

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

**Efeito da temperatura no processo anammox aplicado ao  
pós-tratamento de efluente de reator anaeróbio tratando  
esgoto doméstico**

**Luyara de Almeida Fernandes**

**Belo Horizonte**

**2017**

**Efeito da temperatura no processo anammox aplicado ao pós-tratamento de efluente de reator anaeróbio tratando esgoto doméstico**

**Luyara de Almeida Fernandes**

**Luyara de Almeida Fernandes**

**Efeito da temperatura no processo anammox aplicado ao  
pós-tratamento de efluente de reator anaeróbico tratando  
esgoto doméstico**

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

Área de concentração: Saneamento

Linha de pesquisa: Tratamento de Águas Residuárias

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

Belo Horizonte  
Escola de Engenharia

2017

F363e

Fernandes, Luyara de Almeida.

Efeito da temperatura no processo anammox aplicado ao pós-tratamento de efluente de reator anaeróbio tratando esgoto doméstico [manuscrito] / Luyara de Almeida Fernandes. – 2017.  
xiii, 134 f., enc.: il.

Orientadora: Juliana Calábria de Araújo.

Dissertação (mestrado) Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia.

Bibliografia: f. 118-134.

1. Engenharia sanitária - Teses. 2. Saneamento - Teses. 3. Biorreatores - Teses. 4. Temperatura - Teses. 5. Esgotos - Teses.  
I. Araújo, Juliana Calábria de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia. III. Título.

CDU: 628(043)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Escola de Engenharia

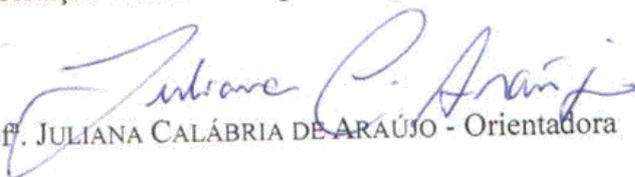
Programa de Pós-Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos  
Avenida Antônio Carlos, 6627 - 4º andar - 31270-901 - Belo Horizonte - BRASIL  
Telefax: 55 (31) 3409-1882 - posgrad@desa.ufmg.br  
<http://www.smarh.eng.ufmg.br>

## FOLHA DE APROVAÇÃO

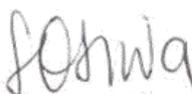
**EFEITO DA TEMPERATURA NO PROCESSO ANAMMOX APLICADO AO PÓS-  
TRATAMENTO DE EFLUENTE DE REATOR ANAERÓBIO TRATANDO ESGOTO  
DOMÉSTICO**

**LUYARA DE ALMEIDA FERNANDES**

Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora constituída pelos Senhores:

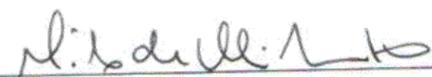
  
Prof. JULIANA CALÁBRIA DE ARAÚJO - Orientadora

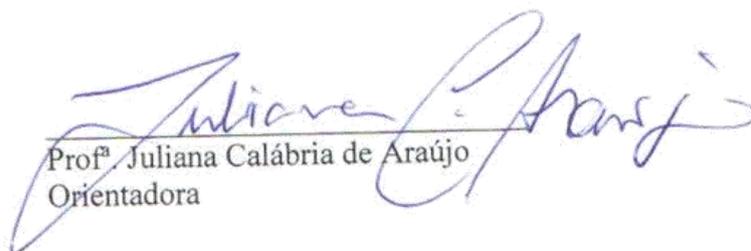
  
Prof. CARLOS AUGUSTO DE LEMOS CHERNICHARO

  
Prof. SILVANA DE QUEIROZ SILVA

Aprovada pelo Colegiado do PG SMARH

Versão Final aprovada por

  
Prof. Nilo de Oliveira Nascimento  
Coordenador

  
Prof.ª Juliana Calábria de Araújo  
Orientadora

Belo Horizonte, 07 de abril de 2017.

## Agradecimentos

Agradecer... reconhecer que nunca andei só e sempre contei com Sua proteção, meu grande Deus. Obrigada por além de me permitir chegar aqui, ter cuidado de minhas preocupações, saúde e afins e por ter cuidado das “minhas gavetas”. Tu és o Cara!

Aos meus pais, sempre serei grata. Eternamente! Pelo amor, educação e dedicação dados a mim. Pelo incentivo, motivação, pelas orações e inúmeras novenas, por estarem comigo nessa árdua caminhada, sem falar que são os melhores pais do mundo. Obrigada Pai! Obrigada Mãe! Amo vocês.

Aos meus amados brothers Brayner, Gustavo e Guilherme, obrigada por me proporcionarem esse amor e carinho de irmãos que mal consigo explicar. As brincadeiras e descontrações me energizaram e me faziam retornar de casa bem mais renovada.

Aos meus amigos e afilhados que sempre torceram por mim e entenderam essa ausência, obrigada!

A toda minha família de Ipatinga, Serra (ES) e BH, especialmente à casa das Tias, agradeço imensamente pela acolhida, pelos puxões de orelha e por todo o bate-papo. Me sentí em casa.

À minha orientadora, professora Juliana Calábria, obrigada pela confiança, por ter aceitado o desafio de me orientar e permitir que eu pudesse desenvolver esta pesquisa. Agradeço pela disponibilidade em atender minhas dúvidas e também possibilitar meu crescimento pessoal e acadêmico.

Agradeço à minha família de laboratório: minha Chefa Cíntia, minha mãe Alyne e minha tia Alê. Foram tantas risadas em alto e bom som, muitos casos, muita orientação, conselhos, muita hora de fruta... time anammox fitness! Obrigada por me ajudarem nessa jornada. Desafios de biologia molecular enfrentados por uma engenheira nunca foram tão fáceis ao lado de uma chefe e de uma mãe tão solícitas e proativas!

À minha Sis Isa Baby, companheira de vida de labs em alguns finais de semana e feriados, obrigada por realmente ser mais que a irmã que nunca tive e por me mostrar que existe vida fora do lab. À Xuxu “nada fitness” Bruna, obrigada pelos seus incentivos, risadas e por deixar os dias do lab mais formosos (estilosos), foram realmente marcantes.

Aos meus alunos de IC e agregados que sempre me socorreram e ajudaram nos apertos, dividindo comigo todas as preocupações e obrigações desta pesquisa. Luisa, Karine, Igor, Lucas... obrigada!

Ao *delivery* do CePTS e companhia Ltda, obrigada pelo esgoto nosso de cada dia. As anammox mandaram um salve!

À minha turma de mestrado pela parceria nesses dois anos, pelos churrascos do gaúcho, rocks e belos momentos que tivemos. Levarei pra sempre comigo. Obrigada galera!

Ao time Contorno do Corpo, obrigada por me ajudarem a extravasar e liberar as energias... Eu cresci!

À trilha sonora de todas as vertentes, ao bom e velho rock, obrigada por existirem. Minha válvula de escape capaz de retirar-me da realidade em fração de segundos, proporcionando a melhor sensação do mundo e aquele conforto melhor da vida!

Ao processo anammox por me despertar uma paixão tão grande! Foram válidos cada final de semana e feriados no lab. Faria tudo novamente! Às minhas anammox e ao reator Agenor, por responderem tão bem às condições impostas, vocês são meu orgulho. Amo!

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos da UFMG, pelos conhecimentos transmitidos nas disciplinas do curso e pelas oportunidades concedidas.

À CAPES e demais agências de fomento que concederam o apoio financeiro, obrigada!

Enfim, agradeço por realmente ter a quem agradecer, cada um tem sua marca em mim. E claro, não poderia deixar de dizer o famoso “porque não sou obrigada!”. Não sou! Foi por amor à pesquisa!

## RESUMO

A oxidação anaeróbia de amônio (anammox) é uma via biológica de remoção de amônio mediada por bactérias autotróficas capazes de converter amônio diretamente a nitrogênio gasoso, utilizando o nitrito como aceptor final de elétrons. Este processo tem mostrado ser uma excelente alternativa ao processo convencional de nitrificação/desnitrificação por seus atrativos em termos de economia e sustentabilidade. O processo anammox tem sido aplicado com sucesso no tratamento de efluentes com alta concentração de amônio e baixa relação DQO/N, o que contrapõe as características de efluentes domésticos tratados pela via anaeróbia, que apresentam baixa concentração de nitrogênio e possuem DQO remanescente. A temperatura tem sido considerada fator-chave no bom desempenho desses reatores, e os trabalhos têm indicado a temperatura ótima de operação dos mesmos em torno de 30 °C, sendo esta maior que a temperatura típica dos efluentes domésticos de regiões tropicais. Esta pesquisa avaliou, em laboratório, a viabilidade de aplicação do processo anammox para pós-tratar efluente doméstico de reator UASB utilizando um RBS com adição de nitrito, previamente enriquecido e submetido às temperaturas de 35 °C (fase 1), 25 °C (fase 2) e 20 °C (fase 3). A fase 1 marcou a transição entre a aplicação do meio mineral e autotrófico utilizado na etapa de enriquecimento, para o efluente doméstico, sem etapa de aclimação e sem inibição. A fase 2 não mostrou-se influenciada pela redução de 10 °C na temperatura de operação, visto que não foi realizada etapa prévia de aclimação. O mesmo ocorreu para o início da fase 3. No geral, considerando a eficiência de remoção de nitrogênio total (nitrito + amônio) e DQO, a fase 2 a 25 °C foi a que apresentou os melhores resultados, sendo que as fases 1 e 3 também apresentaram eficiência de remoção satisfatórias, não sendo possível constatar efeitos inibitórios. As sequências de anammox detectadas no presente trabalho foram relacionadas à *Ca. Brocadia caroliniensis* e *Ca. Brocadia sp.* As condições operacionais testadas revelaram que as bactérias com atividade anammox se mostraram resistentes à rápida mudança de temperatura, mantendo seu metabolismo sem prejuízos à eficiência do processo. Os resultados indicaram que o processo anammox pode ser aplicado com estabilidade ao pós-tratamento de reatores UASB tratando efluentes domésticos com DQO remanescente em torno de 100 mg.L<sup>-1</sup> sem efeitos de inibição, em regiões onde o efluente a ser tratado apresente temperatura média de 25 °C.

## ABSTRACT

The anaerobic oxidation of ammonium (anammox) is a biological pathway of ammonium removal mediated by autotrophic bacteria capable of converting ammonium directly to gaseous nitrogen, using nitrite as the final electron acceptor. This process has shown to be an excellent alternative to the conventional nitrification/denitrification process due to its attractive in terms of economy and sustainability. The anammox process has been successfully applied in the treatment of effluents with high ammonium concentration and low COD/N ratio, which contrasts the characteristics of domestic effluents treated by the anaerobic route, which present low nitrogen concentration and have remaining COD. The temperature has been considered a key factor in the good performance of these reactors, and the work has indicated the optimum temperature of their operation around 30 °C, which is higher than the typical temperature of domestic effluents from tropical regions. This study evaluated the feasibility of applying the anammox process to post-treat UASB domestic effluent using a RBS with addition of nitrite, previously enriched and subjected to temperatures of 35 °C (phase 1), 25 °C (phase 2 ) And 20 ° C (phase 3). Phase 1 marked the transition between the application of the mineral and autotrophic medium used in the enrichment stage, for the domestic effluent, without acclimation stage and without inhibition. Phase 2 was not influenced by the 10 °C reduction in the operating temperature, since no previous acclimation step was performed. The same occurred for the beginning of phase 3. In general, considering the efficiency of removal of total nitrogen (nitrite + ammonium) and COD, phase 2 at 25 °C presented the best results, and phases 1 and 3 also showed satisfactory removal efficiency, and it was not possible to verify inhibitory effects. The anammox sequences detected in the present work were related to *Ca. Brocadia caroliniensis* and *Ca. Brocadia sp.* The operational conditions tested showed that the bacteria with anammox activity proved to be resistant to the rapid change of temperature, maintaining its metabolism without damages to the efficiency of the process. The results indicated that anammox process can be applied with stability to the post-treatment of UASB reactors treating domestic effluents with COD remaining at around 100 mg.L<sup>-1</sup> without inhibition effects in regions where the effluent to be treated shows average temperature of 25 °C.

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>5</b>
2.1	Objetivo Geral.....	5
2.2	Objetivos Específicos .....	5
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>6</b>
3.1	Ciclo do nitrogênio .....	6
3.1.1	Nitrificação .....	9
3.1.2	Desnitrificação.....	10
3.1.3	Oxidação anaeróbia de amônia.....	12
3.1.4	Redução desassimilatória de nitrato .....	12
3.1.5	Redução assimilatória de nitrato.....	13
3.1.6	Assimilação de amônio e amonificação .....	13
3.1.7	Fixação biológica de nitrogênio .....	13
3.2	Processo anammox .....	14
3.3	Inoculação de reatores anammox.....	24
3.4	Processos conjugados com anammox.....	27
3.5	Aplicação do processo anammox ao tratamento de efluentes .....	31
3.5.1	Fatores chave que afetam o crescimento de anammox em sistemas de tratamento de esgotos .....	37
3.5.2	Efeito da temperatura sobre o metabolismo anammox .....	45
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>49</b>
4.1	Reator em batelada sequencial.....	49
4.2	Inoculação do RBS e cultivo da biomassa.....	50
4.3	Reator UASB e efluente anaeróbio.....	52
4.4	Planejamento experimental.....	54

4.5	Métodos analíticos .....	55
4.5.1	Análise de sólidos totais (ST) e sólidos totais voláteis (STV) .....	55
4.5.2	Análise de nitrogênio amoniacal (N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ).....	56
4.5.3	Análise de nitrito (N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) .....	57
4.5.4	Análise de nitrato (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) .....	57
4.5.5	Análise de Demanda Química de Oxigênio total (DQO).....	57
4.6	Investigação da comunidade microbiana .....	58
4.6.1	Extração de DNA.....	58
4.6.2	Detecção de bactérias anammox pela PCR .....	59
4.6.3	Análise da estrutura da comunidade bacteriana por PCR-DGGE .....	59
4.7	Análises estatísticas .....	62
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>63</b>
5.1	Etapa de enriquecimento.....	63
5.2	Desempenho do reator anammox quando submetido às temperaturas propostas aplicando efluente anaeróbico proveniente de reator UASB.....	68
5.2.1	Fase 1 - Operação a 35 °C .....	69
5.2.2	Fase 2 – Operação a 25 °C.....	78
5.2.3	Fase 3 – Operação à temperatura de 20 °C .....	89
5.2.4	Comparação dos resultados obtidos nas Fases I, II e III .....	98
5.3	Análise do perfil e diversidade da comunidade bacteriana pela técnica de PCR-DGGE .....	104
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>116</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>117</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 3.1</b> Ciclo do nitrogênio .....	8
<b>Figura 4.1</b> Representação esquemática e real do RBS utilizado na pesquisa.....	49
<b>Figura 4.2</b> Transferência do inóculo para o RBS anammox.....	51
<b>Figura 4.3</b> Reator UASB, em escala de demonstração, utilizado no presente estudo .....	53
<b>Figura 5.1</b> Carga de nitrogênio aplicada (nitrito + íon amônio) afluyente e efluente durante o período de enriquecimento, com destaque para o início da atividade anammox (82º dia) .....	64
<b>Figura 5.2</b> Dinâmica do íon amônio afluyente e efluente durante a etapa de enriquecimento, com destaque para o início da atividade anammox (82º dia) .....	64
<b>Figura 5.3</b> Dinâmica do nitrito afluyente e efluente durante a etapa de enriquecimento, com destaque para o início da atividade anammox (82º dia) .....	64
<b>Figura 5.4</b> Carga volumétrica de nitrogênio total (nitrito + amônio) afluyente e efluente ao RBS entre os dias 82 e 160, da etapa de enriquecimento.....	66
<b>Figura 5.5</b> Coeficiente estequiométrico do consumo de nitrito/consumo de amônia e produção de nitrato/consumo de amônio entre os dias 82 e 160 da fase de enriquecimento.....	66
<b>Figura 5.6</b> Box-plot do coeficiente estequiométrico Consumo de N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> / Consumo de N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> obtidos para o RBS durante os dias 82 e 160 da etapa de enriquecimento .....	67
<b>Figura 5.7</b> Eficiência de remoção do íon amônio e nitrito na fase de enriquecimento, entre os dias 82 e 160 da etapa de enriquecimento .....	68
<b>Figura 5.8</b> Carga média de nitrogênio total (nitrito + íon amônio) afluyente e efluente ao RBS durante a fase 1 (Temperatura= 35 °C) .....	69
<b>Figura 5.9</b> Box-plot das concentrações de nitrito e amônio afluyente e efluente ao RBS durante a fase 1 (Temperatura= 35 °C).....	70
<b>Figura 5.10</b> Dinâmica dos compostos nitrogenados e eficiência de remoção observados durante a fase 1 (Temperatura= 35 °C) .....	70
<b>Figura 5.11</b> Cargas de nitrogênio (N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> e N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) aplicadas e removidas do RBS durante a fase 1 (Temperatura= 35 °C) .....	72
<b>Figura 5.12</b> Coeficiente estequiométrico do consumo de nitrito/consumo de amônia e produção de nitrato/consumo de amônio durante a fase 1 (Temperatura= 35 °C) .....	73

<b>Figura 5.13</b> Concentração de DQO afluente e efluente ao RBS anammox na fase 1 (Temperatura= 35 °C) .....	76
<b>Figura 5.14</b> Relação DQO/N média observada na fase 1 (Temperatura= 35 °C).....	77
<b>Figura 5.15</b> Carga média de nitrogênio total (nitrito + íon amônio) afluente e efluente ao RBS durante a fase 2 .....	79
<b>Figura 5.16</b> Concentração média de nitrito e amônio afluente e efluente ao RBS durante a fase 2 .....	79
<b>Figura 5.17</b> Dinâmica dos compostos nitrogenados e eficiência de remoção durante a fase 2.....	80
<b>Figura 5.18</b> Carga de nitrogênio (amônio + nitrito) aplicada e removida do RBS anammox durante a fase 2 (Temperatura= 25 °C).....	83
<b>Figura 5.19</b> Coeficiente estequiométrico de consumo de nitrito por consumo de amônio e produção de nitrato por consumo de amônio observados na fase 2 (Temperatura= 25 °C) .....	85
<b>Figura 5.20</b> Concentração de DQO afluente e efluente ao RBS anammox na fase 2 (Temperatura= 25 °C) .....	86
<b>Figura 5.21</b> Relação DQO/N média observada na fase 2 (Temperatura= 25 °C).....	88
<b>Figura 5.22</b> Carga média de nitrogênio total (nitrito + íon amônio) afluente e efluente ao RBS durante a fase 3 (Temperatura= 20 °C) .....	90
<b>Figura 5.23</b> Concentração média de nitrito e amônio afluente e efluente ao RBS durante a fase 3 (Temperatura= 20 °C) .....	90
<b>Figura 5.24</b> Dinâmica dos compostos nitrogenados e eficiência de remoção durante a fase 3 (Temperatura= 20 °C).....	91
<b>Figura 5.25</b> Carga média de nitrogênio (nitrito + amônio) aplicada e removida do RBS na fase 3 (Temperatura= 20 °C) .....	93
<b>Figura 5.26</b> Coeficiente estequiométrico de consumo de nitrito por consumo de amônio e produção de nitrato por consumo de amônio observados na fase 3 (Temperatura= 20 °C) .....	94
<b>Figura 5.27</b> Carga média de DQO afluente e efluente observada durante a fase 3 (Temperatura= 20 °C) .....	95
<b>Figura 5.28</b> Relação DQO/N observada ao longo da fase 3 (Temperatura= 20 °C) .	97
<b>Figura 5.29</b> Dinâmica dos compostos nitrogenados observados durante as três fases desta pesquisa.....	101

<b>Figura 5.30</b> Concentração de DQO afluente e efluente medidas durante as 3 fases operacionais (Fase 1, T= 35 °C), (Fase 2, T= 25 °C) e (Fase 3, T= 20 °C). .....	102
<b>Figura 5.31</b> Eficiência de remoção de DQO nas 3 fases operacionais (Fase 1, T= 35 °C), (Fase 2, T= 25 °C) e (Fase 3, T= 20 °C). .....	102
<b>Figura 5.32</b> Detecção de bactérias anammox pela PCR com iniciadores para o DNAr 16S de bactérias anammox (PLA46f/Amx 820r); (1) Ladder, (2) inóculo, (3) biomassa com 160 dias de enriquecimento, (4) final da fase 1, (5) final da fase 2, (6) controle positivo e (7) controle negativo.....	104
<b>Figura 5.33</b> Perfil do gel de DGGE contendo fragmentos de DNAr 16S amplificados com primers para o domínio Bactéria (1055F/1392R-GC). As canaletas referem-se às amostras (I) do inóculo, (II) final da fase de enriquecimento, (III) final da fase 1, (IV) final da fase 2, (V) fase 3 com 30 dias e (VI) final da fase 3.....	105
<b>Figura 5.34</b> Dendograma baseado no perfil das bandas do gel de DGGE. Os valores nos pontos de ramificação do dendograma referem-se à similaridade. ....	114

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1</b> Estados de oxidação, toxicidade para as células microbianas e propriedades dos compostos nitrogenados.....	7
<b>Tabela 3.2</b> - Gêneros de bactérias anammox descritos na literatura .....	21
<b>Tabela 3.3</b> Concentrações típicas de nitrogênio amoniacal em diversos tipos de efluentes.....	33
<b>Tabela 4.1</b> Composição do meio mineral autotrófico .....	50
<b>Tabela 4.2</b> Composição das soluções de Micronutrientes I e II .....	51
<b>Tabela 4.3</b> Concentração dos substratos no meio de cultura no período de enriquecimento.....	52
<b>Tabela 4.4</b> Condições operacionais do reator UASB.....	53
<b>Tabela 4.5</b> Caracterização físico-química do efluente do reator UASB utilizado ao longo da pesquisa.....	53
<b>Tabela 4.6</b> Fases da pesquisa e parâmetros analisados .....	54
<b>Tabela 4.7</b> Concentração de nitrito fornecida ao reator anammox durante as 3 fases da pesquisa.....	55
<b>Tabela 4.8</b> Detalhamento das fases em dias .....	55
<b>Tabela 4.9</b> Amostras e metodologias empregadas para a caracterização microbiana .....	58
<b>Tabela 4.10</b> Iniciadores utilizados nas reações da PCR para detecção de bactérias anammox.....	59
<b>Tabela 4.11</b> Sequências dos primers utilizados na PCR-DGGE.....	60
<b>Tabela 4.12</b> Concentração dos reagentes utilizados na PCR-DGGE .....	60
<b>Tabela 4.13</b> Condições de amplificação para os primers utilizados na PCR-DGGE.	61
<b>Tabela 5.1</b> Estatística descritiva do coeficiente estequiométrico obtido durante os dias 82 a 160 da etapa de enriquecimento .....	67
<b>Tabela 5.2</b> Estatística descritiva das cargas de nitrogênio aplicadas no RBS durante a fase 1 (Temperatura= 35 °C).....	71
<b>Tabela 5.3</b> Estatística descritiva do coeficiente de consumo de nitrito por consumo de amônio durante a fase 1 (Temperatura= 35 °C) .....	74
<b>Tabela 5.4</b> Estatística descritiva da carga de nitrogênio aplicada e concentração de amônio e nitrito afluentes ao RBS durante a fase 2 (Temperatura= 25 °C).....	81

<b>Tabela 5.5</b> Coeficiente estequiométrico de consumo de nitrito por consumo de amônio observado na fase 2.....	85
<b>Tabela 5.6</b> Estatística descritiva da carga de nitrogênio (nitrito + amônio) e concentração de amônio e nitrito afluente ao RBS durante a fase 3 (Temperatura= 20 °C).....	91
<b>Tabela 5.7</b> Estatística descritiva do coeficiente de consumo de nitrito por consumo de amônio observados durante a fase 3.....	94
<b>Tabela 5.8</b> Estatística descritiva da eficiência de remoção de amônio e nitrito observado no RBS nas 3 fases .....	97
<b>Tabela 5.9</b> Resumo dos parâmetros operacionais e resultados obtidos nas fases 1, 2 e 3 desta pesquisa.....	100
<b>Tabela 5.10</b> Identificação das bandas de DGGE a partir do RDP Classifier e Blastn .....	106
<b>Tabela 5.11</b> Micro-organismos identificados a partir do gel de DGGE .....	107

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Anammox	<i>Anaerobic ammonium oxidation</i> ou Oxidação anaeróbia da amônia
AOB	<i>Ammonia oxidizing bacteria</i> ou Bactérias oxidadoras de amônia
ATP	Adenosina Trifosfato
CANON	<i>Completely Autotrophic Nitrogen removal Over Nitrite</i> ou Remoção de nitrogênio completamente autotrófica até nitrito
Comammox	<i>Complete Ammonia Oxidation</i> ou Oxidação completa da amônia
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
DBO	Demanda biológica de oxigênio
DESA	Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental
DGGE	<i>Denaturing gradient gel electrophoresis</i> ou Eletroforese em gel de gradiente desnaturante
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DQO	Demanda química de oxigênio
FPM	Força próton motiva
N	Nitrogênio
NOB	<i>Nitrite oxidizing bacteria</i> ou Bactérias oxidadoras de nitrito
NTK	Nitrogênio Total Kjeldahl
OLAND	<i>Oxygen Limited Autotrophic Nitrification Denitrification</i>
RBS	Reator em Batelada Sequencial
RPM	Rotações por minuto
SHARON	<i>Single Reactor System for High Ammonium Removal over Nitrite</i> ou Sistema de reator único para alta remoção de amônia até nitrito
ST	Sólidos totais
STV	Sólidos totais voláteis
TDH	Tempo de Detenção Hidráulico

UASB      *Upflow Anaerobic Sludge Blanket* ou Reator de anaeróbio de fluxo ascendente  
e manta de lodo

UFMG      Universidade Federal de Minas Gerais

# 1 INTRODUÇÃO

O nitrogênio (N), fundamental para os micro-organismos por compor diversas biomoléculas como ácidos nucleicos, proteínas e clorofila, quando em excesso no ambiente pode impactar negativamente o meio ambiente e a saúde pública. Impactos ao meio ambiente relacionam-se à eutrofização dos corpos d'água, toxicidade à vida aquática e depleção do oxigênio dissolvido devido à oxidação do íon amônio (VAN DE GRAAF *et al.*, 1995; BERNHARD, 2012; HU *et al.*, 2013). Com relação à saúde pública, relaciona-se o nitrato, que pode estar associado a doenças como a metahemoglobinemia em crianças (síndrome do bebê azul) e também à ocorrência de câncer gástrico em adultos (CASTAÑEDA-CHAVEZ *et al.*, 2010; SCHEEREN *et al.* 2011; HU *et al.* 2013; JAISWAL *et al.*, 2015). Por isso, tecnologias e estratégias para a remoção de nitrogênio vêm sendo desenvolvidas empregando-se basicamente processos físicos, químicos e biológicos (KUNZ *et al.*, 2009; LARA, 2009; SCHEEREN *et al.*, 2011).

Segundo Austin *et al.* (2013), os ecossistemas aquáticos são os mais afetados pela poluição por compostos nitrogenados devido às atividades humanas e isso tem emergido na atualidade como um grave problema, que pode ocasionar um desequilíbrio no ciclo do nitrogênio. Outro agravante refere-se à falta de estrutura de saneamento básico, principalmente nas regiões de baixa renda, onde o esgoto doméstico é lançado nos corpos d'água sem o tratamento adequado, aumentando os níveis de nutrientes (nitrogênio e fósforo, principalmente), que são elementos limitantes para o crescimento de plantas e algas na água.

Convencionalmente, o processo biológico de nitrificação e desnitrificação é usado para remover nitrogênio de efluentes. Neste processo o íon amônio é primeiramente oxidado a nitrito e em seguida a nitrato, em condições aeróbias. Logo após é feita a desnitrificação, etapa anaeróbia e heterotrófica, onde ocorre a redução do nitrato a nitrogênio gasoso por bactérias desnitrificantes, usando a matéria orgânica como doador de elétrons. Por se tratar de processos com requisitos operacionais distintos, há necessidade de dois reatores, um aeróbio e outro anaeróbio, além da necessidade de fornecer oxigênio em um e fonte de carbono em outro, aumentando significativamente os custos do processo (MA *et al.* 2016).

Diversas pesquisas no meio científico a respeito de remoção de nitrogênio estão voltadas para melhorar a eficiência e redução de custos no processo, otimizando estratégias de tratamento disponíveis. Portanto, tecnologias de remoção autotrófica de nitrogênio, capazes de remover

os compostos sem utilizar matéria orgânica, são consideradas como a via mais sustentável de tratamento de efluentes (MA *et al.* 2016). A remoção autotrófica de nitrogênio pode ser alcançada pela desnitrificação autotrófica (WONG e LEE, 2011; LIU *et al.* 2015), sistemas fotoautotróficos (CAO *et al.* 2015; REGMI *et al.* 2015) e oxidação anaeróbia de amônia – processo anammox (KARTAL *et al.* 2010; KUENEN, 2008). Entre esses processos destaca-se o último, indicado como a forma mais promissora de realizar o pós-tratamento de esgoto (KARTAL *et al.* 2010).

A descoberta do processo anammox tem revolucionado a remoção de nitrogênio de efluentes ricos em amônio, pois as bactérias que realizam a atividade anammox são capazes de converter, anaerobiamente, o íon amônio a nitrogênio gasoso, usando o nitrito como acceptor de elétrons (KARTAL *et al.* 2013).

Com isso, o processo anammox tem provado ser uma excelente substituição ao processo convencional de nitrificação/desnitrificação, uma vez que proporciona em torno de 60% de economia de energia com fornecimento de oxigênio para aeração e redução de 100% nos gastos com matéria orgânica (KARTAL *et al.* 2008; KUENEN 2008; OKABE *et al.* 2011).

Um dos principais desafios da aplicação do processo anammox ao pós-tratamento de esgoto doméstico remete às características desse efluente. No Brasil, parcela significativa dos esgotos domésticos é tratada pela via anaeróbia, destacando o emprego de reatores UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket* ou Reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo), que se prestam fundamentalmente à remoção de matéria orgânica. Sabe-se que esses reatores apresentam dificuldade em satisfazer padrões muito restritivos de lançamento e não são capazes de remover nutrientes do efluente, necessitando, assim, de uma etapa de pós-tratamento (VON SPERLING, 2005). Outro aspecto relevante refere-se à matéria orgânica remanescente desse tratamento, que por sua vez pode inibir as bactérias com atividade anammox, ao passo que favorece o desenvolvimento das bactérias heterotróficas, que competem com as anammox pelo acceptor de elétrons (OSHIKI *et al.* 2011; ALI *et al.* 2015).

Algumas pesquisas têm relatado que as bactérias com atividade anammox e desnitrificantes podem coexistir na presença de matéria orgânica, desde que observadas as concentrações de DQO (Demanda Química de Oxigênio) e a relação entre DQO e nitrogênio. Outra característica típica dos esgotos domésticos refere-se à concentração de nitrogênio amoniacal observada, que varia em torno de 25 a 35 mg.L<sup>-1</sup> (VON SPERLING, 2005), inferior à maioria dos efluentes tratados pelo processo anammox, o que reflete diretamente na relação DQO/N.

De acordo com Ali e Okabe (2015), um dos principais desafios em aplicar o processo anammox ao tratamento convencional de efluentes domésticos é justamente a elevada relação DQO/N e a temperatura de operação dos reatores.

A presença de bactérias heterotróficas em reatores é inevitável (constituem aproximadamente 50% da população) mesmo na ausência de carbono exógeno, devido à formação de produtos de decaimento microbiano (KINDAICHI *et al.* 2004; GILBERT *et al.* 2014a). A influência da relação DQO/N é o parâmetro mais relevante para o controle de crescimento das bactérias heterotróficas a fim de se obter um efetivo processo anammox, onde uma relação DQO/N afluente de aproximadamente 2 até 3 deve ser mantida (DESLOOVER *et al.* 2011; VLAEMINCK *et al.* 2012; SANCHEZ *et al.* 2014; HAN *et al.* 2016; LI *et al.* 2016). Poucos estudos têm investigado a potencial aplicação do processo anammox para remover nitrogênio de efluentes com baixa concentração de amônio e alta relação DQO/N, tal como o efluente de reator UASB tratando esgoto doméstico (LEAL *et al.* 2016).

Strous *et al.* (1997b) e Gao e Tao (2011) relataram que o processo anammox opera na faixa de 20 a 43 °C, com ótimo de 40±3 °C. Já Ali e Okabe (2015) consideram 37 °C como temperatura ótima. Kuenen (2008), Jenni *et al.* (2014) e Ma *et al.* (2016) consideram a temperatura como fator-chave no bom desempenho dos reatores anammox, o que limitaria este processo a efluentes com temperatura em torno de 30 °C. Vale ressaltar que manter reatores de grande escala aquecidos, a fim de proporcionar a maior atividade das bactérias anammox, pode fazer com que o processo se torne inviável economicamente.

O pós-tratamento de efluentes domésticos utilizando o processo anammox tem sido alvo de pesquisas em países da Europa, Ásia e América do Norte, onde foram indicadas condições e estratégias operacionais ótimas distintas entre si, principalmente em relação à temperatura (STROUS *et al.* 1997b; KUENEN 2008; GAO e TAO 2011; JENNI *et al.* 2014; ALI e OKABE 2015; MA *et al.* 2016 ). Ressalta-se que a maior parte dos experimentos conduzidos em temperaturas mais altas foram mantidos sob aquecimento, devido ao clima local proporcionar efluentes com temperatura abaixo da faixa designada como ideal para o metabolismo anammox.

Pesquisa desenvolvida no âmbito nacional indicou que o processo anammox pode ser aplicado com sucesso ao pós-tratamento anaeróbico de efluentes domésticos (Leal *et al.* 2016), entretanto, as condições operacionais mantidas neste experimento seguiram parâmetros obtidos em estudos conduzidos em países com clima distinto do Brasil, principalmente no que

tange à temperatura, mantendo ainda os reatores aquecidos (temperatura de 35 °C) durante o enriquecimento e operação. Para que futuramente seja possível a aplicação deste processo ao pós-tratamento de efluentes de sistemas de tratamento de esgotos em maior escala, é necessário obter as melhores condições quanto à sua operação, mesmo que em menor escala, mas adaptadas à realidade, ou seja, temperatura ambiente.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 *Objetivo Geral***

O objetivo geral dessa pesquisa é avaliar, em escala laboratorial, a aplicação do processo anammox ao pós-tratamento de esgoto doméstico proveniente de tratamento anaeróbio (reator UASB), utilizando um reator em batelada sequencial submetido a diferentes temperaturas.

### **2.2 *Objetivos Específicos***

- 1 Avaliar o desempenho do reator anammox na remoção de nitrogênio amoniacal e DQO quando submetido às temperaturas de 35 °C, 25 °C e 20 °C;
- 2 Identificar, comparar e avaliar eventuais alterações na comunidade bacteriana presente no reator anammox nas diferentes condições operacionais testadas;
- 3 Identificar as condições operacionais adequadas a fim de que o processo seja aplicado em maior escala.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Ciclo do nitrogênio

O nitrogênio é um elemento químico essencial a todos os organismos por participar da constituição de moléculas orgânicas imprescindíveis à vida como proteínas e ácidos nucleicos, além de ser um dos elementos químicos mais abundantes na natureza, podendo ser encontrado nas formas orgânica e inorgânica. A maior parte do nitrogênio da Terra encontra-se sob a forma inorgânica, como amônio, nitrato e nitrogênio gasoso ( $N_2$ ), este último constituindo 78% do ar atmosférico. Em sua forma gasosa é quimicamente inerte, o que não possibilita seu uso direto como fonte de nitrogênio, exceto para algumas espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio (VAN DE GRAAF *et al.* 1997; MADIGAN *et al.* 2010). Segundo Madigan *et al.* (2010), o nitrogênio é o elemento mais abundante nas células após o carbono.

Elemento do grupo 5B, o nitrogênio apresenta estados de oxidação que variam de -3 a +5 (TABELA 3.1). Em cada estado de oxidação, o átomo de nitrogênio combina com átomos de hidrogênio, oxigênio ou outros átomos de nitrogênio, permitindo pelo menos uma molécula inorgânica única por estado de oxidação. Embora algumas destas moléculas sejam termodinamicamente mais estáveis do que outras, todos os estados de oxidação são possíveis em sistemas aquosos, pois o estado de oxidação do nitrogênio num dado ambiente é controlado pela cinética (a energia de ativação dos compostos nitrogenados é elevada) e não pelo equilíbrio termodinâmico (JETTEN *et al.* 2009).

De acordo com Von Sperling (2005), no meio aquático o nitrogênio pode ser encontrado em sua forma molecular ( $N_2$ ) (escapando para a atmosfera), orgânica (dissolvido e em suspensão), amônia (livre ou não ionizada –  $NH_3$  e ionizada –  $NH_4^+$ , íon amônio), nitrito ( $NO_2^-$ ) e nitrato ( $NO_3^-$ ). Ainda segundo o autor, as espécies inorgânicas podem ser agrupadas em nitrogênio total (NT) e Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK), os quais são formados pelas seguintes substâncias conforme as Equações 3.1 e 3.2:

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

$$NT = NTK + NO_2^- + NO_3^- \text{ (nitrogênio total)} \quad (3.2)$$

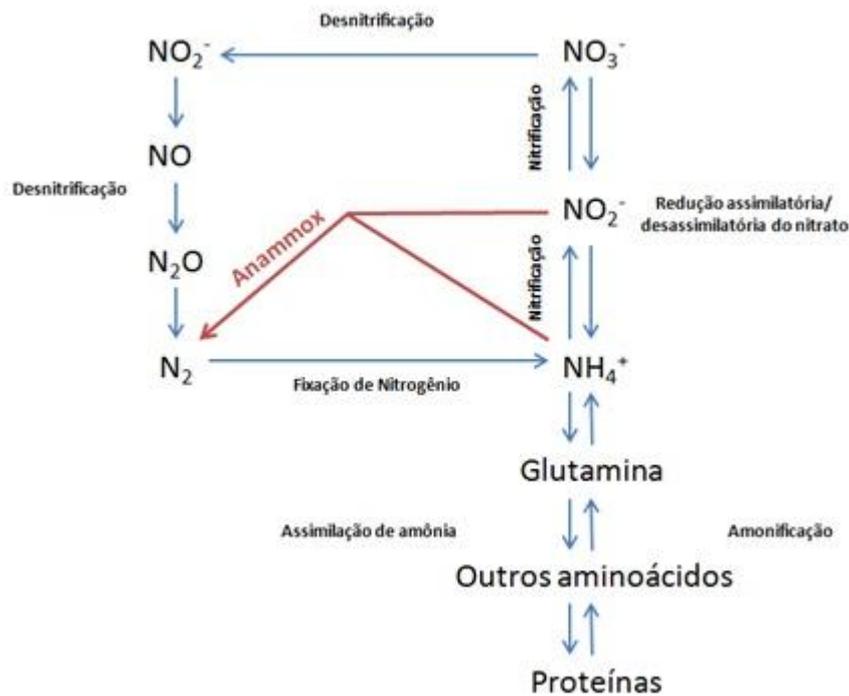
**Tabela 3.1** Estados de oxidação, toxicidade para as células microbianas e propriedades dos compostos nitrogenados

Composto Nitrogenado	Fórmula	Estado de oxidação	Toxicidade e Propriedades
Nitrato	$\text{NO}_3^-$	+5	Não é tóxico em concentrações fisiológicas, porém, esse ânion é fortemente oxidante e o ácido nítrico é tóxico ( $\text{HNO}_3$ ; $\text{pK}_a = -1,4$ ).
Dióxido de nitrogênio	$\text{NO}_2(\text{g})$	+4	Gás laranja e tóxico que surge a partir da oxidação do ácido nítrico e do dióxido de oxigênio ( $\text{O}_2$ ).
Nitrito	$\text{NO}_2^-$	+3	Tóxico, liga-se a átomos de ferro celulares como na molécula de hemoglobina, por exemplo.
Óxido nítrico	$\text{NO}(\text{g})$	+2	Tóxico e altamente reativo. Liga-se a átomos de ferro do grupo heme e Fe/S. Forma complexos com o ferro, como o $\text{Fe}(\text{NO})_2$ .
Óxido nitroso	$\text{N}_2\text{O}(\text{g})$	+1	Quimicamente inerte e não tóxico em concentrações fisiológicas.
Gás dinitrogênio	$\text{N}_2$	0	Quimicamente inerte e não tóxico.
Hidroxilamina	$\text{NH}_2\text{OH}(\text{aq})$	-1	Tóxico quando ligado ao grupo heme. Mutagênico, forma uracila devido à desaminação da citosina, causando assim uma transição do DNA ( $\text{G/C} \rightarrow \text{T/A}$ ).
Hidrazina	$\text{N}_2\text{H}_4(\text{aq})$	-2	Altamente tóxico. Utilizado como combustível de foguetes, forma monohidratos.
Amônio	$\text{NH}_4^+$	-3	Não tóxico em concentrações fisiológicas, porém, o cátion amônia ( $\text{NH}_3^+$ ) é tóxico, ( $\text{pK}_a = 9,25$ ).

Fonte: Simon e Klotz (2013), adaptado.

O nitrogênio orgânico é rapidamente desaminado a ureia (que constitui o maior componente da urina) e esta é hidrolisada a amônio pela enzima urease. Este processo bioquímico é evidente em esgotos tanto de origem doméstica quanto industrial, apesar da ocorrência dos compostos nitrogenados em concentrações variadas (LARA, 2009).

As reações são realizadas de diferentes maneiras por distintos micro-organismos, constituindo o ciclo do nitrogênio (FIGURA 3.1). As transformações cíclicas dos compostos nitrogenados têm importância para o retorno do nitrogênio à biosfera. Do ponto de vista microbiológico, as transformações no ciclo ocorrem por meio de processos catabólicos (nitrificação, desnitrificação, redução desassimilatória do nitrato e oxidação anaeróbia de amônio) e processos anabólicos (redução assimilatória do nitrato, assimilação e fixação de nitrogênio) (JETTEN *et al.* 2009).



**Figura 3.1** Ciclo do nitrogênio

Fonte: Pereira, 2013

De acordo com Bothe *et al.* (2007), os compostos mais estáveis são o nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e o íon amônio ( $\text{NH}_4^+$ ), que podem causar graves problemas ambientais. O nitrogênio amoniacal pode ser tóxico ao ambiente e quando oxidado a nitrato, diminui a quantidade de oxigênio dissolvido nos ecossistemas aquáticos, causando mortalidade da biota aeróbia. A amônia ionizada ( $\text{NH}_4^+$ ) não é tóxica e é consumida por bactérias preferencialmente como nutriente. Já a contaminação decorrente de amônia livre ( $\text{NH}_3$ ) é tóxica, podendo afetar a saúde de peixes em concentrações acima de  $0,02 \text{ mg.L}^{-1}$  (PEREIRA e MERCANTE, 2005).

As características físicas e químicas dos corpos d'água definem o equilíbrio entre as diferentes espécies de nitrogênio amoniacal. Temperatura e pH elevados deslocam o equilíbrio químico no sentido da amônia livre. Na temperatura de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , a proporção da amônia livre em relação à amônia total é aproximadamente o dobro em relação à temperatura de  $15 \text{ }^\circ\text{C}$ . Com relação aos valores de pH, temos as seguintes formas:  $\text{pH} < 8$ , praticamente toda a amônia na forma ionizada ( $\text{NH}_4^+$ );  $\text{pH} = 9,5$ , aproximadamente 50% livre e 50% ionizada; e  $\text{pH} > 11$ , praticamente toda a amônia na forma livre (BAIRD, 2002; MOTA & VON SPERLING, 2009).

No que tange à saúde, o nitrato pode ser tóxico caso ocorra sua ingestão em elevadas concentrações principalmente por crianças, e devido à sua particularidade de associação à

molécula de hemoglobina no sítio ocupado pelo oxigênio, podendo ocasionar a doença Metahemoglobinemia (Síndrome do bebê azul), prejudicando o transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos pela molécula de hemoglobina. O nitrato pode ainda ser carcinogênico, quando em algumas circunstâncias é reduzido a nitrito no estômago e sua forma de N-nitrosamina pode causar câncer no estômago (JAISWAL *et al.* 2015).

O nitrogênio inorgânico também pode se apresentar como nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), que é instável, e rapidamente convertido a nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), ambos encontrados tanto em sistemas naturais como em unidades de tratamento de efluentes. O nitrito pode ser o responsável pela formação de substâncias de poder mutagênico e carcinogênico (BAIRD, 2002). Há também liberação para a atmosfera dos gases óxido nítrico (NO) e óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), os quais são gases que contribuem para o efeito estufa e portanto também estão envolvidos nas mudanças climáticas atuais (AUSTIN *et al.* 2013)

### 3.1.1 Nitrificação

A nitrificação é um processo de duplo estágio que envolve a oxidação quimiolitotrófica de amônio a nitrato sob condições estritamente aeróbias. No primeiro estágio, nitrificação, o amônio é oxidado a nitrito por bactérias oxidadoras de amônia (AOB, do inglês *ammonium oxidizing bacteria*), já o segundo estágio, nitratação, envolve a oxidação do nitrito a nitrato por bactérias oxidadoras de nitrito (NOB, do inglês *nitrite oxidizing bacteria*) (MADIGAN *et al.* 2010). Os gêneros *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* correspondem aos principais gêneros de bactérias do primeiro e segundo estágios, respectivamente. Segundo AHN (2006), o processo de nitrificação e nitratação pode ser expresso pela Equação 3.3, que mostra a oxidação completa do amônio a nitrato, incluindo a síntese celular.



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

As reações mediadas pelas bactérias nitrificantes geram pequena quantidade de energia, fazendo com que o crescimento global desses micro-organismos (gramas de células produzidas por mol de substrato oxidado) seja relativamente baixo (MADIGAN *et al.* 2010; JETTEN *et al.* 2009). Para *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* o rendimento de biomassa é de 0,15 e 0,02 miligramas de células por miligrama de  $\text{N-NH}_4^+$  oxidado, respectivamente (AHN, 2006). Bactérias nitrificantes são organismos de vida livre, encontrados no solo e na água, entrando nos sistemas de tratamento através das águas residuárias e por infiltração. Elas adquirem energia para atividade celular a partir da oxidação de compostos químicos (AOB a partir da oxidação da amônia, NOB a partir da oxidação de nitrito) e carbono para síntese celular a partir de uma fonte inorgânica, no caso  $\text{CO}_2$ , e na forma de alcalinidade bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) (VAN DE GRAAF *et al.* 1995; GERARDI, 2006).

As reações da nitrificação podem ser afetadas por vários fatores ambientais incluindo a temperatura, o pH, a concentração de oxigênio dissolvido e o tempo de retenção celular. Dentre as condições ótimas para a nitrificação tem-se: temperatura na faixa de 25 °C a 35 °C; pH entre 7,5 e 9,0 e concentração de oxigênio dissolvido superior a 2  $\text{mg.L}^{-1}$ . De acordo com Metcalf & Eddy (2003), a velocidade de nitrificação diminui significativamente em valores de pH inferiores a 6,8, justificando assim, o adequado fornecimento de alcalinidade ao sistema, de maneira que a atividade dos micro-organismos seja mantida.

### 3.1.2 Desnitrificação

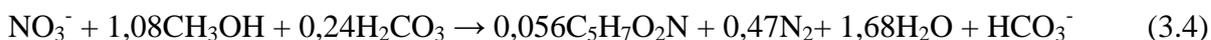
A desnitrificação consiste na redução do nitrato a compostos de nitrogênio gasoso, processo mediado por bactérias desnitrificantes (BOTHE *et al.* 2007; JETTEN, 2008). Por se tratar de um processo redutivo, também é considerado uma forma de respiração, onde os micro-organismos em condições limitadas de oxigênio ou mesmo anóxicas, utilizam compostos nitrogenados inorgânicos como aceptores finais de elétrons. Na desnitrificação completa, o nitrato é reduzido a nitrito, óxido nítrico, óxido nitroso e, por fim a nitrogênio gasoso (MADIGAN *et al.* 2010; BOTHE *et al.* 2007).

Muitos micro-organismos são capazes de realizar o processo de desnitrificação, sendo que grande parte deles são bactérias gram-negativas pertencentes aos grupos *alfa* e *beta* do filo *Proteobacteria* como *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Paracoccus* e *Thiobacillus*. Algumas bactérias gram-positivas, como as do gênero *Bacillus* e poucas arqueias halogênicas, também são capazes de realizar a desnitrificação (AHN, 2006). O processo pode ser desenvolvido por bactérias quimiorganotróficas, litoautotróficas, fototróficas e alguns fungos. Os micro-

organismos desnitrificantes autotróficos utilizam compostos de enxofre, hidrogênio, amônio ou nitrito como doadores de elétrons e o nitrato como aceptor de elétrons. A maioria das bactérias desnitrificantes é anaeróbia facultativa e heterotrófica, que podem utilizar uma grande variedade de compostos orgânicos, como por exemplo: metanol, acetato, glicose, etanol, entre outros, como doadores de elétrons para obtenção de energia e fontes de carbono, inclusive aqueles encontrados em águas residuárias (AHN, 2006).

Algumas bactérias realizam a desnitrificação de forma completa, como *Paracoccus denitrificans* e *Pseudomonas stutzeri*. Entretanto, outras realizam apenas a primeira etapa do processo (redução do nitrato a nitrito), como é o caso da bactéria *Escherichia coli*, o que pode contribuir com a destruição da camada de ozônio e chuvas ácidas, devido à produção os óxidos nítrico e nitroso durante o processo (BOTHE *et al.* 2007; MADIGAN *et al.* 2010; JETTEN *et al.* 2009).

Os organismos desnitrificantes são amplamente encontrados no meio ambiente e exibem, em termos de metabolismo, uma variedade de características distintas. A Equação 3.4 representa a desnitrificação utilizando o metanol como fonte de elétrons, incluindo a síntese celular (AHN, 2006).



O processo de desnitrificação possui quatro etapas. Primeiramente o nitrato é reduzido a nitrito, etapa da desnitrificação, que envolve uma enzima integral de membrana, a nitrato redutase, cuja síntese é inibida pelo oxigênio molecular. Na segunda etapa ocorre a conversão do nitrito a óxido nítrico, onde atua a enzima nitrito redutase. Nas etapas subsequentes, ocorre a redução do óxido nítrico a óxido nitroso e por último o óxido nitroso é reduzido a nitrogênio gasoso, mediadas pelas enzimas óxido nítrico redutase e óxido nitroso redutase, respectivamente. Assim como a primeira, as demais enzimas envolvidas no processo são reguladas de maneira coordenada pela presença de oxigênio. Além disso, a presença de nitrato é essencial para que todas essas enzimas sejam plenamente expressas (MAIER *et al.* 2009; MADIGAN *et al.* 2010; SIMON & KLOTZ, 2013).

Este processo é uma das principais maneiras pela qual o nitrogênio gasoso é formado biologicamente e auxilia no tratamento de águas residuárias, uma vez que remove o nitrato e minimiza o processo de eutrofização quando o esgoto é lançado em lagos ou riachos.

### 3.1.3 Oxidação anaeróbia de amônia

A oxidação anaeróbia da amônia foi descoberta há duas décadas e envolve a oxidação do íon amônio diretamente a nitrogênio gasoso, utilizando o nitrito como acceptor de elétrons (VAN DE GRAAF *et al.*, 1996), processo denominado anammox (Anaerobic Ammonium Oxidation - oxidação da amônia em condições anaeróbias). A descoberta desse processo desencadeou uma revolução no ciclo convencional do nitrogênio, uma vez que acreditava-se que a oxidação da amônia só era possível de ocorrer na presença de oxigênio, e tem sido indicado como uma promissora tecnologia de remoção de nitrogênio por proporcionar tratamento com energia neutra ou mesmo com geração de energia (KARTAL *et al.* 2010). Este item será aprofundado no tópico 3.2.

Guyen *et al.* (2005) mostraram que bactérias com atividade anammox possuem um metabolismo mais versátil do que era previamente suposto, sendo capazes de, em certas situações, usar ácidos orgânicos (acetato e propionato) como doadores de elétrons para reduzir nitrato a nitrito e competir com bactérias heterotróficas desnitrificantes por esses compostos, o que confere a elas vantagem sobre outras espécies de anammox. O produto final da redução de nitrato por bactérias anammox é o nitrogênio gasoso (KARTAL *et al.* 2007a; KARTAL *et al.* 2007b). Kartal *et al.* (2007a), sugeriram que *Ca. Anammoxoglobus propionicus* são mais eficientes usando o nitrito produzido a partir da redução dissimilatória do nitrato e que esta espécie é de particular interesse para o tratamento de efluentes, pois pode ser aplicada no tratamento de efluentes contendo nitrato e/ou matéria orgânica.

### 3.1.4 Redução desassimilatória de nitrato

A redução desassimilatória do nitrato a íon amônio ocorre em condições limitantes de oxigênio e tem a função de eliminar o excesso de potencial redutor ou gerar amônia para assimilação e crescimento celular anaeróbio (YE e THOMAS, 2001). Esse processo, bastante investigado na bactéria *Bacillus subtilis*, ocorre em duas etapas: a primeira envolve a redução do nitrato a nitrito e é denominada respiração do nitrato. Esse passo inicial é acoplado à produção de energia na maioria dos organismos e, apesar de necessário, não é um passo limitante. O segundo passo é a redução do nitrito a amônio, que é a etapa crítica da reação global. Ocorre em ambientes com excesso de compostos redutores, tais como sedimentos anaeróbios marinhos, fontes termais ricas em sulfeto ( $S_2^-$ ), trato gastrointestinal humano e nos organismos de animais de sangue quente (BOTHE *et al.* 2007). Esse processo é regulado pelo oxigênio, mas não é afetado pelo íon amônio e o nitrogênio reduzido não é utilizado pela

célula (KIELING, 2004). É interessante notar que a maioria das bactérias que realizam esta função utiliza a fermentação em vez de metabolismo oxidativo. O processo geral da redução desassimilatória do nitrato pode ser representado pela Equação 3.5.



### 3.1.5 Redução assimilatória de nitrato

A redução assimilatória do nitrato, assim como a redução desassimilatória, envolve a redução do nitrato a íon amônio, a qual será utilizada na biossíntese celular. Este processo, entretanto, ocorre tanto em condições aeróbias quanto anaeróbias, não resulta em rendimento energético e o produto, íon amônio, não é excretado para o meio extracelular. A quantidade de nitrogênio reduzido nesse processo depende da demanda para a produção de biomassa. Quando existe grande concentração do íon amônio o processo é inibido ou torna-se insignificante (KIELING, 2004).

### 3.1.6 Assimilação de amônio e amonificação

A assimilação de amônio ocorre quando o amônio, resultante da redução de nitrato, é incorporado na célula e aos compostos de carbono, via enzimas glutamina sintase e glutamato sintase. Em um primeiro instante o amônio se combina com o glutamato formando a glutamina e posteriormente outros aminoácidos são formados, os quais se ligam formando as proteínas. A amonificação consiste no processo contrário à assimilação de amônio, onde os compostos orgânicos nitrogenados (aminoácidos e nucleotídeos) liberados das células sofrem hidrólise por meio de enzimas bacterianas, resultando na liberação de grupos amina, resultando na produção de nitrogênio reduzido sob duas formas: amônia livre ( $\text{NH}_3^+$ ) ou ionizada ( $\text{NH}_4^+$ ). A quantidade de cada forma é dependente do pH, sendo que em valores de pH menores que 9, a maior parte do nitrogênio reduzido está na forma de  $\text{NH}_4^+$  (BOTHE *et al.* 2007; MADIGAN *et al.* 2010).

### 3.1.7 Fixação biológica de nitrogênio

A fixação biológica de nitrogênio é considerada um dos processos biológicos mais importantes, uma vez que a maior parte do nitrogênio, essencial para as necessidades biossintéticas celulares, está na atmosfera e é indisponível para grande parte dos organismos vivos. Este processo anabólico consiste na redução de nitrogênio gasoso a íon amônio, necessita de energia para quebrar a ligação tripla do nitrogênio e só é realizado por micro-

organismos que possuem a enzima nitrogenase (EQUAÇÃO 3.6) (KIELING, 2004; MAIER *et al.* 2009). Os micro-organismos capazes de realizar tal processo são livres da dependência de utilizar formas fixadas de nitrogênio, como amônia ou nitrato, conferindo-lhes uma vantagem ecológica significativa (MADIGAN *et al.* 2010).



Dentre os procariotos capazes de fixar nitrogênio gasoso, alguns são de vida livre e outros só conseguem realizar esse processo quando associados com determinados tipos de plantas. Dentre os micro-organismos de vida livre, é possível citar os aeróbios *Azotobacter*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes* e *Thiobacillus* e os anaeróbios *Clostridium*, *Desulfovibrio*, *Methanosarcina*, *Methanococcus*, entre outros. Em relação aos micro-organismos que fixam nitrogênio em simbiose com plantas, é possível citar as bactérias do gênero *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* ou *Azorhizobium* em associação com plantas leguminosas como soja, ervilha, trevo, alfarrobeira. A importância da fixação biológica de nitrogênio, portanto, está associada à disponibilização de formas assimiláveis desse composto para outros organismos, como animais e plantas. Algumas formas de fixação de nitrogênio são de enorme relevância agrícola, disponibilizando este elemento para culturas essenciais, como por exemplo, a soja (MADIGAN *et al.* 2010).

O processo é favorecido em ambientes com pouca disponibilidade de nitrogênio e parece não ser relevante em sistemas de tratamento de águas residuárias. O íon  $\text{NH}_4^+$  presente nas águas residuárias é oriundo principalmente de processos de decomposição da matéria orgânica nitrogenada (KAMPSCHREUR *et al.* 2009).

### **3.2 Processo anammox**

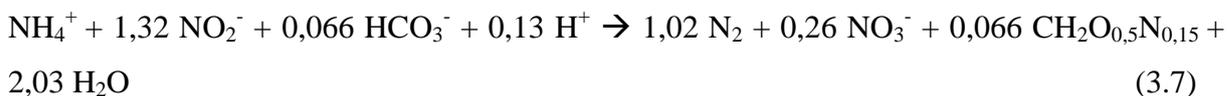
Em 1977, o bioquímico austríaco Broda, por meio de cálculos termodinâmicos, previu a possibilidade da existência de um organismo capaz de oxidar amônia em condições anóxicas, utilizando o nitrito ou nitrato como aceptor de elétrons. Esta reação seria possível do ponto de vista energético com uma substancial liberação de energia livre de Gibbs igual a  $-358 \text{ kJ.mol}^{-1}$  (BRODA, 1977). A primeira evidência de que nitrogênio amoniacal poderia ser oxidado na ausência de oxigênio ocorreu há duas décadas por Mulder *et al.* (1995), que verificaram o consumo de amônio, o desaparecimento de nitrato e aumento na produção de nitrogênio gasoso em condições anóxicas em um reator desnitrificante em escala piloto tratando efluente

de uma indústria de fermento em Delft (Holanda), através dos perfis de nutrientes e cálculos termodinâmicos.

O processo, denominado anammox, é mediado por micro-organismos anaeróbios considerados surpreendentes em sua ecofisiologia, estrutura celular e capacidade de oxidar amônio anaerobicamente (MA *et al.* 2016). As bactérias com atividade anammox oxidam o íon amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) diretamente a nitrogênio gasoso ( $\text{N}_2$ ) utilizando o nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) como acceptor de elétrons e fixam gás carbônico ( $\text{CO}_2$ ) (VAN DE GRAAF *et al.* 1996; STROUS *et al.* 1998; KARTAL *et al.* 2012). Além do nitrito, outros compostos podem ser utilizados como acceptor de elétrons pelas bactérias que realizam o processo anammox, como os óxidos de ferro e manganês (VAN NIFTRIK & JETTEN, 2012). Tal metabolismo já foi observado nas espécies *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* e *Candidatus Scalindua sp* (STROUS *et al.* 2006; VAN VOSENBERG *et al.* 2008). A espécie *Candidatus Anammoxoglobus sulfat* utiliza o  $\text{SO}_4^{-2}$  como acceptor de elétrons, conforme descrito por Liu *et al.* (2008b).

As bactérias com atividade anammox possuem metabolismo quimiolitotrófico e apresentam crescimento lento, podendo atingir tempo de duplicação de até 11 dias (STROUS *et al.* 1998; SCHEEREN *et al.* 2011). O modo de crescimento lento desses micro-organismos resulta em uma estequiometria que apresenta baixa produção de biomassa por mol de amônio consumido (STROUS *et al.* 1998). De acordo com Dosta *et al.* (2008) a taxa de crescimento das anammox é reduzida de 30 a 40% a cada 5 °C de redução da temperatura, que tem seu ótimo reportado entre 35 e 40 °C.

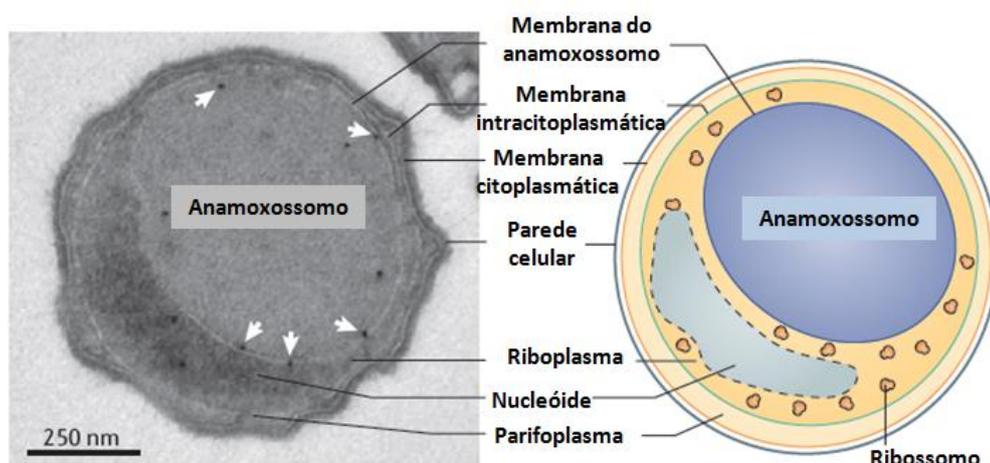
Segundo a estequiometria da reação anammox, proposta por Strous *et al.* (1998), para cada mol de amônio consumido, são consumidos 1,32 mol de nitrito, e são produzidos 0,26 mol de nitrato (Equação 3.7). A reação catabólica de oxidação de amônio é realizada quinze vezes para que seja possível a fixação de uma molécula de dióxido de carbono.



Os micro-organismos que realizam o processo anammox pertencem ao domínio *Bacteria*, filo dos *Planctomycetes* e ordem *Brocadiales*, possuem forma de cocos, têm aproximadamente um micrômetro de diâmetro e possuem coloração alaranjada devido à elevada concentração de citocromos no interior de suas células (JETTEN *et al.* 1998). Os *Planctomycetes* formam um

grupo distinto dentro do domínio *Bacteria*, o qual possui características bastante peculiares, entre elas a presença de compartimentalização intracelular.

Neste compartimento formado por estrutura membranosa de lipídeos laterais contendo anéis de ciclobutano concatenados unidos por ligações éter ou éster, denominado anamoxossomo, estão localizadas enzimas que possibilitam a oxidação anaeróbia da amônia, como a hidrazina hidrolase e a hidrazina oxidoreductase (FUERST e SAGULENKO, 2011; VAN NIFTRIK et al, 2004; KARTAL *et al.* 2012), como pode ser observado na Figura 3.2. Esta estrutura ocupa grande parte do volume da célula (LINDSAY *et al.* 2001). A membrana do anamoxossomo é a estrutura que realiza a separação entre esta organela e o riboplasma circundante, o que é importante para que seja gerada força próton motiva (FPM) através da membrana do anamoxossomo pela ATP sintase, para geração de energia na célula. Além disso, esta estrutura membranosa possui densidade elevada, fator importante para impedir a saída de compostos intermediários tóxicos do metabolismo anammox, como por exemplo, a hidrazina (FUERST e SAGULENKO, 2011).



**Figura 3.2** - Micrografia eletrônica (direita) e representação esquemática (esquerda) de uma célula anammox mostrando o anamoxossomo.

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

As conversões bioquímicas que levam à formação de  $N_2$  a partir de  $NO_2^-$  e  $NH_4^+$  foram objeto de um grande número de estudos. Van de Graaf *et al.* (1997) foram os primeiros a propor uma rota metabólica para a oxidação anaeróbia de amônio por meio de experimentos que utilizaram compostos marcados com  $^{15}N$  em combinação com espectrometria de massa. Neste primeiro modelo hipotético, o nitrito ( $NO_2^-$ ) é reduzido à hidroxilamina ( $NH_2OH$ ) por uma “enzima redutora de nitrito” (nir). Então a hidroxilamina e o amônio ( $NH_4^+$ ) são condensados

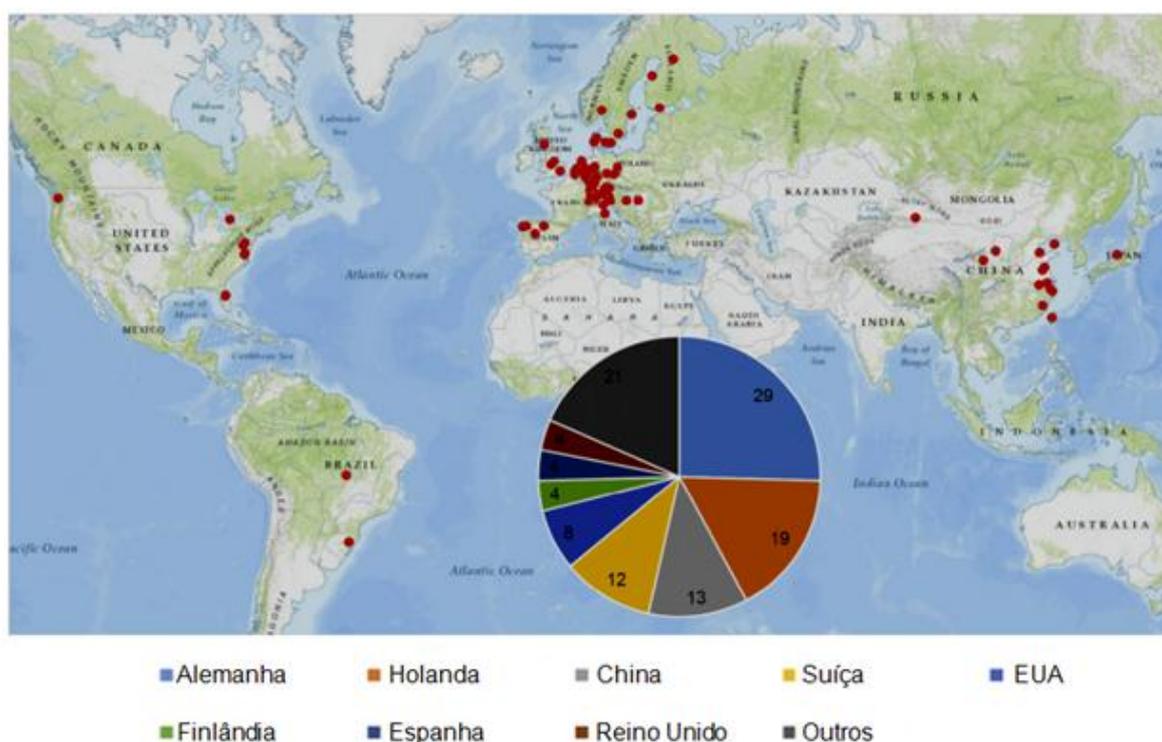
à hidrazina ( $N_2H_4$ ) pela enzima hidrazina hidrolase (hh). Por fim, a hidrazina é oxidada a nitrogênio gasoso ( $N_2$ ) pela enzima hidroxilamina oxidoreductase (hao).

Mais recentemente, uma nova rota metabólica para a oxidação anaeróbia de amônio foi proposta baseada no sequenciamento do genoma de uma bactéria com atividade anammox *Candidatus* “*Kuenenia stuttgartiensis*” (STROUS *et al.* 2006). A reconstrução deste genoma revelou a presença de um gene que codifica uma enzima redutora de nitrito, que na verdade, é um citocromo tipo cd1 nitrito redutase (nir). Esse tipo de nitrito redutase, reduz nitrito a óxido nítrico (NO) e não à  $NH_2OH$ , como se pensava anteriormente. De acordo com esta rota,  $NO_2^-$  é primeiramente reduzido à NO.  $NH_4^+$  é então combinado com NO para formar  $N_2H_4$ , que posteriormente é oxidada a  $N_2$ .

Estudando os compostos intermediários da reação anammox, Kartal *et al.* (2008) propôs que as reações catabólicas deste processo têm início com a redução do  $NO_2^-$  à NO por uma enzima nitrito redutase do tipo cd (nir). Esta reação, possivelmente é seguida pela redução do NO à  $NH_2OH$  por uma enzima do tipo hidroxilamina óxido redutase (hao). A  $NH_2OH$  é então condensada com  $NH_4^+$  para formar  $N_2H_4$ . Alternativamente, NO pode ser condensado diretamente à  $N_2H_4$ , conforme proposto por Strous *et al.* (2006). A  $N_2H_4$  é então oxidada à  $N_2$  (Kartal *et al.* 2008). Os elétrons resultantes da oxidação da  $N_2H_4$ , reação que é catalisada por uma enzima oxidadora de hidrazina (hdh), são transportados por um complexo do tipo citocromo bc1 para as enzimas nitrito redutase (nir) e hidroxilamina óxidoreductase (hao).

Já foram detectadas bactérias com atividade anammox em ecossistemas naturais como regiões anóxicas de sedimentos marinhos e colunas d'água (SCHMID *et al.* 2007), sedimentos de água doce e colunas de água (MOORE *et al.* 2011; YOSHINAGA *et al.* 2011; HU *et al.* 2013), regiões de mangue (MEYER *et al.* 2005; AMANO *et al.* 2011; LI *et al.* 2011); em águas salobras (SANCHEZ-MELSIO *et al.* 2009) e ecossistemas terrestres (HU *et al.* 2011; WANG *et al.* 2011; ZHU *et al.* 2011). Elas também são comuns em ecossistemas artificiais, tais como águas residuárias em estações de tratamento de esgotos (DAPENA-MORA *et al.* 2004; VAN DER STAR *et al.* 2007; ABMA *et al.* 2010; KARTAL *et al.* 2010; TOKUTOMI *et al.* 2011); em sistemas de recirculação utilizados na aquicultura (LAHAV *et al.* 2009; VAN KESSEL *et al.* 2010); em reservatórios de petróleo (LI *et al.* 2010) e em sistemas de tratamento de lixiviado de aterro de resíduos industriais perigosos (EGLI *et al.* 2001) e de aterro de resíduos urbanos (RUSCALLEDA *et al.* 2008).

De acordo com Lackner *et al.* (2014) o processo anammox (em combinação com a nitrificação parcial-processo de desamonificação) é utilizado em cerca de 114 estações de tratamento de águas residuárias em todo o mundo, a maioria em escala plena (88 dos 114) foi construída na Europa, seguido pela China e América do Norte. Na China, no ano de 2009, foi construída a maior usina do mundo para o tratamento de efluente proveniente de indústria de glutamato monossódico, com base no processo anammox (capacidade de tratamento de 11 toneladas de nitrogênio por dia), como mostrado na Figura 3.3 (VAN DER STAR *et al.* 2007; WETT, 2007; ABMA *et al.* 2010; VLAEMINCK *et al.* 2012; NI e ZHANG, 2013, ALI *et al.* 2015).



**Figura 3.3-** Distribuição geográfica dos reatores de desamonificação (nitrificação parcial + anammox) em escala plena ao redor do mundo.

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

Até o momento, foram descritos na literatura sete *Candidatus* a gêneros de bactérias anammox, a maioria inicialmente detectada em sistemas de tratamento de efluentes e cultivada em reatores com diferentes configurações a partir de distintos tipos de inóculo, como pode ser observado na Tabela 3.2. Um gênero em particular, *Candidatus Scalindua*, teve a maioria de seus representantes descobertos em ambientes marinhos (KUENEN, 2008). O termo *Candidatus* (*Ca.*) deve ser empregado, uma vez que ainda não foi possível o isolamento destes micro-organismos por métodos clássicos de microbiologia.

Estudos recentes revelaram que essas bactérias em ambientes marinhos contribuem significativamente para a liberação de nitrogênio fixado dos oceanos (LAM e KUYPERS, 2011; HU *et al.* 2013). Alguns autores explicam que esses micro-organismos são especializados em converter seus substratos em concentrações muito baixas devido à afinidade elevada para o amônio e nitrito (STROUS *et al.* 1999a; YAN *et al.* 2012), o que explica sua ampla ocorrência em ecossistemas antrópicos mesmo com baixas concentrações de nitrogênio (WANG *et al.* 2016). Strous *et al.* (1999a), definiram as constantes de afinidade por amônio e nitrito para *Candidatus Brocadia anammoxidans* como sendo iguais a 5 µM. De acordo com Bitton (2005), as bactérias com atividade anammox têm um papel significante no ciclo global no nitrogênio como agente da regeneração molecular em condições anóxicas. Nos últimos anos tornou-se claro que elas podem ser um dos principais micro-organismos do ciclo global do nitrogênio (JETTEN *et al.* 2009).

O processo conjugado, nitrificação parcial e anammox, quando comparado ao processo convencional de nitrificação de desnitrificação, apresenta como atrativos a redução nos custos operacionais com aeração (cerca de 60% de economia energética), redução de 50% no espaço necessário e cerca de 80% na redução de excesso lodo (JETTEN *et al.* 1997; GAO e TAO, 2011; Ma *et al.* 2016).

Comparado ainda com o processo convencional, o processo anammox tem a capacidade de remover cargas maiores de nitrogênio. Normalmente, a remoção de nitrogênio pelo processo anammox é acima de 2 kg.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>, enquanto os processos convencionais operam com cargas cerca de 10 vezes menores. Tang *et al.* (2011) demonstraram resultados de remoção de 74,3 e 76,7 kgN m<sup>-3</sup> de reator d<sup>-1</sup> em reatores de escala de bancada com curto tempo de retenção hidráulica de 0,16 e 0,11 h, respectivamente.

Além disso, a geração de lodo durante o processo é baixa e o mesmo tem sido considerado ambientalmente sustentável, pois não gera N<sub>2</sub>O, além de consumir o CO<sub>2</sub>, gases que contribuem para o efeito estufa (JETTEN *et al.* 2009; GAO e TAO, 2011; ALI e OKABE, 2015; MA *et al.* 2016).

Entretanto, o lento crescimento dessas bactérias, que aumenta o tempo de partida dos reatores, associado à necessidade de controle rigoroso do processo (pH, temperatura, concentração de oxigênio, concentração dos substratos amônio e nitrito, concentração de substâncias inibitórias como a matéria orgânica, por exemplo) e a obtenção de biomassa são fatores que

ainda limitam o emprego do processo de desamonificação (nitrificação parcial e anammox) em larga escala (STROUS *et al.* 1998; SCHEEREN *et al.* 2011).

A seleção e enriquecimento das bactérias com atividade anammox a partir de uma comunidade bacteriana mista, requer o desenvolvimento das condições que favoreçam as anammox, enquanto limita o crescimento dos outros tipos microbianos. Diferentes reatores vêm sendo utilizados com sucesso para desenvolver a atividade anammox, tais como reator de leito fluidizado (MULDER *et al.* 1995; VAN DE GRAAF *et al.* 1996), reator em batelada sequencial (RBS) (STROUS *et al.* 1998; CHAMCHOI & NITISORAVUT, 2007; WANG *et al.* 2011; ARAÚJO *et al.* 2011), entre outros. Cerca de 50% das estações de tratamento que utilizam o processo anammox operam com reatores em batelada sequenciais (RBS). O segundo tipo de reator anammox mais utilizado opera com biomassa de crescimento granular, seguido por sistemas que utilizam biorreatores de leito móvel com biofilme (MBBR, do inglês, *Moving Bed Biofilm Reactor*) (LACKNER *et al.* 2014).

Os reatores em batelada sequenciais (RBS) também têm sido aplicados com sucesso em muitos laboratórios (STROUS *et al.* 1998; LÓPEZ *et al.* 2008; CHAMCHOI & NITISORAVUT, 2007; WANG *et al.* 2011; ARAÚJO *et al.* 2011; LACKNER *et al.* 2014; PEREIRA *et al.* 2014; LEAL *et al.* 2016). Por ciclos contínuos de alimentação, sedimentação da biomassa e retirada do líquido sobrenadante, as células são selecionadas por suas propriedades de sedimentação e mantidas no interior dos RBS por tempo indeterminado. Normalmente, são utilizados meios contendo amônio, nitrito e carbonato para o cultivo de anammox. Nitrato também pode ser adicionado ao meio a fim de evitar a formação de baixo potencial redox que pode favorecer o crescimento de micro-organismos redutores de sulfato e metanogênicos. Como as bactérias com atividade anammox são essencialmente anaeróbias, um gás inerte como N<sub>2</sub> ou Argônio é fornecido para retirar o oxigênio do meio (KARTAL *et al.* 2012).

Os RBSs vêm sendo recomendados para o enriquecimento das bactérias com atividade anammox pela simplicidade operacional, eficiente retenção de biomassa, homogeneidade na mistura, estabilidade por um longo período de operação e estabilidade sob condições limitantes de substrato (STROUS *et al.* 1998; VAN DONGEN *et al.* 2001; CHAMCHOI & NITISORAVUT, 2007; WANG *et al.* 2011; ARAÚJO *et al.* 2011; PEREIRA *et al.* 2014).

**Tabela 3.2 - Gêneros de bactérias anammox descritos na literatura**

<b>Gênero</b>	<b>Espécie</b>	<b>Habitat</b>	<b>Informações sobre o primeiro experimento de enriquecimento</b>	<b>Referência</b>
<i>Candidatus Kuenenia</i>	<i>Ca. Kuenenia stuttgartiensis</i>	Sistemas de tratamento de efluente	Inóculo: lodo nitrificante Reator: reator 'gas-lift' alimentado com efluente sintético	Schimid <i>et al.</i> (2000)
	<i>Ca. Brocadia anammoxidans</i>	Sistemas de tratamento de efluente	Inóculo: lodo de sistema de tratamento de efluente Reator: RBS alimentado com efluente sintético	Strous <i>et al.</i> (1999b)
	<i>Ca. Brocadia fulgida</i>	Sistemas de tratamento de efluentes	Inóculo: lodo ativado Reator: RBS alimentado com efluente contendo acetato	Kartal <i>et al.</i> (2008)
<i>Candidatus Brocadia</i>	<i>Ca. Brocadia sinica</i>	Sistemas de tratamento de efluentes	Inóculo: lodo de reator anammox (Tsushima <i>et al.</i> (2007)) Reator: Reator de leito expandido e reator UASB alimentado com efluente sintético	Oshiki <i>et al.</i> (2011)
	<i>Ca. Brocadia brasiliensis</i>	Sistemas de tratamento de efluentes	Inóculo: lodo ativado Reator: RBS alimentado com efluente sintético.	Araújo <i>et al.</i> (2011)
	<i>Ca. Brocadia caroliniensis</i>	Sistemas de tratamento de efluentes	Inóculo: lodo de sistema de tratamento de efluente de suinocultura Reator: biorreatores de fluxo contínuo contendo biomassa imobilizada em esferas de polivinil-álcool (PVA)	Vanotti <i>et al.</i> (2011)
<i>Candidatus Anammoxoglobus</i>	<i>Ca. Anammoxoglobus propionicus</i>	Sistemas de tratamento de efluentes	Inóculo: lodo ativado Reator: RBS alimentado com efluente sintético contendo propionato	Kartal <i>et al.</i> (2007a)
	<i>Ca. Anammoxoglobus sulfate</i>	Sistemas de tratamento de efluentes	Inoculum: lodo de reator anammox (Liu <i>et al.</i> (2008a)) Reator: reator com biodiscos alimentado com efluente sintético contendo sulfato	Liu <i>et al.</i> (2008b)

/Continua

<b>Gênero</b>	<b>Espécie</b>	<b>Habitat</b>	<b>Informações sobre o primeiro experimento de enriquecimento</b>	<b>Referência</b>
	<i>Ca. Jettenia asiatica</i>	Ambiente de água doce	Inóculo: sedimento de rio Reator: reator de fluxo ascendente alimentado com efluente sintético	Quan <i>et al.</i> (2008)
<i>Candidatus Jettenia</i>	<i>Ca. Jettenia caeni</i>	Sistemas de tratamento de efluentes	Inóculo: lodo ativado Reator: reator de fluxo ascendente com meio suporte ( <i>non-woven carrier</i> )	Ali <i>et al.</i> (2015)
	<i>Ca. Jettenia moscovienalis</i>	Sistemas de tratamento de efluentes	Inóculo: lodo ativado Reator: RBS alimentado com efluente proveniente da digestão de lodo	Nikolaev <i>et al.</i> (2015)
<i>Candidatus Brasilis</i>	<i>Ca. Brasilis concordiensis</i>	Sistemas de tratamento de efluentes	Inóculo: lodo de lagoa anaeróbia tratando efluente de suinocultura Reator: reator anaeróbio de fluxo ascendente alimentado com efluente sintético	Viancelli <i>et al.</i> (2011)
	<i>Ca. Scalindua brodae and Ca. Scalindua wagneri</i>	Sistemas de tratamento de efluentes	Inóculo: lodo de sistema de tratamento de efluente <sup>a</sup> Reator: reator com biodiscos alimentado com efluente de aterro sanitário	Schmid <i>et al.</i> (2003)
	<i>Ca. Scalindua sorokonii and Ca. Scalindua arabica</i>	Zonas de oxigênio mínimo	- <sup>a</sup>	Wobken <i>et al.</i> (2008)
<i>Candidatus Scalindua</i>	<i>Ca. Scalindua sinooifield</i>	Reservatórios de petróleo com temperatura elevada	-	Li <i>et al.</i> (2010)
	<i>Ca. Scalindua zhenghei</i>	Sedimentos marinhos	-	Hong <i>et al.</i> (2011)
	<i>Ca. Scalindua marina</i>	Sedimentos marinhos	-	Brandsma <i>et al.</i> (2011)
	<i>Ca. Scalindua richardsii</i>	Zonas marinhas sub-óxicas	-	Fuchsman <i>et al.</i> (2012)
	<i>Ca. Scalindua profunda</i>	Sedimentos marinhos	Inóculo: Sedimentos marinhos Reator: RBS com efluentes sintéticos contendo sais marinhos	Van de vossenber <i>et al.</i> (2013)

/Continua

<b>Gênero</b>	<b>Espécie</b>	<b>Habitat</b>	<b>Informações sobre o primeiro experimento de enriquecimento</b>	<b>Referência</b>
<i>Candidatus Anammoximicrobium</i>	<i>Ca. Anammoximicrobium moscowii</i>	Ambientes de água doce	Inóculo: sedimentos de rio Reactor: RBS alimentado com efluente proveniente da digestão de lodo	Khramenkov <i>et al.</i> (2013)

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

### 3.3 Inoculação de reatores anammox

Muitos estudos têm sido conduzidos nas últimas duas décadas e, aos poucos, a ecofisiologia das bactérias com atividade anammox tem sido revelada. Embora esses trabalhos tenham contribuído para avanços no conhecimento acerca das anammox, existem ainda alguns desafios relacionados à aplicação prática do processo, sendo o maior deles relatado como a lenta taxa de crescimento das bactérias, que reflete diretamente no tempo necessário para a partida dos reatores (ALI *et al.* 2015; AWATA *et al.* 2013; OSHIKI *et al.* 2011; CHO *et al.* 2010). Nos países onde o processo anammox já encontra-se bem estabelecido, a partida de novos reatores se dá, normalmente, a partir de biomassa previamente enriquecida, o que reduz de maneira expressiva o tempo necessário para início da operação.

A inoculação de quantidade suficiente de biomassa anammox ativa é essencial para alcançar um rápido e estável *start-up* de reator anammox para o tratamento de efluentes, no entanto, como já mencionado, cultivar e manter grandes quantidades de biomassa anammox ativa é um desafio e pode se tornar inviável (ALI e OKABE, 2015), além disso, a concentração mínima de biomassa anammox necessária para iniciar o processo foi pouco explorada (ALI *et al.* 2015). Dessa forma, pesquisas no sentido de selecionar os melhores inóculos para posterior cultivo das bactérias com atividade anammox e partida de reatores se fazem necessárias.

Em sua pesquisa, Egli *et al.* (2001) enriqueceram bactérias com atividade anammox a partir de biofilme proveniente de reator com biodiscos tratando águas residuárias ricas em amônio (Kölliken, Suíça). O aumento da biomassa foi feito em frascos de 2L operados em batelada, através da técnica de diluição e enriquecimento. Após seis meses de cultivo os autores obtiveram, aproximadamente, 88% de bactérias com atividade anammox em relação ao total de células. Não obstante, foi verificada atividade anammox na faixa de pH 6,5 a 9 (com ótimo em pH 8) e a temperatura ótima de crescimento foi de 37°C. Hidroxilamina e hidrazina, que são intermediários da reação anammox catalisada por *B. anammoxidans*, também foram utilizados pelas anammox de Kölliken, e aproximadamente 15% do nitrito utilizado durante o crescimento autotrófico foi convertido em nitrato.

Experimento de enriquecimento de bactérias anammox em um RBS também foi alvo de pesquisa de Dapena-Mora *et al.* (2004), que utilizaram lodo de um sistema de tratamento de águas residuárias municipais. Os autores perceberam que após 60 dias a atividade anammox foi detectada,

comprovada pelo consumo de quantidades estequiométricas de  $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NH}_4^+$  no sistema. A concentração de biomassa enriquecida ao final foi de 3-3,5 gSSV.dm<sup>-3</sup>, apresentando atividade anammox específica de 0,18 gNH<sub>4</sub><sup>+</sup> gSSV<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>. O reator foi capaz de tratar cargas de nitrogênio de até 1,4 kgN m<sup>-3</sup>d<sup>-1</sup>, atingindo 82% de eficiência de remoção.

Chamchoi & Nitorisavut (2007) investigaram o enriquecimento de bactérias anammox a partir de lodos convencionais, incluindo lodo de reator UASB, lodo ativado e lodo de um digestor anaeróbio, utilizando três RBS. Após período de quatro meses de operação, detectaram atividade anammox em todos os reatores, o que permitiu a remoção contínua de amônio e nitrito. Os autores concluíram, portanto, que o cultivo de bactérias com atividade anammox, a partir de lodos convencionais, foi possível sob ambiente com condições controladas em um período de quatro meses.

Kunz *et al.* (2007) conseguiram atividade anammox em uma amostra de lodo biológico coletado do tratamento de dejetos de suínos e aumentaram a população de bactérias pela aclimação e imobilização. Para estimar a capacidade de remoção de nitrogênio o cultivo foi realizado com um afluente sintético. Como resultado, os autores perceberam que o lodo do sistema de tratamento de efluente da suinocultura foi uma excelente fonte de micro-organismos com atividade anammox. Em estudos posteriores, Kunz *et al.* (2008) concluíram que a eficiência de remoção do sistema anammox é mais alto quando comparado ao sistema de clássico de remoção por nitrificação e desnitrificação, sendo possível obter reatores anammox menores com alta eficiência, reduzindo os custos com construção de reator.

Date *et al.* (2009) também investigaram o enriquecimento de anammox a partir de três inóculos distintos: lodo de uma estação de tratamento de esgoto, lodo coletado em um tanque de digestão e armazenado por dois meses a temperatura ambiente, e lodo nitrificante coletado a partir de um tanque de nitrificação tratando águas residuárias de uma criação de suínos. O enriquecimento a partir destes inóculos foi realizado em três reatores distintos, utilizando uma malha de tecido sintético com o intuito de imobilizar as bactérias anammox. Em todos os reatores a diversidade microbiana da biomassa anammox enriquecida foi investigada. Cerca de quatro meses após o início do enriquecimento foi observada, nos três reatores, remoção simultânea de amônio e nitrito, além da produção de pequena quantidade de nitrato, que é exclusivo para a reação anammox.

Banihani *et al.* (2010) pesquisaram o enriquecimento de anammox a partir de cinco tipos de inóculos objetivando identificar qual lodo apresentaria o maior nível de atividade anammox, sendo três deles coletados em estações de tratamento de águas residuárias municipais, obtidos das seguintes unidades operacionais: lodo de retorno do sistema de lodos ativados, lodo digerido anaerobiamente e lodo coletado na vala de oxidação. Além disso, dois lodos granulares metanogênicos também foram investigados: lodo granular, obtido a partir de um reator UASB tratando águas residuárias de uma destilaria e o lodo granular obtido em um reator UASB tratando efluentes de cervejaria. Os inóculos foram enriquecidos em frascos de 250 mL funcionando como reatores em batelada, na ausência de luz, sendo amônio e nitrito monitorados periodicamente. Os resultados indicaram que as culturas de bactérias anammox foram desenvolvidas a partir de lodos de estações de tratamento de águas residuárias, em um curto período de tempo (50 dias) em comparação ao que foi relatado na literatura anteriormente, o que foi comprovado pela detecção das anammox pela técnica da PCR (do inglês *Plymerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia da Polimerase). Além disso, o inóculo do lodo de retorno apresentou maior nível de atividade anammox. Já os reatores inoculados com lodo granular provenientes de reatores UASB não apresentaram atividade anammox. Os autores sugeriram que a estratégia para o desenvolvimento da cultura de anammox em reatores batelada está relacionada ao fato de se manter concentrações não tóxicas de ácido nítrico e amônio, assim como boas condições de pH.

No Brasil, alguns trabalhos descreveram o uso de reatores e enriquecimento de bactérias com atividade anammox para o tratamento de efluentes. O Programa de Pós-Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos da Universidade Federal de Minas Gerais há cerca de 10 anos, tem investigado esse processo. Araújo *et al.* (2011), Campos (2011) e Pereira (2013) utilizando um RBS e Costa (2013) utilizando um reator de leito fixo com biobob como meio suporte, obtiveram sucesso no enriquecimento de bactérias com atividade anammox a partir de amostras derivadas de lodo proveniente de esgoto doméstico da Estação de Tratamento de Esgotos de Belo Horizonte, MG, sendo detectada atividade anammox a partir de 80 dias de cultivo.

Lara (2009) usou frascos tipo *Schott* para tentar enriquecer bactérias anammox partindo de dois inóculos: lodo de reator UASB e lodo ativado de estação de tratamento de esgotos. A autora identificou atividade de bactérias desnitrificantes, mas nenhuma atividade anammox foi detectada nos experimentos realizados, mesmo com adição de cloranfenicol, utilizado com objetivo de inibir a atividade desses micro-organismos. Com as estratégias utilizadas neste estudo não foi possível enriquecer bactérias anammox.

Araújo *et al.* (2011) fizeram a seleção e cultivo de bactérias com atividade anammox a partir de lodo proveniente de esgoto doméstico da Estação de Tratamento de Esgotos de Belo Horizonte, MG, e reportaram a predominância de *Candidatus Brocadia anammoxidans*, após 6 meses de cultivo, utilizando meio de cultura sintético com concentrações de nitrogênio aplicadas inferiores a  $180 \text{ mg L}^{-1}$  (até  $95 \text{ mg N-NO}_2^-$  e até  $82 \text{ mg N-NH}_4^+$ ).

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

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

Os trabalhos apresentados neste tópico contribuem com os avanços do processo anammox no sentido de facilitar a escolha de um inóculo que possa contribuir para obtenção de maior atividade anammox em um menor tempo, bem como compreender como a remoção de nitrogênio pode ser influenciada por estratégias operacionais distintas.

### **3.4 Processos conjugados com anammox**

Devido ao metabolismo singular das bactérias anammox, capazes de encurtar o processo da oxidação do íon amônio diretamente a nitrogênio gasoso, os benefícios de sua aplicação no tratamento de águas residuárias e sua ecologia microbiana, há crescente interesse pela utilização desses micro-organismos para a remoção de nitrogênio amoniacal (VAN NIFTRIK & JETTEN,

2012). Uma vez que amônio e nitrito são requisitos para a reação anammox, e que o nitrito geralmente está ausente na maioria dos efluentes, novos processos de um ou dois estágios têm sido conjugados com os reatores anammox a fim de proporcionar a formação de nitrito em quantidades ideais, a partir da oxidação do amônio presente no próprio efluente a ser tratado, proporcionando uma maior eficiência na remoção de nitrogênio a um menor custo de tratamento.

Pode-se citar como exemplo de dois estágios o sistema SHARON (*Single Reactor System for High Ammonium Removal over Nitrite*) (VAN DONGEN *et al.* 2001; VAN DER STAR *et al.* 2007) e reatores nitrificantes com biomassa granular (VAZQUEZ-PADIN *et al.* 2009a), que aplica a interrupção nos processos de nitrificação na etapa intermediária, quando o amônio é parcialmente oxidado a nitrito. A conversão de nitrito a nitrogênio gasoso ocorre na etapa seguinte. Utiliza-se o fato de que em altas temperaturas, as NOB tem crescimento mais lento que as AOB, e devido ao curto TDH (aproximadamente um dia) e à alta temperatura (35°C), as NOB são excluídas do reator. A temperatura, associada ao curto TDH, é um fator de seletividade, pois a 35 °C a máxima velocidade de crescimento de NOB é aproximadamente a metade comparada a das AOB (JETTEN *et al.* 2001; VAN DONGEN *et al.* 2001; VAN DER STAR *et al.* 2007).

A nitrificação parcial e a oxidação anaeróbia da amônia também podem ocorrer em um mesmo reator, como os processos CANON (*Completely Autotrophic Nitrogen removal Over Nitrite*) (THIRD *et al.* 2001; THIRD *et al.* 2005; VAZQUEZ-PADÍN *et al.* 2009b) e OLAND (*Oxygen Limited Autotrophic Nitrification Denitrification*) (KUI & VERSTRAETE, 1998; MONBALLIU *et al.* 2013). Nesses sistemas são fornecidas baixas concentrações de oxigênio, proporcionando apenas condições microaeróbias nas quais bactérias oxidadoras de amônio são capazes de oxidar o amônio a nitrito. Consumindo o restante de amônio e utilizando o nitrito resultante da nitrificação parcial, as anammox podem se desenvolver, culminando na produção de nitrogênio gasoso (VAZQUEZ-PADÍN *et al.* 2010).

Um processo chamado ANITA™ Mox também pode ser combinado com o processo anammox. O ANITA™ Mox é baseado na tecnologia MBBR (do inglês *Moving Bed Biofilm Reactor*, Biorreatores de leito móvel com biofilme), onde a remoção de nitrogênio ocorre em apenas um estágio. Os processos de nitrificação parcial e anammox ocorrem simultaneamente no biofilme formado em suportes suspensos, em diferentes camadas, sendo a camada externa responsável pela oxidação de uma parte do amônio a nitrito e na camada mais interna ocorre a atividade anammox, uma vez que o nitrito produzido e o amônio remanescente são utilizados pelas bactérias anammox e

convertidos a  $N_2$  e uma pequena quantidade a nitrato. A grande vantagem deste sistema é a redução do tempo de partida dos reatores anammox (de 9-12 meses para 2-5 meses), pois as bactérias crescem no material suporte e são mantidas no biofilme formado, evitando a perda da biomassa, o que torna o sistema estável e robusto (LEMAIRE *et al.* 2011; CHRISTENSSON *et al.* 2011).

Chen *et al.* (2009) desenvolveram o processo conhecido como SNAD (*Simultaneous Nitrification, Anammox and Denitrification*) para remoção simultânea de nitrogênio e DQO em um único reator, no qual a maior parte do nitrogênio é removida pelas anammox. Esse processo promove a interação de nitrificantes aeróbias, anammox e desnitrificantes em condições limitadas de oxigênio com potencial para fazer a remoção de amônio e carbono orgânico a  $N_2$  e  $CO_2$ . No entanto, as condições ótimas para o enriquecimento desses micro-organismos ainda não são bem compreendidas (LAN *et al.* 2011).

De acordo com Hu *et al.* (2013) os sistemas de estágio único apresentam menor custo operacional, já que não requerem reatores separados para os processos de nitrificação parcial e anammox. Por outro lado, os sistemas de dois estágios permitem uma maior flexibilidade e uma maior estabilidade do processo, uma vez que os processos de nitrificação e anammox podem ser controlados e desenvolvidos separadamente. Além do tipo de sistema, o lodo aplicado varia consideravelmente na utilização do processo anammox conforme o local onde a tecnologia foi desenvolvida, como por exemplo, granular (Holanda), floculento (Suíça, Áustria), biofilme formado em um meio suporte (Suécia, Bélgica) e biofilme híbrido (Áustria). Segundo Cao *et al.* (2017), a principal diferença entre o biofilme granular e o biofilme híbrido é que o último tem uma concentração de lodo suspenso muito mais alta na fase líquida.

Van Dongen *et al.* (2001) pesquisaram a aplicação do processo SHARON e anammox para o tratamento de efluentes ricos em amônio na estação de tratamento de efluentes municipais, cidade de Rotterdam (Holanda). O processo SHARON foi operado de forma estável por mais de 2 anos com aeração contínua e TDH de 1 dia. Neste experimento, apenas 53% do íon amônio era convertida a nitrito. O lodo utilizado foi do tipo granular e o reator foi operado em batelada sequencial, com eficiência de remoção de mais de 80% do N-amoniaco. Essa pesquisa mostrou que o sistema SHARON-anammox pode trabalhar de forma estável durante longos períodos.

Com base nesse estudo, o primeiro reator anammox em escala plena foi construído em Rotterdam, com volume de  $70\text{ m}^3$ , para o tratamento de licor amoniaco proveniente da digestão do lodo da

estação, o qual possui concentração média de nitrogênio amoniacal igual a  $1200 \text{ mg.L}^{-1}$ . O efluente passava primeiramente por um reator SHARON. A biomassa anammox foi enriquecida a partir de lodo nitrificante convencional, por isso o *start-up* do reator demorou aproximadamente dois anos e meio, em decorrência do lento crescimento desses organismos. A carga máxima de nitrogênio aplicada ao reator foi de  $750 \text{ kg.d}^{-1}$ , e a carga volumétrica superior a  $10 \text{ kgN.m}^{-3}\text{d}^{-1}$ , sendo que o reator foi capaz de remover 90% a 95% do nitrogênio afluente (VAN DER STAR *et al.* 2007).

Utilizando um sistema em escala plena constituído por um tanque de separação sólido-líquido, um tanque de nitrificação e desnitrificação e um tanque subsequente de tratamento alcalino (para remoção de fósforo e patógenos), Vanotti *et al.* (2005) testaram por um ano essa proposta com vistas a substituir as lagoas anaeróbias para o tratamento de resíduos da suinocultura. O sistema removeu 98,5% de NTK, 98,7% de amônio, 99,7% de DBO, 97,6% de sólidos suspensos, 95% de fósforo total, 98,7% de cobre e 99,0% de zinco. Também removeu 97,9% dos compostos que apresentavam odor no meio líquido, e reduziu os patógenos indicadores em níveis não detectáveis.

Aplicando os processos de nitrificação parcial e anammox em um RBS em escala piloto, Joss *et al.* (2009) avaliaram a remoção de nitrogênio em águas residuárias ricas em amônio e com baixas concentrações de DBO e sólidos em suspensão em Zurick (Suíça) O RBS era aerado continuamente e pH era controlado (Sistema DEMON), as concentrações do oxigênio dissolvido (OD) foram inferiores a  $1 \text{ mgO}_2.\text{L}^{-1}$ , permitindo que o processo de nitrificação parcial ocorresse simultaneamente com o processo anammox. As cargas de amônio eram de até  $500 \text{ gN m}^{-3}\text{d}^{-1}$ , com conversão em  $\text{N}_2$  superior a 90%.

Apesar da demanda por aeração, o processo de desamonificação (nitritação parcial e processo anammox) tem se mostrado mais sustentável quando comparado ao processo convencional (nitrificação/desnitrificação) na remoção de nitrogênio de efluentes. Comparação realizada por Fux e Siegrist (2004) entre as duas alternativas demonstrou que a nitrificação parcial/anammox consome cerca de 40% a 50% menos oxigênio em relação à nitrificação/desnitrificação. Além disso, por ser um processo completamente autotrófico, 75% menos lodo é gerado e não há demanda de carbono orgânico para os micro-organismos. Os autores realizaram uma estimativa de custo para as duas tecnologias, considerando a construção de reatores para o tratamento de líquido de digestor de lodo, para um equivalente populacional de 100.000 habitantes e geração de  $1,5 \text{ gN.habitante}^{-1}$ . Foi adotada a concentração de nitrogênio amoniacal no efluente de  $1000 \text{ g.m}^{-3}$ , estimando-se uma carga de nitrogênio a ser tratada igual a  $150 \text{ m}^3.\text{d}^{-1}$ . Assumiu-se eficiência de remoção de nitrogênio

amoniaco igual a 85%, sendo requerido um volume de reator de 260 a 280 m<sup>3</sup> com TDH de 0,5 dia para ambos os processos. O custo total estimado para o reator de nitrificação parcial/anammox foi de €2,5 kg<sup>-1</sup> N removido, mais econômico, portanto, do que o custo estimado para o processo de nitrificação/desnitrificação, calculado entre €3,0 a €4,0 kg<sup>-1</sup> N removido.

Chatterjee *et al.* (2016) projetaram, operaram e monitoraram um novo reator de biofilme de leito de corda de fluxo descendente (RBBR) parcialmente exposto ao ar natural, para o pós-tratamento de efluente de reator UASB tratando esgoto sintético, a fim de avaliar sua capacidade de remover matéria orgânica e nitrogênio. A remoção de nitrogênio foi avaliada sob duas condições: com aeração a 0,4 metros da superfície líquida, com objetivo de favorecer a nitrificação no topo do reator e a desnitrificação no fundo, e sem aeração, a fim de proporcionar a nitrificação parcial e anammox apenas com a exposição ao ar natural. Os autores observaram que a contribuição da atividade anammox para a remoção de amônio foi mais pronunciada no fundo do reator do que no topo, uma vez que a relação DQO/N reduziu do topo em direção ao fundo. Uma vez que a matéria orgânica se torna limitante (DQO/N <1) para as bactérias desnitrificantes, a atividade anammox se torna o processo predominante no fundo do reator e melhora a remoção em baixas concentrações de OD (ANJALI E SABUMON, 2015).

### **3.5 Aplicação do processo anammox ao tratamento de efluentes**

Um dos problemas de maior preocupação associado ao lançamento de efluentes contendo nutrientes como nitrogênio e fósforo em sua composição nos corpos d'água é a eutrofização artificial. A elevada disponibilidade de nutrientes no meio, somada às condições favoráveis como incidência solar, proporcionam o crescimento excessivo de algas e plantas aquáticas em níveis tais que sejam consideradas como causadores de interferências com os usos desejáveis dos corpos hídricos, convergindo para profundas alterações nas condições físicas e químicas do meio, nas comunidades aquáticas e no nível de produção do sistema.

De acordo com Von Sperling (2005), as principais consequências advindas da eutrofização estão relacionadas a problemas estéticos e recreacionais, com a limitação do uso da água para balneabilidade e redução da atração turística dos ambientes eutrofizados. A formação de zonas de anaerobiose em regiões mais profundas do corpo d'água, ou no corpo d'água como um todo, também são reflexos da eutrofização, devido ao aumento da produtividade por parte das algas e

plantas aquáticas que conduzem ao crescimento de bactérias aeróbias heterotróficas a fim de que ocorra a degradação da matéria orgânica do meio, consumindo o oxigênio.

Com o consumo de oxigênio para a degradação da matéria, ocorre a morte de peixes, devido às condições anaeróbias. Há maior dificuldade no tratamento da água devido às algas, refletindo diretamente nos custos do mesmo, pois elas são de difícil remoção, além disso, problemas de saúde pública relacionados à presença de toxinas produzidas por determinadas espécies de cianobactérias também podem aparecer. Problemas com navegações, capacidade de transporte (uma vez que a eutrofização promove o crescimento de macrófitas enraizadas e desaparecimento gradual do corpo d'água) juntamente com o assoreamento, tendem a tornar o lago cada vez mais raso, reduzindo seu volume útil, até que o mesmo desapareça por completo.

Os esgotos domésticos e efluentes industriais podem constituir expressiva fonte de nitrogênio, e se lançados sem o devido tratamento nos corpos d'água trazem sérias consequências para o meio ambiente e para a saúde pública. No meio aquático, o nitrogênio pode ser encontrado nas formas de amônia (livre  $\text{NH}_3$  ou ionizada  $\text{NH}_4^+$ ), nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), nitrogênio molecular e nitrogênio orgânico (dissolvido e em suspensão). Este último juntamente com o nitrogênio amoniacal constituem o denominado NTK, que somado às frações de  $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}_3^-$ , constituem o Nitrogênio total (VON SPERLING, 2005).

Quando presente na forma de amônia livre ( $\text{NH}_3$ ), o nitrogênio é diretamente tóxico aos peixes, causando problemas nas guelras e brânquias destes animais, comprometendo seu sistema respiratório, promovendo morte por asfixia (SMART, 1976). Alta concentração de nitrato na água está associada a doenças como a metahemoglobinemia em crianças e à ocorrência de câncer gástrico em adultos (LUZ *et al.* 2008; CASTAÑEDA-CHAVEZ *et al.* 2010).

A fim de evitar grande impacto ambiental e malefícios para a saúde pública, esses efluentes devem ser tratados antes do seu lançamento nos corpos d'água. No esgoto doméstico, cerca de 60% dos compostos nitrogenados estão em sua forma orgânica e 40% na forma inorgânica. Santos (2011) ressalta que até o efluente doméstico entrar na ETE, aproximadamente 90% do nitrogênio se encontrará como amônio ou componentes orgânicos instáveis que são rapidamente convertidos em nitrogênio amoniacal devido à reação de amonificação, que em pH neutro encontra-se como íon amônio, o que configura a forma predominante de N-amoniacal nestes efluentes. O mesmo autor concluiu que a concentração de N-amoniacal presente no efluente doméstico excede o requerimento

microbiano para oxidar a matéria orgânica, então somente parte do nitrogênio é removido por atividade heterotrófica convencional, sendo o restante contribuinte direto para os problemas ambientais.

A concentração de nitrogênio amoniacal típica nesses efluentes está entre 25 e 45 mg.L<sup>-1</sup>, sendo que os compostos nitrogenados somados giram em torno de 35 a 60 mg.L<sup>-1</sup> (VON SPERLING, 2005). Em relação aos efluentes industriais, a composição destes está essencialmente vinculada ao processo produtivo, pois depende da natureza e porte da indústria, grau de modernidade dos seus processos produtivos, bem como da origem das matérias primas e insumos utilizados nos processos de produção (CAVALCANTI, 2012).

No esgoto bruto, as formas predominantes encontradas são N-orgânico (correspondendo aos grupamentos amina) e íon amônio (principal origem na ureia, rapidamente hidrolisada e raramente encontrada), sendo as demais formas usualmente de menor importância (MOTA e VON SPERLING, 2009).

A Tabela 3.3 apresenta a concentração de nitrogênio amoniacal de alguns efluentes industriais e efluentes provenientes da digestão de lodo de estações de tratamento de efluentes e também da metanização de resíduos sólidos urbanos.

**Tabela 3.3** Concentrações típicas de nitrogênio amoniacal em diversos tipos de efluentes

<b>Efluente industrial</b>	<b>Concentração N amoniacal (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Referência</b>
Efluente de indústria alimentícia (glutamato monossódico)	15.000 – 25.000	Li-Dong <i>et al.</i> (2012)
Efluente de indústria alimentícia (processamento de batata)	200-400	Abma <i>et al.</i> (2010)
	1200	Van der Star <i>et al.</i> (2007)
Líquido de digestor de lodo	1400-1600	Furukawa <i>et al.</i> (2009)
	500-1500	Fux e Siegrist (2004)
Lixiviado de aterro	1400-2800	Liang e Liu (2008)
Efluentes de coqueria de	450-4100	Wiesmann (1994)

indústria siderúrgica		
Efluente de suinocultura	900-1500	De Prá <i>et al.</i> (2012)
	2000-4000	Yamamoto <i>et al.</i> (2008)
Pecuária: Bovinos ou suínos	500-2300	Wiesmann (1994)
Refinaria de Petróleo	23,8-865	Wiesmann (1994)

A legislação brasileira, por meio da Resolução CONAMA nº 430/2011, que altera e complementa a Resolução CONAMA nº 357/2005, estabelece em seu artigo 16 o limite de 20 mg.L<sup>-1</sup> para o lançamento de nitrogênio amoniacal em corpos hídricos. Esse limite foi revogado para esgotos sanitários, sendo aplicável apenas a efluentes industriais (BRASIL, 2011). Apesar de não exigido legalmente para esgotos domésticos, deve-se atentar aos impactos que o nitrogênio amoniacal pode desencadear, como já mencionados, levando-se em consideração principalmente o meio ambiente e a saúde pública.

O processo anammox tem sido considerado como eficiente e promissor, e por isso, observa-se grande interesse de sua aplicação ao tratamento de diversos tipos de efluentes, como observado na Tabela 3.3, que reportaram experiências de sucesso. Vários estudos têm demonstrado que remoção de nitrogênio em baixas temperaturas pode ocorrer pelo processo anammox (ISAKA *et al.* 2008; HENDRICKX *et al.* 2012; VAZQUEZ-PADIM *et al.* 2010). De acordo com Hu *et al.* (2013), estratégias apropriadas permitem tratar efluentes que apresentam baixa temperatura e baixa concentração de amônio, como é o caso dos efluentes anaeróbios municipais.

Ele foi alvo de estudo por Toh e Ashbolt (2002) para tratar efluente sintético de coqueria, unidade da indústria siderúrgica que produz efluente com elevada concentração de amônio e fenol. As bactérias com atividade anammox foram capazes de remover nitrogênio do efluente, alcançando a carga máxima removida de 62 mgN-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> L<sup>-1</sup>, mesmo com 330 mg L<sup>-1</sup> de fenol. Neste trabalho os autores observaram que o processo anammox tem potencial para ser utilizado na remoção biológica de nitrogênio de efluentes com elevadas concentrações de compostos tóxicos, como o fenol.

Bactérias com atividade anammox também foram objeto de pesquisa no pós-tratamento de efluentes de suinocultura, em escala laboratorial, por Molinuevo *et al.* (2009). O efluente passava primeiramente por dois tipos de reatores distintos: o primeiro era um reator UASB no qual o efluente de suinocultura era primeiramente digerido, gerando efluentes com valores de DQO iguais

a  $4,7 \text{ g.L}^{-1}$  e de  $\text{N-NH}_4^+$  iguais a  $3,78 \text{ g.L}^{-1}$ . O segundo promovia a oxidação parcial tanto de matéria orgânica quanto de nitrogênio amoniacal, gerando um efluente com valores de DQO iguais a  $2,42 \text{ g.L}^{-1}$  e de  $\text{N-NH}_4^+$  iguais a  $0,67 \text{ g.L}^{-1}$ . Os autores conferiram que ambos os reatores apresentaram um bom desempenho na remoção de amônio, com eficiência de 92% para o reator tratando efluente digerido inicialmente no reator UASB e 98% para o reator tratando efluente após a oxidação parcial. No entanto, um aumento nas cargas de DQO aplicadas em ambos os sistemas afetaram negativamente a remoção de amônio, inibindo totalmente o processo anammox.

Efluentes de indústrias alimentícias também possuem em sua constituição elevadas concentrações de nitrogênio. Li-Dong *et al.* (2012) investigaram a capacidade da remoção de nitrogênio por processo anammox de um efluente de indústria de glutamato monossódico, um aminoácido extensivamente utilizado no setor alimentício. Os efluentes desse tipo de indústria são caracterizados por possuírem concentrações elevadas de DQO (podendo chegar a  $30.000 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e de nitrogênio amoniacal (chegando a  $25.000 \text{ mg.L}^{-1}$ ), culminando, portanto em uma baixa relação Carbono/Nitrogênio (C/N). Isso dificulta a utilização de processos convencionais para a remoção de nitrogênio (nitrificação/desnitrificação, por exemplo). Por esse motivo, a oxidação anaeróbia da amônia representa uma boa alternativa. Na pesquisa em questão, primeiramente foi realizado o enriquecimento de bactérias anammox a partir de três diferentes lodos de inóculos, onde três reatores em escala laboratorial (2 litros de volume) foram utilizados. O efluente industrial a ser tratado em tais reatores continha concentração de amônio e DQO variando entre  $1500\text{-}2000 \text{ mg L}^{-1}$  e  $2000\text{-}2500 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente. No entanto os despejos foram diluídos cerca de 20 a 30 vezes, ficando com uma concentração em torno de  $70 \text{ mg L}^{-1}$  de amônio. O nitrito foi adicionado ao reator, para possibilitar a oxidação anaeróbia do amônio. Após 360 dias de cultivo, remoção significativa de amônio foi observada nos três reatores avaliados, alcançando aos 420 dias eficiências médias de remoção de  $\text{N-NH}_4^+$  próximas a 70% em ambos os reatores.

O processo anammox também foi estudado recentemente para o tratamento de efluente de indústria farmacêutica na China (TANG *et al.* 2011). A referida indústria produz antibióticos de uso veterinário e gera efluentes com elevada concentração de DQO e nitrogênio amoniacal, porém baixa relação C/N. Além disso, os efluentes possuem um caráter tóxico devido à presença de antibióticos e compostos recalcitrantes. Os resultados obtidos nesse estudo permitiram concluir que quando expostos por período prolongado de tempo a substâncias tóxicas, a atividade das anammox é significativamente inibida, não satisfazendo assim, a exigência de biomassa no sistema para uma eficaz remoção de nitrogênio, levando à deterioração do sistema. No entanto, quando é adicionada

biomassa anammox exógena com elevada atividade ao sistema, o mesmo pode se recuperar, melhorando o desempenho da remoção de nitrogênio. Assim, esse estudo desenvolveu um processo denominado Anammox-SBA (*Anaerobic ammonium oxidation - Sequential biocatalyst*), que consistia de um reator anammox convencional de alta taxa seguido por um biocatalisador sequencial (no qual foi adicionada biomassa anammox granular com elevada atividade). Esse processo, foi capaz de remover uma carga de nitrogênio igual a  $9,4 \text{ kgN m}^{-3}\text{d}^{-1}$  do despejo industrial farmacêutico, gerando um efluente com concentrações menores que  $50 \text{ mg.L}^{-1}$ , valor que atende aos padrões de lançamento desse poluente para indústrias farmacêuticas na China, local onde o estudo foi conduzido.

Egli *et al.* (2003) verificaram, em um reator com biodiscos, remoção de amônio por processo anammox de um efluente de aterro sanitário que trata resíduos industriais perigosos, em Kölliken, Suíça. O efluente do aterro possuía  $100$  a  $400 \text{ mg.L}^{-1}$  de Carbono Orgânico Total (COT). Dentre os compostos orgânicos neste efluente pode-se citar os hidrocarbonetos clorados, fenóis e anilina. A concentração de amônio no efluente variava entre  $100$  a  $500 \text{ mg.L}^{-1}$ . O sistema de tratamento consistia de dois reatores, sendo que no primeiro havia a remoção de 88% da matéria orgânica presente no despejo. O efluente deste primeiro reator continha essencialmente nitrogênio na forma de amônio, a qual era removida no segundo reator (cerca de 70% de remoção). Esta remoção de amônio no segundo reator foi atribuída ao processo anammox, uma vez que a concentração de carbono orgânico afluente não era suficiente para que o processo de desnitrificação heterotrófica ocorresse.

De acordo com Vlaeminck *et al.* (2012), o processo anammox já se mostrou adequado ao tratamento de efluente de digestor de lodo, que constituem importante fonte de contribuição de nitrogênio para o ambiente (SANTOS, 2011). No Brasil, parcela significativa do esgoto doméstico é tratada pela via anaeróbia, destacando-se os reatores UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*), tecnologia bem estabelecida no setor (VAN LIER, 2008), mas que não são capazes de remover nitrogênio, necessitando de um pós-tratamento (VON SPERLING e CHERNICHARO, 2005).

Por se tratar de um processo relativamente novo, há ainda demanda de muitas pesquisas para investigar as potencialidades e limitações do processo anammox para o tratamento de outros tipos de efluentes, a fim de expandir sua aplicação, uma vez que ele tem sido principalmente aplicado ao tratamento de efluentes ricos em amônio e com baixa relação C/N (TOH E ASHBOLT, 2002; EGLI

*et al.* 2003; DAPENA-MORA *et al.* 2007; TANG *et al.* 2011; LI-DONG *et al.* 2012; MAGRÍ *et al.* 2012, ALI e OKABE, 2015).

Lacunas ainda existem quanto à aplicação do processo anammox ao tratamento convencional de efluentes domésticos (ALI e OKABE, 2015), já que a presença de matéria orgânica pode inibir a atividade anammox, favorecer o crescimento das bactérias desnitrificantes, que competem com as anammox pelo aceptor de elétrons, resultando em baixa remoção de amônio (STROUS *et al.* 1998; GUVEN *et al.* 2005; OSHIKI *et al.* 2011; KARTAL *et al.* 2012; ALI *et al.* 2015).

### **3.5.1 Fatores chave que afetam o crescimento de anammox em sistemas de tratamento de esgotos**

Os micro-organismos anammox possuem características únicas, o que confere a eles grande vantagem em relação a outros micro-organismos utilizados em técnicas convencionais de tratamento. Por isso, o estudo da aplicação do processo, bem como a caracterização do efluente a ser tratado faz-se importante para avaliar o possível efeito inibidor que alguns compostos podem exercer sobre a atividade das bactérias anammox. Substâncias como os fosfatos, sulfetos, metais pesados, antibióticos, matéria orgânica (glicose, formiato, sacarose, propionato, fenóis) podem provocar inibição e até inativação das bactérias anammox (JIN *et al.* 2012). A implementação do processo anammox como uma tecnologia viável ao tratamento de efluentes requer melhor compreensão das faixas de permissibilidade para nitrito e amônio, dos níveis de oxigênio e do pH do meio, assim como a temperatura de operação (EGLI *et al.* 2001; MA *et al.* 2016).

A lenta taxa de crescimento e rendimento das anammox tem limitado a aplicação do processo ao tratamento de efluentes com temperatura em torno de 30 °C e concentração de amônio mais altas, geralmente entre 500 e 1500 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> L<sup>-1</sup> (KUENEN, 2008; JENNI *et al.* 2014). Sabe-se que a concentração de nitrogênio amoniacal no esgoto é tipicamente inferior a 100 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> L<sup>-1</sup> (BLACKBURNE *et al.* 2008; HENDRICKX *et al.* 2012) e que sua temperatura é relativamente baixa, especialmente no inverno. Esses fatores, somados à presença da matéria orgânica, se mostram contra o estabelecimento de atividade anammox no tratamento de esgotos domésticos.

Conforme discutido anteriormente, bactérias com atividade anammox necessitam de amônio e nitrito de acordo com as proporções estequiométricas apresentadas na Equação 3.5. O íon amônio, geralmente está presente em efluentes domésticos, e em maior concentração, em alguns tipos de efluentes industriais, como já apresentado na Tabela 3.3. Entretanto, o nitrito geralmente não está

presente ou encontra-se em níveis baixos e deve, preferencialmente, ser gerado a partir do próprio efluente para que a reação anammox ocorra. Para isso, os processos conjugados com anammox vêm ganhando destaque, pois proporcionam a oxidação parcial do íon amônio a nitrito e, logo após, estes dois substratos são fornecidos em proporções ideais para as bactérias com atividade anammox.

Apesar de requeridos, os substratos amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) e nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) podem provocar certa inibição no processo anammox, dependendo da concentração em que se encontram no meio. As concentrações em que tais compostos provocam a inibição ou diminuição da eficiência variam muito. Isto ocorre em virtude da quantidade de substrato requerida, pois, para que haja a reação sem inibição, devem-se observar as espécies de bactérias presentes, o tipo de reator, o tipo de alimentação e as condições físico-químicas oferecidas ao processo, dentre outros (EGLI *et al.* 2003; ZHU *et al.* 2008). Kartal *et al.* (2012) destacaram que independente das condições ambientais existentes para as bactérias anammox, as mesmas adquirem os substratos (nitrito e amônio) em cooperação e competição com outros micro-organismos presentes no ciclo do nitrogênio, como as bactérias nitrificantes e desnitrificantes.

Jin *et al.* (2012) reportaram que a inibição por amônio é geralmente atribuída à presença da forma livre ( $\text{NH}_3$ ). Isso porque o íon amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) não se difunde com facilidade através da membrana lipídica da célula bacteriana, no entanto a amônio livre pode se difundir mais facilmente. Em soluções aquosas, há um balanço químico entre as formas de amônia que está intrinsecamente relacionado ao pH do meio, conforme já descrito. Segundo Strous *et al.* (1999b) e Dapena-Mora *et al.* (2007), o íon amônio só passa a ser inibidor em concentrações muito elevadas, da ordem de 770 mg. N- $\text{NH}_4^+$  L<sup>-1</sup>. Jetten *et al.* (1998) mostraram que o íon amônio e nitrito provocaram uma pequena inibição reversível no processo, quando suas concentrações globais estão por volta de 1000 mg N-  $\text{NH}_4^+$  L<sup>-1</sup>. Já Lotti *et al.* (2012), concluíram que concentrações de amônio e nitrito menores que 500 mg.L<sup>-1</sup> não parecem inibir as anammox.

Carvajal-Arroyo *et al.* (2013) investigaram a inibição por  $\text{NH}_4^+$  sob biomassa anammox cultivada na forma granular e suspensa e os resultados obtidos demonstraram que concentração igual a 660 mg.L<sup>-1</sup> causaram inibição de 16% e 34% na biomassa granular e em suspensão, respectivamente.

Fernández *et al.* (2012) investigaram os efeitos da exposição de bactérias anammox ao íon amônio a curto (testes realizados em frascos em batelada) e a longo prazo (testes em um reator em batelada sequencial). Os resultados obtidos nos testes realizados a curto prazo evidenciaram inibição da

atividade quando a concentração de amônio na forma livre foi igual a 38 mg N-NH<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>. Já nos testes a longo prazo, obteve-se uma instabilidade do desempenho do RBS quando a concentração de N-NH<sub>3</sub> atingiu valores de 25 mg.L<sup>-1</sup>, sendo que a remoção de amônio foi totalmente inibida quando a concentração chegou a 35-40 mg N-NH<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>. Um dos fatores que pode controlar a inibição por amônio em reatores anammox, portanto, seria o controle do pH (STROUS *et al.* 1999b).

Estas pesquisas reportaram a inibição por amônio em concentrações elevadas, diferente da concentração observada nos esgotos domésticos, e pode-se notar que não há um consenso sobre a faixa de concentração inibitória ao processo anammox.

O nitrito é um substrato utilizado pelas bactérias que oxidam a amônio anaerobiamente, servindo como acceptor final de elétrons na reação. Vários estudos reportam que a concentração de nitrito é crítica para a estabilidade do processo anammox e, assim como no caso do amônio, as concentrações inibitórias encontradas nos diferentes estudos são bastante variáveis, de acordo com as diferentes condições experimentais e modos de operação dos reatores anammox (JIN *et al.* 2012).

Estudando a fisiologia das bactérias anammox em um RBS, Strous *et al.* (1999b) verificaram que concentrações de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> acima de 100 mg.L<sup>-1</sup> inibiram completamente o processo anammox, no entanto, a atividade foi recuperada após a adição de intermediários da reação anammox (hidroxilamina e hidrazina) ao reator. Uma concentração inibitória maior foi encontrada por Egli *et al.* (2001), os quais encontraram valores iguais a 185 mg.L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> inibindo completamente a atividade anammox.

Dapena-Mora *et al.* (2007) utilizando frascos em batelada verificaram que 50% da atividade anammox foi perdida quando as bactérias foram submetidas à concentração de nitrito igual a 350 mg.L<sup>-1</sup>. Carvajal-Arroyo *et al.* (2013) verificaram que concentrações de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> iguais a 496,8 mg.L<sup>-1</sup> e 607,2 mg.L<sup>-1</sup> foram suficientes para inibir 50% da atividade de biomassa anammox cultivada em suspensão e na forma granular, respectivamente. Nesse estudo, concentrações acima de 690 mg.L<sup>-1</sup> de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> inibiram completamente o processo.

De acordo com Jin *et al.* (2012), o processo anammox não é inibido diretamente pelo nitrito. Essa ocorrência está associada ao ácido nitroso (HNO<sub>2</sub><sup>-</sup>), que assim como o íon amônio, também é afetado pelo pH através do equilíbrio NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/HNO<sub>2</sub><sup>-</sup> em meio líquido.

Substâncias como os fosfatos também podem provocar inibição do processo anammox. Dapena-Mora *et al.* (2007) utilizando fosfato monopotássico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) observaram 50% de inibição da atividade em concentração de  $1900 \text{ mg.L}^{-1}$ , ressaltando que esse valor é geralmente superior aos encontrados em efluentes industriais. Já Van de Graaf *et al.* (1996) observaram que a inibição ocorreu em concentrações muito inferiores, sendo  $475 \text{ mg.L}^{-1}$ .

Liu e Horn (2012) avaliaram o efeito do ferro sobre um processo de desamonificação de estágio único tratando água de rejeito proveniente da desidratação de lodos de uma estação de tratamento de efluentes. Os autores encontraram severa inibição da atividade anammox quando  $\text{Fe}^{2+}$  ( $<1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e  $\text{Fe}^{3+}$  ( $<0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) foram testados no efluente.

No caso dos sulfetos, Dapena-Mora *et al.* (2007) utilizaram sulfeto de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}$ ) e constataram 60% de inibição na atividade anammox quando a concentração ficou em torno de 78 a  $156 \text{ mg.L}^{-1}$ . A inibição completa foi observada quando a concentração de sulfeto atingiu  $390 \text{ mg.L}^{-1}$ .

Relatos sobre efeitos inibitórios de elementos-traço em reatores anammox ainda são escassos na literatura. Esses compostos, por serem de difícil degradação, podem se acumular nos organismos, provocar o efeito tóxico às células, estando muitas vezes presentes em efluentes ricos em nitrogênio, como é o caso dos lixiviados de aterros sanitários (JIN *et al.* 2012).

Van de Graaf *et al.* (1995) aplicando cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ), verificaram inibição total do processo anammox quando a concentração do composto atingiu  $271 \text{ mg.L}^{-1}$ . Yang e Jin (2012) realizando testes com cobre (Cu), observaram a perda de 36% da atividade anammox com apenas  $10 \text{ mg.L}^{-1}$ . Já Zhang *et al.* (2015) testaram os efeitos inibitórios do Zn (II) sobre a atividade anammox e verificaram que as bactérias anammox foram capazes de suportar uma concentração de  $5 \text{ mg L}^{-1}$  de Zn (II). Os mesmos autores ressaltaram que concentrações mais elevadas podem suprimir a atividade anammox.

Guyen *et al.* (2005) relataram que  $0,5 \text{ mmol/l}$  de metanol inibiu de forma irreversível a atividade das anammox. Oshiki *et al.* (2011) observaram perda de 86% da atividade anammox quando a concentração de metanol aplicada foi de apenas  $1 \text{ mmol/l}$ . Isaka *et al.* (2008) puderam observar apenas uma redução de 71% na atividade anammox quando uma concentração de  $5 \text{ mmol/l}$  foi aplicada em seus experimentos. Esta diferença pode estar relacionada com as diferentes espécies encontradas nos experimentos, onde Oshiki *et al.* (2011) reportaram *Candidatus Brocadia sinica* e

Isaka *et al.* (2008) reportaram população de *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*, *Planctomyces KSU-1* e similar *Candidatus Brocadia anammoxidans*.

O efeito inibitório de antibióticos sobre o processo anammox também foi investigado por Van de Graaf *et al.* (1995). Os autores utilizaram a Penicilina ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ), Cloranfenicol ( $200 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e Ampicilina ( $800 \text{ mg.L}^{-1}$ ), os quais foram capazes de provocar a inibição de 36%, 98% e 94% da atividade anammox, respectivamente. Yang e Jin (2012) investigaram efeitos da oxitetraciclina, antibiótico bastante utilizado no tratamento de suínos e portado, comum em efluentes de suinocultura e constataram a redução de 37% na remoção de amônio no processo anammox, quando uma concentração de  $500 \text{ mg.L}^{-1}$  do antibiótico foi adicionado.

O efeito de inibição por fenol também já foi investigado em alguns experimentos. Toh e Ashbolt (2002) após 15 meses de adaptação conseguiram realizar testes em reatores anammox com concentração crescente de fenol, atingindo  $330 \text{ mg.L}^{-1}$ . Os autores observaram pelas proporções estequiométricas de consumo de nitrito e amônio que se tratava de atividade anammox. Outro trabalho desenvolvido por Pereira *et al.* (2014) também avaliou o efeito do fenol sobre o desempenho de reator anammox, alimentado com meio de cultura mineral e autotrófico. Neste experimento foram fornecidas concentrações crescentes de fenol, entre 10 e  $300 \text{ mg.L}^{-1}$ , e amônio e nitrito de 177 e  $160 \text{ mg.L}^{-1}$ , respectivamente. Os autores constataram que quando a concentração de fenol atingiu  $300 \text{ mg.L}^{-1}$ , a eficiência de remoção de amônio e nitrito tiveram redução de 57% e 15%, respectivamente, comparando com um período precedente à adição do composto.

O carbono inorgânico promove o crescimento das bactérias anammox, que por sua vez aumentam a atividade no reator, já o carbono orgânico foi indicado como inibidor, pois promove efeitos adversos à atividade de micro-organismos anammox (MOLINUEVO *et al.* 2009; KIMURA *et al.* 2011; ANJALI E SABUMON, 2014). A inibição do processo anammox por matéria orgânica pode ocorrer devido à inativação enzimática e ser irreversível, levando à morte celular (GUVEN *et al.* 2005). Outro mecanismo proposto é a competição pelo aceptor de elétrons (nitrito) entre bactérias anammox, que são autotróficas, e bactérias heterotróficas desnitrificantes. Como as bactérias heterotróficas são capazes de crescer mais rapidamente em relação às autotróficas, acabam por eliminar as bactérias anammox na competição, inibindo dessa maneira, sua atividade (GUVEN *et al.* 2005; CHANCHOI *et al.* 2008; LACKNER *et al.* 2008; MOLINUEVO *et al.* 2009).

De fato, carbono orgânico, inorgânico e amônio sempre coexistiram em efluentes reais, visto que efluentes que contém amônio não são livres de matéria orgânica (ALI e OKABE, 2015), e a alta concentração destas geralmente limitava a aplicação do processo anammox, uma vez que propicia a formação de consócio microbiano misto.

O processo anammox é frequentemente aplicado ao tratamento de águas residuárias com altas concentrações de N-amoniacal e baixas concentrações de substâncias orgânicas, em que a proporção DQO/N é inferior a  $0,5\text{gDQO gN}^{-1}$  (VAN DER STAR *et al.* 2007; WETT, 2007; JOSS *et al.* 2009; JENNI *et al.* 2014). De acordo com Ali e Okabe (2015), a relação DQO/N observada em reatores encontra-se entre 0,2 até 3,8.

Investigando a ocorrência simultânea de reação anammox e desnitrificação em reatores do tipo UASB, Chamchoi *et al.* (2008) aplicando efluente sintético constataram que o aumento de DQO inibiu gradualmente a atividade anammox, favorecendo a atividade de bactérias desnitrificantes. Os autores também observaram que concentrações de DQO acima de  $300\text{ mg.L}^{-1}$  foram capazes de inibir totalmente a reação anammox. Resultados semelhantes foram obtidos por Molinuevo *et al.* (2009), que observaram o aumento da atividade de micro-organismos desnitrificantes quando a DQO de efluente de suinocultura variou de 237 para  $290\text{ mg.L}^{-1}$ .

Alguns estudos afirmaram que baixas concentrações de matéria orgânica não tem efeito significativo sobre a atividade anammox, porém, concentrações elevadas ( $\text{DQO} > 300\text{ mg.L}^{-1}$ ,  $\text{DQO/N} > 2$ ) podem prejudicar o processo (GUVEN *et al.* 2005; RUSCALLEDA *et al.* 2008, CHANCHOI *et al.* 2008; TANG *et al.* 2010).

Tang *et al.* (2010) aplicando meio sintético com concentrações de DQO aumentando gradativamente de 50 a  $700\text{ mg.L}^{-1}$  (sacarose como composto orgânico), observaram que a eficiência de remoção de amônio diminuiu significativamente, chegando a 3%, quando a concentração de DQO atingiu  $700\text{ mg.L}^{-1}$  ( $\text{DQO/N} = 2,92$ ), no entanto, o consumo de nitrito foi de 99%, demonstrando que a desnitrificação heterotrófica prevaleceu no reator, prejudicando a atividade anammox.

Ni *et al.* (2012) aplicando efluente sintético acrescido de leite sem gordura como fonte de carbono em reatores de 60 ml, TDH de 1,5 dias, biomassa granular e floculenta, investigaram a influência da matéria orgânica no desempenho do processo anammox por meio de diferentes relações DQO/N.

As concentrações de DQO testadas foram  $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $200 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $400 \text{ mg.L}^{-1}$ , com relação DQO/N de 1, 2 e 4, respectivamente. Antes da aplicação do afluente, os reatores apresentaram eficiência de remoção dos compostos nitrogenados em torno de 100%, ao final do experimento a eficiência observada foi de 72%, revelando que a adição de matéria orgânica teve efeito limitado sobre a remoção de amônio pelo processo anammox e que as bactérias anammox e desnitrificantes podem coexistir. Ao final da pesquisa, os autores concluíram que relações de DQO/N superiores a 4 são prejudiciais por reduzirem a quantidade de bactérias anammox e favorecerem a desnitrificação heterotrófica. Outro destaque desse trabalho foi que o lodo granular apresentou uma tolerância maior à presença de matéria orgânica do que o lodo floculento.

Jenni *et al.* (2014) avaliaram a influência do TDH e de diferentes concentrações de DQO na remoção de nitrogênio em um RBS com processo de nitrificação e anammox, com volume de trabalho igual 6,7 L, tratando sobrenadante de digestor de lodo de uma estação de tratamento de esgoto. Ao passo que o TDH foi reduzido, a relação DQO/N foi aumentada até atingir  $1,4 \text{ gDQO gN}^{-1}$ . Quando apenas o efluente foi aplicado, o RBS apresentou 85% de eficiência na remoção de nitrogênio, porém quando acetato e glicose foram adicionados, a eficiência de remoção aumentou para 95%, indicando atividade heterotrófica, confirmada pela técnica FISH (*Fluorescent in-situ hybridisation*). Os autores constataram que a partir da proporção  $0,8 \text{ gDQO.gN}^{-1}$  ocorreu um aumento da espécie *Candidatus Brocadia fulgida*, reconhecida pela capacidade de oxidar o acetato, mas o número total de bactérias anammox diminuiu.

Em estudo posterior, Jenni *et al.* (2015) utilizaram o balanço de massa para entender os processos bacterianos relevantes que ocorreram em um reator de nitrificação/anammox. Os autores concluíram que é um desafio conseguir fechar o balanço de massa e os estudos de cinética, devido à complexidade dos processos que ocorrem e ao alto desvio padrão obtido.

Avaliando os efeitos da relação DQO/N (1,0, 1,8 e 3,5, acetato como fonte de carbono) sobre a comunidade bacteriana envolvida na remoção de nitrogênio pelo processo SAD (*Simultaneous Anammox and Denitrification*), Bi *et al.* (2015) desenvolveram um modelo matemático para descrever a remoção de nitrogênio e de carbono orgânico considerando bactérias anammox e desnitrificantes, nitrogênio amoniacal, nitrito, nitrato e o carbono biodegradável. Por meio de um experimento em batelada montado com uma mistura de lodo anammox e lodo ativado para a verificação do modelo, os autores verificaram que proporções superiores a 1,8 afetaram a remoção

de nitrogênio pelo processo anammox, e o modelo matemático desenvolvido neste estudo foi importante para avaliação e monitoramento do processo SAD.

Leal *et al.* (2016) utilizando meio sintético e glicose (como fonte de matéria orgânica), em um RBS, obteve eficiência de remoção de 84% de amônio, 99% de nitrito e 55% na remoção de DQO, quando aplicou DQO de 300 mg.L<sup>-1</sup> (DQO/N= 5,0) durante 24 dias, evidenciando que relações maiores de DQO/N podem ser aplicadas em reatores anammox, desde que a biomassa seja aclimatada gradativamente e que a DQO não ultrapasse 300 mg.L<sup>-1</sup>, sugerindo que bactérias anammox e desnitrificantes heterotróficas podem coexistir, permitindo a remoção de amônio e consumo de DQO. Quando foi aplicado efluente de reator UASB (DQO≈208,44±54 mg.L<sup>-1</sup>) acrescido de 120 mg.L<sup>-1</sup> de nitrito, verificou-se 98% de eficiência na remoção de amônio, 88% de nitrito e 74% na remoção de DQO, ao final de 32 dias. Portanto, os autores concluíram que é possível aplicar o processo anammox às águas residuárias domésticas com baixa concentração de N-amoniaco e DQO (relação DQO/N de 5,0 a 6,0), previamente tratadas por processos anaeróbios, como é o caso de efluentes provenientes de reatores UASB.

Considerando que o processo anammox se processa em condições anóxicas, baixas concentrações de oxigênio no meio já podem interferir na eficiência de remoção de nitrogênio (JIN *et al.* 2012). A inibição parcial do processo pode ocorrer por concentrações tão baixas quanto 0,2 mgOD.L<sup>-1</sup>, passível de recuperação em seguida se condições anóxicas forem fornecidas. Baixas concentrações de oxigênio dissolvido (OD) também podem provocar a competição entre as anammox e outros grupos oxidadores de amônio e nitrito, como as AOB e as NOB, reduzindo a remoção de nitrogênio pelo processo anammox (STROUS *et al.* 1997a; SCHEEREN *et al.* 2011).

Egli *et al.* (2001) observaram que uma inibição reversível do processo anammox ocorreu em baixas concentrações de oxigênio (<1% de saturação de ar), e a inibição irreversível em concentrações mais elevadas de oxigênio (> 18% de saturação de ar). Portanto, o OD deve ser estritamente controlado em sistemas anammox a fim de se evitar a inibição do processo por oxigênio.

O OD presente em alguns efluentes pode ser removido por micro-organismos que o utilizam em sua respiração, proporcionando a conversão de parte do íon amônio a nitrito, e posterior aplicação ao processo anammox em escala plena, sistema nitrificação parcial-anammox, como os já mencionados sistemas SHARON (VAN DONGEN *et al.* 2001; JETTEN *et al.* 2001), CANON (VAZQUEZ-PADÍN *et al.* 2009b; PARK *et al.* 2010) e OLAND (KUI E VERSTRAETE, 1998;

PHILIPS *et al.* 2002; MONBALLIU *et al.* 2013), em condições operacionais específicas, contribuindo para um consócio em favor da remoção de N (LIU *et al.* 2008a; MA *et al.* 2016).

Com relação ao pH ideal para o crescimento das anammox, Strous *et al.* (1999b) relataram valores entre 6,7 e 8,7, enquanto Gao e Tao (2011) indicaram a faixa entre 6,7 e 8,3. Carvajal-Arroyo *et al.* (2013) consideraram através de ensaios incubados, valores de pH ótimo entre 6,5 e 8,3. Esses autores ainda concluíram que o valor de 7,5 e 7,3 foi ideal para maior atividade anammox alcançada nos testes com as espécies *Candidatus Brocadia caroliniensis* e *Candidatus Brocadia fulgida*, respectivamente. Esses resultados contrapõem os valores reportados anteriormente por Egli *et al.* (2001), que relataram faixa ótima de pH entre 7,5 e 8. Vale ressaltar que um dos fatores que pode provocar a inibição tanto por amônio quanto por nitrito é o pH, uma vez que ele controla a difusão e o equilíbrio químico desses compostos no meio (STROUS *et al.* 1999b; JIN *et al.* 2012).

A alcalinidade exerce função de tampão no meio, minimizando mudanças de pH durante a reação, evitando que os intermediários tóxicos ao processo se formem, inibindo parcial ou totalmente os micro-organismos com atividade anammox (SCHEEREN *et al.* 2011). Ela é fornecida por meio do íon bicarbonato - assim como a fonte de carbono, que faz parte da estequiometria da reação proposta por Strous *et al.* (1998), necessitando assim estar presente a fim de que o processo ocorra.

De acordo com Leal (2015) mais estudos são necessários para elucidar os efeitos e características principais do efluente dos reatores UASB, como o teor de carbono orgânico em termos de biodegradabilidade e sua relação com as concentrações de nitrogênio e temperatura do esgoto, além de entender os mecanismos de interação entre as comunidades microbianas. Parâmetros operacionais como a configuração do reator, pH, alcalinidade e temperatura, também devem ser observados, a fim de se obter um melhor desempenho do processo.

### **3.5.2 Efeito da temperatura sobre o metabolismo anammox**

A temperatura mostra-se como fator-chave para o crescimento e metabolismo dos micro-organismos, influenciando sua abundância, além de ser importante para as estações de tratamento biológico de efluentes (SCHEEREN *et al.* 2011; ALI e OKABE, 2015; DAVEREY *et al.* 2015; MA *et al.* 2016). Geralmente o crescimento celular ocorre mais rapidamente em temperaturas altas, o que limitaria o processo anammox ao tratamento de efluentes em temperaturas mais elevadas, mas quando muito altas, podem inibir a atividade de forma irreversível em decorrência da lise celular.

Gao e Tao (2011) reportaram que as bactérias com atividade anammox demonstraram habilidade de sobreviver em uma faixa de ambientes extremos, com temperaturas tão altas quanto 85 °C ou tão baixas quanto -2 °C, pois já foram detectadas em ecossistemas naturais, tais como solos e sedimentos marinhos no norte da Europa, onde elas prosperam sob condições muito frias e com baixa concentração de amônio (VAN DE VOSSEMBERG *et al.* 2008; HU *et al.* 2011).

De acordo com Zhu *et al.* (2008), há ocorrência de atividade anammox em temperaturas de 6 a 43 °C, mas sua taxa de reação cai rapidamente quando a temperatura encontra-se menor que 15 °C ou maior que 40 °C. De acordo com Dosta *et al.* (2008) a taxa de crescimento das anammox é reduzida de 30 a 40% a cada 5 °C de redução da temperatura, que tem seu ótimo reportado entre 35 e 40 °C. Segundo Dosta *et al.* (2008), Isaka *et al.* (2008) e Lotti *et al.* (2015) a redução da temperatura tem provocado impactos significativos sobre a atividade anammox, ou seja, a redução da temperatura a partir de 15 °C impacta muito a atividade anammox.

Kuenen (2008), Jenni *et al.* (2014) e Ma *et al.* (2016) também consideraram a temperatura como fator-chave no bom desempenho dos reatores anammox, o que limitaria este processo a efluentes com temperatura superior a 30 °C. Strous *et al.* (1997b) e Gao e Tao (2011) relataram que o processo anammox opera na faixa ótima de 40±3 °C, Ali e Okabe (2015) consideraram 37 °C como temperatura ótima, enquanto Thamdrup e Dalsgaard (2002) consideraram uma faixa menor, entre 26 e 28°C.

Liu *et al.* (2015) descobriram que um superaquecimento acidental a 48 °C por 1 h causou danos irreversíveis e morte às bactérias anammox. Após esse curto choque de temperatura, elas precisaram de duas semanas para recuperar uma atividade mensurável. Consequentemente, a temperatura nos reatores anammox deve ser cuidadosamente controlada abaixo de 40 °C, especialmente nos reatores que utilizam aquecedores para controle de temperatura ou em reatores utilizados para o tratamento de efluentes industriais quentes (LOPEZ-VAZQUEZ *et al.* 2014), para evitar o risco de ultrapassar a temperatura máxima admissível das anammox, que levaria a uma falha do reator.

Apesar da predominância de temperaturas mais elevadas, altas taxas de remoção de nitrogênio (2,28 kgN.m<sup>-3</sup>d<sup>-1</sup>) foram alcançadas a 16 °C em um reator tratando efluente de baixa carga proveniente de um clarificador secundário de uma estação de tratamento de efluentes municipais, que apresentava 16,87±2,09 mg.L<sup>-1</sup> de amônio e 20,57±2,31 mg.L<sup>-1</sup> de nitrito em sua composição (MA *et al.* 2013).

Laureni *et al.* (2015) observaram atividade anammox a uma taxa de  $465 \text{ mgN} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$  a  $29 \text{ }^\circ\text{C}$  em um reator tratando esgoto doméstico pré-tratado aerobicamente com adição de nitrito. Quando a temperatura foi reduzida para  $12,5 \text{ }^\circ\text{C}$ , os autores perceberam que a atividade anammox apresentou uma queda acentuada, atingindo taxa de remoção de  $40 \text{ mgN} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ . Guo *et al.* (2015) simularam a variação da temperatura do outono, inverno, primavera e verão típicas do sudeste da China em um reator anammox, e observaram que as temperaturas de inverno ( $15,8$  a  $2,5 \text{ }^\circ\text{C}$ ) provocaram o pior desempenho no reator, que ainda foi refletido no início da etapa seguinte (primavera –  $10,7$  a  $21,6 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Os autores justificaram este ocorrido pela redução da afinidade das bactérias pelo substrato.

Blackburne *et al.* (2008) e Hendrickx *et al.* (2012) consideram que a baixa concentração de amônio no esgoto ( $<100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), associada à baixa temperatura principalmente no inverno e à lenta taxa de crescimento das bactérias, inviabilizariam a aplicação deste processo (em países de clima frio).

Mesmo a predominância de temperaturas mais elevadas, as bactérias anammox podem se adaptar a baixas temperaturas ambientais (ISAKA *et al.* 2008; WINKLER *et al.* 2012; HU *et al.* 2013; GILBERT *et al.* 2014b; ALI e OKABE, 2015), sendo capazes de manter seu crescimento e atividade em efluentes com temperatura entre  $10$  e  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  (GILBERT *et al.* 2014b; LOTTI *et al.* 2014a). Oshiki *et al.* (2011) verificaram atividade anammox em um experimento de laboratório a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Lotti *et al.* (2014b) avaliaram a viabilidade de remoção de nitrogênio de efluente doméstico entre  $10$  e  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ , obtendo taxa de remoção de  $0,4 \text{ gN} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , sugerindo que o processo anammox pode ser usado para este fim em tratamento convencional.

Considerando que cada micro-organismo possui sua faixa de temperatura ideal de desenvolvimento, Ali e Okabe (2015) reportaram que o máximo crescimento de *Candidatus Brocadia* e *Candidatus Jettenia* ocorreu a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  e *Candidatus Scalindua* em torno de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , temperatura passível de ocorrer em alguns efluentes, o que favorece a aplicação desse processo.

A viabilidade de aplicação do processo anammox como pós-tratamento de baixo custo para um efluente anaeróbio foi avaliada por Sanchez *et al.* (2014), que utilizaram efluente sintético acrescido de amido e acetato a fim de simular a presença de matéria orgânica biodegradável. Foram realizados testes em batelada com frascos de  $310 \text{ ml}$  e as condições operacionais dos experimentos foram testadas quanto à variação da temperatura ( $14 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $22 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ) e a razão DQO/N ( $2$  e  $6$ ). As concentrações dos compostos nitrogenados foram de  $32 \pm 2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4^+$  e  $25 \pm 2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de  $\text{NO}_2^-$ . Os autores observaram alta remoção de nitrogênio pelo processo anammox nas temperaturas

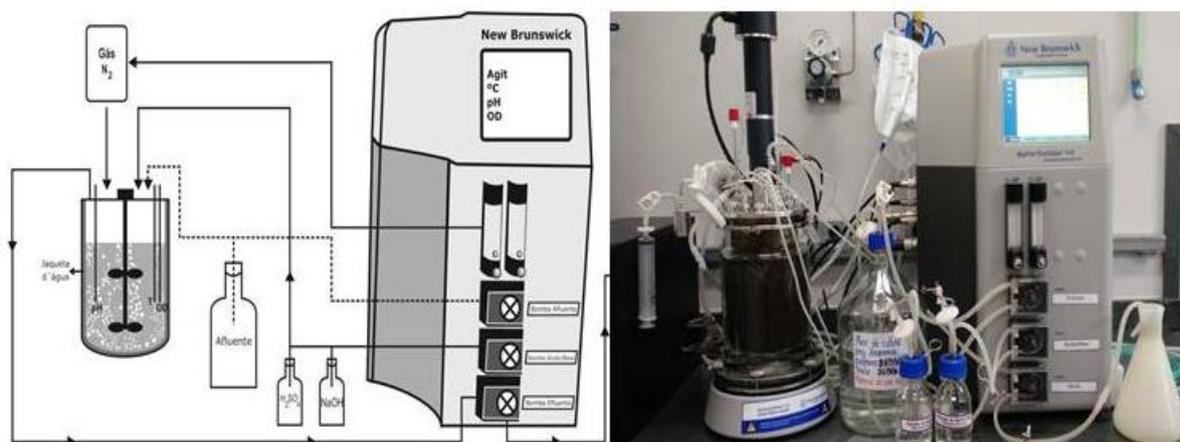
de 22 °C (77-84% de eficiência) e 30 °C (73-79% de eficiência) e concluíram que a atividade anammox foi fortemente influenciada pela temperatura, pois a 14 °C não houve remoção de nitrogênio pelo processo. As fontes de DQO e relação DQO/N aplicadas não mostraram influência significativa sobre o processo. Estes resultados sugerem que o processo anammox tem potencial para ser aplicado como pós-tratamento de sistemas anaeróbios de tratamento de esgoto em climas quentes. Os autores recomendaram experimentos de longa duração em condições semelhantes e também o estudo da dinâmica populacional das bactérias anammox, oxidadoras de amônio e nitrito e dos micro-organismos heterotróficos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi desenvolvida no Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, na linha de pesquisa de tratamento de águas residuárias no grupo de pesquisa de Microbiologia Aplicada à Engenharia Sanitária.

### 4.1 Reator em batelada sequencial

O fermentador de mistura completa utilizado nesta pesquisa, modelo *Benchtop Fermentor & Bioreactor BioFlo®/CelliGen® 115* (marca *New Brunswick/Eppendorf*), possui 2 litros de volume de trabalho e foi operado no modo batelada sequencial, Figura 4.1.



**Figura 4.1** Representação esquemática e real do RBS utilizado na pesquisa

Este reator, confeccionado em vidro e protegido da incidência da luz para evitar o crescimento de algas, é envolvido por uma jaqueta d'água que realiza a troca da água armazenada na parede externa do mesmo, a fim de manter a temperatura programada. Além disso, o reator possui sensores de nível que permitem controlar o volume de entrada e saída do meio de cultura/efluente, e sondas que permitem medir os seguintes parâmetros: pH, saturação de oxigênio dissolvido e temperatura. A agitação também é controlada por controle no equipamento. As bombas de entrada e saída são desativadas automaticamente pelos sensores de nível instalados na parte superior do reator, de acordo com o volume de troca configurado. Essa estabilidade operacional se faz necessária para a seleção e cultivo de micro-organismos de crescimento lento, como é o caso das bactérias com atividade anammox.

## 4.2 Inoculação do RBS e cultivo da biomassa

O RBS foi inoculado com lodo proveniente da linha de recirculação dos decantadores secundários da Estação de Tratamento de Esgoto do Ribeirão Arrudas (ETE – Arrudas) da Companhia de Saneamento de Minas Gerais (COPASA). Estudo realizado previamente por Araújo *et al.* (2011), Campos (2011), e Pereira *et al.* (2014) obtiveram sucesso no enriquecimento de bactérias com atividade anammox em RBS a partir de amostras derivadas do mesmo sistema, sendo que Campos (2011) detectou atividade anammox a partir de 50 dias de cultivo.

Foram coletados 10 litros de lodo do sistema descrito acima e transportados ao laboratório, armazenados a 4 °C até o momento do uso. Para o preparo do inóculo, 8,7 litros de lodo com uma concentração de 5,0 gSTV.L<sup>-1</sup> foram centrifugados a 4000 rpm por 20 minutos, descartando o sobrenadante. Após a etapa de centrifugação, a fração sólida foi adicionada ao meio de cultura mineral e autotrófico, cuja composição estava de acordo com Van de Graaf *et al.* (1996) e Dapena-Mora *et al.* (2004) (TABELAS 4.1 e 4.2) para enriquecimento e cultivo de bactérias com atividade anammox até atingir o volume final de 2 litros, obtendo concentração do inóculo de 20,1 gSTV.L<sup>-1</sup>. A análise de Sólidos Totais Voláteis (STV) seguiu a metodologia descrita no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012). Amostra do inóculo também foi retirada para caracterização microbiológica por meio de técnicas de biologia molecular.

**Tabela 4.1** Composição do meio mineral autotrófico

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

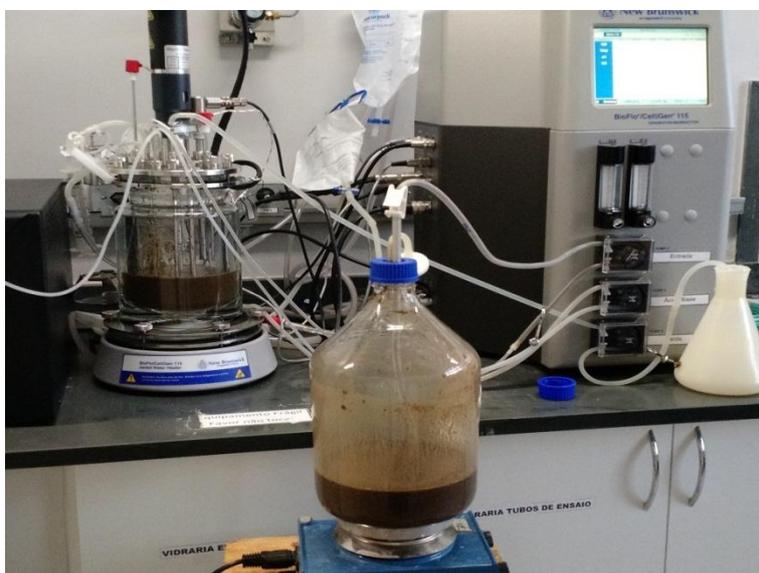
Fonte: Van De Graaf *et al.* 1996; Dapena-Mora *et al.* 2004

**Tabela 4.2** Composição das soluções de Micronutrientes I e II

Componentes	Micronutrientes I Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	Micronutrientes II Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	6250	15000
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	6250	-
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	-	430
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	-	240
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	-	990
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	-	250
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	-	220
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	-	190
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	-	80
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	-	14

Fonte: Dapena-Mora *et al.* 2004

O inóculo preparado foi transferido para um frasco tipo *Schott* de 5 litros na segunda quinzena de março de 2017, onde fluxionou-se gás nitrogênio por 5 minutos na massa líquida e por 3 minutos no *headspace*, a fim de expulsar o oxigênio dissolvido e propiciar condições anaeróbias. Em seguida, o frasco foi fechado e conectado à bomba de entrada do RBS, que através de uma mangueira, iniciou a transferência do inóculo para o reator. Durante essa transferência, o frasco *Schott* foi mantido sob agitação. A Figura 4.2 ilustra a etapa de inoculação.



**Figura 4.2** Transferência do inóculo para o RBS anammox

Após a inoculação, o RBS foi alimentado com o meio de cultura mineral e autotrófico com concentração crescente dos substratos nitrito e amônio, por um período total de 160 dias, conforme apresentado na Tabela 4.3. Durante a etapa de enriquecimento, o pH do reator foi mantido a 7,5,

sendo ajustado quando necessário, com solução de hidróxido de sódio (NaOH – 0,5 M) ou ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 0,5 M), a agitação foi mantida a 70 rpm e a temperatura a 35 °C.

**Tabela 4.3** Concentração dos substratos no meio de cultura no período de enriquecimento

Dias de operação	Concentração de substratos	
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	N- NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
1 a 4	30	30
5 a 89	40	30
90 a 117	60	45
118 a 160	80	60

Nos primeiros 18 dias de enriquecimento (até o dia 4/4/2016), foi realizado apenas um ciclo de operação no RBS a fim de evitar a excessiva perda de sólidos do mesmo. A partir do 19º dia, o RBS foi operado diariamente em dois ciclos: um curto, com duração de 7 horas, e um longo, com duração de 17 horas, tempo de detenção hidráulica (TDH) de 24 horas e retenção total de biomassa. Em cada ciclo, as seguintes etapas foram realizadas: a) fase de alimentação, na qual o afluente foi introduzido no reator (40 minutos, com agitação contínua); b) fase de reação (7 e 17 horas); c) fase de decantação (40 minutos), na qual a agitação do sistema era desligada, permitindo assim a sedimentação da biomassa; e d) fase de retirada do meio líquido, onde 1 litro do efluente era retirado e as respectivas amostras coletadas para análise (40 minutos). O pH, temperatura, agitação e o oxigênio dissolvido foram monitorados e, quando necessários, também foram ajustados a cada ciclo, por meio de sondas, sensores do próprio reator e as soluções de ácido e base dos frascos acoplados ao RBS.

### 4.3 Reator UASB e efluente anaeróbio

O Reator UASB cujo efluente foi utilizado nesta pesquisa está localizado no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento (CePTS/UFMG/COPASA), situado na Estação de Tratamento de Esgotos da bacia do Ribeirão Arrudas (ETE Arrudas/COPASA) em Belo Horizonte, MG. É um reator em escala de demonstração, destinado ao tratamento de esgoto doméstico.

Esse reator possui 14,2 m<sup>3</sup>, construído em ferrocimento, possui 4,5 m de área útil, com 4,5 m de altura e 2 m de diâmetro interno, o qual foi dimensionado para um equivalente populacional de 320 habitantes (per capita de esgoto igual a 125 L.hab<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) e TDH médio de 7,5 horas. Após o esgoto bruto ser submetido ao tratamento preliminar, uma fração é direcionada para o reator UASB e o

efluente desse reator foi coletado para alimentação do reator anammox do presente estudo. A Figura 4.3 apresenta uma foto do reator UASB.



**Figura 4.3** Reator UASB, em escala de demonstração, utilizado no presente estudo

A Tabela 4.4 apresenta uma síntese das principais condições operacionais definidas para a operação do reator UASB. Análises físico-químicas foram realizadas para a caracterização do efluente do reator UASB antes da aplicação no RBS. A Tabela 4.5 apresenta os resultados da composição do efluente anaeróbio.

**Tabela 4.4** Condições operacionais do reator UASB

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

**Tabela 4.5** Caracterização físico-química do efluente do reator UASB utilizado ao longo da pesquisa

<b>Composto</b>	<b>Unidade</b>	<b>Concentração Média (Desvio Padrão)</b>
pH	-	7,02 (0)
Oxigênio dissolvido	mg.L <sup>-1</sup>	0,6 (0,7)
Temperatura	°C	25,0 (1,5)
DQO total	mg.L <sup>-1</sup>	141,4 (43,8)
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	mg.L <sup>-1</sup>	7,94 (6,5)

A aplicação do efluente do reator UASB foi realizada a partir da fase 1, sob as mesmas condições operacionais utilizadas na etapa de enriquecimento. O detalhamento experimental encontra-se no tópico seguinte.

#### 4.4 Planejamento experimental

Para alcançar os objetivos propostos, a pesquisa foi dividida em 3 fases, a partir da fase de enriquecimento: fase 1, destinou-se a aplicar o efluente de reator UASB ao RBS à temperatura de 35 °C, a fase 2 foi proposta para verificar o desempenho do processo anammox quando submetido à temperatura de 25 °C e a fase 3 se propôs a verificar o desempenho do processo anammox a 20 °C, no caso da ocorrência de temperatura ambiente típica do período de inverno (na região de Belo Horizonte). As características das fases, bem como a frequência amostral dos parâmetros analisados, são descritos na Tabela 4.6. Vale ressaltar que a temperatura do RBS foi mantida como descrito, sem variações. Em todas as fases de teste após a etapa de enriquecimento, o fornecimento de nitrito ao RBS se deu pela introdução de uma solução de  $\text{NaNO}_2^-$  (24  $\text{g.L}^{-1}$ ) injetada em um septo na superfície do RBS logo no início de cada ciclo (fase de alimentação), e o volume fornecido foi gradualmente ajustado apenas com a finalidade de suprir a concentração de nitrito necessária às reações ocorridas no reator, conforme Tabela 4.7.

**Tabela 4.6** Fases da pesquisa e parâmetros analisados

Fases do RBS anammox	Temperatura °C	Duração (dias)	Afluente	Monitoramento de parâmetros	Referência
Enriquecimento	35	160	Meio de cultura autotrófico	DQO <sup>a</sup> , N-NH <sub>4</sub> <sup>+b</sup> , N-NO <sub>2</sub> <sup>-b</sup> , N-NO <sub>3</sub> <sup>-c</sup> , pH <sup>b</sup> , temperatura <sup>b</sup> , análises microbiológicas <sup>d</sup>	APHA, 2012
Fase 1	35	40	Efluente anaeróbico real + NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>		
Fase 2	25	63			
Fase 3	20	45			

Frequência semanal de análise: <sup>(a)</sup> 3 vezes; <sup>(b)</sup> 7 vezes; <sup>(c)</sup> 1 vez; <sup>(d)</sup> apenas ao final de cada fase

**Tabela 4.7** Concentração de nitrito fornecida ao reator anammox durante as 3 fases da pesquisa

	<b>Dias de operação</b>	<b>Concentração mg.L<sup>-1</sup></b>
		<b>CL:CC</b>
<b>Fase 1</b>	160 - 167	120:00
	168 - 174	100:80
	175 - 200	90:70
<b>Fase 2</b>	201 - 213	90:70
	218 - 263	70:70
<b>Fase 3</b>	264 - 308	70:70

CL: Ciclo Longo; CC: Ciclo Curto

A atividade anammox foi detectada no RBS após 82 dias de enriquecimento e cultivo, e a partir desse dia até o início da fase 1 (em 25/8/2016), este período foi considerado como período controle para a eficiência de remoção de nitrogênio pelo processo anammox. A descrição do início de cada fase está representada na Tabela 4.8. Cada fase foi mantida até que 40 dias com coleta de dados úteis fossem alcançados, sem interferência, por esse motivo as fases 2 e 3 se estenderam mais (de 45 a 63 dias). No total, o RBS foi monitorado por 308 dias, sendo 160 dias de enriquecimento.

**Tabela 4.8** Detalhamento das fases em dias

<b>Fase</b>	<b>Duração</b>
<i>Start up</i>	17/03/2016
Enriquecimento	17/3 a 24/8
Controle	7/6 a 24/8
Fase 1	25/8 a 3/10
Fase 2	4/10 a 5/12
Fase 3	6/12 a 19/1/17

A fim de avaliar se as diferentes temperaturas testadas tiveram algum efeito significativo na eficiência do processo e se houve alteração da razão estequiométrica de consumo de nitrito/amônio, os resultados obtidos foram tratados estatisticamente e são descritos no tópico 4.6. Amostras da biomassa foram coletadas para avaliação da comunidade microbiana. Estas ocorreram em diferentes períodos, desde o *start up* do RBS até o final do experimento, e são descritas no tópico 4.5.

## **4.5 Métodos analíticos**

### **4.5.1 Análise de sólidos totais (ST) e sólidos totais voláteis (STV)**

As coletas de biomassa do RBS, para a análise de sólidos totais (ST) e sólidos totais voláteis (STV), foram realizadas no lodo adquirido para inoculação, no inóculo pronto, após a etapa de

enriquecimento e após cada uma das três fases de testes com temperatura (na fase 3 foram feitas duas coletas: uma com 30 dias e outra com 40 dias, no final da mesma). Para o resultado final, considerou-se a média entre as duplicatas. A metodologia utilizada foi a 2540 B e E do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012).

#### 4.5.2 Análise de nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)

As análises de nitrogênio amoniacal foram determinadas pelo método colorimétrico 4500-NH<sub>3</sub>-F descrito no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012). Este método baseia-se na formação de um composto de coloração azul intensa, denominado indofenol, proveniente da reação de amônio, hipoclorito e fenol. A reação é catalisada pelo nitroprussiato de sódio e é suscetível à determinação por colorimetria em espectrofotômetro. A absorvância resultante é proporcional à quantidade de nitrogênio amoniacal presente no meio analisado e é medida a 640 nm.

O procedimento analítico consistiu inicialmente na transferência de 5 ml da amostra (ou de diluição da amostra) em tubos tipo de 15 ml e de 5 ml de água Milli-Q<sup>®</sup> (constituindo o branco) em tubos semelhantes. Posteriormente pipetou-se 200 µl de solução de fenol 1% (p/v) e em sequência, 200 µl de uma solução de nitroprussiato de sódio 0,5% (p/v), agitando bem a mistura. Finalmente adicionou-se 500 µl de uma solução oxidante, preparada a partir de hipoclorito de sódio 4-6% e de uma solução alcalina (constituída de citrato de sódio e hidróxido de sódio) na proporção 4:1. Os tubos eram fechados e homogeneizados em agitador tipo vórtex e incubados à temperatura ambiente na ausência de luz por um período de 1 hora. Após a incubação seguiu a etapa de leitura em espectrofotômetro (HACH DR, 2800) à absorvância de 640 nm.

As determinações foram feitas em triplicata e realizava-se a média entre as repetições para obtenção do resultado final. A concentração foi obtida por meio da equação da reta gerada durante a construção da curva de calibração do método (Equação 4.4), onde Y é a absorvância e X é a concentração, considerando R<sup>2</sup> > 0,999, preparada mensalmente, com soluções padrão contendo concentrações conhecidas de nitrogênio amoniacal.

$$Y = aX + b \tag{4.4}$$

#### 4.5.3 Análise de nitrito (N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)

As análises de nitrito (N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) foram realizadas pelo método colorimétrico 4500 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> B, segundo o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012). O método baseia-se na reação do nitrito com ácido sulfanílico, em condições de baixo pH para formar um íon diazônico, o qual se acopla com um composto  $\alpha$ -Naftil, formando um corante de coloração avermelhada.

A metodologia consistiu em pipetar 5 ml da amostra (ou das diluições das amostras) em tubos de 15 ml e também 5 ml de água Milli-Q® (branco). Adicionou-se 200  $\mu$ L do reagente de cor (composto por ácido fosfórico 85%, sulfanilamida e cloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina) e os tubos foram homogeneizados em vórtex. Incubaram-se os tubos a temperatura ambiente por 15 minutos. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro (HACH DR, 2800) a 543 nm, utilizando cubeta quadrada de caminho óptico igual a 1 cm. A concentração de nitrogênio nitroso foi obtida por meio de equação da reta (Equação 4.5) gerada durante a curva de calibração do método ( $R_2 > 0,999$ ), a qual era realizada mensalmente, utilizando soluções padrão com concentrações conhecidas de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. As análises foram realizadas em duplicata, sendo o resultado final obtido por meio da obtenção da média entre as replicatas.

$$Y = aX + b \quad (4.5)$$

#### 4.5.4 Análise de nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)

A determinação das concentrações do íon nitrato foi realizada por meio de Kit (NitraVer® 5 Nitrate Reagent, Hach), de acordo com as instruções do fabricante para as amostras das fases de enriquecimento, 1 e 2. As amostras de nitrato da fase 3 foram analisadas pelo LIMNOS – laboratório externo à UFMG, por cromatografia iônica (METROHM/850/2007).

#### 4.5.5 Análise de Demanda Química de Oxigênio total (DQO)

A DQO foi realizada pelo método colorimétrico, refluxo fechado (5220 D), de acordo com APHA (2012). Na determinação da DQO, a amostra é oxidada por dicromato de potássio, em meio ácido. A quantidade de dicromato de potássio colocada em contato com a amostra deve ser superior à quantidade necessária para a oxidação, para assegurar que toda a matéria orgânica será oxidada. O excesso de dicromato de potássio é medido ao final do processo de oxidação, permitindo determinar

a quantidade consumida para a degradação da matéria orgânica e, indiretamente, a quantidade de oxigênio.

#### 4.6 *Investigação da comunidade microbiana*

Amostras da biomassa foram coletadas para investigação da comunidade microbiana presente no RBS e avaliadas através de métodos moleculares. As amostragens ocorreram em diferentes períodos, desde o *start up* do RBS até o final do experimento, caracterizando o inóculo, o final da etapa de enriquecimento (160 dias de operação) e ao final de cada uma das três fases, sendo que na fase 3 ocorreram duas coletas.

A Tabela 4.8 apresenta os períodos de coleta da biomassa, bem como as técnicas de biologia molecular utilizadas para a caracterização dos micro-organismos presentes no reator.

**Tabela 4.9** Amostras e metodologias empregadas para a caracterização microbiana

<b>Fase</b>	<b>Dias de operação</b>	<b>Amostras</b>	<b>Técnicas</b>
Inóculo	0	Lodo ativado	
Fim do enriquecimento	160	Após 160 dias de cultivo	Extração de DNA; PCR-DGGE e sequenciamento
Fim da Fase 1	200	Biomassa após 35 °C	
Fim da Fase 2	262	Biomassa após 25 °C	
Fase 3 com 31 dias	298	Biomassa após 20 °C	
Fim da fase 3	308	Biomassa após 20 °C	

As amostragens de biomassa foram realizadas através de um coletor próprio localizado na parte superior do reator. A mesma foi realizada durante o período de reação, onde a biomassa e o meio líquido encontravam-se sob agitação contínua.

##### 4.6.1 *Extração de DNA*

As amostras de biomassa coletadas do RBS foram submetidas a centrifugação a 4000 rpm por 20 minutos e lavadas por três vezes sucessivas com tampão fosfato-salino (PBS 1X, NaCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 7,2-7,4). As amostras foram pesadas e armazenadas a -20 °C, conforme descrito por Garcia e Araújo (2010). Posteriormente, o DNA genômico foi extraído a partir de 0,5 g de todas as amostras com o kit de extração *PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, E. U. A.)*, de acordo com as instruções do fabricante.

Para a verificação do resultado da extração, alíquotas de 3,0 µl do DNA extraído das amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,0% (75 volts, 30 minutos). O *GeneRuler Express DNA Ladder* (100-5000 pb, *Thermo Scientific*) foi utilizado como marcador de peso molecular. Após a eletroforese o gel foi observado em transluminador de LED e as imagens obtidas por um sistema de captura de imagens. O DNA foi quantificado em espectrofotômetro *Nanodrop 1000* (*Thermo Scientific*).

#### 4.6.2 Detecção de bactérias anammox pela PCR

Para a detecção e confirmação da presença de bactérias anammox nas amostras coletadas do RBS foi utilizada a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). Após a extração de DNA das amostras, os mesmos foram amplificados por PCR utilizando iniciadores específicos para microrganismos do grupo Planctomicetos e para bactérias anammox (TABELA 4.10).

**Tabela 4.10** Iniciadores utilizados nas reações da PCR para detecção de bactérias anammox

Primer	Grupo alvo	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do fragmento (pb)	Referência
Pla46f	RNAr16S de Planctomycetes	56	774	NEEF <i>et al.</i> (1998)
Amx820r	RNAr16S dos Gêneros “ <i>Ca. Brocadia</i> ” “ <i>Ca. Kuenenia</i> ”			SCHMID <i>et al.</i> (2003)

As condições de amplificação para o par de iniciadores PLA46f-Amx820r consistiram de uma etapa inicial de desnaturação por 4 minutos a 94 °C, trinta e cinco ciclos que compreenderam 45 segundos de desnaturação a 94 °C, 50 segundos de anelamento a 56 °C e 1 minuto de extensão a 72 °C. Por fim, uma etapa de extensão por 7 minutos a 72 °C. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, 80V por 30 minutos. Após a eletroforese o gel foi observado em transluminador de LED e as imagens obtidas por um sistema de captura de imagens. Foi utilizado o marcador de peso molecular *GeneRuler Express DNA Ladder* 100-5000 pb (*Thermo Scientific*).

#### 4.6.3 Análise da estrutura da comunidade bacteriana por PCR-DGGE

A técnica da PCR foi utilizada para a amplificação do DNA extraído de todas as amostras com *primers* universais que amplificam a região V8 do gene da subunidade 16S do RNA ribossomal (1055F/1392R) de *Bacteria* (FERRIS *et al.*, 1996).

Os produtos da PCR com *primers* universais foram separados por Eletroforese em Gel por Gradiente Desnaturante (DGGE), que separa iguais fragmentos de DNA pela concentração de guanina e citosina (G e C) no fragmento amplificado, por isso, fragmentos com maior quantidade de G+C situam-se na região do gel onde tem maior concentração de desnaturante (formamida e ureia). Um grampo GC foi adicionado ao iniciador 1392R, com o objetivo de facilitar a separação das bandas durante a eletroforese.

As sequências dos *primers* utilizados são apresentados na Tabela 4.11. Os reagentes necessários, as concentrações e o volume dos mesmos, para uma reação com volume final de 50 µL, estão apresentados na tabela 4.12. As condições de amplificação são apresentadas na Tabela 4.13. Todas as reações da PCR foram realizadas juntamente com um controle, ausente de amostra de DNA (branco), contendo somente os reagentes para a reação da PCR.

**Tabela 4.11** Sequências dos primers utilizados na PCR-DGGE

<i>Primers</i>	Sequencia (5'→3')	Tamanho do fragmento (pb)	Referência
1055F	ATGGCTGTCGTCAGCT		
1392R-GC	ACGGGCGGTGTGTAC	337	FERRIS <i>et al.</i> , (1996)
Grampo GC	CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGGCCCGCCGCC CCCGCCCC		

**Tabela 4.12** Concentração dos reagentes utilizados na PCR-DGGE

Reagente	Solução estoque	Concentração por reação	Volume (µl)
H <sub>2</sub> O Ultrapura	-	-	20
<i>Pré-Mix*</i>	2X	1X	25
<i>Bovine Serum Albumin (BSA)</i>	5 ng.µl <sup>-1</sup>	30 pmol. µl <sup>-1</sup>	3
Iniciador 1	30 pmol. µl <sup>-1</sup>	300 nM	0,5
Iniciador 2	30 pmol. µl <sup>-1</sup>	300 nM	0,5
Amostra de DNA	variável	variável	1

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

**Tabela 4.13** Condições de amplificação para os primers utilizados na PCR-DGGE

Etapa	Temperatura	1055F/1392R-GC Tempo	
Desnaturação inicial	94	4 minutos	
Desnaturação	94	1 minuto	
Anelamento	56	1 minuto	35 ciclos
Extensão	72	1 minuto	
Extensão final	72	10 minutos	
Resfriamento	4	-	

Os produtos da PCR foram primeiramente analisados por eletroforese em gel de agarose 1% e quantificados por meio da comparação com o marcador de peso molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen). Para a quantificação dos produtos utilizou-se o processador de imagens *ImageJ* 1.6.0, o qual permitiu estimar a área da intensidade da banda (em pixels) de referência (*Low Mass Ladder*) e das amostras do gel. No programa *ImageJ*, com os valores das respectivas áreas do *Low Mass Ladder* foi estimado 400 ng de DNA para cada amostra que seria aplicada na canaleta do gel de DGGE.

Os produtos resultantes da amplificação da PCR foram adicionados ao gel de poliacrilamida (acrilamida-bisacrilamida) contendo agentes desnaturantes (ureia e formamida) para separação dos diferentes fragmentos de DNA. O gel de DGGE continha 8% de acrilamida e gradiente desnaturante de 45% a 75%. O gel foi preparado a partir de soluções estoques com 0% e 100% de ureia e formamida. Para a polimerização do gel foram utilizadas soluções de persulfato de amônio (APS) 10% (volume/volume) e tetrametiletilenodiamina (TEMED) 0,1% (volume/volume). O DGGE foi realizado nas seguintes condições: temperatura de 60°C, 75V, tempo de eletroforese de 16,5 horas e tampão TAE 0,5X (TAE 1X: 0,04M Tris base; 0,02M Acetato de sódio; 10 mM EDTA; pH ajustado para 7,4) no sistema *DCode* (*BioRad Universal Mutation Detection*, Hercules, CA, USA).

Após a eletroforese, o gel foi corado com *SybrGold* (*Life Technologies*) por 25 minutos e visualizado em um transluminador *LED Nippon Genetics*. As bandas foram excisadas com o auxílio de um cortador de bandas, eluídas em 50 µL de TE (Tris 10 mM e EDTA 1 mM, pH 8,0) a 4 °C por 48 horas. O DNA eluído foi novamente amplificado com os iniciadores 1055F/1392R, porém sem o

grupo GC, nas mesmas condições da primeira reação. Os produtos da PCR foram quantificados (conforme descrito na primeira reação) e enviados para purificação e sequenciamento unidirecional (realizado pela empresa *Macrogen Inc.*, em um Sequenciador 3730XL).

As sequências foram comparadas com aquelas presentes nas bases de dados do *Ribosomal Database Project* através do *RDP Classifier* (<https://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>), com um nível de confiança de 80% (WANG *et al.*, 2007) e do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), através do *Blastn* (ALTSCHUL *et al.*, 1990). Os perfis de banda do DGGE foram analisados com o programa *Bionumerics 7.1 (Applied Maths)*, com o objetivo de verificar a similaridade entre as amostras. Os perfis foram comparados usando o coeficiente de similaridade *Dice* e o dendograma foi gerado através do método UPGMA (*Unweighted Pair Group with Mathematical Averages*).

#### **4.7 Análises estatísticas**

Para avaliar se as temperaturas testadas foram significativamente diferentes entre si em relação à eficiência de remoção dos compostos, os dados foram submetidos ao teste de *Shapiro-Wilk* para verificar se os mesmos apresentavam distribuição normal. Em seguida, foi aplicado teste de comparação entre as médias ( $\alpha=5\%$ ), utilizando o teste *ANOVA* quando os dados apresentaram distribuição normal, ou o teste de *Kruskal-Wallis* quando os dados apresentaram distribuição não normal. Para os casos em que houve diferença entre as médias, o teste de comparação múltipla entre médias ( $\alpha=5\%$ ) foi aplicado. Os testes foram executados no *software Statistica 8*.

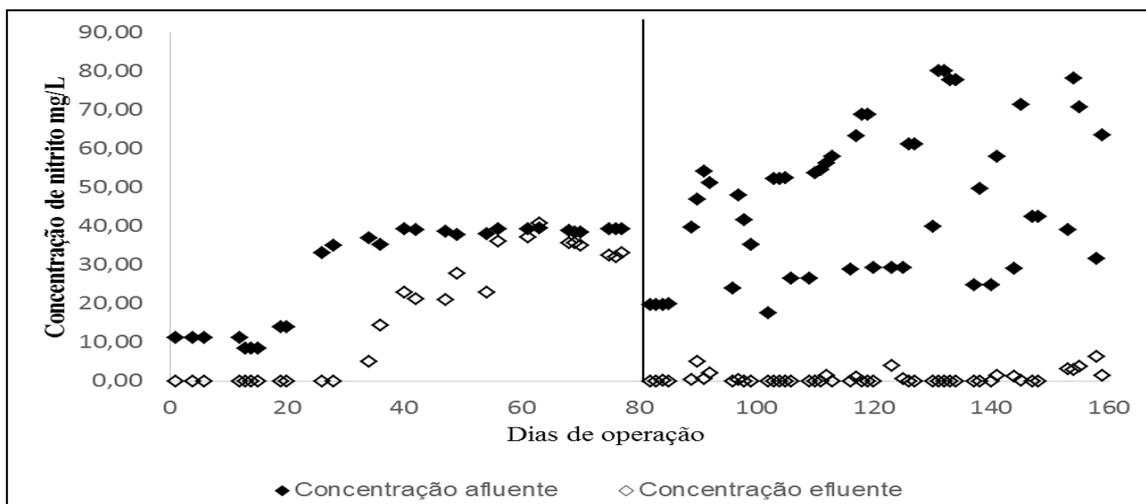
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O reator com atividade anammox foi inoculado com lodo proveniente da Estação de Tratamento de Esgotos do Ribeirão Arrudas - COPASA, e enriquecido por um período de 160 dias, a fim de proporcionar o crescimento e estabilidade das bactérias com atividade anammox. Nesta fase de enriquecimento com meio de cultura, o RBS foi mantido a 35 °C e o pH foi ajustado para 7,5. Segundo Strous *et al.* (1999b), essas condições são ideais para as bactérias com atividade anammox.

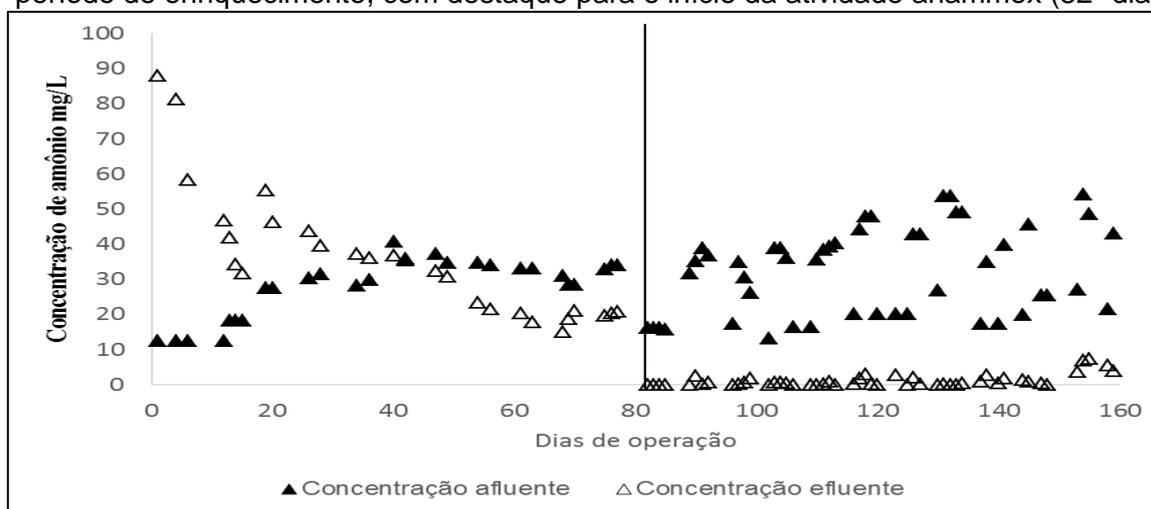
### 5.1 Etapa de enriquecimento

A etapa de enriquecimento das bactérias anammox no RBS foi iniciada em 17 de março de 2016 com o objetivo de selecionar e aumentar a comunidade de bactérias com atividade anammox. A partir do monitoramento da mesma, foi possível observar a dinâmica dos compostos nitrogenados, que indicaram a predominância das reações que estavam ocorrendo no RBS, como pode ser observado nas Figuras 5.1, 5.2 e 5.3. Foi possível notar que do início da operação do RBS até o 25º dia, a carga de nitrogênio total (nitrito + amônio) efluente foi maior que a carga afluente, o que está diretamente vinculada às reações de amonificação ocorridas no reator, fazendo com que a concentração de amônio efluente se apresentasse elevada e o nitrito fosse totalmente consumido, o que caracteriza atividade desnitrificante.

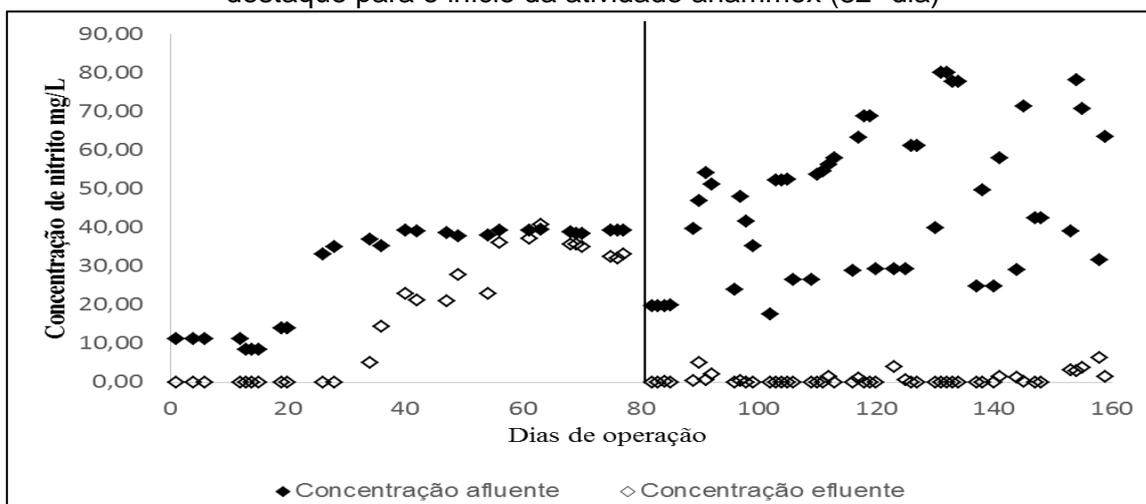
Provavelmente, a presença de condições anaeróbias, disponibilidade de matéria orgânica proveniente do inóculo, nitrito fornecido no meio de cultura, a morte e lise das bactérias aeróbias presentes no lodo e a liberação de nitrogênio orgânico das células mortas que foi rapidamente convertido a íon amônio e liberado no reator, influenciaram este cenário. Esta foi considerada como uma etapa de intensa desnitrificação, devido ao fato da carga de nitrogênio efluente ter sido maior que a carga aplicada. A ocorrência de desnitrificação heterotrófica endógena também foi relatada por diversos autores durante o período de *start-up* de reatores anammox (TOH *et al.* 2002; LOPÉZ *et al.* 2008; DAPENA-MORA *et al.* 2004; ARAÚJO *et al.* 2011; WANG *et al.* 2011; PEREIRA, 2013).



**Figura 5.1** Carga de nitrogênio aplicada (nitrito + íon amônio) afluyente e efluente durante o período de enriquecimento, com destaque para o início da atividade anammox (82º dia)



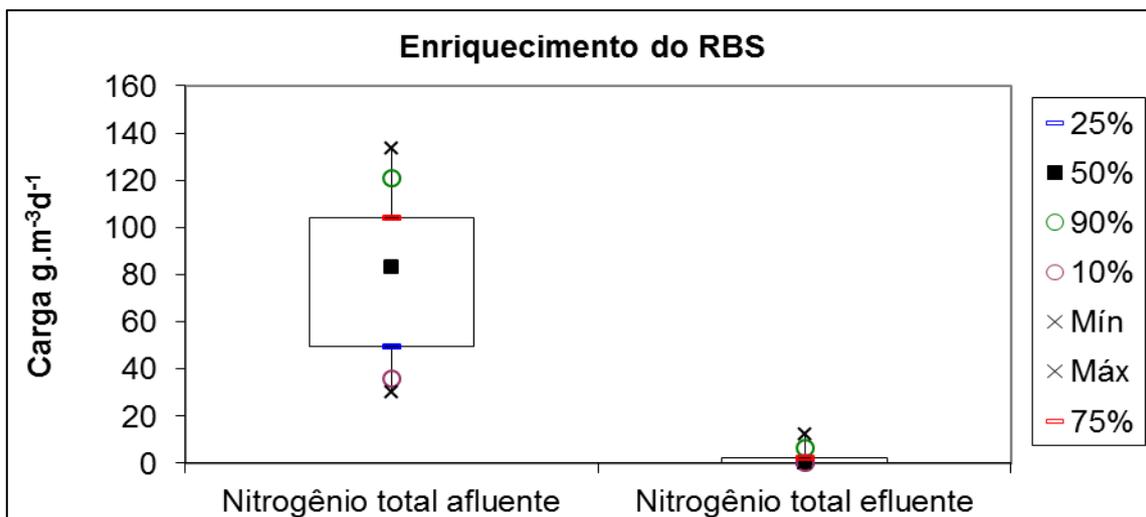
**Figura 5.2** Dinâmica do íon amônio afluyente e efluente durante a etapa de enriquecimento, com destaque para o início da atividade anammox (82º dia)



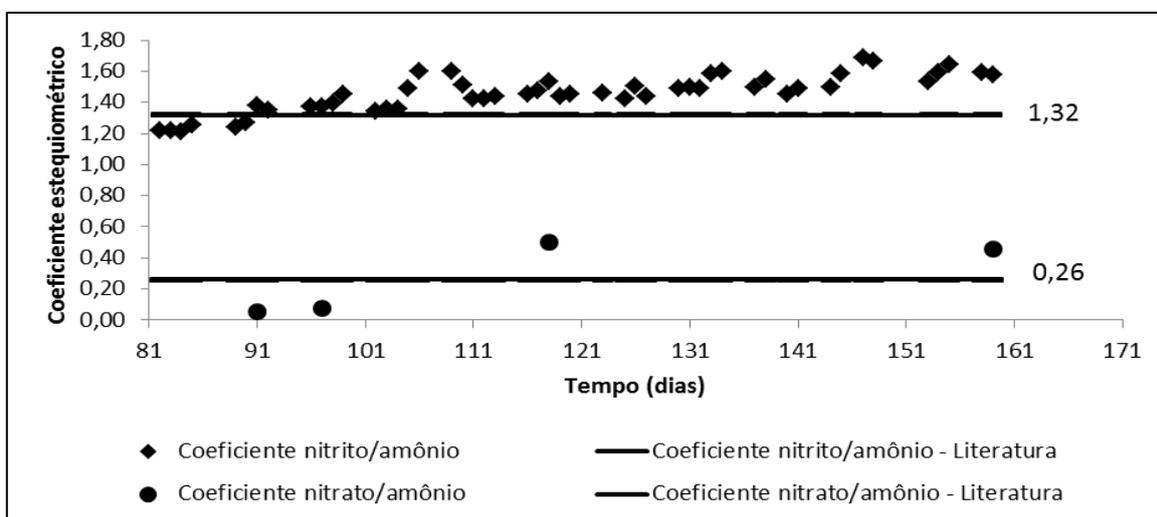
**Figura 5.3** Dinâmica do nitrito afluyente e efluente durante a etapa de enriquecimento, com destaque para o início da atividade anammox (82º dia)

O nitrito passou a ser detectado no efluente apenas a partir do 34º dia de operação, após a etapa de desnitrificação intensa. No 40º dia, a concentração de amônio aplicada se equiparou à concentração efluente no RBS, e esta última foi reduzindo até que não foi mais detectada no 81º dia de operação. Esta condição pode ter ocorrido, pois a matéria orgânica foi se esgotando ao longo do tempo e ocorreu uma redução da atividade desnitrificante. Logo, esta etapa do enriquecimento, entre os dias 26 e 81, foi considerada como redução da atividade desnitrificante, devido à redução da concentração dos compostos orgânicos presentes no meio. Esta redução deve ter favorecido o estabelecimento das bactérias com atividade anammox, uma vez que estes dois grupos (anammox e desnitrificantes) de bactérias podem competir pelo mesmo aceptor de elétrons ( $\text{NO}_2^-$ ) (CHANCHOI *et al.* 2008; GUVEN *et al.* 2005; MOLINUEVO *et al.* 2009; LACKNER *et al.* 2008).

A partir do 82º dia de operação foi detectada a atividade anammox no RBS (que está em destaque nas figuras), corroborando com resultados já descritos na literatura, sendo esta considerada a terceira fase do enriquecimento, marcada pela atividade anammox. A Figura 5.4 retrata a carga volumétrica de nitrogênio afluente (média de  $78,8 \text{ g.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ ) e efluente (média de  $1,9 \text{ g.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ ) ao reator, demonstrando seu consumo intenso. Foi observado que a obtenção de atividade anammox em reatores em batelada sequenciais operados em escala de bancada, onde lodo ativado convencional foi utilizado como inóculo, pode demandar um tempo variável entre 50 e 120 dias (DAPENA-MORA *et al.* 2004; CHAMCHOI & NITSORAVUT, 2007; LÓPEZ *et al.* 2008; CAMPOS, 2011), o que encontra-se dentro do tempo observado nesta pesquisa, a partir de 82 dias. Nesta fase do enriquecimento foi observado o consumo simultâneo de  $\text{N-NO}_2^-$  e  $\text{N-NH}_4^+$  em proporções estequiométricas bem próximas às descritas na literatura para bactérias anammox, que é de 1,32 mol de  $\text{N-NO}_2^-$  consumido por mol de  $\text{N-NH}_4^+$  consumido (STROUS *et al.* 1998), conforme Figura 5.5. Neste período a média do coeficiente estequiométrico encontrada foi de 1,47.



**Figura 5.4** Carga volumétrica de nitrogênio total (nitrito + amônio) afluyente e efluente ao RBS entre os dias 82 e 160, da etapa de enriquecimento



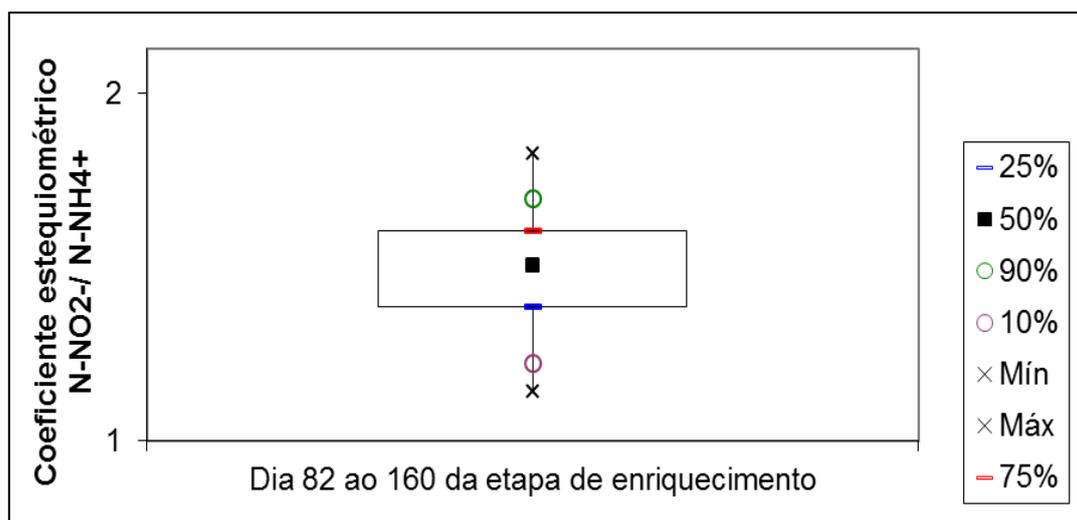
**Figura 5.5** Coeficiente estequiométrico do consumo de nitrito/consumo de amônia e produção de nitrato/consumo de amônio entre os dias 82 e 160 da fase de enriquecimento

A estatística descritiva do coeficiente estequiométrico obtido neste trabalho a partir do 82º dia de operação até o final da etapa de enriquecimento é apresentada na Tabela 5.1 e na Figura 5.6. A média obtida para o coeficiente de consumo de  $N\text{-NO}_2^-$ /consumo de  $N\text{-NH}_4^+$  foi 1,47 e a mediana 1,46, valores próximos, indicando uma distribuição aproximadamente simétrica dos dados. Neste trabalho os valores encontrados foram um pouco maiores que o coeficiente reportado na literatura, que é 1,32. Resultados semelhantes foram obtidos por Chamchoi e Nitorisavut (2007), que encontraram coeficiente igual a 1,5, em média, e também por Quan *et al.* (2008), que obtiveram coeficiente igual a 1,46, em um reator anaeróbico de fluxo ascendente operado sob condições anammox. Estes resultados indicam que além das anammox, outros micro-organismos também

estavam consumindo nitrito, mas sem efeitos inibitórios para oxidação anaeróbica do íon amônio, uma vez que a eficiência de remoção de nitrito neste período atingiu 98,2%. Assim como o coeficiente de consumo nitrito/amônio, o coeficiente de produção de nitrato por consumo de amônio também se mostrou maior que a estequiometria reportada pela literatura (0,26), com média de 0,35.

**Tabela 5.1** Estatística descritiva do coeficiente estequiométrico obtido durante os dias 82 a 160 da etapa de enriquecimento

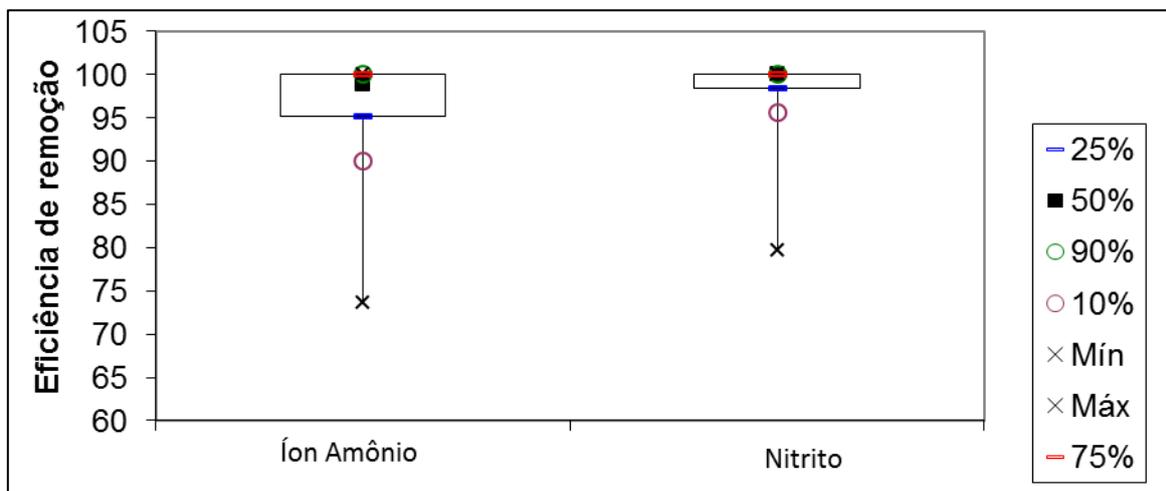
Consumo de nitrito/consumo de íon amônio	
Nº de dados	49
Média	1,47
Desvio padrão	0,12
Coeficiente de variação	0,08
Mediana	1,46
Mínimo	1,21
Máximo	1,69
Percentil 10%	1,27
Percentil 25%	1,38
Percentil 75%	1,53
Percentil 90%	1,60



**Figura 5.6** Box-plot do coeficiente estequiométrico Consumo de  $N-NO_2^-$  / Consumo de  $N-NH_4^+$  obtidos para o RBS durante os dias 82 e 160 da etapa de enriquecimento

Neste período, a concentração média de amônio afluyente foi de  $32,4 \text{ mg.L}^{-1}$ , com 96,5% de eficiência de remoção. Já o nitrito afluyente apresentou média de  $46,7 \text{ mg.L}^{-1}$ , com eficiência de

remoção de 98,2%. As medianas foram 98,9% e 100%, respectivamente, como pode ser observado na Figura 5.7, bem próximas aos valores médios.



**Figura 5.7** Eficiência de remoção do íon amônio e nitrito na fase de enriquecimento, entre os dias 82 e 160 da etapa de enriquecimento

Estes dados comprovaram que o lodo ativado se mostrou um excelente inóculo para cultivar e aumentar a comunidade de bactérias com atividade anammox em reatores em batelada sequenciais operados a 35 °C com pH igual a 7,5 e meio de cultura mineral e autotrófico, aumentando a carga de nitrogênio aplicada gradualmente. Ao final desta fase, a concentração de sólidos totais voláteis (STV) no RBS foi de 4,7 g.L<sup>-1</sup>, indicando uma redução da concentração de sólidos, o que pode estar vinculado a uma seleção dos micro-organismos, comparando com o lodo de inóculo (20,1 g.L<sup>-1</sup> de STV).

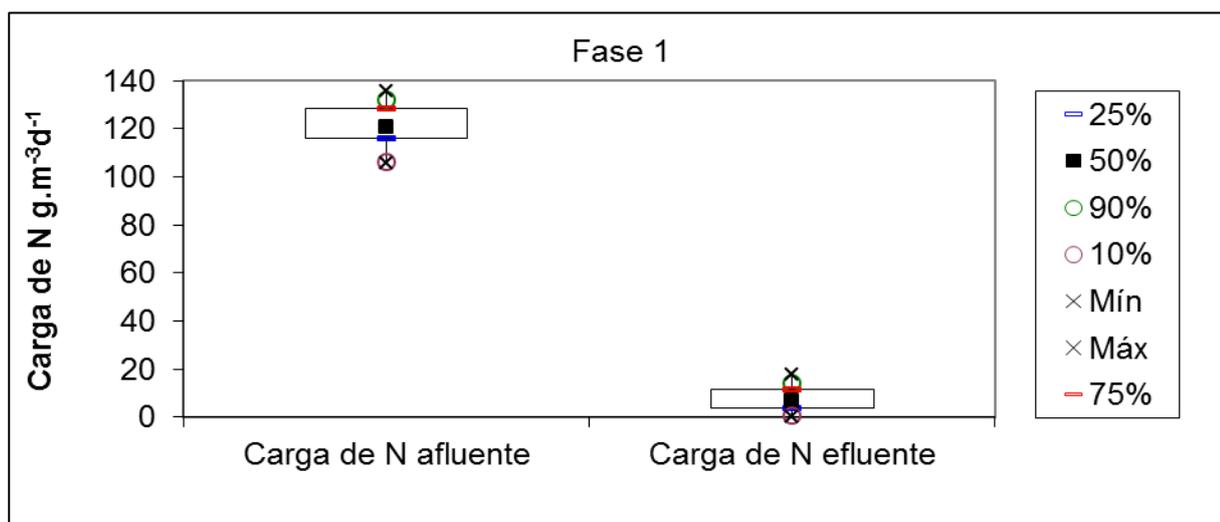
## **5.2 Desempenho do reator anammox quando submetido às temperaturas propostas aplicando efluente anaeróbico proveniente de reator UASB**

A fim de avaliar a influência da temperatura sobre a remoção de amônio em um reator anammox operado no modo batelada sequencial, tratando efluente anaeróbico proveniente de reator UASB, bem como a viabilidade de aplicação do processo anammox em maior escala, considerando variações da temperatura ambiente, esta pesquisa foi dividida em três fases operacionais. A partir da fase de enriquecimento das bactérias anammox, iniciou-se a aplicação de efluente anaeróbico proveniente de reator UASB e adição de nitrito: fase 1 a 35 °C, fase 2 a 25 °C e fase 3 a 20 °C. Durante as fases, a agitação foi mantida a 70 rpm, o TDH de 24 horas com retenção total da

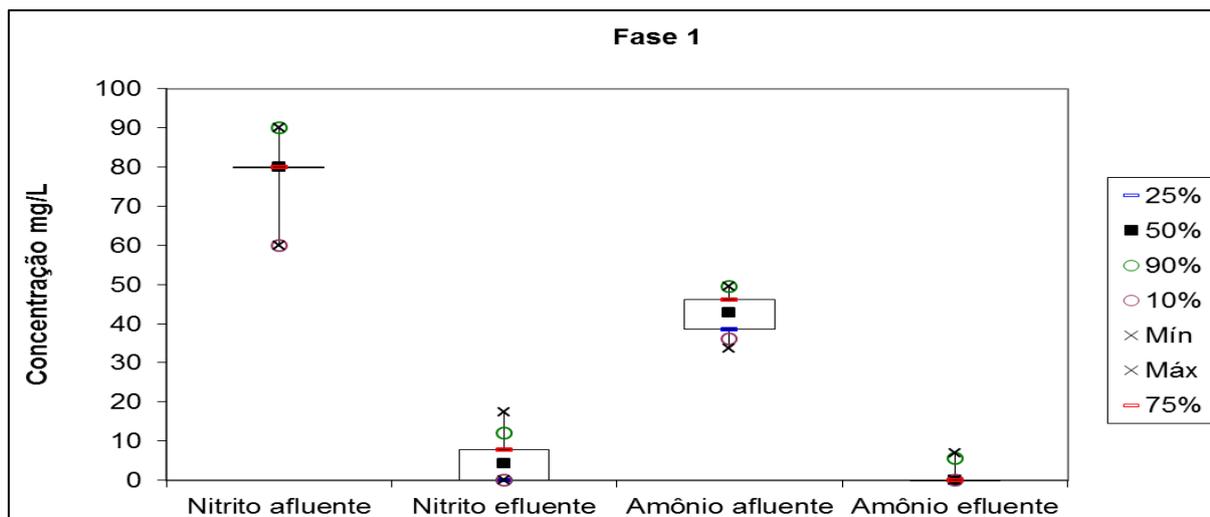
biomassa e o pH em torno de 7,5, corrigido sempre que necessário com a adição de NaOH (0,5 M) ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,5 M).

### 5.2.1 Fase 1 - Operação a 35 °C

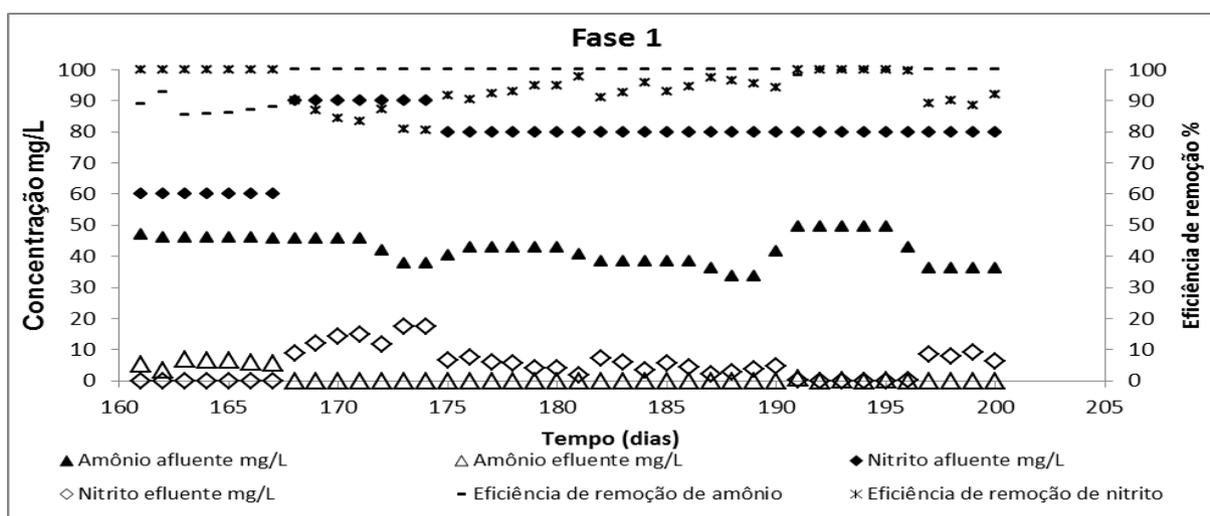
O início da fase 1 foi um período marcado pela transição entre aplicação do efluente sintético, com concentração inicial de 30 mg.L<sup>-1</sup> tanto para o íon amônio quanto para nitrito - aumentada gradualmente até atingir 60 mg.L<sup>-1</sup> de amônio e 80 mg.L<sup>-1</sup> de nitrito, para o efluente anaeróbico real. O primeiro estava livre de matéria orgânica e nitrato, já o segundo apresentou em média 42,3 mg.L<sup>-1</sup> de amônio, concentração de nitrato inferior a 0,5 mg.L<sup>-1</sup>, sem detecção de nitrito, porém continha DQO, que apresentou média de 130,2 mg.L<sup>-1</sup>. Os dados apresentados nas Figuras 5.8, 5.9 e 5.10 referem-se aos valores médios afluente e efluente da carga de nitrogênio total (amônio e nitrito), concentração de nitrito e amônio afluente e efluente ao RBS na fase 1, e a dinâmica dos compostos nitrogenados com suas respectivas eficiências de remoção.



**Figura 5.8** Carga média de nitrogênio total (nitrito + íon amônio) afluente e efluente ao RBS durante a fase 1 (Temperatura= 35 °C)



**Figura 5.9** Box-plot das concentrações de nitrito e amônio afluente e efluente ao RBS durante a fase 1 (Temperatura= 35 °C)



**Figura 5.10** Dinâmica dos compostos nitrogenados e eficiência de remoção observados durante a fase 1 (Temperatura= 35 °C)

Uma vez que a presença de bactérias desnitrificantes poderia comprometer as bactérias com atividade anammox devido à competição pelo acceptor de elétrons, foi fornecido inicialmente 60 mg.L<sup>-1</sup> de nitrito ao RBS, que foi todo consumido e se mostrou insuficiente, uma vez que o íon amônio foi detectado no efluente. Desta forma, a concentração de nitrito afluente foi aumentada para 90 mg.L<sup>-1</sup> no 168º dia de operação, o que permitiu o consumo total de amônio, porém a eficiência de remoção do nitrito atingiu apenas a média de 84,8%, indicativo de excesso do composto no efluente. O acúmulo de nitrito é uma preocupação em reatores anammox, pois o processo mostrou-se mais vulnerável e inibido pelo excesso de nitrito do que pelo íon amônio (STROUS *et al.* 1999b; ISAKA *et al.* 2008; DAPENA-MORA, *et al.* 2007).

A partir do 175º dia até o término desta fase (200º dia), a concentração de nitrito fornecida foi reduzida para 80 mg.L<sup>-1</sup>, aumentando sua eficiência de remoção para 94,8% neste período, ficando com uma eficiência de remoção média geral nesta fase de 93,9%, com concentração afluenta média de 78,2 mg.L<sup>-1</sup>. Vale ressaltar que, se tratando de efluente anaeróbio real que apresentou concentração variável de amônio, a eficiência de remoção de nitrito mostrou-se intimamente vinculada a esta, pois quando o efluente anaeróbio apresentou concentração mais elevada de amônio, o nitrito foi praticamente todo consumido, e quando a concentração de amônio foi menor, a concentração de nitrito detectada no efluente conseqüentemente se mostrou mais alta, o que refletiu em sua eficiência de remoção.

O efluente anaeróbio submetido ao reator anammox apresentou média de 42,3 mg.L<sup>-1</sup> de amônio durante a fase 1. De acordo com Von Sperling (2005), esta concentração é típica de efluentes domésticos, com valores entre 25 e 45 mg.L<sup>-1</sup>. A remoção completa de amônio foi prejudicada nos 7 primeiros dias de operação desta fase devido à falta do aceptor de elétrons (nitrito), apresentando inicialmente eficiência de remoção média de 87,6%, que foi ajustada posteriormente. A partir do oitavo dia da fase 1, quando a concentração de nitrito foi ajustada, a eficiência de remoção de amônio atingiu 99,9%, ficando a média geral em 97,7%. Estes dados revelaram que a biomassa com atividade anammox se adaptou facilmente à transição entre o efluente sintético e efluente anaeróbio contendo DQO à temperatura de 35 °C. A Tabela 5.2 apresenta a estatística descritiva da carga de nitrogênio e concentração de amônio e nitrito afluentes ao RBS na fase 1.

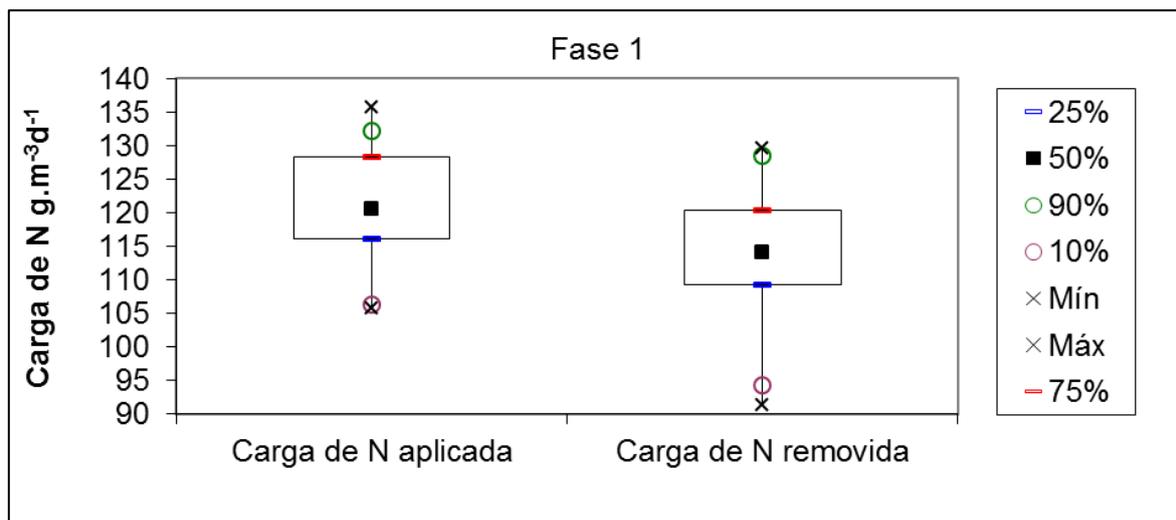
**Tabela 5.2** Estatística descritiva das cargas de nitrogênio aplicadas no RBS durante a fase 1 (Temperatura= 35 °C)

Estatística Descritiva - Medidas de tendência central	Carga de Nitrogênio afluenta (nitrito + amônio) (g.m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )	Concentração de amônio afluenta (mg.L <sup>-1</sup> )	Concentração de nitrito afluenta (mg.L <sup>-1</sup> )
Nº de dados	40	40	40
Média	120,6	42,3	78,2
Desvio padrão	9,1	4,7	9,3
Coeficiente de variação	0,08	0,1	0,1
Mediana	120	42,8	80
Mínimo	105,8	33,3	60
Máximo	135,8	49,2	90
Percentil 10%	106,2	36,1	60
Percentil 25%	116,1	38,5	80
Percentil 75%	128,3	46,2	80
Percentil 90%	132,2	49,6	90

Na Figura 5.11 são apresentados os valores das cargas de nitrogênio total ( $\text{NO}_2^- + \text{NH}_4^+$ ) aplicadas ao RBS e removidas ao longo da fase 1. A carga média de nitrogênio aplicada ao longo desta fase atingiu  $120,6 \text{ gN.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ , sendo o valor máximo de  $135,8 \text{ gN.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ . A carga média de nitrogênio removida foi de  $113,2 \text{ gN.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$  com 93,8% de eficiência de remoção.

Dapena-Mora *et al.* (2004) também utilizaram um RBS a  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  e cultivaram bactérias anammox a partir de lodo de estação de tratamento de águas residuárias municipais. O reator foi capaz de tratar cargas de nitrogênio de até  $1,4 \text{ kg N. m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ , conseguindo uma eficiência de remoção de 82%. Wang *et al.* (2011) também apresentaram resultados relevantes com relação à carga de nitrogênio removida, nesse estudo os autores utilizaram um RBS com atividade anammox, e a carga de nitrogênio removida obtida foi de  $400 \text{ gN.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ . López *et al.* (2008) aplicaram uma carga de nitrogênio afluente igual a  $1,6 \text{ kgN m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ . Nesse estudo, os autores obtiveram 99,7% de eficiência de remoção. Pereira *et al.* (2014) usando o mesmo RBS da presente pesquisa e inóculo proveniente do mesmo sistema do qual este trabalho utilizou, enriqueceram o reator por 335 dias aplicando meio mineral e autotrófico com concentrações crescentes de amônio e nitrito a  $34\text{-}35 \text{ }^\circ\text{C}$ , até atingir  $175 \text{ mg.L}^{-1}$  de amônio e  $150 \text{ mg.L}^{-1}$  de nitrito. Os autores alcançaram eficiência de remoção média de 87,2 e 100% para amônio e nitrito, respectivamente.

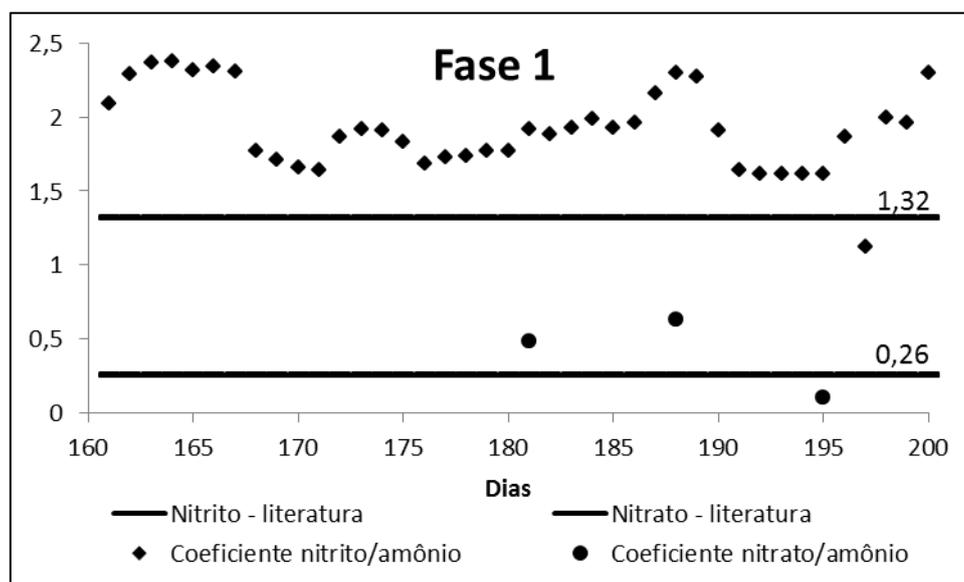
Apesar de Pereira *et al.* (2014) terem utilizado concentração crescente dos substratos e alcançado elevada eficiência de remoção dos mesmos, o período de enriquecimento foi cerca de duas vezes maior que o período de enriquecimento desta pesquisa, que também obteve satisfatórios resultados quanto à eficiência de remoção, reportados no item anterior.



**Figura 5.11** Cargas de nitrogênio ( $\text{N-NO}_2^-$  e  $\text{N-NH}_4^+$ ) aplicadas e removidas do RBS durante a fase 1 (Temperatura=  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ )

A produção de nitrato nesta fase foi monitorada uma vez por semana, com o objetivo de acompanhar a reação anammox e a eficiência do processo sobre os compostos nitrogenados. Na fase 1, o nitrato produzido atingiu média de  $15,5 \text{ mg.L}^{-1}$ . Uma vez que a estequiometria da reação anammox constatada na etapa de enriquecimento mostrou um coeficiente de produção de 0,35 mol de nitrato para cada mol de amônio consumido, e que a média de amônio consumido nesta fase foi de  $41,2 \text{ mg.L}^{-1}$ , a produção de nitrato esperada era de  $14,2 \text{ mg.L}^{-1}$ , que foi próximo ao valor detectado no experimento. Leal *et al.* (2016) encontraram valores menores quando aplicaram efluente doméstico pré-tratado em reator UASB ao processo anammox, com média de produção de nitrato igual a  $9,7 \text{ mg.L}^{-1}$ . De acordo com os autores, este fato pode estar relacionado com o aumento da atividade desnitrificante no reator, que contribui também para a redução do nitrato a nitrogênio gasoso.

As relações estequiométricas obtidas entre os compostos nitrogenados durante a fase 1 são apresentados na Figura 5.12.



**Figura 5.12** Coeficiente estequiométrico do consumo de nitrito/consumo de amônia e produção de nitrato/consumo de amônio durante a fase 1 (Temperatura= 35 °C)

O coeficiente do consumo de nitrito por consumo de amônio (nitrito/amônio) durante a fase 1 alcançou a média de 1,77, mostrando-se mais alto que a estequiometria da reação anammox apresentada na literatura (1,32), Figura 5.12. Vale ressaltar que sendo necessários 1,32 mol de nitrito para cada mol de amônio convertido a  $\text{N}_2$ , e que a concentração média de amônio afluente nessa etapa foi de  $42,3 \text{ mg.L}^{-1}$ , o nitrito requerido pela reação anammox teoricamente seria  $55,8$

mg.L<sup>-1</sup>. Contudo, foi fornecido uma concentração maior devido aos demais grupos de microorganismos que também consomem o nitrito em seu metabolismo (considerando que a concentração de amônio consumida foi de 41,2 mg.L<sup>-1</sup>, o nitrito consumido efetivamente pelas anammox foi de 60,6 mg.L<sup>-1</sup>), de acordo com a estequiometria da reação observada na etapa de enriquecimento. A Tabela 5.3 apresenta a estatística descritiva do coeficiente estequiométrico de consumo de nitrito por consumo de amônio.

**Tabela 5.3** Estatística descritiva do coeficiente de consumo de nitrito por consumo de amônio durante a fase 1 (Temperatura= 35 °C)

Estatística Descritiva - Medidas de tendência central	
Nº de dados	40
Média	1,77
Desvio padrão	0,24
Coeficiente de variação	0,12
Mediana	1,91
Mínimo	1,12
Máximo	2,38
Percentil 10%	1,64
Percentil 25%	1,74
Percentil 75%	2,05
Percentil 90%	2,31

Tang *et al.* (2010) estudaram o efeito da matéria orgânica sobre a remoção de nitrogênio pelo processo anammox e encontraram coeficiente de consumo de nitrito por consumo de amônio de 2,09. Resultados semelhantes foram obtidos por Pereira *et al.* (2014), que aplicaram concentrações crescentes de fenol (até 300 mg.L<sup>-1</sup>) em um reator anammox. Os autores observaram que o fenol afetou negativamente o processo anammox, e alterou o coeficiente estequiométrico da reação de 1,1 para 2,1, promovendo uma diminuição de 57% na eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal e de 15% na eficiência de remoção de nitrito. Leal *et al.* (2016) aplicaram efluente de reator UASB tratando esgoto doméstico, em um RBS anammox durante 3 semanas. Os autores puderam verificar um coeficiente de nitrito/amônio de 1,7, que foi próximo ao valor encontrado nesta pesquisa (1,92).

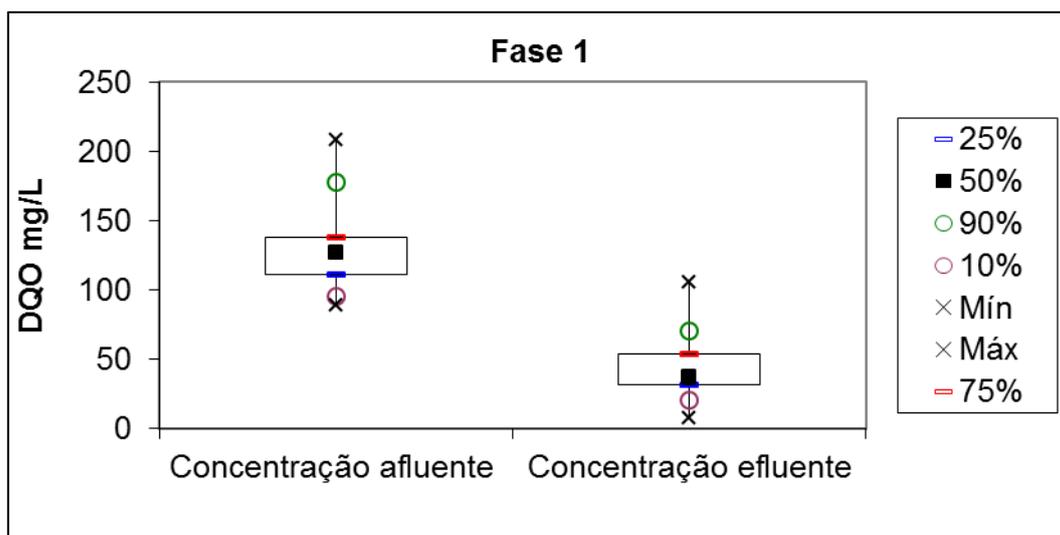
Seguindo a dinâmica do coeficiente de consumo de nitrito por consumo de amônio, o mesmo ocorreu para o coeficiente de produção de nitrato por consumo de amônio (nitrato/amônio), reportado na estequiometria da reação anammox como 0,26. Nesta fase, o coeficiente nitrato/amônio atingiu média de 0,37, o que já era esperado, uma vez que a produção de nitrato

também apresentou-se mais elevada ( $15,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) do que a estequiometria da etapa de enriquecimento propôs ( $14,8 \text{ mg.L}^{-1}$ ), com base na concentração dos compostos nitrogenados encontrados nesta fase. Tang *et al.* (2010) encontraram coeficientes estequiométricos de 0,27 e Leal *et al.* (2016) encontraram 0,2. Já Pereira *et al.* (2014) aplicando concentrações crescentes de fenol em um reator anammox encontraram valores entre 0,33 e 0,39. Investigações mais aprofundadas são necessárias a fim de identificar as reações simultâneas à reação anammox, que podem contribuir para a maior produção de nitrato, para além da estequiometria anammox (0,26).

Coefficientes com valores muito maiores ou menores em relação aos valores estabelecidos na literatura para o processo anammox são indicativos de que outros processos estão ocorrendo. Por exemplo, coeficientes para o consumo de nitrito em relação ao consumo de amônio muito maiores que 1,32 indicam que a desnitrificação pode estar ocorrendo no sistema (TOH e ASHBOLT, 2002). Outro indicativo de que o processo de desnitrificação está ocorrendo é quando coeficientes de produção de nitrato em relação ao consumo de amônio próximos de zero são obtidos (CHAMCHOI e NITISORAVUT, 2007).

Os coeficientes estequiométricos mais elevados encontrados nesta pesquisa foram provavelmente influenciados pela presença da matéria orgânica no efluente anaeróbico real, uma vez que as bactérias desnitrificantes também utilizam nitrito como acceptor de elétrons, aumentando assim, o consumo do mesmo.

Considerando a presença de bactérias desnitrificantes no reator e de matéria orgânica no afluente, o monitoramento da DQO também foi realizado e os resultados são apresentados na Figura 5.13.



**Figura 5.13** Concentração de DQO afluente e efluente ao RBS anammox na fase 1 (Temperatura= 35 °C)

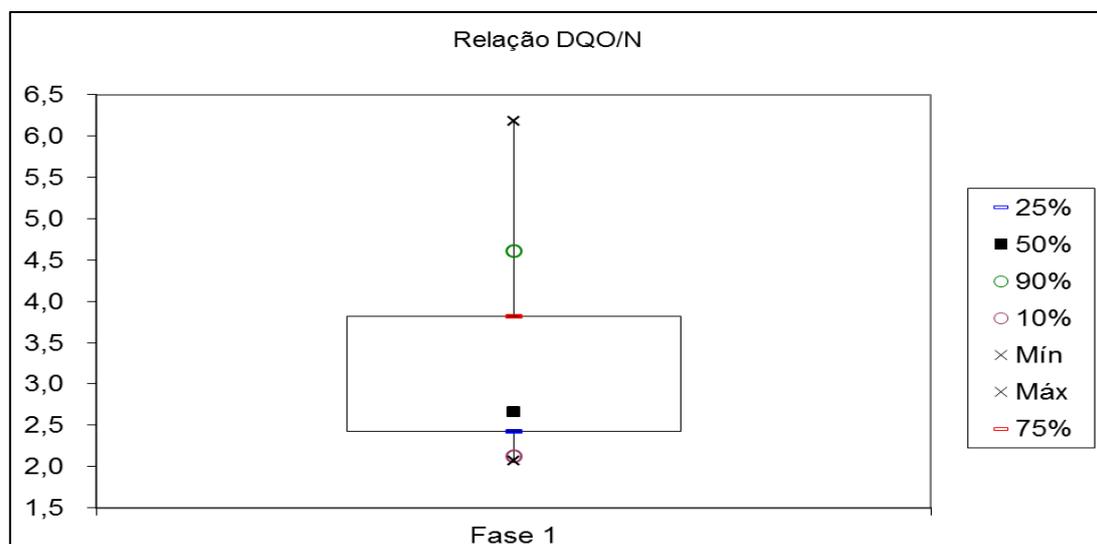
A partir dos dados apresentados, pode-se observar grande variação da DQO afluente, com mínimo e máximo de 88,6 mg.L<sup>-1</sup> e 207,7 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente, e média de 130,2 mg.L<sup>-1</sup>. Já a DQO efluente apresentou média de 43,9 mg.L<sup>-1</sup>, com mínimo e máximo de 7,3 mg.L<sup>-1</sup> e 105,7 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente, e eficiência de remoção média de 61,8%.

Apesar da variação da DQO aplicada ao reator (pois tratava-se de efluente anaeróbico real), a eficiência de remoção de amônio não foi prejudicada. Tang *et al.* (2010) investigaram a supressão do processo anammox quando aplicado ao tratamento de efluente com alta concentração de DQO (50 mg.L<sup>-1</sup> a 700 mg.L<sup>-1</sup> de DQO) a 35 °C e verificaram que as bactérias anammox foram suprimidas pelas bactérias desnitrificantes devido à competição pelo acceptor de elétrons. No entanto, nesta mesma temperatura, o presente trabalho não constatou prejuízos na atividade anammox devido à presença de bactérias heterotróficas, indicando que ambas puderam coexistir. O mesmo foi concluído por Molinuevo *et al.* (2009), Oshiki *et al.* (2011), Kartal *et al.* (2012) e Leal *et al.* (2016), que ainda complementaram que a biomassa desenvolvida no reator foi capaz de remover nitrogênio e DQO simultaneamente.

Considerando que a concentração média efluente de amônio nesta fase foi de 1,1 mg.L<sup>-1</sup>, e que seu consumo médio foi de 41,2 mg.L<sup>-1</sup>, pode-se dizer que efetivamente 60,6 mg.L<sup>-1</sup> de nitrito foram consumidos pela atividade anammox, com base na estequiometria da reação calculada na etapa de enriquecimento (1,47 mol de nitrito por cada mol de amônio consumido). Observado o consumo total de nitrito nesta fase (73,1 mg.L<sup>-1</sup>), e o consumo médio de DQO de 86,4 mg.L<sup>-1</sup>, pode-se observar uma taxa de consumo de 0,14 mgNO<sub>2</sub><sup>-</sup> por mgDQO consumida no reator, levando em

consideração a utilização do nitrito apenas pela atividade desnitrificante ( $12,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Zilz *et al.* (2014) reportaram que a desnitrificação via nitrito utilizando a matéria orgânica como doador de elétrons, consome  $0,33 \text{ mol}$  desse substrato. Logo, a taxa de consumo de nitrito na desnitrificação ocorrida no reator na fase 1 foi menor que o valor reportado por Zilz *et al.* (2014), o que pode ser justificado pela utilização de outro aceptor de elétrons pelas bactérias desnitrificantes, que também são capazes de realizar a desnitrificação via nitrato.

A relação média de DQO/N obtida nesta fase foi de 3,2, como pode ser observado na Figura 5.14. O processo anammox é frequentemente aplicado ao pós-tratamento de águas residuárias com alta concentração de amônio e baixa concentração de matéria orgânica, em que a proporção DQO/N é inferior a  $0,5 \text{ gDQO.gN}^{-1}$  (VAN DER STAR *et al.* 2007; WETT, 2007; JOSS *et al.* 2009; JENNI *et al.* 2014). Dados da literatura reportam que relação DQO/N maiores que 1,8 (BI *et al.* 2015), 3 (TANG *et al.* 2010) e 4 (NI *et al.* 2012) já provocam redução na atividade anammox. Com o valor de DQO/N aplicado neste trabalho (de 2,5 a 4,0- FIGURA 5.14) não foi possível observar redução da atividade anammox, tampouco efeito inibitório.



**Figura 5.14** Relação DQO/N média observada na fase 1 (Temperatura= 35 °C)

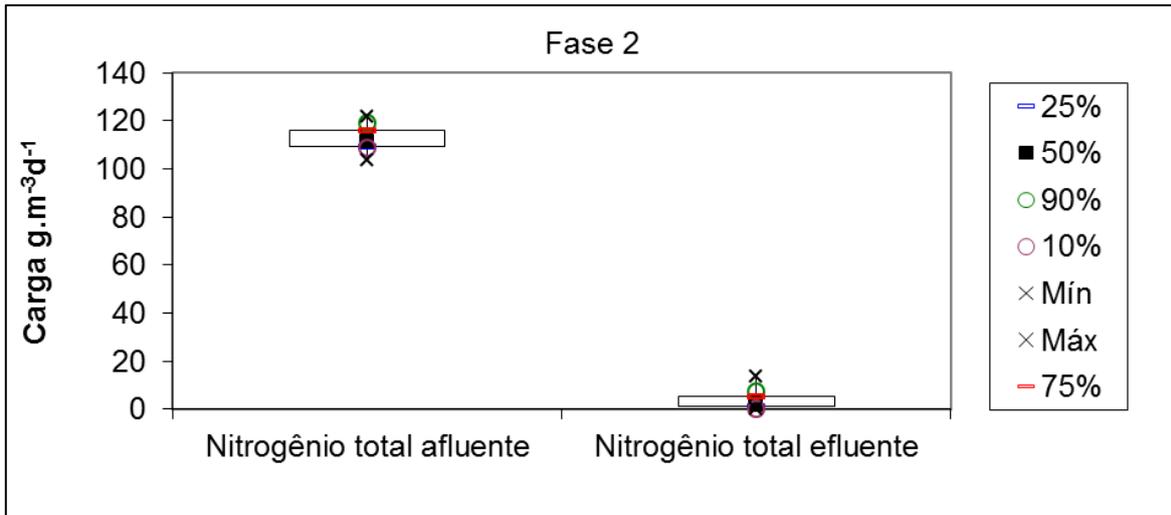
A partir dos resultados obtidos nesta fase a 35 °C, pode-se observar excelente desempenho do reator anammox em questão, no que se refere à remoção dos compostos nitrogenados, estabilidade e eficiência independente da concentração de DQO aplicada nesta pesquisa. Outro aspecto importante refere-se à resistência das bactérias com atividade anammox quando submetidas ao efluente anaeróbio real, que mesmo sem prévia aclimação, puderam coexistir e realizar seu metabolismo

passando de um meio de cultura mineral e autotrófico, para efluente anaeróbio que apresentou características distintas. A concentração de STV verificada ao final desta fase foi de  $7,6 \text{ g.L}^{-1}$ , indicando que as condições operacionais mantidas foram favoráveis ao crescimento da biomassa no interior do RBS, uma vez que se mostrou maior do que no período de enriquecimento. O aumento de STV pode ser explicado pela aplicação do efluente anaeróbio, que também possui sólidos, diferentemente do meio de cultura utilizado no enriquecimento.

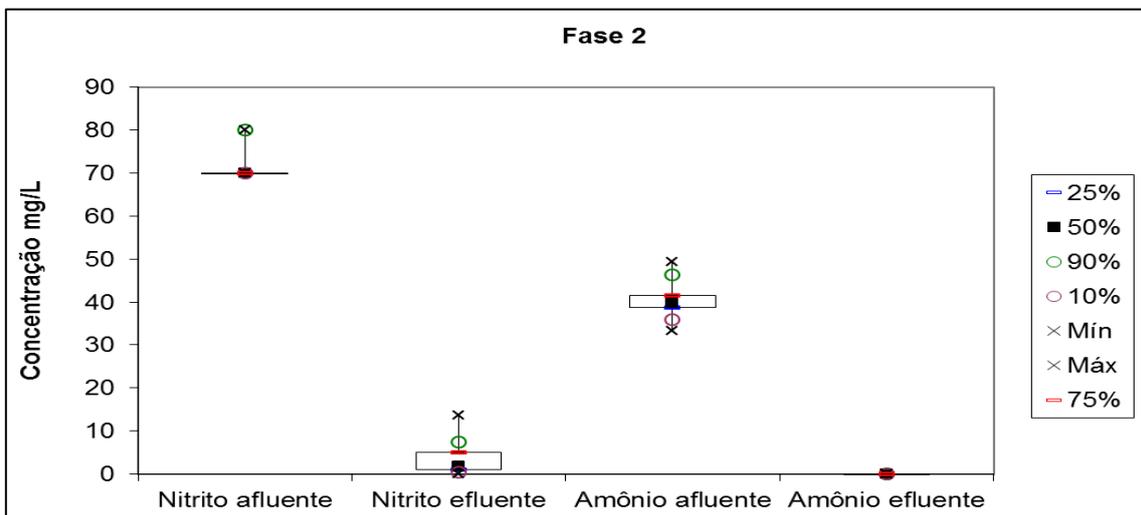
### 5.2.2 Fase 2 – Operação a 25 °C

Considerando que: i) a cidade de Belo Horizonte - MG apresentou no ano de 2015 uma temperatura média anual de  $22,9 \text{ °C}$ , com mínimo de  $19,5 \text{ °C}$  em junho e máximo de  $25,5 \text{ °C}$  em janeiro, respectivamente (BRASIL, 2016); ii) o efluente anaeróbio utilizado neste experimento apresentou temperatura média de  $25 \text{ °C}$ ; iii) manter reatores de maior escala na temperatura ideal para o processo anammox não seria rentável em estações de tratamento de efluentes (DAVEREY *et al.* 2015); e iv) de acordo com Mota e Von Sperling (2009) temperatura de aproximadamente  $23 \text{ °C}$  ou maiores podem ocorrer em efluentes domésticos em grande parte da região tropical, esta fase se propôs a verificar o comportamento do processo anammox dentro da faixa de ocorrência da temperatura local, uma vez que é essencial descobrir a melhor maneira de lidar com esse problema para a aplicação mais ampla da tecnologia anammox.

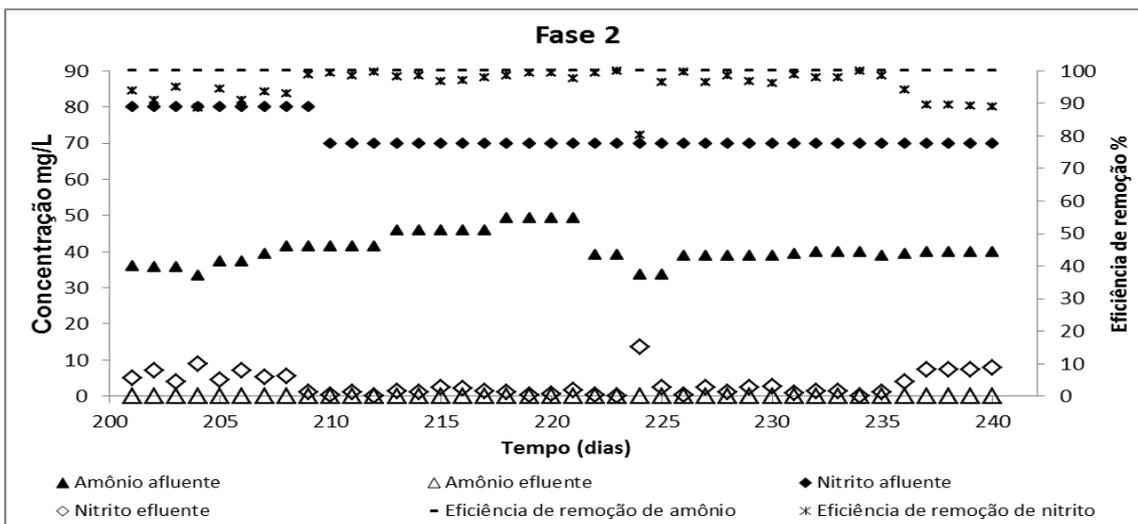
A concentração de nitrito aplicada ao RBS nesta fase sofreu alteração no decorrer dos dias monitorados. Do 201º ao 218º dia foi mantida a concentração da fase 1 ( $80 \text{ mg.L}^{-1}$ ), mas pode-se observar que a concentração efluente deste composto apresentava em média  $5,4 \text{ mg.L}^{-1}$  (93,3% de eficiência de remoção), e a intenção era fornecer apenas a quantidade necessária de nitrito para as reações que estavam ocorrendo no RBS, logo os resultados demonstravam excesso do mesmo, dados apresentados nas Figuras 5.15, 5.16 e 5.17. Apesar de não ter sido observado efeito inibitório pelo nitrito monitorado durante a fase 1 e também na fase 2, optou-se por reduzir a concentração aplicada na fase 2 de  $80 \text{ mg.L}^{-1}$  para  $70 \text{ mg.L}^{-1}$  a partir do 210º dia, mantida até o final desta fase.



**Figura 5.15** Carga média de nitrogênio total (nitrito + íon amônio) afluente e efluente ao RBS durante a fase 2



**Figura 5.16** Concentração média de nitrito e amônio afluente e efluente ao RBS durante a fase 2



**Figura 5.17** Dinâmica dos compostos nitrogenados e eficiência de remoção durante a fase 2

Com a redução da concentração aplicada, a eficiência de remoção de nitrito aumentou para 95,7% (concentração média efluente igual a  $3,1 \text{ mg.L}^{-1}$ ), superior à eficiência atingida na fase 1 (93,9%), podendo observar que a mediana da carga efluente de nitrogênio total (amônio + nitrito) e a mediana da concentração de nitrito foram iguais. Logo, todo o nitrogênio total efluente foi tipicamente representado pelo nitrito efluente, uma vez que a eficiência de remoção de amônio nessa fase atingiu 100%. A Tabela 5.4 apresenta a estatística descritiva referente à carga de N aplicada, bem como a concentração afluente de amônio e nitrito ao RBS nesta fase.

A concentração de amônio aplicada ao reator nesta fase apresentou média de  $40,6 \text{ mg.L}^{-1}$  com 100% de eficiência na remoção. Apesar da concentração média afluente na fase 2 ter sido ligeiramente inferior à concentração afluente na fase 1 ( $42,3 \text{ mg.L}^{-1}$ ), a eficiência de remoção da fase 2 permaneceu em 100% durante todo o período, independente das alterações da concentração afluente de nitrito, que foi reduzida no 210º dia de operação. Vale ressaltar que mesmo no primeiro dia de operação desta fase, que também não teve período de aclimação para o decaimento de  $10 \text{ }^\circ\text{C}$ , o RBS manteve a eficiência de remoção já constatada na fase 1. Na Figura 5.17, onde a dinâmica dos compostos nitrogenados está expressa, foram apresentados os 40 dias de operação com as condições estabelecidas devidamente controladas para esta fase, porém ao todo, esta fase durou 63 dias. Optou-se por retirar os dias que apresentaram variação na temperatura, uma vez que ela é o objeto de pesquisa e comparação, mesmo a eficiência de remoção de amônio nos dias descartados ter atingido 100%.

**Tabela 5.4** Estatística descritiva da carga de nitrogênio aplicada e concentração de amônio e nitrito afluentes ao RBS durante a fase 2 (Temperatura= 25 °C)

Estatística Descritiva - Medidas de tendência central	Carga de Nitrogênio afluente (nitrito + íon amônio) ( $\text{g.m}^{-3}\text{d}^{-1}$ )	Concentração de amônio afluente ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	Concentração de nitrito afluente ( $\text{mg.L}^{-1}$ )
Nº de dados	40	40	40
Média	112,6	40,6	72,2
Desvio padrão	4,5	4,3	4,2
Coefficiente de variação	0,04	0,1	0,06
Mediana	111,6	39,8	70
Mínimo	103,8	33,4	70
Máximo	121,6	49,2	80
Percentil 10%	108,8	35,9	70
Percentil 25%	109,3	38,8	70
Percentil 75%	115,9	41,6	70
Percentil 90%	119,2	46,3	80

Yang *et al.* (2011) investigaram a viabilidade da aplicação do processo anammox à temperatura ambiente com alta taxa de aplicação de N, em um reator em coluna com separador sólido-gás de fluxo ascendente, tratando efluente sintético inorgânico. A carga de nitrogênio aplicada foi mantida acima de  $15 \text{ kgN.m}^{-3}\text{.d}^{-1}$  e a eficiência de remoção de nitrogênio acima de 78%. Os autores verificaram que a  $33\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 24 dias, carga de nitrogênio aplicada igual a  $19,2 \text{ kgN.m}^{-3}\text{.d}^{-1}$ , a taxa de remoção de nitrogênio atingiu  $16,3 \text{ kgN.m}^{-3}\text{.d}^{-1}$  (84,9% de eficiência de remoção). Com  $23\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  por 53 dias, a carga de N aplicada foi  $20,5 \text{ kgN.m}^{-3}\text{.d}^{-1}$ , alcançando a taxa de remoção de  $17,5 \text{ kgN.m}^{-3}\text{.d}^{-1}$  e eficiência de remoção de 85,3%. Nesta pesquisa os autores observaram que o desempenho do processo anammox em diferentes temperaturas não alterou a taxa de remoção de nitrogênio, sugerindo uma adaptação gradual das bactérias com atividade anammox para as diferentes condições operacionais. Além disso, o desempenho do processo foi ligeiramente mais eficiente à menor temperatura investigada. Isto mostrou que reatores anammox podem operar estavelmente em temperaturas ambientes típicas de países de clima tropical, o que corrobora com os dados encontrados na presente pesquisa.

Em seu trabalho, Kouba *et al.* (2016) aplicaram efluente municipal diluído em um reator de biofilme e leito móvel, escala de bancada e fluxo contínuo, a  $22 \text{ }^\circ\text{C}$ , com amônio afluente igual a  $50 \text{ mg.L}^{-1}$ , no processo de nitrificação parcial e anammox. A fim de avaliar o efeito da temperatura sobre a atividade anammox, os autores conduziram testes em batelada a partir da biomassa do reator, variando a temperatura de  $35$  a  $12,5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Os autores demonstraram a viabilidade de aplicar o

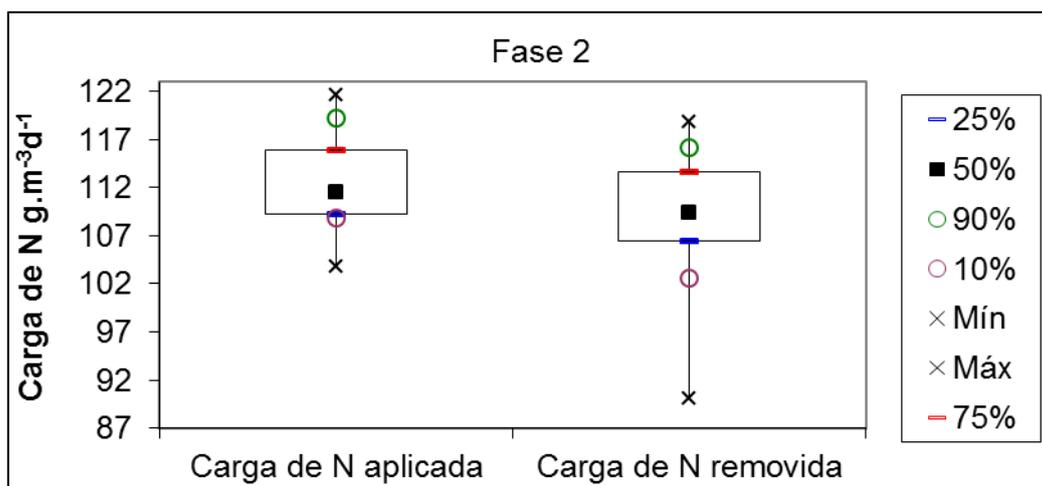
processo de nitrificação parcial e anammox em temperaturas entre 12 e 25 °C, mediante pré-tratamento anaeróbio de efluentes municipais, com possibilidade à temperatura média de 22 °C.

Ma *et al.* (2013) investigando o pós-tratamento de efluente de baixa carga de uma estação de tratamento de efluentes, aplicando efluente do clarificador secundário em reator UASB com atividade anammox, alcançaram taxa de remoção de nitrogênio de 5,72 kgN.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup> a 30 °C por 76 dias, obtendo 94,35% e 92,81% de eficiência de remoção de nitrito e amônio, respectivamente. Os autores reduziram a temperatura de operação do reator com um dia e detectaram que a 25 °C, a remoção de amônio se mostrou instável, alcançando apenas 79±17%.

No presente estudo, a redução da eficiência de remoção tanto de nitrito quanto de amônio não foram observadas a 25 °C, pelo contrário, elas se mostraram maiores que aquelas verificadas na fase 1 (35 °C), assim como observado por Sanchez *et al.* (2014) e Yang *et al.* (2011), contrapondo os resultados de Ma *et al.* (2013).

Daverey *et al.* (2015) estudando os efeitos individuais e interativos da temperatura e pH sobre a atividade de bactérias anammox, obtiveram a equação do modelo por meio de 13 testes em triplicata, e a validação do mesmo se deu com testes nas temperaturas de 25, 20 e 15 °C e pH variável, aplicando efluente preparado a partir de água deionizada rico em nitrito e amônio. Foram realizados 2 testes a 15 °C (pH= 7,5 e 6,5), 2 testes a 20 °C (pH= 8 e 6,5) e 3 testes a 25 °C (pH= 6,5, 8 e 9). Os valores obtidos para a atividade anammox específica dos testes foram bem próximos ao previsto, permitindo a validação do modelo, e a maior atividade foi detectada a 25 °C em pH=8. Analisando estatisticamente os testes, os autores encontraram efeitos interativos entre pH e temperatura sobre a atividade anammox específica, e que esta última aumentou com a elevação da temperatura. Os resultados também indicaram que os efeitos negativos de baixas temperaturas podem ser superados pela manutenção do pH em valores mais altos, por exemplo, a 15 °C não foi detectada atividade anammox com pH=6,5, porém quando este foi ajustado para 7,5 houve atividade de 0,0025 gN<sub>2</sub>.g<sup>-1</sup>SSVd<sup>-1</sup>. Vale ressaltar que o presente trabalho manteve o pH do reator invariavelmente a 7,5, independente da alteração na temperatura.

A Figura 5.18 mostra a carga de N aplicada nesta fase, bem como a carga removida, comprovando que a redução de 10 °C na temperatura de operação não desestabilizou a reação, ressaltando que a carga não removida foi proveniente do nitrato produzido e do nitrito excedente, uma vez que o amônio foi todo convertido.



**Figura 5.18** Carga de nitrogênio (amônio + nitrito) aplicada e removida do RBS anamox durante a fase 2 (Temperatura= 25 °C)

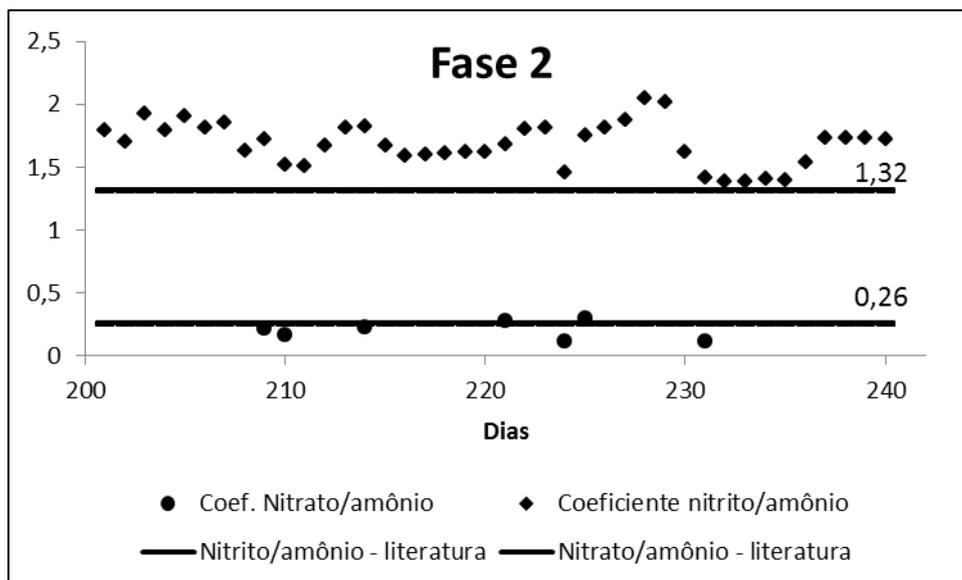
A produção de nitrato durante esta fase foi sensivelmente maior quando comparada à fase 1 (17,9 mg.L<sup>-1</sup> e 15,5 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente). Uma vez que a concentração de amônio afluente foi de 40,6 mg.L<sup>-1</sup> e a estequiometria da reação anamox na etapa de enriquecimento previu a produção de 0,35 mol de nitrato para cada mol de amônio consumido, esperava-se uma produção de 14,2 mg.L<sup>-1</sup> de nitrato, desconsiderando a atividade desnitrificante. Logo, não pode-se constatar que houve consumo do nitrato pelas bactérias desnitrificantes, dado que a concentração afluente manteve-se menor que 0,5 mg.L<sup>-1</sup>. De acordo com NI *et al.* (2012), bactérias desnitrificantes contribuem para a remoção de nitrito e nitrato quando matéria orgânica está disponível, conduzindo à menor concentração de nitrato no efluente, uma vez que há a sua produção na reação anammox. Porém, no presente estudo, não foi possível constatar este fato, devendo ser mais investigado, uma vez que houve redução da DQO. De fato, a concentração média de DQO submetida ao RBS na fase 2 foi menor que na fase 1 (100,1 mg.L<sup>-1</sup> e 130,2 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente), o que pode ter contribuído para a maior eficiência de remoção de DQO na fase 2 em relação à fase 1 (75,7% e 61,8%, respectivamente). Os resultados deste cenário a 25 °C se mostraram melhores, ressaltando maior eficiência de remoção de nitrito, amônio e nitrato, comparados à fase 1.

O coeficiente estequiométrico de consumo de nitrito por consumo de amônio observado na fase 2 foi menor comparado à fase 1, sendo valores médios iguais a 1,7 e 1,77, respectivamente, ou seja, o nitrito foi mais consumido na fase 1 do que na fase 2, por mol de amônio consumido. Um valor menor do que observado na fase 1 já era esperado devido à concentração média de amônio da fase 2 ter se apresentado ligeiramente menor. A Figura 5.19 e a Tabela 5.5 retratam os dados citados e a estatística descritiva dos mesmos na fase 2. Nesta fase, de acordo com a estequiometria da reação

anammox – etapa de enriquecimento, era esperado o consumo médio de  $59,7 \text{ mg.L}^{-1}$  de nitrito pelas bactérias com atividade anammox. Na maior parte do tempo foram adicionados  $70 \text{ mg.L}^{-1}$  de nitrito ao RBS e a concentração média efluente foi de  $3,14 \text{ mg.L}^{-1}$ , podendo inferir o consumo deste composto por outros grupos de micro-organismos, como as bactérias desnitrificantes, uma vez que havia matéria orgânica no afluente.

Uma menor concentração de DQO na fase 2 e a redução de  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  na temperatura anteriormente mantida, pode ter favorecido as bactérias com atividade anammox em relação às desnitrificantes, uma vez que o nitrito requerido mostrou-se inferior nesta fase, comparado à fase 1 (influenciando em um menor coeficiente de consumo de nitrito por consumo de amônio), porém esta possível redução da atividade desnitrificante não foi capaz de afetar o consumo de DQO mesmas.

Assim como a concentração de nitrato produzida foi maior na fase 2 comparada à fase 1 e maior que o esperado pelos cálculos estequiométricos, o coeficiente de produção de nitrato por consumo de amônio também foi maior, apresentando valor médio de 0,44, como pode-se verificar na Figura 5.19. Estes resultados, que indicaram da concentração de nitrato, necessitam de maior investigação, uma vez que houve consumo de DQO pela atividade desnitrificante.



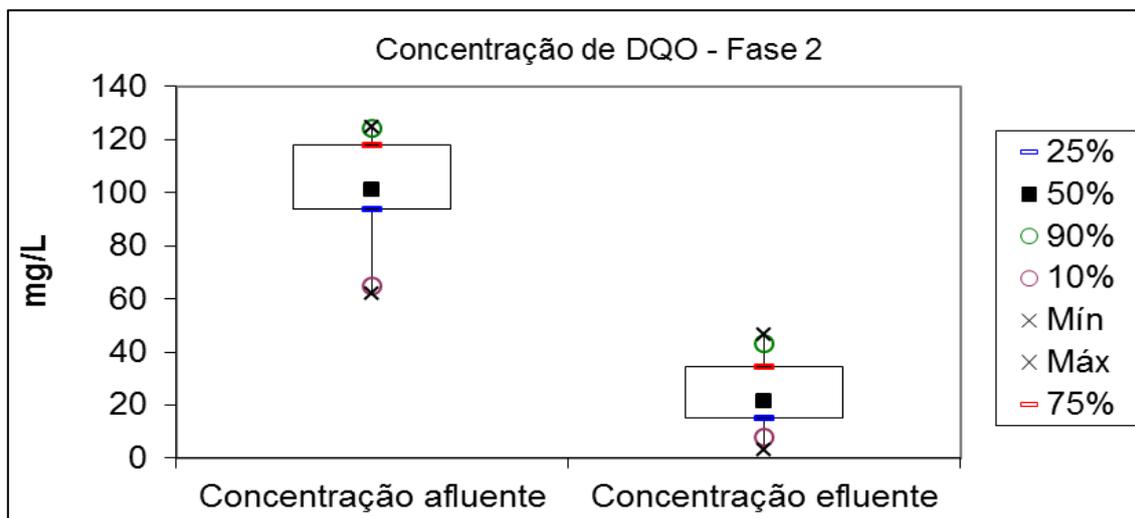
**Figura 5.19** Coeficiente estequiométrico de consumo de nitrito por consumo de amônio e produção de nitrato por consumo de amônio observados na fase 2 (Temperatura= 25 °C)

**Tabela 5.5** Coeficiente estequiométrico de consumo de nitrito por consumo de amônio observado na fase 2

Estatística Descritiva - Medidas de tendência central	
Nº de dados	40
Média	1,70
Desvio padrão	0,17
Coeficiente de variação	0,10
Mediana	1,71
Mínimo	1,38
Máximo	2,05
Percentil 10%	1,42
Percentil 25%	1,60
Percentil 75%	1,81
Percentil 90%	1,88

As análises de consumo de DQO foram realizadas ao longo da fase 2 e os resultados são apresentados na Figura 5.20. Observa-se que os resultados variaram em função do efluente anaeróbico coletado do reator UASB para aplicação no RBS. O valor médio obtido para a DQO afluente foi de 100,1 mg.L<sup>-1</sup>, com mínimo de 61,9 mg.L<sup>-1</sup> e máximo de 124,7 mg.L<sup>-1</sup>. Ao longo desta fase, verificou-se remoção da DQO aplicada (eficiência de remoção média de 75,7%), com concentração média efluente de 23,9 mg.L<sup>-1</sup>, mínimo de 3,17 mg.L<sup>-1</sup> e máximo de 105,7 mg.L<sup>-1</sup>. Eficiência de remoção de DQO semelhante foi obtida por Leal *et al.* (2016), que aplicaram efluente

de reator UASB tratando esgoto doméstico em um RBS com atividade anammox e alcançaram 74% de remoção.



**Figura 5.20** Concentração de DQO afluente e efluente ao RBS anammox na fase 2 (Temperatura= 25 °C)

As análises mostraram que a concentração de DQO submetida ao RBS nesta fase foi menor do que a concentração aplicada na fase 1, variações ocorridas em função das características do efluente real. Portanto, pode-se afirmar que simultaneamente ao processo anammox estava ocorrendo desnitrificação heterotrófica no reator uma vez que grande parte da DQO presente no efluente anaeróbio estava sendo consumida, e essa remoção de DQO explica o consumo de nitrito para além de 59,7 mg.L<sup>-1</sup>.

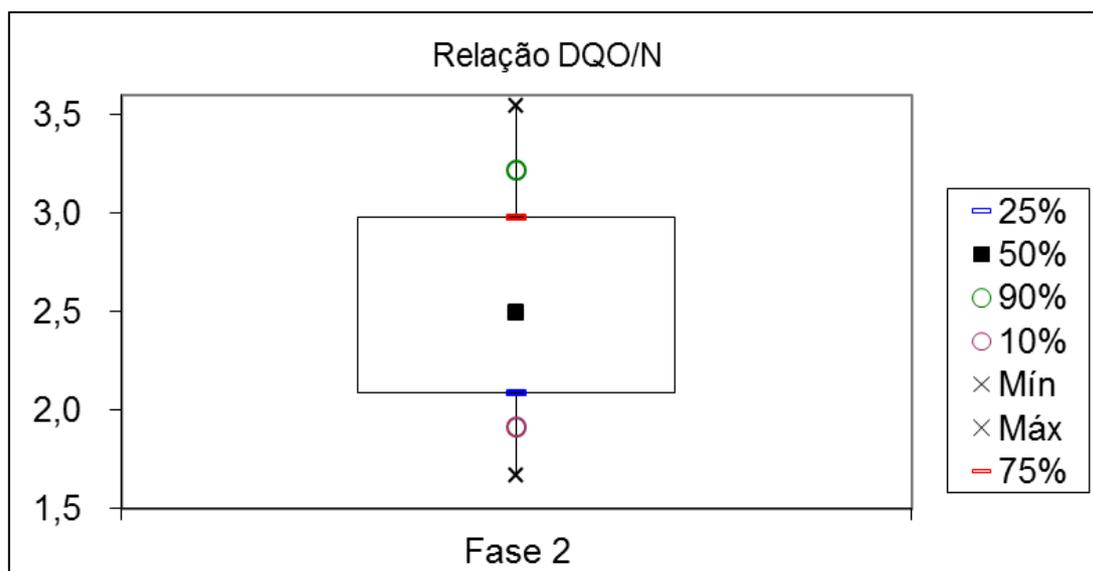
Considerando a concentração média afluente de amônio de 40,6 mg.L<sup>-1</sup> e 100% de eficiência de remoção, foram necessários portanto 59,7 mg.L<sup>-1</sup> de nitrito exclusivamente para o metabolismo das bactérias com atividade anammox. Visto que a concentração média de nitrito consumida foi de 69,1 mg.L<sup>-1</sup> (9,4 mg.L<sup>-1</sup> consumida por outros micro-organismos) e que a concentração média de DQO consumida atingiu 76,2 mg.L<sup>-1</sup>, a taxa de consumo de nitrito por grama de DQO consumida foi de 0,12 mgNO<sub>2</sub><sup>-</sup> por mgDQO, valor bem próximo ao encontrado na fase 1 a 35 °C, que foi de 0,14 mgNO<sub>2</sub><sup>-</sup> por mgDQO. Este resultado considerou apenas o consumo de nitrito pelas bactérias desnitrificantes, mas percebeu-se que a redução de 10 °C na temperatura de operação não alterou essa taxa de consumo. Estudos mais aprofundados nesta área devem ser conduzidos a fim de investigar as rotas de consumo de nitrito, uma vez que neste trabalho a taxa de consumo a 35 e 25

°C foram semelhantes, mas o coeficiente de consumo de nitrito por consumo de amônio apresentaram variações, sendo 1,77 a 35 °C e 1,7 a 25 °C.

De acordo com Guven *et al.* (2005), Chancoi *et al.* 2008, Lackner *et al.* 2008, Molinuevo *et al.* 2009 e Tang *et al.* 2010, as bactérias heterotróficas são capazes de crescer mais rapidamente em relação às autotróficas, e acabam por eliminar as bactérias anammox na competição, inibindo dessa maneira, sua atividade, sendo esses impactos mais expressivos com DQO > 300 mg.L<sup>-1</sup> e relação DQO/N > 2. Os resultados encontrados nesta fase da pesquisa em parte contrapõem a conclusão dos autores citados, pois foi possível verificar elevada eficiência na remoção de amônio, nitrito e DQO a 25 °C (100%, 95,7% e 75,7%, respectivamente), porém a DQO média afluente ao RBS foi bem inferior (100,1 mg.L<sup>-1</sup>), e a relação DQO/N apresentou valor médio de 2,5, ligeiramente superior ao limite máximo sugerido pelos autores supracitados.

Veys *et al.* (2010) aplicaram uma extensão do modelo de lodos ativados para o estudo do processo anammox em temperaturas entre 15 e 40 °C. A partir da análise baseada em modelos, os autores concluíram que desde que haja condições ideais para o desenvolvimento do processo anammox, uma remoção simultânea de DQO e N pode ser alcançada pela cooperação entre as bactérias oxidadoras de amônio, bactérias anammox e bactérias heterotróficas, e os valores de DQO devem ser baixos. De acordo com Ali e Okabe (2015), a presença de matéria orgânica em baixas concentrações não afeta a atividade anammox significativamente, mas melhora a remoção de nitrogênio total via desnitrificação heterotrófica. Uma vez que condições anaeróbias foram mantidas no RBS, foi possível observar cooperação entre as bactérias com atividade anammox e bactérias desnitrificantes, como citado por Ali e Okabe (2015), o que também foi relatado por Leal *et al.* (2016).

A relação entre a concentração de DQO e a concentração de nitrogênio na forma de amônio aplicada ao RBS foi avaliada e os resultados são apresentados na Figura 5.21.



**Figura 5.21** Relação DQO/N média observada na fase 2 (Temperatura= 25 °C)

Nesta fase, a relação DQO/N apresentou a média de 2,5, com mínimo de 1,7 e máximo de 3,5, e mostrou-se menor do que a média verificada na fase 1 (3,2). De acordo com Ali e Okabe (2015), a relação DQO/N observada em reatores anammox encontra-se entre 0,2 até 3,8, uma vez que efluentes que contém amônio não são livres de matéria orgânica. Ni *et al.* (2012) reportaram um limite de DQO/N igual 3,1 para a inibição do processo anammox, definido quando a remoção de amônio caiu para 80%.

O valor encontrado nessa pesquisa vai ao encontro dos dados reportados pela literatura, que concordam para ausência de efeitos inibitórios na condição verificada na fase 2, DQO/N de 2,5, concentração de DQO média igual a 100,1 mg.L<sup>-1</sup> e temperatura de 25 °C, com eficiência máxima na remoção de amônio. Estes resultados sugerem que é possível aplicar o processo anammox como pós-tratamento de efluentes anaeróbios que ainda contenham matéria orgânica na forma de DQO para a remoção de nitrogênio amoniacal a 25 °C, discordando de Dosta *et al.* (2008), que reportaram grande redução na atividade anammox específica em reatores que apresentavam temperatura acima de 25 °C e tiveram a mesma reduzida.

Segundo Jin *et al.* (2013), temperaturas menores podem aumentar a viscosidade e densidade do fluido e isto resulta em uma maior lavagem da biomassa. A análise de STV realizada ao final desta fase (4,7 g.L<sup>-1</sup>) indicou uma redução da concentração comparada à fase 1 (7,6 g.L<sup>-1</sup>), mas que não afetou a eficiência global do processo. Isto vai ao encontro dos resultados observados por Jin *et al.* (2013). Em virtude do aumento da viscosidade do efluente, o tempo necessário para a sedimentação

das partículas também aumenta, porém este foi mantido constante nos ciclos realizados no reator, o que pode ter contribuído para a perda de sólidos.

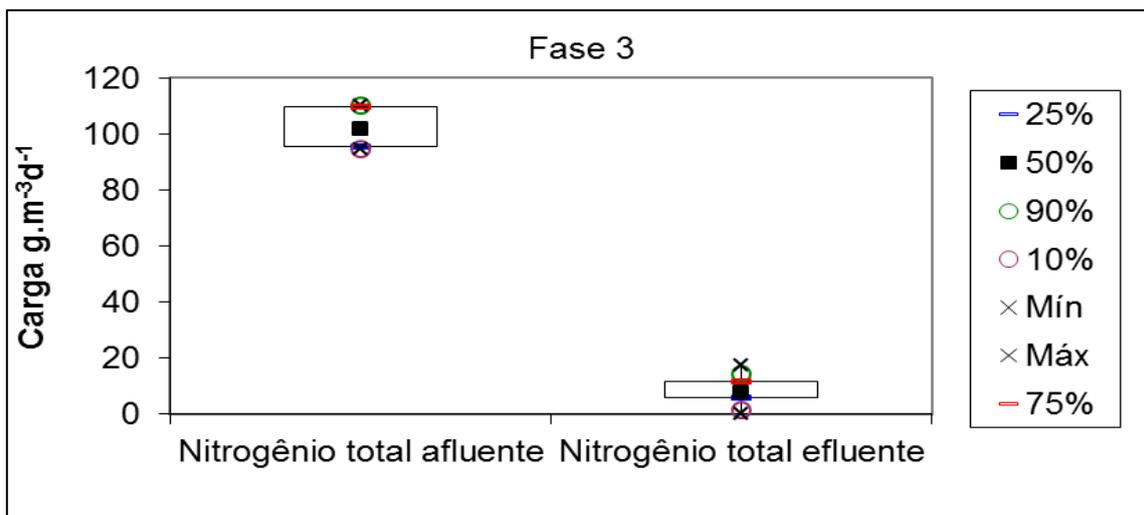
### 5.2.3 Fase 3 – Operação à temperatura de 20 °C

Como na fase 2, o objetivo da fase 3 foi verificar se o metabolismo das bactérias com atividade anammox seria mantido, assim como a estabilidade do reator, de modo que na ocorrência de temperaturas mais baixas em locais onde esses reatores fossem implementados, a eficiência do processo não seria afetada.

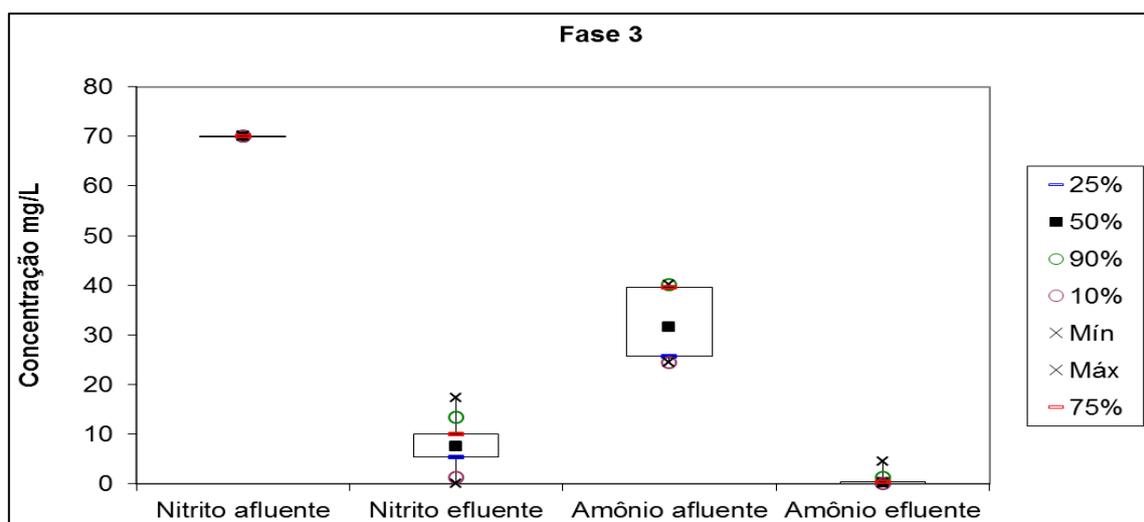
A aplicação do processo anammox para o tratamento de efluentes quentes e concentrados caracterizados por temperatura acima de 25 °C e concentração de nitrogênio no afluente superior a 100 mgN.L<sup>-1</sup>, está atualmente no estado da arte deste processo (VAN HULLE *et al.* 2010). A aplicação à temperaturas mais baixas e concentrações mais baixas de nitrogênio permitiria estender o potencial de aplicação de processos relacionados com anammox ao pós-tratamento de esgoto, abrindo novos cenários possíveis na concepção de plantas de tratamento de efluentes produzindo energia (KARTAL *et al.* 2010).

As Figuras 5.22, 5.23 e 5.24 mostram a carga de nitrogênio afluente e efluente, as concentrações afluente e efluente de amônio e nitrito durante a fase 3, e a dinâmica desses compostos ao longo do tempo. A Tabela 5.6 apresenta a estatística descritiva referente à carga de nitrogênio e concentração de amônio e nitrito afluentes ao RBS durante esta fase.

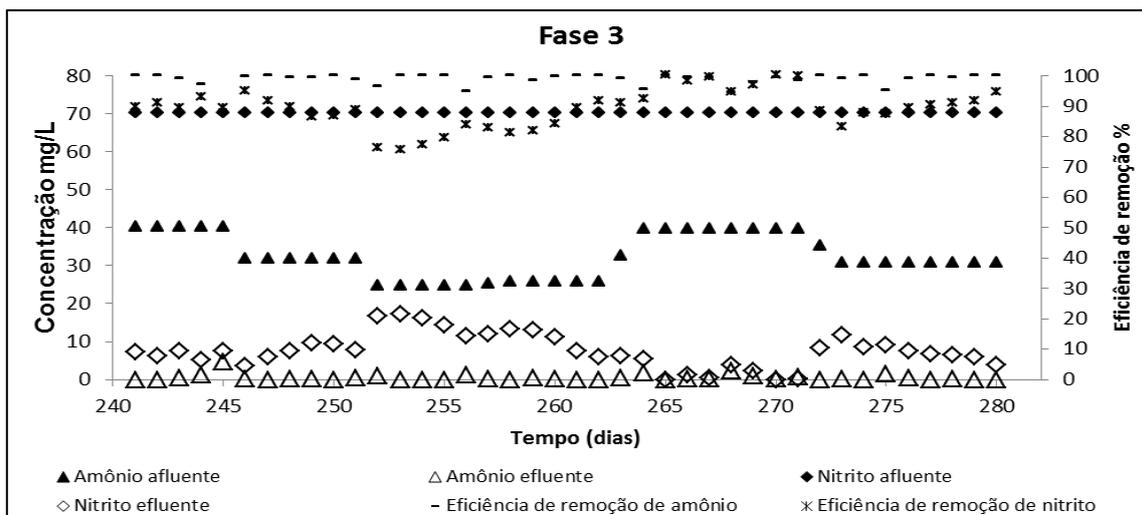
Assim como nas fases anteriores, não houve aclimação prévia para a redução de mais 5 °C na temperatura de operação do RBS, logo, poderia ocorrer uma redução na eficiência de remoção dos compostos nitrogenados, uma vez que a temperatura mantida no RBS foi a mínima entre a faixa ideal de operação de reatores anammox reportada (20 a 43 °C) e a temperatura ótima reportada pelos trabalhos realizados em reatores anammox tem sido relatada como acima de 30 °C. Apesar da temperatura testada nessa fase ter sido o limite mínimo da faixa de operação, em princípio não detectou-se alteração do processo, que obteve eficiência de remoção média de amônio e nitrito de 98,5% e 89,3%, respectivamente.



**Figura 5.22** Carga média de nitrogênio total (nitrito + íon amônio) afluente e efluente ao RBS durante a fase 3 (Temperatura= 20 °C)



**Figura 5.23** Concentração média de nitrito e amônio afluente e efluente ao RBS durante a fase 3 (Temperatura= 20 °C)



**Figura 5.24** Dinâmica dos compostos nitrogenados e eficiência de remoção durante a fase 3 (Temperatura= 20 °C)

A carga de nitrogênio afluente nesta fase foi a menor quando comparada às fases anteriores, sendo as médias de  $120,6 \text{ g.m}^{-3}\text{d}^{-1}$  na fase 1,  $112,6 \text{ g.m}^{-3}\text{d}^{-1}$  na fase 2 e  $102,4 \text{ g.m}^{-3}\text{d}^{-1}$  na fase 3, que variaram em função das características do efluente real aplicado. A carga de nitrogênio total mínima verificada nesta fase foi de  $94,49 \text{ g.m}^{-3}\text{d}^{-1}$  e a máxima de  $110,1 \text{ g.m}^{-3}\text{d}^{-1}$  (FIGURA 5.22). Outro aspecto relevante na Figura 5.22 refere-se à carga efluente de nitrogênio total (amônio + nitrito), que mais uma vez se mostrou fortemente influenciada pelo nitrito efluente, que pode ser observado na Figura 5.23, uma vez que a mediana de nitrogênio total foi 7,6 e a mediana do nitrito foi 7,4.

**Tabela 5.6** Estatística descritiva da carga de nitrogênio (nitrito + amônio) e concentração de amônio e nitrito afluente ao RBS durante a fase 3 (Temperatura= 20 °C)

Estatística Descritiva - Medidas de tendência central	Carga de Nitrogênio afluente nitrito + amônio ( $\text{g.m}^{-3}\text{d}^{-1}$ )	Concentração de íon amônio afluente ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	Concentração de nitrito afluente ( $\text{mg.L}^{-1}$ )
Nº de dados	40	40	40
Média	102,4	32,3	70
Desvio padrão	5,8	5,8	0
Coeficiente de variação	0,06	0,2	0
Mediana	101,6	31,6	70
Mínimo	94,5	24,5	70
Máximo	110,1	40,1	70
Percentil 10%	94,5	24,5	70
Percentil 25%	95,6	25,6	70
Percentil 75%	109,5	39,5	70
Percentil 90%	110,1	40,1	70

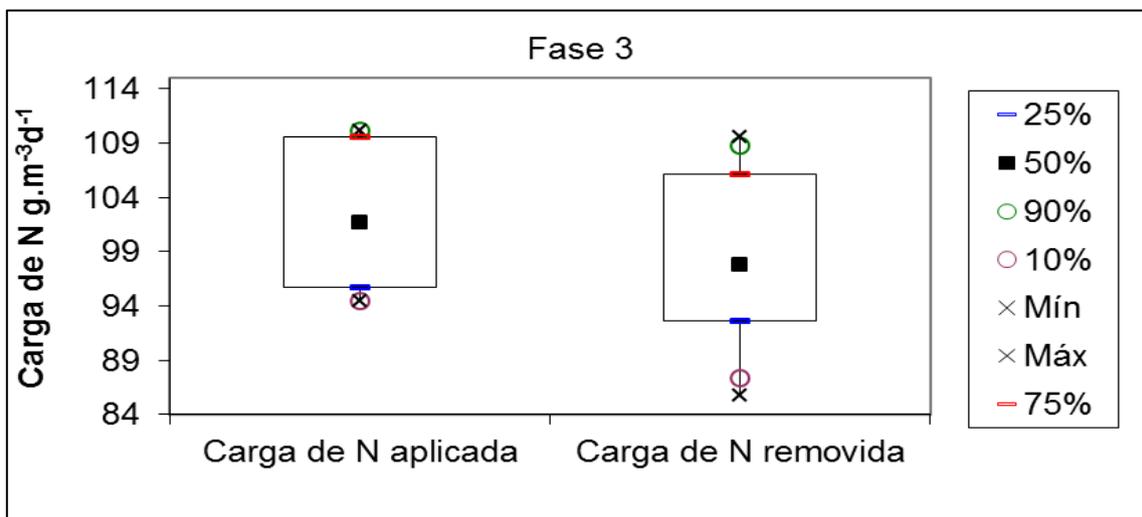
Percebeu-se que, apesar da elevada eficiência de remoção de amônio encontrada na fase 3 (98,5%), a mesma oscilou mais ao longo do tempo, como observado na Figura 5.24, ou seja, não foi mantido o comportamento e padrão verificados na fase 2. Mesmo assim, a concentração efluente de amônio apresentou a média de  $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ , considerando a concentração média afluyente de  $32,3 \text{ mg.L}^{-1}$ , com mínimo de  $24,5 \text{ mg.L}^{-1}$  e máximo de  $40,1 \text{ mg.L}^{-1}$ . Ressalta-se que a concentração afluyente de amônio desta fase foi a menor dentre as fases, o que pode ter contribuído por manter a eficiência de remoção mais elevada, mesmo o reator sendo operado a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  (na fase 1, a  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ , a concentração afluyente de amônio apresentou média de  $42,3 \text{ mg.L}^{-1}$ ).

Avaliando a aplicação de efluente de baixa carga orgânica proveniente de clarificador secundário em reator anammox a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , Ma *et al.* (2013) alcançaram eficiência de remoção de amônio igual a 92,8%, porém a redução da temperatura para  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  provocou uma queda na eficiência para  $75,3 \pm 14,59\%$ . Sanchez *et al.* (2014) em sua pesquisa avaliaram o efeito de diferentes relações DQO/N, utilizando efluente sintético com amido e acetato como fonte de matéria orgânica e temperaturas de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $22 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $14 \text{ }^\circ\text{C}$ . Os autores verificaram que a maior eficiência de remoção de nitrogênio foi alcançada a  $22 \text{ }^\circ\text{C}$ , sugerindo que o processo anammox pode ser empregado no pós-tratamento de esgoto de sistemas anaeróbios em climas quentes. No trabalho dos autores supracitados não foi possível observar o efeito da redução da temperatura sobre a eficiência de remoção de amônio a  $30$  e  $22 \text{ }^\circ\text{C}$ , porém não foi detectada atividade a  $14 \text{ }^\circ\text{C}$ . Comparativamente, na presente pesquisa as eficiências de remoção de amônio foram bem próximas nas temperaturas testadas, sendo 97,7% a  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ , 100% a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  e 98,5% a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Como pode ser observado na Figura 5.24, esta foi a única fase em que a concentração de nitrito afluyente foi a mesma em todo o período, porém a eficiência de remoção deste composto foi a menor entre as fases, com média de 89,3%. Como a remoção de amônio não foi prejudicada pela redução da temperatura, nota-se que a atividade anammox não foi afetada, mas uma vez que a concentração de nitrito aplicada nesta fase também foi aplicada durante 31 dias da fase 2, podem ter ocorrido mudanças na comunidade bacteriana pela redução da temperatura, que alteraram a taxa de consumo de nitrito pelos demais grupos, como é o caso das bactérias heterotróficas, que por sua vez também consomem nitrato.

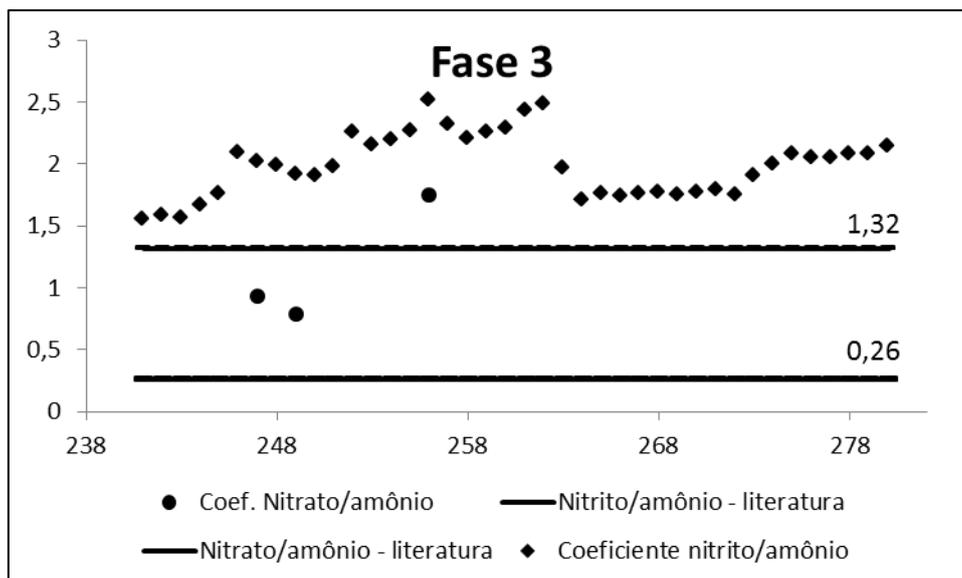
Nota-se também que as quedas de eficiência na remoção de nitrito ocorreram em períodos onde a concentração de amônio afluyente foram menores durante a fase, ou seja, as anammox necessitavam de uma quantidade menor deste íon para oxidar o amônio do efluente anaeróbio, assim, a

concentração de nitrito excedente seria maior, e se o consumo deste pelos demais micro-organismos não foi favorecido, a concentração efluente de nitrito impactaria diretamente na eficiência de remoção verificada. A Figura 5.25 retrata a carga de nitrogênio aplicada nesta fase, bem como a carga removida, que obteve média de 91,8% na eficiência de remoção.



**Figura 5.25** Carga média de nitrogênio (nitrito + amônio) aplicada e removida do RBS na fase 3 (Temperatura= 20 °C)

O coeficiente de consumo de nitrito por consumo de amônio monitorado nesta fase é representado pela Figura 5.26. Pode-se notar que em nenhum momento este foi menor ou igual ao valor estimado pela literatura, que é 1,32, sendo a média do coeficiente obtido de 1,96, conforme apresentado na Tabela 5.7. Ma *et al.* (2013) observaram a ocorrência de valores mais altos do coeficiente de consumo de nitrito por consumo de amônio e produção de nitrato por consumo de amônia ocorreu em temperaturas mais baixas (variando de 30 a 16 °C).



**Figura 5.26** Coeficiente estequiométrico de consumo de nitrito por consumo de amônio e produção de nitrato por consumo de amônio observados na fase 3 (Temperatura= 20 °C)

**Tabela 5.7** Estatística descritiva do coeficiente de consumo de nitrito por consumo de amônio observados durante a fase 3

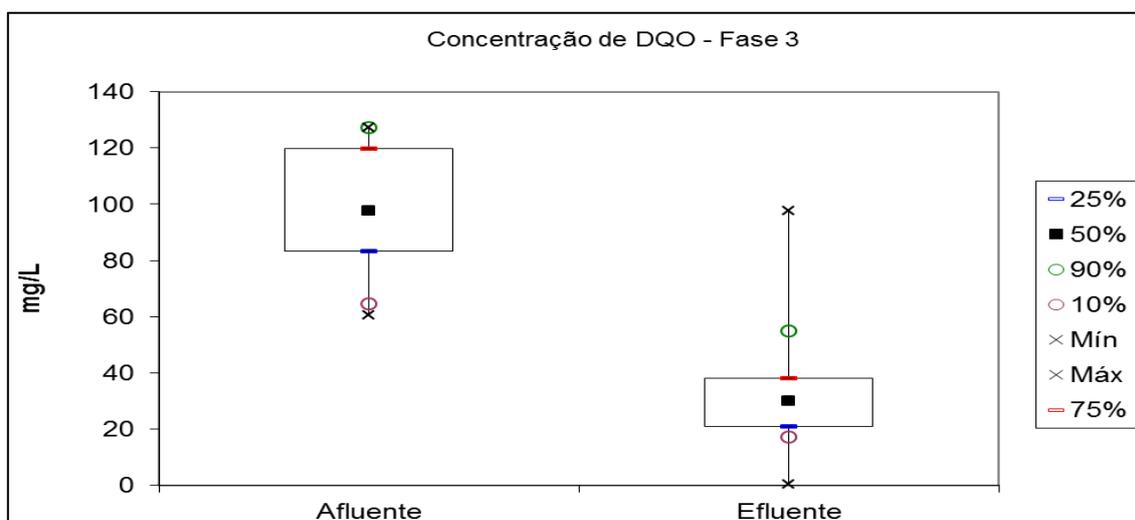
Estatística Descritiva - Medidas de tendência central	
Nº de dados	40
Média	1,96
Desvio padrão	0,25
Coeficiente de variação	0,12
Mediana	2,01
Mínimo	1,56
Máximo	2,52
Percentil 10%	1,71
Percentil 25%	1,77
Percentil 75%	2,16
Percentil 90%	2,29

Observada uma menor eficiência de remoção de nitrito nesta fase, mesmo que a concentração afluyente tenha sido a menor testada ( $70 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e sendo a concentração de amônio afluyente a menor entre as fases, a concentração de DQO também apresentou-se menor (FIGURA 5.27). Logo, para que uma eficiência média de remoção de DQO de 65% pudesse ser alcançada a partir de uma concentração média afluyente igual a  $96,7 \text{ mg.L}^{-1}$  produzindo um efluente de  $33,9 \text{ mg.L}^{-1}$ , o nitrito também teria de ser consumido pela atividade desnitrificante, o que contribuiu para o aumento no coeficiente em questão, sendo o maior entre as fases (1,96). Vale ressaltar que na fase 1, a eficiência de remoção de DQO foi de 61,8%, mas a concentração afluyente era de apenas  $130,2 \text{ mg.L}^{-1}$ , constatado um coeficiente de consumo de nitrito por consumo de amônio de 1,77, inferior ao valor

detectado nesta fase 3. O coeficiente de produção de nitrato por mol de amônio consumido nesta fase também foi semelhante à fase 1, sendo 0,38.

Apesar de ter sido observado consumo de nitrito por outros grupos de micro-organismos, pode-se notar que a temperatura influenciou levemente no metabolismo dos mesmos, visto que foi a única fase em que sua eficiência de remoção foi inferior a 90%, mas sem prejuízos às anammox, uma vez que a eficiência de remoção de amônio atingiu 98,5%. Nesta fase ainda foi detectado nitrito no efluente, indicando que ele não foi substrato limitante para que as reações no RBS pudessem ocorrer. Então, o fator de influência foi a temperatura, que mesmo a 20 °C, permitiu a ocorrência de atividade desnitrificante e anammox.

Conforme mencionado, a concentração média de DQO afluente ao RBS na fase 3 foi a menor entre as fases (96,7 mg.L<sup>-1</sup>), mas bem próxima à fase 2. Assim como nas fases anteriores, não houve adaptação da biomassa para a redução da temperatura, e isto pode ter provocado uma instabilidade inicial no RBS.



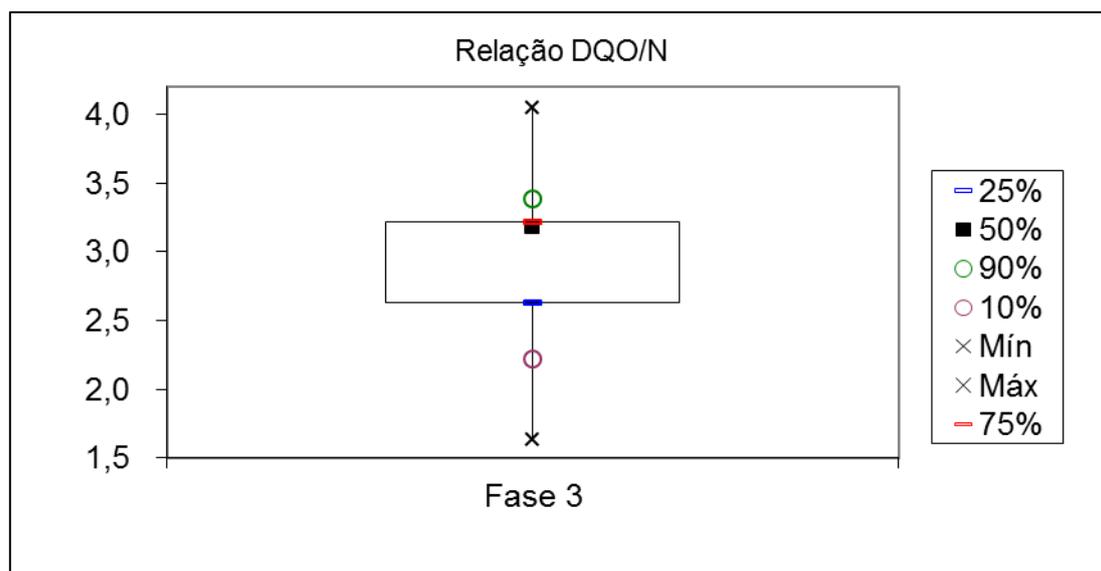
**Figura 5.27** Carga média de DQO afluente e efluente observada durante a fase 3 (Temperatura= 20 °C)

Sabendo que a concentração média de amônio afluente nesta fase foi de 32,3 mg.L<sup>-1</sup>, seriam, portanto, necessários 47,4 mg.L<sup>-1</sup> de nitrito para a atividade anammox, mas como a concentração de amônio removida apresentou média de 31,8 mg.L<sup>-1</sup>, a concentração de nitrito realmente utilizada pela atividade anammox foi de 46,7 mg.L<sup>-1</sup>, de acordo com o coeficiente de consumo de nitrito por consumo de amônio de 1,47 observado na etapa de enriquecimento, sendo portanto, maior que o valor reportado pela literatura (STROUS *et al.* 1998). Considerando que a concentração de nitrito

removida obteve média de  $62,6 \text{ mg.L}^{-1}$ , pode-se dizer então que aproximadamente  $15,9 \text{ mg.L}^{-1}$  foram utilizados por outros grupos de micro-organismos (desnitrificantes, por exemplo). Uma vez que a concentração média de DQO consumida foi de  $62,8 \text{ mg.L}^{-1}$ , a taxa média de consumo de nitrito por consumo de DQO verificado nesta fase foi de  $0,25 \text{ mgNO}_2^-$  por  $\text{mgDQO}$  removida. Esta taxa foi a maior entre as fases, sendo  $0,14$  a  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $0,12$  a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Por essa observação, percebe-se que uma concentração maior de nitrito foi requerida para cada miligrama de DQO removida, à medida que a temperatura de operação do RBS diminuiu de  $25$  para  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ , considerando apenas a atividade desnitrificante além das anammox, como consumidora de nitrito.

Winkler *et al.* (2012) explicaram que a implementação do processo anammox no tratamento de esgoto tem requisito da pré-remoção de DQO. Crescimento de heterotróficas resulta em uma redução do tempo de retenção de sólidos para que elas sejam lavadas do reator e um elevado tempo de retenção de sólidos é essencial para cultivar anammox em temperatura ambiente ( $18 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Dado o lento crescimento de anammox, o crescimento de heterotróficas deve ser minimizado, para manter uma alta fração de anammox no lodo e assim, uma alta eficiência do processo. Os autores ainda concluíram que: as anammox podem competir com bactérias desnitrificantes heterotróficas por acetato em temperatura ambiente; efluente contendo alta carga de DQO parece ser inadequado para anammox, embora ele provavelmente dependa da carga de amônio atual e assim da razão DQO/N; se após um pré-tratamento, alguma DQO solúvel é reduzida e o nível de amônio está alto, o processo anammox pode ser aplicado.

A relação DQO/N observada na fase 3 apresentou média de  $2,9$ , de acordo com a Figura 5.28. Nota-se que mesmo a literatura tendo reportado efeitos inibidores devido à presença de matéria orgânica nos efluentes, e que o processo anammox seria indicado para pós-tratar efluentes cuja relação DQO/N estivesse entre  $2$  e  $3$  (DESLOOVER *et al.* 2011; VLAEMINCK *et al.* 2012; SANCHEZ *et al.* 2014; LI *et al.* 2016; HAN *et al.* 2016), não foi possível observar estes efeitos no RBS a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  pós-tratando efluente aneróbio. Leal *et al.* (2016) avaliando o processo anammox em um RBS, aplicando efluente sintético com glicose em diferentes relações DQO/N a  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ , constataram que a eficiência média de remoção de DQO foi  $62\%$  na relação DQO/N de  $2,8$ , e  $390 \text{ mg.L}^{-1}$  de DQO. A relação obtida no presente trabalho encontra-se dentro da faixa considerada ideal (entre  $2$  e  $3$ ) e bem próxima ao valor reportado por Leal *et al.* (2016), porém com uma DQO afluente consideravelmente menor que a concentração máxima estipulada (até  $300 \text{ mg.L}^{-1}$ ), com média de  $96,7 \text{ mg.L}^{-1}$ .



**Figura 5.28** Relação DQO/N observada ao longo da fase 3 (Temperatura= 20 °C)

Ao final das três fases testadas, pode-se observar elevada resistência das bactérias com atividade anammox, que consumiram amônio e nitrito nas três temperaturas testadas, não mostrando inibição quanto à redução da temperatura sem aclimação e à presença de DQO. A Tabela 5.8 mostra a estatística descritiva das eficiências de remoção de amônio e nitrito nas três fases, que no geral estiveram acima de 90%.

**Tabela 5.8** Estatística descritiva da eficiência de remoção de amônio e nitrito observado no RBS nas 3 fases

Estatística Descritiva - Medidas de tendência central	Amônio	Nitrito	Amônio	Nitrito	Amônio	Nitrito
	T= 35 °C	T= 35 °C	T= 25 °C	T= 25 °C	T= 20 °C	T= 20 °C
Nº de dados	40	40	40	40	40	40
Média	97,7	93,9	100	95,7	98,5	89,3
Desvio padrão	4,9	5,7	0	4,3	2,2	6,4
Coefficiente de variação	0,05	0,06	0	0,04	0,02	0,07
Mediana	100	94,7	100	97,3	99,4	89,4
Mínimo	85,3	80,6	100	80,4	88,6	75,3
Máximo	100	100	100	99,9	100	100
Percentil 10%	87,8	86,5	100	89,5	95,3	80,9
Percentil 25%	99,9	90,3	100	93,7	98,8	85,6
Percentil 75%	100	99,9	100	98,6	100	92,4
Percentil 90%	100	100	100	99,5	100	98,3

Ma *et al.* (2013) tratando efluente de baixa carga relacionaram o bom desempenho do reator UASB operando com atividade anammox com a formação de grânulos e com o acúmulo de anammox no interior do reator, indicando que o nitrogênio pode ser efetivamente removido do efluente tratado no

reator, o que também pode ter ocorrido no RBS utilizado na presente pesquisa, visto que a temperatura não se mostrou limitante ao processo anammox. De acordo com Mckeown *et al.* (2009), a desintegração dos grânulos anaeróbios pode ocorrer como resultado da diminuição da temperatura, levando à perda dos mesmos.

A concentração de sólidos do final desta fase corrobora a informação de Ma *et al.* (2013) e discorda de Mckeown *et al.* (2009), visto que a fração de STV aumentou quando comparada à fase anterior (25 °C), passando de 4,7 g.L<sup>-1</sup> para 6,2 mg.L<sup>-1</sup>, indicando aumento da concentração de biomassa que se mostrou ativa. Lotti *et al.* (2014b) também observaram um aumento na biomassa do reator, de 3,6 para 6,7 g.L<sup>-1</sup> durante 52 dias de operação a 20 °C, e que grânulos estáveis de anammox foram obtidos ao longo de todo o período, independentemente das menores concentrações de nitrogênio, temperatura operacional, presença de sólidos no afluente e crescimento heterotrófico.

#### **5.2.4 Comparação dos resultados obtidos nas Fases I, II e III**

O período de operação total do RBS compreendeu 308 dias com três fases distintas (de acordo com a temperatura de operação) a partir da fase de enriquecimento: fase 1 a 35 °C, fase 2 a 25 °C e fase 3 a 20 °C, conforme já descrito no item 4 - Material e Métodos, onde a composição do afluente, as cargas de nitrogênio aplicadas e DQO variaram.

A Tabela 5.9 apresenta um resumo das características de cada fase para uma melhor comparação, e as Figuras 5.29, 5.30 e 5.31 apresentam a dinâmica dos compostos nitrogenados e DQO (concentração e eficiência de remoção), respectivamente, ao longo das fases.

A fase 1 foi inicialmente marcada pela transição entre a aplicação do meio mineral e autotrófico utilizado no período de enriquecimento de bactérias com atividade anammox, não apresentando fonte de matéria orgânica em sua composição, para o efluente anaeróbio de reator UASB, que apresentou concentração de DQO em média de 130,2 mg.L<sup>-1</sup> e não continha nitrito em sua composição, por isso o fornecimento deste era feito no início de cada ciclo no reator. A fase 2 não mostrou-se influenciada pela queda brusca de 10 °C na temperatura de operação, visto que não foi realizada etapa prévia de aclimação. O mesmo ocorreu para o início da fase 3.

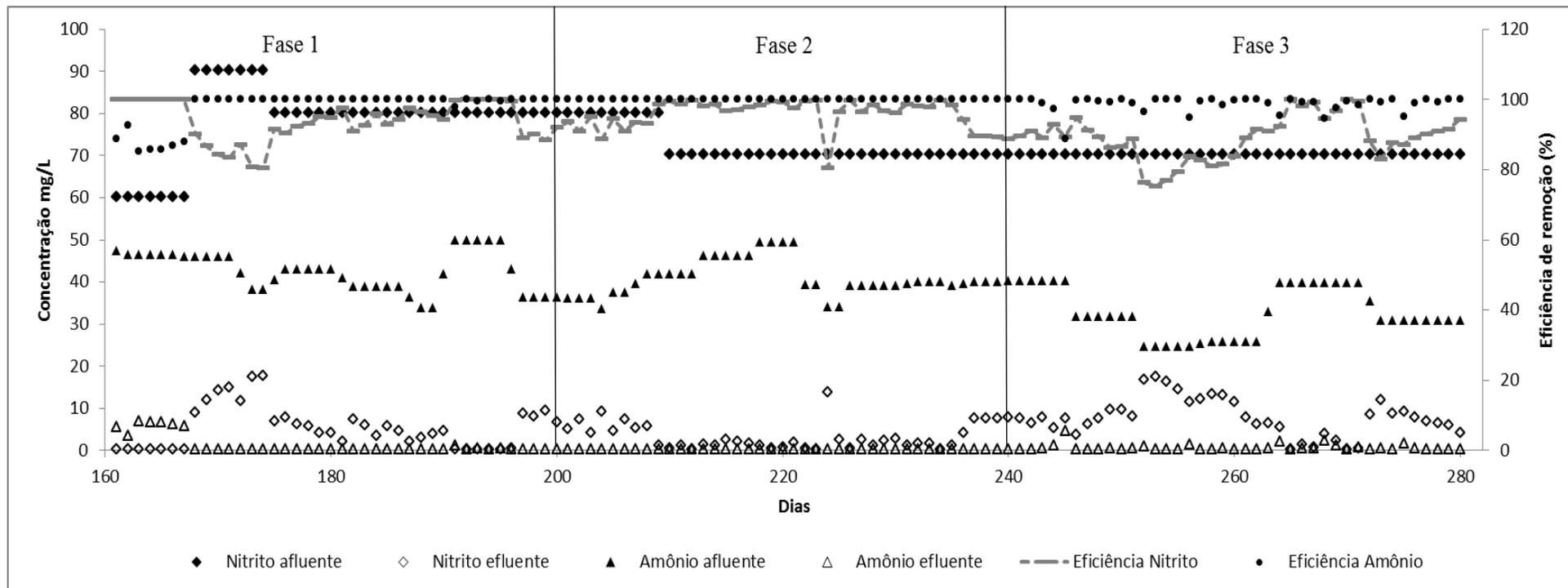
As eficiências de remoção dos compostos nitrogenados bem como a de DQO foram avaliadas estatisticamente a fim de verificar se a alteração da temperatura no reator foi capaz de impactar significativamente a remoção dos compostos, visto que em nenhuma das fases foi possível constatar

efeito inibitório. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de *Shapiro-Wilk* para posterior escolha dos demais testes, paramétricos ou não-paramétricos, e todos apresentaram distribuição normal, sendo tratados pelo teste ANOVA, e pós-tratados no teste de comparações múltiplas de médias, quando pertinente.

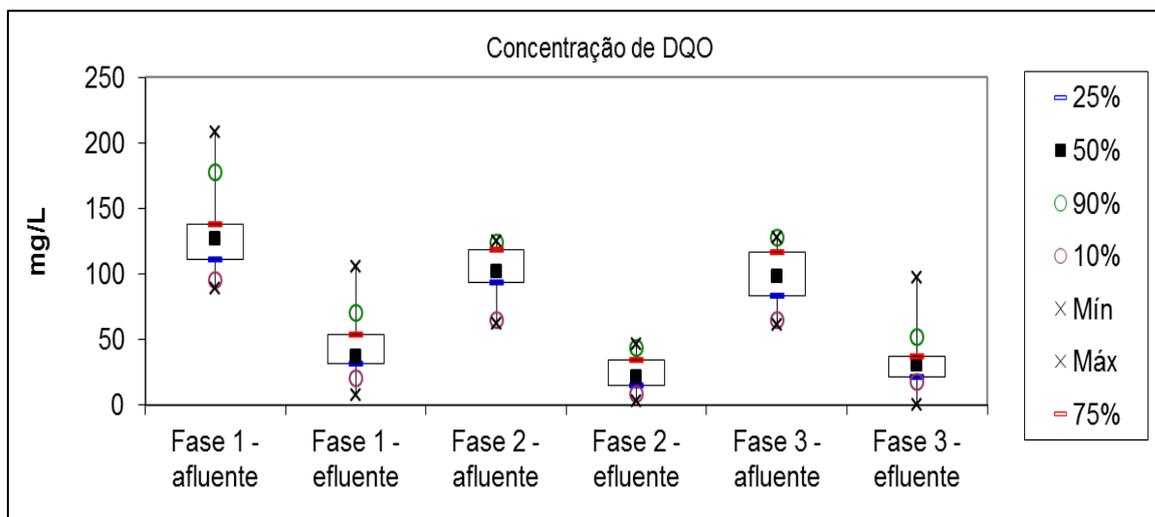
Avaliando a eficiência de remoção de amônio ao longo das três fases, resultados acima de 95% foram obtidos. O teste estatístico revelou diferença significativa apenas entre as fases 2 e 3, p-valor igual a 0,000031. Este resultado mostra que a remoção de amônio não foi afetada pela redução de 10 °C na temperatura entre as fases 1 e 2, mas a redução de 5 °C (de 25 para 20 °C) já foi capaz de influenciar na remoção de amônio. Isto pode ter ocorrido em virtude da fase 2 ter alcançado 100% de eficiência de remoção durante todo o período, e mesmo apesar da fase 3 ter apresentado eficiência de remoção média de 98,7%, esta oscilou bastante no decorrer da fase. Outro aspecto relevante é que a temperatura mantida na fase 3 foi a mínima dentro da faixa recomendada de operação de reatores anammox, que é reportada na literatura de 20 a 43 °C. Tao *et al.* (2012) compararam valores de pH e temperatura e concluíram que efeitos da temperatura foram superiores, considerando um processo com nitratação e anammox.

**Tabela 5.9** Resumo dos parâmetros operacionais e resultados obtidos nas fases 1, 2 e 3 desta pesquisa

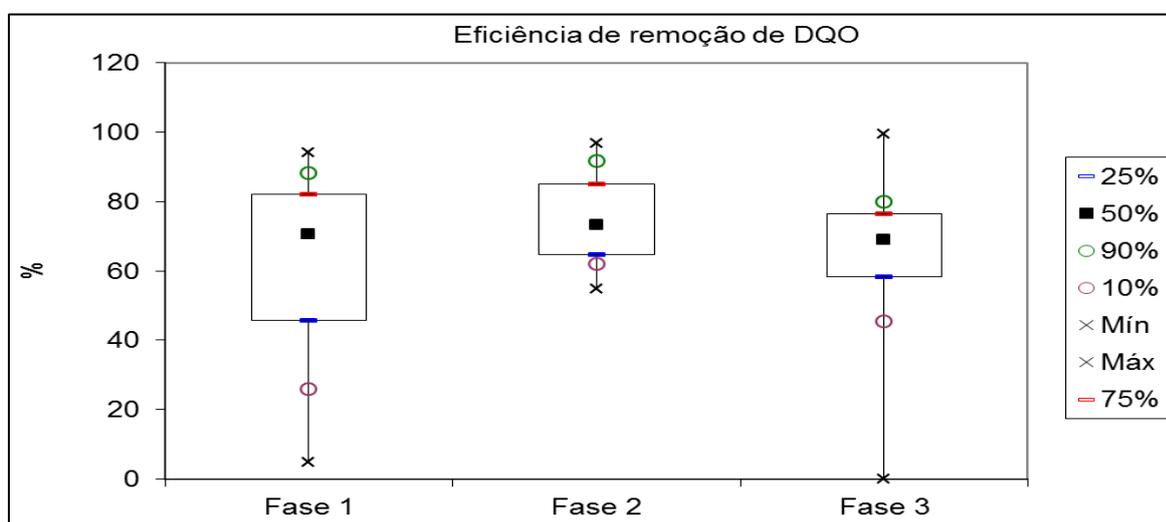
<b>Parâmetros</b>	<b>Fase de enriquecimento</b>	<b>Fase 1 (35 °C)</b>	<b>Fase 2 (25 °C)</b>	<b>Fase 3 (20 °C)</b>
			Média	
Carga de N total (amônio + nitrito) g.m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup>	78,8	120,6	112,6	102,4
Concentração de amônio afluente mg.L <sup>-1</sup>	32,4	42,3	40,6	32,3
Concentração de nitrito afluente mg.L <sup>-1</sup>	46,7	78,2	72,2	70,0
Concentração de DQO afluente mg.L <sup>-1</sup>	-	130,2	100,1	96,7
Eficiência de remoção de N total (%)	97,5	93,9	97,2	91,8
Eficiência de remoção de amônio (%)	96,5	97,7	100	98,5
Eficiência de remoção de nitrito (%)	98,2	93,9	95,7	89,3
Eficiência de remoção de DQO (%)	-	61,8	75,7	65,0
Coefficiente nitrito/amônio	1,47	1,77	1,70	1,96
Coefficiente nitrato/amônio	0,35	0,37	0,44	0,38
Relação DQO/N	-	3,2	2,5	2,9
Concentração de nitrato efluente mg.L <sup>-1</sup>	11	15,5	17,9	12,2



**Figura 5.29** Dinâmica dos compostos nitrogenados observados durante as três fases desta pesquisa



**Figura 5.30** Concentração de DQO afluente e efluente medidas durante as 3 fases operacionais (Fase 1, T= 35 °C), (Fase 2, T= 25 °C) e (Fase 3, T= 20 °C).



**Figura 5.31** Eficiência de remoção de DQO nas 3 fases operacionais (Fase 1, T= 35 °C), (Fase 2, T= 25 °C) e (Fase 3, T= 20 °C).

A eficiência de remoção de nitrito é um fator importante na manutenção da estabilidade dos reatores anammox, e por isso deve ser acompanhada de perto, uma vez que ele, quando em excesso, pode provocar inibição da atividade, não pelo nitrito em si, mas pelo ácido nitroso, que é afetado pelo pH através do equilíbrio químico em meio aquoso (JIN *et al.* 2012). Ao longo das fases, a concentração de nitrito fornecida ao reator foi ajustada gradualmente à medida que esta aumentava no efluente, ou seja, estava sendo fornecido nitrito em excesso, apesar de não ter sido constatado efeito inibitório no decorrer das fases. A avaliação estatística dos dados mostrou que a eficiência de remoção de nitrito foi diferente nas fases, sendo que a fase 3 diferiu estatisticamente das fases 1 e 2 (p-valor igual a 0,000001). Este resultado corrobora com a eficiência de remoção calculada nas 3 fases e apresentada da Tabela 5.9,

onde pode-se verificar que a menor eficiência de remoção de nitrito ocorreu na fase 3. Assim como amônio, esta avaliação revelou que a redução de 25 para 20 °C na temperatura de operação do reator afetou a remoção de nitrito. Ressalta-se que não foram constatados prejuízos à estabilidade do reator, tampouco à remoção de amônio, mas que a temperatura foi capaz de influenciar no consumo de nitrito, resultando em sua menor eficiência de remoção a 20 °C.

A eficiência de remoção de nitrogênio total (amônio + nitrito) também foi avaliada e percebeu-se, pelos dados obtidos nas fases, que ela se mostrou mais influenciada pelo nitrito efluente do que por amônio. A avaliação estatística dos dados demonstrou que houve diferença entre as fases, sendo que a fase 2 diferiu estatisticamente das fases 1 (p-valor igual a 0,0025) e 2 (p-valor igual a 0,000001), e que as fases 1 e 3 não apresentaram diferença entre si. Esta informação mostra-se de grande relevância, pois a maioria dos trabalhos tem indicado o processo anammox para pós-tratar efluentes em temperatura acima de 30 °C, e esta pesquisa mostrou que as condições mantidas na fase 2, a 25 °C, foram melhores do que a 35 e 20 °C. Este resultado retratou a máxima eficiência de remoção de amônio alcançada na fase 2, assim como a maior eficiência de remoção de nitrito, que também foi alcançada na fase 2.

Estes resultados podem indicar que para efeito de enriquecimento e cultivo de bactérias com atividade anammox utilizando meio de cultura mineral e autotrófico, a temperatura de 35 °C mostrou-se adequada. Porém quando o reator anammox passou a ser alimentado com efluente anaeróbio de reator UASB, considerando as 3 temperaturas empregadas (35, 25 e 20 °C), o melhor cenário identificado foi a 25 °C. As temperaturas mais elevadas estavam normalmente associadas à maior taxa de duplicação das bactérias, porém, considerando que as anammox possuem lenta taxa de crescimento comparada às bactérias desnitrificantes, e considerando a presença de matéria orgânica no efluente empregado, as desnitrificantes poderiam eliminar as anammox por competição em maior temperatura. Desta forma, pode-se perceber que a 25 °C um equilíbrio foi mantido favorecendo ambos os grupos e apresentando o melhor cenário desta pesquisa, uma vez que a eficiência de remoção de DQO não apresentou diferença significativa entre as fases (p-valor igual a 0,0566).

### 5.3 Análise do perfil e diversidade da comunidade bacteriana pela técnica de PCR-DGGE

Mudanças nas condições ambientais, como a temperatura, têm um impacto direto nas comunidades microbianas. O estudo das comunidades bacterianas e suas mudanças fornecem informações valiosas para entender melhor os processos de remoção de nutrientes que ocorrem nos ecossistemas de tratamento de efluentes (ISANTA *et al.* 2015).

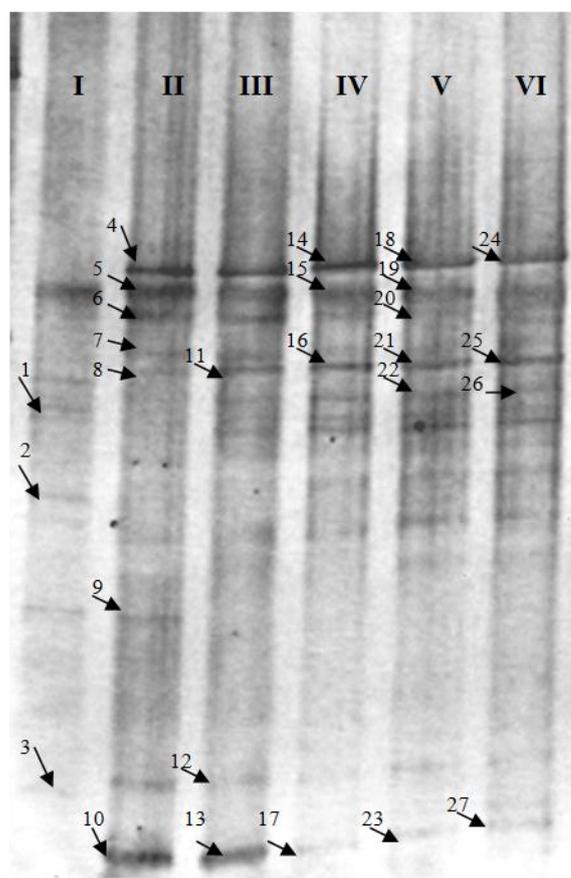
Os resultados da detecção de bactérias anammox pela PCR utilizando os iniciadores PLA46f/Amx 820r foram positivos para a presença de DNAr 16S em todas as amostras analisadas, tanto no lodo utilizado como inóculo quanto em todas as amostras do reator coletadas ao longo do experimento (FIGURA 5.32). As amostras da fase 3 também foram positivas para a presença de DNAr 16S, mas a imagem não foi apresentada. Observou-se que a intensidade da banda referente ao lodo de inóculo (canaleta 2) foi menor que a intensidade das demais bandas (canaletas 3 a 6), sugerindo a existência de menor concentração de DNAr 16S de bactérias anammox no lodo de inóculo em relação às demais amostras coletadas após o início da atividade anammox no reator.



**Figura 5.32** Detecção de bactérias anammox pela PCR com iniciadores para o DNAr 16S de bactérias anammox (PLA46f/Amx 820r); (1) *Ladder*, (2) inóculo, (3) biomassa com 160 dias de enriquecimento, (4) final da fase 1, (5) final da fase 2, (6) controle positivo e (7) controle negativo

Os resultados da PCR indicaram que as bactérias anammox permaneceram no reator ao longo de todo o tempo de operação, mesmo após a alimentação do reator do efluente anaeróbio real. Assim, pode-se verificar que a presença de matéria orgânica e demais compostos presentes no efluente de reator UASB tratando esgoto doméstico não contribuiu para a eliminação de bactérias com atividade anammox do RBS.

A Figura 5.33 apresenta os perfis de DGGE da comunidade bacteriana obtidos para as amostras coletadas a partir da inoculação do reator anammox, sendo as amostras (I) referente ao inóculo, (II) ao final da fase de enriquecimento, (III) final da fase 1 – T=35 °C, (IV) final da fase 2 – T=25 °C, (V) fase 3 com 30 dias e (VI) final da fase 3 – T=20 °C. As bandas mais representativas foram identificadas e excisadas, e o DNA foi sequenciado para a identificação dos micro-organismos, conforme a Tabela 5.10.



**Figura 5.33** Perfil do gel de DGGE contendo fragmentos de DNAr 16S amplificados com *primers* para o domínio Bactéria (1055F/1392R-GC). As canaletas referem-se às amostras (I) do inóculo, (II) final da fase de enriquecimento, (III) final da fase 1, (IV) final da fase 2, (V) fase 3 com 30 dias e (VI) final da fase 3

A análise de DGGE revelou a estrutura da comunidade bacteriana no RBS durante todo o período em que foi monitorado nesta pesquisa. Após o sequenciamento das bandas de DNA obtidas no DGGE, 27 seqüências foram empregadas nas análises (TABELA 5.10). Apesar do grande número de bandas no gel, muitas seqüências não foram utilizadas devido à baixa similaridade obtida. A maioria das bandas presentes na mesma altura apresentou a mesma classificação e identificação taxonômica, optou-se por apresentar na Tabela 5.10 as bandas que apresentaram maior qualidade no sequenciamento e similaridade.

**Tabela 5.10** Identificação das bandas de DGGE a partir do RDP Classifier e Blastn

Banda	RDP Classifier	Blastn	Similaridade <sup>1</sup> (%)	Nº de Acesso
1	<i>Burkholderiales</i>	<i>Acidovorax sp</i>	89	NR_116740.1
2	<i>Saprospirales</i>	<i>Haliscomenobacter sp</i>	91	NR_074420.1
3	<i>Anaerolineaceae</i>	<i>Thermomarinilinea sp</i>	89	NR_132293.1
<b>4</b>	<b>Ca*. <i>Brocadiaceae</i></b>	<b><i>Bacteria não cultivável clone Dok57</i></b>	<b>98</b>	<b>FJ710776.1</b>
<b>5</b>	<b><i>Ca. Brocadia sp</i></b>	<b><i>Bacteria não cultivável clone Dok57</i></b>	<b>91</b>	<b>FJ710776.1</b>
6	<i>Anaerolineaceae</i>	<i>Anaerolinea sp</i>	84	NR_074383.1
7	<i>Rhodocyclales</i>	<i>Bactéria não cultivável isolada</i> <b>DGGE</b>	93	KT835629.1
8	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Denitratisoma oestradiolicum</i>	97	KF810114.1
9	<i>Myxococcales</i>	<i>Myxococcales</i>	92	FJ551068.1
10	<i>Anaerolineaceae</i>	<i>Bellilinea sp</i>	95	JQ183076.1
11	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Denitratisoma oestradiolicum</i>	97	KF810114.1
12	<i>Anaerolineaceae</i>	<i>Anaerolineaceae</i>	94	HE648186.1
13	<i>Anaerolineaceae</i>	<i>Bellilinea sp</i>	93	NR_041354.1
<b>14</b>	<b><i>Ca. Brocadia sp</i></b>	<b><i>Ca. Brocadia caroliniensis</i></b>	<b>98</b>	<b>KF810110.1</b>
<b>15</b>	<b><i>Ca. Brocadia sp</i></b>	<b><i>Ca. Brocadia sp</i></b>	<b>97</b>	<b>AM285341.1</b>
16	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Denitratisoma sp</i>	97	HM769664.1
17	<i>Anaerolineaceae</i>	<i>Bellilinea sp</i>	91	NR_041354.1
<b>18</b>	<b><i>Ca. Brocadia sp</i></b>	<b><i>Bacteria não cultivável clone Dok57</i></b>	<b>98</b>	<b>FJ710776.1</b>
<b>19</b>	<b><i>Ca. Brocadia sp</i></b>	<b><i>Bacteria não cultivável clone Dok57</i></b>	<b>96</b>	<b>FJ710776.1</b>
20	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Rhodocyclaceae</i>	89	HQ033257.1
21	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Denitratisoma oestradiolicum</i>	98	KF810114.1
22	<i>Burkholderiales</i>	<i>Burkholderia sp</i>	90	NR_118986.1
23	<i>Anaerolineaceae</i>	<i>Bellilinea sp</i>	91	NR_041354.1
<b>24</b>	<b><i>Ca. Brocadia sp</i></b>	<b><i>Ca. Brocadia caroliniensis</i></b>	<b>98</b>	<b>KF810110.1</b>
25	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Denitratisoma oestradiolicum</i>	98	KF810114.1
26	<i>Burkholderiales</i>	<i>Burkholderiales</i>	91	KM083133.1
27	<i>Anaerolineaceae</i>	<i>Bellilinea</i>	91	NR_041354.1

<sup>1</sup> As porcentagens representam similaridade entre as sequências das bandas do DGGE com as sequências mais próximas no *GenBank*. Em negrito estão destacadas sequências similares às bactérias anammox.

\*Ca: *Candidatus*

A identificação das bandas de DNA isoladas a partir do gel de DGGE revelou que a maioria das sequências obtidas está relacionada com micro-organismos dos Filos *Proteobacteria*, *Chloroflexi* e *Planctomycetes*. A Tabela 5.11 apresenta, resumidamente, os micro-organismos identificados a partir no sequenciamento das bandas do gel de DGGE.

**Tabela 5.11** Micro-organismos identificados a partir do gel de DGGE

Bandas	Micro-organismo		Amostra em que foi encontrado	Metabolismo principal	Características
	Filo	Identificação			
1	<i>Proteobacteria</i>	<i>Acidovorax sp</i>	I	Desnitrificação	Comumente encontrados em sistemas de lodos ativados, e conhecidos por desempenhar importantes papéis na degradação de compostos aromáticos e na biorremediação de ambientes contaminados (HEYLEN <i>et al.</i> , 2008; QUINTAES <i>et al.</i> , 2012)
2	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Haliscomenobacter sp</i>	I	Organotróficos	Espécie filamentosa aeróbia, frequentemente encontrada no sistema de lodos ativados, comuns no esgoto e geralmente são inibidas em concentração de amônio acima de 2 g.L <sup>-1</sup> (GARRITY, 2010).
3 e 12	<i>Chloroflexi</i>	<i>Anaerolineaceae</i>	I e III	Organotróficos	Anaeróbias, podem utilizar uma ampla gama de carboidratos como fonte de energia, encontradas em solos, fontes termais e lodo aeróbio e anaeróbio (SEKIGUSHI <i>et al.</i> 2003).
4, 14, 18 e 24	<i>Planctomycetes</i>	<i>Bacteria não cultivável clone Dok57</i>	II, IV, V, e VI		Sequência relacionada a bactéria anammox (NCBI: FJ710776.1)
5, 15 e 19	<i>Planctomycetes</i>	<i>Ca. Brocadia sp</i>	II, IV e V	Oxidação Anaeróbia da Amônia	Essa espécie de bactéria anammox é comumente encontrada em biorreatores, principalmente em sistemas que tratam efluentes de suinocultura (VANOTTI <i>et al.</i> , 2011).
6	<i>Chloroflexi</i>	<i>Anaerolinea sp</i>	II	Organotróficos	Anaeróbias e filamentosas, podem utilizar uma ampla gama de carboidratos como fonte de energia, encontradas em solos, fontes termais e lodo aeróbio e anaeróbio (SEKIGUSHI <i>et al.</i> 2003; MAC CONELL, 2014).
7	<i>Proteobacteria</i>	<i>Rhodocyclales</i>	II	Desnitrificação	Bactéria púrpura não-sulfurosa, podem crescer realizando respiração na ausência de luz, encontradas em ambientes anóxicos onde haja matéria orgânica disponível (MADIGAN <i>et al.</i> 2010),
8, 11, 16, 21 e 25	<i>Proteobacteria</i>	<i>Denitratisoma oestradiolicum</i>	II, III, IV, V e VI	Desnitrificação	Presente em sistemas de lodos ativados. Utiliza o 17beta-estradiol (E2) como fonte de carbono, oxidando-o a CO <sub>2</sub> e H <sub>2</sub> O e o NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> como acceptor de elétrons (FAHRBACH <i>et al.</i> , 2006).
9	<i>Proteobacteria</i>	<i>Myxococcales</i>	II	Organotróficos	São encontradas em ambientes com muita matéria orgânica, podem realizar a redução dissimilatória do Fe(III), são anaeróbios facultativos (GARRITY, 2005).
10, 13, 17, 23 e 27	<i>Chloroflexi</i>	<i>Bellilinea sp</i>	II, III, IV, V e VI	Organotróficos	Anaeróbias e filamentosas, podem utilizar uma ampla gama de carboidratos como fonte de energia, encontradas em solos, fontes termais e lodo aeróbio e anaeróbio (SEKIGUSHI <i>et al.</i> 2003).

20	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Denitratisoma oestradiolicum</i>	V	Desnitrificação	Presente em sistemas de lodos ativados. Utiliza o 17beta-estradiol (E2) como fonte de carbono, oxidando-o a CO <sub>2</sub> e H <sub>2</sub> O e o NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> como acceptor de elétrons (FAHRBACH <i>et al.</i> , 2006).
22 e 26	<i>Burkholderiales</i>	<i>Burkholderiales</i>	V e VI	Desnitrificação	Quimiorganotróficos de metabolismo estritamente respiratório, algumas espécies podem crescer na forma anaeróbia tendo o nitrato como acceptor de elétrons (MADIGAN <i>et al.</i> 2010)

(I) Inóculo do reator; (II) Final da fase de enriquecimento; (III) Final da fase 1 – 35 °C; (IV) Final da fase 2 – 25 °C; (V) Fase 3 com 30 dias de operação – 20 °C e (VI) Final da fase 3 – 20 °C.

O filo *Proteobacteria* é o maior e mais diverso grupo dentro do domínio *Bacteria*. Todos os micro-organismos presentes nesse grupo são gram-negativos e exibem uma diversidade muito ampla de mecanismos de produção de energia, contendo espécies quimiolitotróficas, quimiorganotróficas e fototróficas. Possuem fisiologia diversa, incluindo formas anaeróbias, microaerófilas e aeróbias facultativas. Quanto à morfologia, também é muito variável entre as diferentes espécies, podendo possuir formas de bacilos retos e curvos, cocos, espirilos e formas com brotamento e apendiculadas (MADIGAN *et al.*, 2010). É importante ressaltar que dentro deste filo, encontram-se alguns micro-organismos capazes de realizar desnitrificação heterotrófica, como os que pertencem às ordens *Rodhospirillales*, *Burkholderiales*, *Rhodocyclales* e *Pseudomonadales*, os quais têm sido encontrados frequentemente em reatores anammox (PEREIRA *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2014, CHO *et al.*, 2010; GONZALEZ-GIL *et al.*, 2015; LEAL *et al.*, 2016; HU *et al.*, 2012, CAO *et al.*, 2017).

A presença de bactérias desnitrificantes heterotróficas em reatores anammox pode afetar consideravelmente o processo uma vez que esses micro-organismos podem competir com bactérias anammox, que são autotróficas, pelo acceptor de elétrons  $\text{NO}_2^-$ , que é comumente utilizado por ambos grupos microbianos. Como as bactérias heterotróficas são capazes de crescer mais rapidamente em relação às autotróficas, acabam por eliminar as bactérias anammox na competição, inibindo dessa maneira, sua atividade (CHANCHOI *et al.*, 2008; GÜVEN *et al.*, 2005; MOLINUEVO *et al.*, 2009; LACKNER *et al.*, 2008). As bactérias desnitrificantes podem também utilizar o nitrato, que é sempre produzido durante a reação anammox (GONZALEZ-GIL *et al.*, 2015).

Bactérias desnitrificantes foram identificadas no presente trabalho, em todas as amostras retiradas das diferentes fases de operação do reator, uma vez que tinha-se a presença de matéria orgânica do inóculo, o próprio material da morte e lise celular e em seguida o fornecimento de efluente anaeróbio com matéria orgânica residual e amônio estavam presentes, assim como bactérias organotróficas. Nota-se que no inóculo foram detectadas bactérias desnitrificantes (*Acidovorax sp.*) e organotróficas (*Bacteroidetes*), não foram detectadas bactérias anammox no inóculo pelo DGGE.

Pereira *et al.* (2014) enriqueceram bactérias anammox em RBS a partir de lodo ativado e também detectaram *Acidovorax sp.* como bactéria desnitrificante no inóculo. Em relação a reatores anammox, a maioria dos estudos tem sido conduzidos usando efluentes sintéticos como afluente, e geralmente revelam a coexistência de membros de *Chlorobi*, *Chloroflexi* e

*Bacteroidetes* acompanhando um número de *Planctomycetes* que inclui as anammox (QIAO *et al.* 2008; CHO *et al.* 2010).

*Bacteroidetes* é um filo grande e diverso, constituído de alguns micro-organismos que possuem motilidade e habilidade de digerir macromoléculas (McBRIDGE e ZHU *et al.*, 2013). Ocupam as camadas externas dos grânulos e parecem formar teias que melhoram a estrutura dos mesmos (CAO *et al.*, 2017). Estudo conduzido por Inoue *et al.* (2015), encontrou no genoma de oito gêneros de bactérias deste filo, pertencentes à ordem *Bacteroidales*, a presença de genes relacionados à fixação de nitrogênio (*nifH*, *nifK*, *nifD*, *nifk*, *nifE*, *nifN*, *nifB* e *nifA*). Isto indica que estes micro-organismos atuam no ciclo do nitrogênio. Os autores sugerem que outras bactérias deste filo, oriundas de ambientes diversos, que ainda não tiveram seu genoma sequenciado, possam ser micro-organismos diazotróficos (capazes de fixar N<sub>2</sub>). Entretanto, o papel de micro-organismos do filo *Bacteroidetes* em reatores anammox ainda não foi investigado. Egli *et al.* (2003) sugeriram que a função de *Bacteroidetes* pode estar associada ao fornecimento de suporte estrutural para o biofilme e para outras bactérias, e tem sido frequentemente encontrados em elevada abundância em vários habitats, tais como de água doce, solos, mas também em habitats extremos, como águas marinhas da Antártida (MANZ *et al.* 1996; WELLER *et al.* 2000).

Ao final da etapa de enriquecimento, foram detectadas bactérias do filo dos *Planctomycetes*, bactérias anammox – *Ca. Brocadia sp.*, *Proteobacterias* como *Denitratisoma oestradiolicum* e *Myxococcales*. Na etapa de enriquecimento de um RBS anammox, utilizando meio de cultura mineral e autotrófico, Pereira *et al.* (2014) também identificaram a presença de *Myxococcales* na biomassa. O filo *Chloroflexi*, que possui características filamentosas, também destacou-se, pois foi detectado nesta fase e nas fases seguintes.

O Filo *Chloroflexi*, possui bactérias que previamente eram classificadas como bactérias verdes não sulfurosas, é ainda filo pouco estudado e inclui bactérias com metabolismo diversificado (HUG *et al.* 2013). São encontrados em estações de tratamento de esgotos, sendo muito comuns em sistemas de lodos ativados (KRAGELUND *et al.*, 2011). Hug *et al.* (2013) avaliaram a diversidade filogenética e flexibilidade metabólica de *Chloroflexi* em ambiente de sedimento subsuperficial, local que compartilha semelhanças com aquíferos fluviais de todo o mundo. Os autores concluíram que algumas espécies de *Chloroflexi* parecem agir na redução de nitrito e, com menor frequência, na redução de nitrato, e isto pode

explicar a ampla ocorrência desse grupo em reatores anammox, que também constatada no presente trabalho.

A ecofisiologia desse grupo de micro-organismos é ainda desconhecida e existem poucos estudos sobre o papel dos mesmos em reatores anammox. O fato de existirem poucos micro-organismos deste grupo isolados, contribui para a falta de dados fisiológicos relacionados aos exemplares deste grupo microbiano. Por esse motivo, ainda não é possível afirmar com segurança qual o papel estes micro-organismos exercem nos reatores em que são frequentemente encontrados.

Apesar disso, resultados de alguns trabalhos indicam que bactérias do filo *Chloroflexi* podem atuar na degradação de produtos microbianos em biofilmes nitrificantes autotróficos e biorreatores de membrana (KINDAICHI *et al.*, 2004; OKABE *et al.*, 2005; MIURA *et al.*, 2007). Pesquisas têm mostrado que bactérias do filo *Chloroflexi* podem utilizar compostos e metabólitos derivados de células microbianas mortas (KINDAICHI *et al.*, 2012). Espécie *Anaerolinea* foi identificada como bactérias anaeróbias com capacidade de utilização de N-acetilglucosamina e seu papel ecológico como catadores em biorreatores anammox foi apontado por Kindaichi *et al.* (2012).

A maioria dos estudos que realizaram a caracterização da comunidade microbiana geral de reatores anammox, observaram a coexistência de micro-organismos do filo *Chloroflexi* com bactérias anammox. Esta coexistência parece estar relacionada à compatibilidade destes dois grupos de micro-organismos, com ambientes ricos em amônio e nitrito, oligotróficos e anaeróbios (CHO *et al.* 2010; HUG *et al.* 2013).

Cho *et al.* (2010), investigando a comunidade microbiana em um reator anammox de fluxo ascendente e biomassa granular, também observaram que bactérias filamentosas do filo *Chloroflexi* estiveram presentes e participaram da estrutura dos grânulos formados.

Bactérias deste filo podem também auxiliar no processo de granulação do lodo em reatores anammox, formando a estrutura inicial dos grânulos, servindo como núcleo ou suporte para a adesão de outros micro-organismos (CAO *et al.*, 2017). Alguns dos gêneros de *Chloroflexi* encontrados em reatores anammox são *Anaerolinea*, *Caldilinea* e *Longilinea* (PEREIRA *et al.*, 2014; GONZALEZ-GIL *et al.*, 2015, CAO *et al.*, 2017), sendo *Anaerolinea* e *Bellilinea* sp. encontradas no reator utilizado nesta pesquisa.

Leal *et al.* (2016) investigaram a comunidade microbiana em reator anammox e detectaram bactérias do grupo *Chloroflexi*. Os autores sugeriram que elas podem estar envolvidas na remoção de DQO. Destacaram também a presença da bactéria *Denitratisoma oestradiolicum*, que é heterotrófica desnitrificante e esteve presente durante todo o período experimental, o que também ocorreu nesta pesquisa, sendo que ela não foi detectada apenas no inóculo.

Dentre os micro-organismos encontrados no RBS pertencentes ao Filo *Proteobacteria*, destacou-se a bactéria *Denitratisoma oestradiolicum*, uma bactéria desnitrificante, presente em sistemas de lodos ativados que foi isolada em uma planta de tratamento de esgotos na Alemanha. Essa bactéria utiliza o 17beta-estradiol (E2) como fonte de carbono, oxidando-o a CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O e o NO<sub>3</sub><sup>-</sup> é reduzido a N<sub>2</sub>O e N<sub>2</sub> (FAHRBACH *et al.*, 2006). Esse micro-organismo foi encontrado em todas as etapas dessa pesquisa, o que pode ser explicado pelo inóculo utilizado para compor a biomassa do reator ser proveniente de lodos ativados.

Os micro-organismos que realizam o processo anammox pertencem ao domínio *Bacteria*, filo dos *Planctomycetes* e ordem *Brocadiales*, formando um grupo monofilético profundamente ramificado dentro do filo dos *Planctomycetes* e distinto dentro do domínio *Bacteria* (STROUS *et al.*, 1999a; SCHMID *et al.*, 2007; VAN NIFTRIK & JETTEN, 2012).

As bactérias pertencentes ao Filo dos *Planctomycetes* foram confirmadas em todas as amostras coletadas pela técnica da PCR com *primers* específicos (PLA46/Amx 820r). No perfil do gel de DGGE realizado a partir de *primers* para o domínio Bactéria, não foi possível identificar banda com sequência similar ao filo dos *Planctomycetes* nas amostras do inóculo e na amostra do final da fase 1 – 35 °C, o que pode ter ocorrido por alguma falha na execução da análise, uma vez que entre a coleta dessas duas amostras, houve a coleta do final do período de enriquecimento (160 dias), onde foi detectada banda semelhante ao gênero *Ca. Brocadia* (FIGURA 5.33). Logo, pode-se inferir que elas estiveram presentes na fase 1 mas não puderam ser detectadas, uma vez que a amostra da fase 1 detectou apenas *Anaerolinea*, *Denitratisoma oestradiolicum* e *Bellilinea sp.*

As bandas 4, 14, 18 e 24 foram identificadas como pertencentes ao gênero *Ca. Brocadia* (portanto, anammox) mas sem chegar a nível de espécie (*Bacteria não cultivável clone Dok57*) e as bandas 5, 15 e 19 foram aproximadamente relacionadas com as bactérias do gênero *Ca. Brocadia*, e a espécie encontrada, conforme a identificação do *Gen Bank (Blastn)* foi *Ca. Brocadia caroliniensis*, descrita recentemente por Vanotti *et al.* (2011). Essa espécie é comumente encontrada em reatores anammox de sistemas para tratamento de águas

residuárias (LEAL *et al.* 2016). Costa *et al.* (2014) através da técnica de Pirosequenciamento-454, encontraram para o inóculo de *wetland* sequências relacionadas à *Ca. Brocadia sp. 40*, *Ca. Brocadia fulgida* e *Ca. Brocadia carolinienses*. Persson *et al.* (2014) operando um reator escala piloto de 200 L com nitrificação e anammox a 19 °C, aplicando efluente de digestor de lodo anaeróbio também encontraram *Brocadia sp. 40* e *Brocadia caroliniensis* na biomassa.

Observa-se que o gênero *Ca. Brocadia* é o gênero dominante em reatores anammox, independente do tipo de lodo utilizado para a inoculação do reator. Micro-organismos deste gênero estão amplamente distribuídos, principalmente em sistemas de tratamento de efluentes (STROUS *et al.*, 1999a; KARTAL *et al.*, 2008; OSHIKI *et al.*, 2011; ARAÚJO *et al.*, 2011; VANOTTI *et al.*, 2011).

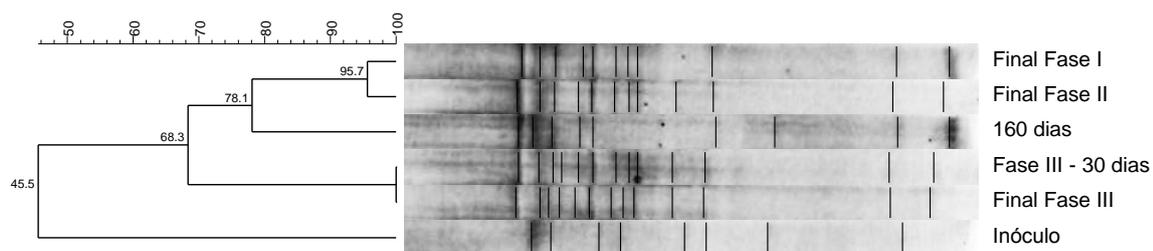
Isanta *et al.* (2015) concluíram que *Candidatus Brocadia* seria um *r*-estrategista (maior taxa de crescimento porém menor afinidade pelo substrato) enquanto *Candidatus Kuenenia* seria um *k*-estrategista (menor taxa de crescimento porém maior afinidade pelo substrato). Os autores investigaram o desempenho de um reator anammox antes e após a ocorrência de choque térmico de alta e longa duração (46 °C por 8 dias) e constataram que a população de anammox mudou de *Candidatus Kuenenia sp.*, dominante antes do choque de temperatura, para *Candidatus Brocadia anammoxidans*. Esta mudança na população foi de acordo com a hipótese de diferentes estratégias de consumo de substrato de *Brocadia* e *Kuenenia*.

No geral, percebeu-se que *Chloroflexi – Anaerolinaceae* foram detectadas no inóculo, na fase de enriquecimento e no final da fase 1 (reator alimentado com efluente real e temperatura de 35 °C). Mas, quando houve redução da temperatura de 35 para 25°C (fase 2) e depois para 20° C (fase 3), este grupo quase não foi mais detectado (as bandas relacionadas a *Chloroflexi* quase desapareceram), sugerindo que a redução da temperatura interferiu negativamente neste grupo (ou seja, a redução da temperatura foi desfavorável para este grupo). *Proteobacterias* como *Rhodocyclales* e *Myxococcales* foram detectadas apenas na etapa de enriquecimento, sugerindo que a aplicação do efluente anaeróbio no RBS foi capaz de inibir estes grupos, uma vez que a temperatura de operação mantida entre o enriquecimento e a fase seguinte (fase 1) foi a mesma – 35 °C.

Bactérias pertencentes à ordem *Burkholderiales*, que podem realizar a desnitrificação heterotrófica, foram detectadas no inóculo e nas amostras da fase 3 (reator alimentado com efluente anaeróbio real e operado à 20 °C). Já bactérias relacionadas à ordem *Rhodocyclales*, identificadas como *Denitratisoma oestradiolicum* foram identificadas em todas as amostras,

com exceção do inóculo. O metabolismo oxidativo através da respiração de nitrato e nitrito tem sido relatado em espécies de *Denitratisoma* (FAHRBACH *et al.* 2006), portanto este gênero pode representar o principal grupo de desnitrificantes neste RBS anammox alimentado com efluente anaeróbio real. Isto sugere que as últimas apresentam maior resistência e versatilidade quando comparada às primeiras, uma vez que o RBS foi submetido à redução de temperatura de 35 °C para 20 °C.

A Figura 5.34 apresenta o dendograma gerado pelo software *BioNumerics* a partir dos perfis populacionais obtidos pela técnica de DGGE, indicando os coeficientes de similaridade entre os perfis. A análise de agrupamentos separa as amostras em grupos que compartilham características semelhantes (perfis de conjuntos de bandas) a partir de uma matriz de similaridade que foi gerada da matriz de presença e ausência de bandas obtida nos géis de DGGE. O coeficiente de similaridade leva em consideração o número total de bandas apresentadas no DGGE e o número de bandas comuns presentes nas amostras.



**Figura 5.34** Dendograma baseado no perfil das bandas do gel de DGGE. Os valores nos pontos de ramificação do dendograma referem-se à similaridade.

O perfil obtido pelo gel de DGGE apresentou agrupamentos distintos. O que apresentou maior similaridade refere-se às amostras do final das fases 1 e 2. Nestas fases, a condição operacional mantida diferiu apenas na temperatura, a fase 1 mantida a 35 °C e a fase 2 a 25 °C. Foram detectadas bactérias do filo *Chloroflexi*, *Proteobacterias* como desnitrificantes e *Planctomycetes*. Estes resultados sugerem que as bactérias presentes puderam se adaptar e manter seu metabolismo nesta faixa de temperatura, uma vez que apresentaram 95,7% de similaridade entre as fases.

Gonzales-Martinez *et al.* (2016) em sua pesquisa, perceberam que a aclimação da biomassa de um reator CANON de 35 °C para 25 °C selecionou *Candidatus Brocadia* e *Candidatus Anammoxoglobus*, e também aumentou a representação dos gêneros *Anaerolinea*,

*Acidobacterium*, *Chloroflexis*, *Fluviicola* e *Prostheco bacter*, e sugeriram que a proliferação destes heterotróficos poderia ser causada por uma melhor adaptação destes filotipos a 25 °C do que a 35 °C. No presente trabalho, a redução da temperatura não selecionou para outro gênero ou espécie de anammox, uma vez que *Brocadia* esteve presente em todas as fases de operação do reator (nas 3 temperaturas testadas). Entretanto, a redução da temperatura de 35 para 20 °C parece ter selecionado negativamente bactérias do filo *Chloroflexi* que quase não foram mais detectadas.

A partir da Figura 5.34 também é possível observar que as fases 1 e 2 apresentaram 78,1% de similaridade com a amostra da etapa de enriquecimento, que foi realizado a 35 °C e meio de cultura autotrófico, indicando que a adição do efluente anaeróbio real (contendo matéria orgânica) selecionou alguns microrganismos que antes não estavam evidentes na fase de enriquecimento (como por exemplo, as desnitrificantes relacionadas à ordem *Rhodocyclaceae* – *Denitratisoma oestradiolicum*). Essas amostras juntas apresentaram apenas 68,3% de similaridade com as amostras da fase 3. Vale ressaltar que a ordem *Burkholderiales*, com excessão do inóculo, foi detectada apenas nas amostras da fase 3. Por fim, todas essas amostras agrupadas apresentaram apenas 45,5% de similaridade com a amostra do inóculo, indicando que as condições operacionais (meio autotrófico e depois efluente anaeróbio real, além da temperatura, foram responsáveis pela seleção das bactérias presentes no reator).

## 6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados do presente estudo e em trabalhos anteriores de enriquecimento de bactérias com atividade anammox conduzidas pelo grupo de pesquisa em Microbiologia aplicada ao Saneamento (realizados neste Programa de Pós-graduação), o lodo ativado de estação de tratamento de esgotos domésticos foi um excelente inóculo para o cultivo de bactérias anammox.

As condições operacionais testadas revelaram que as bactérias com atividade anammox se mostraram resistentes à rápida mudança de temperatura, mantendo seu metabolismo sem prejuízos à eficiência do processo. A remoção de DQO, nitrito e amônio se mostrou mais eficiente à temperatura de 25 °C comparada a 35 e 20 °C. Os resultados indicaram que o processo pode ser aplicado com estabilidade ao pós-tratamento de efluentes de reatores UASB tratando esgoto doméstico com DQO remanescente em torno de 100 mg.L<sup>-1</sup> sem efeitos de inibição, em regiões onde o efluente a ser tratado apresente temperatura média de 25 °C. Além disso, foi possível verificar a remoção simultânea de DQO e amônio, confirmando que bactérias com atividade anammox e desnitrificantes puderam coexistir em um mesmo reator, o que indica o processo como uma alternativa promissora ao pós-tratamento de efluentes domésticos.

Bactérias desnitrificantes (relacionadas à *Rhodocyclales* - *Denitratisoma oestradiolicum*) foram detectadas e identificadas (através de análise de biologia molecular) em amostras de todas as fases de operação do reator (exceto no inóculo), uma vez que matéria orgânica oriunda da morte e lise celular (durante o enriquecimento) e, em seguida durante a alimentação com efluente anaeróbico real (com DQO residual), estava presente. Bactérias organotróficas relacionadas à *Chloroflexi* estiveram presentes durante a fase de enriquecimento e durante a fase de alimentação com efluente real à temperatura de 35° C, mas a redução da temperatura de 35 para 20° C selecionou negativamente este grupo.

As bactérias pertencentes ao Filo dos *Planctomycetes* não foram detectadas no inóculo do RBS pelo DGGE, porém foram detectadas ao final da etapa de enriquecimento (*Brocadiaceae* e *Ca. Brocadia sp*) e posteriormente ao longo da operação com efluente anaeróbico e diferentes temperaturas. As sequências de anammox detectadas no presente trabalho foram relacionadas à *Ca. Brocadia caroliniensis* e *Ca. Brocadia sp*. A redução da temperatura de 35 para 20 °C não afetou negativamente as bactérias com atividade anammox.

## REFERÊNCIAS

- ABMA, W. R.; DRIESSEN, W.; HAARHUIS, R.; VAN LOODSDRECHT, M. C. M. Upgrading of sewage treatment plant by sustainable of industrial wastewater. *Water Science and Technology*, v. 61 (7), p. 1715-1722, 2010.
- AHN, Y. O. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: a review. *Process Biochemistry*, 41:1709-1721, 2006.
- ALI, M. e OKABE, S. Anammox-based technologies for nitrogen removal: Advances in process start-up and remaining issues. *Chemosphere*, v. 141, p. 144–153, 2015.
- ALI, M.; OSHIKI, M.; AWATA, T.; ISOBE, K.; KIMURA, Z.; YOSHIKAWA, H.; HIRA, D.; KINDAICHI, T.; SATOH, H.; FUJII, T.; OKABE, S. Physiological characterization of anaerobic ammonium oxidizing bacterium ‘*Candidatus Jettenia caeni*’. *Environmental Microbiology*, v. 17, p. 2172–2189, 2015.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.; LIPMAN, D. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- AMANO, T.; YOSHINAGA, I.; YAMAGISHI, T.; THUOC, C. V.; THU, P. T.; UEDA, S.; KATO, K.; SAKO, Y.; SUWA, Y. Contribution of anammox bacteria to benthic nitrogen cycling in a mangrove forest and shrimp ponds, Haiphong, Vietnam. *Microbes Environ* v. 26, p. 1–6, 2011.
- ANJALI, G., SABUMON, P.C. Unprecedented development of anammox in presence of organic carbon using seed biomass from a tannery common effluent treatment plant (CETP). *Bioresour. Technol.* V. 153, p. 30–38, 2014.
- APHA - American Public Health Association. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 22 ed, Washington, DC, 2012.
- ARAÚJO, J. C.; CAMPOS, A. C.; CORREA, M. M.; SILVA, E. C.; MATTÉ, M. H.; MATTÉ, G. R.; VON SPERLING, M.; CHERNICHARO, C. A. L. Anammox bacteria enrichment and characterization from municipal activated sludge. *Water Science and Technology*, v. 64, p. 1428-1434, 2011.
- AUSTIN, A. T.; BUSTAMANTE, M. M. C.; NARDOTO, G. B.; MITRE, S. K.; PÉREZ, T.; OMETTO, J. P. H. B.; ASCARRUNZ, N. L.; FORTI, M. C.; LONGO, K.; GAVITO, M. E.; ENRICH-PRAST, A.; MARTINELLI, L. A. Latin America’s Nitrogen Challenge. *Science*, v.340, p. 149, 2013.
- AWATA, Takanori *et al.* Physiological characterization of an anaerobic ammonium-oxidizing bacterium belonging to the “*Candidatus Scalindua*” group. *Applied and environmental microbiology*, v. 79, n. 13, p. 4145-4148, 2013.
- BAIRD, C. *Química ambiental*. Porto Alegre. Bookman, 2002.
- BANIHANI, Q., SUN, A., FIELD, J. A., SIERRA-ALVAREZ R. Enrichment of Anaerobic Ammonium Oxidizing (Anammox) Bacteria from Wastewater Sludge. *12th World Congress on Anaerobic Digestion (AD12)*, Guadalajara, México, 2010.
- BERNHARD, Anne. The nitrogen cycle: Processes, players, and human impact. *Nature Education Knowledge*, v. 3, n. 10, p. 25, 2012.
- BI, Z.; TAKEKAWA, M.; PARK, G.; SODA, S.; QIAO, S.; IKE, M. Effects of the C/N ratio and bacterial populations on nitrogen removal in the simultaneous anammox and

heterotrophic denitrification process: Mathematic modeling and batch experiments. *Chemical Engineering Journal*, v. 280, p. 606-613, 2015.

BITTON, G.. *Wastewater Microbiology*. Wiley Liss Pub., New York, 449 p., 2005.

BLACKBURNE, Richard; YUAN, Zhiguo; KELLER, Jürg. Demonstration of nitrogen removal via nitrite in a sequencing batch reactor treating domestic wastewater. *Water Research*, v. 42, n. 8, p. 2166-2176, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Instituto Nacional e Meteorologia. *Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa*. 2016. Brasília: MAPA. Disponível em: <[http://www.inmet.gov.br/projetos/rede/pesquisa/gera\\_serie\\_txt\\_mensal.php?&mRelEstacao=83587&btnProcesso=serie&mRelDtInicio=01/01/2015&mRelDtFim=31/12/2015&mAtributos=,,,,,,1,,>](http://www.inmet.gov.br/projetos/rede/pesquisa/gera_serie_txt_mensal.php?&mRelEstacao=83587&btnProcesso=serie&mRelDtInicio=01/01/2015&mRelDtFim=31/12/2015&mAtributos=,,,,,,1,,>)>. Acesso em: 19 de novembro de 2016.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. Resolução CONAMA nº 430 de 13 de maio de 2011. Disponível em: <<http://www.saude.mg.gov.br>> Acesso em 5 de abril de 2016.

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

BOTHE, H., FERGUSON, S. J., NEWTON, W. E. *Biology of the Nitrogen Cycle*. Elsevier. 2007, 427 p.

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

CAMPOS, A. P. *Enriquecimento e caracterização de bactérias anammox para a remoção de nitrogênio amoniacal de efluentes*. Belo Horizonte, 2010, 122 p. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

CAO, Yeshi; VAN LOOSDRECHT, Mark CM; DAIGGER, Glen T. Mainstream partial nitritation–anammox in municipal wastewater treatment: status, bottlenecks, and further studies. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 101, n. 4, p. 1365-1383, 2017.

CAO, Y.; HONG, K.B.; ZHOU, Y.; LIU, Y.; JIANZHONG, H.; CHYE, C.S.; LONG, W.Y.; GHANI, Y. The mainstream partial nitritation/anammox nitrogen removal process in the largest water reclamation plant in Singapore. *J. Beijing Univ. Technol.* v. 41, 2015.

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

CASTAÑEDA-CHAVEZ, M. R.; GALAVIZ-VILLA, I.; LANDEROS-SANCHEZ, C.; LANGO-REYNOSO, F.; MARTINEZ-DÁVILA, J.; NIKOLSKII-GAVILOV, I. Agricultural contamination of subterranean water with nitrates and nitrites: na environmental and public health problem. *Journal of Agricultural Science*, p. 17-21, 2010.

CAVALVANTI, J. E. W. A. *Manual de tratamento de efluentes industriais*. 2 ed. São Paulo: Engenho Editora Técnica Ltda, 2012, 500 p.

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

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

CHATTERJEE, Pritha; GHANGREKAR, M. M.; RAO, Surampalli. Development of anammox process for removal of nitrogen from wastewater in a novel self-sustainable biofilm reactor. *Bioresource Technology*, v. 218, p. 723-730, 2016.

CHEN, H.; LIU, S.; YANG, F. XUE, Y.; WANG, T. The development of simultaneous partial nitrification, ANAMMOX and denitrification (SNAD) process in a single reactor for nitrogen removal. *Bioresour. Technol.*, v. 100, p. 1548-1554, 2009.

CHO, S.; TAKAHASHI, Y.; FUJII, N.; YAMADA, Y.; SATOH, H.; OKABE, S. Nitrogen removal performance and microbial community analysis of an anaerobic up-flow granular bed anammox reactor. *Chemosphere*, v. 78, p. 1129-1135, 2010.

CHRISTENSSON, M.; EKSTRO M, S.; LAMAIRE, R.; LE VAILLANT, E.; BUNDGAARD, E.; CHAUZY, J.; STALHANDSKE, L.; HONG, Z.; EKEMBERG, M. ANITA Mox - a biofarm solution for fast startup of deammonifying MBBRs. *WEFTEC11*, Los Angeles, CA, 2011.

COSTA, M. C. M. S. *Impacto do tipo de inóculo e das condições operacionais sobre a estrutura da comunidade bacteriana e desempenho do processo anammox em biofiltros usando espuma de poliuretano como meio suporte dos micro-organismos*. Belo Horizonte, 2013, 127 p. Tese (Doutorado) Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

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

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

DAPENA-MORA, A.; VAN HULLE, S.W.H.; CAMPOS, J.L.; MENDEZ, R.; VAN ROLLEGHEM, P.A.; JETTEN, M.; Enrichment of anammox biomass from municipal activated sludge: experimental and modelling results. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, v. 79, n. 12, p. 1421-1428, 2004.

DATE, Y.; ISAKA, K.; IKUTA, H.; SUMINO, T.; KANEKO, N.; YOSHIE, S.; TSUNEDA, S.; INAMORI Y. Microbial diversity of anammox bacteria enriched from different types of seed sludge in an anaerobic continuous-feeding cultivation reactor. *Journal of bioscience and bioengineering*. v. 103. p. 281-286. 2009.

DAVEREY, A., CHEI, P. C., DUTTA, K., and LIN, J. G. Statistical analysis to evaluate the effects of temperature and pH on anammox activity. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 102, p. 89-93, 2015.

DE PRÁ, MARINA C.; KUNZ, A.; BORTOLI, M.; PERONDI, T.; CHINI, A.; SOARES, H. M. Partial nitrification + ANAMMOX process for nitrogen removal from swine wastewater. In:

- ANNUAL INTERNATIONAL MEETING SPONSORED BY ASABE, 2012, Dallas. *Proceedings...* Dallas: ASABE, 2012.
- DESLOOVER, J.; DE CLIPPELEIR, H.; BOECKX, P.; DU, L.G.; COLSEN, J.; VERSTRAETE, W.; VLAEMINCK, S.E. Floc-based sequential partial nitrification and anammox at full scale with contrasting N<sub>2</sub>O emissions. *Water Research*. 2011.
- DOSTA, J.; FERNANDEZ, I.; VAZQUEZ-PADIN, J. R.; MOSQUERA-CORRAL, A.; CAMPOS, J. L.; MATA-ALVAREZ, J; MENDEZ, R. Short-and long-term effects of temperature on the Anammox process. *Journal of Hazardous Materials*, v. 154, n. 1, p. 688-693, 2008.
- EGLI, K.; BOSSHARD, F.; WERLEN, C.; LAIS, P.; SIEGRIST, H.; ZEHNDER, A. J. B.; VAN DER MEER, J. R. Microbial composition and structure of a rotating biological contactor biofilm treating ammonium-rich wastewater without organic carbon. *Microbial Ecology*, v.45, p.419-432, 2003.
- EGLI, K.; FANGER, U.; ALVAREZ, P. J. J.; SIEGRIST, H.; VAN DER MEER, J. R.; ZEHNDER, A. J. B. Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate. *Arch Microbiol* v. 175, p. 198–207, 2001.
- FAHRBACH, M.; KUEVER, J.; MEINKE, R.; KÄMPFER, P.; HOLLENDER, J. *Denitratisoma oestradiolicum* gen. nov., sp. nov., a 17beta-oestradiol-degrading, denitrifying betaproteobacterium., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* v. 56, p. 1547–1552, 2006.
- FERNANDÉZ, I.; DOSTA, J.; FAJARDO, C.; CAMPOS, J. L.; MOSQUERA-CORRAL, A.; MÉNDEZ, R. Short- and long-terms effects of ammonium and nitrite on the anammox process. *Journal and Environmental Management*, v. 95, p. 170-174, 2012.
- FERRIS, M. J.; MUYZER, G.; WARD, D. M. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16 rRNA – Defined populations inhabiting a hot spring microbial mat communit. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, p. 340-346, 1996.
- FUCHSMAN, C. A.; STALEY, J. T.; OAKLEY, B. B.; KIRKPATRICK, J. B.; MURRAY, J. W. Free-living and aggregate-associated Planctomycetes in the Black Sea. *FEMS Microbiol Ecol* v. 80, p. 402–416, 2012.
- FUERST, J. A.; SAGULENKO, E. Beyond the bacterium: Planctomycetes challenge our concepts of microbial structure and function. *Nature Reviews*, v. 9, n. 6, p. 403-413, 2011.
- FURUKAWA, K.; INATOMI, Y.; QIAO, S.; QUAN, L.; YAMAMOTO, T.; KAZUICHI, I.; SUMINO, T. Innovative treatment system for digester liquor using anammox process. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 5437-5443, 2009.
- FUX, C.; SIEGRIST, H. Nitrogen removal from sludge digester liquids by nitrification/denitrification or partial nitrification/anammox: environmental and economical considerations. *Water Science and Technology*, v. 50 (10), p. 19-26, 2004.
- GAO, D. W.; TAO, Y. Versatility and application of anaerobic ammonium- oxidizing bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 91, n. 4, p. 887-894, 2011.
- GARRITY, G. M. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*: The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes. 2<sup>a</sup> ed. Springer, 949 p. 2010.
- GARRITY, G. M. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*: The Proteobacteria Part C. 2<sup>a</sup> ed. Springer, 575 p. 2005.

- GERARDI, M. H. *Wastewater bacteria*. Estados Unidos, 255 p., 2006.
- GILBERT, E.M.; AGRAWAL, S.; KARST, S.M.; HORN, H.; NIELSEN, P.H.; LACKNER, S. Low temperature partial nitrification/anammox in a moving bed biofilm reactor treating low strength wastewater. *Environ Sci Technol*. (2014a).
- GILBERT, E. M., AGRAWAL, S., BRUNNER, F., SCHWARTZ, T., HORN, H., LACKNER, S. Response of different *Nitrospira* species to anoxic periods depends on operational DO. *Environmental science & technology*, v. 48, n. 5, p. 2934-2941, 2014b.
- GONZALEZ-GIL, G.; SOUGRAT, R.; BEHZAD, A. L.; LENS, P. N. L.; SAIKALY, P. E. Microbial community composition and ultrastructure of granules from a full-scale anammox reactor. *Microbiology Ecology*, v. 78, p. 118-131, 2015.
- GONZALEZ-MARTINEZ, A., RODRIGUEZ-SANCHEZ, A., GARCIA-RUIZ, M. J., MUÑOZ-PALAZON, B., CORTES-LORENZO, C., OSORIO, F., & VAHALA, R. Performance and bacterial community dynamics of a CANON bioreactor acclimated from high to low operational temperatures. *Chemical Engineering Journal*, v. 287, p. 557-567, 2016.
- GUO, Q.; XING, B.-S.; LI, P.; XU, J.-L.; YANG, C.-C.; JIN, R.-C. Anaerobic ammonium oxidation (anammox) under realistic seasonal temperature variations: characteristics of biogranules and process performance. *Bioresour. Technol.* v. 192, p. 765–773, 2015.
- GÜVEN, D.; DAPENA, A.; KARTAL, B.; SCHIMID, M. C.; MAAS, B.; VAN DE PAS-SCHOONEM, K.; SOZEN, S.; MENDEZ, R.; OP DEN CAMP, H. J. M.; JETTEN, M.; STROUS, M.; SCHIMIDT, I. Propionate oxidation by and methanol inhibition of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 2, p. 1066-1071, 2005.
- HAN, M.; DE CLIPPELEIR, H.; AL-OMARI, A.; WETT, B.; VLAEMINCK, S.E.; BOTT, C.; MURTHY, S. Impact of carbon to nitrogen ratio and aeration regime on mainstream deammonification. *Water Science Technology*. 2016.
- HENDRICKX, T. L.; WANG, Y.; KAMPMAN, C.; ZEEMAN, G.; TEMMINK, H., BUISMAN, C. J. Autotrophic nitrogen removal from low strength waste water at low temperature. *Water research*, v. 46, n. 7, p. 2187-2193, 2012.
- HEYLEN, Kim; LEBBE, Liesbeth; DE VOS, Paul. *Acidovorax caeni* sp. nov., a denitrifying species with genetically diverse isolates from activated sludge. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 58, n. 1, p. 73-77, 2008.
- HONG, Y. G.; LI, M.; CAO, H. L.; GU, J. D. Residence of habitat-specific Anammox bacteria in the deep-sea subsurface sediments of the South China Sea: analyses of marker gene abundance with physical chemical parameters. *Microbial Ecology*, v. 62, p. 36–47, 2011.
- HU, Z.; LOTTI, T.; DE KREUK, M.; KLEEREBEZEM, R.; VAN LOOSDRECHT, M.; KRUIT, J.; JETTEN, M.S.S.; KARTAL, B. Nitrogen removal by a nitrification-anammox bioreactor at low temperature. *Applied and environmental microbiology*, v. 79, n. 8, p. 2807-2812, 2013.
- HU, Z.; SPETH, D. R.; FRANCOIJS, K.; QUAN, Z.; JETTEN, M.S.M. Metagenome analysis of a complex community reveals the metabolic blueprint of anammox bacterium “*Candidatus Jettenia asiática*”. *Frontiers in Microbiology*, v. 3 (366), p. 1-9, 2012.
- HU, B. L.; RUSH, D.; VAN DER BIEZEN, E.; ZHENG, P.; VAN MULLEKOM, M.; SCHOUTEN, S.; DAMSTÉ, J. S. S.; SMOLDERS, A. J. P.; JETTEN, M. S. M.; KARTAL, B. New anaerobic, ammonium-oxidizing community enriched from peat soil. *Appl Environ Microbiol* v. 77, n. 3, p. 966–971, 2011.

- HUG, L. A., CASTELLE, C. J., WRIGHTON, K. C., THOMAS, B. C., SHARON, I., FRISCHKORN, K. R. WILLIAMS, K. H., TRINGE, S. G. & BANFIELD, J. F Community genomic analyses constrain the distribution of metabolic traits across the Chloroflexi phylum and indicate roles in sediment carbon cycling. *Microbiome*, v. 1, n. 1, p. 22, 2013.
- INOUE, J.; OSHIMA, K.; SUDA, W.; SAKAMOTO, M.; IINO, T; NODA, S.; HONGO, Y.; HATTORI, M.; OHKUMA, M. Distribution and evolution of nitrogen fixation genes in the Phylum Bacteroidetes. *Microbes and Environments*, v. 30 (1), p. 44-50, 2015.
- ISAKA, K.; SUWA, Y.; KIMURA, Y.; YAMAGISHI, T.; SUMINO, T.; TSUNEDA, S. Anaerobic ammonium oxidation (Anammox) irreversibly inhibited by methanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v. 81, n. 2, p. 379–385, 2008.
- ISANTA, E.; BEZERRA, T.; FERNÁNDEZ, I.; SUÁREZ-OJEDA, M. E.; PÉREZ, J., CARRERA, J. Microbial community shifts on an anammox reactor after a temperature shock using 454-pyrosequencing. *Bioresource Technology*, v. 181, p. 207-213, 2015.
- JAISWAL, S.K.; MANDAL, D.; VISWESWARA RAO, R.V.R.L. Recovery and reuse of nitric acid from effluents containing free nitric acid in absence and presence of metal nitrates. *Chemical Engineering Journal* 266, 271–278, 2015.
- ISAKA, K.; SUWA, Y.; KIMURA, Y.; YAMAGISHI, T.; SUMINO, T.; TSUNEDA, S. Anaerobic ammonium oxidation (Anammox) irreversibly inhibited by methanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v. 81, n. 2, p. 379–385, 2008.
- JENNI, S. S.; VILLEZ, K.; MORGENROTH, E.; UDERT, K. M. Observability of anammox activity in single-stage nitrification/anammox reactors using mass balances. *Water Res. Technol.*, v. 1, p. 523-534, 2015.
- JENNI, S. S; VLAEMINCK, E.; MORGENROTH, E.; UDERT, K. M. Successful application of nitrification/anammox to wastewater with elevated organic carbon to ammonia ratios. *Water Research*. v.49, p. 316-326. 2014.
- JETTEN, M. S. M., NIFTRIK, L. V. V., STROUS, M., KARTAL, B., KELTJENS, J. T., AND OP DEN CAMP, H. J., Biochemistry and molecular biology of Anammox bacteria. *Critical reviews in Biochemistry and Molecular biology*. v. 44, n. 2-3, p. 65–84, 2009.
- JETTEN, M. S. M. The microbial nitrogen cycle. *Environmental Microbiology*, v. 10, p. 2903-2909, 2008.
- JETTEN, M. S. M.; WAGNER, M.; FUERST, J. A.; VAN LOOSDRECHT, M.; KUENEN, J. G.; STROUS, M. Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation (“anammox”) process. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 12, n. 3, p. 283–288, 2001.
- JETTEN, M. S. M., STROUS, M., VAN DE PAS-SCHOONEN, K. T., SCHALK, J., VAN DONGEN, U. G., VAN DE GRAAF, A. A., LOGEMANN, S., MUYZER, G., VAN LOOSDRECHT, M. C., KUENEN, J. G. The anaerobic oxidation of ammonium. *Microbiol Rev*, v.22, p. 421–437, 1998.
- JETTEN, M. S. M., HORN, S.J., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., Towards a more sustainable wastewater treatment system. *Water Science and Technology* 35, 171-180, 1997.
- JIN, R.; YANG, G.; YU, J.; ZHENG, P. The inhibition of anammox process: a review. *Chemical Engineering Journal*, v. 197, p. 67-79, 2012.
- JOSS, A.; SALZGEBER, D.; EUGSTER, J.; KONIG, R.; ROTTERMANN, K.; BURGER, S.; FABIJAN, P.; LEUMANN, S.; MOHN, J.; SIEGRIST, H. Full-scale nitrogen removal from digester liquid with partial nitrification and anammox in one SBR. *Environ Sci Technol* v. 43, p. 5301–5306, 2009.

- KAMPSCHREUR, M. J.; TEMMINK, H.; KLEEREBEZEM, R.; JETTEN, M. S. M.; LOOSDRECHT, M. C. M. V. Nitrous oxide emission during wastewater treatment. *Water Research*, v. 43, p. 4093-4103, 2009.
- KARTAL, B.; ALMEIDA, N. M.; MAALCKE, W. J.; CAMP, H. J.; JETTEN, M. S.; KELTJENS, J. T. How to make a living from anaerobic ammonium oxidation. *FEMS microbiology reviews*, v. 37, n. 3, p. 428-461, 2013.
- KARTAL, B.; VAN NIFTRIK, L.; KELTJENS, J. T.; OP DEN CAMP, H. J. M.; JETTEN, M. S. M. Anammox-growth physiology, cell biology and metabolism. *Microbial Physiology*, vol. 60, p. 211–262, 2012.
- KARTAL, B.; KUENEN, J. G.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Sewage treatment with anammox. *Science* v. 328, n. 5979, p. 702–703, 2010.
- KARTAL, B.; VAN NIFTRIK, L.; RATTRAY, J.; VAN DE VOSSENBERG, J. L. C. M.; SCHMID, M. C.; DAMSTÉ, J. S. S.; JETTEN, M. S. M.; STROUS, M. Candidatus 'Brocadia fulgida': an autofluorescent anaerobic ammonium oxidizing bacterium. *FEMS Microbiol Ecol* v. 63, n. 1, p. 46–55, 2008.
- KARTAL, B.; RATTRAY, J.; VAN NIFTRIK, L. A.; VAN DE VOSSEMBERG, J.; SCHMID, M. C.; WEBB, R. I.; SCHOUTEN, S.; FUERST, J. A.; DAMSTÉ, J. S.; JETTEN, M. S. M.; STROUS, M. Candidatus "Anammoxoglobus propionicus" a new propionate oxidizing species of anaerobic oxidizing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 30, p. 39-49, 2007a.
- KARTAL, B., KUYPERS, M. M., LAVIK, G., SCHALK, J., OP DEN CAMP, H. J., JETTEN, M. S., e STROUS, M. Anammox bacteria disguised as denitrifiers: nitrate reduction to dinitrogen gas via nitrite and ammonium. *Environmental microbiology*, v. 9, n. 3, p. 635-642, 2007b.
- KHRAMENKOV, S. V.; KOZLOVA, M. N.; KEVBRINAA, M. V.; DOROFEEVA, A. G.; KAZAKOVAA, E. A.; GRACHEVA, V. A.; KUZNETSOVB, B. B.; POLYAKOV, D. Y.; NIKOLAEVA, Y. A. A novel bacterium carrying out anaerobic ammonium oxidation in a reactor for biological treatment of the filtrate of wastewater fermented sludge. *Microbiology*, v. 82, p. 628 -636, 2013.
- KIELING, D. D. *Estudo da remoção biológica de nitrogênio a partir de lodo nitrificante cultivado em meio autotrófico sob condições anóxicas*. Florianópolis, 2004, 106 p. Dissertação (Mestrado). Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.
- KIMURA, YUYA; ISAKA, KAZUICHI; KAZAMA, FUTABA. Effects of inorganic carbon limitation on anaerobic ammonium oxidation (anammox) activity. *Bioresource technology*, v. 102, n. 6, p. 4390-4394, 2011.
- KINDAICHI, T.; YURI, S.; NORIATSU, O.; OHASHI, A. Ecophysiological role and function of unculture Chloroflexi in an anammox reactor. *Water Science and Technology*, v. 66 (12), p. 2556-2561, 2012.
- KINDAICHI, T.; ITO, T.; OKABE, S. Ecophysiological interaction between nitrifying bacteria and heterotrophic bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by MAR-FISH. *Appl Environ Microbiol*. v. 70(3), p.1641–1650, 2004.
- KOUBA, V., WIDIAYUNINGRUM, P., CHOVANCOVA, L., JENICEK, P., & BARTACEK, J. Applicability of one-stage partial nitritation and anammox in MBBR for anaerobically pre-treated municipal wastewater. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, v. 43, n. 7, p. 965-975, 2016.

- KRAGELUND, C.; THOMSEN, T. R.; MIELCZAREK, A. T.; NIELSEN, P. H. Eikelboom's morphotype 0803 in activated sludge belongs to the genus *Caldilinea* in the phylum Chloroflexi. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 76, p. 451-462, 2011.
- KUAI, L.; VERSTRAETE, W. Ammonium removal by Oxygen-Limited Autotrophic Nitrification-Denitrification system. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, n. 11, p. 4500-4506, 1998.
- KUENEN, J. G. Anammox bacteria: from discovery to application. *Nature*, v. 6, n. 4, p. 320-326, 2008.
- KUNZ, A.; MIELE, M.; STEINMETZ, R. L. R. Advanced swine manure treatment and utilization in Brazil. *Bioresource technology*, v. 100, n. 22, p. 5485-5489, 2009.
- KUNZ, A.; STEINMETZ, R.; VANOTTI, A. S.; SOARES, H. M. Development of a New Generation Low Cost Treatment of Ammonia for Livestock Effluents Using Anammox and Nitritation. In: *13th RAMIRAN International Conference*, 2008, p.255-258, 2008.
- KUNZ, A.; VANOTTI, M.; SZOGI, A.; GONZALES, M. C. G.; SCHIERHOLT NETO, G. F.; SOARES, H. M. Development of Anammox process for animal waste treatment: Experiences in Brazil. In: *International Symposium on Air Quality and Waste Management for Agriculture*, 2007.
- LACKNER, S., GILBERT, E.M., VLAEMINCK, S.E., JOSS, A., HORN, H., VAN LOOSDRECHT, M.C.M. Full-scale partial nitritation/anammox experiences—an application survey. *Water Res.* v. 55, p. 292–303, 2014.
- LACKNER, S.; TERADA, A.; SMETS, B. F. Heterotrophic activity compromises autotrophic nitrogen removal in membrane-aerated biofilms: results of a modeling study. *Water Research*, v. 42, p. 1101-1112, 2008.
- LAHAV, O.; BAR MASSADA, I.; YACKOUBOV, D.; ZELIKSON, R.; MOZES, N.; TAL, Y.; TARRE, S. Quantification of anammox activity in a denitrification reactor for a recirculating aquaculture system. *Aquaculture* v. 288, p. 76–82, 2009.
- LAM, P.; KUYPERS, M. M. M. Microbial nitrogen cycling processes in oxygen minimum zones. *Ann Rev Mar Sci* vol. 3, p. 317–345, 2011.
- LARA, B. S. *Avaliação e comparação de diferentes estratégias para o enriquecimento de bactérias anammox*. Belo Horizonte, 2009, 109 p. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.
- LAURENI, M.; WEISSBRODT, D. G.; SZIVÁK, I.; ROBIN, O.; NIELSEN, J. L., MORGENROTH, E., e JOSS, A. Activity and growth of anammox biomass on aerobically pre-treated municipal wastewater. *Water research*, v. 80, p. 325-336, 2015.
- LEAL, C. D.; PEREIRA, A. D.; NUNES, F. T.; FERREIRA, L. O.; COELHO, A. C. C.; BICALHO, S. K. S.; MAC CONELL, E. F. A.; RIBEIRO, T. B.; CHERNICHARO, C. A. L.; ARAÚJO, J. C. A. Anammox for nitrogen removal from anaerobically pre-treated municipal wastewater: effect of COD/N ratios on process performance and bacterial community structure. *Bioresource Technology*, v. 211, p. 257-266, 2016.
- LEAL, C. D. *Avaliação do efeito de diferentes relações DQO/N sobre o processo anammox e a viabilidade da aplicação do processo como pós-tratamento de efluente de reator UASB tratando esgoto doméstico*. Belo Horizonte, 2015, 123 p. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

- LEMAIRE, R.; LIVIANO, I.; EKSTRÖM, S.; ROSELIUS, C.; CHAUZY, J.; THORNBERG D.; THIRSING, S.; DELERIS, S. 1-stage Deammonification MBBR process for reject water sidestream treatment: investigation of start-up strategy and carriers design. *Conference Proceedings WEF Nutrient Recovery and Management*, Miami, January 2011.
- LI, X.J.; SUN, S.; BADGLEY, B.D.; SUNG, S.H.; ZHANG, H.S.; HE, Z. Nitrogen removal by granular nitrification/anammox in an upflow membrane-aerated biofilm reactor. *Water Research*. v. 94, p.23–31, 2016.
- LI, M.; HONG, Y. G.; CAO, H. L.; GU, J. D. Mangrove trees affect the community structure and distribution of anammox bacteria at an anthropogenic-polluted mangrove in the Pearl River Delta reflected by 16S rRNA and hydrazine oxidoreductase (HZO) encoding gene analyses. *Ecotoxicology* v. 20, p. 1780–1790, 2011.
- LI, H.; CHEN, S.; MU, B. Z.; GU, J. D. Molecular detection of anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria in high-temperature petroleum reservoirs. *Microb Ecol* v. 60, p. 771–783, 2010.
- LIANG, Z.; LIU, J. X. Landfill leachate treatment with a novel process: anaerobic ammonium oxidation (Anammox) combined with soil infiltration system. *Journal of Hazardous Materials*, v. 151, p. 202–212, 2008.
- LI-DONG, S.; AN-HUI, H.; REN-CUN, J.; DONG-QING, C.; PING, Z.; XIANG-YANG, X.; BAO-LAN, H. Enrichment of anammox bacteria from three sludge sources for the start up of monosodium glutamate industrial wastewater treatment system. *Journal of Hazardous Materials*, v. 199, p. 193-199, 2012.
- LINDSAY, M. R.; WEBB, R. I.; STROUS, M.; JETTEN, M. S.; BUTLER, M. K.; FORDE, R. J.; FUERST, J. A. Cell compartmentalisation in Planctomycetes: novel types of structural organisation for the bacterial cell. *Archives Microbiology*, v. 175, p. 413– 429, 2001.
- LIU, C., ZHAO, D., YAN, L., WANG, A., GU, Y., LEE, D.-J., 2015. Elemental sulfur formation and nitrogen removal from wastewaters by autotrophic denitrifiers and anammox bacteria. *Bioresour. Technol.* V. 191, p. 332–336, 2015.
- LIU, S.; HORN, H. Effects of Fe(II) and Fe(III) on the single-stage deammonification process treating high-strength reject water from sludge dewatering. *Bioresource Technology*, v. 114, p. 12-19, 2012.
- LIU, S; GONG, Z; ZHANG, H; SHI, L; FURUKAWA, K. Combined process of urea nitrogen removal in anaerobic anammox co-culture reactor. *Bioresource Technology*, v 99, p. 1722-1728, 2008a.
- LIU, S. T.; YANG, F. L.; GONG, Z.; MENG, F. G.; CHEN, H. H.; XUE, Y.; FURUKAWA, K. Application of anaerobic ammonium-oxidizing consortium to achieve completely autotrophic ammonium and sulfate removal. *Bioresour Technol* v. 99, n. 15, p. 6817–6825, 2008b.
- LÓPEZ, H.; PUIG, S.; GANIGUÉ, R.; RUSCADELLA, M.; BALAGUER, M. D.; COLPRIM, J. Start-up and enrichment of a granular anammox SBR to treat high nitrogen load wastewaters. *Journal of Chemical Technology and biotechnology*, v. 83, p. 233-241, 2008.
- LOPEZ-VAZQUEZ, C.M., KUBARE, M., SAROJ, D.P., CHIKAMBA, C., SCHWARZ, J., DAIMS, H., BRDJANOVIC, D. Thermophilic biological nitrogen removal in industrial wastewater treatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 945–956. 2014
- LOTTI, T.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Effect of temperature change on anammox activity. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 112 (1), p. 98-103, 2015.

- LOTTI, T.; KLEEREBEZEM, R.; HU, Z.; KARTAL, B.; JETTEN, M. S. M.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Simultaneous partial nitritation and anammox at low temperature with granular sludge. *Water research*, v. 66, p. 111-121, 2014a.
- LOTTI, T.; KLEEREBEZEM, R.; VAN ERP TAALMAN KIP, C.; HENDRICKX, T. L.; KRUIT, J.; HOEKSTRA, M.; VAN LOOSDRECHT, M. C. Anammox growth on pretreated municipal wastewater. *Environmental science & technology*, v. 48, n. 14, p. 7874-7880, 2014b.
- LOTTI, T.; Van der Star, W. R. L.; KLEEREBEZEM, R.; Lubello, C.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. The effect of nitrite inhibition on the anammox process. *Water research*, v. 46, n. 8, p. 2559-2569, 2012.
- LUZ, G. L.; MEDEIROS, S. L. P.; MANFRON, P. A.; AMARAL, A. D.; MÜLLER, L.; TORRES, M. G.; MENTGES, L. A questão do nitrato em alface hidropônica e a saúde humana. *Ciência Rural*, v. 38, p. 2388-2394, 2008.
- MA, B.; WANG, S.; CAO, S.; MIAO, Y.; JIA, F.; DU, R.; PENG, Y. Biological nitrogen removal from sewage via anammox: Recent advances. *Bioresource technology*, v. 200, p. 981-990, 2016.
- MA, B.; PENG, Y.; ZHANG, S.; WANG, J.; GAN, Y.; CHANG, J.; WANG S.; WANG Shanyun.; ZHU G. Performance of anammox UASB reactor treating low strength wastewater under moderate and low temperatures. *Bioresource technology*, v. 129, p. 606-611, 2013.
- MAC CONELL, E.F.A. *Caracterização da comunidade bacteriana de filtros biológicos percoladores tratando efluente anaeróbio*. 159f. Tese (Doutorado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos). Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - UFMG, Belo Horizonte. 2014.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. *Microbiologia de Brock*. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 1128p, 2010.
- MAGRÍ, A.; VANOTTI, M. B.; SZÖGI, A. A. Anammox sludge immobilized in polyvinyl alcohol (PVA) cryogel carriers. *Bioresource Technology*, v. 114, p. 231-241, 2012.
- MAIER, R. M., PEPPER, I. L., GERBA, C. P. *Environmental Microbiology*. 2 ed. Amsterdam; Boston: Elsevier/Academic Press, 598 p, 2009.
- MANZ, Werner *et al.* Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. *Microbiology*, v. 142, n. 5, p. 1097-1106, 1996.
- McBRIDE, M. J.; ZHU, Y. 2013. Gliding motility and por secretion system genes among members os the Phylum Bacteroidetes. *Journal of Bacteriology*, v. 195 (2), p. 270-278, 2013.
- MCKEOWN, R. M., SCULLY, C., MAHONY, T., COLLINS, G., & O'FLAHERTY, V. Long-term (1243 days), low-temperature (4–15 C), anaerobic biotreatment of acidified wastewaters: bioprocess performance and physiological characteristics. *Water research*, v. 43, n. 6, p. 1611-1620, 2009.
- METCALF E EDDY. *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*. 4 ed. Revised by George Tchobanoglous; Franklin L. Burton and H. David Stensel. New York, McGraw-Hill International Edition, 1848p, 2003.
- MEYER, R. L.; RISGAARD-PETERSEN, N.; ALLEN, D. E. Correlation between anammox activity and microscale distribution of nitrite in a subtropical mangrove sediment. *Appl Environ Microbiol* v 71, p.6142–6149, 2005.

- MIURA, Y.; WATANABE, Y.; OKABE, S. Significance of Chloroflexi in performance of submerged membrane bioreactors (MBR) treating municipal wastewater. *Environmental Science and Technology*, v. 41, p. 7787-7794, 2007.
- MOLINUEVO, B.; GARCÍA, M. C.; KARAKASHEV, D.; ANGELIDAKI, I. Anammox from ammonia removal from pig manure effluents: effect of matter organic content on process performance. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 2171-2175, 2009.
- MONBALLIU, A.; DESMIDT, E.; GHYSELBRECHT, K.; CLIPPELEIR, H. DE; VAN HULLE, S.W.H.; VERSTRAETE, W.; MEESSCHAERT, B. Enrichment of anaerobic ammonium oxidizing (Anammox) bacteria from OLAND and conventional sludge: Features and limitations. *Separation and Purification Technology*, v. 104, p. 130–137, 2013.
- MOORE, T. A.; XING, Y. P.; LAZENBY, B.; LYNCH, M. D. J.; SCHIFF, S.; ROBERTSON, W. D.; TIMLIN, R.; LANZA, S.; RYAN, M. C.; ARAVENA, R.; FORTIN, D.; CLARK, I. D.; NEUFELD, J. D. Prevalence of anaerobic ammoniumoxidizing bacteria in contaminated groundwater. *Environ Sci Technol* v. 45, p. 7217-7225, 2011.
- MOTA, F. S. B.; VON SPERLING, M. *Nutrientes de esgoto sanitário: utilização e remoção*. Rio de Janeiro: ABES, 2009. 428p.
- MULDER, A.; VAN DE GRAAF, A. A.; ROBERTSON, L. A.; KUENEN J. G. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 16, p. 177-184, 1995.
- NEEF, A., AMANN R, SCHLESNER H, SCHLEIFER KH. Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of planctomycetes with 16SrRNA-targeted probes. *Microbiology*, 144:3257-3266p, 1998.
- NI, S. Q.; ZHANG, J. Anaerobic Ammonium Oxidation: from laboratory to full-scale application. *BioMed Research International*, v. 2013, p. 1-11, 2013.
- NI, S. Q.; NI, J. Y.; HU, D. L.; SUNG, S. Effect of organic matter on the performance of granular anammox process. *Bioresource Technology*, v. 110, p. 701–705, 2012.
- NIKOLAEV, YU. A.; KOZLOV, M. N.; KEVBRINA, M. V.; DOROFEEV, A. G.; PIMENOV, N. V.; KALLISTOVA, A. YU.; GRACHEV, V. A.; KAZAKOVA, E. A.; ZHARKOV, A. V.; KUZNETSOV, B. B.; PATUTINA, E. O.; BUMAZHKIN, B. K. *Candidatus* “*Jettenia moscovienalis*” sp. nov., a New Species of Bacteria Carrying out Anaerobic Ammonium Oxidation. *Microbiology*, vol. 84, p. 256–262, 2015.
- OKABE, S.; OSHIKI, M.; TAKAHASHI, Y.; SATOH, H. N<sub>2</sub>O emission from a partial nitrification–anammox process and identification of a key biological process of N<sub>2</sub>O emission from anammox granules. *Water research*, v. 45, n. 19, p. 6461-6470, 2011.
- OKABE, S.; KINDAICHI, T.; ITO, T. Fate of 14C-labeled microbial products derived from nitrifying bacteria in autotrophic nitrifying biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, p. 3987–3994, 2005.
- OSHIKI, M.; SHIMOKAWA, M.; FUJII, N.; SATOH, H.; OKABE, S. Physiological characteristics of the anaerobic ammonium-oxidizing bacteria ‘*Candidatus Brocadia sinica*’. *Microbiology*, v. 157, n. 6, p. 1706-1713, 2011.
- PARK, H., ROSENTHAL, A., JEZEK, R., RAMALINGAM, K., FILLOS, J., CHANDRAN, K. Impact of inocula and growth mode on the molecular microbial ecology of anaerobic ammonia oxidation (anammox) bioreactor communities. *Water Research*, v. 44, n. 17, p. 5005–5013, 2010.

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

PEREIRA, A. D. *Caracterização microbiana e avaliação do efeito do fenol em um reator em batelada sequencial com atividade anammox*. Belo Horizonte, 2013, 128 p. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

PEREIRA, L. P. F.; MERCANTE, C. T. J. A amônia nos sistemas de criação de peixes e seus efeitos sobre a qualidade da água. Uma revisão. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 31, n. 1, p.81-88, 2005.

PERSSON, F., SULTANA, R., SUAREZ, M., HERMANSSON, M., PLAZA, E., & WILÉN, B. M. Structure and composition of biofilm communities in a moving bed biofilm reactor for nitrification–anammox at low temperatures. *Bioresource technology*, v. 154, p. 267-273, 2014.

PHILIPS, S.; WYFFELS, S.; SPRENGERS, R.; VERSTRAETE, W. Oxygen-limited autotrophic nitrification/denitrification by ammonia oxidisers enables upward motion towards more favourable conditions. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 59, n. 4-5, p. 557-566, 2002.

QIAO, S., KANDA, R., NISHIYAMA, T., FUJII, T., BHATTI, Z., & FURUKAWA, K. Partial nitrification treatment for high ammonium wastewater from magnesium ammonium phosphate process of methane fermentation digester liquor. *Journal of bioscience and bioengineering*, v. 109, n. 2, p. 124-129, 2010.

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

QUINTAES, B. R., da COSTA, C. A. M., HINOJOSA, S. M. A. G., & CAMPOS, J. C. Avaliação de comunidades microbianas em lixiviado de aterro de resíduos sólidos urbanos–Revisão. *Ciência & tecnologia*, v. 12, p. 7, 2012.

REGMI, P.; HOLGATE, B.; FREDERICKS, D.; MILLER, M. W.; WETT, B.; MURTHY, S.; & BOTT, C. B. Optimization of a mainstream nitrification–denitrification process and anammox polishing. *Water Science and Technology*, v. 72, n. 4, p. 632-642, 2015.

RIBEIRO, T. B. *Sistema UASB/FBP submetido a hidrograma típico de vazão: avaliação do uso de meio suporte baseado em espuma de poliuretano e operação sem decantadores secundários*. 2015. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos - Escola de Engenharia), Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, 2015.

RUSCALLEDA, M.; LOPEZ, H.; GANIGUE, R.; PUIG, S.; BALAGUER, M. D.; COLPRIM, J. Heterotrophic denitrification on granular anammox SBR treating urban landfill leachate. *Water Sci Technol* v. 58, n. 9, p. 1749–1755, 2008.

SANCHEZ-GUILLEN, J. A.; YIMMAN, Y.; LOPEZ VAZQUEZ, C. M.; BRDJANOVIC, D.; VAN LIER, J. B. Effects of organic carbon source, chemical oxygen demand/N ratio and temperature on autotrophic nitrogen removal. *Water Science & Technology*, v. 69, N. 10, p. 2079-2084, 2014.

SANCHEZ-MELSIO, A.; CÁLIZ, J.; BALAGUER, M. D.; COLPRIM, J.; VILA, X. Development of batch- culture enrichment coupled to molecular detection for screening of

natural and man-made environments in search of anammox bacteria for N-removal bioreactors systems. *Chemosphere*, v. 75, n. 2, p. 169-179, 2009.

SANTOS, W. R. B. *Remoção de nitrogênio e fósforo presentes em efluentes agroindustriais pela precipitação de estruvita*. Santa Maria, 2011, 89 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

SCHEEREN, M. B.; KUNZ, A.; STEINMETZ, R. L.; DRESSLER, V. L. O processo ANAMMOX como alternativa para tratamento de águas residuárias, contendo alta concentração de nitrogênio. *R Bras Eng Agríc Ambiental*, v. 15, p. 1289-1297, 2011.

SCHMID, M. C.; RISGAARD-PETERSEN, N.; VAN DE VOSSENBERG, J.; KUYPERS, M. M. M.; LAVIK, G.; PETERSEN, J.; HULTH, S.; THAMDRUP, B.; CANFIELD, D.; DALSGAARD, T.; RYSGAARD, S.; SEJR, M. K.; STROUS, M.; OP DEN CAMP, H. J. M.; JETTEN, M. S. M. Anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in marine environments: widespread occurrence but low diversity. *Environmental Microbiology*, 9(6), p.1476–1484, 2007.

SCHMID, M.; WALSH, K.; WEBB, R.; RIJPISTRA, W. I. C.; VAN DE PAS-SCHOONEN, VERBRUGGEN, M. J.; HILL, T.; MOFFET, B.; FUERST, J.; SCHOUTEN, S.; DAMSTÉ, J. S. S.; HARRIS, J.; SHAW, P.; JETTEN, M.; STROUS, M. *Candidatus "Scalindua brodae"*, sp. nov., *Candidatus "Scalindua wagneri"*, sp. nov., two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 26, p. 529-538, 2003.

SCHMID, M.; TWACHTMANN, U.; KLEIN, M.; STROUS, M.; JURETSCHKO, S.; JETTEN, M. S. M.; METZGER, J. W.; SCHLEIFER, K. H.; WAGNER, M. Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation. *Syst Appl Microbiol* v. 23, p. 93– 106, 2000.

SEKIGUSHI, Y.; YAMADA, T.; HANADA, S.; OHASHI, A.; HARADA, H.; KAMAGATA, Y. *Anaerolinea Thermophila* gen. nov., sp. nov. and *Caldilinea aerophila* gen. nov., sp. nov., novel filamentous thermophiles that represent a previously uncultured lineage of the domain *Bacteria* at the subphylum level. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 53, p. 1843-1851, 2003.

SIMON, J.; KLOTZ, M.G. Diversity and evolution of bioenergetic systems involved in microbial nitrogen compound transformations. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1827, p. 114-135, 2013.

SMART, G. The effect of ammonia exposure on gill structure of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Fish Biology*, v. 8, p.471-475, 1976.

STROUS, M., PELLETIER, E., MANGENOT, S., RATTEI, T., LEHNER, A., TAYLOR, M. W., HORN, M., DAIMS, H., BARTOL-MAVEL, D., WINCKER, P., BARBE, V., FONKNECHTEN, N., VALLENET, D., SEGURENS, B., SCHENOWITZ-TRUONG, C., MÉDIGUE, C., COLLINGRO, A., SNEL, B., DUTILH, B. E. Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature*. v. 440, n. 7085, p. 790–794, 2006.

STROUS, M.; KUENEN J. G.; JETTEN M. S. M. Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. *Applied Environmental and Microbiology*, v. 65, p. 3248-3250, 1999a.

STROUS, M.; FUERST, J. A.; KRAMER, E. H. M.; LOGEMANN, S.; MUYSER G.; VAN DE PAS-SCHOONEN K. T.; WEBB R.; KUENEN J. G.; JETTEN M. S. M. Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature*, v. 400, p. 446-449, 1999b.

- STROUS, M., HEIJNEN, J.J., KUENEN, J.G., JETTEN, M.S.M. The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v. 50, n. 5, p. 589-596, 1998.
- STROUS, M.; VAN GERVEN, E.; KUENEN, J. G.; JETTEN, M. Effects of aerobic and microaerobic conditions on anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) sludge. *Applied and environmental microbiology*, v. 63, n. 6, p. 2446-2448, 1997a.
- STROUS, M.; VAN GERVEN, E.; ZHENG, P.; KUENEN, J. G.; JETTEN, M. S. Ammonium removal from concentrated waste streams with the anaerobic ammonium oxidation (anammox) process in different reactor configurations. *Water Research*, v. 31, n. 8, p. 1955-1962, 1997b.
- TANG, C.; ZHENG, P.; CHEN, T.; ZHANG, J.; MAHMOOD, Q.; DING, S.; CHEN, X.; CHEN, J.; WU, D. Enhanced nitrogen removal from pharmaceutical wastewater using SBA-ANAMMOX process. *Water Research*, v. 45, p. 201-210, 2011.
- TANG, C. J.; ZHENG, P.; WANG, C. H.; MAHMOOD, Q. Suppression of anaerobic ammonium oxidizers under high organic content in high-rate Anammox UASB reactor. *Bioresour. Technol.*, v.101, n. 6, p. 1762–1768, 2010.
- TAO, W., HE, Y., WANG, Z., SMITH, R., SHAYYA, W., & PEI, Y. Effects of pH and temperature on coupling nitrification and anammox in biofilters treating dairy wastewater. *Ecological Engineering*, v. 47, p. 76-82, 2012.
- THAMDRUP, B.; DALSGAARD, T. Production of N<sub>2</sub> through anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments. *Appl Environ Microbiol.* 68, p. 1312–1318, 2002.
- THIRD, K. A., PAXMAN, J., SCHMID, M., STROUS, M., JETTEN, M.S.M., CORD-RUWISH R., Enrichment of Anammox from activated sludge and its application in the CANON process. *Microbial Ecology* 49: 236-244, 2005.
- THIRD, K. A.; SLIEKERS, A. O.; KUENEN, J. G.; JETTEN, M. S. M. The CANON system (Completely Autotrophic Nitrogen-Removal Over Nitrite) under ammonium limitation: interaction and competition between three groups of bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 2001, p. 588-596, 2001.
- TOH, S. K.; ASHBOLT, N. J. Adaptation of anaerobic ammonium-oxidising consortium to synthetic coke-ovens wastewater. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 59, n. 2-3, p. 344-352, 2002.
- TOKUTOMI, T.; YAMAUCHI, H.; NISHIMURA, S.; YODA, M.; ABMA, W. Application of the nitrification and anammox process into inorganic nitrogenous wastewater from semiconductor factory. *J Environ Eng-ASCE* v. 137, p. 146–154, 2011.
- VAN DE GRAAF, A.A., DE BRUIJN, P., ROBERTSON, L.A., JETTEN, M.S.S., KUENEN, J.G. Metabolic pathway of anaerobic ammonium oxidation on the basis of <sup>15</sup>N studies in a fluidized bed reactor. *Microbiology*, v. 143, n. 7, p. 2415-2421, 1997.
- VAN DE GRAAF A. A.; BRUIJN P.; ROBERTSON, L. A.; JETTEN, M. S. M.; KUENEN, J. G. Autotrophic growth anaerobic ammonium-oxidation micro-organisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology*, v. 142, n. 8, p. 2187-2196, 1996.
- VAN DE GRAAF, A. A.; MULDER, A.; BRUIJN, P.; JETTEN, M. S. M.; ROBERTSON, L. A.; KUENEN, J. G. Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, n. 4, p. 1246-1251, 1995.

- VAN DE VOSSENBERG, J.; WOEBKEN, D.; MAALCKE, W. J.; WESSELS, H. J. C. T.; DUTILH, B. E.; KARTAL, B.; JANSSEN-MEGENS, E. M.; ROESELERS, G.; YAN, J.; SPETH, D.; GLOERICH, J.; GEERTS, W.; VAN DER BIEZEN, E.; PLUK, W.; FRANCOIJS, K. J.; RUSS, L.; LAM, P.; MALFATTI, S. A.; TRINGE, S. G.; HAAIJER, S. C. M.; OP DEN CAMP, H. J. M.; STUNNENBERG, H. G.; AMANN, R.; KUYPERS, M. M. M.; JETTEN, M. S. M. The metagenome of the marine anammox bacterium 'Candidatus Scalindua profunda' illustrates the versatility of this globally important nitrogen cycle bacterium. *Environmental Microbiology*, v. 15, p. 1275-1289, 2013.
- VAN DE VOSSENBERG, J.; RATTRAY, J. E.; GEERTS, W.; KARTAL, B.; VAN NIFTRIK, L.; VAN DONSELAAR, E. G.; DAMSTE, J.S.S.; STROUS, M.; JETTEN, M. S. Enrichment and characterization of marine anammox bacteria associated with global nitrogen gas production. *Environmental microbiology*, v. 10, n. 11, p. 3120-3129, 2008.
- VAN DER STAR, W. R. L.; ABMA, W. R.; BLOMMERS, D.; MULDER, J-W.; TOKUTOMI, T.; STROUS, M.; PICIOREANU, C.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Startup of reactors for anoxic ammonium oxidation: experiences from the first full-scale Anammox reactor in Rotterdam. *Water Res.* v.41, n. 18, p. 4149-4163, 2007.
- VAN DONGEN, U.; JETTEN, M. S. M.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. The SHARON®-ANAMMOX® process for treatment of ammonium rich wastewater. *Water Science and Technology*, v. 44, n. 1, p. 153-160, 2001.
- VAN HULLE, S.W.H. VANDEWEYER, H.J.P. MEESCHAERT, B.D. VANROLLEGHEM, P.A. DEJANS, P. DUMOULIN, A. Engineering aspects and practical application of autotrophic nitrogen removal from nitrogen rich streams. *Chem. Eng. J.* v. 162, p. 1–20. 2010.
- VAN KESSEL, M. A. H. J.; SPETH, D. R.; ALBERTSEN, M.; NIELSEN, P. H.; CAMP, H. J. M. O.; KARTAL, B.; JETTEN, M. S. M.; LÜCKER, S. Complete nitrification by a single microorganism. *Nature*, v. 528, p. 555-571, 2015.
- VAN KESSEL, M. A. H. J.; HARHANGI, H. R.; VAN DE PAS-SCHOONEN, K.; VAN DE VOSSENBERG, J.; FLIK, G.; JETTEN, M. S. M.; KLAREN, P. H. M.; DEN CAMP, H. J. M. O. Biodiversity of N-cycle bacteria in nitrogen removing moving bed biofilters for freshwater recirculating aquaculture systems. *Aquaculture* v. 306, p. 177–184, 2010.
- VAN LIER, J. High-rate anaerobic wastewater treatment: diversifying from end-of-the-pipe treatment to resource-oriented conversion techniques. *Water Science and Technology*, v.57, p. 1137-1148, 2008.
- VAN NIFTRIK, L.; JETTEN, M. S. M. Anaerobic Ammonium-Oxidizing Bacteria: Unique Microorganisms with Exceptional Properties. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 76, n. 3, p. 585–596, 2012.
- VAN NIFTRIK, L.A., FUERST, J. A., DAMSTÉ, J. S. S., KUENEN, J. G., JETTEN, M. S. M., STROUS, M., The anammoxosome: an intracytoplasmic compartment in anammox bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, v. 233, n. 1, p. 7–13, 2004.
- VANOTTI, M. B.; SZOGI, A. A.; ROTHROCK, M. J. *Novel anammox bacterium isolate*. Pub. No. US2011/0180476. July 28, 2011.
- VANOTTI, M. B., SZOGI, A. A., HUNT, P. G., ELLISON, A. Q., MILLNER, P. D., HUMENIK, F. J. Development of an environmentally superior treatment system for replacing anaerobic swine waste lagoons. In: *Water Environment Federation Technical Exhibition And Conference (Weftec)*, October 29 - November 2, 2005, Washington, Dc., 2005.

- VAZQUEZ-PADÍN, J.; MOSQUERA-CORRALM, A.; CAMPOS, J. L.; MÉNDEZ, R.; REVSBECH, N. P. Microbial community distribution and activity dynamics of granular biomass in a CANON reactor. *Water Research*, v. 44, p. 4359-4370, 2010.
- VAZQUEZ-PADÍN, J.; FERNANDÉZ, I.; FIGUEROA, M.; MOSQUERA-CORRAL, A.; CAMPOS, J. L.; MÉNDEZ, R. Applications of Anammox based process to treat anaerobic digester supernatant at room temperature. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 2988-2994, 2009a.
- VAZQUEZ-PADÍN, J.; POZO, M. J.; JARPA, M.; FIGUEROA, M.; FRANCO, A.; MOSQUERA-CORRAL, A.; CAMPOS, J. L.; MÉNDEZ, R. Treatment of anaerobic sludge digester effluents by the CANON process in an air pulsing SBR. *Journal of Hazardous Materials*, v. 166, p. 336-341, 2009b.
- VEYS, P.; VANDEWEYER, H.; AUDENAERT, W.; MONBALLIU, A.; DEJANS, P.; JOOKEN, E.; DUMOULIN, A.; MEESSCHAERT, B. D.; VAN HULLE, S. W. H. Performance analysis and optimization of autotrophic nitrogen removal in different reactor configurations: a modelling study. *Environmental Technology*, v. 31, p. 1311–1324, 2010.
- VIANCELLI, A.; KUNZ, A.; ESTEVES, P. A.; BAUERMANN, F. V.; FURUKAWA, K.; FUJII, T.; ANTÔNIO, R. V.; VANOTTI, M. Bacterial biodiversity from an anaerobic up flow bioreactor with anammox activity inoculated with swine sludge. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 54, p. 1035-1041, 2011.
- VLAEMINCK, S.E.; DE CLIPPELEIR, H.; VERSTRAETE, W. Microbial resource management of one-stage partial nitrification/anammox. *Microbial Biotechnology*, v. 5, n. 3, p. 433–448, 2012.
- VON SPERLING, M. *Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos*. Belo Horizonte: UFMG, 2005. 452p.
- VON SPERLING, M. e CHERNICHARO, C.A.L. *Biological Wastewater Treatment in Warm Climate Regions*. IWA Publishing, London, 2005.
- WANG, D., WANG, Q., LALOO, A., XU, Y., BOND, P. L., e YUAN, Z. Achieving stable nitrification for mainstream deammonification by combining free nitrous acid-based sludge treatment and oxygen limitation. *Scientific reports*, v. 6, 2016.
- WANG, S. Y.; WANG, Y.; WANG, C. X.; RISGAARD-PETERSEN, N.; JETTEN, M. S. M.; YIN, C. Q. Anaerobic ammonia oxidation in a fertilized paddy soil. *ISME J*, v. 5, p. 1905–1912, 2011.
- WANG, Q.; GARRITY, G.; TIEDJE, J.; COLE, J. Naive bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, n. 16, p. 5261-5267, 2007.
- WELLER, Roland; GLÖCKNER, Frank Oliver; AMANN, Rudolf. 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for the in situ detection of members of the phylum Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides. *Systematic and applied microbiology*, v. 23, n. 1, p. 107-114, 2000.
- WETT, B. Development and implementation of a robust deammonification process. *Water Sci Technol*, v. 56, p. 81–88, 2007.
- WIESMANN, U. Biological nitrogen removal from wastewater. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, v. 51, p. 113–154, 1994.

- WINKLER, M.-KH; KLEEREBEZEM, R.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Integration of anammox into the aerobic granular sludge process for main stream wastewater treatment at ambient temperatures. *Water research*, v. 46, n. 1, p. 136-144, 2012.
- WOEBKEN, D.; LAM, P.; KUYPERS, M. M. M.; NAQVI, W. A.; KARTAL, B.; STROUS, M.; JETTEN, M. S. M.; FUCHS, B. M.; AMANN, R. A microdiversity study of anammox bacteria reveals a novel *Candidatus Scalindua phylotype* in marine oxygen minimum zones. *Environmental Microbiology*, v. 10, p. 3106-3119, 2008.
- WONG, BIING-TEO; LEE, DUU-JONG. Denitrifying sulfide removal and carbon methanogenesis in a mesophilic, methanogenic culture. *Bioresource technology*, v. 102, n. 12, p. 6673-6679, 2011.
- YAMAMOTO, T.; TAKAKI, K.; KOYAMA, T.; FURUKAWA, K. Long-term stability of partial nitrification of swine wastewater digester liquor and its subsequent treatment by anammox. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 6419-6425, 2008.
- YAN, J.; HAAIJER, S. C. M.; OP DEN CAMP, H. J. M.; VAN NIFTRIK, L.; STAHL, D. A.; KONNEKE, M.; RUSH, D.; SINNINGHE DAMSTE, J. S.; HU, Y. Y.; JETTEN, M. S. M. Mimicking the oxygen minimum zones: stimulating interaction of aerobic archaeal and anaerobic bacterial ammonia oxidizers in a laboratory scale model system. *Environ Microbiol* vol. 14, p. 3146–3158, 2012.
- YANG, G.; JIN, R. The joint inhibitory effects of phenol, copper (II), oxytetracycline (OTC) and sulfide on anammox activity. *Bioresource Technology*, v. 126, p. 187-192, 2012.
- YANG, J., ZHANG, L., HIRA, D., FUKUZAKI, Y., & FURUKAWA, K. High-rate nitrogen removal by the Anammox process at ambient temperature. *Bioresource technology*, v. 102, n. 2, p. 672-676, 2011.
- YE, R. W.; THOMAS, S. M. Microbial Nitrogen Cycles: physiology, genomics and application. *Current Opinion in Microbiology*, v. 4, 307-3012, 2001.
- YOSHINAGA, I.; AMANO, T.; YAMAGISHI, T.; OKADA, K.; UEDA, S.; SAKO, Y.; SUWA, Y. Distribution and diversity of anaerobic ammonium oxidation (Anammox) bacteria in the sediment of a eutrophic freshwater lake, Lake Kitaura, Japan. *Microbes Environ* v. 26, p. 189 - 197, 2011.
- ZHANG, X.; ZHANG, H.; YE, C.; WEI, M.; DU, J. Effect of COD/N ratio on nitrogen removal and microbial communities of CANON process in membrane bioreactors. *Bioresource Technology*, v. 189, p. 302-308, 2015.
- ZHU, G.; WANG, S.; WANG, Y.; WANG, C.; RISGAARD-PETERSEN, N.; JETTEN, M. S. M.; YIN, C. Q. Anaerobic ammonia oxidation in a fertilized paddy soil. *The ISME Journal*, v. 5, n. 12, p. 1905–1912, 2011.
- ZHU, G; PENG, Y.; LI, B.; GUO, J.; YANG, Q.; WANG, S. Biological removal of nitrogen from wastewater. *Reviews Environmental Contamination and Toxicology*, v.192, p.159-195, 2008.
- ZILZ, Luana; SILVA, Joel Dias da; PINHEIRO, Adilson. Eficiência do melaço como fonte de carbono na remoção de nitrito em lixiviados de aterros sanitários. *Eng. sanit. ambient*, v. 19, n. 1, p. 97-104, 2014.