

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

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES
RELAÇÕES DQO/N SOBRE O PROCESSO
ANAMMOX E VIABILIDADE DA APLICAÇÃO DO
PROCESSO COMO PÓS-TRATAMENTO DE
EFLUENTE DE REATOR UASB TRATANDO ESGOTO
DOMÉSTICO**

Cíntia Dutra Leal

Belo Horizonte

2015

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES
RELAÇÕES DQO/N SOBRE O PROCESSO
ANAMMOX E VIABILIDADE DA APLICAÇÃO DO
PROCESSO COMO PÓS-TRATAMENTO DE
EFLUENTE DE REATOR UASB TRATANDO ESGOTO
DOMÉSTICO**

Cíntia Dutra Leal

Cíntia Dutra Leal

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES
RELAÇÕES DQO/N SOBRE O PROCESSO
ANAMMOX E VIABILIDADE DA APLICAÇÃO DO
PROCESSO COMO PÓS-TRATAMENTO DE
EFLUENTE DE REATOR UASB TRATANDO ESGOTO
DOMÉSTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial 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.^a Juliana Calábria de Araújo

Belo Horizonte

Escola de Engenharia da UFMG

2015

L435a

Leal, Cíntia Dutra.

Avaliação do efeito de diferentes relações DQO/N sobre o processo Anammox e viabilidade da aplicação do processo como pós-tratamento de efluente de reator UASB tratando esgoto doméstico [manuscrito] / Cíntia Dutra Leal. – 2015.

xv, 123 f., enc.: il.

Orientadora: Juliana Calábria de Araújo.

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

Bibliografia: f. 106-123.

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

CDU: 628(043)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por se fazer sempre presente em minha vida, dando-me força, saúde, calma, paciência e sabedoria para seguir em direção a mais esta conquista.

Aos meus amados pais Geraldo e Joana, responsáveis por todas as minhas conquistas, minhas irmãs Márcia e Carine, minhas adoráveis sobrinhas Júlia, Sofia e Beatriz, e a todos os familiares que sempre me apoiaram para a continuidade de meus estudos desde o meu ingresso na graduação.

Ao meu querido Marcos, presente em todos os momentos, pelo carinho, paciência e abraços fortes de apoio.

À Professora Juliana Calábria Araújo, pela orientação, sugestões e contribuições para a realização deste trabalho. Obrigada pela compreensão, confiança, conselhos e por ser mais que uma professora, ser uma amiga.

Aos meus amigos do Laboratório de Microbiologia, Alyne, Alessandra, Ana Maria, Luciene, Isabel, Jéssica, Érika, Graziela, Renata, Karolzinha, Daniel, Carlos Díaz, Elayne, por todo apoio e incentivo, por contribuírem com sugestões, ajuda e ensinamentos, pela amizade, carinho, pelos momentos de descontração que me fizeram muito bem.

Aos bolsistas de iniciação científica e apoio técnico do Projeto Anammox, Thaís, Fernando, Sarah, Luísa, Aline Coelho que tanto me auxiliaram na execução do projeto e pela amizade. Um agradecimento especial à Alyne Duarte, por todo o apoio e disponibilidade em ajudar e pela amizade.

Aos Professores Carlos Augusto de Lemos Chernicharo e Silvana de Queiroz Silva, pela atenção e disponibilidade em participarem da banca examinadora.

Aos Professores do Programa de Pós Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos, por todos os ensinamentos passados.

Ao Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, pelo incentivo e oportunidade em realizar o mestrado.

Aos colegas da Pós Graduação, por tornar inesquecível e agradável essa jornada de aprendizado, em especial ao Thiago Bressani, pela simpatia, disponibilidade em ajudar e por fornecer o efluente anaeróbio para a execução do presente trabalho.

Aos colegas e funcionários do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFMG, Suzane, Cláudia, Iara, Júlio, Fernanda, Cassiano, Lucilaine e Mirna pelo apoio.

Ao Laboratório de Análises Instrumentais, pelas análises de Nitrato.

RESUMO

A oxidação anaeróbia da amônia (Anammox), realizada por bactérias anaeróbias, quimiolitotróficas, é uma via importante sobre o ciclo biológico do nitrogênio. O processo Anammox possui inúmeras vantagens e tem sido aplicado com sucesso para a remoção do nitrogênio em várias estações de tratamento em todo o mundo, principalmente para o tratamento de águas residuárias ricas em nitrogênio. A presença de matéria orgânica pode provocar efeitos adversos sobre as bactérias anammox, diminuindo a eficiência ou até mesmo causando a inibição do processo anammox. Esta pesquisa avaliou, em laboratório, a aplicabilidade e a eficiência da remoção de nitrogênio amoniacal pelo processo Anammox como pós-tratamento de efluente anaeróbio proveniente de reator UASB tratando esgoto doméstico. O estudo foi dividido em três etapas, a Fase I compreendeu o período de cultivo e aumento da biomassa anammox, na Fase II foram testadas as relações DQO/N de 0,7, 1,4, 2,8, 3,5 e 5,0, utilizando uma solução de glicose como fonte de carbono e na Fase III o reator foi alimentado com efluente anaeróbio. Um reator em batelada sequencial, com volume de 2.0L (RBS) foi utilizado para o cultivo da biomassa anammox. As técnicas de PCR-DGGE e PCR em tempo real foram utilizadas para monitorar e caracterizar a mudança na diversidade comunidade bacteriana em resposta às diferentes proporções de DQO/N aplicadas ao reator. Os resultados mostraram que na concentração de até 390 mg.L⁻¹ (DQO/N de 2,8) a eficiência de remoção foi de 66%, e na concentração de DQO 487 mg L⁻¹ (DQO/N de 3,5) a eficiência de remoção de amônia do RBS reduziu para 28%, enquanto que a eficiência de remoção de nitrito permaneceu elevada (99%). Não obstante, quando aplicou-se a relação de 5,0, mas com DQO igual a 300 mg.L⁻¹, os valores de eficiência de remoção de amônia e nitrito foram elevados, 84% e 99%, respectivamente, indicando portanto que o processo Anammox pode ser usado no pós-tratamento de efluentes anaeróbios que contenham concentração de DQO inferior a 300 mg.L⁻¹. Quando o RBS passou a ser alimentado somente com o efluente anaeróbio acrescido de nitrito (relação DQO/N de 4 a 5) , a remoção de amônia aumentou, de 55% para 98%, atingindo valores máximos de 99%. A identificação das bandas 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*. *Ca. Brocadia sinica* foi detectada em todas as fases da pesquisa.

Palavras-chave: anammox, relação DQO/N, efluente anaeróbio, UASB, diversidade bacteriana

ABSTRACT

Anaerobic oxidation of ammonia (Anammox) performed by anaerobic and chemolithoautotrophics bacteria, is a important pathway on the biological nitrogen cycle. The Anammox process has numerous advantages and has been successfully applied for nitrogen removal at various treatment plants around the world, primarily for the treatment of wastewater, rich in nitrogen. The presence of organic matter may cause adverse effects on the anammox bacteria, decreasing the efficiency or even causing inhibition of the anammox process. This study evaluated in the laboratory, the applicability and efficiency of removing ammonia nitrogen by Anammox process as post-treatment of anaerobic effluent from a UASB reactor treating domestic wastewater. The study was divided into three phases, Phase I comprises the cultivation period of the anammox biomass, in Phase II were tested the relations COD/N of 0.7, 1.4, 2.8, 3.5 and 5.0, using a solution of glucose as carbon source and Phase III in which the reactor was fed with real anaerobic effluent. A sequencing batch reactor with a volume of 2.0L (SBR) was used for the cultivation of anammox biomass. The PCR-DGGE and real time PCR were used to monitor and characterize the change in bacterial community diversity in response to different ratios of COD/N applied to the reactor. The results showed that at a concentration of up to 390 mg.L⁻¹ (COD/N 2.8) the removal efficiency was 66%, and the COD concentration of 487 mg L⁻¹ (COD/N 3.5) ammonia removal efficiency SBR reduced to 28%, while the nitrite removal efficiency remained high (99%). Nevertheless, when applied to ratio of 5.0, but with COD like to 300 mg.L⁻¹, of ammonia and nitrite removal efficiency values were high, 84% and 99%, respectively. Thus indicating that the Anammox process can be used in the post-treatment of anaerobic wastewater containing COD concentration below 300 mg.L⁻¹. When the SBR started to be fed only with the anaerobic effluent plus nitrite (ratio COD/N of 4 to 5), the ammonia removal increased from 55% to 98%, to maximum values of 99%. The identification of bands isolated from the gel DGGE showed that most sequences obtained is related with microorganisms of the phylum *Proteobacteria*, *Chloroflexi* and *Planctomycetes*. *Ca. Brocadia sinica* was detected in all phases of the study.

Keywords: anammox, COD/N Ratio, anaerobic effluent, UASB reactor, bacterial diversity

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE TABELAS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	XIII
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	4
2.1 OBJETIVO GERAL	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	5
3.1 NITROGÊNIO: DISTRIBUIÇÃO E IMPACTOS NO MEIO AMBIENTE	5
3.2 PROCESSOS BIOLÓGICOS ENVOLVIDOS NO CICLO DO NITROGÊNIO	10
3.3 PROCESSO ANAMMOX.....	18
3.3.1 <i>Ecologia e diversidade microbiana das bactérias envolvidas no processo Anammox</i>	19
3.3.2 <i>Aplicação do processo Anammox para a remoção de nitrogênio amoniacal de efluentes</i>	24
3.3.3 <i>Variáveis do processo e principais fatores que podem inibir a atividade anammox</i>	32
3.3.4 <i>Inibição do processo Anammox por matéria orgânica</i>	36
3.4 REATOR UASB	42
3.4.1 <i>Processo Anammox como alternativa no pós-tratamento de efluentes de reatores UASB</i>	42
4 MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	45
4.2 REATOR EM BATELADA SEQUENCIAL	45
4.3 CULTIVO E ESTABILIZAÇÃO DA BIOMASSA ANAMMOX - FASE I.....	47
4.3.1 <i>Inóculo</i>	47
4.3.2 <i>Operação e monitoramento do reator</i>	49
4.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS SOBRE O PROCESSO ANAMMOX	51
4.4.1 <i>Teste com diferentes relações DQO/N aplicando efluente sintético com glicose – Fase II</i>	51
4.4.2 <i>Avaliação do efeito da aplicação de efluente anaeróbio de reator UASB – Fase III</i>	53
4.5 MÉTODOS ANALÍTICOS	55
4.5.1 <i>Análise de sólidos totais (ST) e sólidos totais voláteis (STV)</i>	55
4.5.2 <i>Análise de nitrogênio amoniacal (N-NH₄⁺)</i>	56
4.5.3 <i>Análise de nitrogênio nitroso (N-NO₂⁻)</i>	57
4.5.4 <i>Análise de nitrato (NO₃⁻)</i>	58
4.5.5 <i>Análise de Demanda Química de Oxigênio (DQO)</i>	58
4.6 CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA.....	59
4.6.1 <i>Extração de DNA</i>	60
4.6.2 <i>Análise da estrutura da comunidade bacteriana por PCR-DGGE</i>	60
4.6.3 <i>Quantificação de bactérias totais, anammox e desnitrificantes pela técnica de PCR em tempo real</i> 62	
4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	66
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.1 MONITORAMENTO E ACLIMATAÇÃO DA BIOMASSA NO RBS - FASE I	67
5.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS SOBRE O DESEMPENHO DO PROCESSO ANAMMOX... 75	
5.2.1 <i>Aplicação de afluente sintético acrescido de glicose com diferentes relações DQO/N - Fase II</i> .. 75	
5.2.2 <i>Efeito da aplicação de efluente anaeróbio real sobre o processo Anammox - Fase III</i>	83
5.2.3 <i>Comparação dos resultados obtidos nas Fases I, II e III</i>	91
5.3 ANÁLISE DO PERFIL E DIVERSIDADE DA COMUNIDADE MICROBIANA PELA TÉCNICA DE PCR-DGGE.....	96
5.4 QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS TOTAIS, BACTÉRIAS ANAMMOX E DESNITRIFICANTES POR PCR EM TEMPO REAL 102	
6 CONCLUSÕES.....	105
7 RECOMENDAÇÕES	106
REFERÊNCIAS	107

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1:** Ciclo Redox do Nitrogênio com o processo Anammox: As reações de oxidação são indicadas pelas setas com traços e as de redução, pelas setas contínuas. As reações que não apresentam alteração redox são indicadas pelas setas cinza. O processo indicado por (1) refere-se à Redução Assimilatória/Desassimilatória do NO_3^- 9
- Figura 3.2:** Árvore filogenética das bactérias anammox baseada nas sequencias do rRNA 16S. A figura apresenta as diferentes relações das bactérias anammox entre os *Planctomycetes*. A divergência de sequencias de outras bactérias dentro desse filo é indicada como *outgroup*. A escala representa 10% de sequencias divergentes.....20
- Figura 3.3:** (a) Coloração alaranjada das bactérias anammox; (b) Foto de Microscopia eletrônica de varredura mostrando as irregularidades típicas da célula anammox.....21
- Figura 3.4:** Foto de Microscopia eletrônica e esquema da célula anammox. Barra de escala: 200 nm.....22
- Figura 3.5:** Distribuição geográfica de reatores anammox em escala plena em todo o mundo.....26
- Figura 4.1:** Representação esquemática do RBS utilizado para o enriquecimento e cultivo de bactérias anammox. (pH) Sensor de pH; (T) Sensor de Temperatura; (OD) Sensor de oxigênio dissolvido.....45
- Figura 4.2:** Reator em bateladas sequenciais utilizado no projeto, com biomassa anammox.....45
- Figura 4.3:** (A) Reator com a biomassa utilizada por Pereira *et al.* (2014) e (B) detalhe da biomassa (Inóculo I).....47
- Figura 4.4:** (A) Reator de fluxo ascendente utilizado por Costa *et al.* (2014) e (B) detalhe da biomassa aderida ao meio suporte e retirada do reator (Inóculo II).....47
- Figura 4.5:** Reator UASB, em escala de demonstração, utilizado no presente estudo.....52

Figura 5.1: Concentrações de $N-NH_4^+$ e de $N-NO_2^-$ afluentes e efluentes no reator durante os ciclos longo (A) e curto (B).....	67
Figura 5.2: Eficiência de remoção e dinâmica dos compostos nitrogenados ao longo do tempo de operação – Ciclo Longo (17 horas).....	68
Figura 5.3: Eficiência de remoção e dinâmica dos compostos nitrogenados ao longo do tempo de operação – Ciclo Curto (7 horas).....	68
Figura 5.4: Produção de $N-NO_3^-$ no RBS durante a Fase I – Ciclo Longo (17 horas) e Curto (7 horas).....	69
Figura 5.5: Coeficiente estequiométrico do consumo de nitrito/consumo de amônia e da produção de nitrato/consumo de amônia durante a Fase I – Ciclo Longo (17 horas).....	71
Figura 5.6: Coeficiente estequiométrico do consumo de nitrito/consumo de amônia e da produção de nitrato/consumo de amônia durante a Fase I – Ciclo Curto (7 horas).....	71
Figura 5.7: Cargas de nitrogênio ($N-NO_2^-$ mais $N-NH_4^+$) aplicadas e removidas do RBS durante o período de 350 dias - Fase I.....	72
Figura 5.8: (A) Biomassa; (B) Grânulos observados no RBS e (C) tamanho do grânulo, régua em cm.....	73
Figura 5.9: Dinâmica dos compostos nitrogenados e eficiências de remoção do Ciclo Longo (17 horas) durante o teste com diferentes relações DQO/N. O período *R refere-se à etapa de recuperação do reator, onde não foi adicionada a glicose.....	75
Figura 5.10: Concentrações de $N-NO_3^-$ efluente no Ciclo Longo (17 horas) durante o teste com diferentes relações DQO/N.....	75
Figura 5.11: <i>Box-plot</i> das eficiências de remoção de $N-NO_2^-$ durante a Fase II.....	76
Figura 5.12: <i>Box-plot</i> das eficiências de remoção de $N-NH_4^+$ durante a Fase II.....	77
Figura 5.13: <i>Box-plot</i> das eficiências de remoção de DQO durante a Fase II.....	78

Figura 5.14: (A) Biomassa antes do teste de DQO; (B) Biomassa e (C) Efluente durante o teste DQO/N de 3,5.....	81
Figura 5.15: Dinâmica dos compostos nitrogenados e eficiências de remoção durante a alimentação com o efluente de UASB + meio de cultura (etapa A) e alimentação somente com o efluente de UASB (etapa B) durante o ciclo longo (17 horas).....	83
Figura 5.16: Dinâmica dos compostos nitrogenados e eficiências de remoção durante a alimentação com o efluente de UASB + meio de cultura (etapa A) e alimentação somente com o efluente de UASB (etapa B) durante o ciclo curto (7 horas).....	83
Figura 5.17: Nitrato efluente nas etapas A (alimentação com o efluente de UASB + meio de cultura) e B (alimentação com efluente de UASB) durante os ciclos longo (17 horas) e curto (7 horas).....	86
Figura 5.18: Coeficiente estequiométrico de consumo de $N-NO_2^-$ / consumo de $N-NH_4^+$ nas etapas A (alimentação com o efluente de UASB + meio de cultura) e B (alimentação com efluente de UASB) durante os ciclos longo (17 horas) e curto (7 horas). A seta indica o coeficiente relatado na literatura de 1,32.....	87
Figura 5.19: Coeficiente estequiométrico de produção de $N-NO_3^-$ / consumo de $N-NH_4^+$ nas etapas A (alimentação com o efluente de UASB + meio de cultura) e B (alimentação com efluente de UASB) durante os ciclos longo (17 horas) e curto (7 horas). A seta indica o coeficiente relatado na literatura de 0,26.....	87
Figura 5.20: Concentrações afluentes e efluentes de DQO nas etapas A (alimentação com o efluente de UASB + meio de cultura) e B (alimentação com efluente de UASB) durante o ciclo longo (17 horas).....	88
Figura 5.21: Concentrações afluentes e efluentes de DQO nas etapas A (alimentação com o efluente de UASB + meio de cultura) e B (alimentação com efluente de UASB) durante o ciclo curto (7 horas).....	88
Figura 5.22: Dinâmica dos compostos nitrogenados e eficiências de remoção de $N-NO_2^-$ e $N-NH_4^+$ referentes ao ciclo longo (17 horas).....	93

Figura 5.23: Dinâmica dos compostos nitrogenados e eficiências de remoção de N-NO ₂ - e N-NH ₄ ⁺ referentes ao ciclo curto (7 horas).....	94
Figura 5.24: Perfil do gel de DGGE contendo fragmentos de DNAr 16S amplificados com <i>primers</i> universais para bactérias em geral (1055F/1392R-GC). As canaletas referem-se às amostras (1) Fase I (cultivo e aumento biomassa anammox; (2) Fase II (diferentes relações DQO/N com glicose); (3) Fase de Recuperação e (4) Fase III (elfuente anaeróbio). As letras de A a P são as identificações das bandas recortadas.....	95
Figura 5.25: Dendograma baseado no perfil das bandas do gel de DGGE. Os valores nos pontos de ramificação do dendograma referem-se à similaridade. Legenda das amostras: (1) Fase I; (2) Fase II; (3) Fase de Recuperação e (4) Fase III.....	100
Figura 5.26: (A) Estimativa do número de cópias do gene RNAr 16S de bactérias anammox e desnitrificantes em relação ao número de cópias do gene RNAr 16S de bactérias totais nas Fases I, II e III; (B) Abundância relativa, em porcentagem, de bactérias anammox e desnitrificantes em relação às bactérias totais.....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Estados de oxidação, toxicidade para as células microbianas e propriedades dos compostos nitrogenados.....	5
Tabela 3.2: Distribuição relativa das formas de nitrogênio em diferentes condições.....	8
Tabela 3.3: Principais processos biológicos do Ciclo do Nitrogênio.....	10
Tabela 3.4: Gêneros que realizam a Fixação Biológica do N ₂	11
Tabela 3.5: Exemplos de bactérias nitrificantes quimiolitotróficas.....	13
Tabela 3.6: Gêneros de bactérias desnitrificantes.....	14
Tabela 3.7: Bactérias que realizam a redução dissimilatória do nitrato e nitrito a íon amônio.....	16
Tabela 3.8: Espécies de bactérias anaeróbias oxidadoras de amônia já descritas.....	19
Tabela 3.9: Sistemas de remoção de nitrogênio que envolvem o processo Anammox.....	29
Tabela 3.10: Concentrações de substrato que podem inibir o processo Anammox.....	33
Tabela 3.11: Descrição resumida de estudos relacionados ao efeito dos compostos orgânicos sobre o processo Anammox.....	40
Tabela 4.1: Etapas metodológicas utilizadas para a realização da pesquisa.....	44
Tabela 4.2: Composição do meio mineral autotrófico.....	49
Tabela 4.3: Composição das soluções de Micronutrientes I e II.....	49
Tabela 4.4: Parâmetros de Análise, frequência e métodos analíticos.....	50
Tabela 4.5: Ensaio para o teste com diferentes proporções DQO/N.....	51

Tabela 4.6: Condições operacionais do reator UASB.....	53
Tabela 4.7: Caracterização físico-química do efluente do reator UASB.....	53
Tabela 4.8: Etapas do teste com aplicação de efluente do reator UASB.....	53
Tabela 4.9: Amostras e metodologias empregadas para a caracterização microbiana.....	58
Tabela 4.10: Sequências dos <i>primers</i> utilizados na PCR-DGGE.....	59
Tabela 4.11: Concentração dos reagentes utilizados na PCR-DGGE.....	60
Tabela 4.12: Condições de amplificação para os <i>primers</i> utilizados na PCR-DGGE.....	60
Tabela 4.13: Concentração dos reagentes utilizados na reação da PCR em tempo real, para um volume final de 20 μ L.....	63
Tabela 4.14: Iniciadores (<i>Primers</i>) utilizados na reação da PCR em tempo real.....	64
Tabela 4.15: Equações das curvas padrão e eficiências dos ensaios da PCR em tempo real de quantificação absoluta.....	64
Tabela 5.1: Estatística descritiva referente à eficiência de remoção de $N-NH_4^+$ e de $N-NO_2^-$ no reator ao longo dos dois ciclos de monitoramento.....	69
Tabela 5.2: Estatística descritiva referente aos coeficientes estequiométricos obtidos durante a Fase I.....	70
Tabela 5.3: Estatística descritiva referente às cargas de nitrogênio ($N-NO_2^-$ mais $N-NH_4^+$) aplicadas e removidas do RBS durante a Fase I.....	72
Tabela 5.4: Estatística descritiva da eficiência de remoção de $N-NO_2^-$ observada no teste com diferentes relações DQO/N.....	76
Tabela 5.5: Estatística descritiva da eficiência de remoção de $N-NH_4^+$ observada no teste com diferentes relações DQO/N.....	77

Tabela 5.6: Coeficientes de consumo de N-NO_2^- / consumo de N-NH_4^+ e produção de N-NO_3^- / consumo de N-NH_4^+ obtidos no teste com diferentes proporções DQO/N.....	78
Tabela 5.7: Estatística descritiva das eficiências de remoção de N-NO_2^- e N-NH_4^+ observadas na etapa A de aplicação do efluente anaeróbio (60%) + meio de cultura (40%).....	84
Tabela 5.8: Estatística descritiva das eficiências de remoção de N-NO_2^- e N-NH_4^+ observadas na etapa B de aplicação do efluente anaeróbio do reator UASB.....	84
Tabela 5.9: Estatística descritiva referente às eficiências de remoção (%) de DQO observados no período da Fase III.....	89
Tabela 5.10: Resumo dos parâmetros operacionais e resultados obtidos nas Fases I, II e III (valores médios).....	91
Tabela 5.11: Identificação das bandas de DGGE a partir do <i>RDP Classifier</i> e <i>Blastn</i>	96
Tabela 5.12: Micro-organismos identificados a partir do gel de DGGE.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

μl	microlitro
Anammox	Anaerobic Ammonium Oxidation ou Oxidação Anaeróbia da Amônia
AOB	Aerobic Oxidizing Bacteria ou Bactéria Oxidadora de Amônia
ATP	Adenosina Trifosfato
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Albumina de soro bovina
C/N	Relação Carbono/Nitrogênio
<i>Ca.</i>	<i>Candidatus</i>
CANON	Completely Autotrophic Nitrogen removal Over Nitrite
CEPTS	Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
COPASA	Companhia de Saneamento de Minas Gerais
CT	Ciclo Treshold
DBO	Demanda Biológica de Oxigênio
DESA	Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental
DGGE	Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis ou Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAr	DNA ribossomal

dNTP	Desoxirribonucleotídeo fosfatado
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EDTA Tetraacético	Ethylenediamine Tetraacetic Acid ou Ácido Etilenodiamino
ETE	Estação de Tratamento de Esgotos
GW	Gigawatt
L	Litro
LB	Luria Bertani
M	Molar
MBBR	Moving Bed Biofilm Reactor
NCBI	National Center of Biotechnology Information
ng	Nanograma
nM	Nanomolar
NOB	Nitrite Oxidizing Bacteria ou Bactéria Oxidadora de Nitrito
NTK	Nitrogênio Total Kjeldahl
°C	Grau Célsius
OD	Oxigênio Dissolvido
OLAND	Oxigen Limitant Autotrophic Nitrification Denitrification
pb	Par de base
PBS	Tampão Fosfato Salino

PCR	Polimerase Chain Reaction ou Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
pmol	Picomolar
RBS	Reator em Batelada Sequencial
RDP	Ribossomal Database Project
REGAP	Refinaria Gabriel Passos
RNAr	Ácido Ribonucleico Ribossomal
SAD	Simultaneous Anammox and Denitrification
SHARON	Single Reactor for Ammonium Removal Over Nitrite
SNAD	Simultaneous Nitrification, Anammox and Denitrification
SST	Sólidos Suspensos Totais
SSV	Sólidos Suspensos Voláteis
STV	Sólidos Totais Voláteis
TAE	Tris acetato e EDTA
TDH	Tempo de Detenção Hidráulica
UASB	Upflow Anaerobic Sludge Blanket
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages

1 INTRODUÇÃO

A presença de compostos nitrogenados ou efluentes contendo nitrogênio amoniacal proveniente de diferentes processos industriais, práticas de fertilização e esgotos podem impactar negativamente os ambientes aquáticos e causar consumo de oxigênio dissolvido e eutrofização nos corpos d'água receptores. O nitrogênio, na maioria das vezes, está presente nos efluentes na forma de nitrogênio reduzido como a amônia (NH_3^+) e amônia ionizada ou íon amônio (NH_4^+) (MOTA & VON SPERLING, 2009). Várias pesquisas vêm sendo realizadas para desenvolver tecnologias que visam reduzir a quantidade de nitrogênio amoniacal nas águas residuárias.

Existem várias estratégias para redução do impacto ambiental de espécies nitrogenadas, como o N-NH_4^+ , N-NO_2^- e N-NO_3^- . Esses processos podem ser físicos, físico-químicos ou biológicos. Dentre os processos físicos, a adsorção se mostra bastante eficiente para remover amônia de meios aquosos, porém, segundo Pergher *et al.* (2005), a utilização de resinas trocadoras de íons é economicamente inviável para o tratamento de efluentes. Outra forma de remover compostos de nitrogênio é por processos químicos ou físico-químicos pela coprecipitação ou precipitação. Pastor *et al.* (2007) mostraram que é possível a remoção de fósforo e nitrogênio através de um processo biológico, complementado por um processo químico, através do qual ocorre a formação de estruvita ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Apesar disto, na maioria das vezes os processos químicos estão limitados às condições de pH e características do efluente que, por sua vez, podem elevar os custos operacionais necessários para resultar em eficiência satisfatória. Desta forma, a remoção de compostos nitrogenados de efluentes por processos biológicos é uma alternativa viável e com uso crescente devido a questões de favorecimento econômico com relação aos processos físicos e químicos.

O efluente das estações de tratamento de esgotos (ETE) contém compostos de nitrogênio orgânico e inorgânico na forma de amônia ionizada. Aproximadamente 60% dos resíduos nitrogenados em ETE estão na forma orgânica e 40% na forma inorgânica. Em geral, a faixa de concentração de N-amoniacal nos esgotos sanitários predominantemente domésticos situa-se entre 20 e 35 mg N.L⁻¹, com valor típico de 25 mg N.L⁻¹ (VON SPERLING, 2005). Cabe ressaltar que as concentrações de N-amoniacal tendem a aumentar cerca de 30% após o pré-

tratamento em etapa anaeróbia, devido à amonificação de parte da parcela do nitrogênio orgânico (ALMEIDA, 2012).

A remoção de nitrogênio em sistemas de tratamento tem sido tradicionalmente realizada por processos microbiológicos que ocorrem em duas etapas distintas, a nitrificação seguida pela desnitrificação. A primeira etapa é aeróbia, na qual bactérias nitrificantes oxidam amônio (NH_4^+) a nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-). Em uma segunda etapa, o nitrato formado anteriormente é convertido em nitrogênio gasoso, por bactérias quimiorganotróficas que requerem uma fonte de carbono para a desnitrificação. Há necessidade de um eficiente sistema de aeração para o desenvolvimento das nitrificantes, e a adição de um substrato apropriado pode ser necessária para completar a desnitrificação. Em virtude da elevada quantidade de biomassa gerada, há preocupação com o tratamento e descarte do lodo excedente. O processo de oxidação anaeróbia de amônia, ou Anammox, é uma tecnologia promissora para a remoção de nitrogênio. Este processo remove dois poluentes simultaneamente, amônio e nitrito, convertendo-os a nitrogênio gasoso (ZHANG *et al.*, 2008). Por ser uma alternativa às tecnologias convencionais de remoção biológica de nitrogênio, o processo Anammox vem sendo estudado nas últimas duas décadas. Possui como principais vantagens a redução de custos operacionais com aeração e a ausência da necessidade de adição de fontes externas de carbono, que são requeridas nos processos de nitrificação e desnitrificação, respectivamente. As principais desvantagens do processo estão associadas ao crescimento lento das bactérias anammox e ao pequeno rendimento de biomassa, o que pode aumentar consideravelmente o tempo de partida dos reatores (GAO; TAO, 2011).

As bactérias anammox são micro-organismos quimioautotróficos e utilizam o CO_2 como única fonte de carbono. Fontes de carbono inorgânico, como o CO_2 e o HCO_3^- são particularmente importantes para o cultivo de bactérias anammox e favorecem o crescimento e o aumento da atividade desses micro-organismos. No entanto, a presença de matéria orgânica (carbono orgânico) em elevadas concentrações pode provocar efeitos adversos sobre as bactérias anammox, diminuindo a eficiência ou até mesmo causando a inibição do processo anammox. Este trabalho se justifica pela necessidade de estudo a respeito desse processo e de sua utilização para a remoção de nitrogênio amoniacal de águas residuárias contendo matéria orgânica. Apesar dos avanços nos estudos acerca do processo Anammox e do sucesso de sua aplicação em diversos países, pesquisas em que esse processo foi utilizado para tratamento de

efluentes anaeróbios contendo compostos orgânicos (DQO) e baixas concentrações de nitrogênio são raras na literatura e necessitam de maiores investigações, a fim de avaliar a aplicabilidade do processo Anammox para o pós-tratamento desses efluentes.

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo geral*

O objetivo geral desta pesquisa é avaliar, em laboratório, a aplicabilidade e a eficiência da remoção de nitrogênio amoniacal pelo processo Anammox como pós-tratamento de efluente anaeróbio.

2.2 *Objetivos específicos*

- Verificar o desempenho do processo Anammox na remoção de compostos nitrogenados presentes em efluente sintético com diferentes relações de DQO/N, aplicando um efluente sintético.
- Avaliar a capacidade de remoção de N-amoniacal pelo processo Anammox quando aplicado ao pós-tratamento de efluente anaeróbio real proveniente de reator UASB tratando esgoto doméstico.
- Investigar e comparar a composição da comunidade microbiana desenvolvida no Reator em Batelada Sequencial (RBS) ao longo dos experimentos com efluente sintético e efluente anaeróbio de reator UASB.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Nitrogênio: distribuição e impactos no meio ambiente

O nitrogênio (N) é um nutriente essencial para a vida. A maior parte do nitrogênio da Terra existe sob a forma de nitrogênio gasoso (N_2), constituindo 78% do ar atmosférico. Nessa forma de gás N_2 ele é quimicamente inerte e não pode ser usado diretamente como fonte de nitrogênio, exceto para algumas espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio (VAN DE GRAAF *et al.*, 1997; MADIGAN *et al.*, 2010).

É um constituinte importante das células, sendo componente das proteínas, ácidos nucleicos e vários outros compostos celulares, e é fundamental para as estruturas e os processos bioquímicos que definem a vida. Segundo Madigan *et al.* (2010), após o carbono, o elemento mais abundante nas células corresponde ao nitrogênio e uma célula bacteriana é composta por cerca de 12% de nitrogênio (por peso seco).

Os compostos nitrogenados se apresentam em estado de oxidação que podem variar das formas mais reduzidas -3 (NH_3/NH_4^+), até as mais oxidadas +5 (NO_3^-) (MADIGAN *et al.*, 2010). Em cada estado de oxidação o nitrogênio atômico se combina com átomos de hidrogênio, oxigênio ou outros átomos de nitrogênio. Desta forma, pelo menos, uma única molécula inorgânica existe para cada estado de oxidação.

Os compostos mais estáveis são o ânion nitrato (NO_3^-) e o cátion amônio (NH_4^+) que podem causar graves problemas ambientais (BOTHE *et al.*, 2007). Apesar de algumas destas moléculas serem termodinamicamente mais estáveis do que outras, todos os estados de oxidação são possíveis em sistemas aquosos, uma vez que o estado de oxidação do nitrogênio em um determinado ambiente é controlado pela cinética da reação e não pelo equilíbrio termodinâmico, pois a energia de ativação dos compostos nitrogenados é alta (JETTEN *et al.*, 2009).

Os estados de oxidação e algumas propriedades dos compostos nitrogenados são apresentados na Tabela 3.1.

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	NO_3^-	+5	Não é tóxico em concentrações fisiológicas, porém, esse ânion é fortemente oxidante e o ácido nítrico é tóxico (HNO_3 ; $\text{pK}_a = -1,4$).
Dióxido de nitrogênio	$\text{NO}_{2(g)}$	+4	Gás laranja e tóxico que surge a partir da oxidação do ácido nítrico e do dióxido de oxigênio (O_2).
Nitrito	NO_2^-	+3	Tóxico, liga-se a átomos de ferro celulares como na molécula de hemoglobina, por exemplo.
Óxido nítrico	$\text{NO}_{(g)}$	+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	$\text{N}_2\text{O}_{(g)}$	+1	Quimicamente inerte e não tóxico em concentrações fisiológicas.
Gás dinitrogênio	N_2	0	Quimicamente inerte e não tóxico.
Hidroxilamina	$\text{NH}_2\text{OH}_{(aq)}$	-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	$\text{N}_2\text{H}_{4(aq)}$	-2	Altamente tóxico. Utilizado como combustível de foguetes, forma monohidratos.
Amônio	NH_4^+	-3	Não tóxico em concentrações fisiológicas, porém, o cátion amônia (NH_3^+) é tóxico, ($\text{pK}_a = 9,25$).

Fonte: Adaptado de Simon e Klotz (2013)

O nitrogênio é encontrado na natureza nas formas orgânica e inorgânica. No entanto, a maior parte do nitrogênio disponível encontra-se sob a forma de compostos inorgânicos, como a amônia (NH_3), nitrato (NO_3^-) e N_2 . Segundo Von Sperling (2005), no meio aquático, o nitrogênio pode ser encontrado nas seguintes formas: nitrogênio molecular (N_2) (escapando para a atmosfera); nitrogênio orgânico (dissolvido e em suspensão); amônia (livre ou não ionizada – NH_3^+ e ionizada – NH_4^+); nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-). Ainda segundo o autor, as espécies inorgânicas de nitrogênio 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:

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

$$\text{NT} = \text{NTK} + \text{NO}_2^- + \text{NO}_3^- \quad (\text{nitrogênio total}) \quad (3.2)$$

Os compostos orgânicos nitrogenados são frequentemente lançados nas águas residuárias sanitárias, sendo encontrados nos resíduos fecais e de alimentos. As proteínas, um dos principais componentes das águas residuárias, são coloides, insolúveis em água, e sofrem hidrólise pela ação de enzimas bacterianas, liberando os aminoácidos.

Outro importante composto orgânico de nitrogênio é a ureia (H_2NCONH_2), que constitui o maior componente da urina. Durante a decomposição de aminoácidos, ureia e nucleotídeos (originários da degradação de ácidos nucleicos) ocorre à liberação de grupos amina, processo denominado de amonificação. A amonificação resulta na produção de nitrogênio reduzido sob duas formas: amônia não ionizada ou livre (NH_3^+) e amônia ionizada ou íon amônio (NH_4^+).

O equilíbrio entre as diferentes espécies de amônia depende das características físicas e químicas dos corpos d'água. Elevações do pH ou da temperatura deslocam o equilíbrio químico no sentido da amônia não ionizada. Na temperatura de 25°C , a proporção da amônia livre ou não ionizada em relação à amônia total é aproximadamente o dobro em relação à temperatura de 15°C . Com relação aos valores de pH, temos as seguintes formas: $\text{pH} < 8$, praticamente toda a amônia na forma ionizada (NH_4^+); $\text{pH} = 9,5$, aproximadamente 50% de NH_3^+ e 50% de NH_4^+ ; e $\text{pH} > 11$, praticamente toda a amônia na forma de NH_3^+ (BAIRD, 2002; MOTA & VON SPERLING, 2009).

A amônia é um composto importante e é responsável por uma série de problemas ambientais, dentre os quais a degradação da qualidade do ar, a geração de odores, alterações climáticas, a acidificação do solo e principalmente a eutrofização dos corpos hídricos (AUSTIN *et al.*, 2013). A amônia pode ser tóxica ao ambiente, estando presente em diversos efluentes industriais e domésticos. A amônia ionizada (NH_4^+) não é tóxica e é consumida por bactérias preferencialmente como nutriente. Por outro lado, a contaminação do ambiente aquático por nitrogênio amoniacal (NH_3^+) é tóxica, podendo afetar a saúde de peixes em concentrações acima de $0,02 \text{ mg.L}^{-1}$ (PEREIRA & MERCANTE, 2005).

O íon amônio quando oxidado a nitrato, diminui a quantidade de oxigênio dissolvido (OD) nos ecossistemas aquáticos, causando mortalidade da biota aeróbia. Além da restrição inerente às concentrações de OD para sobrevivência das diversas espécies de peixes, as formas de nitrogênio apresentam diferentes níveis de toxicidade, levando a tolerâncias variadas para as diferentes espécies de peixes. Em geral os níveis letais são: amônia entre $0,6$ e $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$,

nitrito $> 0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ e nitrato $> 5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ (BASTOS *et al.*, 2003; REIS e MENDONÇA, 2009).

O nitrato é tóxico caso seja ingerido em concentrações elevadas, principalmente por crianças, e devido à sua particularidade em associar-se à molécula de hemoglobina no sítio ocupado pelo oxigênio, pode 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 apresentar-se na forma de íons nitrito (NO_2^-), o qual é instável e é rapidamente convertido em íon nitrato (NO_3^-). Ambos estão presentes tanto em sistemas naturais como em plantas de tratamento de águas residuárias. O nitrito pode ser o responsável pela formação de substâncias mutagênicas e carcinogênicas (BAIRD, 2002). Há também liberação para a atmosfera dos gases óxido nítrico (NO) e óxido nitroso (N_2O), os quais são gases que contribuem para o efeito estufa e portanto também estão envolvidos nas mudanças climáticas atuais (AUSTIN *et al.*, 2013; SULLIVAN *et al.*, 2014)

Aproximadamente 60% dos resíduos nitrogenados em ETE estão na forma orgânica e 40 % na forma inorgânica, na maioria das estações de tratamento as concentrações de nitrogênio total afluente estão entre 35 mg.L^{-1} e 60 mg.L^{-1} , sendo a concentração do nitrogênio amoniacal entre 20 mg.L^{-1} e 35 mg.L^{-1} (VON SPERLING, 2005).

Segundo Austin *et al.* (2013), os ecossistemas aquáticos são os mais afetados pela poluição por compostos nitrogenados devido às atividades humanas e tem emergido na atualidade como um problema grave que pode ocasionar um desequilíbrio no ciclo do nitrogênio. A 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, aumenta os níveis de nutrientes, principalmente o nitrogênio (N) e fósforo (P), que são elementos limitantes para o crescimento de plantas e algas na água.

A determinação da forma predominante do nitrogênio em um corpo d'água pode fornecer informações sobre o estágio da poluição eventualmente causada por algum lançamento de

esgoto a montante. A Tabela 3.2 apresenta um resumo da distribuição das formas de nitrogênio em situações distintas:

Tabela 3.2: Distribuição relativa das formas de nitrogênio em diferentes condições

Condição	Forma predominante do nitrogênio
Esgoto Bruto	Nitrogênio orgânico / Amônia
Poluição recente em um curso de água	Nitrogênio orgânico / Amônia
Estágio intermediário da poluição em um curso de água	Nitrogênio orgânico / Amônia / Nitrito (em menores concentrações) / Nitrato
Poluição remota em um curso de água	Nitrato
Efluente de tratamento sem nitrificação	Nitrogênio orgânico (em menores concentrações) / Amônia
Efluente de tratamento com nitrificação	Nitrato
Efluente de tratamento com nitrificação/desnitrificação	Concentrações mais reduzidas de todas as formas de nitrogênio

Fonte: Adaptado de Von Sperling (2005)

Os compostos nitrogenados, juntamente com outros nutrientes como o carbono (C) e o fósforo (P), quando em excesso, podem causar sérios problemas aos ambientes aquáticos, pois contribuem para o fenômeno de eutrofização, o que pode levar a deterioração dos corpos d'água. Esses nutrientes são encontrados em diversos tipos de águas residuárias tanto urbanas quanto agrícolas ou industriais. Esteves (1998) explica que a eutrofização é o aumento da concentração de nutrientes, especialmente o nitrogênio e fósforo, nos ecossistemas aquáticos, e que pode ser natural (processo lento, porém contínuo) ou artificial (provocada pelo homem). A eutrofização pode possibilitar o crescimento mais intenso de seres vivos que utilizam esses nutrientes, especialmente as algas. Estas grandes concentrações de algas podem trazer prejuízos aos múltiplos usos dessas águas, prejudicando seriamente o abastecimento público ou causando poluição decorrente da morte e decomposição desses organismos.

Os sistemas de tratamento de águas residuárias têm sido desenvolvidos com o objetivo de reduzir a concentração de matéria orgânica de águas com altas cargas de DQO, mas a maioria desses sistemas não foram projetados para a remoção de nutrientes, inviabilizando tanto o lançamento quanto as possibilidades de reuso.

O tratamento adequado dos efluentes para o atendimento dos padrões de lançamento nos corpos hídricos representa uma importante medida na solução dos problemas relacionados à poluição e escassez dos recursos hídricos. Em abril de 2008, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) modificou os limites estabelecidos pela Resolução N° 357/05, tornando os padrões de lançamento menos restritivos. Essa Resolução, que preconizava para o parâmetro nitrogênio amoniacal total o valor máximo de lançamento em 20 mg N.L⁻¹, deixou de ser aplicável como regulador da qualidade de efluentes finais produzidos por sistemas de tratamento de esgotos sanitários, no entanto, o limite de 20 mgN.L⁻¹ continuou válido para efluentes industriais. Atualmente, esse limite continua regulamentado pela Resolução 430/2011 que substituiu a 397/08 (BRASIL, 2011).

3.2 Processos biológicos envolvidos no Ciclo do Nitrogênio

O Ciclo do Nitrogênio (Figura 3.1) representa um dos mais importantes e complexos ciclos biogeoquímicos, pois envolve um processo dinâmico de troca de energia entre a atmosfera, a matéria orgânica e compostos inorgânicos. Reações redox compõem esse ciclo e podem ser realizadas de maneiras diferentes por bactérias, arqueias, alguns fungos especializados e plantas (BOTHE *et al.*, 2007; MAIER *et al.*, 2009).

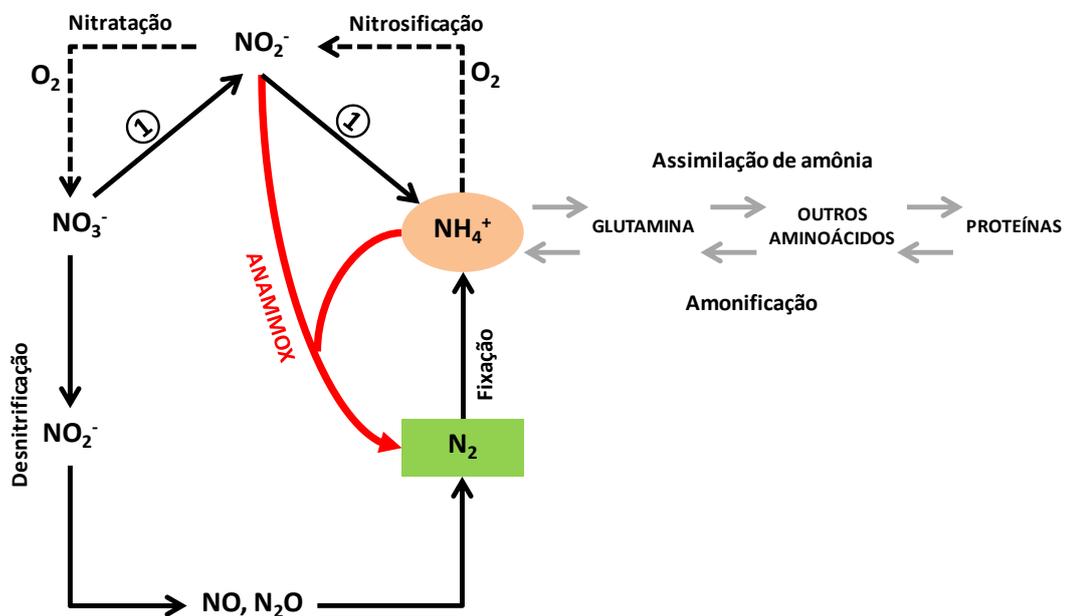


Figura 3.1: Ciclo Redox do Nitrogênio com o processo Anammox: As reações de oxidação são indicadas pelas setas com traços e as de redução, pelas setas contínuas. As reações que não apresentam alteração redox são indicadas pelas setas cinzas. O processo indicado por (1) refere-se à Redução Assimilatória/Desassimilatória do NO_3^-

Os processos de transformações microbianas acontecem através de processos catabólicos como nitrificação, desnitrificação, redução desassimilatória do nitrato e oxidação anaeróbia da amônia (processo Anammox) e processos anabólicos, como redução assimilatória do nitrato, assimilação e fixação de nitrogênio (BOTHE *et al.*, 2007; MAIER *et al.*, 2009; MADIGAN *et al.*, 2010). A Tabela 3.3 apresenta um resumo dos principais processos realizados pelos procaríotos no Ciclo do Nitrogênio, esses processos serão descritos de maneira mais detalhada a seguir.

Tabela 3.3: Principais processos biológicos do Ciclo do Nitrogênio

Processos	Reação
Fixação de Nitrogênio	$0,5N_2 + 1,5H_2 + H^+ \rightarrow NH_4^+$
Desnitrificação	$NO_3^- + 1,25(CH_2O) + H^+ \rightarrow 0,5N_2 + 1,75H_2O + 1,25CO_2$
Amonificação	$N \text{ orgânico} \rightarrow NH_4^+$
Nitrosificação	$NH_4^+ + 1,5O_2 \rightarrow NO_2^- + 2H^+ + H_2O$
Nitratação	$NO_2^- + 0,5O_2 \rightarrow NO_3^-$
Redução desassimilatória/assimilatória NO_3^-	$NO_3^- + 2(CH_2O) + 2H^+ \rightarrow NH_4^+ + 2CO_2 + H_2O$
Anammox	$NH_4^+ + 1,32NO_2^- + 0,066HCO_3^- + 0,13H^+ \rightarrow 1,02N_2 + 0,26NO_3^- + 0,066CH_2O_{0,5}N_{0,15} + 2,03H_2O$

Fonte: Adaptado de STROUS *et al.*, 1998; BOTHE *et al.*, 2007; MADIGAN *et al.*, 2010.

3.2.1 Fixação Biológica do Nitrogênio

A Fixação Biológica de Nitrogênio é considerada um dos processos biológicos mais importantes. A maior parte do nitrogênio está na atmosfera, indisponível para a maioria dos organismos vivos. A fixação bacteriana do nitrogênio é um processo metabólico que necessita de energia para quebrar a ligação tripla do nitrogênio ($N \equiv N$). Apenas os micro-organismos que possuem a enzima nitrogenase são capazes de transformar o N_2 em NH_4^+ , forma nitrogenada prontamente assimilável para as plantas e outros organismos (MAIER *et al.*, 2009).

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 NH_4^+ presente nas águas residuárias é oriundo principalmente de processos de decomposição da matéria orgânica nitrogenada (KAMPSCHREUR *et al.*, 2009).

A Fixação Biológica de Nitrogênio é um processo anabólico e 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). Outra característica importante é a associação de alguns micro-organismos com as plantas (simbiose/mutualismo) para aumentar a fixação de N₂, como por exemplo, a relação entre as leguminosas e as bactérias do gênero *Rhizobium*, essa associação é benéfica para ambos os organismos e pode aumentar a fixação de N₂ de 200 a 300 kg N/ha/ano (MAIER *et al.*, 2009). Bactérias aeróbias e anaeróbias podem realizar a fixação do N₂, bem como algumas espécies de actinomicetos e cianobactérias. A Tabela 3.4 apresenta alguns gêneros envolvidos nesse processo:

Tabela 3.4: Gêneros que realizam a Fixação Biológica do N₂

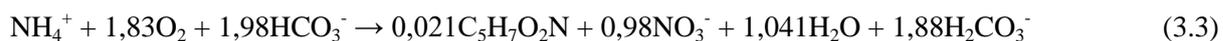
Características metabólicas	Gêneros
Heterotróficos e Aeróbios	<i>Azotobacter</i> <i>Beijerinckia</i> <i>Acetobacter</i> <i>Pseudomonas</i>
Heterotróficos e Anaeróbios Facultativos	<i>Klebsiella</i> <i>Bacillus</i>
Heterotróficos e Microaerófilos	<i>Xanthobacter</i> <i>Azospirillum</i>
Autotróficos, Heterotróficos e Anaeróbios estritos	<i>Thiobacillus</i> <i>Clostridium</i> <i>Desulfovibrio</i>
Fototróficos e Aeróbios	<i>Anabaena</i> <i>Nostoc</i>
Fototrófico e Anaeróbio Facultativo	<i>Rhodospirillum</i>
Fototróficos e Anaeróbios estritos	<i>Chlorobium</i> <i>Chromatium</i>
Simbióticos	<i>Rhizobium</i> <i>Bradyrhizobium</i> <i>Frankia</i>

Fonte: Adaptado de MAIER *et al.*, 2009 e MADIGAN *et al.*, 2010.

3.2.2 Nitrificação: Nitrosificação e Nitratação

A nitrosificação consiste na conversão de amônia a nitrito na presença de oxigênio, assim, as bactérias que realizam esse processo são denominadas nitrosificantes (produtoras de

nitrogênio nitroso). Já a nitratação é o processo subsequente, onde o nitrito é convertido a nitrato também na presença de oxigênio, sendo essa reação efetuada pelas bactérias nitrificantes (produtoras de nitrato) (MADIGAN *et al.*, 2010). Os gêneros *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* correspondem aos principais gêneros de bactérias nitrosificantes e nitrificantes respectivamente. Segundo AHN (2006), o processo de nitrosificação e nitrificação pode ser expresso pela Equação 3.3, que mostra a oxidação completa da amônia a nitrato, incluindo a síntese celular.



As reações mediadas pelas bactérias nitrificantes geram pequena quantidade de energia. Dessa maneira, o crescimento global desses micro-organismos (gramas de células produzidas por mol de substrato oxidado) é 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 N-NH₄⁺ oxidado, respectivamente (AHN, 2006).

A nitrificação é uma etapa conduzida por dois grupos microbianos distintos: AOB (*Ammonium Oxidizing Bacteria*, ou bactérias oxidadoras de amônia) e NOB (*Nitrite Oxidizing Bacteria*, ou bactérias oxidadoras de nitrito). 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. Ambos os grupos são aeróbios e de metabolismo quimiolitotrófico, obtendo 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 CO₂, e na forma de alcalinidade bicarbonato (HCO₃⁻) (GRAAF *et al.*, 1995; GERARDI, 2006). Não obstante, algumas amostras de NOB apresentam crescimento mixotrófico, sendo capazes de utilizar compostos orgânicos como fonte de carbono (DAIMS *et al.*, 2001). As principais espécies de bactérias nitrificantes quimiolitotróficas são listadas na Tabela 3.5.

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. Estes fatores podem exercer influência direta na atividade enzimática e na velocidade de crescimento dos micro-organismos ou influência indireta, interferindo na estrutura do biofilme, na velocidade de difusão e na solubilidade do oxigênio. 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 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.

Tabela 3.5: Exemplos de bactérias nitrificantes quimiolitotróficas

Grupo	Gêneros	Espécies
AOB - Oxidadoras de Amônia	<i>Nitrosomonas</i>	<i>europaea</i>
		<i>eutrophus marina</i>
	<i>Nitrosococcus</i>	<i>nitrosus</i>
		<i>mobilis</i>
		<i>oceanus</i>
		<i>briensis</i>
<i>Nitrosolobus</i>	<i>multiformis</i>	
<i>Nitrosovibrio</i>	<i>tenuis</i>	
NOB - Oxidadoras de Nitrito	<i>Nitrobacter</i>	<i>winogradskyi</i>
		<i>hamburgensis</i>
	<i>Nitrospina</i>	<i>vulgaris</i>
		<i>gracilis</i>
		<i>mobilis</i>
<i>Nitrospira</i>	<i>marina</i>	

Fonte: Adaptado de MAIER *et al.*, 2009.

3.2.3 Desnitrificação

A desnitrificação consiste na redução do nitrato a compostos de nitrogênio gasoso. É um processo alternativo de micro-organismos para respirarem em condições limitadas de O₂ ou mesmo anóxicas, utilizando compostos nitrogenados inorgânicos como aceptores finais de elétrons. É uma das principais fontes de emissões de NO (óxido nítrico) e N₂O na atmosfera (JETTEN, 2008).

O processo pode ser desenvolvido por várias bactérias quimiorganotróficas, litoautotróficas, fototróficas e alguns fungos. Os micro-organismos desnitrificantes autotróficos utilizam compostos de enxofre, hidrogênio, amônia ou nitrito como doadores de elétrons e o nitrato comoceptor de elétrons. A maioria das bactérias desnitrificantes é anaeróbia facultativa heterotrófica, que podem utilizar uma grande variedade de compostos orgânicos, como por exemplo: metanol, acetato, glicose, etanol, entre outros. Esses compostos são utilizados como

doadores de elétrons para obtenção de energia e fontes de carbono, inclusive aqueles encontrados em águas residuárias (AHN, 2006). Os organismos desnitrificantes são encontrados amplamente no meio ambiente e exibem uma variedade de características diferentes em termos de metabolismo. A Tabela 3.6 apresenta gêneros que podem realizar o processo de desnitrificação:

Tabela 3.6: Gêneros de bactérias desnitrificantes

Tipo de metabolismo	Gêneros	
Organotróficos	<i>Alcaligenes</i>	<i>Flexibacter</i>
	<i>Agrobacterium</i>	<i>Halobacterium</i>
	<i>Aquaspirillum</i>	<i>Hyphomicrobium</i>
	<i>Azospirillum</i>	<i>Kingella</i>
	<i>Bacillus</i>	<i>Neisseria</i>
	<i>Blastobacter</i>	<i>Paracoccus</i>
	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Propionibacterium</i>
	<i>Branhamella</i>	<i>Pseudomonas</i>
	<i>Chromobacterium</i>	<i>Rhizobium</i>
	<i>Cytophaga</i>	<i>Wolinella</i>
	<i>Flavobacterium</i>	
Fototrófico	<i>Rhodopseudomonas</i>	
Litotróficos	<i>Alcaligenes</i>	
	<i>Bradyrhizobium</i>	
	<i>Nitrosomonas</i>	
	<i>Paracoccus</i>	
	<i>Pseudomonas</i>	
	<i>Thiobacillus</i>	
	<i>Thiomicrospira</i>	
	<i>Thiosphaera</i>	

Fonte: Adaptado de MAIER *et al.*, 2009.

O processo de desnitrificação possui quatro etapas. A primeira etapa da desnitrificação (redução de NO_3^- a NO_2^-) envolve uma enzima integral de membrana, a nitrato redutase, cuja síntese é inibida pelo oxigênio molecular. Na segunda etapa da via (transformação do NO_2^- a NO) atua a enzima nitrito redutase. As etapas subsequentes da desnitrificação, redução de NO a N_2O e redução de N_2O a N_2 , são mediadas pelas enzimas óxido nítrico redutase e óxido nitroso redutase, respectivamente. Assim como a primeira enzima envolvida no processo (nitrato redutase), as demais 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).

A desnitrificação é uma das principais maneiras pela qual o N₂ gasoso é formado biologicamente. Esse processo auxilia no tratamento de águas residuárias, pois, remove o nitrato e minimiza o processo de eutrofização quando o esgoto é lançado em lagos ou riachos. Por outro lado, a desnitrificação é um processo prejudicial devido ao uso de fertilizantes a base de nitrato de potássio (KNO₃), que promovem uma desnitrificação intensa e pode remover todo o nitrogênio do solo. A desnitrificação também contribui para a destruição da camada de ozônio e para as chuvas ácidas devido à produção de N₂O e NO durante o processo.

3.2.4 Assimilação da Amônia e Amonificação

A assimilação da amônia ocorre quando a amônia, resultante da redução de nitrato, é incorporada na célula e aos compostos de carbono, via enzimas glutamina sintase e glutamato sintase. Em um primeiro momento, a amônia 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 da amônia, em que os compostos orgânicos nitrogenados (aminoácidos e nucleotídeos) liberados das células sofrem hidrólise por meio de enzimas bacterianas, resultando na liberação de grupos amina, que resulta na produção de nitrogênio reduzido sob duas formas: amônia livre (NH₃⁺) ou ionizada (NH₄⁺), 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 NH₄⁺ (BOTHE *et al.*, 2007; MADIGAN *et al.*, 2010).

3.2.5 Oxidação anaeróbia da amônia

Embora as bactérias nitrificantes clássicas sejam aeróbias, a amônia também pode ser catabolizada em condições anóxicas. Esse processo, conhecido como Anammox (do inglês, *Anaerobic Ammonium Oxidation* - oxidação da amônia em condições anaeróbias) foi descoberto há quase duas décadas e envolve a oxidação do íon amônio diretamente a nitrogênio gasoso, utilizando o nitrito como aceptor de elétrons (VAN DE GRAAF *et al.*, 1996). A descoberta desse processo foi vista como uma revolução no ciclo convencional do nitrogênio, uma vez que anteriormente se considerava que a oxidação da amônia era possível apenas em condições aeróbias. Por se tratar do tema de maior relevância deste trabalho, o processo Anammox será abordado com maiores detalhes no item 3.3.

3.2.6 Redução desassimilatória do nitrato

A redução desassimilatória do nitrato a íon amônio (RDNA) 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 & THOMAS, 2001). Esse processo 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 passo seguinte é a redução do nitrito a amônia, 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, 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). A Tabela 3.7 apresenta uma variedade de bactérias que realizam RDNA, é interessante notar que a maioria das bactérias nesta lista utilizam a fermentação, em vez de metabolismo oxidativo.

Tabela 3.7: Bactérias que realizam a redução dissimilatória do nitrato e nitrito a íon amônio

Tolerância ao Oxigênio	Gêneros
Anaeróbios obrigatórios	<i>Clostridium</i> <i>Desulfovibrio</i> <i>Selenomonas</i> <i>Veillonella</i> <i>Wolinella</i>
Anaeróbios Facultativos	<i>Citrobacter</i> <i>Enterobacter</i> <i>Erwinia</i> <i>Escherichia</i> <i>Klebsiella</i> <i>Photobacterium</i> <i>Salmonella</i> <i>Serratia</i> <i>Vibrio</i>
Microaerófilo	<i>Campylobacter</i>
Aeróbios	<i>Bacillus</i> <i>Neisseria</i> <i>Pseudomonas</i>

Fonte: Adaptado de MAIER *et al.*, 2009.

3.2.7 Redução assimilatória do 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).

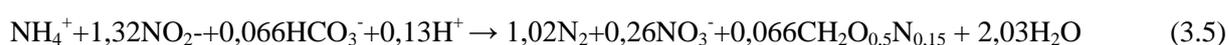
3.3 Processo Anammox

Há quase um século, o ciclo do nitrogênio era considerado completo, uma vez que a amônia não poderia ser oxidada em condições anóxicas. No entanto, os últimos 20 anos deixaram claro que o conhecimento acerca do ciclo microbiológico do nitrogênio e os seus principais participantes estão longe de estarem completos (JETTEN, 2008). Descobertas relevantes foram feitas nesse período, tais como a oxidação anaeróbia da amônia (Anammox) (JETTEN *et al.*, 1998; STROUS *et al.*, 1999a). Richards (1965) constatou uma perda de amônia inexplicável, em condições anóxicas, em estudos de balanço de nitrogênio em fiordes anóxicos. Na década de 1970, o químico austríaco Engelbert Broda foi o primeiro a usar dados termodinâmicos e fazer previsões sobre a existência de uma bactéria quimiolitotrófica capaz de oxidar amônia para N₂ gasoso, com base nos valores de energia livre das reações químicas (BRODA, 1977). Porém, até a constatação do processo Anammox nenhum pesquisador havia verificado a ocorrência desta bactéria no ambiente ou em qualquer sistema de engenharia.

O processo Anammox foi descoberto por Mulder *et al.* (1995) em um reator desnitrificante de leito fluidizado aplicado ao tratamento de efluentes de um reator metanogênico, operado para degradação de resíduos da planta de produção de fermento, em Delft na Holanda. Observou-se concomitantemente o desaparecimento de nitrato e aumento na produção de nitrogênio gasoso (Equação 3.4) (MULDER *et al.*, 1995).



Van de Graaf *et al.* (1996) demonstraram a natureza biológica dessa rota e a presença de uma bactéria autotrófica capaz de efetuar a reação anammox em um reator de leito fluidizado em escala laboratorial, o que tornou claro que o cultivo das mesmas deve ser realizado utilizando nitrito e não nitrato. Van de Graaf *et al.* (1997) esclareceram a rota metabólica de conversão da amônia a nitrogênio gasoso, em anaerobiose, utilizando experimentos com ^{15}N . Os autores presumiram que a bactéria autotrófica responsável pelo processo Anammox reduz nitrito (NO_2^-) a hidroxilamina (NH_2OH). Em seguida, hidroxilamina e amônio (NH_4^+) são condensados a hidrazina (N_2H_4) e água. Posteriormente, a hidrazina é oxidada a nitrogênio gasoso (N_2) e os elétrons são utilizados para reduzir a próxima molécula de nitrito. Além disso, parte do nitrito é convertida a nitrato, o que produz equivalentes de redução para fixação do CO_2 e conseqüentemente, aumento da biomassa. Em estudos posteriores, Strous *et al.* (1998) apresentaram o balanço total de nitrogênio, que apresentou a proporção de 1:1,32:0,26 para a conversão de amônio e nitrito e produção de nitrato. A Equação 3.5 se refere à equação geral da reação anammox, proposta pelos referidos autores.



O processo Anammox é realizado por bactérias anaeróbias, quimiolitotróficas, de crescimento muito lento e até o momento não existe uma única espécie que tenha sido isolada em cultura pura (KARTAL *et al.*, 2011). As características das bactérias anammox, bem como a ecologia, a diversidade e aplicação desses micro-organismos serão apresentadas nos próximos itens.

3.3.1 Ecologia e diversidade microbiana das bactérias envolvidas no processo Anammox

Os micro-organismos que realizam o processo Anammox pertencem ao domínio *Bacteria*, filo dos *Planctomycetes* e ordem *Brocadiales*. Até o momento foram identificados seis candidatos a gêneros, denominados de *Candidatus Brocadia*, *Candidatus Kuenenia*, *Candidatus Scalindua*, *Candidatus Anammoxoglobus*, *Candidatus Jettenia* e *Candidatus Anammoximicrobium* (KARTAL *et al.*, 2007; QUAN *et al.*, 2008; HU *et al.*, 2013; ALI *et al.*, 2015a), e descritas 21 espécies de bactérias anammox. A Tabela 3.8 apresenta os gêneros conhecidos, bem como as espécies que os compõe.

As bactérias anammox já foram identificadas em diversos ecossistemas naturais, tais como: regiões anóxicas de sedimentos marinhos e colunas d'água (THAMDRUP e DALSGAARD,

2002; DALSGAARD *et al.*, 2003; KUYPERS *et al.*, 2003; RYSGAARD *et al.*, 2004; ENGSTRÖM *et al.*, 2005; DALSGAARD *et al.*, 2005; DEVOL *et al.*, 2006; PENTON *et al.*, 2006; HAMERSLEY *et al.*, 2007; SCHMID *et al.*, 2007; RICH *et al.*, 2008; GALÁN *et al.*, 2009); sedimentos de água doce e colunas de água (PENTON *et al.*, 2006; SCHUBERT *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2007; CLARK *et al.*, 2008; MOORE *et al.*, 2011; YOSHINAGA *et al.*, 2011); 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 (HUMBERT *et al.*, 2010; HU *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2011; ZHU *et al.*, 2011). As bactérias anammox 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.*, 2007; FRIJTERS *et al.*, 2007; JOSS *et al.*, 2009; ABMA *et al.*, 2010; KARTAL *et al.*, 2010; TOKUTOMI *et al.*, 2011); em sistemas de recirculação utilizados na aquicultura (TAL *et al.*, 2006; LAHAV *et al.*, 2009; VAN KESSEL *et al.*, 2010); em reservatórios de petróleo (LI *et al.*, 2010) e em sistemas de tratamento de chorume (EGLI *et al.*, 2001; RUSCALLEDA *et al.*, 2008; LIANG E LIU, 2008).

Tabela 3.8: Espécies de bactérias anaeróbias oxidadoras de amônia já descritas.

Gênero	Espécie	Referência
<i>Brocadia</i>	<i>Candidatus Brocadia anammoxidans</i>	STROUS <i>et al.</i> , (1999a)
	<i>Candidatus Brocadia fulgida</i>	KARTAL <i>et al.</i> , (2008)
	<i>Candidatus Brocadia sinica</i>	HU <i>et al.</i> , (2010)
	<i>Candidatus Brocadia caroliniensis</i>	VANOTTI <i>et al.</i> , (2011)
	<i>Candidatus Brocadia brasiliensis</i>	ARAÚJO <i>et al.</i> , (2011)
<i>Scalindua</i>	<i>Candidatus Scalindua brodae</i>	SCHMID <i>et al.</i> , (2003)
	<i>Candidatus Scalindua wagneri</i>	SCHMID <i>et al.</i> , (2003)
	<i>Candidatus Scalindua sorokinii</i>	KUYPERS <i>et al.</i> , (2003)
	<i>Candidatus Scalindua arabica</i>	WOEBKEN <i>et al.</i> , (2008)
	<i>Candidatus Scalindua sinooifield</i>	LI <i>et al.</i> , (2010)
	<i>Candidatus Scalindua zhenghei</i>	HONG <i>et al.</i> , (2011)
	<i>Candidatus Scalindua marina</i>	BRANDSMA <i>et al.</i> , (2011)
	<i>Candidatus Scalindua richardsii</i>	FUCHSMAN <i>et al.</i> , (2012)
<i>Anammoxoglobus</i>	<i>Candidatus Anammoxoglobus propionicus</i>	VOSENBERG <i>et al.</i> , (2013)
	<i>Candidatus Anammoxoglobus sulfate</i>	KARTAL <i>et al.</i> , (2007)
<i>Jettenia</i>	<i>Candidatus Jettenia asiatica</i>	LIU <i>et al.</i> , (2008)
	<i>Candidatus Jettenia caeni</i>	TSUSHIMA <i>et al.</i> , (2007)
	<i>Candidatus Jettenia moscovienalis</i>	ALI <i>et al.</i> , (2015b)
<i>Kuenenia</i>	<i>Candidatus Kuenenia stuttgartiensis</i>	NIKOLAEV <i>et al.</i> , (2015)
<i>Anammoximicrobium</i>	<i>Candidatus Anammoximicrobium moscowii</i>	SCHMID <i>et al.</i> , (2000)
		KHRAMENKOVA <i>et al.</i> , (2013)

Estudos recentes revelaram que as bactérias anammox que habitam ambientes marinhos contribuem significativamente para a liberação de nitrogênio fixado dos oceanos (DEVOL, 2003; ARRIGO, 2005; KUYPERS *et al.*, 2005; LAM e KUYPERS, 2011; HU *et al.*, 2013). Alguns autores explicam que esses micro-organismos são especializados a converter seus substratos em concentrações muito baixas devido à afinidade elevada para a amônia e nitrito (STROUS *et al.*, 1999a; YAN *et al.*, 2012).

Os *Planctomyces* formam um grupo distinto dentro do domínio *Bacteria*, o qual possui características bastante peculiares, entre elas a presença de compartimentalização intracelular. As bactérias anammox formam um grupo monofilético profundamente ramificado dentro do filo dos *Planctomyces* (STROUS *et al.*, 1999a; SCHMID *et al.*, 2007; VAN NIFTRIK & JETTEN, 2012). Além de possuírem um metabolismo único (anaeróbias, quimiolitotróficas), sendo capazes de oxidar a amônia anaerobicamente, a presença de uma estrutura membranosa intracelular com ausência de ribossomos denominada anamoxossomo torna esse grupo bastante diferente dos demais (STROUS *et al.*, 1999a; VAN NIFTRIK & JETTEN, 2012). A Figura 3.2 apresenta a árvore filogenética das bactérias anammox, com base nas sequências do rRNA 16S.

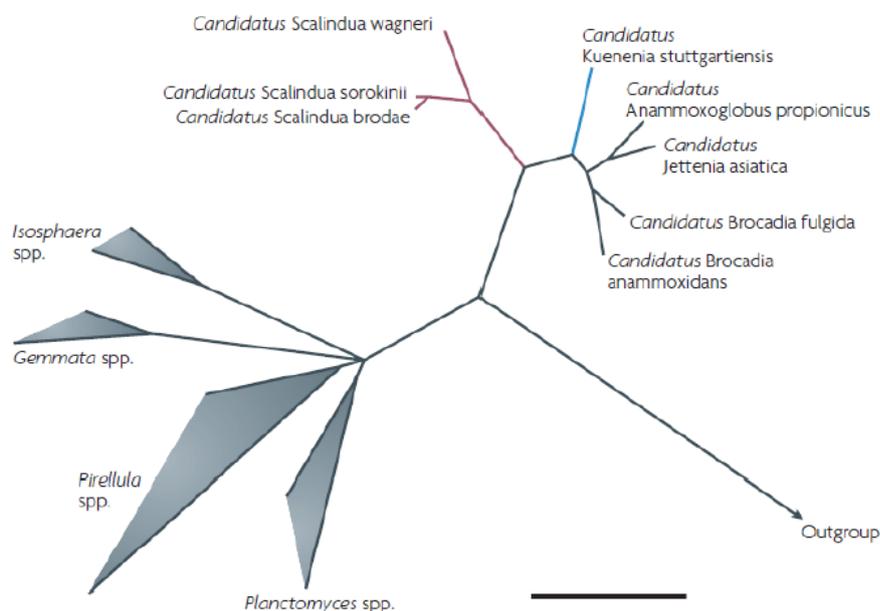


Figura 3.2: Árvore filogenética das bactérias anammox baseada nas sequências do rRNA 16S. A figura apresenta as diferentes relações das bactérias anammox entre os *Planctomyces*. A divergência de sequências de outras bactérias dentro desse filo é indicada como *outgroup*. A escala representa 10% de sequências divergentes. Fonte: KUENEN, 2008

As bactérias anammox apresentam características dos três domínios, *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya*, tornando-as extremamente interessantes do ponto de vista evolutivo. Além disso, as bactérias anammox despertam grande interesse no que diz respeito ao seu metabolismo incomum e a importância da aplicação no tratamento de águas residuárias e ecologia microbiana (VAN NIFTRIK & JETTEN, 2012).

Bactérias anammox possuem forma de cocos, com o diâmetro variando entre 800 a 1.100 nm (VAN NIFTRIK *et al.*, 2008). Esses organismos apresentam crescimento lento, com taxa de duplicação de aproximadamente onze dias. Segundo Jetten *et al.* (1998) bactérias anammox possuem coloração alaranjada devido à elevada concentração de citocromos no interior de suas células (Figura 3.3). O pH ideal para o crescimento de bactérias anammox encontra-se entre 6,7 e 8,3 e a temperatura, entre 20 e 43 °C. No entanto, estes organismos já demonstraram tolerância sob uma ampla faixa de temperaturas, podendo sobreviver em ambientes com temperaturas elevadas (85 °C) e reduzidas (-2 °C) (GAO & TAO, 2011).

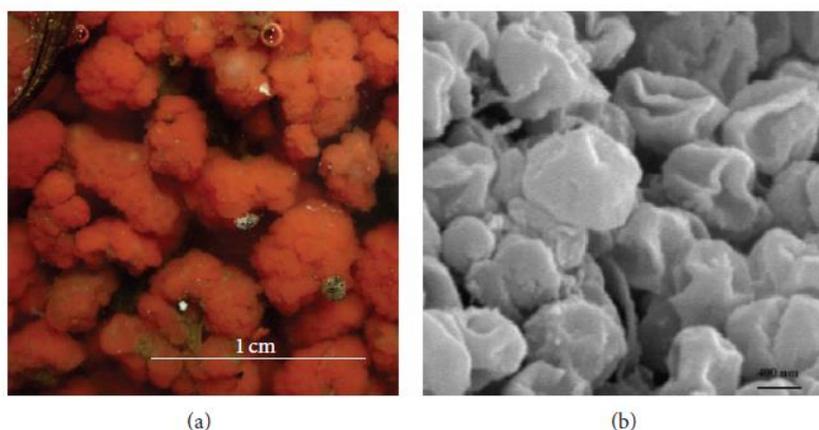


Figura 3.3: (a) Coloração alaranjada das bactérias anammox; (b) Foto de Microscopia eletrônica de varredura mostrando as irregularidades típicas da célula anammox. Fonte: Adaptado de Ni & Zhang (2013)

Van Niftrik (2013) explica que a célula das bactérias anammox é compartimentada, dividida por três membranas (Figura 3.4). A membrana mais externa envolve o periplasma, compartimento que tem uma função ainda desconhecida. A membrana secundária envolve o riboplasma, que contém os ribossomos e o nucleóide. A membrana mais interna engloba o maior compartimento da célula, o anamoxosomo, onde ocorre todo o metabolismo energético da célula.

Todas as três membranas possuem uma bicamada lipídica simples, formada de lipídeos singulares, denominados laderanos, compostos por anéis de ciclobutano e possuem ligações do tipo éter ou éster, entre si. Esses lipídeos são considerados marcadores taxonômicos de bactérias anammox e conferem à membrana da célula elevada densidade, fator importante para impedir a saída de compostos intermediários tóxicos do metabolismo para a célula anammox, como por exemplo, a hidrazina (VAN NIFTRIK *et al.*, 2004; FUERST e SAGULENKO, 2011).

Outra característica importante do anamoxossomo é a presença, nesse compartimento, de enzimas importantes necessárias à reação de oxidação anaeróbia da amônia, como a hidrazina hidrolase, hidrazina oxireductase e hidroxilamina oxidoreductase (JETTEN *et al.*, 2001; FUERST & SAGULENKO, 2011). Além disso, para que a reação anammox aconteça é necessária que haja a separação entre o anamoxossomo e o riboplasma circundante, para que seja gerada uma força próton motora (FPM) através da membrana do anamoxossomo pela ATP sintase, para a geração de energia na célula (FUERST & SAGULENKO, 2011).

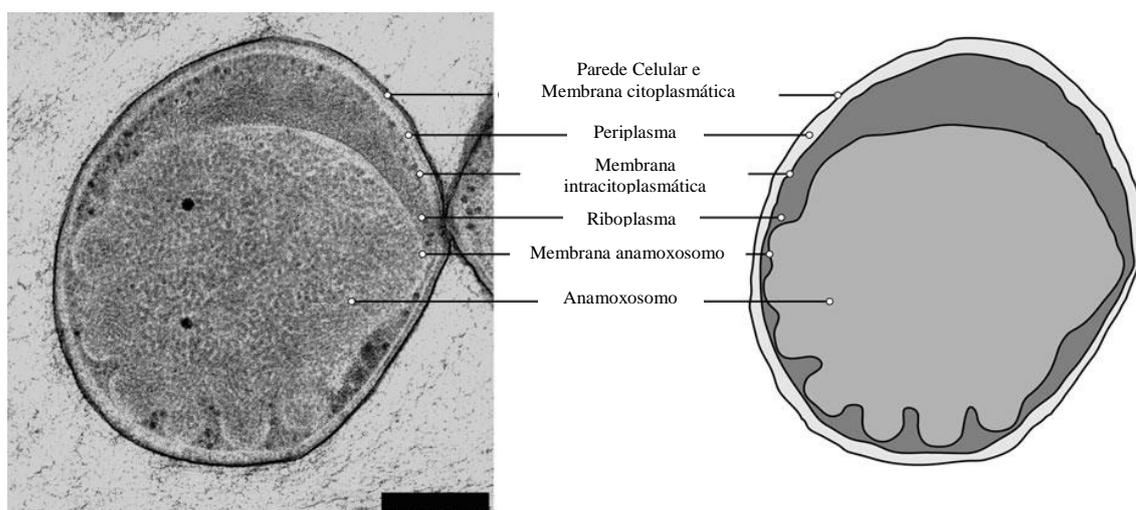


Figura 3.4: Foto de Microscopia eletrônica e esquema da célula anammox. Barra de escala: 200 nm. Fonte: Adaptado de Van Niftrik, (2013)

A ampla ocorrência das bactérias nos ecossistemas sugere que este processo seja ubíquo, e é possível que as anammox sejam encontradas em qualquer ecossistema que contenha nitrogênio amoniacal com zonas anaeróbias (FRANCIS *et al.*, 2007). Estudos apontam a coexistência das bactérias que realizam o processo anammox com bactérias aeróbias oxidadoras de amônia e nitrito. Segundo Madigan *et al.* (2010), a fonte de nitrito na reação

anammox é o produto da oxidação da amônia pelas bactérias nitrosificantes, como por exemplo as bactérias do gênero *Nitrosomonas*. Nesses ambientes são encontradas zonas óxicas e anóxicas, onde os dois grupos oxidadores de amônia podem coexistir. Schmidt *et al.* (2002) sugeriram que em vários ecossistemas *Candidatus B. anammoxidans* é dependente da atividade de bactérias aeróbias oxidadoras de amônia, em condições limitantes de oxigênio. Esse fato foi constatado na interface aeróbia/anóxica da biomassa em estações de tratamento de águas residuárias na Holanda, Alemanha, Suíça, Reino Unido, Austrália e Japão (JETTEN, 2001).

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 spp* (STROUS *et al.*, 2006; VAN VOSENBERG *et al.*, 2008). A espécie *Candidatus Anammoxoglobus sulfate* utiliza o SO_4^{-2} como acceptor de elétrons, conforme descrito por Liu *et al.* (2008).

As bactérias anammox ainda não foram isoladas por técnicas convencionais de microbiologia. Desde a década de 1980, as ferramentas moleculares têm sido utilizadas para a identificação dessas bactérias, com base nas sequencias do gene rRNA 16S (STROUS *et al.*, 2002; SCHMID *et al.*, 2005). Porém, em estudo realizado por Strous *et al.* (1999a) foi possível obter cultura celular anammox com 99,6 % de pureza por meio de centrifugação em gradiente de densidade com *Percoll*. Com base em análises do gene RNAr 16S foi possível identificar o organismo purificado como sendo do filo *Planctomycetes*.

3.3.2 Aplicação do processo Anammox para a remoção de nitrogênio amoniacal de efluentes

As pesquisas relacionadas à remoção de nutrientes buscam aprimorar os processos já existentes e o desenvolvimento de novos processos, de modo a aumentar a eficiência e reduzir os custos do tratamento. Para isso é imprescindível conhecer quais os micro-organismos envolvidos e como os mesmos atuam durante os processos bioquímicos de conversão dos poluentes nos diferentes tipos de tratamento estudados. Os processos de tratamento biológico para remoção de nitrogênio são os que apresentam menores custos de instalação e operação em relação aos processos físicos e químicos. Durante as últimas duas décadas, vários

trabalhos foram desenvolvidos no sentido de investigar o mecanismo dos micro-organismos responsáveis pela oxidação anaeróbia da amônia e as aplicações do processo Anammox no tratamento de águas residuárias (ZHANG *et al.*, 2008). Neste contexto, o processo Anammox é um tratamento biológico promissor para a redução de altas concentrações de nitrogênio em efluentes (DAPENA-MORA *et al.*, 2007).

A remoção biológica de nitrogênio de efluentes é realizada convencionalmente pelos processos de nitrificação aeróbia seguida por desnitrificação anaeróbia, esses processos já foram descritos nos itens 3.2.2 e 3.2.3. No entanto, para utilização desses processos, são necessárias duas etapas com requisitos biológicos distintos, e portanto, há a demanda de dois tipos de reatores diferentes. Além disso, em vários tipos de efluentes, os baixos níveis de carbono orgânico são insuficientes para que ocorra uma desnitrificação completa, sendo necessário fornecer fontes externas de carbono (AHN, 2006). Como alternativa aos processos comumente utilizados para a remoção biológica de nitrogênio, o processo Anammox vem sendo bastante estudado, pois traz uma economia de cerca de 90% nos custos operacionais e 50% de redução de área requerida.

As principais vantagens associadas ao processo Anammox são:

- O processo apresenta economia no tamanho de reatores, além de consumir cerca de 60% menos energia quando comparado ao processo convencional, pois não necessita de aeração, uma vez que o processo é anaeróbio;
- Para a remoção de nitrogênio não é necessário fornecer uma fonte de carbono orgânico, já que as bactérias utilizam a amônia como doador de elétrons;
- Economiza custos com o tratamento do lodo em função do baixo crescimento celular, cerca de $0,11 \text{ g SSV g}^{-1} \text{ N-NH}_4^+$ (ISAKA *et al.*, 2006).
- O processo não gera N_2O e CO_2 é necessariamente consumido pelas bactérias.

Comparado ainda com os processos convencionais de nitrificação/desnitrificação, o processo Anammox tem a capacidade de remover cargas maiores de nitrogênio. Normalmente, a remoção de nitrogênio pelo processo Anammox é acima de $2 \text{ kg.m}^3 \text{ d}^{-1}$, enquanto os processos convencionais (nitrificação/desnitrificação) operam com cargas cerca de 10 vezes

menores. Tang *et al.* (2011) demonstraram resultados de remoção de 74,3 a 76,7 kgN m³ de reator d⁻¹ em reatores de escala de bancada e com curto tempo de retenção hidráulica.

As bactérias com atividade anammox têm sido encontradas em águas residuárias e sistemas naturais, e possuem alta afinidade com os substratos nitrito e amônio (ZHANG *et al.*, 2008). Esses micro-organismos são reconhecidos por sua baixa taxa de crescimento, o que confere a principal desvantagem do processo e eleva consideravelmente o período de início da atividade anammox nos reatores. Por isso, a aplicação do processo está limitada pela disponibilidade de biomassa anammox e pela dificuldade associada a cultivar e manter grandes quantidades dessas bactérias. O isolamento e enriquecimento das bactérias com atividade anammox, a partir de uma comunidade bacteriana mista, requer o desenvolvimento das condições que favorecem o processo 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. Em laboratório, esse obstáculo foi superado usando sistemas com retenção de biomassa, como os reatores batelada sequencial (RBS). No entanto, na medida em que essa tecnologia for difundida, essa baixa taxa de crescimento deixará de ser um problema, uma vez que haverá maior disponibilidade de biomassa anammox e que poderá ser utilizada para a partida de novos reatores (STROUS *et al.*, 1998; GAO & TAO, 2011).

O processo Anammox pode ser aplicado em estações de tratamento de águas residuárias domésticas (efluentes de digestores de lodo), no tratamento de efluentes provenientes da digestão de resíduos sólidos orgânicos (aterros sanitários, compostagem e digestão), no tratamento de efluentes industriais, tais como indústrias de alimentos, de fermentações (destilação), vinícolas, de fertilizantes, curtumes, química e petroquímica (VLAEMINCK *et al.*, 2012). O processo Anammox é utilizado com sucesso atualmente em cerca 114 (incluindo 10 em fase de projeto e construção) estações de tratamento de águas residuárias em todo o mundo (LACKNER, *et al.*, 2014). A maioria dos sistemas em escala plena (88 dos 114) foi construída na Europa, seguido pela China e América do Norte, como mostrado na Figura 3.5. (VAN DER STAR *et al.*, 2007; WETT, 2007; ABMA *et al.*, 2010; VLAEMINCK *et al.*, 2012; NI & ZHANG, 2013, ALI, *et al.*, 2015a). A Figura 3.5 mostra dois pontos no Brasil,

porém, não foi possível obter informações sobre esses reatores, pois não existem trabalhos publicados e a empresa (PAQUES) responsável pelo projeto não pode fornecer as informações.

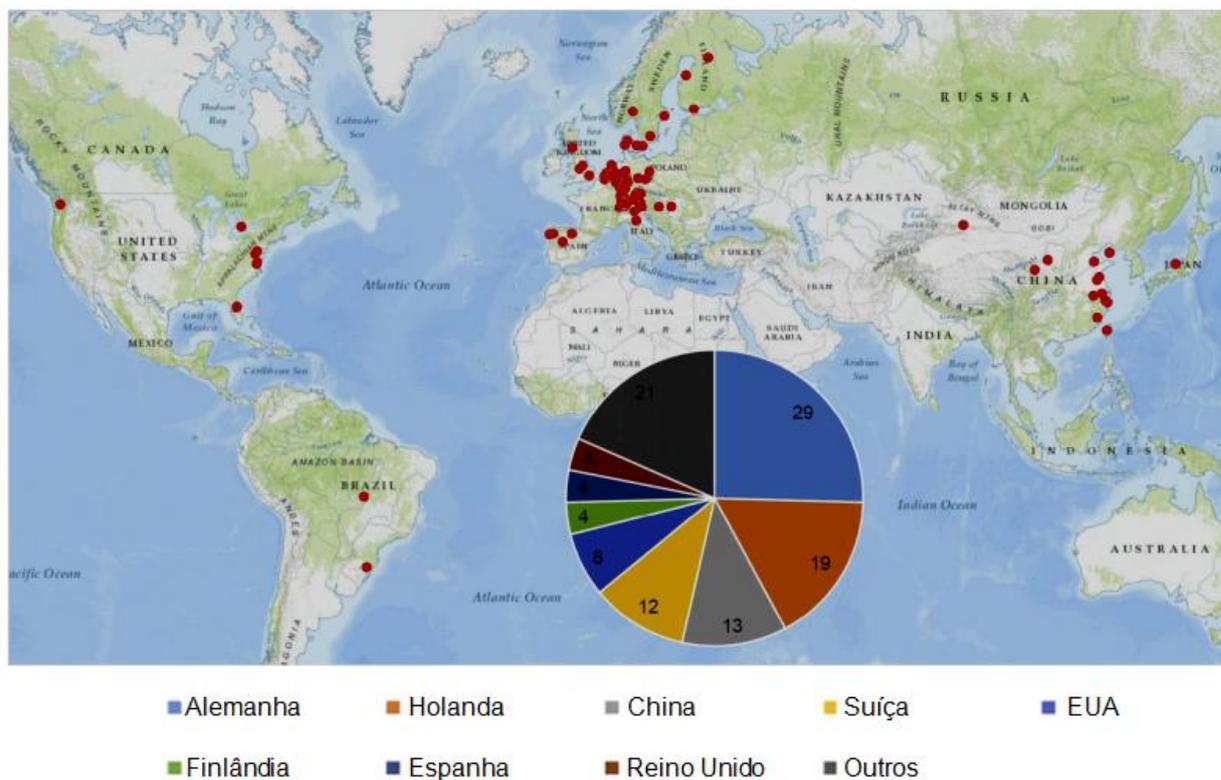


Figura 3.5: Distribuição geográfica de reatores anammox em escala plena em todo o mundo. Fonte: Adaptado de ALI *et al.* (2015a)

Van Niftrik & Jetten (2012) destacaram que desde o início da operação da primeira estação de tratamento de águas residuárias em 2002, em Rotterdam na Holanda, o processo Anammox surgiu como uma alternativa atraente para remoção de nitrogênio de águas residuais em todo o mundo. A China possui 13 plantas de reatores anammox, e no ano de 2009 foi construída a maior usina do mundo para o tratamento de águas residuárias com base no processo Anammox, com a capacidade de tratamento de 11 toneladas de Nitrogênio por dia (NI & ZHANG, 2013). No Brasil, o estudo e a aplicação real do processo Anammox é recente e considerado como desafio para o tratamento de efluentes (águas residuárias, agropecuárias e agroindustriais), devido à dificuldade de se obter biomassa anammox em volumes maiores e estável por longo período.

O processo Anammox pode ser conjugado com outros processos, utilizando dois estágios e melhorando ainda mais sua eficiência na remoção do nitrogênio. Para a utilização do processo

Anammox em escala plena é necessário que parte da amônia afluente seja primeiramente oxidada a nitrito. Reatores que utilizam o processo de nitrificação parcial promovem um tratamento prévio e fornecem um efluente (afluente para o reator anammox) com condições ótimas para o processo de oxidação anaeróbia da amônia. Pode-se citar como exemplo os sistemas do tipo 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).

O processo SHARON aplica a interrupção nos processos de nitrificação e desnitrificação. A nitrificação é interrompida na etapa intermediária, mantendo o nitrogênio na forma de nitrito e 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. Devido ao curto tempo de detenção hidráulica (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 podem ocorrer também num mesmo reator, como os processos OLAND (*Oxygen Limited Autotrophic Nitrification Denitrification*) (KUI & VERSTRAETE, 1998; MONBALLIU *et al.*, 2013) e CANON (*Completely Autotrophic Nitrogen removal Over Nitrite*) (THIRD *et al.*, 2001; THIRD *et al.*, 2005; VAZQUEZ-PADÍN *et al.*, 2009b). Nesses sistemas, baixas concentrações de oxigênio são fornecidas e promovem condições microaeróbias sob as quais bactérias oxidadoras de amônia são capazes de oxidar parcialmente a amônia a nitrito, consumindo o oxigênio dissolvido do meio e formando vários nichos anóxicos. As bactérias anammox podem se desenvolver consumindo o restante da amônia e utilizando o nitrito resultante da nitrificação parcial, culminando na produção de nitrogênio gasoso (VAZQUEZ-PADÍN *et al.*, 2010).

Chen *et al.* (2009) desenvolveram o processo conhecido como SNAD (*Simultaneous Nitrification, Anammox and Denitrification*) para remoção de nitrogênio e remoção de DQO em um único reator, no qual a maioria do nitrogênio é removida por Anammox. Esse processo promove a interação de nitrificantes aeróbios, Anammox e desnitrificantes em condições limitadas de oxigênio com um potencial para fazer a remoção de amônia 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).

O processo Anammox pode ser combinado com um novo processo chamado ANITA™ Mox, que é baseado na tecnologia MBBR (*Moving Bed Biofilm Reactor*), no qual a remoção de nitrogênio ocorre em apenas um estágio. Os processos de nitrificação e anammox ocorrem simultaneamente no biofilme formado em suportes suspensos, em diferentes camadas, sendo a camada externa responsável pela oxidação de uma parte da amônia a nitrito e na camada mais interna ocorre a atividade anammox, uma vez que o nitrito produzido e a amônia 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).

Hu *et al.* (2013) referiram-se aos processos conjugados com o processo Anammox como sistemas divididos em dois estágios ou somente em um estágio. Segundo os autores, sistemas de um estágio apresentam o custo operacional mais baixo, 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 aplicação do processo Anammox conforme o local onde a tecnologia foi desenvolvida, como por exemplo, floculento (Suíça, Áustria), granular (Holanda), biofilme formado em um meio suporte (Suécia, Bélgica) e híbrido (Áustria). A Tabela 3.9 apresenta alguns exemplos dos tipos de lodo e das configurações que podem ser utilizadas nos processos conjugados com o processo Anammox.

Van Dongen *et al.* (2001) pesquisaram a aplicação do processo SHARON e o processo Anammox para o tratamento de efluentes ricos amônia na Estação de Tratamento de Águas Residuárias Municipais, na cidade de Rotterdam (Holanda). O processo SHARON foi operado de forma estável por mais de 2 anos, com aeração contínua e tempo de detenção hidráulica (TDH) de 1 dia. Apenas 53% da amônia era convertida a nitrito, tornando o efluente do processo SHARON ideal como afluente para o reator anammox. O lodo utilizado

para o processo Anammox 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 Rotterdan. O reator tem um volume de 70 m³ e funciona em combinação com um reator SHARON para o tratamento de licor amoniacal proveniente da digestão do lodo da estação, o qual possui concentração média de nitrogênio amoniacal igual a 1200 mg.L⁻¹. 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 Kg.d⁻¹, e a carga volumétrica superior a 10 Kg N. m³.d⁻¹, sendo que o reator é capaz de remover 90% a 95% do nitrogênio afluente (VAN DER STAR *et al.*, 2007).

Tabela 3.9: Sistemas de remoção de nitrogênio que envolvem o processo Anammox

Tipo de Biomassa	Nº de estágios	Processo	Taxa de remoção de N (kgN .m ⁻³ .d ⁻¹)	Referência
Suspensa	1	Crescimento suspenso em RBS ^a	0,5	JOSS <i>et al.</i> , (2009)
	2	NAS ^b	0,26*	DESLOOVER <i>et al.</i> , (2011)
Granular	1	CANON	1,2	THIRD <i>et al.</i> , (2001); ABMA <i>et al.</i> , (2010)
	2	SHARON-Anammox	0,6	VAN DONGEN <i>et al.</i> , (2001)
Híbrida	1	DEMON ^c	0,6	WETT (2007)
Biofilme	1	ANITA-Mox ^d	1,1*	CHRISTENSSON <i>et al.</i> , (2011)
	1	DeAmmon ^e	0,3-0,4	ROSENWINKEL <i>et al.</i> , (2005)
	1	OLAND	0,05*	KUAI & VERSTRAETE (1998)
	1	Aerobic deammonification	1,23*	HIPPEN <i>et al.</i> , (1997)
	1	SNAP ^f	0,31-0,45*	FURUKAWA <i>et al.</i> , (2006)

^a Reator em batelada sequencial

^b Lodos Ativados (*New activated sludge*)

^c Refere-se ao sistema de RBS com controle de pH

^d Nome comercial utilizado pela empresa *Veolia* para reatores de 1 estágio (nitrificação parcial-anammox) pelo sistema MBBR

^e Nome comercial utilizado pela empresa *Purac* para reatores de 1 estágio (nitrificação parcial-anammox) pelo sistema MBBR

^f Sistema de estágio único para remoção de nitrogênio usando o anammox e nitrificação parcial, o nome refere-se apenas ao processo de uma camada superficial de biofilme

*Os valores se referem a aplicações em escala laboratorial

Fonte: Adaptado de HU *et al.* 2013.

Vanotti *et al.* (2005) utilizaram um sistema de tratamento em escala plena, constituído de um módulo contendo as bactérias anammox (para remoção do N) e outro módulo subsequente de tratamento alcalino (para promover a remoção de fósforo e de patógenos). O sistema foi testado por 1 ano com a proposta de substituir as lagoas anaeróbias para o tratamento de resíduos de suinocultura. O sistema removeu 97,6% de sólidos suspensos, 99,7% de DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio), 98,5% de NTK (Nitrogênio Total Kjeldahl), 98,7% de amônia, 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.

Joss *et al.* (2009) aplicaram os processos de nitrificação parcial e Anammox em um reator em batelada sequencial (RBS), em escala piloto, para a remoção de nitrogênio em águas residuárias ricas em amônia e com baixas concentrações de DBO e sólidos em suspensão em Zurick (Suíça). O pH do reator era controlado (Sistema DEMON) e o RBS era aerado continuamente, as concentrações do oxigênio dissolvido (OD) foram inferiores a $1 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$, permitindo que o processo de nitrificação parcial ocorresse simultaneamente com o processo Anammox. As taxas de amônia eram de até $500 \text{ gN m}^3\text{d}^{-1}$, com conversão em N_2 de mais de 90%.

No Brasil, alguns trabalhos descreveram o uso de reatores e enriquecimento de bactérias anammox para o tratamento de efluentes. 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 mg L^{-1} (até 95 mg N-NO_2^- e até 82 mg N-NH_4^+).

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 aclimatação e imobilização, e o cultivo foi realizado com um afluente sintético, para estimar a capacidade de remoção de nitrogênio. Como resultado, os autores perceberam que o lodo do sistema de tratamento de efluente da suinocultura foi uma excelente fonte de microorganismos com atividade anammox. Em estudos posteriores, Kunz *et al.* (2008) investigaram uma forma de baixo custo para a remoção de amônia, com objetivo de aplicação em efluentes

da suinocultura usando, para isto, o processo Anammox. A eficiência de remoção de nitrogênio foi cerca de cinco vezes maior quando comparada com a dos processos de nitrificação-desnitrificação.

O processo Anammox é um processo eficiente e promissor, por isso, há grande interesse na aplicação desse processo para o tratamento de diversos tipos de efluentes (domésticos, agrícolas e industriais). Os micro-organismos anammox possuem características únicas, o que confere a eles grandes vantagens em relação a outros organismos utilizados em técnicas convencionais de tratamento. Por isso, o estudo da aplicação do processo, bem como a caracterização do efluente a ser tratado é importante, pois, alguns compostos podem exercer um possível efeito inibidor na atividade das bactérias anammox.

3.3.3 Variáveis do processo e principais fatores que podem inibir a atividade anammox

A implementação do processo Anammox como uma tecnologia viável de tratamento de efluentes requer melhor compreensão das faixas de permissibilidade para nitrito e amônio, dos níveis de oxigênio e do pH do meio (EGLI *et al.*, 2001). 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). Por isso, o estudo dos compostos que podem exercer um possível efeito inibidor na atividade das bactérias anammox torna-se muito importante, para que se possam compreender as limitações inerentes à aplicação do processo e, com isso, buscarem formas de aperfeiçoar esta tecnologia.

Os substratos amônio (NH_4^+) e nitrito (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 do processo Anammox variam muito. Isto ocorre em virtude da quantidade de substrato que o processo necessita, pois, para que haja a reação sem haver a 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).

Jin *et al.* (2012) reportaram que a inibição por amônia é geralmente atribuída à presença da forma não protonada desse composto (NH_3). Isso porque o íon amônio (NH_4^+) não se difunde

com facilidade através da membrana lipídica da célula bacteriana, no entanto a amônia na forma 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 no item 3.1. 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-NH₄⁺ L⁻¹. Jetten *et al.* (1998) mostraram que o íon amônio e nitrato provocaram uma pequena inibição reversível no processo, quando suas concentrações globais estão por volta de 1000 mg N-NH₄⁺ L⁻¹.

Numerosos estudos confirmaram que a concentração de nitrito é crítica para a estabilidade do processo Anammox e é responsável por sérios problemas em condições experimentais (VAN HULLE *et al.*, 2010; BETTAZZI *et al.*, 2010; KIMURA, *et al.*, 2010; JAROSZYNSKI *et al.*, 2011). No entanto, esses estudos discordaram sobre o valor limite para inibição por nitrito, as concentrações relatadas variaram entre 5 e 280 mg.N. L⁻¹, em diferentes condições experimentais e modos de operação (ISAKA *et al.*, 2007; JAROSZYNSKI *et al.*, 2011). A inibição do processo anammox por nitrito é associada não ao íon nitrito (NO₂⁻) propriamente dito, mas ao ácido nitroso (HNO₂⁻). Como no caso da amônia, o pH também afeta o equilíbrio NO₂⁻/ HNO₂⁻ em um meio líquido. Para que se alcance o sucesso durante a utilização do processo Anammox, portanto, a concentração de HNO₂⁻ também deve ser controlada por meio do controle do pH (JIN *et al.*, 2012) .

Strous *et al.* (1999b), estudando a fisiologia das bactérias anammox em um RBS verificaram que concentrações de NO₂⁻ acima de 0,1 g.L⁻¹ inibiram completamente o processo, no entanto, a atividade foi recuperada após a adição de intermediários da reação anammox (hidroxilamina e hidrazina) ao reator. Carvajal-Arroyo *et al.* (2013) verificaram que concentrações de NO₂⁻ iguais a 10,8 mM (496,8 mg.L⁻¹) e 13,2 mM (607,2 mg.L⁻¹) foram requeridas para inibir 50% da atividade de biomassa anammox cultivada em suspensão e na forma granular. Nesse estudo, concentrações acima de 15,1 mM (690 mg.L⁻¹) de NO₂⁻ inibiram completamente o processo.

A Tabela 3.10 apresenta, resumidamente, estudos que tiveram a inibição do processo Anammox devido as concentrações do substrato (amônia e nitrito).

Tabela 3.10: Concentrações de substrato que podem inibir o processo Anammox

Substrato	Concentração (mg L ⁻¹)	Efeito	Referência
N-NH ₄ ⁺	770	Inibição 50% da atividade	DAPENA-MORA, <i>et al.</i> , (2007)
N-NH ₃ ⁺	35-40	Inibição de até 34% da atividade	FERNÁNDEZ <i>et al.</i> , (2012)
N-NH ₄ ⁺	792	Inibição	CARVAJAL-ARROYO <i>et al.</i> , (2013)
N-NO ₂ ⁻	100	Inibição	STROUS <i>et al.</i> , (1999b)
N-NO ₂ ⁻	185	Inativação	EGLI <i>et al.</i> , (2001)
N-NO ₂ ⁻	280	Inibição	ISAKA <i>et al.</i> , (2007)
N-NO ₂ ⁻	768	Eficiência de remoção 24%	CHEN <i>et al.</i> , (2011)

Compostos inorgânicos como os fosfatos e os sulfetos podem inibir a atividade anammox. Dapena-Mora *et al.* (2007) testaram os efeitos tóxicos de sais fosfatos e sulfetos. No caso dos fosfatos, foi utilizado o KH₂PO₄ e observou-se inibição de 50% da atividade anammox em concentrações iguais a 20mM (1900 mg.L⁻¹). Vale ressaltar que essa concentração é maior do que as comumente encontradas em efluentes. Van de Graaf *et al.* (1996) observaram inibição do processo anammox em concentrações mais baixas de fosfato, 5 mM (475 mg.L⁻¹). Em relação ao efeito dos sulfetos, Dapena-Mora *et al.* (2007) utilizaram o Na₂S e concentrações entre 1 e 2 mM (78 a 156 mg.L⁻¹) causaram a inibição de 60% na atividade anammox e quando alcançam 5 mM (390 mg.L⁻¹) o processo foi totalmente inibido.

Os estudos sobre os metais pesados ainda são raros na literatura, esses compostos são de difícil degradação e podem acumular-se nos organismos, provocando um efeito tóxico às células. Alguns tipos de águas residuárias ricas em nitrogênio, como lixiviados de aterros sanitários, muitas vezes contêm níveis elevados de metais pesados (JIN *et al.*, 2012). Van de Graaf *et al.* (1995) verificaram que concentrações iguais a 271 mg.L⁻¹ de HgCl₂ foram capazes de inibir completamente o processo anammox. Yang & Jin, 2012 testaram as concentrações inibitórias do cobre (Cu) ao processo anammox, os resultados demonstraram que 36% da atividade anammox é perdida quando essas bactérias são submetidas à concentração de cobre igual a 10 mg.L⁻¹. Zhang *et al.* (2015) testaram os efeitos inibitórios do Zn (II) sobre a atividade anammox. Nesse estudo, os autores verificaram que as bactérias anammox podem tolerar uma concentração de 5 mg L⁻¹ de Zn (II), porém, concentrações mais elevadas podem suprimir a atividade anammox.

Os 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. Jin *et al.* (2012) destacaram que para maior eficiência no processo Anammox é necessário observar

a presença de inibidores no efluente a ser tratado, bem como o controle dos parâmetros operacionais e o conhecimento sobre o tipo de lodo anammox que será utilizado.

Em consequência da baixa taxa de crescimento dos micro-organismos com atividade anammox, recomendam-se reatores com configurações que diminuam a perda de biomassa. Strous *et al.* (1998) e Zhu *et al.* (2008) concluíram que sistemas de biofilmes e reatores em batelada sequencial (RBS, *Sequential Batch Reactor*) são os mais indicados para o processo Anammox. O uso de materiais que auxiliam na retenção da biomassa também é uma alternativa para se obter maior eficiência no processo Anammox. ZHANG *et al.* (2010) utilizaram uma esponja de polietileno (*PE sponge*), esse material foi utilizado como suporte em reatores cilíndricos, com altas taxas de imobilização de bactérias anammox e de eficiência na remoção do nitrogênio superior a 85%.

Costa *et al.* (2014) também utilizaram meio suporte para a retenção da biomassa, o material utilizado era de polipropileno e espuma de poliuretano flexível, os autores avaliaram o impacto do tipo de inóculo e as condições operacionais sobre o desempenho do processo Anammox. Dois tipos de inóculos foram aplicados: um lodo oriundo de sistemas de tratamento de efluente sanitário (*wetland* construída, CePTS), e o segundo oriundo do sistema de tratamento de efluente industrial (REGAP/Petrobras). Os autores concluíram que as condições operacionais aplicadas desempenharam papel importante na seleção da comunidade de bactérias anammox.

Com relação ao pH, Strous *et al.* (1999b) e Jetten *et al.* (2009) enfatizaram que a faixa de pH ideal para a atividade anammox encontra-se entre 6,7 a 8,3. Faixas de pH fortemente ácidas ou fortemente básicas podem causar inibição completa do processo, pois podem promover hidrólise da membrana celular e cessar processos metabólicos essenciais para as bactérias. A disponibilidade ou inibição pelo substrato também é influenciada pelo pH, em razão do deslocamento do equilíbrio químico da reação, conforme já discutido anteriormente. Egli *et al.* (2001) observaram atividade anammox em uma faixa de pH entre 6,5 e 9,0, em uma cultura mista de bactérias anammox tratando lixiviados, sendo o valor do pH ótimo igual a 8,0. Jaroszynski *et al.* (2011) afirmaram que o pH deve ser mantido estável e valores elevados devem ser evitados, os autores observaram que taxas mais elevadas de substrato podem ser aplicadas a um pH mais baixo. Costa (2013) relatou que no início de operação dos reatores em estudo, até o pico máximo de remoção de amônia, o pH se manteve em torno de 7,2. No

entanto, quando esse pH diminuiu, atingindo o valor de 5,1, houve também diminuição da atividade anammox.

A alcalinidade no processo Anammox é fornecida pelo íon bicarbonato (HCO_3^-). Este íon faz parte da estequiometria da reação proposta por Strous *et al.* (1998) e precisa estar presente no meio reacional para que o processo ocorra. A alcalinidade exerce papel importante de tampão do meio, suavizando mudanças de pH no decorrer da reação, evitando que intermediários tóxicos ao processo se formem inibindo, parcial ou totalmente, os micro-organismos, com a atividade anammox.

O oxigênio dissolvido (OD) é um parâmetro operacional crítico para o processo Anammox, pois esse processo acontece em condições anóxicas e baixas concentrações de oxigênio no meio já podem interferir na eficiência do processo (JIN *et al.*, 2012). Concentrações baixas de OD podem provocar a inibição parcial do processo ou promover a competição entre bactérias anammox com outros grupos oxidadores de amônia e nitrito, como as AOB e as NOB, o que reduz a remoção de nitrogênio pelo processo Anammox. Strous *et al.* (1997) relataram que o processo Anammox foi inibido reversivelmente a partir de um nível baixo (<2% da saturação do ar). 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.

3.3.4 Inibição do processo Anammox por matéria orgânica

Os compostos orgânicos estão presentes em praticamente todos os tipos de efluentes, e promovem efeitos adversos à atividade de micro-organismos anammox (GÜVEN *et al.*, 2005; CHAMCHOI *et al.*, 2008; MOLINUEVO *et al.*, 2009). A inibição do processo Anammox por matéria orgânica pode ocorrer devido à inativação enzimática e ser irreversível, levando à morte celular (GÜVEN *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 (GÜVEN *et al.*, 2005; CHAMCHOI *et al.*, 2008; LACKNER *et al.*, 2008; MOLINUEVO *et al.*, 2009).

Jin *et al.* (2012) explicaram que os compostos orgânicos podem ser divididos em tóxicos e não tóxicos. Os compostos orgânicos tóxicos são de difícil biodegradabilidade, como por exemplo, o álcool, os aldeídos, os fenóis e os antibióticos. Segundo Isaka *et al.* (2008), o metanol pode ser convertido intracelularmente em formaldeído devido à ação da enzima hidroxilamina oxidoreductase. O formaldeído interfere na atividade enzimática da célula anammox e pode inibir de forma irreversível o processo anammox, porém, mais estudos são necessários para entender esse efeito tóxico (SCHALK *et al.*, 2000; METZ *et al.*, 2004; GÜVEN *et al.*, 2005; ISAKA *et al.*, 2008). Güven *et al.* (2005) observaram inibição completa e irreversível da atividade anammox por metanol em concentrações tão baixas quanto 0,5mM.

Toh & Ashbolt (2002) conseguiram adaptar as bactérias anammox a um efluente contendo fenol, porém, um longo período foi requerido (15 meses). As concentrações afluentes de fenol chegaram até a 330 mg.L⁻¹ e o reator anammox foi capaz de remover nitrito e amônia em proporções estequiométricas típicas da reação anammox. Pereira *et al.* (2014) cultivaram bactérias anammox a partir de lodo ativado em um reator em batelada sequencial (RBS) de 2L, alimentado com meio mineral autotrófico. As concentrações afluentes de N-NH₄⁺ e N-NO₂⁻ foram inicialmente iguais a 20 mg.L⁻¹ e alcançaram valores de 177 e 160 mg.L⁻¹, respectivamente. Nesse estudo, o fenol foi adicionado ao reator do 335º ao 377º dia de operação com concentrações afluentes variando de 10 mg.L⁻¹ até 300 mg.L⁻¹. Os autores observaram perdas de eficiências iguais a 57% de amônia e 15% de nitrito, quando as concentrações de fenol atingiram 300 mg.L⁻¹, em comparação com período precedente à alimentação do reator com fenol.

Jin *et al.* (2012) destacaram que os antibióticos são extensivamente aplicados para o tratamento de doenças humanas e animais, podem ser encontrados nos ambientes aquáticos como águas superficiais e subterrâneas e em estações de tratamento de efluentes, e o efeito de alguns antibióticos sobre o processo anammox deve ser investigado. Em estudo conduzido por Van de Graaf *et al.* (1995) foram adicionados em reatores anammox os antibióticos Penicilina (100 mg.L⁻¹), Cloranfenicol (200 mg.L⁻¹) e Ampicilina (800 mg.L⁻¹), os quais foram capazes de promover a inibição de 36%, 98% e 94% da atividade anammox, respectivamente. Yang & Jin (2012) investigaram o efeito da oxitetraciclina, bastante utilizada para o tratamento de doenças em suínos, e portanto, presente em efluentes de suinocultura. Nesse estudo verificou-

se que concentrações de 500 mg.L⁻¹ foi capaz de inibir 37% da remoção de amônia pelo processo anammox.

Dentre os compostos orgânicos não tóxicos, cita-se a matéria orgânica normalmente presente nos efluentes sanitários, que pode ser de origem natural (vegetais, animais e micro-organismos) ou antropogênica (despejos domésticos e industriais), constituída principalmente por proteínas, carboidratos, lipídeos, além da ureia. Segundo Von Sperling (2005), a matéria carbonácea (com base no carbono orgânico) divide-se em duas frações: (a) não biodegradável (em suspensão e dissolvida) e (b) biodegradável (em suspensão e dissolvida). Normalmente, utilizam-se métodos indiretos para quantificação da matéria orgânica ou do seu potencial poluidor. A Demanda Química de Oxigênio (DQO) é um dos parâmetros tradicionalmente utilizados como indicador do conteúdo orgânico de águas residuárias e superficiais, e bastante utilizado no monitoramento de estações de tratamento de efluentes. A DQO é expressa em termos da quantidade total de oxigênio necessária para oxidação da matéria orgânica a dióxido de carbono e água. 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 0,5gDQO.gN (VAN DER STAR *et al.*, 2007; WETT, 2007; JOSS *et al.*, 2009; JENNI *et al.*, 2014).

Chamchoi *et al.* (2008) investigando simultaneamente a ocorrência de reação anammox e desnitrificação em reatores do tipo UASB, verificaram que o aumento gradativo da concentração de DQO inibiu gradualmente a atividade das bactérias anammox, favorecendo concomitantemente a atividade de bactérias desnitrificantes. Observou-se nesse estudo que concentrações de DQO acima de 300 mg.L⁻¹ são capazes de inibir totalmente a reação anammox.

Ni *et al.* (2012) testaram o desempenho do processo Anammox na presença de matéria orgânica, com diferentes relações DQO/N. Reatores em escala laboratorial com volume de 60 ml, operados com TDH de 1,5 dias, e biomassas diferentes (lodo granular e floculento) foram utilizados nesse estudo. Leite sem gordura foi adicionado ao afluente sintético como fonte de carbono. As concentrações de DQO testadas foram 100 mg.L⁻¹, 200 mg.L⁻¹ e 400 mg.L⁻¹, com relação DQO/N de 1, 2 e 4, respectivamente. Antes da aplicação do afluente, os reatores apresentavam eficiência de remoção dos compostos nitrogenados em torno de 100%, ao final do estudo, foi observada eficiência de remoção em torno de 72%. Este estudo revelou que as

bactérias anammox e desnitrificantes podem coexistir, e a adição de matéria orgânica teve efeito limitado sobre a remoção de amônia pelo processo Anammox. Porém, os autores concluíram que relações DQO/N superiores a 4 são prejudiciais ao processo Anammox, pois reduzem o quantidade de bactérias anammox e favorecem a desnitrificação heterotrófica. Outro aspecto importante desse estudo é que o lodo granular apresentou uma tolerância maior à presença de matéria orgânica do que o lodo floculento.

Jenni *et al.* (2014) aplicaram os processos de nitrificação/Anammox para testar a influencia de diferentes concentrações de DQO e tempos de retenção hidráulica na remoção de nitrogênio. O lodo utilizado foi proveniente de um digestor instalado em uma estação de tratamento de esgoto na Suíça, e o sobrenadante desse sistema foi empregado para a alimentação do reator. Os autores utilizaram um reator operado em bateladas sequenciais, com volume de trabalho de 6,7 litros, sendo o acetato e a glicose as fontes de carbono aplicadas em etapas distintas. A relação DQO/N foi elevada gradativamente até 1,4gDQO gN⁻¹, e simultaneamente, o tempo de retenção hidráulica foi reduzido. A eficiência de remoção de nitrogênio foi de até 85%, quando aplicado somente o sobrenadante do digestor. Após a aplicação de acetato e da glicose, a eficiência foi próxima de 95%. A composição da comunidade de bactérias anammox foi avaliada pela técnica de FISH (*Fluorescent in-situ hybridisation*), e os resultados mostraram que a partir da proporção de 0,8g DQO gN⁻¹, houve um aumento da espécie *Candidatus Brocadia fulgida*, porém, o n° total de bactérias anammox diminuiu. Os autores constataram ainda que a alternância de acetato e glicose não influenciou negativamente a comunidade e o predomínio da bactéria *Ca. Brocadia fulgida* deve-se ao fato de que essa espécie é reconhecida pela capacidade de oxidar o acetato. 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.

Bi *et al.* (2015) estudaram os efeitos da relação C/N sobre a população bacteriana envolvida na remoção de nitrogênio pelo processo SAD (*Simultaneous Anammox and Denitrification*). Os autores desenvolveram um modelo matemático para descrever a remoção de nitrogênio e de carbono orgânico. O modelo considerava bactérias anammox, bactérias desnitrificantes, nitrogênio amoniacal, nitrito, nitrato e o carbono biodegradável. Para a verificação desse

modelo, um experimento em batelada foi montado com uma mistura de lodo anammox e lodo ativado. As proporções C/N testadas foram 1,0; 1,8 e 3,5, a fonte de carbono utilizada foi o acetato. Os testes mostraram 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.

Com base no referencial teórico apresentado, percebe-se que os estudos sobre a aplicação do processo Anammox para o tratamento de efluentes, que ainda contenham compostos orgânicos, e os efeitos que esses compostos podem exercer sobre o processo, são poucos na literatura. A maioria das pesquisas desenvolvidas sobre esse tema utilizaram efluentes sintéticos acrescidos de algum composto orgânico (acetato, propionato, glicose, etc.). Apesar dos avanços nos estudos acerca do processo Anammox, trabalhos que utilizaram esse processo para tratamento de efluentes reais contendo compostos orgânicos ainda são raros na literatura e necessitam de maiores investigações. A Tabela 3.11 apresenta, resumidamente, os estudos relacionados à aplicação do processo Anammox, bem como as concentrações e os efeitos sobre o processo quando submetido a compostos orgânicos.

Tabela 3.11: Descrição resumida de estudos relacionados ao efeito dos compostos orgânicos sobre o processo Anammox

Tipo de Reator	Biomassa	Composto Orgânico	Concentração (mg.L ⁻¹)	DQO/N	Efeito sobre o processo Anammox	Referência
Reator de leito Fluidizado (FBR) fluxo contínuo	Lodo de reator metanogênico (MULDER <i>et al.</i> , 1995)	Glicose (efluente sintético)	180 (1mM.L ⁻¹)	NI	Redução de 12% da atividade	VAN DE GRAAF <i>et al.</i> , 1996
Reator anaeróbico em batelada	Cultura enriquecida anammox	Propionato (efluente sintético) Acetato (efluente sintético)	288 (<3mM.L ⁻¹) 4,1-24,6 (0,5-3mM.L ⁻¹)	NI	Não significativo	GÜVEN <i>et al.</i> , 2005
Frascos em batelada	Biomassa enriquecida ^a (DAPENA-MORA <i>et al.</i> , 2004)	Acetato (efluente sintético)	82 (10 mM.L ⁻¹) 205 (25 mM.L ⁻¹) 410 (50 mM.L ⁻¹)	NI	Não significativo Redução de 22% da atividade Redução de 70% da atividade	DAPENA-MORA <i>et al.</i> , 2007
UASB, fluxo contínuo	Lodo anammox granular ^b	Leite - 3,4% proteína; 4,8% carboidrato e 3,5% lipídeo (efluente sintético)	>300*	0,9; 1,4 e 2,0	Inibição atividade anammox	CHANCHOI <i>et al.</i> , 2008
UASB, semicontínuo	Lodo anammox granular	Efluente suinocultura	>290*	1,0	Inibição atividade anammox	MOLINUEVO <i>et al.</i> , 2009
UASB	Lodo anammox granular (TANG <i>et al.</i> , 2009)	Sacarose (efluente sintético)	700*	3,0	Redução de 98% da atividade	TANG <i>et al.</i> , 2010
Frascos em batelada	Biofilme anammox ^c (TSUSHIMA <i>et al.</i> , 2007)	Acetato (efluente sintético)	8,2 (1mM.L ⁻¹)	NI	Redução de 2% da atividade	OSHIKI <i>et al.</i> , 2011
		Propionato (efluente sintético)	96 (1mM.L ⁻¹)		Redução de 1% da atividade	
		Glicose (efluente sintético)	180 (1mM.L ⁻¹)		Redução de 5% da atividade	
UASB	Lodo anammox granular Lodo anammox floculento	Leite sem gordura (efluente sintético)	100; 200 e 400*	1,0; 2,0 e 4,0	Redução de 28% da atividade (DQO/N 3,1) Redução de 28% da atividade	NI <i>et al.</i> , 2012
Reator em batelada sequencial	Lodo anammox granular de digestor ^d	Acetato Glicose	720*	0,27 a 1,4	Remoção de nitrogênio > 95%	JENNI <i>et al.</i> , 2014
Frascos em batelada	Mistura de lodo anammox e lodo ativado	Acetato (efluente sintético)	40-140	1,0; 1,8 e 3,5	Remoção de 82% de N e acúmulo de 12,7 mg. L ⁻¹ de nitrito	BI <i>et al.</i> , 2015

NI: Não informado

* Concentração em termos de DQO

^a Espécie de bactéria dominante *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*

^b Espécies de bactérias dominantes *Ca. Brocadia anammoxidans* e *Ca. Kuenenia stuttgartiensis*

^c Espécie de bactéria dominante *Candidatus Brocadia sinica*

^d Espécie de bactéria dominante *Candidatus Brocadia fulgida*

3.4 Reator UASB

O Reator UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*), também denominado reator de fluxo ascendente e manta de lodo, é um tipo de tecnologia anaeróbia amplamente utilizada no mundo para o tratamento de águas residuárias. O processo consiste em um fluxo ascendente de água residuária (esgoto) através de um leito de lodo denso, o que possibilita a estabilização da matéria orgânica e a formação de novas células e de biogás. Um dos princípios fundamentais do processo é a presença de um dispositivo de separação de sólidos e gases, que se localiza na parte superior do reator e garante a liberação do gás contido na mistura líquida, propiciando condições ótimas de sedimentação do lodo no compartimento de decantação e o seu retorno ao compartimento de digestão. Outra característica importante dos reatores UASB é o desenvolvimento de uma biomassa de elevada atividade (CHERNICHARO, 2007).

Entre as tecnologias existentes para tratamento de esgotos, os reatores anaeróbios do tipo UASB, desenvolvidos na década de 1980, assumiram posição de destaque, devido às vantagens dessa tecnologia em relação aos processos aeróbios convencionais. Entre estas, pode-se destacar, principalmente, os baixos custos de implantação e de operação, o baixo consumo energético e a baixa quantidade de lodo a ser gerenciada (VON SPERLING & CHERNICHARO, 2005; VAN LIER, 2008). Por essas vantagens, e devido às elevadas temperaturas ambientes, os reatores UASB encontraram grande aplicabilidade para tratamento de esgoto sanitário nos países de clima quente como o Brasil (VON SPERLING & CHERNICHARO, 2005). Entretanto, essa tecnologia possui algumas desvantagens, como por exemplo, a qualidade insatisfatória do efluente final, pois esse sistema anaeróbio não remove nutrientes. Neste sentido, pesquisas têm sido direcionadas para a melhoria da qualidade do efluente final, a partir do pós-tratamento de efluentes de reatores UASB para a redução de concentrações dos componentes não removidos nesse processo.

3.4.1 Processo Anammox como alternativa no pós-tratamento de efluentes de reatores UASB

Embora apresente vantagens, o processo anaeróbio apresenta dificuldade em produzir um efluente que se enquadre a padrões usuais da legislação ambiental. O pós-tratamento do efluente de reatores UASB pode ser realizado por vários processos, dentre eles: lagoas de estabilização, sistema de lodos ativados, biofiltro aerado submerso, aplicação no solo e filtro

biológico. Os filtros biológicos são os mais comumente utilizados, pois reduzem consistentemente as cargas orgânicas do esgoto doméstico. Entretanto, o sistema possui limitações em termos operacionais, não sendo eficiente para a remoção de compostos nitrogenados, pois apenas convertem o N-amoniaco a nitrito e nitrato (ALMEIDA *et al.*, 2011). O processo Anammox possui inúmeras vantagens e tem sido aplicado com sucesso para a remoção do nitrogênio em várias estações de tratamento em todo o mundo, principalmente para o tratamento de águas residuárias ricas em nitrogênio, conforme já descrito no item 3.3.2. Entretanto, poucos estudos reportaram a aplicação do processo Anammox como uma tecnologia de pós-tratamento para a remoção de nitrogênio de efluentes provenientes de processos anaeróbios, como por exemplo, no pós-tratamento de efluentes de reatores UASB. Sanchez *et al.* (2014) destacaram que as condições ambientais, operacionais e as características do esgoto devem ser avaliadas, pois os efluentes anaeróbios se diferem dos outros efluentes devido à presença de compostos orgânicos, baixas concentrações de nitrogênio e temperaturas mais baixas.

Heffernan *et al.* (2011) explicaram que o efluente de reatores UASB apresentam, aproximadamente, uma proporção DQO/N entre 2 e 6 e espera-se desses reatores uma eficiência de remoção de 80% e 50%, respectivamente, da DQO biodegradável. Porém, mais estudos são necessários para elucidar os efeitos e características principais do efluente dos reatores UASB, tais como os teores de carbono orgânico em termos de biodegradabilidade e sua relação com as concentrações de nitrogênio e temperatura de esgoto, além de entender os mecanismos de interação entre as comunidades microbianas.

Abma *et al.* (2010) investigaram a capacidade de remoção de nitrogênio por processo Anammox de um efluente de indústria alimentícia em Olburgen, na Holanda. A planta de tratamento era composta por três reatores UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) com volume de 1200 m³ cada, seguidos por dois reatores de 300 m³ para remoção de fosfato por precipitação (Sistema *Phospaq*) e um reator anammox de um estágio (Processo CANON), com volume de 600 m³. Foi utilizado lodo granular no reator anammox e o sistema era aerado periodicamente. As concentrações de nitrito e amônia eram monitoradas frequentemente, a fim de se ajustar o fluxo de aeração e garantir o bom desempenho do processo Anammox. O efluente industrial possuía, em média, 1000 kg.d⁻¹ de DQO, 700 kg.d⁻¹ de N-NH₄⁺ e 200 kg.d⁻¹ de P-PO₄⁻ e contribuía de forma expressiva com nutrientes para as águas residuárias. Após o

tratamento desse efluente industrial pela combinação dos sistemas UASB-Phospaq-Anammox, houve remoção significativa dos nutrientes, com destaque para a eficiência de remoção de N-NH_4^+ de 91%. Os autores destacaram a importância do uso de sistemas sustentáveis para o tratamento de efluentes, como o apresentado no artigo, onde a economia de energia elétrica foi cerca de 1,5 GWh/ano e a área requerida para a planta foi 17 vezes menor do que o necessário, além de ter promovido a produção de biogás e recuperação de estruvita (MgNH_4PO_4) que pode ser utilizada como fertilizante.

Sanchez *et al.* (2014) avaliaram a viabilidade de aplicação do processo Anammox como uma etapa de pós-tratamento de baixo custo para um efluente anaeróbio. Os efeitos simultâneos de uma fonte de carbono orgânico, valores de DQO, proporção DQO/N e da temperatura sobre o processo Anammox foram estudados. O lodo anammox utilizado foi proveniente da Estação de Tratamento de Águas Residuárias em Rotterdam, na Holanda. Foram realizados testes em batelada com frascos de 310 ml e as condições operacionais dos experimentos foram testadas quanto à variação da temperatura (14°C, 22°C e 30°C) e a razão DQO/N (2 e 6). As concentrações dos compostos nitrogenados eram de $32 \pm 2 \text{ mg.L}^{-1}$ de NH_4^+ e $25 \pm 2 \text{ mg.L}^{-1}$ de NO_2^- . As fontes de carbono orgânico adicionadas ao afluente sintético foram o acetato e o amido, com o objetivo de simular a presença da matéria orgânica biodegradável. Observou-se alta remoção de nitrogênio pelo processo Anammox nas temperaturas de 22° C (77-84% de eficiência) e 30°C (73-79% de eficiência). 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 influenciaram de forma significativa o processo Anammox. Estes resultados sugerem que o processo Anammox tem potencial para ser aplicado como pós-tratamento para sistemas de esgoto anaeróbios 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 amônia e nitrito e dos micro-organismos heterotróficos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Planejamento Experimental

O planejamento experimental para se atingir os objetivos do trabalho foram divididos em três fases. A Tabela 4.1 apresenta cada fase e correlaciona com as atividades experimentais. As etapas metodológicas são descritas nos próximos itens.

Tabela 4.1: Etapas metodológicas utilizadas para a realização da pesquisa

Fase	Descrição	Duração (Dias)	Análises realizadas
I	Mistura dos inóculos, cultivo e aumento da biomassa	350	STV, NO_2^- , NH_4^+ , NO_3^- e coleta de biomassa para as análises de biologia molecular
II	Teste com diferentes relações DQO/N (0,7, 1,4, 2,8, 3,5 e 5,0) aplicando efluente sintético + glicose	131	NO_2^- , NH_4^+ , NO_3^- , DQO e coleta de biomassa para as análises de biologia molecular
III	Aplicação do efluente anaeróbico de UASB no RBS (Etapa A, efluente anaeróbico + meio de cultura e Etapa B, efluente anaeróbico + solução de nitrito)	57	NO_2^- , NH_4^+ , NO_3^- , DQO, STV e coleta de biomassa para as análises de biologia molecular

4.2 Reator em batelada sequencial

O Reator operado em Batelada Sequencial (RBS) utilizado no presente estudo foi um reator de mistura completa, modelo *Benchtop Fermentor & Bioreactor BioFlo®/CelliGen® 115* (marca *New Brunswick/Eppendorf*), com volume de trabalho de 2 litros. Esse fermentador possui sondas que permitem o controle preciso das condições operacionais, como pH, oxigênio dissolvido, temperatura e nível, além do controle automático do fluxo de gases e agitação. Essa estabilidade operacional é importante para a seleção e cultivo de micro-organismos de crescimento lento, como as bactérias envolvidas no processo Anammox. Os RBS vem sendo recomendados para o enriquecimento das 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). As Figuras 4.1 e 4.2 apresentam, respectivamente, a representação esquemática e uma foto do reator utilizado no presente estudo.

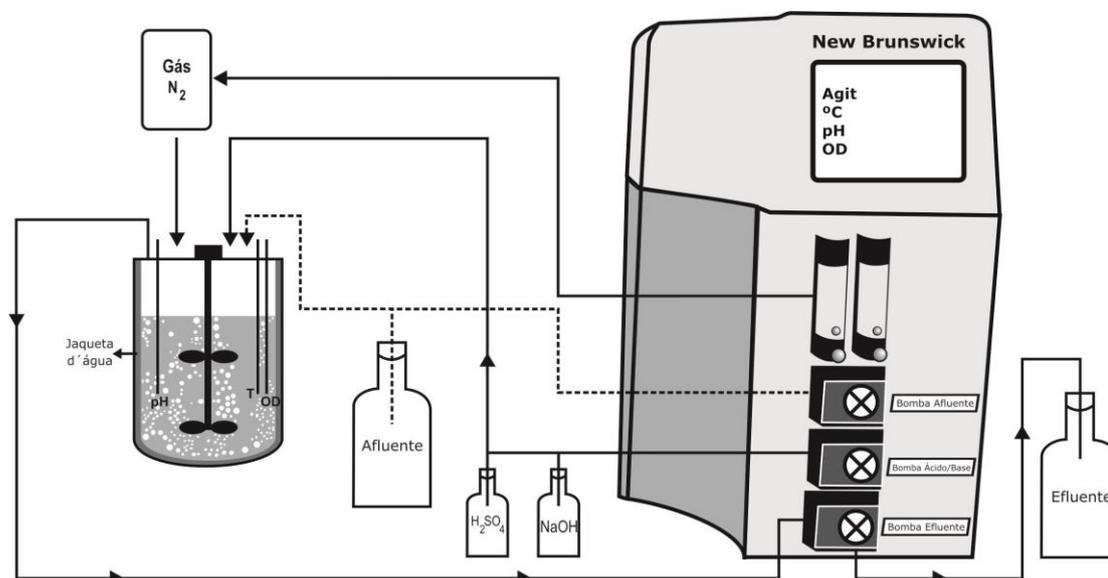


Figura 4.1: Representação esquemática do RBS utilizado para o enriquecimento e cultivo de bactérias anammox. (pH) Sensor de pH; (T) Sensor de Temperatura; (OD) Sensor de oxigênio dissolvido



Figura 4.2: Reator em bateladas sequenciais utilizado no projeto, com biomassa anammox

4.3 Cultivo e estabilização da biomassa anammox - Fase I

4.3.1 Inóculo

O RBS foi inoculado com biomassas provenientes de dois biorreatores com atividade anammox, utilizados em trabalhos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa de Microbiologia Aplicada do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFMG. Os inóculos são descritos a seguir:

- **Inóculo 1:** Biomassa proveniente de um RBS com atividade anammox. Pereira *et al.* (2014) cultivaram bactérias anammox a partir de lodo coletado da linha de recirculação dos decantadores secundários que compõem o sistema de lodos ativados convencional da Estação de Tratamento de Esgotos do Ribeirão Arrudas (ETE Arrudas/ COPASA). O lodo inoculado tinha a concentração de 6,2g STV/L. O reator foi operado por 377 dias com afluente sintético e submetido a concentrações crescentes de fenol ($10\text{-}300\text{ mg.L}^{-1}$) por 42 dias. O volume de trabalho do reator era de 2 litros e o TDH de 24 horas. A biomassa foi utilizada após o período de recuperação da exposição ao fenol.
- **Inóculo 2:** Biomassa proveniente de reator anaeróbico de fluxo ascendente e leito fixo com atividade anammox. Costa *et al.* (2014) cultivaram bactérias anammox a partir do sedimento de um sistema alagado construído não plantado (*Wetland*), instalado no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento - CePTS/UFMG/COPASA. O reator possuía volume útil de 2 litros e era preenchido com meio suporte em polipropileno e espuma de poliuretano, esse sistema foi operado por 550 dias e a alimentação era realizada com afluente sintético.

A escolha dos inóculos foi baseada nos resultados obtidos por Pereira *et al.* (2014) e Costa *et al.* (2014). Ambos os estudos apresentaram uma porcentagem significativa de micro-organismos do filo *Planctomycetes*, 15,12% (PEREIRA *et al.*, 2014) e 11% (COSTA *et al.*, 2014), e do gênero *Candidatus Brocadia*, 12,16% (PEREIRA *et al.*, 2014) e 10,9% (COSTA *et al.*, 2014).

A biomassa do Inóculo II foi retirada do reator, porém, uma parte da biomassa estava aderida ao meio suporte e para remoção utilizou-se o tampão fosfato-salino (PBS 1X, NaCl, Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , pH = 7,2-7,4) para a lavagem do mesmo, outra parte da biomassa estava sedimentada e foi coletada. Após essa etapa, a biomassa foi centrifugada a 4.000 rpm, por 10 minutos, para

retirada do excesso de meio de cultura e tampão. O volume de biomassa (Inóculo II) obtido foi de aproximadamente 250 ml, essa biomassa foi transferida para um frasco contendo meio de cultura sintético e aplicada no primeiro ciclo de operação do RBS, que já possuía o Inóculo I. As condições operacionais são descritas no item 4.1.2. As Figuras 4.3 e 4.4 apresentam as biomassas utilizadas como inóculos antes de serem misturadas e cultivadas no RBS para o presente projeto.

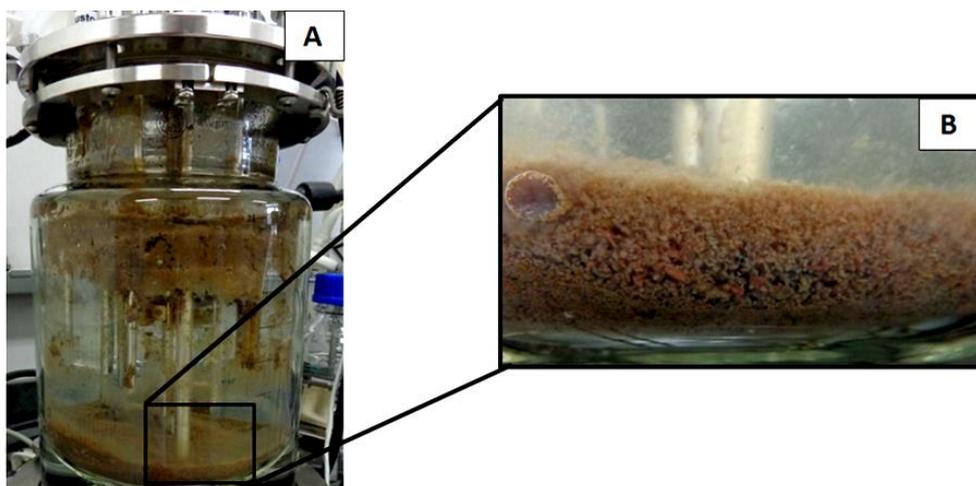


Figura 4.3: (A) Reator com a biomassa utilizada por Pereira *et al.* (2014) e (B) detalhe da biomassa (Inóculo I)

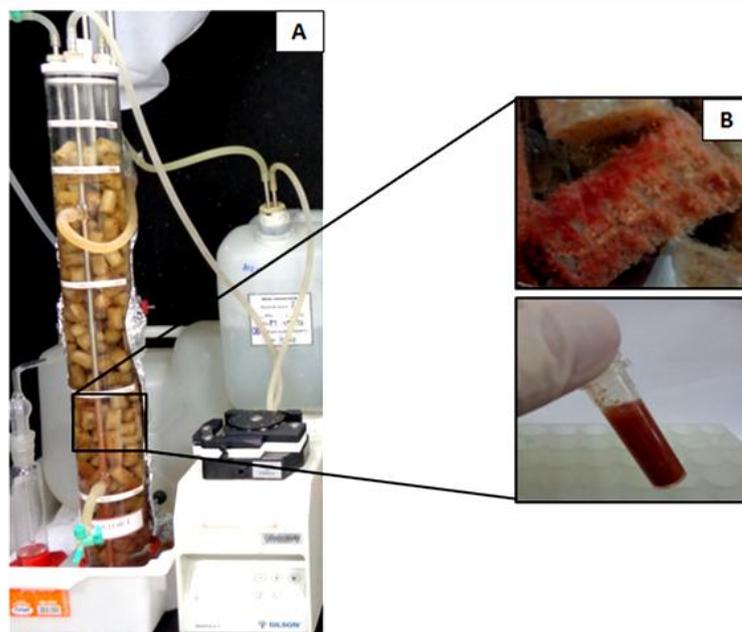


Figura 4.4: (A) Reator de fluxo ascendente utilizado por Costa *et al.* (2014) e (B) detalhe da biomassa aderida ao meio suporte e retirada do reator (Inóculo II)

A caracterização microbiológica dos dois inóculos utilizados foi realizada pela técnica do Pirosequenciamento, sistema 454 *Life Sciences*, e os principais filos encontrados foram *Proteobactéria*, *Firmicutes*, *Chloroflexi*, *Verrucomicrobia* e *Planctomycetes* (PEREIRA *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2014).

4.3.2 Operação e monitoramento do reator

O RBS foi operado durante 583 dias (01/12/2013 a 03/07/2015, Fases I, II e III, conforme Tabela 4.1). Foram definidos dois ciclos diários de operação, o primeiro ciclo com duração de 7 horas (Ciclo Curto) e o segundo com duração de 17 horas (Ciclo longo). Cada ciclo compreendia três etapas: a) fase de alimentação, na qual o afluente é introduzido no reator (com agitação contínua); b) fase de decantação (30 minutos), na qual a agitação do sistema é desligada, permitindo assim a decantação da biomassa; e c) fase de retirada da fase líquida, em que o efluente é coletado para análises. O reator foi operado com tempo de detenção hidráulica (TDH) de 24 horas e retenção total de biomassa.

O pH, a temperatura e o oxigênio dissolvido foram monitorados a cada ciclo por meio de sondas e sensores do próprio reator, esses parâmetros foram monitorados a cada ciclo. A temperatura no interior do reator foi mantida a 35 °C e o pH em torno de 7,5. O pH era ajustado sempre que necessário utilizando soluções de NaOH (0,5M) e H₂SO₄ (1M). O reator era protegido da luz para evitar o crescimento de algas, as quais podem competir com as bactérias anammox pelo nitrogênio do meio. Ao RBS foi acoplada uma bolsa de gás contendo nitrogênio, a fim de manter a anaerobiose no interior do reator. Sempre que necessário, gás nitrogênio era adicionado no interior do líquido e no *headspace* do reator.

O RBS foi alimentado com meio de cultura mineral e autotrófico (VAN DE GRAAF *et al.*, 1996; DAPENA-MORA *et al.*, 2004). O meio de cultura (afluente sintético) continha amônia e nitrito como únicos doador e acceptor de elétrons, respectivamente. Carbonato foi usado como única fonte de carbono inorgânico. Como a biomassa já estava previamente enriquecida, as concentrações iniciais de N-NO₂⁻ e N-NH₄⁺ afluentes foram de aproximadamente 150 mg.L⁻¹ e 120 mg.L⁻¹ respectivamente. Essas concentrações foram aumentadas gradativamente à medida que o processo Anammox, após a mistura dos inóculos, ficou estável. A composição completa do meio de cultura encontra-se detalhada nas Tabelas 4.2 e 4.3.

Tabela 4.2: Composição do meio mineral autotrófico

Componentes	Concentração (mg.L ⁻¹)
NH ₄ CL	Variável
NaNO ₂	Variável
KHCO ₃	500
KH ₂ PO ₄	27
CaCl ₂ .2H ₂ O	180
MgSO ₄ .7H ₂ 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 4.3: Composição das soluções de Micronutrientes I e II

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

Fonte: Dapena-Mora *et al.*, 2004

Ao meio de cultura era adicionado gás nitrogênio a fim de expulsar o oxigênio dissolvido e propiciar condições anaeróbias no interior do frasco. O nitrogênio era adicionado durante 10 minutos no interior do meio e 3 minutos no *headspace* do frasco. O pH do meio de cultura era sempre ajustado, com soluções de NaOH (0,5M) e H₂SO₄ (1M), para que ficasse entre 7,2 e 7,8. As soluções de micronutrientes I e II, bem como as soluções estoque de CaCl₂. 2H₂O (0,5M) e de MgSO₄.7H₂O (0,5M) foram esterilizadas em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Nestas soluções, previamente à esterilização, também fluxionava-se o gás nitrogênio por 10 minutos, garantindo a anaerobiose nas mesmas. Estas soluções foram estocadas em frascos âmbar, a 4°C por 2 a 3 meses.

O monitoramento do RBS foi realizado através de métodos analíticos e análises microbiológicas, de modo a verificar o desempenho quanto à eficiência de remoção de amônia, nitrito e produção de nitrato. Ao final de cada ciclo, amostras de 20 ml eram coletadas do efluente, após a etapa de decantação da biomassa. Amostras do afluente (meio de

cultura autotrófico e efluente do UASB nas Fases III e IV), também eram coletadas de modo a confirmar as concentrações de amônia, nitrito, DQO (Fases II e III) e determinação do pH. As amostras coletadas para as análises de amônia, nitrito e nitrato eram filtradas (filtro para seringa, PTFE, porosidade 0,45 µm e Ø25mm) e depois armazenadas a -20°C até o dia da análise. As amostras para a análise de DQO eram somente refrigeradas e acidificadas com H₂SO₄, a fim de manter o pH ≤ 2 e preservar a amostra (APHA, 2012). Os métodos analíticos e caracterização microbiológica serão descritos detalhadamente nos itens 4.4 e 4.5, respectivamente. A frequência e os parâmetros analisados para cada fase desse estudo estão descritos na Tabela 4.4.

Tabela 4.4: Parâmetros de Análise, frequência e métodos analíticos

Parâmetro	Fase I	Fase II	Fase III	Frequência*	Metodologia
N-NH ₄ ⁺	X	X	X	4	Colorimétrico
N-NO ₂ ⁻	X	X	X	4	Colorimétrico
N-NO ₃ ⁻	X	X	X	4	Cromatografia Iônica
DQO	-	X	X	3	Titulométrico
STV**	X	-	X	**	Gravimétrico

* N° de coletas por semana

** Amostras para STV foram coletadas no final das Fases I e III

4.4 Avaliação do efeito de compostos orgânicos sobre o processo Anammox

4.4.1 Teste com diferentes relações DQO/N aplicando efluente sintético com glicose – Fase II

O objetivo desta etapa (Fase II) foi verificar os efeitos de diferentes relações DQO/N sobre o processo Anammox e avaliar a viabilidade de aplicação de um efluente real, sem prejudicar a biomassa anammox previamente enriquecida.

A partir do 351° dia de operação, iniciou-se os testes com diferentes relações DQO/N e as concentrações foram aumentadas gradativamente para verificar a partir de qual valor haveria efeito negativo sobre a atividade Anammox. Optou-se por utilizar a glicose como fonte de carbono por não ser um composto orgânico tóxico e as bactérias anammox são incapazes de degradar esse substrato (GÜVEN *et al.*, 2005; JENNI *et al.*, 2014). A solução de glicose foi adicionada ao reator com auxílio de seringas de 50 ml de volume por meio de um septo de

borracha, localizado na parte superior do RBS, no início da fase de alimentação do ciclo de 17 horas (Ciclo Longo), e a concentração da solução variou conforme a relação DQO/N testada. Os cálculos das proporções DQO/N aplicadas foram feitos conforme a concentração de nitrogênio utilizada na operação do reator e com base no consumo teórico de oxigênio pelos micro-organismos, que para a oxidação de 1 mol de glicose (180g) são necessários 6 mols de oxigênio (192g) ou 192g de DQO, conforme a Equação 4.1:



As condições para os testes com diferentes proporções de DQO/N e os períodos de teste para cada relação DQO/N são apresentados na Tabela 4.5:

Tabela 4.5: Ensaios para o teste com diferentes proporções DQO/N

DQO/N	Nitrogênio Total (mg. L ⁻¹)	DQO (mg. L ⁻¹)	Solução glicose (mg. L ⁻¹)	Período (dias)	Dias de operação
0,7	140,0	98,0	91,88	7	351-358
1,4	140,0	196,0	183,75	22	359-381
2,8	140,0	392,0	367,50	17	382-399
3,5	140,0	490,0	459,38	14	400-414
5,0	60,0	300,0	281,25	33	449-482

Amostras do afluente e do efluente do reator foram coletadas para caracterização físico-química conforme já apresentado na Tabela 4.3, a fim de avaliar se estava ocorrendo alterações tanto na eficiência de remoção de nitrogênio quanto na razão estequiométrica de consumo de nitrito/amônia característica do processo Anammox. Considerou-se como controle (referência da remoção de nitrogênio pelo processo Anammox no RBS), a Fase I, período de operação precedente aos ensaios com diferentes relações DQO/N. Este período foi considerado para a comparação realizada, porque nele prevaleceram condições de operação semelhantes às utilizadas durante o período de alimentação do reator com a glicose.

Na etapa em que a relação DQO/N estava em 3,5, observou-se diminuição da atividade anammox no RBS e por esse motivo, optou-se por interromper a alimentação com a glicose para que a atividade das bactérias anammox não fosse inibida de maneira irreversível. O reator ficou um período de 35 dias em recuperação, sendo alimentado somente com o efluente sintético, durante esse período, as concentrações de NO₂⁻ e NH₄⁺ foram reduzidas para 30

mg.L⁻¹ (60 mg.L⁻¹ de N) e após a etapa de recuperação, a proporção DQO/N de 5 foi testada. Esses resultados são discutidos no item 5, Resultados e Discussão.

4.4.2 Avaliação do efeito da aplicação de efluente anaeróbio de reator UASB – Fase III

O Reator UASB utilizado nessa 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 esgotos domésticos. Esse reator possui 16,8 m³, executado em aço-carbono, com dimensões de 2,50 m (comprimento) x 1,40 m (largura) e 4,50 m (altura), o qual foi dimensionado para um equivalente populacional de 380 habitantes (per capita de esgoto igual a 125L. hab⁻¹.d⁻¹). 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 4.5 apresenta uma foto do reator UASB.



Foto: Ribeiro, 2015

Figura 4.5: Reator UASB, em escala de demonstração, utilizado no presente estudo

A Tabela 4.6 apresenta uma síntese das principais condições operacionais definidas para a operação do reator UASB, segundo os estudos de Ribeiro (2015). Análises físico-químicas foram realizadas para a caracterização do efluente do reator UASB antes da aplicação no RBS. A Tabela 4.7 apresenta os resultados da composição do efluente anaeróbio.

Tabela 4.6: Condições operacionais do reator UASB

Parâmetro	Reator UASB
Tempo de detenção hidráulica - TDH (h)	8,7 (5,4 – 17,1)
Velocidade ascensional média (m.h ⁻¹)	0,5 (0,3 – 0,9)
Vazão afluyente (m ³ .d ⁻¹) (vazão média)	46,6 (22,7 – 72)
Carga orgânica volumétrica (kgDQO.m ⁻³ .d ⁻¹)	1,5 (0,8 – 2,4)
Carga orgânica volumétrica (kgDBO.m ⁻³ .d ⁻¹)	0,75 (0,38 – 1,2)
Taxa de aplicação superficial (m ³ .m ² .d ⁻¹)	-
Tempo de residência celular (d)	70 ^a

() Faixa imposta pelo hidrograma de vazão variável que alimenta o reator.

^a Em função da massa mínima de lodo no reator.

Tabela 4.7: Caracterização físico-química do efluente do reator UASB

Composto	Unidade	Concentração (± desvio padrão)
pH	-	7,2 ± 0,1
Condutividade	µS/cm ⁻¹	741 ± 65
Oxigênio Dissolvido	mg.L ⁻¹	0,4 ± 0,1
Temperatura	°C	25 ± 2
DBO total	mg. L ⁻¹	61 ± 18
DQO total	mg. L ⁻¹	177 ± 82
DQO solúvel	mg. L ⁻¹	125 ± 64
SST	g. L ⁻¹	75 ± 25
SSV	g. L ⁻¹	50 ± 18
Nitrogênio Total	mg. L ⁻¹	43 ± 8
NTK	mg. L ⁻¹	41 ± 8
NH ₄ ⁺	mg. L ⁻¹	35 ± 10
NO ₂ ⁻	mg. L ⁻¹	0,21
NO ₃ ⁻	mg. L ⁻¹	0,11
PO ₄ ³⁻	mg. L ⁻¹	18 ± 1,67
SO ₄ ²⁻	mg. L ⁻¹	6,8 ± 0,36

A aplicação do efluente do reator UASB foi realizada a partir do 501º dia de operação do RBS, sob as mesmas condições operacionais utilizadas nas Fases I e II, com os dois ciclos de 7 e 17 horas. O processo de aplicação do efluente anaeróbico, como afluyente do RBS, consistiu de 2 etapas, conforme apresentado na Tabela 4.8:

Tabela 4.8: Etapas do teste com aplicação de efluente do reator UASB

Etapa	Afluyente ao RBS	Período (dias)	Dias de operação
A	60 % efluente UASB + 40% meio de cultura	24	501-525
B	Efluente UASB acrescido de NO ₂ ⁻	32	526-558

A Etapa A foi realizada com o objetivo de aclimação da biomassa, uma vez que os microorganismos do RBS só recebiam como afluente meio mineral autotrófico. Antes da aplicação no reator, o efluente anaeróbio era misturado ao meio de cultura, na proporção de 60% e 40%, respectivamente. O meio mineral possuía a concentração de 50 mg.L^{-1} de NO_2^- e 30 mg.L^{-1} de NH_4^+ . A Etapa B consistiu somente na aplicação do efluente anaeróbio do reator UASB, porém, por limitações técnicas, não foi possível promover uma nitrificação parcial no RBS para que o NO_2^- fosse produzido, por isso, optou-se pela adição de uma solução de NO_2^- , na concentração de 120 mg.L^{-1} ao efluente do reator UASB, já que esse efluente possui concentrações muito baixas desse íon. A solução de NO_2^- era adicionada ao efluente do UASB quando o mesmo seria aplicado ao reator, pois, se fosse adicionado antes, o nitrito já começava a ser consumido por outros grupos de bactérias presentes no próprio efluente anaeróbio, não sobrando para a biomassa anammox estabelecida no RBS.

Amostras do afluente (conforme descrito nas etapas A e B) e do efluente do reator foram coletadas para caracterização físico-química e monitoramento do RBS, conforme já apresentado na Tabela 4.3.

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 após as Fases I (Estabilização do inóculo) e III (Aplicação efluente anaeróbio). A análise de ST e STV foi realizada apenas duas vezes e em duplicata devido à quantidade de biomassa presente no RBS. 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), descrita a seguir.

Para a análise utilizou-se um volume de 40 ml de lodo, o qual foi pesado em cápsulas de porcelana de peso conhecido e submetido a banho maria à temperatura de 90°C para evaporação da água. Posteriormente, a cápsula contendo a amostra foi incubada por 1 hora em estufa a temperatura de $101 - 103^\circ\text{C}$ para secagem. Após o período de incubação na estufa as cápsulas esfriaram em dessecador e foram novamente pesadas. Obteve-se a concentração de

sólidos totais por meio da Equação 4.2, Onde, A é igual ao peso da cápsula + resíduo seco após passar pela estufa (g); e B é igual ao peso da cápsula (g).

$$STg.l^{-1} = (A + B)x \frac{1000}{40} \quad (4.2)$$

Após a pesagem das cápsulas, as mesmas foram submetidas à mufla à temperatura de 550°C durante 30 minutos, para permitir a volatilização da matéria orgânica presente nos sólidos. Após esfriamento, pesou-se novamente a cápsula e assim foi possível determinar a concentração de sólidos fixos presente no lodo, por meio da Equação 4.3, onde C é o peso da cápsula + resíduo após passar pela mufla (g); e B é referente ao peso da cápsula (g).

$$STFg.l^{-1} = (C + B)x \frac{1000}{40} \quad (4.3)$$

Por fim, a concentração de STV foi obtida subtraindo-se os sólidos totais fixos dos sólidos totais, conforme Equação 4.4.

$$STVg.l^{-1} = \frac{gST}{l} - \frac{gSTF}{l} \quad (4.4)$$

4.5.2 Análise de nitrogênio amoniacal (N-NH₄⁺)

As análises de nitrogênio amoniacal foram determinadas pelo método colorimétrico 4500-NH₃-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 da amônia, 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[®] (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 4.5), onde Y é a absorvância e X é a concentração, considerando $R^2 > 0,999$, preparada mensalmente, com soluções padrão contendo concentrações conhecidas de nitrogênio amoniacal.

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

4.5.3 Análise de nitrogênio nitroso ($N-NO_2^-$)

As análises de nitrito ($N-NO_2^-$) foram realizadas pelo método colorimétrico 4500 NO_2^- 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 α -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 μ 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 absorvância 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 4.6) gerada durante a curva de calibração do método ($R^2 > 0,999$), a qual era realizada mensalmente, utilizando soluções padrão com concentrações conhecidas de $N-NO_2^-$. As análises foram realizadas em duplicata, sendo o resultado final obtido por meio da obtenção da média entre as replicatas.

$$Y = aX + b \quad (4.6)$$

4.5.4 Análise de nitrato (NO₃⁻)

A determinação das concentrações do íon nitrato foi realizada por meio de cromatografia de troca iônica utilizando-se o método 4110 B, conforme descrito no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012). As amostras foram enviadas ao Laboratório de Análises Instrumentais do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG, onde as análises foram realizadas em cromatógrafo iônico DIONEX ICS 1000, com coluna de guarda *Ion Pac* AG22 2x50mm, supressora ASRS300 2mm, detector de condutividade DS6 e injetor automático (DIONEX AS-DV). Como fase móvel utilizou-se uma solução 4,5 mmol. l⁻¹ de Na₂CO₃ e 1,75 mmol. l⁻¹ de NaHCO₃, a uma vazão de 0,25 ml.min⁻¹.

4.5.5 Análise de Demanda Química de Oxigênio (DQO)

A demanda química de oxigênio (DQO) foi realizada pelo método titulométrico 5220 C, refluxo fechado, conforme descrito no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (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. As Equações 4.7 e 4.8 apresentam as reações químicas referente a esta análise.



Para a execução da análise, utilizou-se tubos de vidro (16x10mm) e em cada tubo adicionou-se 1,5 ml da Solução de digestão de K₂Cr₂O₇, 3,5 ml da solução de ácido sulfúrico reagente (H₂SO₄ + AgSO₄) e 2,5 ml da amostra (no caso do branco, utilizou-se 2,5 ml de água Milli-Q[®]). Os tubos foram colocados no bloco digestor de DQO por 2 horas, na temperatura de 150°C. Após esse período, os tubos foram retirados para esfriarem à temperatura ambiente e a titulação foi realizada, uma solução de sulfato ferroso amomiacal (Fe(NH₄)₂(SO₄)₂.6H₂O a 0,10 M - FAS) foi usada como titulante e a solução de Ferroin (fenatrolina monohidratado +

FeSO₄.7H₂O) foi usada como indicador. A cada análise era feita a padronização dos reagentes. A concentração da DQO (mg.l⁻¹) foi obtida através da Equação 4.9. As análises eram realizadas em triplicata, sendo o resultado final obtido por meio da obtenção da média entre as replicatas.

$$DQO \text{ mg } O_2 \cdot l^{-1} = \frac{(A-B) \times M \times 8000}{c} \quad (4.9)$$

Onde:

A = Volume de FAS utilizado na titulação do branco (ml)

B = Volume de FAS utilizado na titulação da amostra (ml)

M = Molaridade do FAS, que é dada pela fórmula $M = (D/E) \times 0,1000$, onde D é o volume de dicromato usado e E é o volume de FAS gasto na titulação da solução anterior.

C = Volume da amostra (ml)

4.6 Caracterização da comunidade microbiana

A investigação da comunidade microbiana presente no RBS foi realizada através de métodos moleculares. A Tabela 4.9 apresenta os períodos de coleta da biomassa, bem como as técnicas de biologia molecular utilizadas para a caracterização do micro-organismos presentes no reator. Detalhes metodológicos de cada técnica usada serão descritos nos itens a seguir.

Tabela 4.9: Amostras e metodologias empregadas para a caracterização microbiana

Fase	Dias de operação	Amostra	Técnicas
I	349	Biomassa do reator após estabilização (Mistura dos Inóculos I e II)	
II	482	Biomassa após teste de diferentes relações DQO/N com glicose	<ul style="list-style-type: none"> • Extração de DNA • PCR-DGGE
II	500	Biomassa após período de recuperação do teste com a glicose	<ul style="list-style-type: none"> • Sequenciamento • PCR em tempo real
III	558	Biomassa após a aplicação do efluente de UASB	

4.6.1 Extração de DNA

As amostras de biomassa coletadas do RBS foram centrifugadas a 4000 rpm por 20 minutos e lavadas por três vezes sucessivas com tampão fosfato-salino (PBS 1X, NaCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, pH = 7,2-7,4). As amostras foram pesadas e armazenadas a -20C°, conforme descrito por Garcia & 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 2,0µl do DNA extraído das amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,0% (75 volts, 35 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 luz UV e as imagens obtidas por um sistema de captura de imagens. O DNA foi quantificado em espectrofotômetro *Nanodrop 1000 (Thermo Scientific)*.

4.6.2 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 sequencias dos *primers* utilizados são apresentados na Tabela 4.10. Os reagentes necessários, as concentrações e o volume dos mesmos, para uma reação com volume final de 50µL, estão apresentados na tabela 4.11. As condições de amplificação são apresentadas na Tabela 4.12. Todas as reações da PCR foram realizadas juntamente com um controle, ausente de amostra de DNA (branco), contendo somente os reagentes para a reação de PCR.

Tabela 4.10: Sequências dos *primers* utilizados na PCR-DGGE

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

Tabela 4.11: Concentração dos reagentes utilizados na PCR-DGGE

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

*O *Pré-Mix (Phonutria)* 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 4.12: Condições de amplificação para os *primers* utilizados na PCR-DGGE

Etapa	°C	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 2% 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 400ng 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 poli(acrilamida-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 50% 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 tetrametiletlenodiamina (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 10mM e EDTA 1mM, pH 8,0) a 4°C por 48 horas. O DNA eluído foi novamente amplificado com os iniciadores 1055F/1392R, porém sem o grampo 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*).

4.6.3 Quantificação de bactérias totais, anammox e desnitrificantes pela técnica de PCR em tempo real

A técnica da PCR em tempo real foi utilizada para se estimar o número de cópias do gene RNAr 16S de bactérias anammox, desnitrificantes e bactérias totais nas amostras coletadas do RBS ao longo da pesquisa. Essa metodologia quantifica o DNA de maneira mais precisa e com maior reprodutibilidade, porque determina os valores na fase exponencial da reação. O

ponto que detecta o ciclo no qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado Ciclo de *Threshold* (CT), e o mesmo permite a quantificação exata e reprodutível de acordo com a fluorescência emitida. A intensidade da fluorescência é proporcional à quantidade de produto gerado na reação de PCR.

As etapas utilizadas para a quantificação de bactérias nas amostras do RBS são descritas nos próximos itens.

4.6.3.1 Obtenção dos plasmídeos recombinantes para as curvas padrão de DNA

Plasmídeos recombinantes contendo genes específicos foram utilizado nas curvas padrão dos ensaios da PCR em tempo real. Os plasmídeos foram obtidos por meio de clonagem do produto da PCR em vetor plasmidial (kit *pGem Easy Vector*, Promega) e inseridos em células *E. coli* JM 109, seguindo instruções do fabricante.

Os plasmídeos já se encontravam disponíveis no laboratório, uma vez que foram obtidos em pesquisas anteriormente realizadas por Mac Conell (2014), conforme descrito a seguir. Para a quantificação dos genes de RNAr 16S de bactérias em geral e de genes *nosZ* para desnitrificantes, utilizou-se DNA de cultura pura de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e para a quantificação de cópias de genes de RNAr 16S de bactérias anammox, utilizou-se DNA genômico proveniente de biomassa cultivada em reatores de enriquecimento anammox, obtida a partir de experimentos prévios conduzidos no Laboratório de Microbiologia do DESA.

As colônias brancas (que continham o plasmídeo recombinante) foram repicadas em placas de petri contendo ágar Luria Bertani (LB). Para confirmar o sucesso da clonagem, as colônias repicadas foram submetidas à nova reação de PCR com os iniciadores específicos para os micro-organismos de interesse. Essas colônias foram repicadas em ágar LB e posteriormente foram coletadas e preservadas em 1 mL de caldo LB estéril (suplementado com 10% de glicerol) a -80 °C.

Para extração do DNA plasmidial, os clones recombinantes foram repicados em 3 mL de caldo LB estéril e incubados por um período de 16 a 24 horas a 35°C . Posteriormente, realizou-se a extração dos plasmídeos utilizando o kit *Illustra Plasmid Prep Mini Spin* (*GE Healthcare Life Sciences*) conforme as instruções do fabricante. Por fim, o DNA plasmidial

(plasmídeo + inserto) foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop (*Thermo Scientific*). Após a quantificação do DNA plasmidial, alíquotas foram preparadas e congeladas a – 20°C para elaboração das curvas-padrão nos ensaios de PCR em tempo real.

Para o cálculo da massa do inserto, primeiramente calculou-se o número de cópias do plasmídeo com o inserto, considerando que a massa de 1 mol de par de bases (pb) possui 660g e que o número de moléculas em 1 mol é igual a $6,02 \times 10^{23}$, conforme descrito na Equação 4.10 (WHELAN *et al.*, 2003). A partir do resultado do cálculo descrito na Equação 4.10, obtém-se o número de cópias do inserto e dessa forma, pode-se calcular a quantidade de DNA do inserto utilizando a mesma equação, substituindo o tamanho do plasmídeo com o inserto, pelo tamanho do inserto.

$$\text{Cópias de DNA} = \frac{6,02 \times 10^{23}(\text{cópias/mol}) \times \text{quantidade de DNA (ng)}}{\text{Tamanho do DNA (pb)} \times 6,6 \times 10^{11} \text{ (ng/mol/pb)}} \quad 4.10$$

Após a estimativa da quantidade em nanogramas (ng) de DNA do inserto foram realizadas diluições seriadas do DNA plasmidial em água ultrapura na proporção de 1:5 para bactérias em geral, desnitrificantes e bactérias anammox, respectivamente. Alíquotas de 2,0µL de cada diluição foram adicionadas nas reações da PCR em tempo real, cujas curvas de amplificação foram utilizadas para elaboração da equação linear do experimento, explicada no item 4.5.4.3.

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

Para as reações da PCR em tempo real utilizou-se o mix *Maxima™ SYBR Green/ ROX q PCR Master Mix 2X* (Fermentas). O SYBR® *Green* é um composto fluorescente amplamente utilizado em reações da PCR em tempo real, esse reagente se liga na fita dupla de DNA e emite fluorescência conforme acontece a reação da PCR. Os reagentes utilizados na reação e suas respectivas concentrações estão detalhados na Tabela 4.13 e os pares de iniciadores utilizados estão detalhados na Tabela 4.14. O volume final de cada reação foi igual a 20 µL. As reações foram realizadas em triplicata, tanto para as amostras, quanto para os controles negativos e diluições das curvas padrão.

Tabela 4.13: Concentração dos reagentes utilizados na reação da PCR em tempo real, para um volume final de 20 µL

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

* O *Master Mix* inclui o tampão da PCR, MgCl₂, a enzima *Taq polimerase Hot start*, dNTPs, o corante *SYBR Green I* e o corante de referência passiva ROX.

Tabela 4.14: Iniciadores (*Primers*) utilizados na reação da PCR em tempo real

<i>Primers</i>	Grupo Alvo	Sequencia (5'→3')	°C Anelamento	Referência
1055F 1392R	Bactérias em geral	ATGGCTGTCGTCAGCT ACGGGCGGTGTGTAC	53	FERRIS <i>et al.</i> , (1996)
Pla46F Amx 667 R	<i>Planctomycetes</i> e anamnox	GGATTAGGCATGCAAGTC ACCAGAAGTTCCACTCTC	56	VAN DER STAR <i>et al.</i> (2007)
NosZ F NosZ1622 R	Desnitrificantes	CGYTGTTCMTCGACAGCCAG CGSACCTTSTTGCCSTYGCG	55	ENWALL <i>et al.</i> (2005)

A microplaca (96 poços) foi vedada com selante óptico e colocada em equipamento *7500 Real Time System (Applied Biosystems)*. O programa da PCR consistia de 40 ciclos de desnaturação por 1 minuto (94 °C), anelamento dos iniciadores por 1 minuto (temperatura de acordo com par, conforme especificado na Tabela 4.14) e extensão por 1 minuto (72 °C). O programa se encerrava com a elaboração da curva de *melting* ou de dissociação, útil para checar a pureza dos produtos amplificados, aparecendo-se apenas um pico no gráfico. Esta etapa consistia de 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C, 30 segundos a 95 °C e 15 segundos a 60 °C.

4.6.3.3 Determinação do número de cópias de genes dos grupos bacterianos

Para o cálculo do número de cópias dos genes por reação utilizou-se as equações da reta obtidas a partir das curvas padrão. A Tabela 4.15 apresenta as equações das curvas padrão e eficiências obtidas nos ensaios da PCR em tempo real realizados no presente estudo. Por meio da equação da reta, obteve-se a quantidade em nanogramas de DNA das amostras investigadas e por meio da Equação 4.10, determinou-se o número de cópias de DNA por reação, ou o número de cópias do gene por 5 ng de DNA (quantidade de DNA adicionada em cada reação). Posteriormente, estimou-se a quantidade em nanogramas de DNA extraído por grama de lodo e

dessa maneira, por regra de três simples, calculou-se o número de cópias de genes por grama de lodo.

Tabela 4.15: Equações das curvas padrão e eficiências dos ensaios da PCR em tempo real de quantificação absoluta

Grupo Alvo	Par de iniciadores	Eficiência (%)	r ²	Valor Threshold	Equação da reta
Bactérias totais	1055F 1392R	103	0,996	0,151544	Y=-3,243x+8,925
<i>Planctomycetes/</i> anammox	Pla46F Amx 667 R	95	0,988	0,025799	Y=-3,44x+2,518
Bactérias desnitrificantes	NosZ F NosZ1622 R	91	0,933	0,016924	Y=-3,559x+8,87

4.7 Análises estatísticas

Para o monitoramento do reator, com relação à eficiência da remoção de nitrogênio, serão realizadas análises estatísticas para as quatro fases distintas da pesquisa, através de estatística descritiva e do teste de *Kruskall Wallis* ($\alpha = 5\%$), seguido pelo teste de comparações múltiplas entre medianas ($\alpha = 5\%$), para os casos em que houve diferença significativa entre as medianas no teste *Kruskal-Wallis*. Para os testes estatísticos utilizou-se o software *Past 3.0*, e para a confecção dos gráficos utilizou-se o *Excel 2010*.

A diversidade biológica, que inclui a riqueza (número total de espécies) e abundância (número de indivíduos de uma determina espécie dentro de uma comunidade), é parâmetro de fundamental importância na ecologia de comunidades. Através de expressões matemáticas, é possível estimar os índices de diversidade em um ecossistema (MAGURRAN, 2004).

Para a análise de diversidade do DGGE das amostras de biomassa coletadas durante as quatro fases, utilizou-se o Índice de Shannon (H'), que foi calculado conforme a Equação 4.10, onde ni representou a intensidade de bandas individuais e N foi a soma da intensidade de todas as bandas. Segundo Gafan *et al.* (2005), o índice mede o grau de incerteza em prever a que espécie pertencerá uma banda escolhida, ao acaso, de uma amostra com S espécies e N bandas.

$$H = -\sum \left[\frac{ni}{N} \log \left(\frac{ni}{N} \right) \right] \quad (4.10)$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Monitoramento e Aclimação da biomassa no RBS - Fase I

O RBS foi monitorado por um período de 350 dias, que compreendeu a etapa de mistura e aclimação dos inóculos, antes do início dos testes com diferentes relações DQO/N e aplicação do efluente do UASB. Ao longo do período de monitoramento, o reator apresentou, no ciclo longo (17 horas), o valor médio de pH igual a 7,3 ($\pm 0,8$), a temperatura permaneceu em 35°C e o oxigênio dissolvido ficou entre 0,0 e 0,5. Já no ciclo curto (7 horas), o valor médio do pH mensurado foi igual a 7,4 ($\pm 0,7$), a temperatura não variou e o oxigênio dissolvido ficou entre 0,0 e 0,3. Segundo Strous *et al.* (1999b), essas condições são ideais para as bactérias anammox, pertencentes ao filo *Planctomycetes*, que são bactérias anaeróbias estritas, quimiolitotróficas, cujo o pH ótimo se encontra entre 6,7 e 8,3 e a temperatura entre 20 e 43 °C.

As concentrações afluentes dos compostos nitrogenados foram aumentadas gradativamente até 250 mg.L⁻¹ de nitrogênio nitroso e 180 mg.L⁻¹ de nitrogênio amoniacal, até aproximadamente o dia 208. O objetivo do aumento gradativo das concentrações de N-NO₂⁻ e N-NH₄⁺ foi promover o crescimento da biomassa anammox e conseqüentemente maior remoção de amônia. Porém, de 208 até 233 dias de operação, quando as concentrações de N-NH₄⁺ e N-NO₂⁻ estavam em 180 mg.L⁻¹ e 250 mg.L⁻¹, respectivamente, observou-se redução na eficiência de remoção dos compostos nitrogenados, que atingiu valores médios de remoção de nitrito de 86%, tanto para o ciclo longo quanto para o ciclo curto. Os valores médios para a remoção de amônio foram de 87% para os dois ciclos. Para evitar que a inibição do processo Anammox ocorresse por completo, as concentrações afluentes dos compostos nitrogenados foram reduzidas para aproximadamente 150 mg.L⁻¹ de N-NH₄⁺ e 200 mg.L⁻¹ de N-NO₂⁻. Apesar de a eficiência de remoção dos compostos nitrogenados ter sido reduzida nesse período, não houve perda total da atividade anammox.

O processo Anammox é mais vulnerável à inibição por nitrito do que pelo íon amônio (STROUS *et al.*, 1999b; ISAKA *et al.*, 2007; DAPENA-MORA, *et al.*, 2007). Os estudos relacionados ao efeito inibitório de nitrito sobre as bactérias anammox sugerem que este efeito ocorre principalmente pela concentração do nitrito e pelo tempo de exposição da biomassa a essa condição (STROUS *et al.*, 1999b; EGLI *et al.*, 2001; DAPENA-MORA *et al.*, 2007).

Egli *et al.* (2001) constataram que concentrações de nitrogênio na forma de nitrito iguais a 185 mg.L^{-1} inibiram completamente a atividade anammox em um reator em escala laboratorial. Dapena-Mora *et al.*, (2007) encontraram concentrações maiores de nitrito (350 mg N-NO_2^-) reduzindo pela metade a atividade das bactérias anammox. A inibição do processo Anammox pelo nitrito pode ser reversível, e para uma rápida recuperação da atividade anammox pode-se adicionar hidrazina ou hidroxilamina (STROUS *et al.*, 1999b; HU *et al.*, 2013). No presente estudo não foi necessária a adição destes compostos, pois, o reator conseguiu recuperar a atividade anammox somente com a redução da concentração de nitrito.

Na Figura 5.1 (A e B) são apresentados os dados referentes às concentrações afluentes e efluentes de nitrogênio nitroso e nitrogênio amoniacal nos dois ciclos, ao longo de todo o período de monitoramento da Fase I.

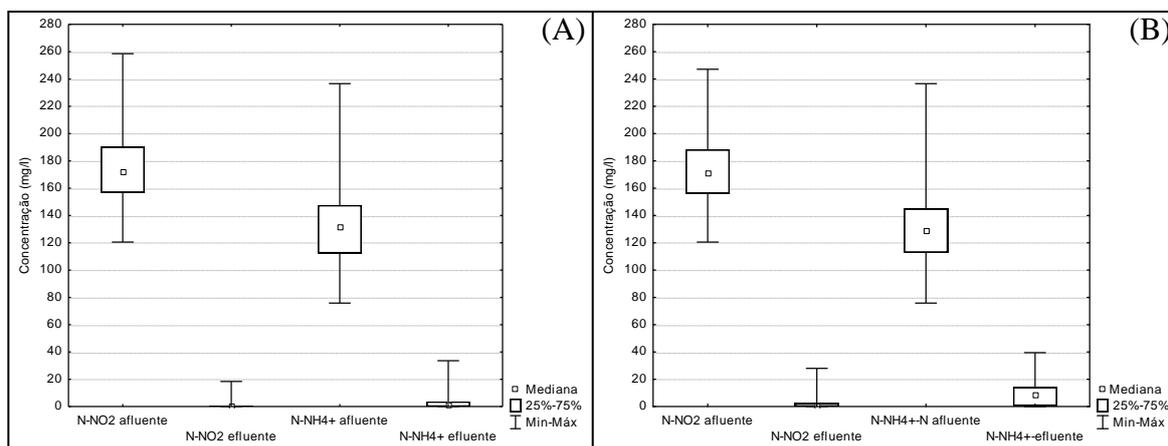


Figura 5.1: Concentrações de N-NH_4^+ e de N-NO_2^- afluentes e efluentes no reator durante os ciclos longo (A) e curto (B)

Os dados apresentados nas Figuras 5.2 e 5.3 referem-se à dinâmica dos compostos nitrogenados e à eficiência de remoção de N-NH_4^+ e N-NO_2^- no sistema durante os dois ciclos de operação do reator, ciclo longo e ciclo curto, respectivamente. Em geral, os perfis de consumo dos compostos nitrogenados (N-NH_4^+ e N-NO_2^-) durante os dois ciclos foram bastante similares. Durante o período de monitoramento da Fase I, as médias de eficiência de remoção de nitrito foram iguais a 97% para o ciclo longo e para o ciclo curto. As médias de remoção de amônio foram de 97% e 92% para os ciclos longo e curto, respectivamente. A

Tabela 5.1 apresenta a estatística descritiva da eficiência de remoção dos compostos nitrogenados pelo RBS ao longo de cada ciclo, para o total de 350 dias de monitoramento.

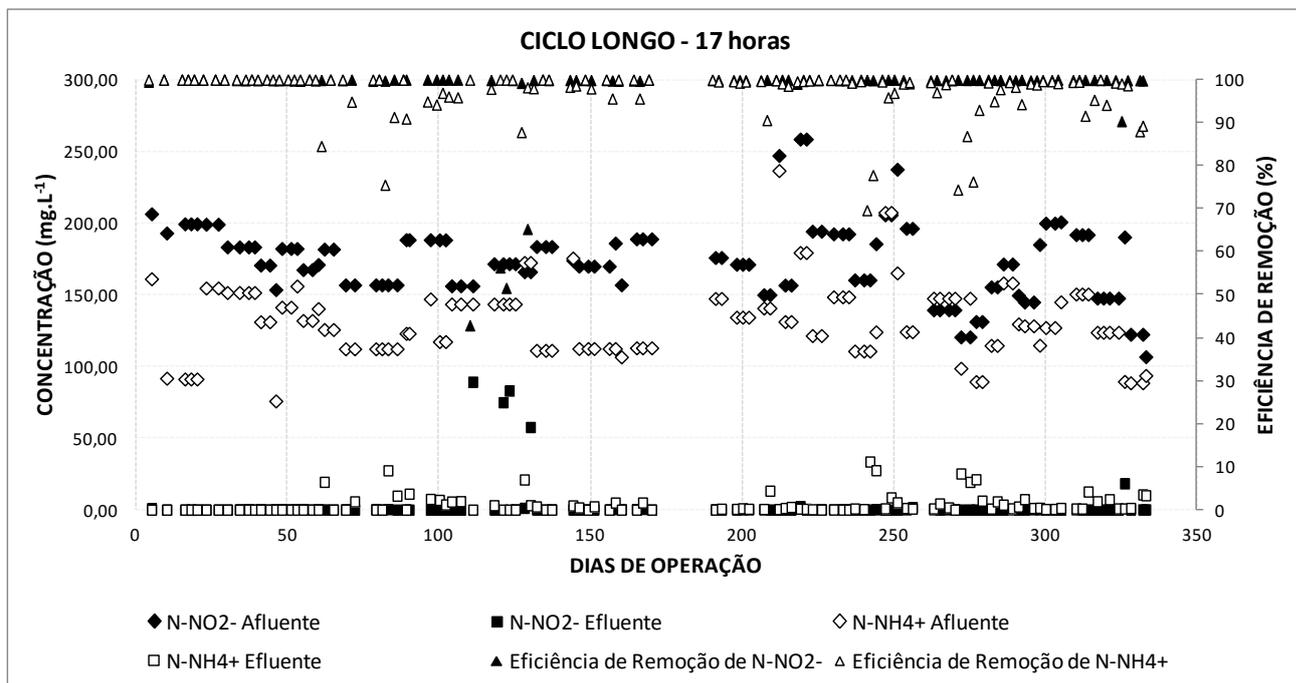


Figura 5.2: Eficiência de remoção e dinâmica dos compostos nitrogenados ao longo do tempo de operação – Ciclo Longo (17 horas)

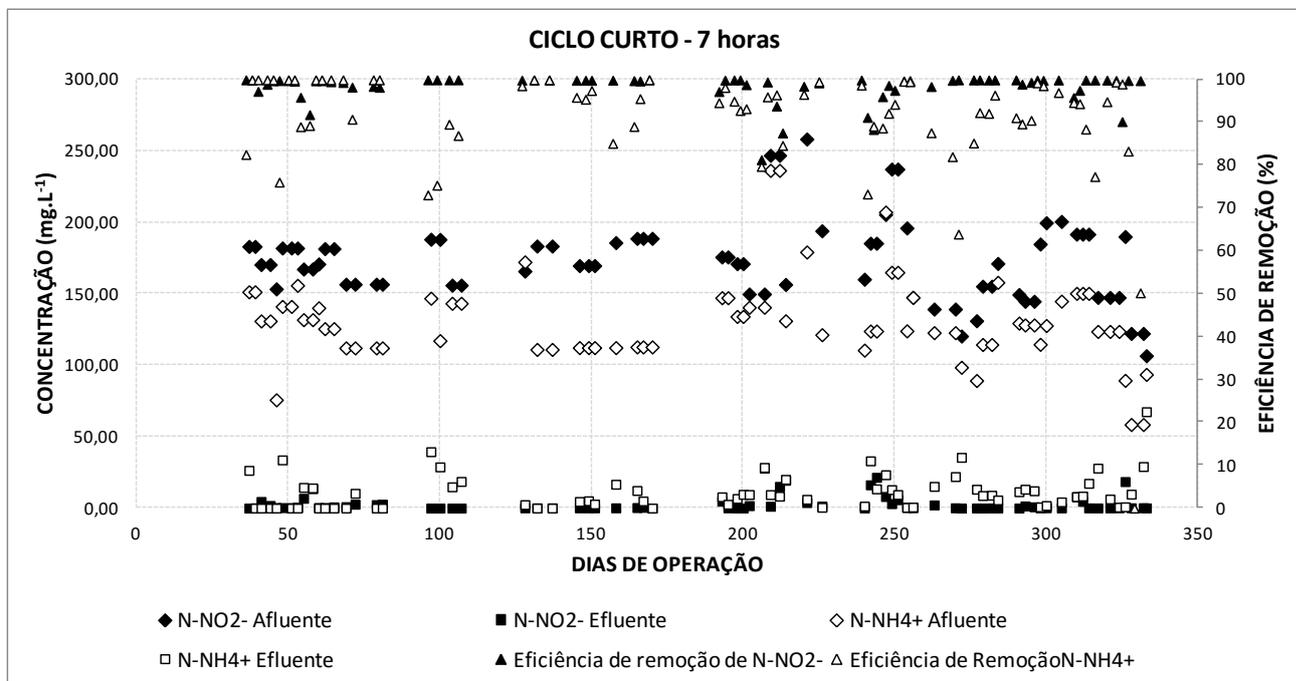


Figura 5.3: Eficiência de remoção e dinâmica dos compostos nitrogenados ao longo do tempo de operação – Ciclo Curto (7 horas)

Tabela 5.1: Estatística descritiva referente à eficiência de remoção de N-NH_4^+ e de N-NO_2^- no reator ao longo dos dois ciclos de monitoramento

Estatística Descritiva/Ciclos Medidas de Tendência Central	Ciclo Longo		Ciclo Curto	
	N- NO_2^-	N- NH_4^+	N- NO_2^-	N- NH_4^+
Número de Dados	104	104	67	67
Média Aritmética	97	97	97	92
Média Geométrica	97	96	97	91
Mediana	100	99	100	93
Mínimo	43	70	81	64
Máximo	100	100	100	100
Desvio Padrão	9	6	4	8
Percentil 10%	92	91	90	81
Percentil 25%	100	96	94	88
Percentil 75%	100	100	100	99
Percentil 90%	100	100	100	100

Os inóculos utilizados no presente estudo já apresentavam atividade anammox e a produção de nitrato foi monitorada nos dois ciclos ao longo da Fase I. Os valores médios encontrados foram $32,6 \text{ mg.L}^{-1}$ e $33,5 \text{ mg.L}^{-1}$ para os Ciclos Longo e Curto, respectivamente. A Figura 5.4 apresenta a produção de nitrato obtida durante a Fase I.

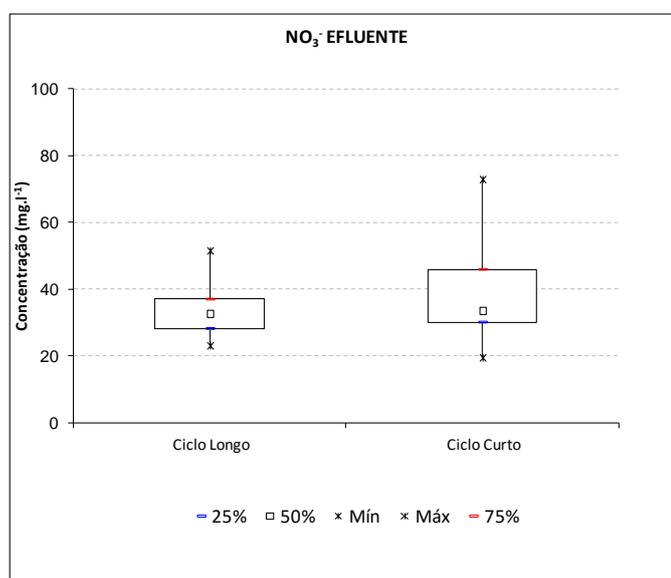


Figura 5.4: Produção de N-NO_3^- no RBS durante a Fase I – Ciclo Longo (17 horas) e Curto (7 horas)

As relações estequiométricas obtidas entre os compostos nitrogenados durante a Fase I foram próximas às previstas por Strous *et al.* (1998) para as bactérias anammox, $1,32 \text{ mol de N-NO}_2^-$

consumido por mol de N-NH_4^+ consumido e 0,26 mol de N-NO_3^- produzido por mol de N-NH_4^+ consumido, conforme a equação descrita na literatura. A Tabela 5.2 apresenta a estatística descritiva dos coeficientes estequiométricos alcançados neste experimento. As médias obtidas para o coeficiente de consumo de $\text{N-NO}_2^-/\text{consumo de N-NH}_4^+$ foram de 1,42 (Ciclo Longo) e 1,49 (Ciclo Curto) e as medianas 1,39 (Ciclo Longo) e 1,45 (Ciclo Curto), valores próximos aos relatados na literatura para a reação anammox (1,32), porém, um pouco maiores neste estudo. Chamchoi & Nitisoravut (2007), relataram valores de consumo de $\text{N-NO}_2^-/\text{consumo de N-NH}_4^+$ iguais a 1,5, em média. Quan *et al.* (2008) obtiveram coeficiente igual a 1,46, em um reator anaeróbico de fluxo ascendente operado sob condições anammox. As médias e medianas obtidas para o coeficiente produção de $\text{N-NO}_3^-/\text{consumo de N-NH}_4^+$ também foram um pouco maiores que 0,26, conforme descrito por Strous *et al.* (1998). Para o Ciclo Longo, foram obtidas média e mediana iguais a 0,30, e para o Ciclo Curto, foi obtida média de 0,34 e mediana de 0,31. Date *et al.* (2009) conseguiram coeficiente de produção de $\text{N-NO}_3^-/\text{consumo de N-NH}_4^+$ igual a 0,33, em um reator de fluxo ascendente com biomassa proveniente de um tanque de tratamento de águas residuárias de suinocultura. Resultados semelhantes também foram apresentados no estudo de Pereira *et al.* (2014), que obtiveram o valor médio para esse coeficiente de 0,36. Nas Figuras 5.5 e 5.6 são apresentadas as séries históricas dos coeficientes estequiométricos para a reação anammox obtidas nesta etapa do estudo.

Tabela 5.2: Estatística descritiva referente aos coeficientes estequiométricos obtidos durante a Fase I

Estatística Descritiva/Ciclos	Consumo $\text{NO}_2^-/\text{Consumo NH}_4^+$		Produção $\text{NO}_3^-/\text{Consumo NH}_4^+$	
	Ciclo longo	Ciclo Curto	Ciclo longo	Ciclo Curto
Número de Dados	101	78	95	73
Média Aritmética	1,42	1,49	0,30	0,34
Mediana	1,39	1,45	0,30	0,31
Mínimo	1,00	0,98	0,00	0,15
Máximo	2,19	2,15	0,48	0,79
Desvio Padrão	0,26	0,28	0,09	0,13
Percentil 10%	1,14	1,19	0,19	0,21
Percentil 25%	1,21	1,29	0,24	0,24
Percentil 75%	1,60	1,65	0,36	0,41
Percentil 90%	1,71	1,88	0,44	0,47

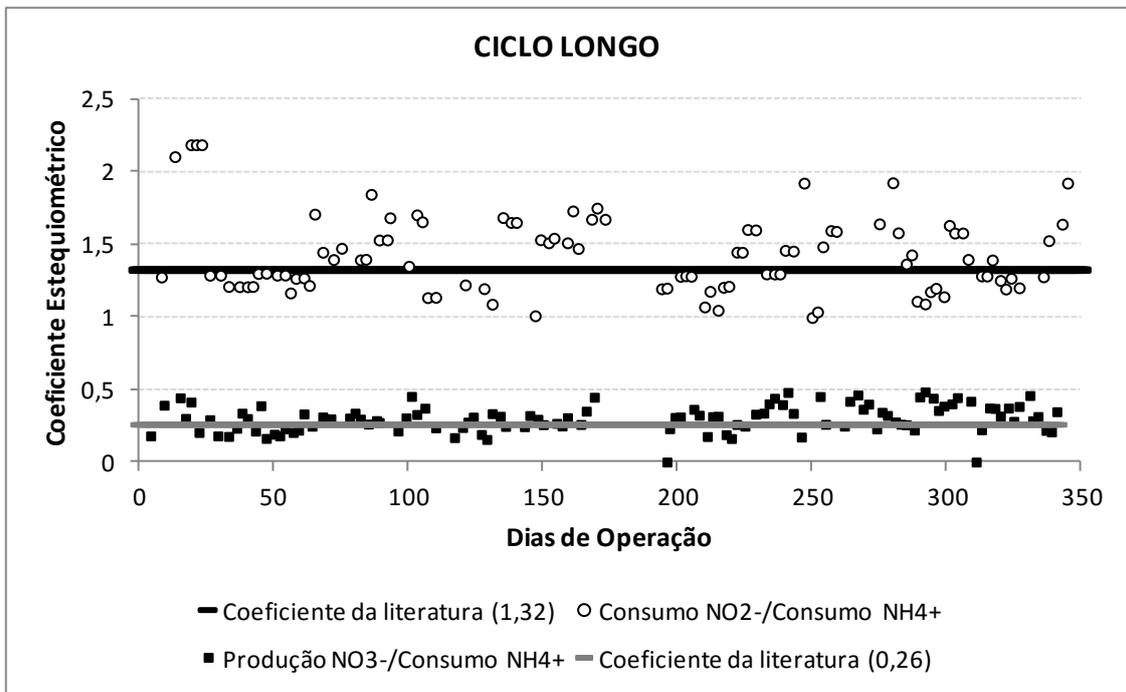


Figura 5.5: Coeficiente estequiométrico do consumo de nitrito/consumo de amônia e da produção de nitrato/consumo de amônia durante a Fase I – Ciclo Longo (17 horas)

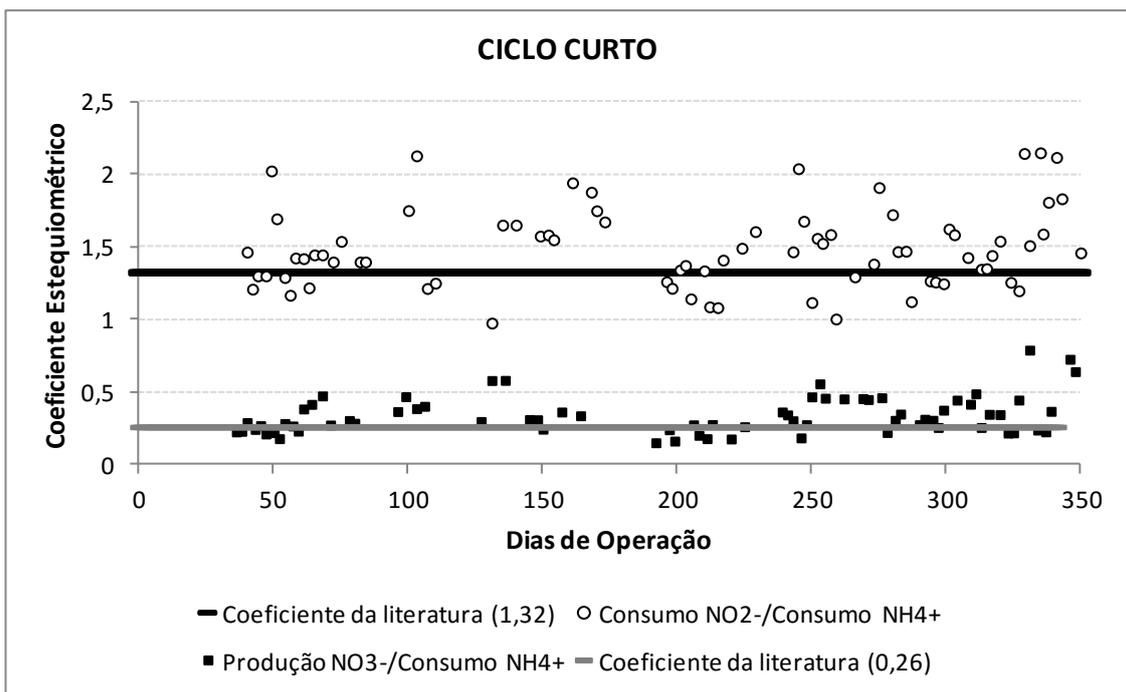


Figura 5.6: Coeficiente estequiométrico do consumo de nitrito/consumo de amônia e da produção de nitrato/consumo de amônia durante a Fase I – Ciclo Curto (7 horas)

Na Figura 5.7 são apresentados os valores das cargas de nitrogênio (N-NO_2^- mais N-NH_4^+) aplicadas ao RBS e removidas ao longo de todo o tempo de operação (350 dias). A carga média de nitrogênio aplicada ao longo da Fase I foi de $226,87 \text{ g N.m}^3.\text{d}^{-1}$, atingindo o valor máximo de $483,7 \text{ g N.m}^3.\text{d}^{-1}$. A carga média de nitrogênio removida foi de $200,97 \text{ g N.m}^3.\text{d}^{-1}$. A Tabela 5.3 apresenta com detalhe a estatística descritiva aplicada a esse parâmetro.

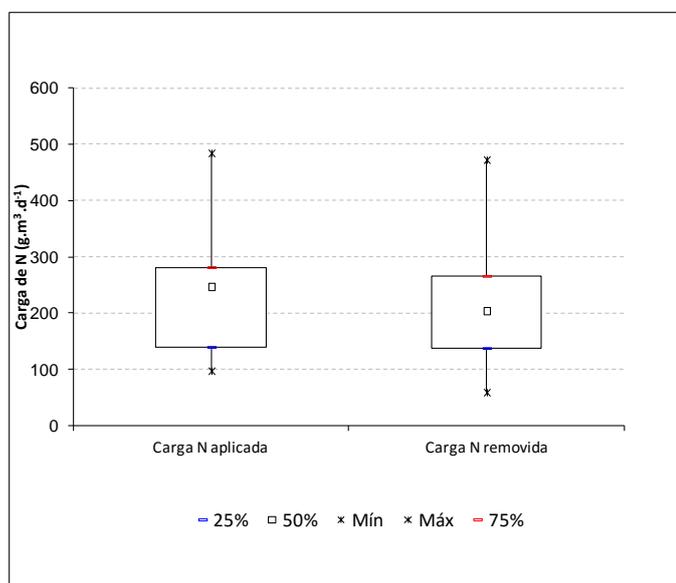


Figura 5.7: Cargas de nitrogênio (N-NO_2^- mais N-NH_4^+) aplicadas e removidas do RBS durante o período de 350 dias - Fase I

Tabela 5.3: Estatística descritiva referente às cargas de nitrogênio (N-NO_2^- mais N-NH_4^+) aplicadas e removidas do RBS durante a Fase I

Estatística Descritiva	Carga de Nitrogênio Aplicada	Carga de Nitrogênio Removida
Medidas de Tendência Central	(g N.m³.d⁻¹)	(g N.m³.d⁻¹)
Número de Dados	97	97
Média Aritmética	226,87	200,97
Mediana	246,33	203,33
Mínimo	96,53	58,44
Máximo	483,65	471,66
Desvio Padrão	87,30	93,08
Percentil 10%	106,96	68,59
Percentil 25%	138,85	136,88
Percentil 75%	280,69	265,04
Percentil 90%	321,51	317,58

Wang *et al.* (2011) apresentaram resultados semelhantes com relação à carga de nitrogênio removida, nesse estudo os autores utilizaram um reator em batelada sequencial, com atividade anammox, e a carga de nitrogênio removida obtida foi de $400\text{g N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$. Dapena-Mora *et al.* (2004) também utilizaram um reator em batelada sequencial 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 $1,4\text{ Kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$, conseguindo uma eficiência de remoção de 82%. López *et al.* (2008) aplicaram uma carga de nitrogênio afluente a um reator com atividade anammox, em escala laboratorial com o volume variando de 14,3 a 15,8L, igual a $1,6\text{ Kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$, nesse estudo, os autores obtiveram 99,7% de eficiência de remoção. Tang *et al.*, (2011) utilizaram um reator com configurações semelhantes ao reator UASB, contendo lodo granular anammox, e conseguiram remover elevadas cargas de nitrogênio, cerca de $75\text{ Kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$.

Ao final do período de estabilização da biomassa no RBS (Fase I), observou-se a presença de grânulos de coloração marrom alaranjado, característicos de bactérias anammox. Tal coloração tem sido atribuída ao ferro associado ao citocromo presente em grande quantidade em culturas de bactérias anammox ativas (JETTEN *et al.*, 2005). As bactérias anammox têm como característica o arranjo na forma de aglomerados (EGLI *et al.*, 2001; EGLI *et al.*, 2003). Os grânulos existentes no reator possuíam o tamanho variando de 0,1 a 0,5 cm. A Figura 5.8 apresenta a biomassa no reator com 350 dias de operação, bem como os grânulos observados na biomassa do RBS.

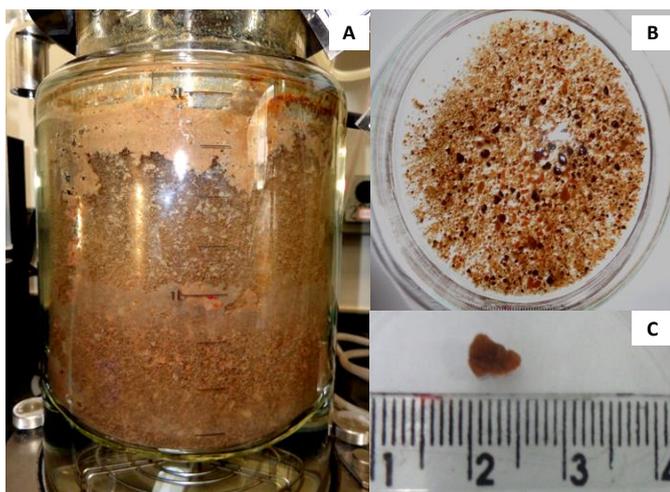


Figura 5.8: (A) Biomassa; (B) Grânulos observados no RBS e (C) tamanho do grânulo, régua em cm

A partir dos resultados obtidos na Fase I, e tendo em vista a mistura das biomassas provenientes dos estudos de Pereira *et al.* (2014) e Costa *et al.* (2014), observou-se excelente desempenho do reator anammox em questão, no que se refere à remoção dos compostos nitrogenados. Esses resultados motivaram as etapas seguintes da pesquisa, que visaram estudos mais completos sobre o processo Anammox, bem como sua aplicação no tratamento de efluentes que ainda contenham carbono orgânico, na forma de DQO. A Fase I foi utilizada como controle, em relação às etapas subsequentes.

5.2 Avaliação do efeito de compostos orgânicos sobre o desempenho do processo Anammox

5.2.1 Aplicação de afluente sintético acrescido de glicose com diferentes relações DQO/N - Fase II

Para a realização do experimento com a glicose, os valores afluentes de N-NH_4^+ e N-NO_2^- foram reduzidos, respectivamente, para 60 mg.L^{-1} e 80 mg.L^{-1} (140 mg.L^{-1} de N), para as relações DQO/N de 0,7, 1,4, 2,8 e 3,5. A Figura 5.9 apresenta a dinâmica dos compostos nitrogenados no período do teste com as diferentes relações DQO/N. Vale ressaltar que a glicose era aplicada somente no início do Ciclo Longo (17 horas), conforme descrito no item 4.2.1. Conforme os resultados observados na Figura 5.9, verificou-se que o aumento da relação DQO/N aplicada afetou negativamente a remoção de N-NH_4^+ , inibindo parcialmente o processo Anammox, principalmente na etapa onde a relação DQO/N foi de 3,5:1 (DQO 490 mg.L^{-1}), em que a média da eficiência de remoção do N-NH_4^+ diminuiu para 28,06%. Por esse motivo, optou-se por interromper o teste e o reator ficou 33 dias (período 415 a 448 dias de operação) sem receber glicose, sendo alimentado somente com o afluente sintético, com o objetivo de recuperar a eficiência de remoção. As concentrações afluentes de N-NH_4^+ e N-NO_2^- foram reduzidas para 30 mg.L^{-1} (60 mg.L^{-1} de N), para realização do teste com a relação DQO/N de 5,0 após o período de recuperação. O valor médio do pH durante a Fase II foi de $6,83 (\pm 0,25)$, percebe-se que com relação à Fase I ($7,4 \pm 0,8$), o pH diminuiu, porém, ainda ficou dentro da faixa ideal para as bactérias anammox, que é de 6,7 a 8,3 (STROUS *et al.* 1999b). As concentrações de N-NO_3^- efluente também foram monitoradas durante os períodos do teste com diferentes relações DQO/N. A Figura 5.10 apresenta a série histórica da concentração efluente de N-NO_3^- ao longo da Fase II.

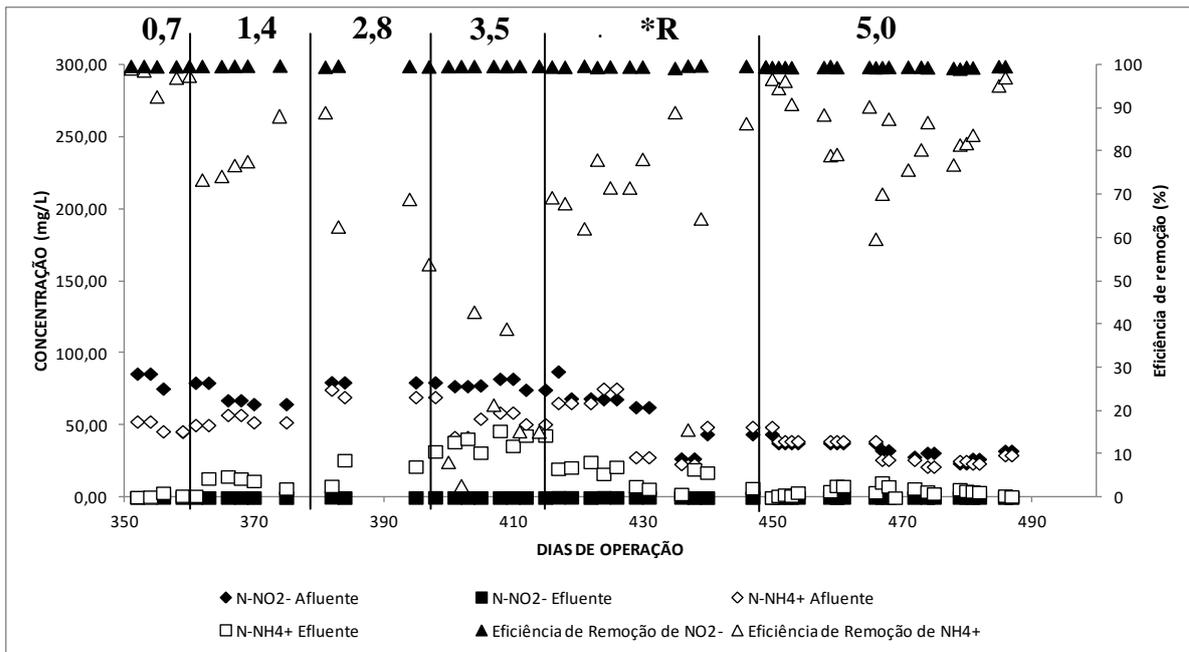


Figura 5.9: Dinâmica dos compostos nitrogenados e eficiências de remoção do Ciclo Longo (17 horas) durante o teste com diferentes relações DQO/N. O período *R refere-se à etapa de recuperação do reator, onde não foi adicionada a glicose.

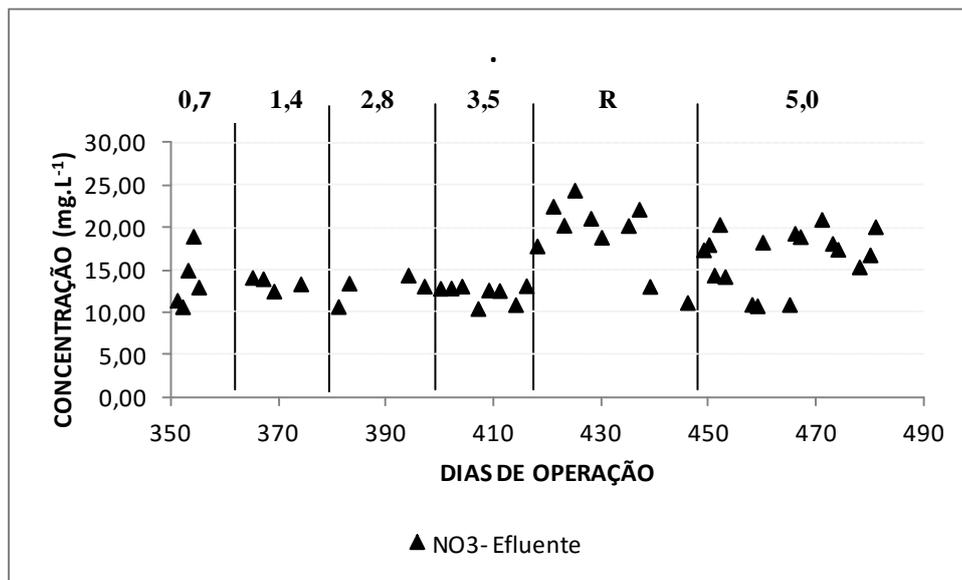


Figura 5.10: Concentrações de N-NO_3^- efluente no Ciclo Longo (17 horas) durante o teste com diferentes relações DQO/N

Com relação à eficiência de remoção de N-NO_2^- em cada etapa do teste com diferentes relações DQO/N, os resultados obtidos demonstraram que as médias e medianas apresentaram valores em torno de 99% de remoção do nitrogênio, na forma de nitrito (Figura 5.11). Para comparar a eficiência de remoção de N-NO_2^- com relação às diferentes relações DQO/N aplicadas e à Fase I (Fase controle) utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis ($\alpha = 5\%$), seguido

pele teste de comparações múltiplas entre medianas ($\alpha = 5\%$). O resultado mostrou que não foi considerada significativa a diferença de remoção de N-NO_2^- a um nível de significância igual a 5% ($p\text{-valor} = 0,1531$). A Tabela 5.4 apresenta a estatística descritiva referente à eficiência de remoção de N-NO_2^- .

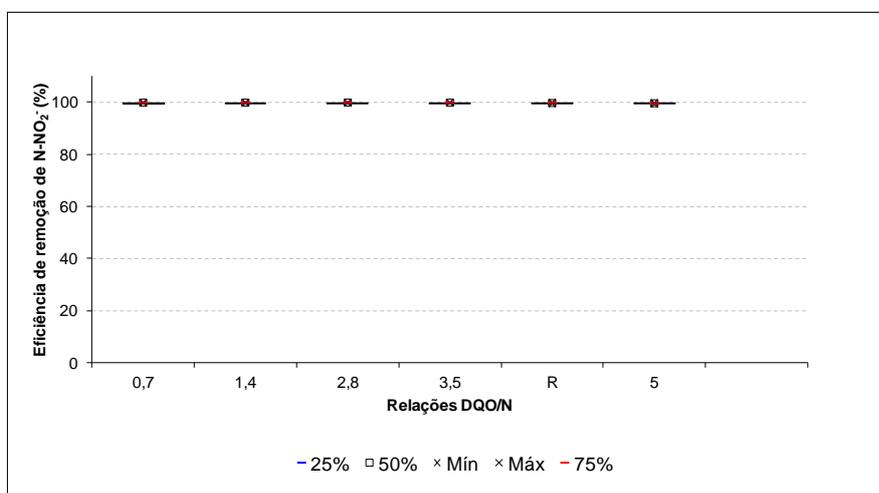


Figura 5.11: Box-plot das eficiências de remoção de N-NO_2^- durante a Fase II

Tabela 5.4: Estatística descritiva da eficiência de remoção de N-NO_2^- observada no teste com diferentes relações DQO/N

Estatística Descritiva	DQO/N					
	0,7	1,4	2,8	3,5	R*	5,0
Medidas de Tendência Central						
Número de Dados	5	12	8	8	14	18
Média Aritmética	99,85	99,86	99,87	99,86	99,75	99,60
Mediana	99,87	99,89	99,89	99,86	99,71	99,63
Mínimo	99,78	99,69	99,75	99,83	99,41	99,24
Máximo	99,87	99,95	99,92	99,89	99,98	99,87
Desvio Padrão	0,04	0,09	0,08	0,03	0,14	0,13
Percentil 10%	99,81	99,70	99,75	99,83	99,64	99,48
Percentil 25%	99,78	99,82	99,81	99,84	99,71	99,57
Percentil 75%	99,87	99,90	99,92	99,88	99,85	99,66
Percentil 90%	99,88	99,95	99,92	99,89	99,92	99,70

* O período *R refere-se à etapa de recuperação do reator, onde não foi adicionada a glicose.

Na Figura 5.12 são apresentados os resultados para as eficiências de remoção de N-NH_4^+ . Foi verificado que houve diferença significativa entre as medianas obtidas no período da alimentação do reator com diferentes relações DQO/N e à Fase I (Fase controle), a um nível de significância de 5% ($p\text{-valor} = 0,01356$), para a remoção de N-NH_4^+ . No entanto, pelo teste

de comparações múltiplas entre as medianas, foi verificado que as eficiências de remoção de amônia não diferiram significativamente entre a Fase 1 e a etapa com DQO/N de 0,7 (p-valor = 0,28). Nas outras etapas do teste com glicose, houve diferença significativa entre os períodos com relações DQO/N iguais a 0,7 e 1,4 (p-valor = 0,0412), 0,7 e 2,8 (p-valor = 0,0453), 0,7 e 3,5 (p-valor = 0,0167), 0,7 e R (p-valor = 0,0102) e 0,7 e 5,0 (p-valor = 0,0201). A Tabela 5.5 apresenta a estatística descritiva referente à eficiência de remoção de N-NH_4^+ .

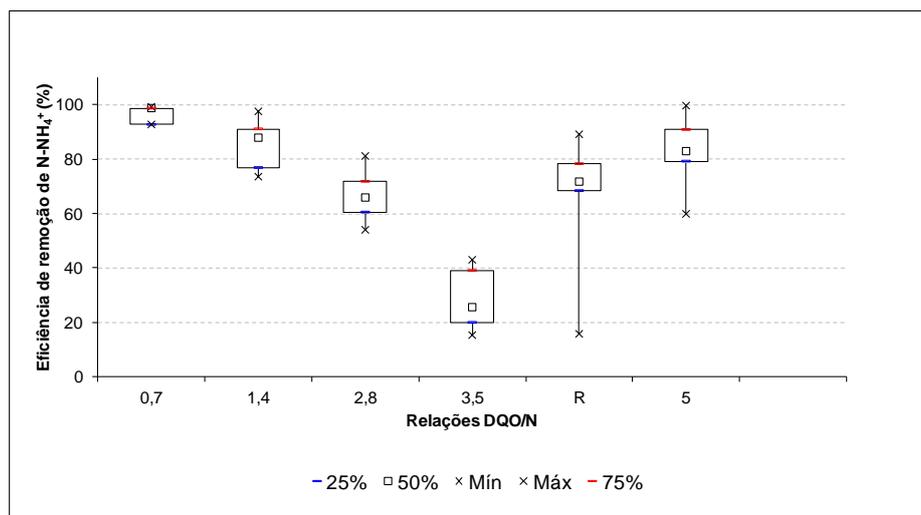


Figura 5.12: Box-plot das eficiências de remoção de N-NH_4^+ durante a Fase II

Tabela 5.5: Estatística descritiva da eficiência de remoção de N-NH_4^+ observada no teste com diferentes relações DQO/N

Estatística Descritiva	DQO/N					
	0,7	1,4	2,8	3,5	R*	5,0
Medidas de Tendência Central						
Número de Dados	5	12	8	8	14	18
Média Aritmética	96,51	85,53	66,64	28,06	71,11	84,17
Mediana	98,83	87,93	65,92	25,56	71,77	82,99
Mínimo	92,81	73,58	54,02	15,28	15,75	59,89
Máximo	99,30	97,62	81,20	43,00	89,18	99,74
Desvio Padrão	3,39	9,24	10,40	11,09	18,07	10,15
Percentil 10%	92,81	74,68	54,02	15,35	63,00	74,23
Percentil 25%	92,81	76,95	60,55	19,97	68,46	79,31
Percentil 75%	98,83	91,17	71,88	39,10	78,37	90,94
Percentil 90%	99,11	97,57	80,50	40,27	88,42	96,58

* O período *R refere-se à etapa de recuperação do reator, onde não foi adicionada a glicose.

Os valores obtidos para a razão estequiométrica de consumo de N-NO_2^- / consumo de N-NH_4^+ e produção de N-NO_3^- / consumo de N-NH_4^+ sob as diferentes proporções DQO/N aplicadas foram analisados a fim de avaliar qual a proporção DQO/N apresentou efeito inibidor sobre o processo Anammox no RBS. A Tabela 5.6 apresenta os valores médios e desvios padrão das razões estequiométricas alcançadas durante a Fase II.

Tabela 5.6: Coeficientes de consumo de N-NO_2^- / consumo de N-NH_4^+ e produção de N-NO_3^- / consumo de N-NH_4^+ obtidos no teste com diferentes proporções DQO/N

DQO/N	Consumo N-NO_2^- / Consumo N-NH_4^+	Produção N-NO_3^- / Consumo N-NH_4^+
0,7	$1,69 \pm 0,07$	$0,22 \pm 0,01$
1,4	$1,51 \pm 0,33$	$0,18 \pm 0,02$
2,8	$1,87 \pm 0,23$	$0,18 \pm 0,01$
3,5	$4,11 \pm 1,34$	$0,23 \pm 0,12$
Recuperação	$1,73 \pm 0,72$	$0,45 \pm 0,17$
5,0	$1,30 \pm 0,30$	$0,31 \pm 0,19$

A DQO efluente também foi monitorada durante o período da Fase II, com o objetivo de verificar se estava ocorrendo o consumo da glicose, na forma de DQO, por outros grupos de micro-organismos, ou se a DQO estava acumulando no reator. A Figura 5.13 apresenta as eficiências de remoção de DQO obtidas durante a Fase II. As eficiências médias de remoção de DQO para cada uma das etapas foram de 71% (DQO aplicada de $97,50 \text{ mg.L}^{-1}$, DQO/N = 0,7), 82% (DQO aplicada de 195 mg.L^{-1} , DQO/N = 1,4), 62% (DQO aplicada de $390,0 \text{ mg.L}^{-1}$, DQO/N = 2,8), 16% (DQO aplicada de $487,50 \text{ mg.L}^{-1}$, DQO/N = 3,5) e 55% (DQO aplicada de $300,00 \text{ mg.L}^{-1}$, DQO/N = 5,0). No período de recuperação (R) não houve aplicação de glicose.

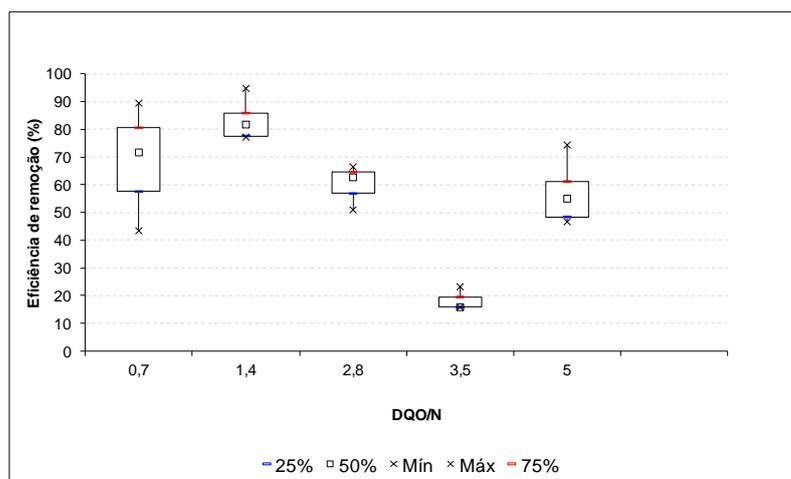


Figura 5.13: Box-plot das eficiências de remoção de DQO durante a Fase II

A partir da análise dos resultados apresentados na Figura 5.13, verificou-se que uma parte da DQO era consumida no reator, provavelmente por bactérias desnitrificantes heterotróficas, até a proporção DQO/N de 2,8 (390,0 mg.L⁻¹ de DQO) e o consumo de nitrogênio amoniacal foi reduzido, apresentando valores médios de 66,64%, conforme já apresentado na Tabela 5.5. Resultados semelhantes foram obtidos por Tang *et al.* (2010), que pesquisaram a supressão do processo Anammox quando aplicado um meio sintético com elevada concentração de DQO. Nesse estudo, os autores utilizaram um reator anammox baseado no sistema de fluxo ascendente do tipo UASB, o volume de trabalho do reator era de 1,1 litro e o tempo de detenção hidráulica de 0,83 h. A biomassa utilizada foi um lodo anammox granular obtido em estudos anteriores, com atividade anammox específica de 0.072 kg N-NH₄⁺.kg SSV⁻¹. d⁻¹ (TANG *et al.*, 2009). Utilizou-se a sacarose como composto orgânico e as concentrações foram aumentadas gradativamente (50 a 700 mg.L⁻¹ de DQO). Os autores observaram que com a adição de matéria orgânica e aumento gradativo da DQO afluenta, o consumo de N-NH₄⁺ era reduzido. Quando a concentração de DQO atingiu 700 mg.L⁻¹ (DQO/N igual a 2,92), a eficiência de remoção de amônia diminuiu significativamente, chegando a 3%, no entanto, o consumo de nitrito foi de 99%. O balanço de massa apresentado demonstrou que a desnitrificação heterotrófica prevaleceu no reator. Os autores concluíram que a matéria orgânica prejudicou a atividade anammox, sendo o principal motivo à competição pelo acceptor de elétrons (nitrito) com as bactérias desnitrificantes heterotróficas.

Jenni *et al.* (2014) utilizaram um reator em bateladas sequenciais e aumentaram gradativamente as relações DQO/N (até o valor de 1,4), utilizando o acetato e a glicose como fontes de carbono. Os autores utilizaram o processo em etapas aeróbias e anaeróbias (nitrificação parcial/anammox). Os resultados mostraram que o nitrogênio foi removido também por outras vias além do processo anammox, como por exemplo, as bactérias oxidadoras de amônia (AOB). A diminuição da atividade e abundância das bactérias anammox foi correlacionada com o aumento da proporção DQO/N. A composição da comunidade de bactérias anammox foi avaliada pela técnica de FISH (*Fluorescent in-situ hybridisation*), e os resultados mostraram que a partir da proporção de 0,8g DQO gN⁻¹, houve um aumento da espécie *Candidatus Brocadia fulgida*, porém, o n° total de bactérias anammox diminuiu. Ao mesmo tempo, a desnitrificação heterotrófica e a atividade de bactérias oxidadoras de amônia (AOB) aumentaram gradualmente, sendo o nitrito todo consumido no reator.

No presente estudo, quando a relação DQO/N era de 3,5 (487,50 mg.L⁻¹ de DQO), o consumo da DQO aplicada diminuiu e os valores encontrados para a DQO efluente foram de 410,26 mg.L⁻¹. Nesse período observou-se também a menor eficiência de remoção de N-NH₄⁺, conforme já discutido anteriormente. A presença de matéria orgânica, na forma de DQO afetou negativamente o processo Anammox, em concordância com os resultados apresentados por Tang *et al.* (2010). Alguns estudos afirmaram que baixas concentrações de matéria orgânica não tem efeito significativo sobre a atividade anammox, porém, concentrações elevadas (DQO > 300 mg.L⁻¹, DQO/N ≥ 2) podem prejudicar o processo (GÜVEN *et al.*, 2005; RUSCALLEDA *et al.*, 2008, CHANCHOI *et al.*, 2008; TANG *et al.*, 2010). Não obstante, no presente trabalho, quando se aplicou a relação DQO/N de 5,0 (DQO = 300 mg.L⁻¹), a eficiência de remoção de amônia foi alta (cerca de 84%), evidenciando que relações maiores de DQO/N podem ser aplicadas em reatores anammox, desde que a biomassa seja aclimatada gradativamente a esta condição e desde que a DQO não ultrapasse 300,0 mg.L⁻¹.

Oshiki *et al.* (2011) utilizaram como fonte de matéria orgânica, na concentração final de 1mM, acetato, propionato, glicose, etanol e metanol. A presença de acetato, propionato e da glicose não afetou a atividade anammox e houve consumo significativo de nitrito. O etanol e o metano inibiram a atividade anammox e houve uma redução no consumo de nitrito, o que vem de encontro ao relatado na literatura sobre o efeito inibitório da matéria orgânica no processo Anammox (GÜVEN *et al.*, 2005; TSUSHIMA *et al.*, 2007).

As bactérias que realizam o processo anammox podem apresentar uma versatilidade metabólica, o que permite que esses micro-organismos se adaptem ao ambiente, quando os substratos principais (N-NH₄⁺ e N-NO₂⁻) são limitantes. As bactérias anammox podem utilizar compostos inorgânicos ou orgânicos como doadores de elétrons para sustentar o seu metabolismo e algumas espécies são capazes de oxidar formiato, acetato e propionato a CO₂ (KARTAL *et al.*, 2007; KARTAL *et al.*, 2012).

No período em que a proporção DQO/N era de 3,5 observou-se alteração na coloração da biomassa presente no reator. A biomassa anammox passou de marrom alaranjada para negra, e a cor do efluente do reator também se alterou, conforme apresentado na Figura 5.14. Esses resultados somados aos resultados de eficiência de remoção de amônia e de DQO confirmaram que as anammox foram afetadas negativamente pela alta concentração de DQO aplicada ao reator. A mudança na coloração da biomassa pode ser devido a presença de ferro,

que é uma das substâncias utilizadas na solução de micronutrientes (FeSO_4) para o preparo do meio de cultura. Madigan *et al* (2010) explica que durante o metabolismo microbiano, alguns subprodutos são formados e podem reagir com o ferro presente nos meios de cultivo, como por exemplo, quando há produção de sulfeto de hidrogênio (H_2S) o ferro reage com o H_2S , formando o sulfeto de Ferro II (FeS), um precipitado negro visível.

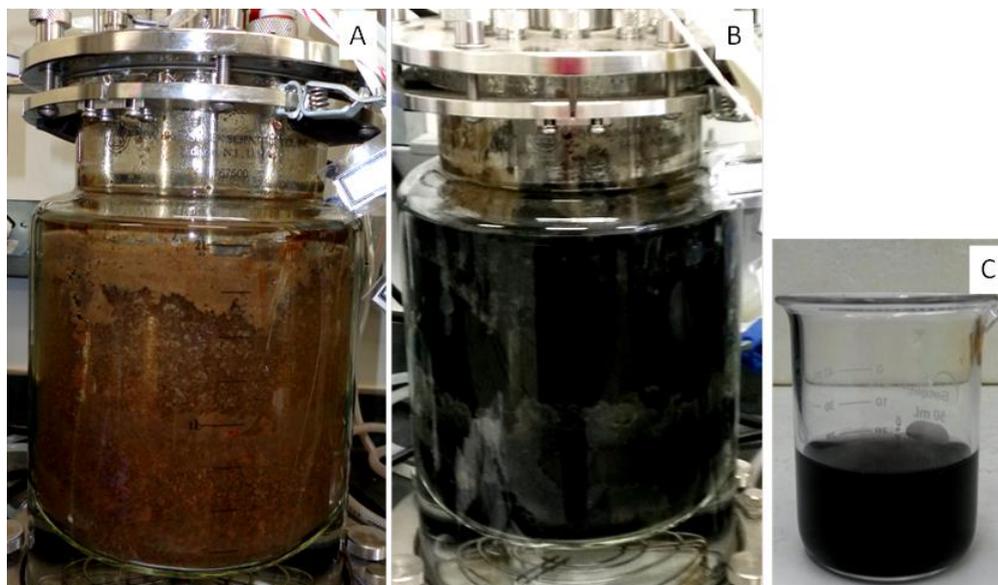


Figura 5.14: (A) Biomassa antes do teste de DQO; (B) Biomassa e (C) Efluente durante o teste DQO/N de 3,5

A etapa com a relação DQO/N de 3,5 foi realizada por apenas 14 dias, pois, uma vez constatada a mudança na cor da biomassa e os baixos valores de eficiência de remoção de N-NH_4^+ , esta fase foi interrompida de modo a evitar inativação irreversível do processo Anammox. Após a interrupção, o período de recuperação (R) foi realizado aplicando-se apenas o afluente sintético, sem glicose, e as concentrações de N-NH_4^+ e N-NO_2^- foram reduzidas para 30 mg.L^{-1} (60 mg.L^{-1} de N). O período de recuperação apresentou uma eficiência média de remoção de N-NO_2^- de 99,75% e de N-NH_4^+ de 71,11%. A biomassa do reator voltou a ficar na cor marrom e o efluente com a cor transparente. Como o RBS apresentou uma melhora significativa da atividade anammox nesse período, após 33 dias de recuperação, decidiu-se por realizar mais um teste com a relação DQO/N de 5,0 e concentração igual a 300 mg.L^{-1} . Neste teste, o reator apresentou resultados médios de eficiência de remoção de N-NO_2^- de 99,60% e de N-NH_4^+ de 84,17%, o que corrobora com os resultados descritos na literatura sobre as faixas de concentrações de DQO ($> 300 \text{ mg.L}^{-1}$) que

interferem no processo Anammox. Essa última etapa foi importante, pois os valores de concentração de DQO e relação DQO/N foram bem próximas às encontradas nos efluentes anaeróbios de reatores UASB, tratando esgoto doméstico. Portanto, os resultados do presente trabalho indicam que o processo Anammox pode ser usado no pós-tratamento de efluentes anaeróbios que contenham DQO até 300 mg/L (e relação DQO/N de 5,0).

5.2.2 Efeito da aplicação de efluente anaeróbio real sobre o processo Anammox - Fase III

A partir do dia 501 de operação, o RBS foi alimentado com o efluente anaeróbio proveniente de reator UASB por um período de 57 dias. A aplicação do efluente anaeróbio foi realizada em duas etapas, conforme descrito no item 4.2.2. Na etapa IIIA, foi aplicada uma mistura do efluente anaeróbio com o meio de cultura autotrófico (60% efluente e 40% meio cultura), na etapa IIIB foi aplicado somente o efluente anaeróbio acrescido de uma solução de nitrito, com concentração de 120 mg. L⁻¹. Ao longo do período de monitoramento da Fase III, o reator apresentou, no ciclo longo (17 horas), o valor médio de pH igual a 6,9 (± 0,4), a temperatura permaneceu em 35°C e o oxigênio dissolvido ficou entre 0,0 e 0,4. Já no ciclo curto (7 horas), o valor médio do pH mensurado foi igual a 6,7 (± 0,2), a temperatura não variou e o oxigênio dissolvido ficou entre 0,0 e 0,3.

As Figuras 5.15 e 5.16 apresentam os dados referentes à dinâmica dos compostos nitrogenados e à eficiência de remoção de N-NH₄⁺ e N-NO₂⁻ no sistema durante os dois ciclos de operação do reator, ciclo longo e ciclo curto, e às etapas A e B da Fase III. Em geral, os perfis de consumo dos compostos nitrogenados (N-NH₄⁺ e N-NO₂⁻) durante os dois ciclos de operação foram bastante similares. As Tabelas 5.7 e 5.8 apresentam a estatística descritiva da eficiência de remoção dos compostos nitrogenados pelo RBS ao longo de cada ciclo, e para as etapas A e B.

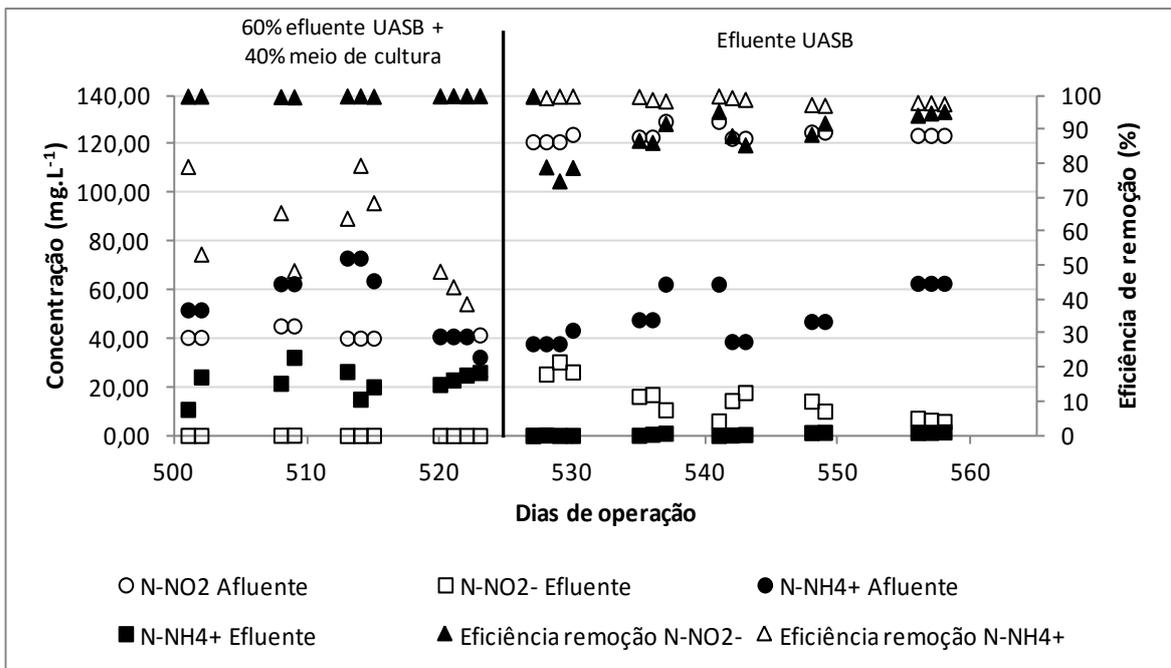


Figura 5.15: Dinâmica dos compostos nitrogenados e eficiências de remoção durante a alimentação com o efluente de UASB + meio de cultura (etapa A) e alimentação somente com o efluente de UASB (etapa B) durante o ciclo longo (17 horas)

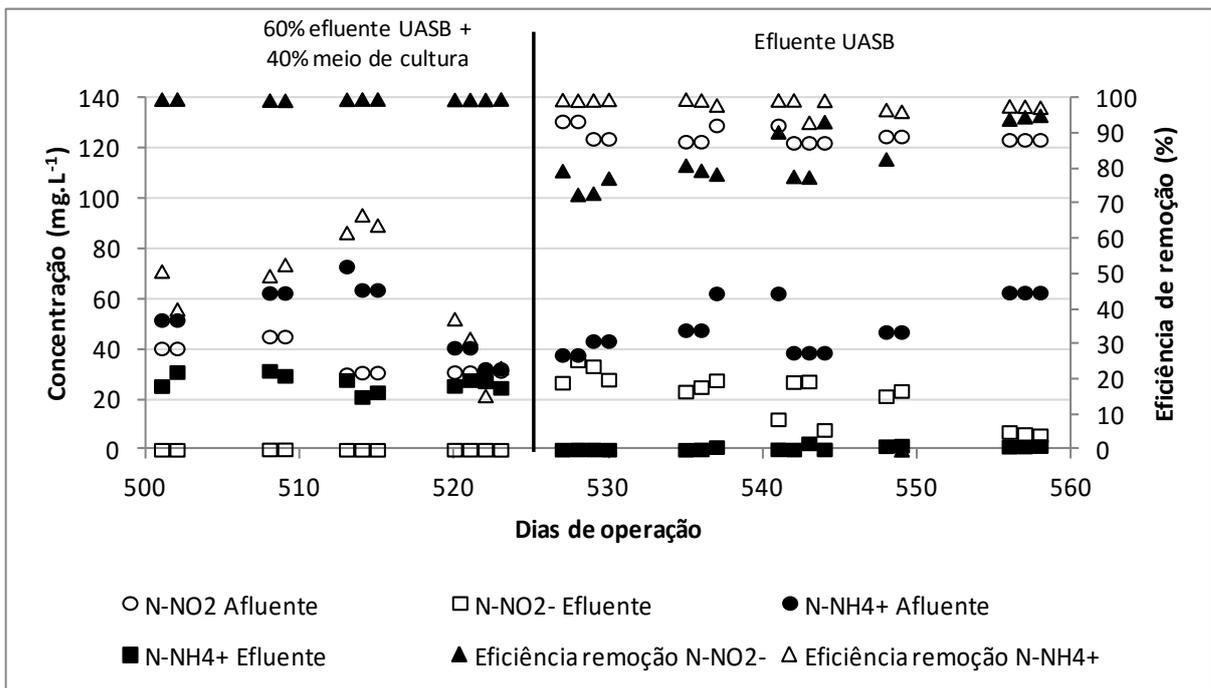


Figura 5.16: Dinâmica dos compostos nitrogenados e eficiências de remoção durante a alimentação com o efluente de UASB + meio de cultura (etapa A) e alimentação somente com o efluente de UASB (etapa B) durante o ciclo curto (7 horas)

Tabela 5.7: Estatística descritiva das eficiências de remoção de N-NO_2^- e N-NH_4^+ observadas na etapa A de aplicação do efluente anaeróbio (60%) + meio de cultura (40%)

Estatística Descritiva/Ciclos Medidas de Tendência Central	Ciclo Longo		Ciclo Curto	
	N-NO_2^-	N-NH_4^+	N-NO_2^-	N-NH_4^+
Número de Dados	14	14	14	14
Média Aritmética	99,88	55,37	99,86	44,95
Mediana	99,93	53,40	99,90	49,63
Mínimo	99,65	19,52	99,60	15,49
Máximo	100,00	79,51	99,97	66,95
Desvio Padrão	0,11	18,15	0,12	16,86
Percentil 10%	99,73	38,80	99,67	23,42
Percentil 25%	99,84	46,07	99,84	34,55
Percentil 75%	99,94	67,05	99,96	57,37
Percentil 90%	99,98	79,18	99,97	64,05

Tabela 5.8: Estatística descritiva das eficiências de remoção de N-NO_2^- e N-NH_4^+ observadas na etapa B de aplicação do efluente anaeróbio do reator UASB

Estatística Descritiva/Ciclos Medidas de Tendência Central	Ciclo Longo		Ciclo Curto	
	NO_2^-	NH_4^+	NO_2^-	NH_4^+
Número de Dados	18	18	18	18
Média Aritmética	88,80	98,83	83,30	98,51
Mediana	88,65	98,92	79,66	99,61
Mínimo	74,93	97,17	72,78	93,34
Máximo	99,98	99,92	95,33	99,94
Desvio Padrão	7,09	1,00	8,11	1,80
Percentil 10%	78,95	97,48	74,86	96,71
Percentil 25%	85,89	97,96	77,84	97,84
Percentil 75%	94,59	99,79	92,06	99,70
Percentil 90%	95,35	99,88	94,65	99,84

As etapas A e B apresentaram resultados distintos quanto à dinâmica dos compostos nitrogenados e às eficiências de remoção. Na etapa A, o efluente foi misturado ao meio de cultura (50 mg.L^{-1} de N-NO_2^- e 30 mg.L^{-1} N-NH_4^+) e observou-se uma instabilidade do processo anammox no RBS, pois o N-NO_2^- foi totalmente consumido, com eficiências médias de remoção de 99,8% para os ciclos longo e curto. Com relação à eficiência de remoção de N-NH_4^+ , os valores médios encontrados foram de 55,3% e 44,9% para os ciclos longo e curto,

respectivamente. Este declínio na remoção de N-NH_4^+ explica-se pelo fato de que o nitrito pode ter sido consumido no processo de desnitrificação, e não pela oxidação anaeróbia da amônia, e, portanto, faltou o acceptor final de elétrons para as bactérias anammox, já que o efluente possui outros grupos de micro-organismos. Por esse motivo, para a etapa B, optou-se por acrescentar o nitrito ao efluente anaeróbio real, de forma que as bactérias anammox o utilizassem para a oxidação da amônia. Tang *et al.* (2010) investigaram a supressão do processo Anammox quando aplicado ao tratamento de efluente com alta concentração de DQO (50 mg.L^{-1} a 700 mg.L^{-1} de DQO). Neste estudo, as bactérias anammox foram suprimidas pelas bactérias desnitrificantes devido à competição pelo acceptor de elétrons. Os autores adicionaram nitrito (40 mg.L^{-1}) ao reator, com o objetivo de favorecer o processo Anammox.

Na etapa B, na qual aplicou-se o efluente anaeróbio acrescido de nitrito, a eficiência de remoção de N-NH_4^+ apresentou valores maiores em relação à etapa A, o valor médio da eficiência de remoção encontrado foi de 98% para os dois ciclos. Porém, com relação à eficiência de remoção do N-NO_2^- apresentada na etapa A (99,8%), os valores médios foram menores, 88% e 83% para os ciclos longo e curto, respectivamente. Esta diferença na eficiência de remoção do N-NO_2^- foi considerada significativa entre as etapas A e B segundo o teste *Mann-Whitney* ($\alpha = 5\%$), onde o p-valor foi igual a 0,00016. Ao final da etapa B, observou-se um aumento no consumo do N-NO_2^- , alcançando valores superiores a 95% para os dois ciclos.

Estudos recentes propuseram que bactérias anammox enriquecidas em reatores alimentados com compostos orgânicos (por exemplo, propionato e acetato) são capazes de competir com as bactérias desnitrificantes heterotróficas, com base no mecanismo de afinidade pelo substrato (KARTAL *et al.*, 2012). Por outro lado, as bactérias anammox possuem taxas de crescimento e síntese celular muito baixas (coeficiente de rendimento de bactérias anammox, $Y=0,066 \pm 0,01$) quando comparado com as bactérias desnitrificantes heterotróficas ($Y=0,27 \pm 0,3$) (STROUS *et al.*, 1998). Portanto, as bactérias desnitrificantes podem crescer a uma taxa mais elevada quando a matéria orgânica coexiste com N-NH_4^+ e N-NO_2^- no efluente a ser tratado.

A produção de nitrato foi monitorada nos dois ciclos ao longo da Fase III. Os valores médios encontrados foram $5,7 \text{ mg.L}^{-1}$ e $2,3 \text{ mg.L}^{-1}$ para os Ciclos Longo e Curto, respectivamente, na

etapa A e $11,2 \text{ mg.L}^{-1}$ e $9,4 \text{ mg.L}^{-1}$ para os Ciclos Longo e Curto, respectivamente, na etapa B. Os valores encontrados nessa Fase foram menores do que os obtidos na Fase I ($32,6 \text{ mg.L}^{-1}$ e $33,5 \text{ mg.L}^{-1}$ para os Ciclos Longo e Curto, respectivamente), tal fato pode ser explicado pela atividade desnitrificante que pode ter aumentado devido a aplicação do efluente anaeróbio do reator UASB na Fase III. A Figura 5.17 apresenta a produção de nitrato obtida durante a Fase III, nas etapas A e B.

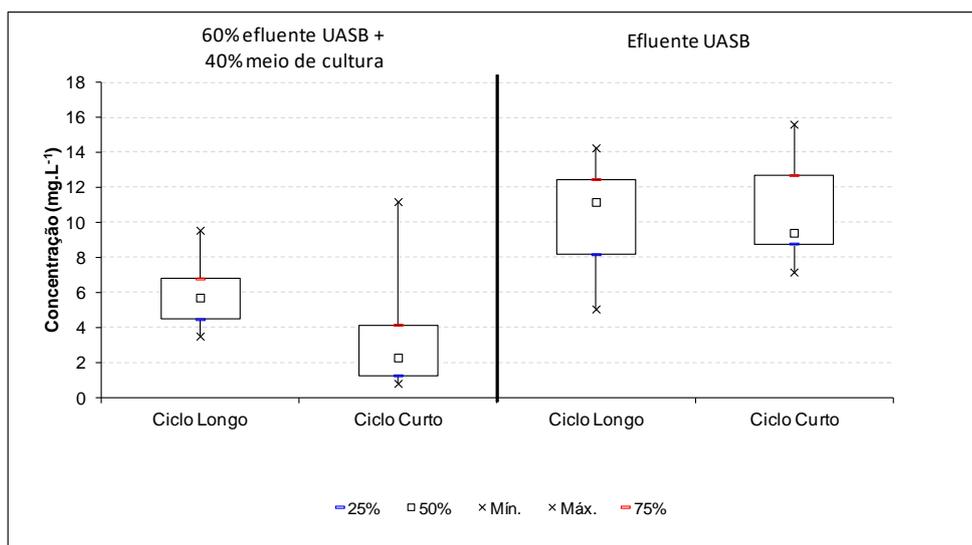


Figura 5.17: Nitrato efluente nas etapas A (alimentação com o efluente de UASB + meio de cultura) e B (alimentação com efluente de UASB) durante os ciclos longo (17 horas) e curto (7 horas)

As relações estequiométricas obtidas para consumo de N-NO_2^- /consumo de N-NH_4^+ e produção de N-NO_3^- /consumo de N-NH_4^+ , durante a Fase III, são apresentadas nas Figuras 5.18 e 5.19. Durante a Fase III, os valores N-NH_4^+ presentes no efluente anaeróbio não foram constantes, o valor médio encontrado ao longo do monitoramento do reator UASB foi de $35 \pm 10 \text{ mg.L}^{-1}$, o que pode explicar as variações estequiométricas ocorridas nesse período, em relação aos valores encontrados na literatura. As médias obtidas para o coeficiente de consumo de N-NO_2^- /consumo de N-NH_4^+ na etapa A foram de 1,1 (Ciclo Longo) e 0,8 (Ciclo Curto), e na etapa B foram de 2,7 (Ciclo Longo) e 2,3 (Ciclo Curto). Os valores médios encontrados para o coeficiente de produção de N-NO_3^- /consumo de N-NH_4^+ na etapa A foram de 0,2 (Ciclo Longo) e 0,17 (Ciclo Curto), e na etapa B foi de 0,2 para os dois ciclos.

Tang et al. (2010) estudaram o efeito da matéria orgânica sobre a remoção de nitrogênio pelo processo anammox. Os autores encontraram coeficientes estequiométricos de 1:2,09:0,27 (consumo de N-NO_2^- /consumo de N-NH_4^+ / produção de N-NO_3^-). Resultados semelhantes foram obtidos por Pereira *et al.* (2014), que aplicaram concentrações crescentes de fenol (até 300 mg.L^{-1}) em um reator anammox. Os autores perceberam 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 nitrogênio nitroso.

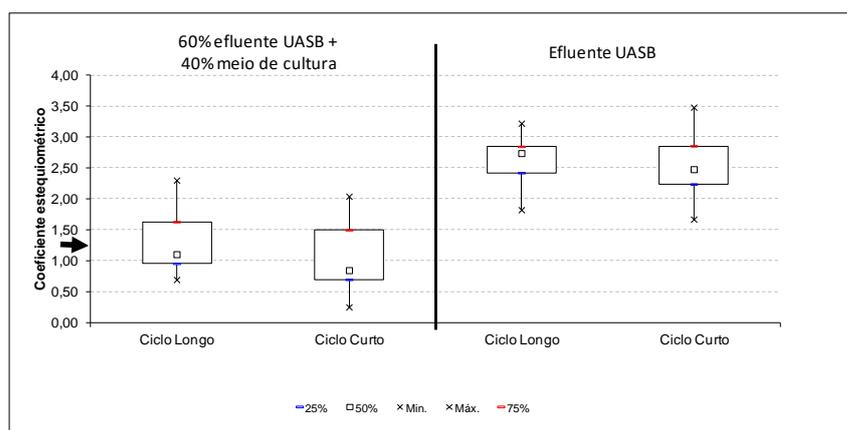


Figura 5.18: Coeficiente estequiométrico de consumo de N-NO_2^- / consumo de N-NH_4^+ nas etapas A (alimentação com o efluente de UASB + meio de cultura) e B (alimentação com efluente de UASB) durante os ciclos longo (17 horas) e curto (7 horas). A seta indica o coeficiente relatado na literatura de 1,32

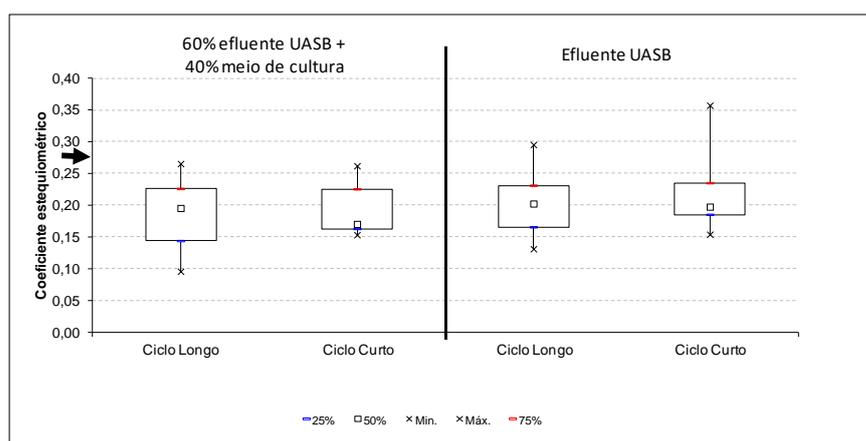


Figura 5.19: Coeficiente estequiométrico de produção de N-NO_3^- / consumo de N-NH_4^+ nas etapas A (alimentação com o efluente de UASB + meio de cultura) e B (alimentação com efluente de UASB) durante os ciclos longo (17 horas) e curto (7 horas). A seta indica o coeficiente relatado na literatura de 0,26

As análises de consumo de DQO foram realizadas ao longo da Fase III e os resultados são apresentados nas Figuras 5.20 e 5.21. Os resultados variaram em função do efluente anaeróbio coletado do reator UASB para aplicação no RBS. O valor médio obtido para a DQO afluente foi de $208,44 \pm 54 \text{ mg.L}^{-1}$. Ao longo da Fase III verificou-se remoção da DQO aplicada (cerca de 85% para a etapa A e 74% para a etapa B) conforme descrito na Tabela 5.9. 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 elevado consumo de nitrito e consequentemente o maior valor encontrado para a razão $\text{N-NO}_2 / \text{N-NH}_4$ (coeficiente estequiométrico de 2,5 apresentado na Figura 5.18).

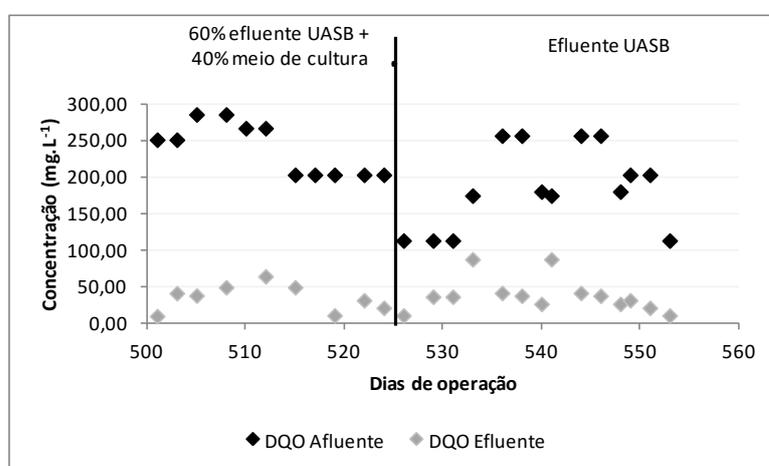


Figura 5.20: Concentrações afluentes e efluentes de DQO nas etapas A (alimentação com o efluente de UASB + meio de cultura) e B (alimentação com efluente de UASB) durante o ciclo longo (17 horas)

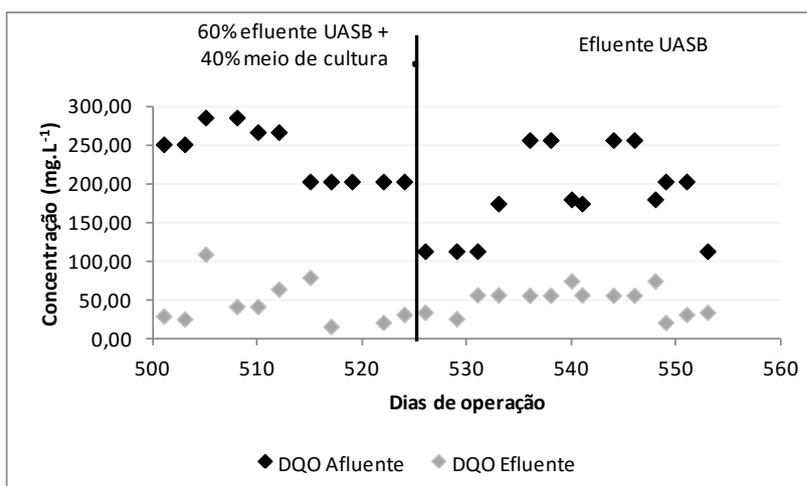


Figura 5.21: Concentrações afluentes e efluentes de DQO nas etapas A (alimentação com o efluente de UASB + meio de cultura) e B (alimentação com efluente de UASB) durante o ciclo curto (7 horas)

Tabela 5.9: Estatística descritiva referente às eficiências de remoção (%) de DQO observados no período da Fase III

Estatística Descritiva Medidas de Tendência Central	Etapa A - remoção (%) DQO		Etapa B - remoção (%) DQO	
	Ciclo Longo	Ciclo Curto	Ciclo Longo	Ciclo Curto
Número de Dados	11	11	14	14
Média Aritmética	88,28	83,12	78,76	71,94
Mediana	86,84	85,53	85,08	73,63
Mínimo	75,92	61,11	50,00	50,00
Máximo	100,00	100,00	90,91	89,79
Desvio Padrão	8,67	12,19	14,05	10,91
Percentil 10%	76,04	61,84	55,45	58,62
Percentil 25%	83,32	80,28	72,13	67,65
Percentil 75%	95,57	89,89	85,51	78,23
Percentil 90%	100,00	92,34	90,57	82,75

Veys *et al.* (2010) aplicaram uma extensão do modelo de lodos ativados para o estudo do processo Anammox. Esse estudo foi realizado a 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 conseguida pela cooperação entre as bactérias oxidadoras de amônio, bactérias anammox e bactérias heterotróficas, e os valores de DQO devem ser baixos.

Com base nos resultados apresentados neste capítulo, pode-se concluir que a instabilidade observada na etapa A já era esperada, pois as condições do afluente aplicado eram diferentes dos afluentes sintéticos aplicados nas Fases I e II. O efluente do reator UASB, além de conter matéria orgânica, baixa concentração de $N-NH_4^+$, e micro-organismos, poderia ainda apresentar compostos inibidores do processo Anammox, como fosfatos, sulfetos, entre outros. Segundo Souza *et al.* (2012), as concentrações de sulfeto dissolvido no efluente de reator UASB varia de 4 a 17 $mg.L^{-1}$, porém, concentrações a partir de 32 $mg.L^{-1}$ é que podem causar inativação irreversível do processo anammox (JIN *et al.*, 2013).

A etapa B apresentou excelentes resultados quanto à remoção de amônia e também de DQO. A diminuição do remoção de $N-NO_2^-$ pode ser explicada pelo fato do mesmo ter sido adicionado em excesso ao efluente a ser tratado. Porém, ao final da etapa B, o nitrito voltou a ser quase totalmente consumido, conforme se observa nos gráficos apresentados.

Nesse sentido, os resultados obtidos na Fase III sugerem que é possível aplicar o processo Anammox como pós-tratamento de efluentes anaeróbios e que ainda contenham matéria orgânica, na forma de DQO para a remoção de nitrogênio amoniacal. O diferencial deste estudo foi aplicar o processo Anammox para o tratamento de um efluente anaeróbio com a relação DQO/N entre 4 e 5, a maioria dos trabalhos citados nessa dissertação aplicaram relações DQO/N inferiores a 3, exceto Ni *et al.* (2012) que chegaram a aplicar a relação DQO/N de 4 (400 mg.L⁻¹ DQO), porém, nesse estudo os autores obtiveram inibição do processo Anammox a partir da relação DQO/N de 3.

Outro ponto importante foi a aplicação de um efluente anaeróbio real, sem filtrar ou diluir (JENNI *et al.*, 2014), em um lodo que apresentava atividade anammox, e não com a biomassa anammox pura, o que conferiu uma vantagem para esse estudo, pois as bactérias anammox conseguiram coexistir com as bactérias desnitrificantes heterotróficas, conforme já relatado na literatura (MOLINUEVO *et al.*, 2009; OSHIKI *et al.*, 2011; KARTAL *et al.*, 2012) e o reator removeu simultaneamente nitrogênio e DQO.

5.2.3 Comparação dos resultados obtidos nas Fases I, II e III

O período de operação total do RBS foi de 558 dias, compreendeu três fases distintas, conforme já descrito na Metodologia (item 4) do presente estudo, onde a composição do afluente, as cargas de nitrogênio aplicadas e DQO variaram. A Tabela 5.10 apresenta um resumo dos aspectos operacionais e resultados obtidos nas Fases I, II e III. As Figuras 5.22 e 5.23 apresenta a dinâmica dos compostos nitrogenados e as eficiências de remoção obtidas ao longo das três Fases.

Tabela 5.10: Resumo dos parâmetros operacionais e resultados obtidos nas Fases I, II e III (valores médios)

	Fase I	Fase II	Fase III
Afluente	Efluente sintético	Efluente sintético + glicose	Efluente anaeróbio de reator UASB
pH	7,3 ± 0,75	6,83 ± 0,25	6,9 ± 0,4
Sólidos Totais Voláteis (g.L⁻¹)	12,39	-	12,24
Dias de operação	350	131	57
Carga de Nitrogênio Aplicada (gN.m³.d⁻¹)	226,87	100,45	123,37
Carga de Nitrogênio Removida (gN.m³.d⁻¹)	200,97	85,50	103,30
Eficiência remoção N-NO₂⁻	97%	99,7%	88,5 a 99,8%
Eficiência remoção N-NH₄⁺	95%	28,06 a 96,51%	50,16 a 98,67%
Carga DQO Aplicada (gDQO.m³.d⁻¹)	-	48,75 a 243,75	104,22
Carga DQO Removida (gDQO.m³.d⁻¹)	-	33,25 a 130,51	86,26
Concentração NO₃⁻ (mg.L⁻¹)	33,05	16,80	6,7 a 10,11
Estequiometria (consumo de N-NO₂⁻/consumo de N-NH₄⁺/ produção de N-NO₃⁻)	1:1,42:0,32	1: (1,3 a 4,1): (0,18:0,4)	1: (1,1 a 2,5): (0,1 a 0,2)

Na Fase I, os parâmetros operacionais estavam adequados para o processo Anammox, favorecendo o estabelecimento e adaptação dos dois inóculos utilizados para compor a biomassa do reator. Essa etapa foi utilizada como uma "fase controle", para a comparação dos resultados das etapas subsequentes. Os resultados do monitoramento apontaram para uma boa eficiência de remoção de N-NO₂⁻ (97%) e N-NH₄⁺ (95%). A partir dos resultados obtidos nesta etapa, as Fases II e III foram executadas.

A Fase II pode ser considerada a mais crítica de toda a pesquisa, pois observou-se grande redução na atividade anammox, em relação à Fase I. Concentrações crescentes de DQO foram aplicadas, utilizando a glicose como fonte de carbono, em diferentes proporções DQO/N. Nessa etapa, o reator apresentou grandes variações nas eficiências de remoção de N-NH₄⁺, sendo os menores valores encontrados nas relações DQO/N de 2,8 (66,64% de remoção) e 3,5 (28,06% remoção), onde as concentrações da DQO aplicada foram de 390 mg.L⁻¹ e 487,5

mg.L⁻¹, respectivamente. Porém, o N-NO₂⁻ continuou sendo consumido, o que sugere que bactérias heterotróficas poderiam estar competindo com as bactérias anammox pelo aceptor de elétrons (nitrito). Após a etapa da relação DQO/N de 3,5, o reator passou por um período de recuperação, sem receber matéria orgânica. Alteração no aspecto da biomassa também foi observada nesse período, pois a mesma passou da cor marrom alaranjada para uma cor negra, também foi observado que o efluente do reator apresentou aspecto turvo e escuro.

O início da Fase III apresentou grande instabilidade no que se refere à remoção de amônia, pois o nitrito era praticamente todo consumido pelas bactérias heterotróficas presentes no reator e no efluente anaeróbio utilizado para a alimentação do reator nessa fase. Quando o RBS passou a ser alimentado somente com o efluente anaeróbio acrescido de nitrito, a remoção de amônia aumentou, atingindo valores máximos de 99%. Nas Fases II e III também foi observado remoção de parte da DQO aplicada.

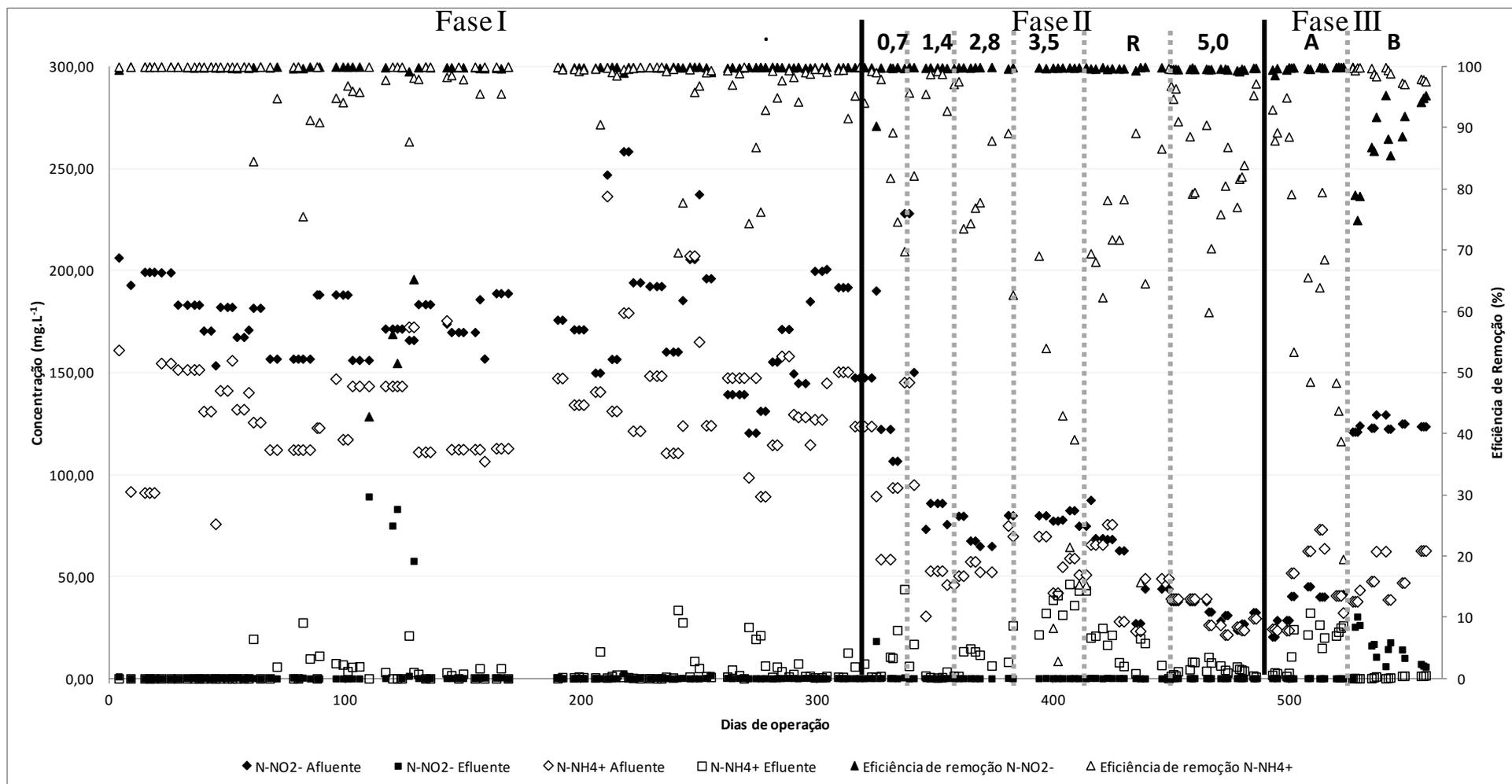


Figura 5.22: Dinâmica dos compostos nitrogenados e eficiências de remoção de N-NO₂⁻ e N-NH₄⁺ referentes ao ciclo longo (17 horas)

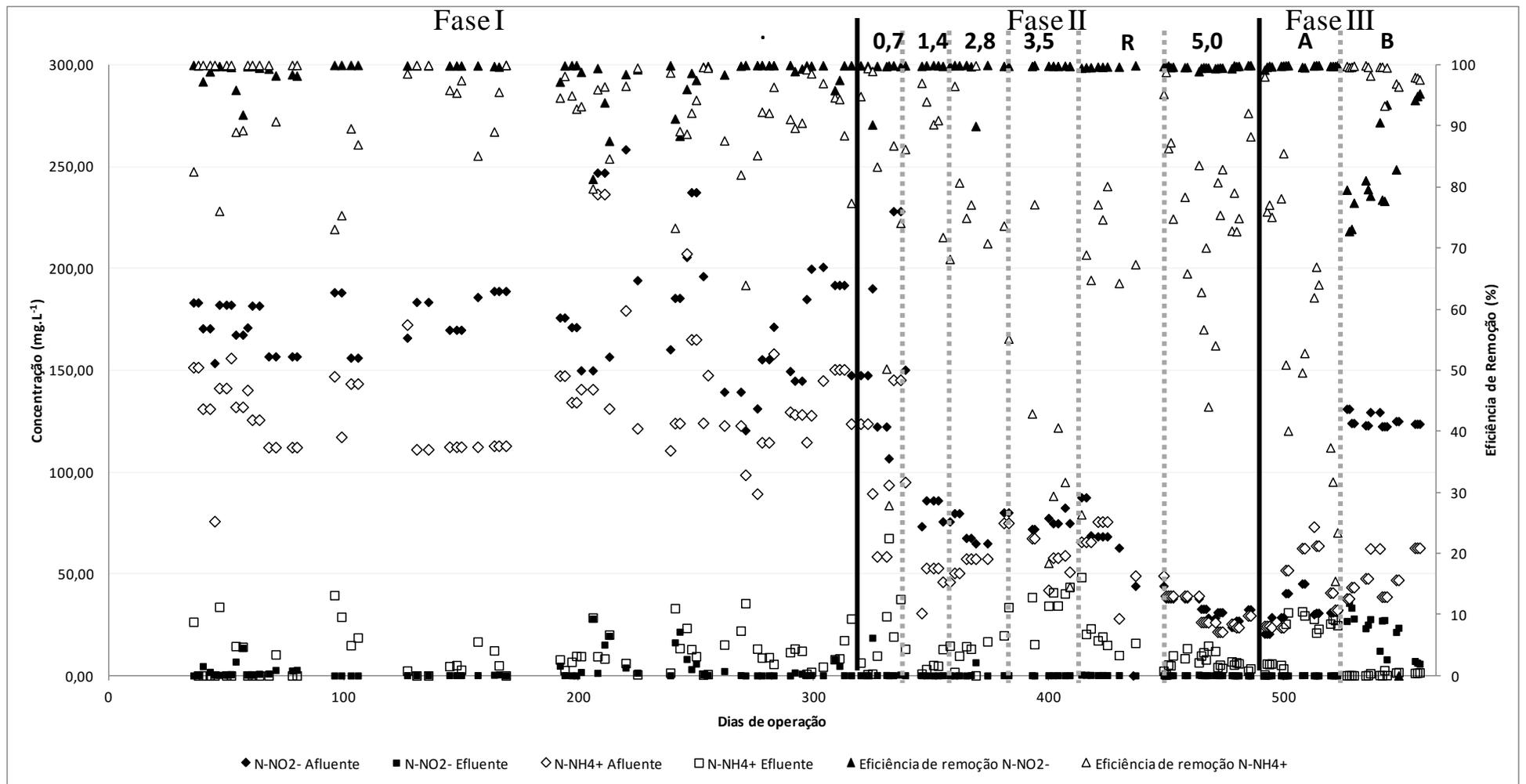


Figura 5.23: Dinâmica dos compostos nitrogenados e eficiências de remoção de N-NO₂⁻ e N-NH₄⁺ referentes ao ciclo curto (7 horas)

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

A Figura 5.24 apresenta os perfis de DGGE da comunidade microbiana obtidos para as amostras coletadas nas Fases I, II, Recuperação e III. As bandas mais representativas foram identificadas e excisadas, e o DNA foi sequenciado para a identificação dos microorganismos, conforme a Tabela 5.11.

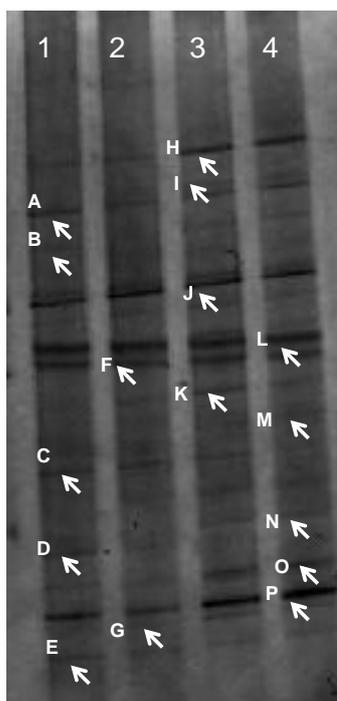


Figura 5.24: Perfil do gel de DGGE contendo fragmentos de DNAr 16S amplificados com *primers* universais para bactérias em geral (1055F/1392R-GC). As canaletas referem-se às amostras (1) Fase I (cultivo e aumento biomassa anammox); (2) Fase II (diferentes relações DQO/N com glicose); (3) Fase de Recuperação e (4) Fase III (elfuente anaeróbio). As letras de A a P são as identificações das bandas recortadas

A análise de DGGE revelou a estrutura da comunidade bacteriana no RBS nas três fases distintas da pesquisa. Após o sequenciamento das bandas do DGGE, 16 seqüências foram empregadas nas análises (Tabela 5.11). Apesar do grande número de bandas no gel, muitas seqüências não puderam ser utilizadas porque a qualidade do sequenciamento não ficou boa. A maioria das bandas presentes na mesma altura apresentou a mesma classificação e identificação taxonômica, optou-se por apresentar na Tabela 5.11 as bandas que apresentaram melhor qualidade no sequenciamento e similaridade. Algumas bandas com a mesma classificação foram observadas em alturas distintas do gel (bandas B e J, E e G, F e M).

Tabela 5.11: Identificação das bandas de DGGE a partir do *RDP Classifier* e *Blastn*

Banda	<i>RDP Classifier</i>	<i>Blastn</i>	Similaridade ¹ (%)	Nº de Acesso
A	<i>Ca. Brocadiaceae</i>	<i>Ca. Brocadia caroliniensis</i>	98	KF810110.1
B	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Denitratisoma oestradiolicum</i>	97	KF810114.1
C	<i>Myxococcales</i>	<i>Myxococcales</i>	92	FJ552616.1
D	<i>Chloroflexi</i>	<i>Anaerolineaceae</i>	97	HE648186.1
E	<i>Rhodospirillales</i>	<i>Acetobacteraceae</i>	91	EU193085.1
F	<i>Chloroflexi</i>	<i>Caldilinea sp</i>	84	HQ043268.1
G	<i>Acetobacteraceae</i>	<i>Acetobacteraceae</i>	93	EU921207.1
H	<i>Ca. Brocadia sp.</i>	<i>Ca. Brocadia sinica</i>	99	AB565477.1
I	<i>Chlorobi</i>	<i>Chlorobi</i>	88	KJ941776.1
J	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Denitratisoma oestradiolicum</i>	98	KF810114.1
K	<i>Actinomycetales</i>	<i>Propioniferax sp</i>	90	KP419698.1
L	<i>Anaerolineaceae</i>	<i>Chloroflexi</i>	97	JF703582.1
M	<i>Caldilinea sp</i>	<i>Chloroflexi</i>	94	AY921707.1
N	<i>Planctomycetes</i>	<i>Planctomycetales</i>	80	FJ517124.1
O	<i>Thermoflexus sp.</i>	<i>Chloroflexi</i>	95	AY921707.1
P	<i>Chloroflexi</i>	<i>Chloroflexi</i>	96	AY921913.1

¹ As porcentagens representam similaridade entre as sequências das bandas do DGGE com as sequências mais próximas no *GenBank*. **As bandas destacadas em negrito correspondem às sequências relacionadas às bactérias anammox, desnitrificantes e do Filo *Chloroflexi*.**

A identificação das bandas 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 5.12 apresenta, resumidamente, os micro-organismos identificados a partir no sequenciamento das bandas do gel de DGGE.

Tabela 5.12: Micro-organismos identificados a partir do gel de DGGE

Bandas	Micro-organismo		Fase em que foi encontrado	Metabolismo Principal	Características
	Filo	Identificação			
A	<i>Planctomycetes</i>	<i>Ca. Brocadia caroliniensis</i>	I, II, R* e III	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).
B e J	<i>Proteobacteria</i>	<i>Denitratisoma oestradiolicum</i>	B - I, R*e III; J - I, II, R*e III	Desnitrificação	Presente em sistemas de lodos ativados. Utiliza o 17beta-estradiol (E2) como fonte de carbono, oxidando-o a CO ₂ e H ₂ O e o NO ₃ ⁻ como acceptor de elétrons (FAHRBACH <i>et al.</i> , 2006).
C	<i>Proteobacteria</i>	<i>Myxococcales</i>	I, II, R*	Organotróficos	São encontradas em ambientes com muita matéria orgânica, podem realizar a redução dissimilatória do Fe(III), são anaeróbios facultativos (GARRITY, 2005).
D e L	<i>Chloroflexi</i>	<i>Anaerolineaceae</i>	D - I; L - I, II, R* 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).
E e G	<i>Proteobacteria</i>	<i>Acetobacteraceae</i>	I, II, R* e III	Oxidação ácido acético	Realizam uma oxidação incompleta de álcoois produzindo uma acumulação de ácidos orgânicos como produtos finais. São aeróbios e resistentes a pH ácido (MADIGAN <i>et al.</i> , 2010).
F e M	<i>Chloroflexi</i>	<i>Caldilinea sp</i>	F - I, II, R*e III; M - Fase III	Organotróficos	Anaeróbias facultativas, utilizam substratos orgânicos para a obtenção de energia. Presentes em sistemas de lodos ativados e exercem papel importante na estrutura dos flocos comumente formados nesses sistemas (KRAGELUND <i>et al.</i> , 2011).
H	<i>Planctomycetes</i>	<i>Ca. Brocadia sinica</i>	I, II, R*e III;	Oxidação Anaeróbia da Amônia	Espécie de bactéria anammox enriquecida em biorreatores de membrana (OSHIKI <i>et al.</i> , 2011)
I	<i>Chlorobi</i>	<i>Chlorobi</i>	R* e III	Fotoautotrófico	Anaeróbias, encontradas em ambientes aquáticos, sedimentos e ambientes ricos em sulfeto (MADIGAN <i>et al.</i> , 2010).
K	<i>Actinobacteria</i>	<i>Propioniferax sp</i>	II, R* e III;	Organotróficos	Bactérias anaeróbias envolvidas na degradação do fenol. Produzem ácido propiônico e acético (MADIGAN <i>et al.</i> , 2010).
N	<i>Planctomycetes</i>	<i>Planctomycetales</i>	R*e III;	Diversos	As informações sobre este filo estão presentes na revisão de literatura, item 3.3.
O	<i>Chloroflexi</i>	<i>Thermoflexus sp.</i>	I, II, R* e III;	Organotróficos	Heterotróficos, compreende o grupo das bactérias verdes não sulfurosas e filamentosas. Esse gênero ainda foi encontrado em amostras ambientais e águas termais (MADIGAN <i>et al.</i> , 2010).
P	<i>Chloroflexi</i>	<i>Chloroflexi</i>	I, II, R*e III;	Organotróficos	

*R: Refere-se à Fase de Recuperação, onde não foi adicionado matéria orgânica no RBS

As bactérias pertencentes ao Filo dos *Planctomycetes* estiveram presentes em todas as etapas da pesquisa, o que foi confirmado pela técnica da PCR, descrito anteriormente. As bandas A e H foram aproximadamente relacionadas com as bactérias do gênero *Brocadia*, e as espécies encontradas, conforme a identificação do *Gen Bank (Blastn)* foram *Ca. Brocadia caroliniensis* e *Ca. Brocadia sinica*, estas espécies foram descritas recentemente por Vanotti *et al.* (2011) e Hu *et al.* (2010), respectivamente. Essas espécies são comumente encontradas em sistemas para tratamento de águas residuárias. *Ca. Brocadia sinica* tem sido relatada em reatores anammox na China, Japão e Alemanha, o que mostra a ampla distribuição dessas bactérias no mundo (OSHIKI *et al.* 2011). 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*.

Oshiki *et al.* (2011) compararam as características fisiológicas da espécie *Ca. Brocadia sinica* com as espécies *Ca. Brocadia anammoxidans* e *Ca. Kuenenia stuttgartiensis* e foi observado que a espécie *Ca. Brocadia sinica* apresenta uma taxa de crescimento maior, contrastando com uma menor afinidade pelo substrato em relação às outras duas espécies observadas. Nesse estudo, foram testadas diversas condições, como temperatura, oxigênio dissolvido, pH, salinidade e a inibição por compostos orgânicos (acetato, propionato, glicose e metanol). Os autores observaram que em reatores onde há condições adversas e alta carga de amônia e nitrito, a espécie *Ca. Brocadia sinica* é dominante em relação às outras bactérias anammox.

O Filo *Chloroflexi* compreende as bactérias verdes não sulfurosas. São organismos estritamente anaeróbios e fototróficos, filamentosos que podem ser encontrados em ambientes aquáticos que contenham enxofre elementar como águas termais e sedimentos de lagos e rios (VAL-MORAES, 2008). Também são encontrados em estações de tratamento de esgotos, sendo muito comuns em sistemas de lodos ativados (KRAGELUND *et al.*, 2011). 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 desse filo são comumente encontradas em reatores anammox. Segundo os autores, esta coexistência parece estar relacionada à compatibilidade destes dois grupos de micro-organismos, com ambientes ricos em amônio e nitrito, oligotróficos e anaeróbios.

Egli *et al.* (2003) estudando a composição de um biofilme formado em reatores com biodiscos tratando lixiviado de aterro de resíduos industriais na Suíça, verificou a presença de bactérias filamentosas, além de bactérias anammox e nitrificantes no biofilme formado. Foi visto que as bactérias filamentosas presentes, exerciam um papel estrutural importante para a formação do biofilme. Martins (2010) também relatou a presença de bactérias da espécie *Anaerolinea thermophila* e *Caldilinea aerophila* em RBS sob condições anóxicas. O autor ressaltou que, por serem micro-organismos heterotróficos, sobrevivência dos mesmos no reator só foi possível devido à presença de ácidos orgânicos de cadeia curta oriundos da decomposição da biomassa endógena.

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). O grande número de micro-organismos incluídos nesse filo, aliado a enorme diversidade e versatilidade metabólica de seus constituintes pode explicar a grande abundância relativa do mesmo no RBS.

Dentro os micro-organismos encontrados no RBS pertencentes ao Filo *Proteobacteria*, destaca-se a bactéria *Denitratisoma oestradiolicum*, uma bactéria desnitrificante, presente em sistemas de lodos ativados e 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 CO₂ e H₂O e o NO₃⁻ é reduzido a N₂O e N₂ (FAHRBACH *et al.*, 2006). Esse micro-organismo foi encontrado em todas as etapas dessa pesquisa, o que pode ser explicado pelo fato de um dos inóculos utilizados para compor a biomassa do reator ser proveniente de lodos ativados (PEREIRA *et al.*, 2014).

O Filo *Actinobacteria* constitui um dos maiores filos dentro do domínio Bactéria e é composto por micro-organismos com enorme diversidade em termos de morfologia, fisiologia capacidades, e metabólicas. Esses micro-organismos também possuem alto teor de guanina e citosina (GAO & GUPTA, 2012). O gênero *Propioniferax* identificado no reator é encontrado em diferentes habitats como o solo, lagoas e plantas de tratamento de esgotos. São micro-

organismos anaeróbios facultativos e participam da degradação do fenol. Produzem ácido propiônico e acético (MADIGAN *et al.*, 2010; GAO & GUPTA, 2012). Pereira *et al.* (2014) aplicou concentrações crescentes de fenol em um reator anammox operado em bateladas sequenciais. A biomassa presente nesse reator foi utilizada como o inóculo I na presente pesquisa, após passar por um período de recuperação, o que pode justificar a detecção desse gênero no RBS.

A Figura 5.25 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.

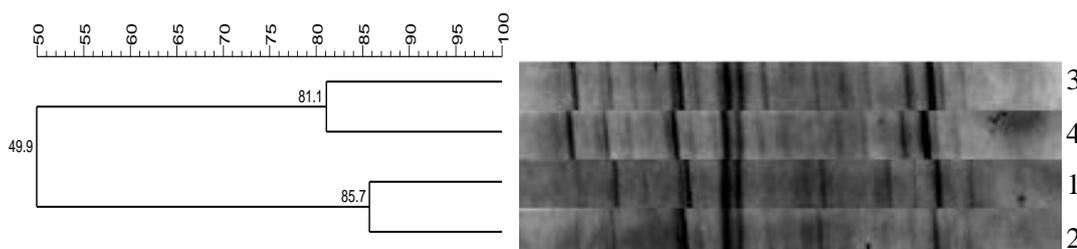


Figura 5.25: Dendrograma baseado no perfil das bandas do gel de DGGE. Os valores nos pontos de ramificação do dendrograma referem-se à similaridade. Legenda das amostras: (1) Fase I; (2) Fase II; (3) Fase de Recuperação e (4) Fase III

O perfil obtido pelo gel de DGGE apresentou dois agrupamentos distintos (que apresentaram somente 49,9% de similaridade) foram observados. O primeiro agrupamento apresentou 85,7% de similaridade e inclui as amostras 1 e 2, que correspondem respectivamente à biomassa coletada ao final da Fase I (349 dias de operação), onde os inóculos utilizados já estavam bem estabelecidos, e a amostra coletada após a Fase II (482 dias de operação), onde a biomassa foi submetida a diferentes relações DQO/N (glicose como fonte de carbono) utilizando a glicose como fonte de carbono orgânico. A similaridade observada no segundo agrupamento foi de 81,1% e corresponde às amostras de biomassa coletada após um período de recuperação (amostra 3, 500 dias de operação), onde não houve aplicação de compostos orgânicos e anterior ao teste com efluente de UASB e a amostra 4 (558 dias de operação) que

foi coletada ao final da Fase III, após a alimentação com o efluente anaeróbio. Percebe-se que as amostras coletadas em períodos mais próximos (1 e 2; 3 e 4) apresentaram maior similaridade entre si, o que é confirmado pelo Índice de Shannon, que analisa a diversidade entre comunidades microbianas, onde as amostras 1 e 2 apresentaram respectivamente os índices de 2,49 e 2,50, e as amostras 3 e 4 que apresentaram valores iguais a 2,66 e 2,82, respectivamente. A partir dos resultados apresentados, observou-se que a adição de glicose ou do efluente anaeróbio no RBS, não alterou de forma significativa a diversidade da comunidade bacteriana presente no reator.

5.4 Quantificação de bactérias totais, bactérias anammox e desnitrificantes por PCR em tempo real

A Figura 5.26 apresenta os resultados das quantificações por PCR em tempo real do nº de cópias dos genes de bactérias totais (RNAr 16S), bactérias anammox e bactérias desnitrificantes por grama de lodo. Cabe ressaltar que, no caso de desnitrificantes, foram quantificados cópias do gene *nosZ*, envolvido na redução do N₂O a N₂, portanto, somente as bactérias que realizam a desnitrificação completa foram quantificadas.

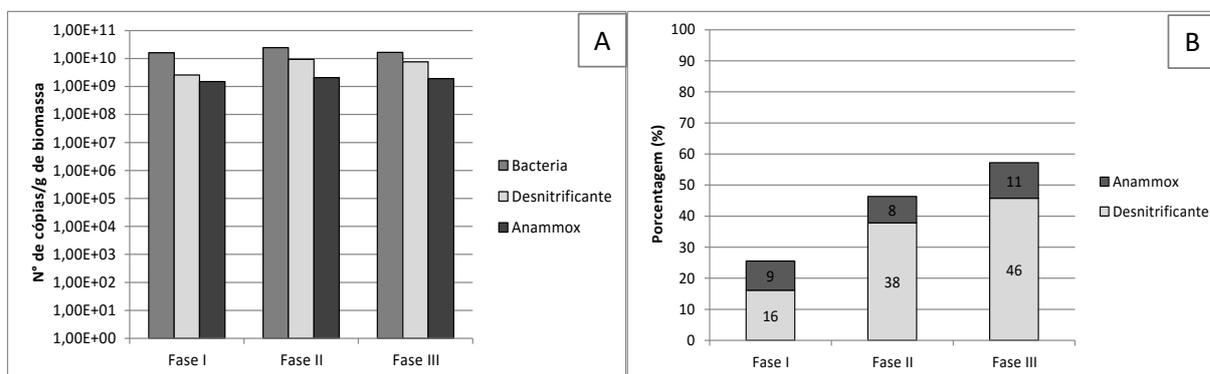


Figura 5.26: (A) Estimativa do número de cópias do gene RNAr 16S de bactérias anammox e desnitrificantes em relação ao número de cópias do gene RNAr 16S de bactérias totais nas Fases I, II e III; (B) Abundância relativa, em porcentagem, de bactérias anammox e desnitrificantes em relação às bactérias totais

Os resultados obtidos pela PCR em tempo real demonstraram que as concentrações na Fase I do gene RNAr 16s de bactérias anammox foram iguais a $1,05 \times 10^9$ cópias/g de lodo, bactérias desnitrificantes foram $2,57 \times 10^9$ cópias/g de lodo e bactérias totais foram $1,59 \times 10^{10}$. Na Fase II, quando o RBS foi submetido a diferentes relações DQO/N com a aplicação da glicose, as concentrações do gene RNAr 16s de bactérias anammox foram iguais a $2,08 \times$

10^9 cópias/g de lodo, bactérias desnitrificantes foram $9,28 \times 10^9$ cópias/g de lodo e bactérias totais foram $2,45 \times 10^{10}$. Na Fase III, o reator estava sendo alimentado com o efluente anaeróbio e o RBS apresentou as concentrações de $1,90 \times 10^9$ cópias/g de lodo para as bactérias anammox, $7,57 \times 10^9$ cópias/g de lodo para as bactérias desnitrificantes e $1,65 \times 10^9$ cópias/g de lodo para o valor total de bactérias.

Van der Star *et al.* (2007) utilizaram a técnica de PCR em tempo real para monitorar o crescimento de bactérias anammox em um reator escala plena instalado em Rotterdam, na Holanda. A eficiência de remoção de nitrogênio pode estar associada com o crescimento exponencial da biomassa. A técnica de PCR quantitativo provou ser um método adequado para o monitoramento das bactérias anammox, indicando o tempo de duplicação das bactérias anammox de 10 a 12 dias. Ni *et al.* (2010) cultivando bactérias anammox em um reator em escala de bancada do tipo UASB encontrou concentrações máximas de RNAr 16S de bactérias anammox igual a $4,6 \times 10^8$ cópias/mL de lodo, resultado inferior ao obtido no presente estudo ($3,8 \times 10^9$ cópias/g de lodo). Essa concentração foi encontrada quando o reator apresentava melhor desempenho, aos 300 dias de operação, em que o mesmo era alimentado com concentrações de amônia e nitrito de aproximadamente 200 mg.L^{-1} e era capaz de remover 94% do nitrogênio total afluente.

A Fase I apresentou percentual de população de bactérias anammox (9%) e bactérias desnitrificantes (16%). Nesta fase, o reator era alimentado com meio mineral e autotrófico e apresentava boa remoção de N-NO_2^- (97%) e N-NH_4^+ (95%). A partir dos resultados apresentados, percebe-se que houve uma pequena redução na população de bactérias anammox na Fase II. Vale ressaltar que nessa fase o reator apresentou também redução significativa na remoção de N-NH_4^+ (28,06%) quando a DQO afluente era de $487,50 \text{ mg.L}^{-1}$ e a relação DQO/N de 3,5. Nesse período a biomassa ficou com cor negra e o nitrito era praticamente todo consumido, tal fato pode ser explicado pela redução de bactérias anammox e aumento das bactérias desnitrificantes devido à presença de uma fonte orgânica de carbono. Entretanto, a alta concentração de DQO não foi capaz de eliminar totalmente as bactérias anammox do meio e após a etapa de recuperação, a atividade anammox foi reestabelecida. Na Fase III percebe-se que a concentração da população de bactérias totais diminuiu em relação à Fase II. Tal fato pode ser explicado pelo período crítico em que o reator passou quando a

relação DQO/N foi de 3,5. Na Fase III, a eficiência de remoção de N-NH_4^+ variou de 50% a 98%, sendo a menor eficiência observada no início desta fase.

A remoção de DQO concomitante com o consumo de amônia e nitrito foi observada no reator durante as Fases II e III, o que pode ser explicado pela presença de bactérias desnitrificantes, comprovada pelas técnicas de PCR-DGGE e PCR em tempo real. A presença de bactérias desnitrificantes heterotróficas no RBS ao longo de todo o tempo de operação sugere a ocorrência de desnitrificação heterotrófica após a alimentação do reator com afluente contendo compostos orgânicos, pois a glicose e a matéria orgânica presente no efluente anaeróbio poderiam servir como fonte de carbono para o metabolismo desses micro-organismos.

Kartal *et al.* (2012) destacaram que independente das condições ambientais existentes para as bactérias anammox, as mesmas adquirem os substratos (nitrito e amônia) em cooperação e competição com outros micro-organismos presentes no Ciclo do Nitrogênio, como as bactérias nitrificantes e desnitrificantes. O diferencial é a afinidade pelo substrato que cada espécie de bactérias anammox possui. Além disso, as bactérias anammox apresentam uma vantagem competitiva através da utilização (suplementar) de outros compostos orgânicos (acetato, propionato e formiato) e inorgânicos (Fe_2^+ e MnO_2) como doadores de elétrons para auxiliar no seu metabolismo. Pode-se inferir que as bactérias anammox são K-estrategistas, enquanto as bactérias desnitrificantes heterotróficas são R-estrategistas. Micro-organismos K-estrategistas apresentam crescimento mais lento, porém têm maior afinidade pelo substrato, ao contrário dos micro-organismos R-estrategistas, que apresentam taxas de crescimento maiores, entretanto, com menor afinidade pelo substrato. Portanto, a cooperação e a competição entre os micro-organismos são importantes no que se refere às novas tecnologias aplicadas ao tratamento de águas residuárias.

6 CONCLUSÕES

Os testes com diferentes relações DQO/N (com a glicose) mostraram que valores de DQO superiores a 300 mg.L^{-1} inibiram o processo, corroborando com dados da literatura. Não obstante, mostrou-se neste trabalho que relações altas de DQO/N (de 5,0, mas DQO até 300 mg/L) não inibiram o processo anammox e permitiram a coexistência de atividade anammox e atividade desnitrificante no reator.

Na Fase III avaliou-se o efeito da matéria orgânica e dos micro-organismos de um efluente anaeróbio sobre o processo Anammox. A instabilidade observada na etapa A era esperada, pois as condições do afluente aplicado eram diferentes dos meios sintéticos aplicados nas Fases I e II. O efluente do reator UASB tratando esgoto doméstico, além de conter matéria orgânica, baixa concentração de N-NH_4^+ , e micro-organismos, poderia ainda apresentar compostos inibidores do processo Anammox, como fosfatos, sulfetos, entre outros. Não obstante, quando o reator foi alimentado com o efluente anaeróbio real, verificaram-se excelentes resultados quanto à remoção de amônia, de DQO, e de nitrito. Portanto, indicando que é possível aplicar o processo Anammox na remoção de nitrogênio amoniacal de águas residuárias domésticas previamente tratadas por processos anaeróbios.

Os resultados obtidos pelas técnicas de biologia molecular confirmaram a presença das bactérias anammox no RBS, corroborando assim, com os resultados físico-químicos, que evidenciaram fortemente que a remoção de nitrogênio amoniacal no reator foi predominantemente pela via da oxidação anaeróbia da amônia, mas parte da remoção de nitrito também ocorreu pela desnitrificação heterotrófica. Bactérias anammox foram detectadas em todas as amostras de biomassa coletadas do RBS nos diferentes tempos de operação. A análise do perfil da comunidade microbiana ao longo do tempo demonstrou que as bactérias anammox persistiram durante todo o experimento e que bactérias desnitrificantes estiveram presentes e coexistiram com as anammox. Os resultados da PCR em tempo real revelaram que houve redução na proporção de bactérias anammox com o aumento da DQO ($> 400 \text{ mg.L}^{-1}$), mas depois a população voltou a aumentar durante a aplicação do efluente anaeróbio. Portanto, conclui-se que o processo anammox tem potencial para ser utilizado no pós-tratamento de efluentes anaeróbios que contenham baixa concentração de nitrogênio amoniacal e DQO, como é o caso de efluentes provenientes de reatores UASB.

7 RECOMENDAÇÕES

A partir dos resultados obtidos e com base nas dificuldades e limitações identificadas no presente trabalho, recomenda-se:

- Promover a nitrificação parcial de amônia no reator através de aeração, para obter nitrito disponível para as bactérias anammox por meio de uma oxidação parcial da amônia, com o objetivo de favorecer a aplicação em maior escala, descartando-se a necessidade de adicionar o nitrito.
- Caracterizar toda a comunidade microbiana presente no reator, utilizando técnicas mais avançadas de sequenciamento, como o Pirosequenciamento ou o Sequenciamento de Nova Geração.

REFERÊNCIAS

- ABMA, W. R.; SCHULTZ, C. E.; MULDER, J. W.; VAN DER STAR, W. R. L.; STROUS, M.; TOKUTOMI, T.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Full-scale granular sludge Anammox process. *Water Sci Technol* v. 55, p. 27–33, 2007.
- ABMA, W. R.; DRIESSEN, W.; HAARHUIS, R.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Upgrading of sewage treatment plant by sustainable and costeffective separate treatment of industrial wastewater. *Water Sci Technol* v. 61, p. 1715–1722, 2010.
- AHN, Y. O. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: a review. *Process Biochemistry*, 41:1709-1721, 2006.
- ALI, M.; OKABE, S. Anammox-based technologies for nitrogen removal: Advances in process start-up and remaining issues. *Chemosphere*, v. 141, p. 144–153, 2015a.
- 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, 2015b.
- ALMEIDA, P. G. S.; OLIVEIRA, S. C.; CHERNICHARO, C. A. L. Operação de filtros biológicos percoladores pós- reatores UASB sem a etapa de decantação secundária. *Engenharia Sanitária e ambiental-ABES*, v. 16, no.2, p.281-290, 2011.
- ALMEIDA, P. G. S. *Remoção de matéria orgânica e nitrogênio em filtros biológicos percoladores aplicados ao pós tratamento de efluentes de reatores UASB*. 2012. 221 f. Tese. (Doutorado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos - Escola de Engenharia), Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, 2012.
- 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.
- APHA; AWWA; WEF. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 20. ed.. Washington: APHA, 2012.
- ARAÚJO, J. C.; CAMPOS, A. C.; CORREA, M. M.; SILVA, E. C.; MATTÉ, M. H.; MATTÉ, G. R.; 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.
- ARRIGO, K. R. Marine microorganisms and global nutrient cycles. *Nature* vol. 437, p. 349–355, 2005.
- 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.
- BAIRD, C. *Química ambiental*. Porto Alegre. Bookman, 2002.

- BASTOS, R. K. X (coordenador) *Utilização de esgotos tratados em irrigação, hidroponia e piscicultura*. Rio de Janeiro: FINEP/PROSAB, 2003, 267 p.
- BETTAZZI, E.; CAFFAZ, S.; VANNINI, C.; LUBELLO, C. Nitrite inhibition and intermediates effects on Anammox bacteria: a batch-scale experimental study. *Process Biochem.* v. 45, p. 573–580, 2010.
- 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.
- BOTHE, H.; FERGUNSON, S. J.; NEWTON, W. E. *Biology of the Nitrogen Cycle*. 1 ed. Elsevier, 2007. 453p.
- BRANDSMA, J.; VAN DE VOSSENBERG, 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.
- 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 e nº 397, de 03 de abril de 2008 do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. Resolução CONAMA nº 430 de 13 de maio de 2011.
- BRODA, E. Two kinds of lithotrophs missing in nature. *Z. Allg. Mikrobiol.* 17: 491-493, 1977.
- 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.
- CASAGRANDE, C. G.; KUNZ, A.; DE PRÁ, M. C.; BRESSAN, C. R.; SOARES, H. M. High nitrogen removal rate using ANAMMOX process at short hydraulic retention time. *Water Science & Technology*. v.67. n. 5. p. 968-975. 2013.
- CHAMCHOI, N.; NITISORAVUT, S. Anammox enrichment from different conventional sludges. *Chemosphere*, v. 66, p. 2225-2232, 2007.
- CHANCHOI, N.; NITISORAVUT, S.; SCHIMIDT, J. E. Inactivation of anammox communities under concurrent operation of anaerobic ammonium oxidation (anammox) and denitrification. *Bioresour. Technol.*, v. 99, p. 3331-3336, 2008.
- 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.
- CHEN, T.T.; ZHENG, P.; SHEN, L.D.; DING, S.; MAHMOOD, Q. Kinetic characteristics and microbial community of Anammox-EGSB reactor. *J. Hazard. Mater.*, v. 190, p. 28–35, 2011.
- CHERNICHARO, C. A. D. L. *Reatores anaeróbios*. UFMG. 2. ed. Belo Horizonte, MG: 2007. 380 p.

- 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.
- CLARK, I.; TIMLIN, R.; BOURBONNAIS, A.; JONES, K.; LAFLEUR, D.; WICKENS, K. Origin and fate of industrial ammonium in anoxic ground water - ¹⁵N evidence for anaerobic oxidation (Anammox). *Ground Water Monit R* v. 28, p. 73-82, 2008.
- 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*. 2013. 127f. Tese. (Doutorado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos - Escola de Engenharia), Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, 2013.
- COSTA, M. C. M. S.; CARVALHO, L.; LEAL, C.D.; DIAS, M.F.; MARTINS, K.L.; GARCIA, G.B.; MANCUELO, I.D.; HIPÓLITO, T.; MAC CONELL, E.A.; OKADA, D.; ETCHEBEHERE, C.; CHERNICHARO, C.A.; ARAUJO, J.C. Impact of inocula and operating conditions on the microbial community structure of two anammox reactors. *Environ. Technol.* v.35, p.1–12, 2014.
- DAIMS, H.; NIELSEN, J. L.; NIELSEN, P. H.; SCHLEIFER, K. H.; WAGNER, M. In situ characterization of Nitrospira-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 11, p. 5273-5284, 2001.
- DALSGAARD, T.; CANFIELD, D. E.; PETERSEN, J.; THARMDRUP, B.; ACUÑA-GONZÁLEZ, J. N₂ production by the anammox reaction in the anoxic water column of Golfo Dulce, Costa Rica. *Nature* 422, p. 606–608, 2003.
- DALSGAARD, T.; THARMDRUP, B.; CANFIELD, D. E. Anaerobic ammonium oxidation (anammox) in the marine environment. *Res Microbiol* 156, p. 457–464, 2005.
- 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.
- 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, p. 859-865, 2007.
- 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.
- DESLOOVER, J.; DE CLIPPELEIR, H.; BOECKX, P.; DU LAING, G.; COLSEN, J.; VERSTRAETE, W.; VLAEMINCK, S. E. Floc-based sequential partial nitrification and anammox at full scale with contrasting N₂O emissions. *Water Res*, v. 45, p. 2811–2821, 2011.

- DEVOL, A. H. Nitrogen cycle - solution to a marine mystery. *Nature* vol. 422, p. 575–576, 2003.
- DEVOL, A. H.; NAQVI, S. W. A.; CODISPOTI, L. A. Nitrogen cycling in the suboxic waters of the Arabian Sea. *Nato Science Series: IV: Earth and Environmental Sciences*, v. 64, p. 283–310, 2006.
- 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.
- 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.
- ENGSTRÖM, P.; DALSGAARD, T.; HULTH, S.; ALLER, R. C. Anaerobic ammonium oxidation by nitrite (anammox): implications for N₂ production in coastal marine sediments. *Geochim Cosmochim Acta* 69, p. 2057–2065, 2005.
- ENWALL, K.; PHILIPPOT, L.; HALLIN, S.; SALIN, S. Activity and composition of the denitrifying bacterial community respond differently to long-term fertilization. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 12, p. 8335 – 8343, 2005.
- ESTEVEZ, F. de A. *Fundamentos de limnologia*. 2^a. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 602 p., 1998.
- 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.
- FRANCIS, C. A.; BEMAN, J. M.; KUYPERS, M.M.M. New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *Journal of the International Society for Microbial Ecology*, v. 1 , p. 19-27, 2007.
- FRIJTERS, C. T. M. J.; SILVIUS, M.; FISCHER, J.; HAARHUIS, R.; MULDER, R. Fullscale applications for both COD and nutrient removal in a CIRCOX airlift reactor. *Water Sci Technol* v. 55, p. 107–114, 2007.
- 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, p. 403-413, 2011.

- FURUKAWA, K.; LIEU, P. K.; TOKITOH, H.; FUJII, T. Development of single-stage nitrogen removal using anammox and partial nitritation (SNAP) and its treatment performances. *Water Sci Technol*, v. 53, p. 83-90, 2006.
- GAFAN, G. P.; LUCAS, V. S.; ROBERTS, G. J.; PETRIE, A.; WILSON, M.; SPRATT, D. A. Statistical analyses of complex denaturing gradient gel electrophoresis profiles. *J. Clin. Microbiol.* v. 43, p. 3972–3978, 2005.
- GALÁN, A.; MOLINA, V.; THAMDRUP, B.; WOEBKEN, D.; LAVIK, G.; KUYPERS, M. M. M.; ULLOA, O. Anammox bacteria and the anaerobic oxidation of ammonium in the oxygen minimum zone off northern Chile. *Deep-Sea Res PtII* v. 56, 1021–1031, 2009.
- 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.
- GAO, B.; GUPTA, R. S. Phylogenetic Framework and Molecular Signatures for the Main Clades of the Phylum *Actinobacteria*. *Journal American Society for Microbiology.* v. 76, p. 66-112, 2012
- GARCIA, G. P.; ARAUJO, J. C. *Extração de DNA de amostras de lodo, sedimento e espuma.* Procedimento operacional padrão da rede PROSAB microbiologia para o saneamento básico, 2010.
- GARRITY, G. M. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Proteobacteria Part C.* 2^a ed. Springer, 575 p. 2005.
- GERARDI, M. H. *Wastewater bacteria.* Estados Unidos, 255 p., 2006.
- GRAAF, A. A.; MULDER, A.; BRUJIN, P.; JETTEN, M. S. M.; ROBERTSON, L. A.; KUENEN, G. Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. *Applied and Environmental Microbiology*, v.61, p.1246 – 1251, 1995.
- GRAY, N.F. —Biology of wastewater treatment|| Oxford University Press. New York, USA, 1992.
- 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, p. 1066-1071, 2005.
- HAMERSLEY, M. R.; LAVIK, G.; WOEBKEN, D.; RATTRAY, J. E.; LAM, P.; HOPMANS, E. C.; DAMSTE, J. S. S.; KRUGER, S.; GRACO, M.; GUTIERREZ, D.; KUYPERS, M. M. M. Anaerobic ammonium oxidation in the Peruvian oxygen minimum zone. *Limnol Oceanogr* v.52, p. 923–933, 2007.
- HARHANGI, H. R.; ROY, M. L.; VAN ALEN, T.; HU, B.; GROEN, J.; KARTAL, B.; TRINGE, S. G.; QUAN, Z.; JETTEN, M. S. M.; CAMP., H. J. M. O. Hydrazine synthase, a unique phylomarker with which to study the presence and biodiversity of anammox bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 78, p. 752-758, 2012.
- HEFFERNAN, B.; VAN LIER, J. B.; VAN DER LUBBE, J. Performance review of large scale up-flow anaerobic sludge blanket sewage treatment plants. *Water Science and Technology*, v. 63, p. 100–107, 2011.

- HIPPEN, A.; ROSENWINKEL, K. H.; BAUMGARTEN, G.; SEYFRIED, C. F. Aerobic deammonification: a new experience in the treatment of wastewaters. *Water Sci Technol*, v. 35, p. 111–120, 1997.
- HIRSCH M. D., LONG Z. T. AND SONG B. Anammox bacterial diversity in various aquatic ecosystems based on the detection of hydrazine oxidase genes (hzoA/hzoB). *Microbial Ecology*, 61(2), 264-276p, 2010.
- 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. *Microb Ecol* v. 62, p. 36–47, 2011.
- HU, B. L.; ZHENG, P.; TANG, C. J.; CHEN, J. W.; VAN DER BIEZEN, E.; ZHANG, L.; NI, B. J.; JETTEN, M. S. M.; YAN, J.; YU, H. Q.; KARTAL, B. Identification and quantification of anammox bacteria in eight nitrogen removal reactors. *Water Res* v. 44, p. 5014–5020, 2010.
- 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, p. 966–971, 2011.
- HU, Z.; LOTTI, T.; VAN LOOSDRECHT, M.; KARTAL, B. Nitrogen removal with the anaerobic ammonium oxidation process. *Biotechnol Lett*. 35, p.1145–1154, 2013.
- HUMBERT, S.; TARNAWSKI, S.; FROMIN, N.; MALLET, M. P.; ARAGNO, M.; ZOPFI, J. Molecular detection of anammox bacteria in terrestrial ecosystems: distribution and diversity. *ISME J* v. 4, p. 450–454, 2010.
- ISAKA, K.; DATE, Y.; SUMINO, T.; YOSHIE, S.; TSUNEDA, S. Growth characteristic of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in an anaerobic biological filtrated reactor. *Biotechnological Products and Process Engineering*, v.70, p.47-52, 2006.
- ISAKA, K.; SUMINO, T.; TSUNEDA, S. High nitrogen removal performance at moderately low temperature utilizing anaerobic ammonium oxidation reactions. *J. Biosci. Bioeng.* v.103, p. 486–490, 2007.
- ISAKA, K.; SUWA, Y.; KIMURA, Y.; YAMAGISHI, T.; SUMINO, T.; TSUNEDA, S. Anaerobic ammonium oxidation (Anammox) irreversibly inhibited by methanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v. 81, p. 379–385, 2008.
- 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.
- JAROSZYNSKI, L.W.; CICEK, N.; SPARLING, R.; OLESZKIEWICZ, J.A. Importance of the operating pH in maintaining the stability of anoxic ammonium oxidation (Anammox) activity in moving bed biofilm reactors. *Bioresour. Technol.* v. 102, p. 7051–7056, 2011.
- JENNI, S. S; VLAEMINCK, E.; MORGENROTH, E.; UBERT, K. M. Successful application of nitrification/anammox to wastewater with elevated organic carbon to ammonia ratios. *Water Research*. v.49, p. 316-326. 2014
- 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.

- 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.; 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, p. 283–288, 2001.
- JETTEN, M. S. M. The microbial nitrogen cycle. *Environmental Microbiology*, v. 10, p. 2903-2909, 2008.
- 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* 44, 65–84p, 2009.
- JIN, R.; YANG, G.; YU, J.; ZHENG, P. The inhibition of anammox process: a review. *Chemical Engineering Journal*, v. 197, p. 67-79, 2012.
- JIN, R.; YANG, G.; YU, J.; ZHANG, Q.; MA, C.; XING, B. The effect of sulfide inhibition on the Anammox process *Water Research*, v. 47, p. 1459-1469, 2013.
- 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.; RATTRAY, J.; VAN NIFTRIK, L. A.; VAN DE VOSSEMBERG, J.; SCHIMID, 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, 2007.
- KARTAL, B.; VAN NIFTRIK, L.; RATTRAY, J.; VAN DE VOSSEMBERG, 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, p. 46–55, 2008.
- KARTAL, B.; KUENEN, J. G.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Sewage treatment with anammox. *Science* v. 328, p. 702–703, 2010.
- KARTAL, B.; MAALCKE, W. J.; ALMEIDA, N. M.; CIRPUS, I.; GLOERIC, J.; GEERTS, W.; CAMP, J. M.; HARHANGI, H. R.; JANSSEN-MEGENS, E. M.; FRANCOIJS, K.; STUNNENBERG, H. G.; KELTJENS, J. T.; JETTEN, M. S. M.; STROUS, M. Molecular mechanisms of anaerobic ammonium oxidation. *Nature*, v. 479, 127-130p, 2011
- 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.
- KHRAMENKOVA, 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, Y.; ISAKA, K.; KAZAMA, F.; SUMINO, T. Effects of nitrite inhibition on anaerobic ammonium oxidation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v. 86, p. 359–365, 2010.
- 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, p. 4500–4506, 1998.
- KUENEN, J. G. Anammox bacteria: from discovery to application. *Nature*, v. 6, p. 320–326, 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.
- 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.
- KUYPERS, M. M. M.; SLIEKERS, A. O.; LAVIK, G.; SCHMID, M.; JORGENSEN, B.; KUENEN, J. G.; DAMSTÉ, J. S. S.; STROUS, M.; JETTEN, M. S. M. Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. *Nature* 422, p. 608–611, 2003.
- KUYPERS, M. M. M.; LAVIK, G.; WOEBKEN, D.; SCHMID, M.; FUCHS, B. M.; AMANN, R.; JORGENSEN, B. B.; JETTEN, M. S. M. Massive nitrogen loss from the Benguela upwelling system through anaerobic ammonium oxidation. *Proc Natl Acad Sci USA* vol. 102, p, 6478–6483, 2005.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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, 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.
- 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.
- LIANG, Z.; LIU, J. X. Landfill leachate treatment with a novel process: anaerobic ammonium oxidation (Anammox) combined with soil infiltration system. *J Hazard Mater* v. 151, p. 202–212, 2008.
- 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, p. 6817–6825, 2008.
- 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.
- MAC CONNELL, E. F. A. *Caracterização da comunidade bacteriana de filtros biológicos percoladores tratando efluente anaeróbico*. 2014. 143 f. Tese. (Doutorado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos - Escola de Engenharia), Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, 2014.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. *Microbiologia de Brock*. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1129p.
- MAGURRAN, A. E. *Measuring biological diversity*. Oxford: Blackwell Publishing, 2004. 256p.
- MAIER, R. M., PEPPER, I. L., GERBA, C. P. *Environmental Microbiology*. 2 ed. Amsterdam; Boston: Elsevier/Academic Press, 2009, 598 p.
- MARTINS, T. H. Conversão de compostos nitrogenados em reatores biológicos: operação, caracterização microbiológica e filogenética. São Carlos, 2010, 115 p. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.
- 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, 2003, 1848p.
- METZ, B.; KERSTEN, G. F. A.; HOOGERHOUT, P.; BRUGGHE, H. F.; TIMMERMANS, H. A. M.; JONG, A.; MEIRING, H.; HOVE, J.; HENNINK, W.E.; CROMMELIN, D. J. A.; JISKOOT, W. Identification of formaldehyde-induced modifications of proteins. *J. Biol. Chem.* v. 279, p. 6235–6243, 2004.

- 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.
- 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 fluidised bed reactor. *FEMS Microbiology Ecol.*, 16, 177-184, 1995.
- NI, B.; HU, B.; FANG, F.; XIE, W.; KARTAL, B.; LIU, X.; SHENG, G.; JETTEN, M.; ZHENG, P.; YU, H. Microbial and Physicochemical characteristics of compact anaerobic ammonium-oxidizing granules in a upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, p. 2652-2656, 2010.
- 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.
- NI, S. Q.; ZHANG, J. Anaerobic Ammonium Oxidation: from laboratory to full-scale application. *BioMed Research International*, v. 2013, p. 1-11, 2013.
- 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.
- OSHIKI, M.; SHIMOKAWA, M.; FUJII, N.; SATOH, H.; OKABE, S. Physiological characteristics of the anaerobic ammonium-oxidizing bacteria ‘*Candidatus Brocadia sinica*’. *Microbiology*, v. 157, p. 1706-1713, 2011.
- PASTOR, L.; MARTI, N.; BOUZAS, A.; SECO, A. Sewage sludge management for phosphorus recovery as struvite in EBPR wastewater treatment plants. *Bioresource Technology*, v.99, p.4817-4824, 2007.
- PENTON, C. R.; DEVOL, A. H.; TIEDJE, J. M. Molecular evidence for the broad distribution of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in freshwater and marine sediments. *Applied Environmental Microbiology*, v. 72, p. 6829–6832, 2006.
- PEREIRA, A.D.; LEAL, C.D.; DIAS, M.F.; ETCHEBEHERE, C.; CHERNICHARO C.A.L.; ARAÚJO, J.C. Effect of phenol on the nitrogen removal performance and microbial

- community structure and composition of an anammox reactor. *Bioresource Technology*, v. 166, p. 103-11, 2014.
- 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.
- PERGHER, S. B. C.; CAOVIALLA, M.; DETONI, C.; MACHADO, C. Remoção de Cu^{+2} de soluções aquosas em zeólita NaX. Efeito da granulometria. *Química Nova*, v.28, p.397-401, 2005.
- 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.
- REIS, J.A.T; MENDONÇA, A.S.F. Análise técnica dos novos padrões brasileiros para amônia em efluentes e corpos d'água. *Artigo técnico Eng. Sanit Ambient*, v14n 3: 353-362p, 2009.
- 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.
- RICH, J. J.; DALE, O. R.; SONG, B.; WARD, B. B. Anaerobic ammonium oxidation (Anammox) in Chesapeake Bay sediments. *Microb Ecol* v. 55, p. 311–320, 2008.
- RICHARDS F. A., Anoxic basins and fjords, In: Ripley JP and Skirrow G, eds. *Chemical Oceanography*, London and New York: Academic Press, pp. 611–643, 1965.
- ROSENWINKEL, K. H.; CORNELIUS, A.; THO, LE D. Full scale application of the deammonification process for the treatment of sludge water. *In: Proceedings of IWA specialised conference on Nutrient Management in Wastewater Treatment Processes and Recycle Streams*, Krakow, p 483-491, 2005.
- 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, p. 1749–1755, 2008.
- RYSGAARD, S.; GLUD, R. N.; RISGAARD-PETERSEN, N.; DALSGAARD, T. Denitrification and anammox activity in arctic marine sediments. *Limnol Oceanogr.* 49, p. 1493–1502, 2004.
- SÁNCHEZ-GUILLÉN, 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, 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.

- SCHALK, J.; VRIES, S. D. ; KUENEN, J. G.; JETTEN, M. S. M. Involvement of a novel hydroxylamine oxidoreductase in anaerobic ammonium oxidation. *Biochemistry*, v. 39, p. 5405–5412, 2000.
- 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.
- 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., MAAS B., DAPENA A., VAN DE PAS-SCHOONEN K., VAN DE VOSSENBERG J., KARTAL B., VAN NIFTRIK L., SCHMIDT I., CIRPUS I., KUENEN J.G., WAGNER M., DAMSTÉ J.S.S., KUYPERS M., REVSBECH N.P., MENDEZ R., JETTEN M.S.M., STROUS M. Biomarkers for in situ detection of anaerobic ammonium-oxidizing (Anammox) Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1677-1684, 2005.
- 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.
- SCHMIDT, I., SLIEKERS, O., SCHMID, M., CIRPUS, I., STROUS, M., BOCK, E., KUENEN, J.G., and JETTEN, M.S.M. Aerobic and anaerobic ammonia oxidizing bacteria competitors or natural partners? *FEMS Microbiol. Ecol.* 39, 175–181, 2002.
- SCHUBERT, C. J.; DURISCH-KAISER, E.; WEHRLI, B.; THAMDRUP, B.; LAM, P.; KUYPERS, M. M. M. Anaerobic ammonium oxidation in a tropical freshwater system (Lake Tanganyika). *Environ Microbiol*, v. 8, p. 1857–1863, 2006.
- 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.
- SOUZA, C. L.; CHERNICHARO, C. A. L.; MELO, G. C. B. Methane and hydrogen sulfide emissions in UASB reactors treating domestic wastewater. *Water Science and Technology*, v. 65, p. 1229-1237, 2012.
- STROUS, M.; VAN GERVEN, E.; KUENEN, J. G.; JETTEN, M. S. M. Effects of aerobic and microaerobic conditions on anaerobic ammonium-oxidizing (Anammox) sludge. *Appl. Environ. Microbiol*, v. 63, p. 2446–2448, 1997.

- 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.* 50: 589-596, 1998.
- STROUS, M., FUERST, J.A., KRAMER, E.H.M., LOGEMANN, S., MUYSER G., VAN DE PAS-SCHOONEN K.T., WEBB R., Gijss KUENEN J., JETTEN M.S.M. Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature* 400, 446-449, 1999a
- STROUS, M.; KUENEN, J.G.; JETTEN, M.S.M. Key physiology of anaerobic ammonia oxidation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v. 65, p. 3248–3250, 1999b.
- 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* 440, 790–794, 2006.
- STROUS, M.; KUENEN, J. G.; FUERST, J. A.; WAGNER, M.; JETTEN M.S.M. The anammox case – A new experimental manifesto for microbiological eco-physiology. *Antonie van Leeuwenhoek* v. 81, p. 693–702, 2002.
- SULLIVAN, B. W.; SMITH, W. K.; TOWNSEND, A. R.; NASTO, M. K.; REED, S. C.; CHAZDON, R. L.; CLEVELAND, C. C. Spatially robust estimates of biological nitrogen (N) fixation imply substantial human alteration of the tropical N cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 111, n. 22, p. 8101-8106, 2014.
- TAL, Y.; WATTS, J. E. M.; SCHREIER, H. J. Anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria and associated activity in fixed-film biofilters of a marine recirculating aquaculture system. *Appl Environ Microbiol* v. 72, p. 2896–2904, 2006.
- TANG, C. J.; ZHENG, P.; MAHMOOD, Q.; CHEN, J. W. Start-up and inhibition analysis of the Anammox process seeded with anaerobic granular sludge. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 36, p. 1093–1100, 2009.
- 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, p. 1762–1768, 2010.
- TANG, C.; ZHENG, P.; WANG, C.; MAHMOOD, Q.; ZHANG, J.; CHEN, X.; ZHANG, L.; CHEN, J. Performance of high-loaded Anammox UASB reactors containing granular sludges. *Water Research*, v. 45, p. 135-144, 2011.
- THAMDRUP, B.; DALSGAARD, T. Production of N₂ through anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments. *Appl Environ Microbiol.* 68, p. 1312–1318, 2002.
- 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.
- 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.

- TOH, S. K.; ASHBOLT, N. J. Adaptation of anaerobic ammonium-oxidising consortium to synthetic coke-ovens wastewater. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 59, 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.
- TSUSHIMA, I.; OGASAWARA, Y.; KINDAICHI, T.; SATOH, H.; OKABE, S. Development of high-rate anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) biofilm reactors. *Water Res* v. 41, p. 1623–1634, 2007.
- VAL-MORAES, S. P. *Impacto do lodo de esgoto na comunidade bacteriana do solo: avaliação por microarranjo de DNA*. Jaboticabal, 2008, 170p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal, Jaboticabal, 2008.
- 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 Environmental and Microbiology*, v. 61, p. 1246-1251, 1995.
- VAN DE GRAAF A. A.; BRUIJN P.; ROBERTSON, L. A.; JETTEN, M. S. M.; KUENEN, J. G. Autotrophic growth anaerobic ammonium-oxidation micro-organisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology*, v. 142, p. 2187-2196, 1996.
- VAN 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 15N studies in a fluidized bed reactor. *Microbiology* 143, 2415-2421, 1997.
- 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.; FRANCOIS, 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 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, 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, 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.; 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.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* 233, 7–13, 2004.
- VAN NIFTRIK, L.; GEERTS, W. J. C.; VAN DONSELAAR, E. G.; HUMBEL, B. M.; WEBB, R. I.; FUERST, J. A.; VERKLEIJ, A. J.; JETTEN, M. S. M.; STROUS, M. Linking ultra structure and function in four genera of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: cell plan, glycogen storage, and localization of cytochrome c proteins. *J Bacteriol* vol. 190, p. 708–717, 2008.
- VAN NIFTRIK, L.; JETTEN, M. S. M. Anaerobic Ammonium-Oxidizing Bacteria: Unique Microorganisms with Exceptional Properties. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, n. 3, v. 76, p. 585–596, 2012.
- VAN NIFTRIK, L. Cell biology of unique anammox bacteria that contain an energy conserving prokaryotic organelle. *Springer Science*, 2013.
- 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.
- VANOTTI, M. B.; SZOGI, A. A.; ROTHROCK, M. J. Novel anammox bacterium isolate. Pub. No. US2011/0180476. July 28, 2011.
- 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.
- 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.
- VEYS, P.; VANDEWEYER, H.; AUDENAERT, W.; MONBALLIU, A.; DEJANS, P.; JOOKEN, E.; DUMOULIN, A.; MEESCHAERT, 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.
- VLAEMINCK, S.E.; DE CLIPPELEIR, H.; VERSTRAETE, W. Microbial resource management of one-stage partial nitrification/anammox. *Microb Biotechnol*, v. 5, p. 433–448, 2012.
- VON SPERLING, M. & CHERNICHARO, C.A.L. Biological Wastewater Treatment in Warm Climate Regions. IWA Publishing, London, 2005.

- VON SPERLING, M. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. Belo Horizonte: UFMG, 2005. 452p.
- 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.
- 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.
- WETT, B. Development and implementation of a robust deammonification process. *Water Sci Technol*, v. 56, p. 81–88, 2007.
- WHELAN, J. A.; RUSSELL, N. B.; WHELAN, M. A. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *Journal of Immunological Methods*, n. 278, p. 261-269, 2003.
- WOEBKEN, D.; LAM, P.; KUYPERS, M. M. M.; NAQVI, 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.
- 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.
- 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, L.; ZHENG, P.; TANG, C.; JIN, R. Anaerobic ammonium oxidation for treatment of ammonium-rich wastewaters. *Journal of Zhejiang University Science B*, v.9, p.416-426, 2008.
- ZHANG, Y.; RUAN, X. H.; OP DEN CAMP, H. J. M.; SMITS, T. J. M.; JETTEN, M. S. M.; SCHMID, M. C. Diversity and abundance of aerobic and anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in freshwater sediments of the Xinyi River (China). *Environ Microbiol* v. 9, p. 2375–2382, 2007.
- ZHANG, L.; YANG, J.; MA Y, LI, Z.; FUJII, T.; ZHANG, W.; TAKASHI, N.; FURUKAWA, K. Treatment capability of an up-flow Anammox column reactor using polyethylene sponge strips as biomass carrier. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 110, p. 72-78, 2010.

ZHANG, Q. Q.; ZHANG, Z. Z.; GUO, Q.; WANG, J. J.; WANG, H. Z.; JIN, R. C. Analyzing the revolution of anaerobic ammonium oxidation (anammox) performance and sludge characteristics under zinc inhibition. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 99, p. 3221–3232, 2015.

ZHU, G; PENG, Y.; LI, B.; GUO, J.; YANG, Q.; WANG, S. Biological removal of nitrogen from wastewater. *Reviews Environmental Contamination & Toxicology*, v.192, p.159-195, 2008.

ZHU, G. B.; WANG, S. Y.; FENG, X. J.; FAN, G. N.; JETTEN, M. S. M.; YIN, C. Q. Anammox bacterial abundance, biodiversity and activity in a constructed wetland. *Environ Sci Technol* v. 45, p. 9951–9958, 2011.