operação do RBS e o aumento de BDH nos dias 70, 250 e 451 em relação ao início da operação (Figura 9-5).

A maior abundância de bactérias anammox ( $5,40 \times 10^{10} \pm 5,64 \times 10^9$ ) foi obtida no dia 0. Ao final da fase 1 ao final da fase 2, as abundâncias de bactérias anammox foram de  $7,91 \times 10^9 \pm 1,68 \times 10^8$  e de  $2,62 \times 10^9 \pm 3,89 \times 10^8$  n° de cópias/gSSV, respectivamente. Os valores de abundância de bactérias anammox observados neste estudo são similares a valor ( $7,83 \times 10^8 \pm 4,29 \times 10^4$  n° de cópias/gSSV) observado em sistema de NP/A com aeração intermitente de 8 min on/21 min off, alimentado com efluente doméstico. A diminuição da abundância de bactérias anammox com o aumento de carga na fase 2 (DBO/NT de 2,6) em relação à fase 1 (DBO/NT de 1,0) está

em contraste com os resultados obtidos por Zhang et al. (2024), que observaram ligeiro aumento da abundância de bactérias anammox de  $1,3 \times 10^9$  para  $2,0 \times 10^9$  ao aumentar a taxa C/N de 1,7 para 2,9.

A abundância de BON no gênero *Nitrospira* foi maior do que o gênero *Nitrobacter* em todas as amostras de qPCR. Estes resultados demonstram a vantagem do gênero *Nitrospira* em relação a *Nitrobacter* nas condições operacionais adotadas no presente estudo (aeração intermitente e redução da disponibilidade de OD). As abundâncias relativas iniciais (dia 0) de *Nitrobacter* e *Nitrospira* foram de  $7,08 \times 10^8 \pm 7,91 \times 10^7$  e  $2,42 \times 10^{10} \pm 1,73 \times 10^9$  n° de cópias/gSSV, respectivamente, foram as maiores para estes grupos. Ao longo da fase 1 (até o dia 250), houve diminuição gradual de *Nitrobacter* e *Nitrospira*, que voltaram a aumentar ao final da fase 2 (dia 451), com abundâncias relativas de  $6,61 \times 10^7 \pm 1,00 \times 10^6$  e  $6,87 \times 10^8 \pm 3,96 \times 10^7$  n° de cópias/gSSV.

Figura 9-5 – Abundância relativa de microorganismos do ciclo do nitrogênio (n° de cópias/gSSV) no RBS ao longo da operação, incluindo duas amostras da fase 1 (dia 0 e dia 70) e duas amostras da fase 2 (dia 250 e dia 451)



A abundância relativa de BOA (avaliada pelo gene funcional *AmoA*) diminuiu ao longo da fase 1 ( $1,23 \times 10^9 \pm 7,04 \times 10^7$  e  $1,12 \times 10^7 \pm 3,27 \times 10^5$  n° de cópias/gSSV nos dias 0 e 250, respectivamente e aumentou no final na fase 2 ( $4,70 \times 10^7 \pm 6,37 \times 10^6$  n° de cópias/gSSV). Estes resultados indicam que durante a fase 1 (alimentação com efluente anaeróbio sob aeração intermitente), a comunidade de BOA e BON foi reduzida e que as condições operacionais adotadas na fase 2 (alimentação com efluente anaeróbio doméstico e lodo anaeróbio sob aeração intermitente) favoreceu estes grupos.

Estudo prévio de NP/A com aeração intermitente para remoção de nitrogênio de efluente doméstico mostrou a tendência dos gêneros de NOB *Nitrospira* e *Nitrobacter* (principalmente o primeiro) em ter maiores abundâncias relativas em relação a BOA (*AmoA*) (MIAO et al., 2020). No presente estudo, na maioria das amostras, a abundância dos gêneros de BON *Nitrobacter* e *Nitrospira* foi superior à abundância do gene funcional *AmoA* de BOA. BON são capazes de resistir em sistemas com escassez de aeração, como reatores com pequenas vazões de ar aplicadas e aeração intermitente, por exemplo, e podem levar vantagem sobre BOA, uma vez que a afinidade por oxigênio de BON é maior do que de BOA, com constantes de meia saturação por oxigênio de 0,05 e 0,41 mg/L, respectivamente ((MALOVANYYY et al., 2015).

Mesmo com o aumento de carga orgânica em virtude da alimentação com efluente anaeróbio doméstico e lodo anaeróbio na fase 2, a abundância de BDH (considerando o gene funcional *NosZ*) diminuiu ao final desta fase ( $1,41 \times 10^8 \pm 3,85 \times 10^7$ ) em relação ao final da fase 1 ( $2,01 \times 10^8 \pm 3,78 \times 10^6$ ). Estes resultados corroboram com a menor eficiência de remoção de DBO (mediana de 2%) na fase 2, demonstrando que organismos heterotróficos não foram favorecidos nesta fase.

### 9.3.5 Diversidade microbiana (NGS)

A diversidade microbiana foi investigada através da análise de NGS das amostras do final da operação das fases 1 e 2. Os microrganismos do ciclo do nitrogênio e bactérias metanotróficas com abundância igual ou superior a 1% em pelo menos uma das amostras são apresentados na Tabela 9-5. Tanto na fase 1 quanto na fase 2, foi observada maior abundância (%) de BDH, bactérias anammox, BOA/AOA, BON e bactérias metanotróficas, nesta ordem.

O gênero dominante de bactérias anammox foi *Ca. Brocadia*, com abundâncias relativas de 13,8 e 9,1% ao final das fases 1 e 2, respectivamente. A dominância de bactérias anammox do gênero *Ca. Brocadia* é comumente encontrada em sistemas de NP/A de duplo estágio (6-13%) (JIN et al., 2019; JUAN-DÍAZ; PÉREZ; CARRERA, 2021) estágio único com aeração intermitente (2,4 a 8,7% e 1,9 a 3,7%) (AL-HAZMI et al., 2021; GONÇALVES PITEIRA CARVALHO et al., 2021).

Dentre os microrganismos oxidadores de amônio identificados, com abundância relativa nas fases 1 e 2 de 12,7 e 7,8 %, respectivamente, os gêneros *Ellin6067*, *Nitrosomonas* e *MND1* pertencentes à família Nitrosomonadaceae tiveram abundâncias relativas maiores na fase 1,

enquanto o gênero *mle1-7* da família Nitrosomonadaceae e AOA do gênero *Ca. Nitrocosmicus* apresentaram maiores abundâncias relativas na fase 2.

Tabela 9-5 – Diversidade microbiana do RBS ao final das fases 1 (dia 250) e 2 (dia 451), com microrganismos do ciclo do nitrogênio e de bactérias metanotróficas (abundância igual ou superior a 1% em pelo menos uma das amostras)

Domínio	Classe	Família	Gênero	RBS dia 250	RBS dia 451
<b>Anammox</b>					
Bacteria	Brocadiae	Brocadaceae	<i>Ca. Brocadia</i>	13,8	9,1
<b>Total</b>				<b>13,8</b>	<b>9,1</b>
<b>BOA e AOA</b>					
Archaea	Nitrososphaeria	Nitrososphaeraceae	<i>Ca. Nitrocosmicus</i>	3,2	4,1
Bacteria	Gammaproteobacteria	Nitrosomonadaceae	<i>Ellin6067</i>	4,1	0,7
Bacteria	Gammaproteobacteria	Nitrosomonadaceae	<i>Nitrosomonas</i>	3,6	1,5
Bacteria	Gammaproteobacteria	Nitrosomonadaceae	<i>mle1-7</i>	0,5	1,2
Bacteria	Gammaproteobacteria	Nitrosomonadaceae	<i>MND1</i>	1,3	0,4
<b>Total</b>				<b>12,7</b>	<b>7,8</b>
<b>BON</b>					
Bacteria	Nitrospira	Nitrospiraceae	<i>Nitrospira</i>	2,8	3,8
<b>Total</b>				<b>2,8</b>	<b>3,8</b>
<b>BDH</b>					
Bacteria	Gammaproteobacteria	Rhodocyclaceae	<i>Denitratisoma</i>	6,1	13,6
Bacteria	Gammaproteobacteria	Comamonadaceae	<i>Ottowia</i>	0,8	1,3
Bacteria	Gammaproteobacteria	Rhodanobacteraceae	<i>Rhodanobacter</i>	0,4	3,2
Bacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiaceae	<i>Limnobacter</i>	4,5	2,9
Bacteria	Ignavibacteria	Ignavibacteriaceae	<i>Ignavibacterium</i>	5,0	1,9
Bacteria	Bacteroidia	Chitinophagaceae	<i>Ferruginibacter</i>	2,0	1,4
Bacteria	Gammaproteobacteria	Comamonadaceae	<i>Methylibium</i>	4,2	1,1
Bacteria	Bacteroidia	Chitinophagaceae	<i>Sediminibacterium</i>	0,0	2,2
Bacteria	Polyangia	Haliangiaceae	<i>Haliangium</i>	1,9	0,1
Bacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	1,9	3,0
Bacteria	Gammaproteobacteria	Rhodocyclaceae	<i>Azovibrio</i>	1,1	0,2
Bacteria	Holophagae	Holophagaceae	<i>Geothrix</i>	1,4	0,1
Bacteria	Anaerolineae	Anaerolineaceae	<i>Anaerolinea</i>	0,3	1,7
Bacteria	Gammaproteobacteria	Rhodocyclaceae	<i>Sterolibacterium</i>	0,5	1,5
Bacteria	Omnitrophia	Omnitrophaceae	<i>Ca. Omnitrophus</i>	4,0	0,9
Bacteria	Gammaproteobacteria	Rhodocyclaceae	<i>Sulfuritalea</i>	2,4	0,2
Bacteria	Bdellovibrionia	Bdellovibrionaceae	<i>Bdellovibrio</i>	1,2	0,8
<b>Total</b>				<b>37,5</b>	<b>36,1</b>
<b>Bactérias metanotróficas</b>					
Bacteria	Gammaproteobacteria	Methylomonadaceae	<i>Methylosarcina</i>	1,6	1,2
<b>Total</b>				<b>1,6</b>	<b>1,2</b>

O gênero *Nitrospira* foi dominante como grupo de BON, com abundâncias de 2,8 e de 3,8 % nas fases 1 e 2, respectivamente, caracterizando o único grupo microbiano do ciclo do nitrogênio com aumento na abundância relativa na fase 2 em comparação à fase 1. O aumento deste gênero na fase 2 corrobora os resultados da qPCR que também evidenciaram o aumento do n° de cópias/gSSV deste gênero na fase 2, bem como o aumento da relação  $\text{NO}_3^-$  produzido/ $\text{NH}_4^+$  consumido na fase 2 (mediana de 0,18) em relação ao valor obtido na fase 1 (mediana de 0,13).

Bactérias do gênero *Nitrospira* têm vantagem com o aumento da taxa C/N (ZHANG et al., 2024), o que foi observado também por Jin et al. (2019), com percentuais de até 5% sob o aumento de DQO de 121,9 para 192,4 mg/L. No presente estudo, com o aumento de de DBO/NT de 1,0 para 2,6 nas fases 1 e 2, respectivamente, houve incremento de 2,8 % para 3,8% da abundância de *Nitrospira*, respectivamente.

Dentre as BDH, 17 gêneros apresentaram abundâncias expressivas (maior ou igual a 1%), caracterizando o grupo mais abundante em percentual e em número de indivíduos. Os gêneros de BDH *Denitratisoma*, *Ottowia*, *Rhodanobacter*, *Sediminibacterium*, *Pseudomonas*, *Anaerolinea* e *Sterolibacterium* tiveram suas abundâncias relativas aumentadas na fase 2, enquanto os gêneros *Limnobacter*, *Ignavibacterium*, *Ferruginibacter*, *Methylibium*, *Haliangium*, *Azovibrio*, *Geothrix*, *Ca. Omnitrophus*, *Sulfuritalea* e *Bdellovibrio* foram mais abundantes na fase 1.

Nas fases 1 e 2, as abundâncias de anammox (13,8 e 9,6 %, respectivamente), BOA (12,7 e 7,8 %, respectivamente), BON (2,8 e 3,8 %, respectivamente) e BDH (37,5 e 36,1 %, respectivamente) estiveram em contraste com estudos prévios em sistemas SNAD (abundâncias de anammox, BOA, BON e BDH de 0,5,1,3, 0,8 e 18,4 %, respectivamente). Embora BDH tenham sido mais abundantes no presente estudo (devido ao enriquecimento com lodos ativados e alimentação com efluente anaeróbio contendo matéria orgânica), houve melhor bioaumentação de bactérias anammox.

Microrganismos do gênero *Sediminibacterium* (14 %) e das famílias Rhodocyclaceae (12,4 %), Anareolinaceae (6 %) foram identificados em reator com meio suporte composto de espuma de poliuretano (COSTA et al., 2022). Foi observado aumento de abundância de família Anareolineceae (8%) com o aumento de carga de efluente em estudos prévios (JIN et al., 2019). O aumento de carga de matéria orgânica na fase 2, com a adição de lodo anaeróbio, ocasionou

mudanças na comunidade microbiana do sistema, com diminuição da abundância de bactérias anammox. A adição de matéria orgânica ocasiona a redução de bactérias anammox, principalmente pelo favorecimento de BDH, que competem com bactérias anammox pelo substrato (ZHANG et al., 2020). O gênero *Pseudomonas* foi identificado em estudo prévio como produtor de N<sub>2</sub>O, devido à sua capacidade de redução incompleta de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (SUN et al., 2019). No entanto, no presente estudo, a abundância máxima deste gênero foi de 3% na fase 2.

Bactérias do gênero *Methylosarcina* foram identificadas nas fases 1 e 2, com abundâncias relativas de 1,6 e 1,2 %, respectivamente. Este gênero compreende bactérias metanotróficas capazes de assimilar CH<sub>4</sub> (KOLB et al., 2003). A presença destes microrganismos está de acordo com os resultados de fluxo de emissão de CH<sub>4</sub>, com diminuição gradual ao longo do ciclo operacional, indicando que este gás estaria sendo consumido no reator, além da própria emissão eliminá-lo do sistema.

#### 9.4 Conclusões

O processo de NP/A foi implementado com sucesso em efluente anaeróbio doméstico, com valores medianos de remoção de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e NT de 72 e 64 %, respectivamente. A aplicação conjunta de efluente anaeróbio doméstico e sobrenadante de lodo na proporção de 3:1 ocasionou a redução da remoção de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e NT (valores medianos de 45 e 43 %, respectivamente), onde a emissão de N<sub>2</sub>O e de CH<sub>4</sub> correspondeu à 0,021 e 1,022 % da carga de NT e DQO aplicada, e a 0,114 e 1,313 % da carga de NT e DQO removida. A abundância de anammox, BOA (*AmoA*) e BDH (*NosZ*) diminuiu, enquanto a abundância de BON (*Nitrobacter* e *Nitrospira*) aumentou na fase 2 em relação à fase 1. *Ca. Brocadia* foi o gênero anammox dominante, enquanto *Nitrospira* predominou como BON. 17 gêneros de BDH foram identificados, caracterizando a maior abundância entre os grupos do ciclo do nitrogênio em percentual e em diversidade de gêneros.

## 10 CONCLUSÕES GERAIS

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

1) O processo anammox foi aplicado com sucesso para remoção de nitrogênio de efluente anaeróbio doméstico, mesmo com a redução da temperatura de 35°C para temperatura ambiente (20-29 °C) (remoção mediana de NT foi de 75%). Para NP/A, a melhor estratégia de aeração foi de 7 min on/14 min off, com remoções medianas de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e NT de 66 e 59%, respectivamente. A abundância de bactérias anammox durante o estudo permaneceu na ordem de magnitude de 10<sup>9</sup> a 10<sup>10</sup> cópias/gSSV.

Estes resultados confirmam a possibilidade da aplicabilidade do processo de NP/A em efluentes domésticos provenientes de tratamentos anaeróbios, o que tem sido um grande desafio devido à baixa concentração de nitrogênio nestes efluentes em relação à centrados de lodo, e também à maior presença de matéria orgânica. Além disso, a temperatura ambiente do Sudeste brasileiro foi propícia para o desenvolvimento do processo, demonstrando o grande potencial da extensão da aplicação de NP/A em outras localidades brasileiras e em países de clima tropical e subtropical.

2) Apesar das diferentes estratégias operacionais estabelecidas para NP/A (1 min on/14 min off, 5 min on/14 min off e 7 min on/14 min off), resultando em desempenhos diferentes quanto à remoção de NT e DQO, a dinâmica de emissão de N<sub>2</sub>O e CH<sub>4</sub> apresentou similaridades. De maneira geral, houve maior emissão de CH<sub>4</sub> do que de N<sub>2</sub>O. Nos períodos com aeração, a emissão de CH<sub>4</sub> foi decrescente até ser nula, enquanto a emissão de N<sub>2</sub>O apresentou picos no início e no final das amostragens. A medida em que os tempos aerados foram aumentados (1 a 7 min da fase 5 a 7), a emissão (%) de N<sub>2</sub>O diminuiu e a de CH<sub>4</sub> aumentou. O grupo microbiano mais abundante, em termos de número de gêneros, na comunidade microbiana foram as BDH, com 28 gêneros. Bactérias anammox representaram até 53,6% da comunidade microbiana.

Estes resultados demonstram que a NP/A é capaz de emitir baixos teores de GEEs como N<sub>2</sub>O e CH<sub>4</sub>. Isto implica na sustentabilidade do processo de NP/A não só do ponto de vista econômico e da alta eficiência para remover nitrogênio da fase líquida, mas também da fração gasosa (biogás).

3) É possível estabelecer a partida de novos sistemas anammox após 40-70 dias de inoculação com lodos ativados, incluindo reatores com alimentação com meio de cultura autotrófico

(RFC1) e reatores alimentados com efluente anaeróbio doméstico real sob aeração (RFC2). As remoções medianas de  $\text{N-NH}_4^+$  foram de 91 e 72% e para NT foram de 63 e 45%, respectivamente, no RFC1 e RFC2. Houve maior abundância de BOA na biomassa aderida e de BDH na biomassa dispersa em ambos os reatores. Foi observada alta abundância de bactérias anammox do RFC2 após 51 dias de operação (25,9 %), e maior abundância de bactérias anammox no RFC2 em relação ao RFC1.

O gênero anammox dominante foi *Ca. Brocadia*. Este trabalho mostra a possibilidade de bioaumentar biomassa anammox em novos sistemas de NP/A com lodos ativados, sem a necessidade de inóculo proveniente de sistemas anammox e sem a necessidade de aclimação do sistema com meio de cultura autotrófico, o que implica em contribuições reais para a maior aplicação do processo anammox em ETEs.

Estes resultados demonstram que novos reatores anammox podem ser inoculados sem a presença de biomassa com alta atividade anammox, como por exemplo, proveniente de outros sistemas anammox. Este é um dado interessante para aplicabilidade de sistemas de NP/A em locais como o Brasil, onde há escassez de reatores anammox em escala de demonstração ou plena, de onde poderia ser retirado o inóculo para novos reatores anammox.

Além disso, a rápida atividade anammox em sistemas alimentados com efluente real desde a partida torna promissora a aplicação de novos sistemas anammox em escala real, onde a necessidade de alimentação com meio de cultura autotrófico, que envolve também a expulsão de oxigênio presente no meio, além de considerável volume de água e reagentes químicos, dificulta a aplicação em escala plena.

4) O processo de NP/A foi implementado com sucesso em efluente anaeróbio doméstico, com valores medianos de remoção de  $\text{N-NH}_4^+$  e NT de 72 e 64 %, respectivamente. A aplicação conjunta de efluente anaeróbio doméstico e sobrenadante de lodo na proporção de 3:1 ocasionou a redução da remoção de  $\text{N-NH}_4^+$  e NT (valores medianos de 45 e 43 %, respectivamente), onde a emissão de  $\text{N}_2\text{O}$  e de  $\text{CH}_4$  correspondeu à 0,021 e 1,022 % da carga de NT e DQO aplicada, e a 0,114 e 1,313 % da carga de NT e DQO removida. A abundância de anammox, BOA (*AmoA*) e BDH (*NosZ*) diminuiu, enquanto a abundância de BON (*Nitrobacter* e *Nitrospira*) aumentou na fase 2 em relação à fase 1. *Ca. Brocadia* foi o gênero anammox dominante, enquanto *Nitrospira* predominou como BON. 17 gêneros de BDH

heterotrócias foram identificados, caracterizando a maior abundância entre os grupos do ciclo do nitrogênio em percentual e em diversidade de gêneros.

Portanto, apesar de ter aumentado a carga de NT removida ( $\text{mg NT/m}^3\cdot\text{d}$ ), o aumento de carga em virtude da aplicação da mistura de efluente anaeróbio doméstico com sobrenadante de lodo diminuiu a eficiência de remoção de NT e a abundância de bactérias anammox da biomassa do reator, além de ter aumentado as emissões de  $\text{N}_2\text{O}$  e  $\text{CH}_4$ . Ainda assim, o co-tratamento dos efluentes citados para remoção de nitrogênio é promissora e poderá contribuir para o tratamento simultâneo dos efluentes gerados em ETEs.

## 11 RECOMENDAÇÕES

Recomenda-se que algumas das condições operacionais utilizadas neste trabalho (diferentes configurações de reatores, melhores estratégias de aeração intermitente para estabelecer a NP/A, partida de reatores com efluente real e sob aeração intermitente), que foram desenvolvidas em reatores em escala de laboratório (2 a 2,3 L de volume útil) sejam aplicadas em reatores em escala de demonstração e escala real.

Adicionalmente, recomenda-se que sensores de OD, pH, temperatura e de compostos nitrogenados e orgânicos sejam utilizados nos reatores utilizados para NP/A para melhor controle da NP/A, além de gerarem dados cinéticos que podem explicar certos desempenhos e auxiliar em tomadas de decisão quanto à adoção de novas estratégias operacionais.

## 12 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHN, Y. H. **Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. Process Biochemistry**, ago. 2006.
- AL-HAZMI, H. E. et al. Optimization of the Aeration Strategies in a Deammonification Sequencing Batch Reactor for Efficient Nitrogen Removal and Mitigation of N<sub>2</sub>O Production. **Environmental Science and Technology**, v. 55, n. 2, p. 1218–1230, 19 jan. 2021.
- APHA. **Standard Methods for Examination of Water and Wastewater**. 23. ed. Washington, DC, USA: [s.n.].
- AUGUSTO, M. R.; CAMILOTI, P. R.; SOUZA, T. S. O. DE. Fast start-up of the single-stage nitrogen removal using anammox and partial nitritation (SNAP) from conventional activated sludge in a membrane-aerated biofilm reactor. **Bioresource Technology**, v. 266, p. 151–157, 1 out. 2018.
- AZARI, M.; JURNALIS, A.; DENECKE, M. The influence of aeration control and temperature reduction on nitrogen removal and microbial community in two anammox-based hybrid sequencing batch biofilm reactors. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 96, n. 12, p. 3358–3370, 1 dez. 2021.
- BLACKBURNE, R. et al. Kinetic characterisation of an enriched Nitrospira culture with comparison to Nitrobacter. **Water Research**, v. 41, n. 14, p. 3033–3042, 2007.
- BLUM, J. M.; JENSEN, M. M.; SMETS, B. F. Nitrous oxide production in intermittently aerated Partial Nitritation-Anammox reactor: oxic N<sub>2</sub>O production dominates and relates with ammonia removal rate. **Chemical Engineering Journal**, v. 335, p. 458–466, 1 mar. 2018.
- BRAZIL. **Resolução nº 430 de 2011 - Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA)**, 2011.
- BRESSANI-RIBEIRO, T. et al. **Trickling filters following anaerobic sewage treatment: state of the art and perspectives. Environmental Science: Water Research and Technology** Royal Society of Chemistry, , 1 nov. 2018.

CABRAL, C. S. et al. Impact of microaeration bioreactor on dissolved sulfide and methane removal from real UASB effluent for sewage treatment. **Water Science and Technology**, v. 81, n. 9, p. 1951–1960, 1 maio 2020.

CAKIR, F. Y.; STENSTROM, M. K. Greenhouse gas production: A comparison between aerobic and anaerobic wastewater treatment technology. **Water Research**, v. 39, n. 17, p. 4197–4203, 2005.

CAO, Y.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; DAIGGER, G. T. **Mainstream partial nitrification–anammox in municipal wastewater treatment: status, bottlenecks, and further studies**. **Applied Microbiology and Biotechnology** Springer Verlag, , 1 fev. 2017.

CASTRO-BARROS, C. M. et al. Effect of aeration regime on N<sub>2</sub>O emission from partial nitrification-anammox in a full-scale granular sludge reactor. **Water Research**, v. 68, p. 793–803, 1 jan. 2015.

CHERNICHARO, C. A. DE L. et al. Panorama do tratamento de esgoto sanitário nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil: tecnologias mais empregadas. **Revista DAE**, v. 66, n. 213, p. 5–19, 2018.

CHERNICHARO, C. A. L. et al. **Anaerobic sewage treatment: state of the art, constraints and challenges**. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology** Springer Netherlands, , 1 dez. 2015.

COGERT, K. I.; ZIELS, R. M.; WINKLER, M. K. H. Reducing Cost and Environmental Impact of Wastewater Treatment with Denitrifying Methanotrophs, Anammox, and Mainstream Anaerobic Treatment. **Environmental Science and Technology**, v. 53, n. 21, p. 12935–12944, 5 nov. 2019.

CONNAN, R. et al. Coupling of partial nitrification and anammox in two- and one-stage systems: Process operation, N<sub>2</sub>O emission and microbial community. **Journal of Cleaner Production**, v. 203, p. 559–573, 1 dez. 2018.

COSTA, R. B.; OKADA, D. Y.; FORESTI, E. Practical implications of methanotrophic denitrification as post-treatment unit of anaerobic effluents in tropical areas. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 97, n. 6, p. 1400–1407, 1 jun. 2022.

DAPENA-MORA, A. et al. Enrichment of Anammox biomass from municipal activated sludge: Experimental and modelling results. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 79, n. 12, p. 1421–1428, dez. 2004.

DE ALMEIDA FERNANDES, L. et al. Effect of temperature on microbial diversity and nitrogen removal performance of an anammox reactor treating anaerobically pretreated municipal wastewater. **Bioresource Technology**, v. 258, p. 208–219, 1 jun. 2018.

DE PRÁ, M. C. et al. Novel one-stage reactor configuration for deammonification process: Hydrodynamic evaluation and fast start-up of NITRAMMOX® reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 171, 1 jul. 2021.

DING, X. et al. Biological denitrification in an anoxic sequencing batch biofilm reactor: Performance evaluation, nitrous oxide emission and microbial community. **Bioresource Technology**, v. 285, 1 ago. 2019.

GANI, K. M. et al. Potential strategies for the mainstream application of anammox in treatment of anaerobic effluents - A review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 51, n. 21, p. 2567–2594, 2021.

GE, G. et al. Nitrogen removal and nitrous oxide emission in an anaerobic/oxic/anoxic sequencing biofilm batch reactor. **Environmental Engineering Science**, v. 35, n. 1, p. 19–26, 1 jan. 2018.

GONÇALVES PITEIRA CARVALHO, B. et al. Aeration strategies and temperature effects on the partial nitrification/anammox process for nitrogen removal: performance and bacterial community assessment. **Environmental Technology (United Kingdom)**, 2021.

GÜVEN, D. Effects of different carbon sources on denitrification efficiency associated with culture adaptation and C/N ratio. **Clean - Soil, Air, Water**, v. 37, n. 7, p. 565–573, jul. 2009.

HUANG, Z. et al. 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.

ISAKA, K. et al. Nitrogen removal performance using anaerobic ammonium oxidation at low temperatures. **FEMS Microbiology Letters**, v. 282, n. 1, p. 32–38, maio 2008.

JIN, P. et al. High-efficient nitrogen removal from municipal wastewater via two-stage nitrification/anammox process: Long-term stability assessment and mechanism analysis. **Bioresource Technology**, v. 271, p. 150–158, 1 jan. 2019.

JUAN-DÍAZ, X.; PÉREZ, J.; CARRERA, J. Effective dampening of temperature effects in an anammox reactor treating real mainstream wastewater. **Journal of Water Process Engineering**, v. 40, 1 abr. 2021.

KOLB, S. et al. Quantitative detection of methanotrophs in soil by novel pmoA-targeted real-time PCR Assays. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 5, p. 2423–2429, 1 maio 2003.

LACKNER, S. et al. Full-scale partial nitrification/anammox experiences - An application survey. **Water Research**, v. 55, p. 292–303, 15 maio 2014.

LATOCHESKI, E. C.; DA ROCHA, M. C. V.; BRAGA, M. C. B. **Nitrospira in wastewater treatment: applications, opportunities and research gaps**. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology** Springer Science and Business Media B.V., , 1 dez. 2022.

LAURENI, M. et al. Activity and growth of anammox biomass on aerobically pre-treated municipal wastewater. **Water Research**, v. 80, p. 325–336, 1 set. 2015.

LAURENI, M. et al. Mainstream partial nitrification and anammox: Long-term process stability and effluent quality at low temperatures. **Water Research**, v. 101, p. 628–639, 2016.

LEAL, C. D. et al. 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, 1 jul. 2016.

LOBATO, L. C. DA S. et al. Contribuição para o aprimoramento de projeto, construção e operação de reatores UASB aplicados ao tratamento de esgoto sanitário - Parte 3: Gerenciamento de lodo e espuma. **Revista DAE**, v. 66, n. 214, p. 30–55, 2018.

LV, Y. et al. Enhanced microbial metabolism in one stage partial nitrification-anammox system treating low strength wastewater by novel composite carrier. **Water Research**, v. 163, 15 out. 2019.

MA, B. et al. Suppressing nitrite-oxidizing bacteria growth to achieve nitrogen removal from domestic wastewater via anammox using intermittent aeration with low dissolved oxygen. **Scientific Reports**, v. 5, n. September, p. 1–9, 2015a.

MA, B. et al. Suppressing nitrite-oxidizing bacteria growth to achieve nitrogen removal from domestic wastewater via anammox using intermittent aeration with low dissolved oxygen. **Scientific Reports**, v. 5, 10 set. 2015b.

MA, Y. et al. Intermittent aeration to regulate microbial activities in membrane-aerated biofilm reactors: Energy-efficient nitrogen removal and low nitrous oxide emission. **Chemical Engineering Journal**, v. 433, 1 abr. 2022.

MALOVANY, A.; TRELA, J.; PLAZA, E. Mainstream wastewater treatment in integrated fixed film activated sludge (IFAS) reactor by partial nitrification/anammox process. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 478–487, 1 dez. 2015.

MEHRANI, M. J. et al. The occurrence and role of *Nitrospira* in nitrogen removal systems. **Bioresource Technology**, v. 303, 1 maio 2020.

MIAO, Y. et al. 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, 2016.

MIAO, Y. et al. Enhancing ammonium oxidizing bacteria activity was key to single-stage partial nitrification-anammox system treating low-strength sewage under intermittent aeration condition. **Bioresource Technology**, v. 231, p. 36–44, 2017.

MIAO, Y. et al. An improved start-up strategy for mainstream anammox process through inoculating ordinary nitrification sludge and a small amount of anammox sludge. **Journal of Hazardous Materials**, v. 384, 15 fev. 2020a.

MIAO, Y. et al. An improved start-up strategy for mainstream anammox process through inoculating ordinary nitrification sludge and a small amount of anammox sludge. **Journal of Hazardous Materials**, v. 384, 15 fev. 2020b.

NOWKA, B.; DAIMS, H.; SPIECK, E. Comparison of oxidation kinetics of nitrite-oxidizing bacteria: Nitrite availability as a key factor in niche differentiation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 2, p. 745–753, 2015.

PEDROUSO, A. et al. Performance of partial nitrification-anammox processes at mainstream conditions in an IFAS system. **Journal of Environmental Management**, v. 250, 15 nov. 2019.

PEREIRA, A. D. et al. Nitrogen removal from food waste digestate using partial nitrification-anammox process: Effect of different aeration strategies on performance and microbial community dynamics. **Journal of Environmental Management**, v. 251, 1 dez. 2019a.

PEREIRA, T. D. S. et al. Effect of operating conditions on N<sub>2</sub>O production in an anammox sequencing batch reactor containing granular sludge. **Water Science and Technology**, v. 80, n. 1, p. 37–47, 1 jul. 2019b.

QIU, S. et al. Start up of partial nitrification-anammox process using intermittently aerated sequencing batch reactor: Performance and microbial community dynamics. **Science of the Total Environment**, v. 647, p. 1188–1198, 10 jan. 2019.

RASSAMEE, V. et al. Effect of oxic and anoxic conditions on nitrous oxide emissions from nitrification and denitrification processes. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 9, p. 2036–2045, set. 2011.

RIBEIRO, R. P. et al. Evaluation of the spatial and temporal variability of nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) emissions at two different full-scale aerobic treatment systems used in the post-treatment of UASB effluents in Brazil. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 1, 1 fev. 2021.

ROCKSTRÖM, J. et al. A safe operation space for humanity. **Nature**, v. 461, n. September, p. 472–475, 2009.

SÁNCHEZ GUILLÉN, J. A. et al. Anammox cultivation in a closed sponge-bed trickling filter. **Bioresource Technology**, v. 186, p. 252–260, 1 jun. 2015.

SANDRA C, A. et al. Aerobic and Anaerobic Sewage Biodegradable Processes: The Gap Analysis. **International Journal of Research in Environmental Science**, v. 3, n. 3, 2017.

SCAGLIONE, D. et al. Inhibition on anammox bacteria upon exposure to digestates from biogas plants treating the organic fraction of municipal solid waste and the role of conductivity. **Waste Management**, v. 61, p. 213–219, 1 mar. 2017.

SIEGRIST, H. et al. Anammox brings WWTP closer to energy autarky due to increased biogas production and reduced aeration energy for N-removal. **Water Science and Technology**, v. 57, n. 3, p. 383–388, 2008.

SILVA, B. G.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; FORESTI, E. Effects of intermittent aeration periods on a structured-bed reactor continuously fed on the post-treatment of sewage anaerobic effluent. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 41, n. 8, p. 1115–1120, 1 ago. 2018.

SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES SOBRE SANEAMENTO - SNIS. **Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgoto**SNSA/MCIDADES. Brasília: [s.n.].

SLIEKERS, A. O. et al. **Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite in one single reactor***Water Research*. [s.l: s.n.].

SOUZA, T. S. O.; OKADA, D. Y.; FORESTI, E. Proof of concept and improvement of a triple chamber biosystem coupling anaerobic digestion, nitrification and mixotrophic endogenous denitrification for organic matter, nitrogen and sulfide removal from domestic sewage. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 41, n. 12, p. 1839–1850, 1 dez. 2018.

STAZI, V.; TOMEI, M. C. **Enhancing anaerobic treatment of domestic wastewater: State of the art, innovative technologies and future perspectives**. *Science of the Total Environment*Elsevier B.V., , 1 set. 2018.

STEIN, L. Y. Surveying N<sub>2</sub>O-producing pathways in bacteria. Em: **Methods in Enzymology**. [s.l.] Academic Press Inc., 2011. v. 486p. 131–152.

STEIN, L. Y.; KLOTZ, M. G. The nitrogen cycle. **Current Biology**, v. 26, n. 3, p. R94–R98, 2016.

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

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

SUN, Y. et al. Nitrogen removal, nitrous oxide emission and microbial community in sequencing batch and continuous-flow intermittent aeration processes. **Environmental Engineering Research**, v. 24, n. 1, p. 107–116, 1 mar. 2019.

SUN, Y. et al. Influence of C/N ratio and ammonia on nitrogen removal and N<sub>2</sub>O emissions from one-stage partial denitrification coupled with anammox. **Chemosphere**, v. 341, 1 nov. 2023.

VAL DEL RIO, A. et al. Determination of the intrinsic kinetic parameters of ammonia-oxidizing and nitrite-oxidizing bacteria in granular and flocculent sludge. **Separation and Purification Technology**, v. 213, p. 571–577, 15 abr. 2019.

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

WAN, X. et al. Impact of organics, aeration and flocs on N<sub>2</sub>O emissions during granular-based partial nitrification-anammox. **Science of the Total Environment**, v. 797, 25 nov. 2021.

WANG, L. et al. **Challenges, solutions and prospects of mainstream anammox-based process for municipal wastewater treatment. Science of the Total Environment** Elsevier B.V., , 10 maio 2022.

WATARI, T. et al. Development of a single-stage mainstream anammox process using a sponge-bed trickling filter. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 42, n. 19, p. 3036–3047, 2021.

WU, L. et al. Analysis of the impact of reflux ratio on coupled partial nitrification-anammox for co-treatment of mature landfill leachate and domestic wastewater. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 207–214, 1 dez. 2015.

WU, P. et al. Characterization of the start-up of single and two-stage Anammox processes with real low-strength wastewater treatment. **Chemosphere**, v. 245, 1 abr. 2020.

XU, Z. et al. Optimization of the intermittent aeration to improve the stability and flexibility of a mainstream hybrid partial nitrification-anammox system. **Chemosphere**, v. 261, 1 dez. 2020.

YANG, Y. et al. Survival strategies of ammonia-oxidizing archaea (AOA) in a full-scale WWTP treating mixed landfill leachate containing copper ions and operating at low-intensity of aeration. **Water Research**, v. 191, 1 mar. 2021.

YU, L. et al. Experimental investigation and mathematical modeling of the competition among the fast-growing “r-strategists” and the slow-growing “K-strategists” ammonium-oxidizing bacteria and nitrite-oxidizing bacteria in nitrification. **Science of the Total Environment**, v. 702, 1 fev. 2020.

ZHANG, F. et al. New insights into co-treatment of mature landfill leachate with municipal sewage via integrated partial nitrification, Anammox and denitrification. **Journal of Hazardous Materials**, v. 415, 5 ago. 2021a.

ZHANG, J. et al. An effective strategy for in situ start-up of mainstream anammox process treating domestic sewage. **Bioresource Technology**, v. 339, 1 nov. 2021b.

ZHANG, T.; WEI, N.; WU, G. Autotrophic nitrogen removal and potential microbial interactions in anammox systems with different ammonia and organic carbon concentrations. **Journal of Water Process Engineering**, v. 37, 1 out. 2020.

ZHANG, W. et al. Increasing carbon to nitrogen ratio promoted anaerobic ammonia-oxidizing bacterial enrichment and advanced nitrogen removal in mainstream anammox system. **Bioresource Technology**, v. 393, p. 130169, fev. 2024.

**APÊNDICE A – INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES DA ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA DOS  
RESULTADOS DE NGS (NÚMERO DE SEQUÊNCIAS RECUPERADAS, ÍNDICE DE  
DIVERSIDADE DE CHAO1, ÍNDICE DE DIVERSIDADE DE SHANNON, ÍNDICE DE  
DIVERSIDADE DE GINI-SIMPSON E ÍNDICE DE DIVERSIDADE DE SIMPSON INVERSO**

Tabela A-1 - Informações complementares da análise de bioinformática dos resultados de NGS (número de sequências recuperadas, índice de diversidade de Chao1, índice de diversidade de Shannon, índice de diversidade de Gini-Simpson e índice de diversidade de Simpson inverso)

	<b>Número de sequências recuperadas</b>	<b>Chao1</b>	<b>Simpson inverso</b>	<b>Gini-Simpson</b>	<b>Shannon</b>
<b>Capítulo 2</b>					
Fase 1	32611	198,83	31,47	0,97	4,03
Fase 2	27584	120,47	14,17	0,93	3,45
Fase 3	4817	66,00	4,58	0,78	2,66
Fase 4	21593	154,44	12,40	0,92	3,66
Fase 5	34688	187,04	29,42	0,97	3,92
B.S.	24941	94,75	7,99	0,87	2,96
Fase 6.1	26518	144,53	6,28	0,84	2,89
Fase 6.2	26153	112,20	3,56	0,72	2,26
Fase 7	31037	89,50	8,09	0,88	2,72
<b>Capítulo 3</b>					
Inóculo	26283	173,00	30,01	0,97	4,01
RFC1 dia 51	23144	152,00	12,55	0,92	3,41
RFC1 dia 547	17786	149,00	29,77	0,97	4,00
RFC2 dia 51	25694	102,00	4,58	0,78	2,30
RFC2 dia 547	20984	130,00	11,63	0,91	3,27
<b>Capítulo 4</b>					
RBS dia 250	13049	147,00	24,87	0,96	3,91
RBS dia 451	18313	180,00	25,96	0,96	4,10