Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Departamento de Hidráulica e Saneamento

Murilo Senhuki Esposto

Influência do carbono inorgânico e enxofre na oxidação anaeróbia da amônia

São Carlos
2018

Murilo Senhuki Esposto

Influência do carbono inorgânico e enxofre na oxidação anaeróbia da amônia

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento.

Orientador: Prof. Tit. Eugenio Foresti

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da
EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

S77i Senhuki Esposto, Murilo
Influência do carbono inorgânico e enxofre na
oxidação anaeróbia da amônia / Murilo Senhuki Esposto;
orientador Eugenio Foresti. São Carlos, 2018.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação
em Engenharia Hidráulica e Saneamento e Área de
Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de
Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo,
2018.

1. Oxidação anaeróbia da amônia. 2. Remoção de
nutrientes. 3. Tratamento de esgotos. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Bacharel **MURILO SENHUKI ESPOSTO**.

Título da dissertação: "Influência do carbono inorgânico e enxofre na oxidação anaeróbia da amônia".

Data da defesa: 11/05/2018

Comissão Julgadora:

Resultado:

Prof. Titular **Eugenio Foresti**
(Orientador)
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Aprovado

Prof. Dr. **Arnaldo Sarti**
(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP - Araraquara)

Aprovado

Prof. Dr. **Theo Syrto Octavio de Souza**
(Escola Politécnica/EP-UPS)

Aprovado

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:

Prof. Dr. **Eduardo Mario Mendiando**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Associado **Luís Fernando Costa Alberto**

A cada porteiro(a), segurança, faxineira(o) e demais profissionais que mantêm o laboratório funcionando.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Luis Alberto Esposto e Marcia Helena Senhuki Esposto, por terem apoiado mais uma etapa de minha vida e por continuarem acreditando no meu potencial muito mais do que eu mesmo sou capaz de acreditar.

Ao meu irmão, Mateus Senhuki Esposto, por tirar dúvidas escolares comigo e me mostrar que ainda posso ser feliz na docência.

A minha melhor amiga, Mariele Fernandes de Oliveira, pelo carinho, torcida e disposição para ouvir meus desabafos.

Aos meus amigos de longa data, Leonardo Dias, José Vitor, Rafael Fares, Carlos Eduardo, Lucas Lombardi, Igor Aurélio, Carolina Oliveria e Stela Kaori, por serem o combustível que me alimenta todas as vezes que visito São Joaquim da Barra.

A minha amiga Cristina Rebello, pelas conversas geniais e igualmente divertidas que me proporciona, pelas quais me sinto tão presente, mesmo estando tão distante.

A turma do “Beberico” (Arlan, Bruno, Lucas, Nicolas, Túlio, Hugo, Alana, Ana Claudia, Julliana e Tatiana) e ao pessoal do “Rolê Errado” (Camila, Isabele e Andressa), pelos momentos de descontração em que pude esfriar a cabeça e esquecer um pouco das responsabilidades.

Ao pessoal do “Futeba das Firma”, por deixar minhas terças-feiras menos estressantes e mais saudáveis.

Ao pessoal da “República Dezanda” e da “República Zinabre”, pela hospitalidade e boa companhia.

Aos amigos da graduação, Otávio, Murilo, Luiz Eduardo, Stefania e demais que não perderam contato e me receberam muito bem nas visitas à Uberaba.

A Raissa, Alejandra, Elis, Cristiane, Mirabelle, Elias, Bruno, Lucas e demais colegas de laboratório que fizeram do ambiente de pesquisa um lugar mais divertido.

Aos alunos especiais (em todos os sentidos) Luttembergue e Natana, que permaneceram tão pouco conosco, mas que fizeram tanta falta após voltarem para o Nordeste.

Ao casal Hugo Guilherme e Bruna Nayara, pelas ótimas conversas, não só durante as aulas e almoços na universidade, como também nas caronas para São Joaquim da Barra.

Ao meu professor e orientador, Eugenio Foresti, pela disponibilidade, paciência e humildade com as quais me orientou, além, claro, de todo o conhecimento gentilmente compartilhado comigo.

A professora Marcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic que, mesmo não sendo minha orientadora oficial, me auxiliou do início ao fim da pesquisa.

Aos companheiros de laboratório, Tiago (responsável por buscar o lodo utilizado na etapa 2 da pesquisa) e Natália, que sofreram tanto quanto eu durante os desafios de cultivar as bactérias ANAMMOX. Obrigado pela parceria e por todo o suporte.

As técnicas Eloisa Pozzi e Isabel Kimiko Sakamoto e ao colega de laboratório Fabrício, por me ajudarem a desbravar o mundo da microbiologia quando precisei.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

E um agradecimento mais que especial aos grandes amigos que fiz no mestrado, Hiago, Danilo e David. Obrigado por cada aperto de mão e abraço apertado compartilhado a cada vez que nos víamos; por cada elogio distribuído gratuitamente; pelas conversas filosóficas, mas, principalmente, pelas não tão filosóficas assim; pela parceria nos momentos de estudo ou de farra, seja na universidade ou nas repúblicas; por terem sido os principais responsáveis pelo meu entusiasmo ao longo do mestrado; e por entenderem, assim como eu, que...

... é bom ter um objetivo nas jornadas que empreendemos; mas, no final das contas, o que importa é a jornada em si.

(A mão esquerda da escuridão, por Ursula K. Le Guin)

RESUMO

ESPOSTO, Murilo Senhuki. **Influência do carbono inorgânico e enxofre na oxidação anaeróbia da amônia**. 2018. 42 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

As concentrações de carbono inorgânico e compostos sulfurados a partir das quais pode haver melhoria ou inibição do processo ANAMMOX variam muito na literatura especializada. Características como o tipo de efluente, inóculo, reator, temperatura, pH e tempo de detenção hidráulica influenciam as respostas obtidas em cada trabalho. A presente pesquisa teve como objetivo encontrar uma relação ideal entre as concentrações de bicarbonato e sulfeto utilizadas pelas bactérias responsáveis pelo processo. Para isso, na etapa 1, tentou-se enriquecer biomassa ANAMMOX em um reator contínuo de leito fixo utilizando lodo de uma lagoa aerada proveniente da ETE da indústria “Incofap”, fabricante de ração animal no município de Araraquara (São Paulo). Posteriormente, na etapa 2, para encontrar a relação ideal entre bicarbonato e sulfeto, optou-se por utilizar reatores em batelada inoculados com lodo proveniente de um reator experimental ANAMMOX previamente enriquecido. Tais reatores foram alimentados com substrato sintético contendo a mesma concentração de nitrogênio amoniacal e nitrito (70 mgN/l), enquanto variou-se as concentrações de bicarbonato (5 - 125 mgHCO₃⁻/l) e sulfeto (0 - 32 mgS²⁻/l) por meio de um planejamento fatorial 2 x 2. Concluiu-se, na etapa 1, que o lodo da “Incofap” possui grande potencial para processos de nitrificação parcial e desnitrificação heterotrófica, desde que condições de microaeração e estrita anaerobiose, respectivamente, sejam satisfeitas. Enquanto isso, na etapa 2, concluiu-se que qualquer presença de sulfeto no meio prejudica o processo ANAMMOX e quanto mais próximo da razão teórica estiver a concentração de bicarbonato, melhor é a atividade microbiana.

Palavras-chave: Oxidação anaeróbia da amônia. Remoção de nutrientes. Tratamento de esgotos.

ABSTRACT

ESPOSTO, Murilo Senhuki. **Influence of inorganic carbon and sulfur on anaerobic ammonium oxidation.** 2018. 42 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

The concentrations of inorganic carbon and sulfur compounds from which there may be improvement or inhibition of the ANAMMOX process vary greatly in the literature. Characteristics such as the type of effluent, inoculum, reactor, temperature, pH and time of hydraulic detention influence the responses obtained in each work. The present research had as objective to find an ideal relation between the concentrations of bicarbonate and sulfide used by the bacteria responsible for the process. For this, in step 1, we tried to enrich ANAMMOX biomass in a continuous bed reactor using sludge from an aerated lagoon from the WWTP of the industry "Incofap", animal feed manufacturer in the city of Araraquara (São Paulo). Later, in step 2, to find the ideal relationship between bicarbonate and sulfide, we decided to use batch reactors inoculated with sludge from a previously enriched ANAMMOX experimental reactor. These reactors were fed with synthetic substract containing the same concentration of ammonium nitrogen and nitrite (70 mgN/l), while varying the concentrations of bicarbonate (5 - 125 mgHCO³⁻/l) and sulfide (0 - 32 mgS²⁻/l) by means of a 2 x 2 factorial design. In stage 1, it was concluded that the "Incofap" sludge has great potential for partial nitrification and heterotrophic denitrification, provided that microaeration conditions and strict anaerobiosis are respectively satisfied. Meanwhile, in step 2, it was concluded that any presence of sulfide in the medium impairs the ANAMMOX process and the closer to the theoretical ratio is the bicarbonate concentration, better is the microbial activity.

Keywords: Anaerobic ammonium oxidation. Removal of nutrients. Treatment of sewage.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ETE - Estação de Tratamento de Esgoto

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

OD - Oxigênio dissolvido

ANAMMOX - *Anaerobic Ammonium Oxidation*

RLF - Reator de Leito Fixo

NTK - Nitrogênio Total Kjeldahl

pH - Potencial Hidrogeniônico

BOA - Bactérias que oxidam amônia

BON - Bactérias que oxidam nitrito

USEPA - *United States Environmental Protection Agency*

MLE - Processo Ludzack Ettinger Modificado

eq - equivalente

$C_{10}H_{19}O_3N$ - Representação da matéria orgânica biodegradável do esgoto

nox - Número de oxidação

θ_h - Tempo de detenção hidráulica

θ_c - Tempo de retenção celular

ST - Sólidos totais

STF - Sólidos totais fixos

STV - Sólidos totais voláteis

SST - Sólidos suspensos totais

SSF - Sólidos suspensos fixos

SSV - Sólidos suspensos voláteis

DQO - Demanda Química de Oxigênio

UFC - Unidades formadoras de colônias

NMP - Número mais provável

MSE 1 - Biomassa retirada da lagoa aerada proveniente da ETE da indústria “Incofap”, ou seja, trata-se do lodo original, antes do mesmo ser utilizado como inóculo do RLF

MSE 2 - Biomassa retirada das mangueiras do RLF onde, por meio das análises físico-químicas, verificou-se um aparente processo de nitrificação parcial

MSE 3 - Biomassa retirada de frascos de antibiótico que simulavam a operação do RLF em condições mais estritas de anaerobiose onde, por meio das análises físico-químicas, verificou-se aparente processo de desnitrificação heterotrófica.

DNA - Ácido desoxirribonucleico

TE - Tris-EDTA

bTEFAP[®] - *Bacterial tag encoded FLX amplicon pyrosequencing* (bTEFAP)

PCR - *Polymerase chain reaction*

x_1 - Codificação do fator bicarbonato

x_2 - Codificação do fator sulfeto

x_i - Valor do i -ésimo nível,

$\bar{x}$ - Valor médio dos níveis

Δx - Amplitude dos níveis

y - Resposta real do planejamento fatorial

$\bar{y}$ - Resposta média do planejamento fatorial

$\bar{y}_+$ - Resposta média obtida no nível superior

$\bar{y}_-$ - Resposta média obtida no nível inferior

s^2_{agregada} - Variância agregada dos valores de y

s^2_i - Variância da amostra de y referente a i -ésima combinação

v_i - Número de graus de liberdade da amostra de y referente a i -ésima combinação

n_i - Tamanho da amostra de y referente a i -ésima combinação ou, em outras palavras, o número de repetições de cada combinação

s^2_{efeito} - Variância de um efeito

n - Número de combinações

$t_{\text{calculado}}$ - Valor calculado de uma distribuição t de student

$y_{\text{calculado}}$ - Resposta calculada a partir do modelo estatístico

b_0, b_1, b_2 e b_{12} os coeficientes do modelo estatístico

$\bar{y}_{\text{global}}$ - Média global

ANOVA - Análise da variância

SQ_{modelo} - Soma quadrática do modelo

$SQ_{\text{resíduos}}$ - Soma quadrática dos resíduos

SQ_{total} - Soma quadrática total

$SQ_{\text{falta de ajuste}}$ - Soma quadrática da falta de ajuste

$SQ_{\text{erro puro}}$ - Soma quadrática do erro puro

$\bar{y}_i$ - Média entre as repetições da i -ésima combinação

$D/\mu\text{L}$ - Número de dispersão

E_θ - Curva padronizada para a função pulso

Sefeito - Erro padrão de um efeito

$t_{v,\alpha/2}$ - Valor crítico encontrado em uma tabela de distribuição t de Student

v - Número de graus de liberdade

α - Nível de significância.

R^2 - Coeficiente de determinação

MQ_{modelo} - Média quadrática do modelo

$MQ_{\text{resíduos}}$ - Média quadrática dos resíduos

$MQ_{\text{falta de ajuste}}$ - Média quadrática da falta de ajuste

$MQ_{\text{erro puro}}$ - Média quadrática do erro puro

$F_{\text{modelo/resíduos}}$ e $F_{\text{falta de ajuste/erro puro}}$ - Valores calculados de uma distribuição F de Snedecor

$F_{v,\alpha}$ - Valor crítico encontrado em uma tabela de distribuição F de Snedecor.

$R^2_{\text{máximo}}$ - Coeficiente de determinação máximo

S^0 - Enxofre elementar

DEAMOX - *Denitrifying Ammonium Oxidation*

LPB-USP - Laboratório de Processos Biológicos da Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS DA ETAPA 1	17
2.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS DA ETAPA 2	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1	CICLO DO NITROGÊNIO	18
3.2	REMOÇÃO CONVENCIONAL DE NITROGÊNIO	20
3.3	ANAMMOX	23
4	METODOLOGIA	26
4.1	ETAPA 1	26
4.1.1	Instalação experimental	26
4.1.2	Substrato sintético	28
4.1.3	Análises físico-químicas e microbiológicas	30
4.1.4	Inóculo	31
4.1.5	Complemento do monitoramento do RLF	32
4.1.6	Análises de biologia molecular	33
4.2	ETAPA 2	34
4.2.1	Instalação experimental	34
4.2.2	Planejamento fatorial	35
4.2.3	Substrato sintético	39
4.2.4	Análises físico-químicas	39
4.2.5	Inóculo	39
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1	ETAPA 1	40
5.1.1	Ensaio hidrodinâmico	40
5.1.2	Monitoramento do RLF	41
5.1.3	Análises de biologia molecular	47
5.2	ETAPA 2	50
5.2.1	Resposta do planejamento fatorial	50
5.2.2	Efeitos	56
5.2.3	Estimativa do erro experimental	58

5.2.4	Significância dos efeitos.....	59
5.2.5	Modelo estatístico	60
5.2.6	Análise da variância	61
5.2.7	Superfície de resposta.....	63
6	CONCLUSÃO.....	67
6.1	SUGESTÕES.....	67
	REFERÊNCIAS.....	68
	APÊNDICE	75

1 INTRODUÇÃO

Uma estação de tratamento de esgoto (ETE) simula as operações e processos de assimilação de substâncias que ocorrem naturalmente no meio ambiente, porém, reduzindo o tempo e o espaço necessários para a remoção dos poluentes. Em outras palavras, a ETE acelera os ciclos biogeoquímicos, fazendo com que eles ocorram numa velocidade maior e num espaço menor do que aqueles que ocorreriam na natureza.

O objetivo da ETE é fazer com que o lançamento de esgotos em corpos hídricos não prejudique os diversos usos que os seres humanos fazem da água, como o abastecimento público, abastecimento industrial, irrigação, geração de energia elétrica, recreação, pesca, navegação, etc. Para garantir que esses usos não sejam alterados, o lançamento de esgotos em corpos hídricos brasileiros deve respeitar as exigências presentes na legislação pertinente. Em nível nacional, a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 357 dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento (BRASIL, 2005), enquanto a Resolução CONAMA nº 430 dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes (BRASIL, 2011). Já no nível estadual, o Decreto nº 8468 dispõe sobre a prevenção e controle da poluição do meio ambiente no estado de São Paulo (SÃO PAULO, 1976), enquanto o Decreto nº 10755 dispõe sobre o enquadramento dos corpos de água receptores do estado de São Paulo (SÃO PAULO, 1977).

Mesmo com a existência das ETEs e das exigências legais, certos poluentes, como compostos nitrogenados, ainda podem alcançar os corpos hídricos sem terem sido removidos satisfatoriamente pelas tecnologias utilizadas no tratamento de esgotos, devido à complexidade de seus ciclos biogeoquímicos. Convencionalmente, na nitrificação, o nitrogênio amoniacal composto por amônia livre (NH_3) e íon amônio (NH_4^+) é oxidado a nitrito (NO_2^-) e posteriormente a nitrato (NO_3^-) em condições predominantemente aeróbias. Por outro lado, na desnitrificação, a redução do NO_2^- e NO_3^- a nitrogênio molecular (N_2), que pode ser removido da massa líquida, ocorre em condições predominantemente anaeróbias. Essas condições nem sempre são atendidas nas unidades que compõem uma ETE, principalmente quando esta se baseia exclusivamente no tratamento anaeróbio, já que, nas condições de ausência de oxigênio (O_2), não há a etapa inicial de nitrificação.

O tratamento anaeróbio tem sido muito estudado e empregado devido a certas vantagens quando comparado ao tratamento aeróbio, por exemplo: baixo consumo de energia; produção de menores quantidades de lodo; construção e operação relativamente mais simples; menores áreas de implantação; e possibilidade de recuperar metano (CH_4) e gás hidrogênio

(H₂) como combustíveis para geração de energia, uma vez verificada a viabilidade do processo. No entanto, entre suas desvantagens, está a baixa eficiência na remoção de nutrientes, como o já citado nitrogênio.

A importância da remoção de nitrogênio se dá, pois ele é nutriente essencial para o metabolismo e constituição celular de organismos, como as algas, que assimilam nitrogênio na forma de NH₄⁺ e NO₃⁻. Sendo assim, quando o nitrogênio está em excesso nos ambientes aquáticos, pode ocorrer uma superpopulação dessas algas, fenômeno conhecido como eutrofização. Tal fenômeno confere coloração esverdeada à água, aumenta o custo de seu tratamento e dificulta a penetração da radiação solar na massa líquida, o que resulta na diminuição da quantidade de oxigênio dissolvido (OD) para outros organismos aeróbios, podendo causar a morte dos mesmos.

Em 1995, foi observado um processo, até então desconhecido, que abriu novas possibilidades para o tratamento anaeróbio de esgotos e para a remoção de nitrogênio. Em um reator de leito fluidizado tratando efluente de um reator metanogênico, um grupo de pesquisadores mostrou que o NH₄⁺ também poderia ser oxidado em ambiente anaeróbio, utilizando NO₂⁻ comoceptor final de elétrons e gerando NO₃⁻ e N₂ como produtos finais. Esse processo ficou conhecido como oxidação anaeróbia da amônia (*Anaerobic Ammonium Oxidation* - ANAMMOX) (MULDER et al., 1995).

A partir de então, muitos estudos têm sido desenvolvidos para estabelecer condições ótimas de enriquecimento das bactérias responsáveis pelo processo ANAMMOX. Nesses estudos, foram testados: diferentes configurações de reatores, tipos de material suporte, lodos para inóculo, tempos de detenção hidráulica; variações na temperatura e pH, bem como nas concentrações de compostos essenciais e compostos inibidores do processo (TSUSHIMA et al., 2007; ARAUJO et al., 2010; YANG et al., 2011; WANG et al., 2013; JIN et al., 2013; LIU et al., 2015; WANG et al., 2016).

Ainda assim, pouco mais de duas décadas após a descoberta, são poucos os reatores em escala real que exploram a tecnologia (VAN DER STAR et al., 2007; LACKNER et al., 2014). Ademais, também existem divergências entre autores no que se refere às concentrações ideais de compostos, principalmente bicarbonato e sulfeto, que participam do processo ANAMMOX (KIMURA, ISAKA, KAZAMA, 2011; YANG et al., 2010; VAN DE GRAAF et al., 1996; JIN et al., 2013; DAPENA-MORA et al.; 2007).

Diante do exposto, a presente pesquisa deu continuidade aos estudos sobre ANAMMOX com o objetivo de encontrar uma relação ideal entre as concentrações de bicarbonato e sulfeto utilizadas pelas bactérias responsáveis pelo processo.

2 OBJETIVOS

Nesta seção, o principal objetivo da pesquisa é apresentado, bem como os objetivos específicos, que foram divididos em duas etapas.

2.1 OBJETIVO GERAL

Encontrar uma relação ideal entre as concentrações de bicarbonato e sulfeto utilizadas pelas bactérias responsáveis pelo processo ANAMMOX.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS DA ETAPA 1

a) Enriquecer biomassa ANAMMOX em um reator contínuo de leito fixo (RLF) em período de tempo coerente com o de trabalhos semelhantes presentes na literatura especializada;

b) Testar a capacidade de retenção da biomassa ANAMMOX nos anéis de polipropileno de superfície rugosa, material usado no meio suporte do RLF;

c) Testar, como inóculo do RLF, o lodo de uma lagoa aerada proveniente da ETE da indústria “Incofap”, fabricante de ração animal no município de Araraquara (São Paulo);

d) Avaliar a diversidade microbiana da biomassa desenvolvida nesta etapa por meio de análises de biologia molecular;

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS DA ETAPA 2

e) Utilizar a biomassa enriquecida na etapa anterior para inocular reatores em batelada e submetê-la a diferentes relações entre as concentrações de bicarbonato e sulfeto;

f) Utilizar, como forma alternativa de inóculo para os reatores em batelada, o lodo de um reator experimental com atividade ANAMMOX estável, proveniente da “Embrapa Suínos e Aves”, localizada no município de Concórdia (Santa Catarina).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta seção são apresentados conceitos fundamentais para o bom entendimento da pesquisa, além do estado da arte sobre o processo ANAMMOX.

3.1 CICLO DO NITROGÊNIO

As principais formas de nitrogênio presentes na natureza são: nitrogênio molecular, nitrogênio orgânico (particulado na forma de organismos e detritos ou dissolvido na forma de compostos como aminoácidos, peptídeos, ácidos nucleicos etc.), amônia livre, íon amônio, nitrito e nitrato. Além disso, na área de tratamento de esgotos é comum o uso do nitrogênio total Kjeldahl (NTK), sendo ele a soma do nitrogênio orgânico e amoniacal. As formas descritas podem ser inseridas, no meio, pelo aporte de despejos domésticos, despejos industriais, excrementos de animais e fertilizantes.

Os principais processos envolvendo as formas de nitrogênio são: fixação de nitrogênio, amonificação, nitrificação (nitritação e nitratação) e desnitrificação. De acordo com revisão feita por Esteves (2011) e Metcalf & Eddy (2016), esses processos podem ser sucintamente descritos como:

a) Fixação de nitrogênio: processo que ocorre tanto em ambiente aeróbio quanto anaeróbio e consiste em converter N_2 atmosférico em nitrogênio orgânico. Tal conversão é realizada por microrganismos como as bactérias dos gêneros *Azotobacter*, *Clostridium* e *Azospirillum*, além de cianobactérias como as pertencentes aos gêneros *Nostoc* e *Anabaena*. Esses microrganismos utilizam o N_2 como fonte de nitrogênio para seu metabolismo, transformando-o em biomoléculas como proteínas.

b) Amonificação: processo que também ocorre em ambiente aeróbio ou anaeróbio e consiste em converter nitrogênio orgânico em nitrogênio amoniacal (NH_3 e NH_4^+). Este processo se dá pela hidrólise da ureia ($CO[NH_2]_2$) liberada na excreção dos organismos, pela liberação de sedimentos do fundo e pela decomposição de compostos orgânicos, como ácidos nucleicos. A produção da amônia a partir da ureia pode ser representada pela equação 1.

Em meio aquoso, a amônia é instável, principalmente em meios ácidos, sendo convertida a íon amônio por hidratação, como na equação 2.

Quanto maior a temperatura e o potencial hidrogeniônico (pH), maior a taxa de conversão do íon amônio em amônia livre.

c) Nitrificação: processo predominantemente aeróbio que ocorre em duas etapas: oxidação de NH_4^+ a NO_2^- (nitritação) e oxidação de NO_2^- a NO_3^- (nitratação), ambas realizadas por bactérias autotróficas. A oxidação de NH_4^+ a NO_2^- é feita por microrganismos comumente denominados bactérias que oxidam amônia (BOA), como as bactérias pertencentes aos gêneros *Nitrosomonas*, *Nitrosospira* e *Nitrosococcus*. Na reação, que pode ser representada pela equação 3, NH_4^+ é o doador de elétrons e O_2 é o aceptor de elétrons.

Na oxidação de nitrito a nitrato, os microrganismos responsáveis são comumente denominados bactérias que oxidam nitrito (BON), como as bactérias pertencentes aos gêneros *Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrococcus* e *Nitrospina*. Na reação, que pode ser representada pela equação 4, NO_2^- é o doador de elétrons e O_2 é o aceptor de elétrons.

Logo, a reação global da nitrificação pode ser representada pela equação 5.

d) Desnitrificação: processo predominantemente anaeróbio que consiste na redução de NO_2^- e NO_3^- a N_2 , forma gasosa que pode ser removida do meio aquoso e retornar para o início do ciclo. Esse processo é realizado por um grande número de gêneros de bactérias como as heterotróficas *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*,

Hyphomicrobium, *Moraxella*, *Neisseria*, *Paracoccus*, *Propionibacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Spirillum*, *Vibrio* e as autotróficas *Paracoccus*, *Thiobacillus* e *Thiomicrospira*. As reações de desnitrificação podem ser representadas, de forma simplificada, pelas equações 6 e 7.

Tais equações são simplificadas, pois contemplam os aceptores finais de elétrons da redução (NO_2^- e NO_3^-), mas não os doadores de elétrons, que são substâncias orgânicas na desnitrificação heterotrófica e substâncias inorgânicas na desnitrificação autotrófica. Esses doadores de elétrons serão exemplificados na próxima seção.

3.2 REMOÇÃO CONVENCIONAL DE NITROGÊNIO

Dentre as possíveis rotas descritas nas seções anteriores, observa-se que o nitrogênio pode ser removido do meio aquático por:

- a) Volatilização na forma de NH_3 ;
- b) Assimilação pelas algas na forma de NH_4^+ e NO_3^- , podendo ser, posteriormente, sedimentado na forma de nitrogênio orgânico particulado;
- c) Conversão a N_2 atmosférico via redução de NO_2^- e NO_3^- .

As duas primeiras formas de remoção são aplicadas, normalmente, em sistemas de lagoas de estabilização, enquanto a terceira é alcançada pela combinação de reatores aeróbios e anaeróbios, de maior interesse para esta pesquisa.

Segundo o manual da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*United States Environmental Protection Agency* - USEPA), de 1993, a primeira tentativa de remoção de nitrogênio proposta para ETEs foi apresentada por Wuhrman (1964), enquanto a forma de remoção mais utilizada tem sido o processo Ludzack Ettinger, modificado por Barnard (1973).

No sistema de Whurman (1964), um primeiro reator é aerado, onde ocorre a oxidação de NH_4^+ a NO_2^- e, posteriormente, a NO_3^- , enquanto em um segundo reator, anaeróbio, ocorre a redução de NO_3^- a N_2 . Como no primeiro reator não ocorre apenas oxidação da amônia, mas também da matéria orgânica presente no esgoto, o doador de elétrons para desnitrificação

heterotrófica se torna escasso no segundo reator, sendo necessária a utilização de uma fonte externa de carbono. Já no processo Ludzack Ettinger Modificado (MLE) por Barnard (1973), o reator anaeróbio é posicionado antes do reator aeróbio e ocorre a alimentação do primeiro reator com NO_3^- produzido no segundo, por meio de recirculação. Isso faz com que o reator anaeróbio, onde ocorre a desnitrificação, possua o doador e o receptor de elétrons necessários.

Na reação de nitrificação (equação 5) é possível verificar que há produção de hídon (H^+), o que reduz o pH do meio, enquanto nas reações de desnitrificação (equações 6 e 7) há produção de hidroxila (OH^-), o que faz com que o pH aumente. Segundo revisão feita por Bastos e von Sperling (2009), boa parte dos estudos foram feitos controlando o pH do sistema de remoção entre 7 e 8,5 e, nessa faixa, não se observou efeitos deletérios sobre a nitrificação. Além disso, a faixa ideal de pH da desnitrificação (6 a 9) é maior do que a da nitrificação, sendo assim, mantendo-se as condições de pH favoráveis para a nitrificação, é provável que se tenha um bom desenvolvimento da desnitrificação.

As variações de pH em função da geração de ácidos podem ser minimizadas pela alcalinidade do esgoto, que se deve à presença de OH^- , carbonatos (CO_3^{2-}) e bicarbonatos (HCO_3^-). Como as bactérias responsáveis pela nitrificação são autotróficas, elas obtêm sua fonte de carbono para síntese celular por meio de carbono inorgânico dissolvido, por exemplo, HCO_3^- . Sendo assim, a reação global da nitrificação pode ser reescrita pela equação 8, como foi feito por Metcalf & Eddy (2016).

Observa-se que são consumidos 2 mols de alcalinidade como HCO_3^- para cada mol de NH_4^+ oxidado. A alcalinidade é comumente expressa em mg/l de carbonato de cálcio (CaCO_3). Sabe-se que 1 equivalente (eq) de alcalinidade corresponde a 50 g CaCO_3 , portanto, pode-se dizer que, na nitrificação, são consumidos, teoricamente, 7,14 g de alcalinidade como CaCO_3 por g de N- NH_4^+ oxidado $[(2 \times 50 \text{ gCaCO}_3)/(14 \text{ gN-NH}_4^+)]$. Seguindo o mesmo raciocínio, observa-se pelas equações 6 e 7 que a desnitrificação produz 1 mol de alcalinidade como OH^- para cada mol de NO_2^- ou NO_3^- reduzido, o que significa que, na desnitrificação, são produzidos, teoricamente, 3,57 g de alcalinidade como CaCO_3 por g de N reduzido $[(1 \times 50 \text{ gCaCO}_3)/(14 \text{ gN-NH}_4^+)]$. Na prática, os valores de alcalinidade são menores que os teóricos, pois parte do nitrogênio é incorporado à biomassa produzida, que não foi considerada nas equações mostradas até aqui.

No que se refere à temperatura, a nitratação é mais rápida que a nitrificação em temperaturas menores que 20 °C, enquanto a nitrificação é mais rápida em temperaturas mais elevadas (>25 °C). Em outras palavras, a taxa de crescimento de BOA é maior que a taxa de crescimento de BON em altas temperaturas, o que permite favorecer e selecionar BOA pela temperatura, quando desejado. Já a taxa de desnitrificação aumenta com a temperatura até um valor ótimo de 40 °C (HELLINGA et al, 1998).

Quanto à necessidade de doadores de elétrons, foi comentado, na seção anterior, que esses podem ser substâncias orgânicas na desnitrificação heterotrófica ou substâncias inorgânicas na desnitrificação autotrófica. Quando o doador de elétrons está presente no próprio esgoto a ser tratado, ele é denominado endógeno. A equação 9, apresentada por USEPA (1993), exemplifica o uso de matéria orgânica biodegradável presente no esgoto ($C_{10}H_{19}O_3N$) como doador de elétrons endógeno na desnitrificação heterotrófica.

Por outro lado, quando o doador de elétrons vem de uma fonte externa, ele é denominado exógeno. Exemplos podem ser encontrados no trabalho de Santos et al. (2004), que utilizaram e compararam três diferentes doadores de elétrons exógenos para a desnitrificação heterotrófica, sendo eles o metanol (CH_3OH), etanol (C_2H_5OH) e CH_4 . Por tratar-se de uma fonte externa, o uso de doadores exógenos atribui um custo adicional ao sistema de tratamento e, por isso, é mais interessante dar preferência ao uso dos doadores endógenos. Já quando o doador de elétrons é uma substância inorgânica, pode-se citar, como exemplo não tão convencional de remoção de nitrogênio, o íon sulfeto (S^{2-}), utilizado com sucesso por Souza e Foresti (2013) na desnitrificação autotrófica.

Em relação aos requisitos de oxigênio para a nitrificação, analisando as equações 3, 4 e 5, pode-se verificar que é mais vantajoso optar pela remoção de nitrogênio via nitrito. Para converter NH_4^+ a NO_2^- são necessários 1,5 mol de O_2 para cada mol de N oxidado, o que equivale a 3,43 g O_2 /gN $[(1,5 \times 2 \times 16 \text{ g}O_2)/(14 \text{ g}N)]$. Já na conversão de NH_4^+ até NO_3^- , são necessários 2 mols de O_2 para cada mol de N oxidado, o que equivale a 4,57 g O_2 /gN $\{3,43 + [(0,5 \times 2 \times 16 \text{ g}O_2)/(14 \text{ g}N)]\}$. Em outras palavras, operar um reator sob condições limitadas de oxigênio dissolvido favorece BOA, por possuírem maior afinidade com o mesmo (BLACKBURNE et al., 2007; WYFFELS et al., 2004).

Observa-se também que a remoção de nitrogênio via nitrito é mais vantajosa em relação aos doadores de elétrons. Analisando a equação 6, verifica-se que, para o NO_2^- ser reduzido a N_2 , seu número de oxidação (nox) varia de +3 a 0, sendo necessária a doação de 3 elétrons. Por outro lado, analisando a equação 7, verifica-se que, para o NO_3^- ser reduzido a N_2 , seu nox varia de +5 a 0, sendo necessário a doação de 5 elétrons. Isso significa que, para um mesmo doador de elétrons, serão gastos menores quantidades do doador na desnitrificação via nitrito do que na desnitrificação via nitrato.

Além de possuírem maior taxa de crescimento em altas temperaturas, de terem maior afinidade com o oxigênio e do processo de nitrificação necessitar de uma menor quantidade de elétrons transferidos, outra vantagem de fazer com que as BOA prevaleçam no reator é que a concentração de amônia livre inibidora para BOA é mais elevada do que para BON (ANTHONISEN et al., 1976; YAMAMOTO et al., 2008).

Diante dos conceitos apresentados para a remoção convencional de nitrogênio e com base nas vantagens observadas para a remoção de nitrogênio via nitrito, as novas tecnologias têm se baseado na remoção via curta e no processo ANAMMOX. A próxima seção traz o estado da arte desse processo.

3.3 ANAMMOX

Após sua descoberta, o processo ANAMMOX passou a ser intensivamente estudado. A reação que descreve a estequiometria do processo pode ser representada pela equação 10, obtida através do trabalho realizado por Strous et al. (1998).

Strous et al. (1999) identificaram o microrganismo responsável pelo processo ANAMMOX e afirmaram que se tratava de um membro do filo *Planctomycetes*. De acordo com Pereira et al. (2017), até o momento foram identificados sete gêneros de bactérias ANAMMOX, sendo eles: *Candidatus Anammoximicrobium*, *Candidatus Anammoxoglobus*, *Candidatus Brasilis*, *Candidatus Brocadia*, *Candidatus Jettenia*, *Candidatus Kuenenia* e *Candidatus Scalindua*. O termo “*Candidatus*” é utilizado quando espécies ou gêneros são bem caracterizados, mas não foram estudados em culturas puras.

A taxa de crescimento dos *Planctomycetes* é muito baixa, sendo o tempo de duplicação observado de aproximadamente 11 dias, o que faz com que o processo ANAMMOX necessite de grande quantidade de inóculo, pouco arraste de biomassa e tempo de enriquecimento relativamente longo (SCHEEREN et al., 2011).

No que diz respeito ao enriquecimento da biomassa, Strous et al. (1997) identificaram atividade ANAMMOX em um RLF após 115 dias de operação. Utilizando o mesmo tipo de reator, Tsushima et al. (2007) observaram a atividade ANAMMOX após 50 dias de enriquecimento; Zhang et al. (2010) após 57 dias; Wang et al. (2013) após 39 dias; Wang, Zhang e Yang (2016) após 67 dias; e Wang et al. (2016) após 45 dias.

Observa-se, pela equação 10, que a relação $\text{NH}_4^+:\text{NO}_2^-$ é de 1:1,32. Com base no que tem sido reportado pela literatura especializada, Uyanik, Bekmezci e Yurtsever (2011) recomendaram manter essa relação entre 1:1 e 1:1,5, pois, tanto o nitrogênio amoniacal quanto o nitrito podem atuar como inibidores do processo ANAMMOX se não estiverem presentes nas concentrações adequadas.

Jin et al. (2012) elaboraram uma revisão sobre o fenômeno da inibição e observaram que a amônia livre é o verdadeiro inibidor quando se trata de nitrogênio na forma amoniacal, enquanto o íon amônio não confere grande risco ao processo. Os autores verificaram que a concentração mais baixa a causar inibição já observada foi de 1,7 mgN-NH₃/l, em trabalho realizado por Jung et al. (2007), enquanto a faixa de valores de 57-187 mgN-NH₃/l, encontrada por Tang et al. (2010), foi a mais alta a causar inibição.

Jin et al. (2012) também apresentaram informações quanto à inibição por nitrito. Segundo a revisão feita pelos autores, a inibição pode ocorrer a partir de 100 mgN-NO₂⁻/l, de acordo com Strous, Kuenen e Jetten (1999), ou a partir de concentrações bem mais elevadas, como 750 mgN-NO₂⁻/l, de acordo com Kimura et al. (2010).

Além de NH_4^+ e NO_2^- , o carbono inorgânico também é substrato essencial para o processo ANAMMOX, como pode ser verificado pela equação 10, na forma de HCO_3^- . De acordo com a equação, a relação $\text{NH}_4^+:\text{HCO}_3^-$ é, teoricamente, 1:0,066; mas alguns trabalhos tem demonstrado que essa relação pode variar.

Utilizando um reator contínuo de fluxo ascendente e separador trifásico, Yang et al. (2010), após 51 dias de adaptação da biomassa ANAMMOX, começaram a avaliar a influência do carbono inorgânico. Aumentando a relação $\text{HCO}_3^-:\text{NH}_4^+$ de 0,07 a 0,18 do dia 51 ao 63, observaram melhora na remoção de nitrito. Do dia 63 ao 78, aumentaram a relação $\text{HCO}_3^-:\text{NH}_4^+$ de 0,18 a 0,42 e, durante esse período, não verificaram melhora significativa na remoção, mostrando que não seria econômico continuar aumentando a dosagem de HCO_3^- .

Kimura, Isaka e Kazama (2011) avaliaram a influência do carbono inorgânico na atividade ANAMMOX em reator contínuo de fluxo ascendente, preenchido com cubos de gel como material suporte. Os autores testaram diferentes relações $\text{HCO}_3^-:\text{NH}_4^+$ e seus resultados mostraram que a relação ideal foi de 0,2.

Van de Graaf et al. (1996) apresentaram, em sua metodologia, meio mineral sintético para o enriquecimento de microrganismos do grupo ANAMMOX que é utilizado até os dias atuais nos trabalhos sobre o tema. Mas, além disso, os autores também adicionaram várias substâncias extras, dentre elas o sulfeto, para avaliar o efeito das mesmas no processo. Em testes de batelada observaram que concentrações de sulfeto de 1 a 5 mM, faziam com que a atividade ANAMMOX fosse potencializada. Em experimentos contínuos, observaram que, fazendo uso de alimentação em pulso, concentrações de sulfeto de 2 mM aumentaram em 20% a atividade ANAMMOX, já com alimentações intermitentes, os mesmos 2 mM de sulfeto aumentaram em 60% a atividade ANAMMOX.

Por outro lado, a presença de sulfeto em determinadas concentrações também pode provocar efeitos inibitórios. Jin et al. (2013) verificaram que, sob concentrações de sulfeto de 1 mM (32 mg/l), a atividade ANAMMOX de um reator contínuo foi reduzida à metade após 13 dias da adição do inibidor. Ao final dos experimentos, tais autores também reportaram que o uso do sulfeto diminuiu o tamanho do grânulo e danificou as células da biomassa utilizada como inóculo. Anteriormente, Dapena-Mora et al. (2007) observaram que concentrações de sulfeto entre 1 e 2 mM causaram decréscimo de 60% da atividade ANAMMOX e que acima de 5 mM a atividade ANAMMOX se tornou ausente em reatores em batelada.

Os trabalhos citados nesta seção mostram que as concentrações de compostos nitrogenados, carbono inorgânico e compostos sulfurados a partir das quais pode haver melhoria ou inibição do processo ANAMMOX variam muito com as características da biomassa e das condições operacionais de cada experimento. Sendo assim, diferentes características como tipo de inóculo, temperatura, pH, tempo de detenção hidráulica (θ_h), característica do efluente, tempo de retenção celular (θ_c) e configuração do reator geram diferentes respostas sobre o processo. Isso faz com que cada sistema de tratamento deve ser analisado separadamente, justificando a necessidade de pesquisas como a que está sendo apresentada.

4 METODOLOGIA

Esta seção contempla a descrição das instalações experimentais, bem como os procedimentos empregados no preparo do substrato sintético e inóculo. Também descreve o planejamento experimental e como se deu o monitoramento dos reatores por meio das análises físico-químicas, microbiológicas e de biologia molecular.

4.1 ETAPA 1

Referente aos objetivos estabelecidos na seção 2.2.

4.1.1 Instalação experimental

Foi utilizado um RLF de acrílico, cuja instalação pode ser observada através do esquema da figura 1, sendo (1) o recipiente de alimentação, (2) a mangueira de sucção, (3) a bomba, (4) a mangueira de recalque, (5) o meio suporte, (6) o dispositivo de coleta do gás gerado e (7) a bolsa de gás N₂.

No preenchimento do RLF foram usados anéis de polipropileno de superfície rugosa, representados na figura 2. Esse modelo de anéis possui 2,5 cm de diâmetro, 1 cm de altura, superfície específica de 576 m²/m³ e massa específica de 0,98 g/cm³. A escolha desse material se deu, pois ele é inerte, permanece imóvel no reator e suas cavidades externas aliadas a alta porosidade podem potencializar a retenção da biomassa, bem como evitar o entupimento do meio e garantir uma ligeira “lavagem” que impede o aprisionamento do gás formado (WANG et al., 2016).

Além disso, como relataram Rajeshwari et al. (2000), um RLF apresenta vantagens como simplicidade de montagem, ausência de misturadores mecânicos, maior estabilidade quando submetido a altas cargas, seja de substrato ou de compostos tóxicos, e alta capacidade de recuperação após longo período inativo.

As características do RLF aqui descritas são coerentes com as características do processo ANAMMOX apresentadas na seção 3.3. Ademais, esse tipo de reator foi utilizado com sucesso por Strous et al. (1997), Tsushima et al. (2007), Zhang et al. (2010), Yang et al. (2011), Wang et al. (2013), Wang, Zhang e Yang (2016) e Wang et al (2016) em estudos do processo ANAMMOX com objetivos semelhantes aos que foram propostos nesta pesquisa.

Figura 1 - Esquema geral do sistema de tratamento utilizado na etapa 1

Fonte: Do autor, 2018

Figura 2 - Anéis de polipropileno de superfície rugosa

Fonte: Do autor, 2018

O reator preenchido com o material suporte possuía volume útil de 3,12 l, o θ_h teórico adotado foi de 2 dias e a alimentação do RLF se deu em fluxo ascensional, sendo realizada com o auxílio de uma bomba peristáltica com vazão de 1,56 l/d.

Antes da operação do RLF, o mesmo foi submetido a ensaio hidrodinâmico com base na metodologia descrita por Levenspiel (2000) para determinar o θ_h real e a qual modelo de dispersão o reator mais se assemelhava. O ensaio foi realizado com a função degrau e, como traçador, utilizou-se uma solução de cloreto de sódio (NaCl) a 10000 mg/l.

4.1.2 Substrato sintético

A composição do substrato sintético utilizado pode ser consultada nos quadros 1, 2 e 3, já o preparo do mesmo seguiu, basicamente, a metodologia que foi apresentada por Van de Graaf et al. (1996), salvo algumas adaptações, descritas no decorrer do texto, que visaram adequar tais métodos à realidade da presente pesquisa.

Quadro 1 - Composição do substrato sintético

Substância		Concentração inicial
Sulfato de amônio	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	330 mg/l (70 mgN/l)
Nitrito de sódio	NaNO_2	345 mg/l (70 mgN/l)
Bicarbonato de potássio	KHCO_3	500 mg/l (305 mgIC/l)
Sulfeto de sódio	$\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	0 mg/l (0 mgS/l)
Fosfato de potássio monobásico	KH_2PO_4	27,2 mg/l
Sulfato de magnésio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	300 mg/l
Cloreto de cálcio	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	180 mg/l
Solução de elementos traço I		1 ml
Solução de elementos traço II		1,25 ml

Fonte: Adaptado de Van de Graaf et al., 1996

Quadro 2 - Solução de elementos traço I

Substância		Concentração
Etilenodiamino tetra-acético	EDTA	5 g/l
Sulfato de ferro 2	FeSO_4	5 g/l

Fonte: Van de Graaf et al., 1996

Quadro 3 - Solução de elementos traço II

Substância		Concentração
Etilenodiamino tetra-acético	EDTA	15 g/l
Sulfato de zinco	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,43 g/l
Cloreto de cobalto 2	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,24 g/l
Cloreto de manganês 2	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,99 g/l
Sulfato de cobre 2	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,25 g/l
Molibdato de sódio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,22 g/l
Cloreto de Níquel 2	NiCl ₂ .6H ₂ O	0,19 g/l
Selenato de sódio	Na ₂ SeO ₄ .10H ₂ O	0,21 g/l
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	0,014 g/l

Fonte: Van de Graaf et al., 1996

As soluções de elementos traço I e II, bem como as soluções de MgSO₄.7H₂O a 0,5 M e de CaCl₂.2H₂O a 0,5 M, eram preparadas previamente, sendo cada uma delas transferida para um frasco tipo âmbar. Fluxionava-se gás N₂ (100%) por 20 minutos (sendo 5 minutos no *headspace*) em todos os quatro frascos e, posteriormente, os mesmos eram vedados e esterilizados a 120 °C em vapor úmido por 20 minutos. Essas soluções permaneciam estocadas sob refrigeração a 4 °C até o momento da mistura com os demais componentes do substrato sintético.

A preparação do substrato sintético e consequente alimentação do reator era feita duas vezes por semana, para evitar problemas ocasionados por acúmulo ou consumo de substâncias que inibem o desenvolvimento dos microrganismos responsáveis pelo processo.

Primeiramente, uma solução era preparada adicionando os componentes (NH₄)₂SO₄, NaNO₂, KHCO₃, Na₂S.9H₂O e KH₂PO₄ de acordo com as concentrações mostradas no quadro 1. Na sequência, eram retirados, para cada litro de solução, 7,05 ml da mesma e, posteriormente, o conteúdo restante era transferido para um frasco Schott, utilizado como recipiente de alimentação. Esse frasco era vedado e autoclavado a 120 °C em vapor úmido por 20 minutos. Após o resfriamento da solução, para se atingir todas as concentrações desejadas dos quadros 1, 2 e 3, eram adicionados, para cada litro de substrato sintético, em condições de assepsia em capela de fluxo laminar e bico de Bunsen:

- 2,4 ml da solução de MgSO₄.7H₂O a 0,5 M;
- 2,4 ml da solução de CaCl₂.2H₂O a 0,5 M;
- 1,0 ml da solução de elementos traço I;

d) 1,25 ml da solução de elementos traço II.

Após a mistura de todos os componentes do substrato sintético, o pH do mesmo era corrigido com o uso de soluções de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,5 M e ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 1 M, a fim de se obter o pH desejado de 8.

Por fim, gás N₂ (100%) era fluxionado no frasco tipo Schott por 45 minutos, sendo 5 minutos na atmosfera do frasco. Além disso, durante a operação do reator, uma bolsa de coleta de urina contendo gás N₂ ficava conectada ao recipiente de alimentação, a fim de que o gás citado preenchesse o volume do frasco à medida que o líquido do recipiente esvaziava.

4.1.3 Análises físico-químicas e microbiológicas

Na caracterização do lodo foram determinados: sólidos totais (ST), sólidos totais fixos (STF) e voláteis (STV), sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos fixos (SSF) e voláteis (SSV), NH₄⁺, NO₂⁻, NO₃⁻, demanda química de oxigênio (DQO), temperatura, pH, número de unidades formadoras de colônias (UFC) de bactérias heterotróficas e número mais provável (NMP) de bactérias desnitrificantes.

O monitoramento do RLF, que era feito três vezes por semana tanto para o afluente quanto para o substrato, consistia na determinação de: NH₄⁺, NO₂⁻, NO₃⁻, sulfato (SO₄²⁻), S²⁻, temperatura, pH e OD. Como foi utilizado substrato sintético preparado de acordo com a seção 4.1.2, a ausência de matéria orgânica no meio eliminava a necessidade da determinação frequente de DQO e o nitrogênio total era estimado pela soma das três formas de nitrogênio supracitadas, sem a necessidade de determinar o NTK.

O pH era determinado por potenciômetro e o OD por oxímetro. A temperatura, que era mantida em 30 °C por meio de câmara climatizada, era verificada de tempos em tempos por meio de um termopar.

A série de sólidos era determinada pelo método gravimétrico, o NH₄⁺ pelo método espectrofotométrico do fenol, NO₂⁻ pelo método espectrofotométrico da sulfanilamida, NO₃⁻ pelo método do ácido cromotrópico, DQO pelo método espectrofotométrico, SO₄²⁻ pelo método turbidimétrico e S²⁻ pelo método espectrofotométrico do azul de metileno. Com exceção do NO₃⁻, cujo método do ácido cromotrópico é baseado em West e Ramachandran (1996), todas as demais análises físico-químicas citadas baseiam-se no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA/AWWA/WEF, 2005).

A número de UFC de bactérias heterotróficas do lodo seguiu a metodologia de APHA/AWWA/WEF (2005), conforme descrito por Mendonça (2002). Utilizou-se o meio de

cultura *Plate Count Agar*, a técnica *Spread Plate* e a contagem se deu com o auxílio de um contador de colônias.

Já a determinação do NMP de bactérias desnitrificantes do lodo seguiu a metodologia de Tiedje (1984), adaptada para amostras de efluentes líquidos (visto que o método foi desenvolvido para amostras de solo), conforme descrito por Mendonça (2002). Utilizou-se o meio de cultura *Nutrient Broth* com adição de nitrato de sódio (NaNO_3) e a contagem se deu pela combinação das respostas em tubos positivos, utilizando tabela padrão de probabilidade, que também pode ser encontrada em APHA/AWWA/WEF (2005).

4.1.4 Inóculo

O lodo foi coletado em uma lagoa aerada proveniente da ETE da indústria “Incofap”, fabricante de ração animal no município de Araraquara (São Paulo). As características desse lodo estão presentes no quadro 4.

O processo de inoculação seguiu Costa (2013) com adaptações. O lodo de origem foi centrifugado a 3600 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O sedimento remanescente foi adicionado ao substrato sintético sem os componentes $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e NaNO_2 e submetido novamente a centrifugação (esse processo foi feito duas vezes). Logo, a preparação do lodo para inóculo consistiu de: uma centrifugação apenas com o lodo de origem e duas centrifugações da mistura do sedimento remanescente com o substrato sintético sem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e NaNO_2 .

O sedimento remanescente final foi adicionado ao substrato sintético (ainda sem os substratos NH_4^+ e NO_2^-) de modo a manter uma concentração de SSV de, aproximadamente, 3,2 g/l no RLF. Essa mistura (lodo com substrato sintético) permaneceu em recirculação no reator durante 5 dias. O objetivo de não utilizar NH_4^+ e NO_2^- com o inóculo era eliminar a matéria orgânica e os compostos nitrogenados presentes no meio líquido que pudessem favorecer o desenvolvimento das bactérias heterotróficas presentes no lodo.

Após esse período de 5 dias, o reator passou a ser alimentado normalmente, duas vezes por semana, com o substrato sintético descrito na seção anterior, ou seja, com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e NaNO_2 e sem adição de lodo.

Quadro 4 - Caracterização do lodo utilizado como inóculo da etapa 1

Parâmetro	Valor
ST (g/l)	3,955
STF (g/l)	0,740
STV (g/l)	3,215
SS (g/l)	1,255
SSF (g/l)	0,010
SSV (g/l)	1,245
NH ₄ ⁺ (mg/l)	1250
NO ₂ ⁻ (mg/l)	2,02
NO ₃ ⁻ (mg/l)	13,0
DQO (mg/l)	2576
Temperatura (°C)	33,4
pH	8,37
Bactérias heterotróficas (UFC/l)	6,80E+11
Bactérias desnitrificantes (NMP/l)	3,60E+10

Fonte: Do autor, 2018

4.1.5 Complemento do monitoramento do RLF

Após 50 dias de operação, a fim de compreender melhor os processos desenvolvidos no reator contínuo, um teste foi realizado em frascos de antibiótico simulando as condições operacionais do RLF, mas com condições bem mais controladas de anaerobiose.

Os frascos possuíam 50 ml, sendo 25 ml destinados ao *headspace*; o substrato sintético utilizado foi o mesmo descrito na seção 4.1.2 e a concentração de inóculo foi a mesma da seção 4.1.4; gás N₂ (100%) foi fluxionado nos frascos durante 3 min, sendo 20 s no *headspace*.

O aparato descrito nesta seção pode ser visualizado pela figura 3, ao passo que, na seção 5.1.2, encontram-se, com mais detalhes, os processos físico-químicos que levaram à necessidade de realização do teste.

Figura 3 - Frascos que simularam as condições operacionais do RLF

Fonte: Do autor, 2018

4.1.6 Análises de biologia molecular

Três diferentes amostras de biomassa foram destinadas as análises de biologia molecular:

1ª) MSE 1: retirada da lagoa aerada proveniente da ETE da indústria “Incofap”, ou seja, trata-se do lodo original, antes do mesmo ser utilizado como inóculo do RLF;

2ª) MSE 2: retirada das mangueiras do RLF onde, por meio das análises físico-químicas, verificou-se um aparente processo de nitrificação parcial;

3ª) MSE 3: retirada de frascos de antibiótico que simulavam a operação do RLF em condições mais estritas de anaerobiose onde, por meio das análises físico-químicas, verificou-se aparente processo de desnitrificação heterotrófica.

Mais detalhes dos processos recém citados estão presentes na seção 5.1.2.

Para as três diferentes amostras, o ácido desoxirribonucleico (DNA) foi extraído pelo método do fenol-clorofórmio (GRIFFITHS et al., 2000) e purificado com o kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* da “GE Healthcare” seguindo o protocolo do fabricante.

As concentrações de DNA purificado foram obtidas em ng/μl mediante leitura em espectrofotômetro, sendo elas: 46 ng/μl (razão 260nm/280nm = 2,13) para a amostra MSE 1, 36,5 ng/μl (razão 260nm/280nm = 2,14) para a amostra MSE 2 e 36,7 ng/μl (razão 260nm/280nm = 1,95) para a amostra MSE 3.

Cerca de 30 μl de cada uma das três amostras de DNA purificado e armazenado em meio Tris-EDTA (TE) foram enviados para a empresa “Mr. DNA”, localizada na cidade de Shallowater (Texas), nos Estados Unidos. As amostras foram destinadas ao ensaio *Bacterial tag encoded FLX amplicon pyrosequencing* (bTEFAP) constituído de: reação em cadeia da

polimerase (*polymerase chain reaction* - PCR) e sequenciamento 16s com *primers* 515F/806R utilizando a tecnologia Illumina MiSeq com 20000 leituras por ensaio.

4.2 ETAPA 2

Referente aos objetivos estabelecidos na seção 2.3.

4.2.1 Instalação experimental

A instalação a ser descrita nesta seção encontra-se na figura 4.

Figura 4 - Sistema de tratamento utilizado na etapa 2

Fonte: Do autor, 2018

Para os reatores em batelada, foram utilizados frascos do tipo Schott de 500 ml, sendo 250 ml destinados ao *headspace*. Suas tampas de butila possuíam duas mangueiras de poliuretano acopladas que permitiam, por meio de torneiras de seringa intercambiáveis, a entrada e saída de gás argônio, bem como a coleta de efluente para as análises de

monitoramento. O gás argônio foi fluxionado durante 8 min no líquido e 1 min no *headspace* para manter o ambiente anaeróbio.

Os reatores foram alimentados com substrato sintético cujo pH inicial foi ajustado para 8 e permaneceram sob agitação constante de aproximadamente 130 rpm. A agitação foi obtida com o auxílio de um *shaker* mantido no escuro com temperatura de aproximadamente 35 °C, alcançada por meio de uma câmara climatizada.

4.2.2 Planejamento fatorial

Para encontrar a relação ideal entre as concentrações de bicarbonato e sulfeto utilizadas pelas bactérias ANAMMOX, empregou-se um planejamento fatorial do tipo 2^2 , sendo dois fatores e dois níveis: HCO_3^- (5 mg/l e 125 mg/l) e S^{2-} (0 mg/l e 32 mg/l).

Os níveis foram escolhidos com base na literatura apresentada na seção 3.3. O estudo de Kimura, Isaka e Kazama (2011), assim como o de Yang et al. (2010), foram a base de escolha dos níveis de bicarbonato, enquanto os estudos de Van de Graaf et al. (1996), Jin et al. (2013) e Dapena-Mora et al. (2007) foram a base para a escolha dos níveis de sulfeto.

A relação $\text{NH}_4^+:\text{NO}_2^-$ foi mantida em 1:1, por já estar bem estabelecida na literatura.

Para a montagem da matriz de planejamento, o bicarbonato foi considerado o fator x_1 e o sulfeto o fator x_2 , já os níveis foram codificados por meio da equação 11.

$$\text{Nível codificado} = \frac{x_i - \bar{x}}{\frac{\Delta x}{2}} \quad (11)$$

Sendo que x_i é o valor do i-ésimo nível, $\bar{x}$ é o valor médio dos níveis e Δx é a amplitude dos mesmos.

A matriz de planejamento obtida encontra-se no quadro 5, por onde observa-se que o fatorial 2^2 resultou em quatro combinações utilizando os níveis extremos (+1 e -1) e essas foram realizadas em duplicata; ademais, três ensaios foram realizados nos níveis centrais (0 e 0), totalizando onze ensaios. Para fins de controle e comparação, um décimo segundo reator foi alimentado seguindo exatamente a composição clássica do meio mineral autotrófico proposto por Van de Graaf et al. (1996).

Quadro 5 - Matriz de planejamento

Ensaio	Bicarbonato (mg/l)	Sulfeto (mg/l)	x ₁	x ₂
1	125	32	+1	+1
2	125	32	+1	+1
3	5	0	-1	-1
4	5	0	-1	-1
5	125	0	+1	-1
6	125	0	+1	-1
7	5	32	-1	+1
8	5	32	-1	+1
9	65	16	0	0
10	65	16	0	0
11	65	16	0	0

Fonte: Do autor, 2018

Após a aplicação do planejamento fatorial e a obtenção dos dados em laboratório, a resposta real (y) escolhida para o tratamento estatístico se baseou na análise gráfica dos perfis de nitrogênio construídos ao longo do experimento. Esses perfis são apresentados na seção 5.2.1.

A partir de então, o tratamento estatístico seguiu, predominantemente, a metodologia descrita por Barros Neto, Scarminio e Bruns (2007), com a utilização das equações descritas a seguir.

Para o cálculo dos efeitos, utilizou-se a equação 12

$$\text{Efeito} = \bar{y}_+ + \bar{y}_- \quad (12)$$

Sendo $\bar{y}_+$ a resposta média obtida no nível superior e $\bar{y}_-$ a resposta média obtida no nível inferior de um determinado fator.

A variância agregada (s^2_{agregada}) foi calculada pela equação 13.

$$s^2_{\text{agregada}} = \frac{\sum v_i \cdot s_i^2}{\sum v_i} \quad (13)$$

Em que s_i^2 é a variância da amostra de y referente a i -ésima combinação; e v_i é o número de graus de liberdade da amostra de y referente a i -ésima combinação. O valor de v_i é igual a $n_i - 1$; sendo n_i o tamanho da amostra de y referente a i -ésima combinação ou, em outras palavras, o número de repetições de cada combinação.

A variância do efeito (s_{efeito}^2) foi calculada pela equação 14.

$$s_{\text{efeito}}^2 = \frac{1}{n} \cdot \sum \left(\frac{s_i^2}{n_i} \right) \quad (14)$$

Em que n é o número de combinações.

Como o número de repetições realizadas para cada combinação foi o mesmo para todas as combinações ($n_i = 2$), n_i era um valor constante e pôde ser retirado do somatório da equação 14, além disso, a variância agregada calculada pela equação 13 tornou-se a simples média aritmética das variâncias de cada combinação, ou seja:

$$s_{\text{efeito}}^2 = \frac{1}{n_i} \cdot \frac{1}{n} \cdot \sum s_i^2$$

e

$$s_{\text{agregada}}^2 = \frac{1}{n} \cdot \sum s_i^2$$

Sendo assim, a equação 14 foi reduzida a:

$$s_{\text{efeito}}^2 = \frac{1}{n} \cdot \sum \left(\frac{s_i^2}{n_i} \right) = \frac{1}{n_i} \cdot \frac{1}{n} \sum s_i^2 = \frac{s_{\text{agregada}}^2}{n_i}$$

Na avaliação da significância dos efeitos, $t_{\text{calculado}}$ foi obtido pela equação 15.

$$t_{\text{calculado}} = \frac{\text{Efeito}}{S_{\text{efeito}}} \quad (15)$$

Para a construção do modelo estatístico, utilizou-se a equação geral de um planejamento fatorial 2², dado pela equação 16.

$$y_{\text{calculado}} = b_0 + b_1 \cdot x_1 + b_2 \cdot x_2 + b_{12} \cdot x_1 \cdot x_2 \quad (16)$$

Sendo $y_{\text{calculado}}$ a resposta estimada a partir do modelo e b_0 , b_1 , b_2 e b_{12} os coeficientes do mesmo. O cálculo de b_0 se deu pela média aritmética de todas as respostas obtidas nos 11 ensaios, ou seja, foi a média global ($\bar{y}_{\text{global}}$). Já os coeficientes b_1 , b_2 e b_{12} foram obtidos dividindo os efeitos das variáveis x_1 , x_2 e $x_1 x_2$ pelo número de níveis elevado ao de fatores menos 1. Neste caso, esse divisor foi igual a 2.

Para a análise da variância (ANOVA), foram calculados a soma quadrática do modelo (SQ_{modelo}), dos resíduos ($SQ_{\text{resíduos}}$), a soma quadrática total (SQ_{total}), da falta de ajuste ($SQ_{\text{falta de ajuste}}$) e do erro puro ($SQ_{\text{erro puro}}$) por meio das equações 17, 18, 19, 20 e 21, respectivamente.

$$SQ_{\text{modelo}} = \sum \left(y_{\text{calculado}} - \bar{y}_{\text{global}} \right)^2 \quad (17)$$

$$SQ_{\text{resíduos}} = \sum \left(y - \bar{y}_{\text{calculado}} \right)^2 \quad (18)$$

$$SQ_{\text{total}} = SQ_{\text{modelo}} + SQ_{\text{resíduos}} \quad (19)$$

$$SQ_{\text{falta de ajuste}} = \sum \left(y_{\text{calculado}} - \bar{y}_i \right)^2 \quad (20)$$

$$SQ_{\text{erro puro}} = \sum \left(y - \bar{y}_i \right)^2 \quad (21)$$

Em que $\bar{y}_i$ é a média entre as repetições da i -ésima combinação.

Já os graus de liberdade de cada soma quadrática foram calculados da seguinte forma:

- Para SQ_{modelo} = número de coeficientes – 1;
- Para $SQ_{\text{resíduos}}$ = número total de observações - número de coeficientes;
- Para $SQ_{\text{falta de ajuste}}$ = número de ensaios distintos - número de coeficientes;
- Para $SQ_{\text{erro puro}}$ = número total de observações - número de ensaios distintos.

4.2.3 Substrato sintético

O mesmo descrito na seção 4.1.2 considerando, obviamente, a matriz de planejamento do quadro 5 para os onze ensaios.

4.2.4 Análises físico-químicas

Para o lodo, determinou-se a concentração de ST (22,255 g/l), STF (10,63 g/l) e STV (11,625 g/l). Já o monitoramento dos reatores se deu por meio da determinação de NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- e pH. A pressão nos frascos era checada, de tempos em tempos, por meio de um barômetro digital. A temperatura fornecida no display da câmara era verificada com um termômetro de mercúrio. E o OD foi checado via oxímetro no início e no final do monitoramento, após a abertura dos frascos do tipo Schott. A metodologia de determinação dos parâmetros citados nesta seção é a mesma descrita na seção 4.1.3.

4.2.5 Inóculo

O lodo foi coletado em um reator experimental contínuo com estável atividade ANAMMOX proveniente da “Embrapa Suínos e Aves”, localizada no município de Concórdia (Santa Catarina). Tal biomassa foi enriquecida por Shierholt Neto et al. (2006) a partir do lodo proveniente de uma lagoa experimental desativada e de um decantador de lodos ativados, ambos da “Embrapa Suínos e Aves”. As concentrações de ST, STF e STV determinadas para esse lodo foram, respectivamente, 22,255 g/l, 10,63 g/l e 11,625 g/l.

Devido à estabilidade da atividade ANAMMOX e da forma granular do lodo coletado, o processo de inoculação dos reatores em batelada se limitou em peneirar o lodo e preencher os frascos do tipo Schott de modo a manter uma concentração de STV de, aproximadamente, 2,3 g/l nos mesmos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção encontram-se os principais dados obtidos na pesquisa e como se deu o tratamento e interpretação dos mesmos. O autor se reservou a descrever, em texto, o que é essencial para o real significado da pesquisa, mas, caso o leitor tenha interesse, todos as planilhas de cálculo constam, na íntegra, do apêndice.

5.1 ETAPA 1

Contempla os dados obtidos por meio da metodologia descrita na seção 4.1 visando a realização dos objetivos estabelecidos na seção 2.2, ou seja, esta seção é referente a operação do reator contínuo.

5.1.1 Ensaio hidrodinâmico

No tratamento dos dados hidrodinâmicos, a curva da função degrau foi derivada a fim de convertê-la na função pulso, como mostra a figura 5.

Figura 5 - Perfil do traçador obtido no ensaio hidrodinâmico

Fonte: Do autor, 2018

O θ_h real obtido foi de 2914,71 min, muito próximo ao θ_h teórico (2880 min), indicando que não houve atraso significativo ou qualquer outro tipo de anomalia de

escoamento, como canalizações, regiões de estagnação, recirculação interna ou caminhos paralelos. O θ_h de 2 dias foi adotado com base no trabalho de Wang et al. (2013) e Wang et al. (2016), que também enriqueceram e avaliaram o comportamento do processo ANAMMOX em um RLF.

O número de dispersão ($D/\mu L$) calculado no tratamento dos dados hidrodinâmicos foi de 0,00175, sendo ele menor que 0,01, caracterizando dispersão de pequena intensidade. A figura 6 apresenta a curva padronizada para a função pulso (E_θ) obtida no ensaio e o modelo de dispersão mais adequado para descrever o reator.

Figura 6 - Curva E_θ e modelo de dispersão de pequena intensidade obtidos no ensaio

Fonte: Do autor, 2018

Para mais resultados obtidos no ensaio hidrodinâmico, consultar o apêndice.

5.1.2 Monitoramento do RLF

A figura 7 apresenta os perfis de nitrogênio dos 101 dias de operação do reator contínuo. É notável que, entre os dias 10 e 50, houve aumento da concentração de nitrito concomitante a redução da concentração de nitrogênio amoniacal. A tabela 1 apresenta, numericamente, um resumo dos dados obtidos nesse período.

Figura 7 - Perfil de nitrogênio durante a operação do reator contínuo

Fonte: Do autor, 2018

Tabela 1 - Resumo dos dados de nitrogênio obtidos entre os dias 10 e 50

Formas de nitrogênio	Média inicial (mg/l)	Média final (mg/l)	Produção média (mg/l)	Consumo médio (mg/l)	Eficiência de remoção média (%)
Amoniacal	67,23	29,30	-	37,93	56,42
Nitrito	70,94	94,50	23,56	-	-
Nitrato	0	0,69	0,69	-	-
Total	138,17	124,49	24,25	37,93	9,90

Fonte: Do autor, 2018

O comportamento observado no início da operação do RLF não é o esperado em estudos de enriquecimento da biomassa ANAMMOX, como pode ser verificado em trabalhos como o de Araújo et al. (2010), Wang et al. (2012) e Wang et al. (2016). Todos esses autores identificaram, ao longo da operação de seus reatores, três fases muito bem definidas durante o enriquecimento: a de desnitrificação heterotrófica, a de redução da desnitrificação heterotrófica e a de aparecimento da atividade ANAMMOX.

A desnitrificação heterotrófica é esperada nos primeiros dias de operação, pois as bactérias aeróbias presentes no lodo utilizado como inóculo são submetidas a um novo ambiente, o anaeróbio. Essa mudança causa a *lise* (quebra) celular dessas bactérias, liberando compostos orgânicos e nitrogênio amoniacal no meio. Os compostos orgânicos são utilizados como doadores de elétrons endógenos e o nitrito comoceptor final de elétrons. Como resultado, nessa fase, há um aumento na concentração de nitrogênio amoniacal e redução da concentração de nitrito.

Após alguns dias de operação, os compostos orgânicos tendem a acabar, já que o substrato sintético utilizado como alimento para a biomassa ANAMMOX é um meio mineral autotrófico, o que leva a redução gradativa da desnitrificação heterotrófica. Como resultado, nessa fase, a concentração de nitrogênio amoniacal efluente fica próxima à do afluente, enquanto a concentração de nitrito, não mais reduzido a N_2 , tende a aumentar.

Após a exaustão dos compostos orgânicos, o meio mineral autotrófico, aliado às condições de anaerobiose, pH e temperatura adotados, tende a favorecer as bactérias ANAMMOX, dando início à terceira e última fase do período de enriquecimento, caracterizada pela remoção simultânea de nitrogênio amoniacal e nitrito. É a partir dessa fase que os autores supracitados iniciam a progressão de carga, aumentando as concentrações afluentes de NH_4^+ e NO_2^- , respeitando a razão estequiométrica de 1:1 a 1:1,5 ou diminuindo o θ_h .

Apesar de nenhuma das três fases reportadas por Araújo et al. (2010), Wang et al. (2012) e Wang et al. (2016) terem sido observadas na presente pesquisa, a mesma apresenta certa semelhança com o trabalho de Fdz-Polanco et al. (2001). Esses autores, tratando vinhaça com altas concentrações de NTK e SO_4^{2-} em um reator de leito fluidizado, observaram comportamento até então desconhecido em que nitrogênio e enxofre foram removidos simultaneamente sob condições anaeróbias. Como uma primeira aproximação para esse novo processo, Fdz-Polanco et al (2001) postularam as reações de oxi-redução definidas pelas equações 22, 23 e 24.

Nota-se que as equações 23 e 24 são, respectivamente, reações de desnitrificação autotrófica e ANAMMOX, enquanto a equação 22 envolve oxidação de NH_4^+ a NO_2^- com simultânea redução de SO_4^{2-} a S^{2-} , o que pode explicar o perfil de nitrogênio anterior ao quinquagésimo dia de operação do RLF desta pesquisa. No entanto, ao verificar o perfil de enxofre resultante da operação desse mesmo reator, apresentado na figura 7, vemos que não houve mudanças significativas nas concentrações iniciais e finais de SO_4^{2-} e S^{2-} .

Pela figura 8, é possível notar que, a partir de um determinado tempo (32 dias) de operação, a concentração de sulfato inicial reduziu consideravelmente. Isso ocorreu, pois o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ utilizado no substrato sintético foi substituído por cloreto de amônio (NH_4Cl), justamente pensando em diminuir o fornecimento de SO_4^{2-} e evitar o suposto processo observado por Fdz-Polanco (2001). Entretanto, ao comparar a figura 8 com a figura 7, nota-se que a mudança de reagente não surtiu efeito e o aumento da concentração de nitrito concomitante à redução da concentração de nitrogênio amoniacal continuou até o dia 50. Por essas análises, concluiu-se que o processo observado na presente pesquisa não era o mesmo observado por Fdz-Polanco et al (2001).

Figura 8 - Perfil de enxofre ao longo da operação do reator contínuo

Fonte: Do autor, 2018

Outra medida tomada para estudar o perfil de nitrogênio da figura 7 foi realizar um teste em frascos de antibiótico, simulando as condições operacionais do RLF, mas com condições bem mais controladas de anaerobiose, como foi descrito na seção 4.1.5.

O intuito era monitorar os frascos ao longo de um mês, determinando as formas de nitrogênio presentes no meio com a mesma frequência com que se monitorava o RLF, porém, três dias após inoculá-los, todo o nitrito afluyente (70 mgN/l) havia sido consumido, enquanto o nitrogênio amoniacal permaneceu aproximadamente constante, indicando processo de desnitrificação heterotrófica.

O teste mostrou que, se o RLF estivesse operando em condições de estrita anaerobiose, como a dos frascos de antibiótico, não ocorreria oxidação de NH_4^+ e redução de NO_2^- . Sendo assim, a provável explicação para essa reação de oxi-redução no RLF é que, de alguma forma, oxigênio estava entrando no sistema de tratamento mostrado na figura 9.

Figura 9 - Sistema de tratamento utilizado na etapa 1

Fonte: Do autor, 2018

Nota-se que, com exceção das mangueiras acopladas à tampa de butila do frasco Schott, todas as demais utilizadas eram de silicone. Esse tipo de material não é totalmente impermeável, pois impede a entrada de líquidos, mas seus poros permitem a entrada de ar no interior da mangueira. Autores como Camiloti (2015) não só tomaram conhecimento desse fato, como fizeram uso da mangueira de silicone como membrana tubular para microaeração.

A figura 10 mostra a mangueira utilizada nesta pesquisa com mais detalhes; trata-se de uma fotografia da mangueira de sucção (a direita) sendo comparada com uma mangueira nova (a esquerda).

Figura 10 - Acúmulo de biomassa na mangueira de silicone

Fonte: Do autor, 2018

É possível notar que houve acúmulo de biomassa na mangueira de silicone, o que reforça a assertiva de que esse material foi o responsável pela entrada de oxigênio no sistema de tratamento. O acúmulo pode ser explicado pelos 5 dias em que a mistura de lodo e substrato sintético permaneceram em recirculação no sistema de tratamento para inocular o RLF, somado a vazão muito baixa utilizada para manter o θ_h de 2 dias durante a operação do reator.

Com o intuito de dar continuidade ao enriquecimento da biomassa ANAMMOX, todas as mangueiras de silicone foram substituídas por mangueiras de poliuretano. As primeiras análises físico-químicas realizadas após a troca ocorreram no dia 50 e, pela figura 7, verifica-se que, a partir deste tempo, não houve mais nitrificação.

Outra medida adotada a fim de garantir ao máximo a anaerobiose do sistema foi adicionar sulfito de sódio (Na_2SO_3) no substrato sintético. A adição teve início no dia 54 e o cálculo da massa de Na_2SO_3 necessário era feito com base na estequiometria da reação $\text{Na}_2\text{SO}_3 + \frac{1}{2}\text{O}_2 \rightarrow \text{Na}_2\text{SO}_4$ e com a concentração de OD presente na água utilizada para o preparo do substrato sintético.

Pela figura 7, verifica-se que até o dia 72 não foram observados nenhum sinal das três fases do enriquecimento ANAMMOX já descritas nesta seção. Por esse motivo, o reator foi novamente inoculado seguindo os procedimentos descritos na seção 4.1.4, mas, dessa vez, diminuindo o tempo de recirculação da mistura de lodo e substrato sintético para 3 dias. Posteriormente, o substrato sintético passou a ser novamente o descrito nos quadros 1, 2 e 3 adicionando, para cada litro de substrato, 1 ml de solução de sulfato de hidrazina ($\text{N}_2\text{H}_4\text{H}_2\text{SO}_4$) a 100 mM e 1 ml de solução de cloridrato de hidroxilamina (NH_3OHCl) a 100 mM. De acordo com Third et al (2005), essas duas substâncias são intermediárias do processo ANAMMOX, podendo ajudar a acelerar a reação e diminuir o tempo para enriquecer a biomassa. Essas novas soluções eram preparadas previamente ao substrato sintético, seguindo os procedimentos já descritos na seção 4.1.2 para esterilizar, criar ambiente anaeróbico e estocá-las.

Observando a figura 8, verifica-se que, após o dia 93, houve uma nova queda na concentração de sulfato inicial. Isso ocorreu pois o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi novamente substituído por NH_4Cl devido à falta do primeiro, não afetando em nada o comportamento dos perfis de nitrogênio da figura 7. A operação do RLF continuou até o dia 101, quando a etapa 1 da pesquisa foi interrompida, já que não houve aparecimento da atividade ANAMMOX e o tempo para desenvolvimento da pesquisa era limitado.

5.1.3 Análises de biologia molecular

O ensaio bTEFAP detectou três diferentes reinos nas amostras MSE 1 e MSE 3 e cinco diferentes reinos na amostra MSE 2. Houve nítido predomínio do reino *Bacteria*, como pode ser visto na tabela 2 e, por isso, tal reino é o foco da discussão nesta seção.

Já a tabela 3 apresenta os 22 filos identificados dentro do reino *Bacteria* e é possível observar que o filo *Planctomycetes*, a qual pertencem as bactérias ANAMMOX, estava presente na amostra de lodo utilizado como inóculo do RLF (MSE 1), apesar da pequena abundância. Entretanto, apenas uma espécie dentro desse filo foi identificada, sendo ela *Planctomyces spp*, não associada aos grupos ANAMMOX apresentados na seção 3.3.

Tabela 2 - Reinos detectados nas três amostras de biomassa estudadas

Reino	Abundância relativa		
	MSE 1 (%)	MSE 2 (%)	MSE 3 (%)
<i>Eukaryota</i>	0,000985668	0,120327448	0,001036506
<i>Viridiplantae</i>	0	0,002958872	0
<i>Fungi</i>	0	0,002958872	0
<i>Bacteria</i>	98,89802275	99,83035802	98,31049566
<i>Archaea</i>	1,100991582	0,043396785	1,688467837

Fonte: Do autor, 2018

Tabela 3 - Filos identificados dentro do reino *Bacteria*

Filo	Abundância relativa		
	MSE 1 (%)	MSE 2 (%)	MSE 3 (%)
<i>Acidobacteria</i>	0	0,005927799	0
<i>Actinobacteria</i>	0,334874821	8,184315043	1,275725371
<i>Bacteroidetes</i>	14,30792537	13,64381829	11,97811235
<i>Chlamydiae</i>	0	0,032602897	0
<i>Chlorobi</i>	0,937848828	0,510778715	1,407515182
<i>Chloroflexi</i>	0,24716951	0,016795432	0,689524291
<i>Cloacimonetes</i>	3,018856642	0,06322986	5,954790823
<i>Cyanobacteria</i>	0	0,093856824	0
<i>Deferribacteres</i>	0,144514432	0,0029639	0,25830803
<i>Dictyoglomi</i>	0,002989954	0	0,009488866
<i>Fibrobacteres</i>	0,004983256	0,813096485	0,006325911
<i>Firmicutes</i>	16,47265189	0,352704064	21,73582996
<i>Fusobacteria</i>	0,132554616	0,000987967	0,040064103
<i>Gemmatimonadetes</i>	0	0,018771365	0
<i>Ignavibacteriae</i>	0,000996651	0,000987967	0,006325911
<i>Planctomycetes</i>	0,002989954	0	0,005271592
<i>Proteobacteria</i>	55,14571041	76,07638957	47,4854504
<i>Spirochaetes</i>	0,00797321	0,03457883	0,022140688
<i>Synergistetes</i>	9,07650295	0,134363453	9,003879892
<i>Tenericutes</i>	0,134547919	0	0,109649123
<i>Thermotogae</i>	0,008969861	0	0
<i>Verrucomicrobia</i>	0,017939723	0,013831532	0,011597503

Fonte: Do autor, 2018

Por outro lado, o filo de maior abundância nas três amostras foi o *Proteobacteria*, que é de grande importância no estudo da remoção de nitrogênio em águas residuárias, já que nele encontram-se os principais gêneros de BOA (*Nitrosomonas*, *Nitrosospira* e *Nitrosococcus*) e BON (*Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrococcus* e *Nitrospina*), bem como boa parte dos gêneros de bactérias desnitrificantes heterotróficas (*Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium*, *Hyphomicrobium*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Spirillum*, *Vibrio* e *Paracoccus*) e autotróficas (*Paracoccus*, *Thiobacillus* e *Thiomicrospira*). A figura 11 apresenta os gêneros recém citados que foram identificados nas amostras estudadas na presente pesquisa.

Figura 11 - Gêneros de importância na remoção de nitrogênio do filo *Proteobacteria*

Fonte: Do autor, 2018

Os gêneros de bactérias nitrificantes *Nitrosospira*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrococcus* e *Nitrospina* não foram identificados nas amostras, assim como os gêneros de bactérias desnitrificantes *Agrobacterium*, *Chromobacterium*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Spirillum*, *Vibrio* e *Thiomicrospira*.

Gêneros de bactérias desnitrificantes de outros filos como *Arthrobacter* (Filo *Actinobacteria*), *Bacillus* (Filo *Fermicutes*), *Corynebacterium* (Filo *Actinobacteria*),

Flavobacterium (Filo *Bacteroidetes*) e *Propionibacterium* (Filo *Actinobacteria*) foram identificados, mas com abundância pouco significativa.

A figura 11 mostra que o gênero de maior abundância presente na amostra MSE 2 é o *Nitrosomonas*. Não por acaso, a amostra MSE 2 é referente a biomassa retirada das mangueiras de silicone onde havia sido observado, por meio das análises físico-químicas, aumento da concentração de nitrito concomitante à redução da concentração de nitrogênio amoniacal, confirmando ainda mais a assertiva de que houve nitrificação ou nitrificação parcial.

Enquanto isso, os gêneros de maior abundância na amostra MSE 3 foram o *Acinetobacter* e o *Pseudomonas*. A amostra MSE 3 é referente a biomassa retirada dos frascos de antibiótico utilizados no teste que simulava o RLF em condições estritas de anaerobiose, o que corrobora com o processo de desnitrificação heterotrófica observado nesses frascos.

Diante do exposto, verifica-se que os resultados das análises de biologia molecular foram coerentes e complementares aos resultados das análises físico-químicas realizadas durante a operação do reator contínuo da etapa 1.

5.2 ETAPA 2

Contempla os dados obtidos por meio da metodologia descrita na seção 4.2 visando à realização dos objetivos estabelecidos na seção 2.3, ou seja, esta seção é referente à operação dos reatores em batelada.

5.2.1 Resposta do planejamento fatorial

A resposta real escolhida para o tratamento estatístico do planejamento fatorial foi a eficiência de remoção de nitrogênio. No entanto, conforme descrito na seção 4.2.4, as análises físico-químicas foram realizadas de tempos em tempos, o que gerou um perfil de concentração de nitrogênio para cada um dos 12 reatores (11 ensaios + reator de controle e comparação). Sendo assim, foi preciso escolher, nos perfis obtidos, qual o valor de eficiência mais adequado para ser usado como resposta de cada ensaio. Para isso, uma análise gráfica foi feita com base nas figuras 12, 13, 14, 15, 16 e 17, referentes a cada um dos perfis supracitados.

Figura 12 - Perfil de nitrogênio da combinação $x_1 = +1$, $x_2 = +1$ (ensaios 1 e 2)

Fonte: Do autor, 2018

Figura 13 - Perfil de nitrogênio da combinação $x_1 = -1$, $x_2 = -1$ (ensaios 3 e 4)

Fonte: Do autor, 2018

Figura 14 - Perfil de nitrogênio da combinação $x_1 = +1$, $x_2 = -1$ (ensaios 5 e 6)

Fonte: Do autor, 2018

Figura 15 - Perfil de nitrogênio da combinação $x_1 = -1$, $x_2 = +1$ (ensaios 7 e 8)

Fonte: Do autor, 2018

Figura 16 - Perfil de nitrogênio utilizando $x_1 = 0$ e $x_2 = 0$ (ensaios 9, 10 e 11)

Fonte: Do autor, 2018

Figura 17 - Perfil de nitrogênio do reator de controle e comparação

Fonte: Do autor, 2018

Uma característica se mostrou presente em todos os ensaios: a partir de um determinado tempo de operação, NH_4^+ e NO_2^- deixaram de ser consumidos simultaneamente, se distanciando da razão teórica 1:1,32, o que descaracteriza o processo ANAMMOX. Esse fenômeno aconteceu, pois a biomassa utilizada como inóculo nesta etapa da pesquisa não era uma cultura pura, mas sim um consórcio microbiano, logo, outros processos estavam sujeitos a ocorrer paralelamente ao desejado.

Pelas figuras apresentadas, é fácil notar que, após a descaracterização do processo ANAMMOX, a concentração de NH_4^+ aumentou nos ensaios em que o sulfeto estava presente em seu nível superior (32 mg/l) e tendeu à estabilização nos demais ensaios. É provável que o aumento de NH_4^+ se deu pela *lise* celular das bactérias sob o efeito do sulfeto, o que também disponibilizou matéria orgânica para o meio. Isso explica a contínua queda de NO_2^- ; ele estava sendo removido via desnitrificação heterotrófica utilizando a matéria orgânica liberada como fonte de carbono. Outra possibilidade é a desnitrificação autotrófica utilizando o S^{2-} como doador de elétrons.

O efeito deletério do nível superior de sulfeto também pôde ser verificado por uma simples análise da coloração da biomassa ao abrir os reatores no final das 16 h de operação. Os grânulos de reatores sem sulfeto permaneceram com coloração avermelhada do início ao fim, enquanto reatores com 32 mg S^{2-} /l apresentaram nítido escurecimento da biomassa, como pode ser observado na figura 18. Trata-se de uma fotografia de um reator com combinação $x_1 = -1$, $x_2 = -1$ (a esquerda) e de um reator com combinação $x_1 = +1$, $x_2 = +1$ (a direita).

Figura 18 - Coloração da biomassa ANAMMOX ao final de dois ensaios distintos.

Fonte: Do autor, 2018

O fenômeno observado é coerente com o que foi reportado por Jetten et al. (1999); segundo os autores, as bactérias do grupo ANAMMOX possuem, quando ativas, cor vermelha

profunda, relacionada ao grupamento M (grupo prostético com um átomo de Fe^{2+}) presente na enzima hidroxilamina oxirredutase.

Em relação às curvas de eficiência de remoção de nitrogênio (representadas pelas linhas tracejadas nas figuras 12, 13, 14, 15, 16 e 17), verifica-se que elas estão em conformidade com os fenômenos descritos até aqui. Na ausência de sulfeto (figuras 13, 14 e 17), a estabilização da concentração de NH_4^+ e o total consumo de NO_2^- fizeram com que a eficiência de remoção tendesse à estabilização. Na presença de sulfeto em seu nível superior (figuras 12 e 15), o aumento gradativo de NH_4^+ fez com que a eficiência de remoção caísse e, provavelmente, continuaria caindo além das 16 h de operação, enquanto houvesse produção de NH_4^+ . Já nos três ensaios realizados nos níveis centrais (figura 16), apesar de não ser possível observar amonificação e sim uma tendência de estabilização do NH_4^+ , o efeito negativo do sulfeto na eficiência de remoção de nitrogênio continua nítido, porém, proporcional à menor quantidade utilizada nesses ensaios ($16 \text{ mgS}^{2-}/\text{l}$).

Os efeitos, tanto do sulfeto quanto do bicarbonato, descritos nesta seção de forma qualitativa e por meio de uma simples análise gráfica, serão quantificados na seção 5.2.2.

O que é possível concluir, de antemão, é que o tempo de operação se mostrou um importante parâmetro para selecionar as bactérias ANAMMOX do lodo utilizado. Em praticamente todos os ensaios, com exceção daqueles com $x_2 = +1$, é a partir de 8 h de operação que a descaracterização do processo ANAMMOX se inicia. Além disso, o intervalo entre 6 e 8 h é o que apresenta as maiores taxas de remoção de nitrogênio. Graficamente, essas taxas podem ser entendidas como a inclinação da reta formada entre dois pontos de quantificação de nitrogênio e estão presentes na tabela 4.

Tabela 4 - Inclinação da reta entre dois pontos de quantificação de nitrogênio (em mg/h)

Tempo (h)	Ensaio							Reator de controle e comparação
	3	4	5	6	9	10	11	
0	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-17,07	-17,54	-5,71	-2,09	-5,30	-6,35	-4,00	-9,50
6	-9,43	-6,62	-11,10	-9,55	-10,10	-7,08	-7,30	-6,60
8	-18,22	-23,96	-21,93	-29,81	-11,66	-17,34	-19,03	-20,98
10	-6,46	-3,17	-8,43	-1,50	-3,53	-2,05	-0,58	-4,98
13	-1,80	-0,20	-4,15	-5,72	-4,91	-7,47	-6,23	-6,83
16	-1,36	-3,84	-1,48	-0,87	-0,59	-0,15	-0,09	-1,75

Fonte: Do autor, 2018

Nota-se que os valores apresentados representam a concentração total de nitrogênio consumido ou produzido em um determinado intervalo de tempo, por isso podem ser entendidos como taxas. O sinal negativo indica que, nos ensaios analisados, só houve consumo de nitrogênio.

Diante do que foi exposto nesta seção, a eficiência de remoção de nitrogênio escolhida para ser utilizada como resposta de cada ensaio foi a obtida com 8 h de operação. Com isso, pôde-se criar a tabela 5, referente aos dados de entrada para o tratamento estatístico do planejamento fatorial.

Tabela 5 - Dados de entrada para o tratamento estatístico do planejamento fatorial

Ensaio	Carbono inorgânico (mg/l)	Sulfeto (mg/l)	x ₁	x ₂	Remoção de nitrogênio ¹ , y (%)	Resposta média ¹ , $\bar{y}$ (%)
1	125	32	+1	+1	30,21	31,69
2	125	32	+1	+1	33,18	
3	5	0	-1	-1	75,43	76,74
4	5	0	-1	-1	78,05	
5	125	0	+1	-1	69,45	71,08
6	125	0	+1	-1	72,70	
7	5	32	-1	+1	43,83	42,12
8	5	32	-1	+1	40,41	
9	65	16	0	0	52,37	52,91
10	65	16	0	0	53,33	
11	65	16	0	0	53,03	

¹Em texto, optou-se por utilizar duas casas decimais, nos cálculos todas foram consideradas (ver apêndice).

Fonte: Do autor, 2018

5.2.2 Efeitos

Com posse da resposta média obtida em cada uma das 4 combinações do planejamento fatorial ²², foi possível calcular os efeitos do bicarbonato e sulfeto sobre a eficiência de remoção de nitrogênio por meio da equação 12.

Entende-se como efeito individual aquele causado por um único fator, enquanto o outro é mantido fixo. Esse tipo de efeito é apresentado na figura 19, em que o eixo das abscissas contém os níveis codificados do fator x₁, o eixo das ordenadas contém os níveis

codificados do fator x_2 e as bolhas contêm a resposta média obtida em cada uma das 4 combinações.

Figura 19 - Efeitos individuais de cada fator sobre a resposta média

Fonte: Do autor, 2018

Pela figura, verifica-se que, ao fixar a concentração de sulfeto em 32 mg/l ($x_2 = +1$), o aumento na concentração de bicarbonato de 5 a 125 mg/l ($x_1 = -1$ a $x_2 = +1$) reduziu em 10,43 % a eficiência de remoção de nitrogênio. Por outro lado, ao fixar a concentração de sulfeto em 0 mg/l ($x_2 = -1$), o mesmo aumento na concentração de bicarbonato reduziu em 5,67 % a eficiência de remoção de nitrogênio.

A mesma análise pode ser feita para o efeito individual do sulfeto. Ao fixar a concentração de bicarbonato em 125 mg/l ($x_1 = +1$), o aumento na concentração de sulfeto de 0 mg/l a 32 mg/l ($x_2 = -1$ a $x_2 = +1$) reduziu em 39,38 % a eficiência de remoção de nitrogênio. Por outro lado, ao fixar a concentração de bicarbonato em 5 mg/l ($x_1 = -1$), o mesmo aumento na concentração de sulfeto reduziu em 34,62 % a eficiência de remoção de nitrogênio.

Já o efeito principal de cada fator pode ser entendido como a média de seus efeitos individuais. O efeito principal do bicarbonato é a média entre -10,43 % e -5,67 %, ou seja, ao aumentar a concentração de bicarbonato de 5 a 125 mg/l, a eficiência de remoção de nitrogênio reduziu, em média, 8,05 %. Enquanto isso, o efeito principal do sulfeto é a média entre -39,38 % e -34,62 %, ou seja, ao aumentar a concentração de sulfeto de 0 a 32 mg/l, a eficiência de remoção de nitrogênio reduziu, em média, 37,00 %.

Também foi possível calcular o efeito de interação entre os dois fatores. Como todo efeito, o de interação também é dado pela diferença de duas médias, mas, neste caso, trata-se da média das respostas obtidas quando os fatores possuem níveis iguais menos a média das respostas obtidas quando os fatores possuem níveis diferentes (média entre 31,69 % e 76,74 % menos a média entre 71,08 % e 42,12 %). O valor obtido foi de -2,38 %, concluindo o cálculo dos efeitos.

5.2.3 Estimativa do erro experimental

A estimativa do erro experimental foi possível graças às repetições (duplicatas) de cada combinação do planejamento fatorial 2².

Primeiramente, obteve-se a variância dos pares de valores de y referentes a cada uma das 4 combinações e, na sequência, a variância agregada desses valores foi calculada por meio da equação 13.

Em seguida, a variância de um efeito pôde ser calculada pela equação 14.

Com isso, calculou-se o valor do erro padrão de um efeito (s_{efeito}), sendo ele a raiz quadrada de s^2_{efeito} .

A tabela 6 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 6 - Estimativa do erro experimental

Combinação	s^2_i	s^2_{agregada}	s^2_{efeito}	s_{efeito}
+1+1	4,41	4,74	2,37	1,54
-1-1	3,42			
+1-1	5,29			
-1+1	5,83			

Fonte: Do autor, 2018

5.2.4 Significância dos efeitos

Com a estimativa do erro padrão, foi possível analisar o quão significativos são os efeitos calculados na seção 5.2.2.

O efeito é considerado significativo se o valor do módulo de $t_{\text{calculado}}$, obtido pela equação 15, for maior que o valor de $t_{v,\alpha/2}$, encontrado em tabelas de distribuição t de Student, sendo v o número de graus de liberdade e α o nível de significância. O valor de v é o mesmo do denominador da equação 13, ou seja, a soma dos graus de liberdade de cada combinação. Já o nível de significância foi adotado como sendo 5 %, valor usualmente utilizado em estudos estatísticos como este (COSTA NETO, 2002).

Os resultados da análise de significância encontram-se na figura 20 e na tabela 7.

Figura 20 - Diagrama de Pareto dos efeitos calculados no planejamento fatorial

Fonte: Do autor, 2018

Tabela 7 - Análise da significância dos efeitos

Variável	Efeitos (%)	$ t_{\text{calculado}} $	$t_{v,\alpha/2}$
x ₁	-8,05	5,23	2,776
x ₂	-37,00	24,04	2,776
x ₁ x ₂	-2,38	1,55	2,776

Fonte: Do autor, 2018

Verificou-se, então, que o efeito de interação entre bicarbonato e sulfeto (x_1x_2) não é significativo e, por isso, foi desconsiderado do modelo estatístico descrito na próxima seção.

5.2.5 Modelo estatístico

Os coeficientes da equação 16, obtidos de acordo com o que foi descrito na seção 4.2.2, são apresentados na tabela 8. Com esses coeficientes, obteve-se o modelo estatístico que descreve o planejamento fatorial da presente pesquisa, que é dado pela equação 25.

Tabela 8 - Coeficientes do modelo estatístico

b_0	54,73
b_1	-4,02
b_2	-18,50
b_{12}	-1,19

Fonte: Do autor, 2018

$$y_{\text{calculado}} = 54,73 - 4,02 \cdot x_1 - 18,50 \cdot x_2 \quad (25)$$

Nota-se que o coeficiente b_{12} não entra na equação, já que na seção anterior provou-se que o efeito de interação entre x_1 e x_2 não é significativo. A tabela 9 apresenta os valores de $y_{\text{calculado}}$ pela equação 25 em comparação com as respostas obtidas experimentalmente. Já pela figura 21, a comparação pode ser feita de forma gráfica.

Tabela 9 - Respostas estimadas pelo modelo estatístico

Ensaio	x_1	x_2	y	$y_{\text{calculado}}$
1	+1	+1	30,21	32,20
2	+1	+1	33,18	32,20
3	-1	-1	75,43	77,25
4	-1	-1	78,05	77,25
5	+1	-1	69,45	69,20
6	+1	-1	72,70	69,20
7	-1	+1	43,83	40,25
8	-1	+1	40,41	40,25
9	0	0	52,37	54,73
10	0	0	53,33	54,73
11	0	0	53,03	54,73

Fonte: Do autor, 2018

Figura 21 - Respostas estimadas em comparação com as obtidas experimentalmente

Fonte: Do autor, 2018

5.2.6 Análise da variância

A fim de avaliar, numericamente, a qualidade do ajuste do modelo, foi aplicado o método ANOVA.

Primeiramente, calculou-se a SQ_{modelo} , $SQ_{\text{resíduos}}$, SQ_{total} , $SQ_{\text{falta de ajuste}}$ e $SQ_{\text{erro puro}}$ por meio das equações 17, 18, 19, 20 e 21, respectivamente.

Posteriormente, dividindo SQ_{modelo} por SQ_{total} obteve-se o coeficiente de determinação (R^2) e dividindo os valores obtidos nas equações 17, 18, 20 e 21 pelos seus respectivos graus de liberdade descritos na seção 4.2.2, obteve-se a média quadrática do modelo (MQ_{modelo}), dos resíduos ($MQ_{\text{resíduos}}$), da falta de ajuste ($MQ_{\text{falta de ajuste}}$) e do erro puro ($MQ_{\text{erro puro}}$).

Considera-se que existe relação entre a resposta estimada pelo modelo ($y_{\text{calculado}}$) e suas variáveis (x_1 e x_2) se a razão entre MQ_{modelo} e $MQ_{\text{resíduos}}$ ($F_{\text{modelo/resíduos}}$) for maior que o valor de $F_{v,\alpha}$, encontrado em tabelas de distribuição F de Snedecor. E considera-se que existe ajuste se a razão entre $MQ_{\text{falta de ajuste}}$ e $MQ_{\text{erro puro}}$ ($F_{\text{falta de ajuste/erro puro}}$) for menor que o valor de $F_{v,\alpha}$, encontrado em tabelas de distribuição F de Snedecor. Em ambos os testes, α também foi adotado como sendo 5 % (COSTA NETO, 2002).

Os resultados da ANOVA encontram-se na tabela 10.

Tabela 10 - ANOVA

Fonte da variação	SQ	v	MQ	F	$F_{v,\alpha}$
Modelo	2867,54	2	1433,77	258,33	4,46
Resíduos	44,40	8	5,55		
Total	2911,94	10			
Falta de ajuste	24,96	2	12,48	3,85	5,14
Erro puro	19,44	6	3,24		
R^2	98,48%				

Fonte: Do autor, 2018

De acordo com Box e Wetz (1973) e Box e Draper (1987), considera-se um modelo como útil para fins de previsão se a razão entre MQ_{modelo} e $MQ_{\text{resíduos}}$ ($F_{\text{modelo/resíduos}}$) for, pelo menos, cerca de dez vezes o valor do ponto da distribuição F com o número apropriado de graus de liberdade, no nível de confiança escolhido. Isso aconteceu no presente caso, já que o valor calculado para F de 258,33 é maior que 10 vezes o valor de 4,46, obtido na tabela de distribuição F de Snedecor com 2 e 8 graus de liberdade, além de um nível de significância de 5 %.

Verifica-se que o outro teste, referente ao ajuste do modelo, também é satisfeito, já que o valor calculado para F de 3,85 é menor que o valor de 5,14, obtido na tabela de distribuição F de Snedecor, com 2 e 6 graus de liberdade e nível de significância de 5 %.

A $MQ_{\text{resíduos}}$ é uma estimativa, com v graus de liberdade, da variância dos pontos em torno da equação do modelo. Ou seja, o valor de 5,55 encontrado pode ser interpretado como uma medida aproximada do erro médio (quadrático) cometido ao usar a equação 25 para prever a resposta y correspondente a um dado par de valores x_1 e x_2 .

O R^2 obtido indica que o modelo é capaz de explicar 98,48 % da variância dos dados experimentais ou, em outras palavras, que apenas 1,52 % da variação total é explicada pelos resíduos. Porém, observa-se pela tabela 10 que $SQ_{\text{resíduos}} = SQ_{\text{erro puro}} + SQ_{\text{falta de ajuste}}$, ou seja, os resíduos deixados pelo modelo podem ser decompostos em duas partes: uma causada pelos erros experimentais e outra devida a falta de ajuste do modelo. A segunda parte pode ser reduzida aperfeiçoando o modelo, a primeira não. Sendo assim, o valor de R^2 não deve ser comparado com 100%, devido a contribuição do erro puro. O valor máximo explicável pelo modelo ($R^2_{\text{máximo}}$) é a diferença entre SQ_{total} e $SQ_{\text{erro puro}}$. No presente caso, $2911,94 - 19,44 = 2892,5$, que equivale a 99,33 %. É com esse novo valor que o R^2 de 98,48 % deve ser

comparado. A diferença não é grande, justamente porque a contribuição do erro puro é, relativamente, pequena.

5.2.7 Superfície de resposta

Após verificar que, na região investigada (5 a 125 $\text{mgHCO}_3^-/\text{l}$ e 0 a 32 mgS^{2-}/l), a superfície de resposta é descrita satisfatoriamente pela equação 25, a mesma foi utilizada para definir o plano representado em perspectiva na figura 22 e as curvas de nível desse plano na figura 23.

Verifica-se em ambas as figuras que se trata de um plano inclinado obliquamente em relação aos eixos e com sentido ascendente indo da direita para a esquerda. Ou seja, se o intuito é obter maiores eficiências de remoção de nitrogênio, deve-se deslocar a região experimental para menores valores de x_1 e menores valores de x_2 (o que também pode ser verificado pelos coeficientes da equação 25).

Figura 22 - Plano definido pelo modelo estatístico

Fonte: Do autor, 2018

Figura 23 - Curvas de nível do plano definido pelo modelo estatístico

Fonte: Do autor, 2018

Os resultados obtidos nesta pesquisa contrariam os obtidos por Van de Graaf et al. (1996); tais autores observaram, também em testes de batelada, que concentrações de sulfeto de 1 a 5 mM fizeram com que a atividade ANAMMOX fosse potencializada. Esse efeito positivo pode ter ocorrido, pois o sulfeto é capaz de eliminar pequenas concentrações de OD residual, além de reduzir o NO_3^- (que estava presente no sistema estudado pelos autores supracitados) a NO_2^- , que é substrato essencial para o processo ANAMMOX. Nessa reação, o S^{2-} é oxidado a enxofre elementar (S^0), o que também contribui para remoção de enxofre do sistema.

Liu et al. (2015) fizeram uso desses conhecimentos em processo denominado *Denitrifying Ammonium Oxidation* (DEAMOX), pois primeiro reduziram NO_3^- a NO_2^- usando o S^{2-} como doador de elétrons e depois removeram o NO_2^- convertendo-o a N_2 pelo processo ANAMMOX. Nesse estudo, eles encontraram uma relação $\text{S}^{2-}:\text{NO}_3^-$ ideal de 1,31:1 para que o processo ocorresse com sucesso.

Como nesta pesquisa não foi adicionado NO_3^- no meio e ele também não foi produzido ao longo do experimento, o S^{2-} presente não teria como reagir com tal forma nitrogenada para

dar início ao processo DEAMOX. A constatação da função unicamente inibidora do S^{2-} é coerente com os estudos de Dapena-Mora et al. (2007) e Jin et al. (2013).

Dapena-Mora et al. (2007), como já comentado na seção 3.3, observaram que concentrações de sulfeto entre 1 e 2 mM causaram decréscimo de 60% da atividade ANAMMOX e que acima de 5 mM a atividade ANAMMOX se tornou ausente em reatores em batelada

Já Jin et al. (2013), além de trabalharem com reatores contínuos, como foi citado na seção 3.3, também realizaram dois tipos de testes em batelada, com condições semelhantes as que foram aplicadas na presente pesquisa. No primeiro teste, os autores mantiveram a relação $NH_4^+:NO_2^-$ de 1:1 e aumentaram gradativamente a concentração de S^{2-} de 0 a 512 mg/l. Quanto maior a concentração de entrada de S^{2-} , menor foi a taxa de remoção de nitrogênio, o que também foi apresentado neste texto. No entanto, os autores observaram que NH_4^+ deixava de ser consumido, enquanto NO_2^- continuava a ser removido a partir de 256 mg/l de S^{2-} e não a partir de 32 mg S^{2-} /l, como foi apresentado neste texto. No segundo teste em batelada, Jin et al. (2013) mantiveram a concentração de S^{2-} fixa em 96 mg/l e testaram diferentes concentrações de entrada de nitrogênio total. Os autores verificaram que a atividade ANAMMOX com nitrogênio total afluente de 140 mg/l (a mesma desta pesquisa) era de 64,1% da observada com nitrogênio total afluente de 280 mg/l, ou seja, os autores concluíram que a inibição por sulfeto não depende somente da concentração do agente inibidor, mas também da concentração de substrato inicial. Isso pode explicar a diferença da concentração de S^{2-} a partir da qual houve descaracterização do processo ANAMMOX entre esta pesquisa e o trabalho supracitado. Além disso, não se pode desconsiderar o fato do lodo utilizado na etapa 2 ter permanecido fora de atividade durante cerca de 17 h antes da realização do experimento, tempo em que o lodo foi transportado da “Empraba Suínos e Aves” até o Laboratório de Processos Biológicos da Universidade de São Paulo (LPB-USP).

No que diz respeito ao bicarbonato, os resultados obtidos nesta pesquisa são condizentes, com ressalvas, com os obtidos por Kimura, Isaka e Kazama (2011) e Yang et al. (2010). Na presente pesquisa, quanto menor a concentração de HCO_3^- , melhor foi o desempenho do processo, sendo que a relação $HCO_3^-:NH_4^+$ de 0,07 (5 mg HCO_3^- /l e 70 mg NH_4^+ /l) foi a que resultou na melhor eficiência de remoção de nitrogênio. Diminuir ainda mais a concentração de HCO_3^- seria fornecer uma quantidade insuficiente de substrato essencial para as bactérias ANAMMOX e impedir que o processo ocorresse. Os trabalhos supracitados também demonstraram que relações $HCO_3^-:NH_4^+$ altas, distantes da razão teórica de 0,066, não são interessantes para o processo ANAMMOX. No entanto, Yang et al. (2010)

verificaram que, ao aumentar um pouco a relação $\text{HCO}_3^-:\text{NH}_4^+$, de 0,07 a 0,18, houve melhoria no processo ANAMMOX, muito semelhante ao que foi observado por Kimura, Isaka e Kazama (2011), que encontraram relação $\text{HCO}_3^-:\text{NH}_4^+$ ideal de 0,2.

6 CONCLUSÃO

Com 101 dias de operação do RLF, não foi possível enriquecer biomassa ANAMMOX a partir do lodo coletado na lagoa aerada da ETE da indústria “Incofap”, fabricante de ração animal no município de Araraquara (São Paulo). Sendo assim, os objetivos da etapa 1 da pesquisa não foram alcançados. No entanto, as análises físico-químicas realizadas no monitoramento do RLF demonstraram que o lodo tem grande potencial para processos de nitrificação parcial e desnitrificação heterotrófica, desde que condições de microaeração e estrita anaerobiose, respectivamente, sejam satisfeitas. As análises de biologia molecular complementaram essas afirmações, já que os microrganismos com maior abundância nas amostras estudadas foram, justamente, aqueles responsáveis pelos processos observados por meio das análises físico-químicas e nenhum deles estava associado a atividade ANAMMOX.

O estudo da influência do carbono inorgânico e enxofre na oxidação anaeróbia da amônia foi possível operando reatores em batelada e utilizando, como inóculo, lodo de um reator com estável atividade ANAMMOX proveniente da “Embrapa Suínos e Aves”, localizada no município de Concórdia (Santa Catarina). Após variar as concentrações de bicarbonato ($5 - 125 \text{ mgHCO}_3^-/\text{l}$) e sulfeto ($0 - 32 \text{ mgS}^{2-}/\text{l}$) por meio de um planejamento fatorial 2^2 , concluiu-se que as quantidades de sulfeto utilizadas prejudicam o processo ANAMMOX e quanto mais próximo da razão teórica estiver a concentração de bicarbonato, melhor é a atividade microbiana. A relação ideal entre nitrogênio, bicarbonato e enxofre encontrada foi de 1:0,07:0.

6.1 SUGESTÕES

a) Reduzir a região investigada no planejamento fatorial, principalmente a de bicarbonato, trabalhando com valores mais próximos de 5 mg/l . Sugere-se a faixa de $5 - 25 \text{ mgHCO}_3^-/\text{l}$.

b) Adicionar nitrato na composição do substrato sintético e verificar se, na presença de sulfeto, haveria o processo DEAMOX;

c) Validar o modelo estatístico obtido nesta pesquisa.

REFERÊNCIAS

- ANTHONISEN, A.C. et al. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Journal Water Pollution Control Federation*, 48 (5), 835-852, 1976.
- APHA/AWWA/WEF. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Washington: APHA, 2005.
- ARAUJO, J.C. et al. Enriquecimento de bactérias anaeróbias oxidadoras de amônia - Anammox. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, 15 (1), 205-212, 2010.
- BARNARD, J. L. Biological Denitrification. *Journal of Water Pollution Control* 72 (6), 705-720, 1973
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I, S.; BRUNS, R.; E. *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. Campinas: Unicamp, 2007.
- BASTOS, F. S.; VON SPERLING, M. (Org.). *Nutrientes de esgoto sanitário: Utilização e remoção*. Rio de Janeiro: Abes, 2009.
- BLACKBURNE, R. et al. Kinetic characterisation of na enriched Nitrospira culture with comparison to Nitrobacter. *Water Research*, 41 (14), 3033-3042, 2007.
- BRASIL. Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005. *Classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento*. Brasília, DF, 2005.
- BRASIL. Resolução CONAMA nº 430, de 13 de maio de 2011. *Condições e padrões de lançamento de efluentes*. Brasília, DF, 2011.
- BOX, G. E. P.; DRAPER, N. R. *Evolutionary operation: a statistical method for process improvement*. New York: Wiley-Interscience, 1969.
- BOX, G. E. P.; WETZ, J. Criteria for judging adequacy of estimation by an approximate response function. *University of Wisconsin Technical Report*, 9, 1973.

CAMILOTI, P. R. *Recuperação de enxofre elementar a partir de águas residuárias em reatores anaeróbio/microaerado*. Tese. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento. São Carlos: USP, 2015.

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 microrganismos*. Tese. Programa de Pós-Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos. Belo Horizonte: UFMG, 2013.

COSTA NETO, P. L. O. *Estatística*. São Paulo, Editora Blucher, 2002.

DAPENA-MORA, A. et al. Evaluation of activity and inhibition effects on Anammox process by batch tests based on the nitrogen gas production. *Enzyme And Microbial Technology*. 40 (4), 859-865, 2007.

ESTEVES, F. A. et al. *Fundamentos de Limnologia*. Rio de Janeiro: Interciência, 2011.

FDZ-POLANCO, F. et al. New process for simultaneous removal of nitrogen and sulphur under anaerobic conditions. *Water Resources*, 35 (4), 1111-1114, 2001.

GRIFFITHS, R.I. et al. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rRNA based microbial community composition. *Applied and environmental microbiology*, 66 (12), 5488-5491, 2000.

HELLINGA, C. et al. The SHARON process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich wastewater. *Water Science and Technology*, 37 (9), 135-142, 1998.

JETTEN, M.S. et al. The Anaerobic Oxidation of Ammonium. *FEMS Microbiology Reviews*, 22 (5), 421 - 437, 1999.

JIN, R. et al. The inhibition of the Anammox process: A review. *Chemical Engineering Journal*, [s.l.], 197 (1), 67-79, 2012.

JIN, R. et al. The effect of sulfide inhibition on the ANAMMOX process. *Water Research*, 47 (3), 1459-1469, 2013.

JUNG, J. Y. et al. Factors affecting the activity of Anammox bacteria during start up in the continuous culture reactor. *Water Sci. Technol.* 55 (1), 459–468, 2007.

KIMURA, Y. et al. Effects of nitrite inhibition on anaerobic ammonium oxidation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86 (1), 359–365, 2010.

KIMURA, Y.; ISAKA, K.; KAZAMA, F. Effects of inorganic carbon limitation on anaerobic ammonium oxidation (anammox) activity. *Bioresource Technology*, 102 (6), 4390-4394, 2011.

LACKNER, S. et al. Full-scale partial nitrification/anammox experiences: An application survey. *Water Res*, 55 (1), 292-303, 2014.

LEVENSPIEL, O. *Engenharia das Reações Químicas*. New York: Editora Edgard Blucher Ltda, 2000.

LIU, C. et al. Elemental sulfur formation and nitrogen removal from wastewaters by autotrophic denitrifiers and anammox bacteria. *Bioresource Technology*, 191 (1), 332-336, set. 2015.

MENDONÇA, L. C. *Microbiologia e cinética de sistema de lodos ativados como pós-tratamento de efluente de reator anaeróbio de leito expandido*. Tese. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento. São Carlos: USP, 2002.

METCALF & EDDY. *Tratamento de efluentes e recuperação de resíduos*. Porto Alegre: Editora Mc Graw Hill, 2016.

MULDER, A. et al. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiology Ecology*, 16 (3), 177-184, 1995.

PEREIRA, A. D. et al. Microbial communities in anammox reactors: a review. *Environmental Technology Reviews*, 6 (1), 74-93, 2017.

RAJESHWARI, K.V. et al. State-of-the-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment. *Renewable And Sustainable Energy Reviews*, 4 (1), 135-156, 2000.

SANTOS, S. G. et al. Comparison of Methanol, Ethanol and Methane as Electron Donors for Denitrification.. *Environmental Engineering Science*, 21 (3), 313-320, 2004.

SÃO PAULO. Decreto nº 8468, de 8 de setembro de 1976. *Prevenção e controle da poluição do meio ambiente no estado de São Paulo*, São Paulo, 8 set. 1976.

SÃO PAULO. Decreto nº 10755, de 22 de novembro de 1977. *Enquadramento dos corpos de água receptores do estado de São Paulo*, São Paulo, 22 nov. 1977.

SCHEEREN, M. B. et al. O processo ANAMMOX como alternativa para tratamento de águas residuárias contendo alta concentração de nitrogênio. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 15 (12), 1289-1297, 2011.

SCHIERHOLT NETO, G. F. et al. Aclimação e acompanhamento da atividade de lodos de efluentes de suinocultura para remoção de nitrogênio pelo processo de oxidação anaeróbia de amônia (anammox). *Anais. XXX Congreso Internacional de Ingenieria Sanitaria y Ambiental*. Punta del Este, 2006.

SOUZA, T. S. O.; FORESTI, E. Sulfide-Oxidizing Autotrophic Denitrification: an Evaluation for Nitrogen Removal from Anaerobically Pretreated Domestic Sewage. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 170 (1), 1094-1103, 2013.

STROUS, M. et al. Ammonium removal from concentrated waste streams with the anaerobic ammonium oxidation (anammox) process in different reactor configurations. *Water Research*, 31 (1), 1955–1962, 1997.

STROUS, M.; KUENEN, J. G.; JETTEN, M. S. M. Key physiology of anaerobic ammonia oxidation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65 (7), 3248–3250, 1999.

STROUS, M. et al. Missing litotroph identified as new planctomycete. *Nature*, 400 (1), 446-449, 1999.

STROUS, M. et al. The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50 (1), 589-596, 1998.

TANG, C. J. et al. Effect of substrate concentration on stability of Anammox biofilm reactors. *J. Central South Univ. Technol.* 17 (1), 79–84, 2010.

THIRD, K. A. et al. Enrichment of ANAMMOX from activated sludge and its application in the CANON process. *Microbial Ecology*, 49 (1), 236-244, 2005.

TIEDJE, J. *Methods of soil analysis: Part 2 - Chemical and microbiological properties*. Wisconsin: SSSA Book Series 5, 1984.

TSUSHIMA, I. et al. Development of high-rate anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) biofilm reactors. *Water Research*, 41 (8), 1623-1634, 2007.

USEPA. *Nutrient Control Manual*. EPA/625/R-93/010. Cincinnati: Office of Research and Development, 1993.

UYANIK, S.; BEKMEZCI, O. K.; YURTSEVER, A. Strategies for Successful ANAMMOX Enrichment at Laboratory Scale. *Clean - Soil, Air, Water*, 39 (7), 653-657, 2011. Wiley-Blackwell.

VAN DE GRAAF, A.A. et al. Autotrophic growth of anaerobic ammonium oxidizing microorganisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology*, 142 (1), 2187-2196, 1996.

VAN DER STAR, W. R. L. et al. Startup of reactors for anoxic ammonium oxidation: Experiences from the first full-scale anammox reactor in Rotterdam. *Water Res*, 41 (1), 4149–4163, 2007.

WANG, T. et al. Start-up and long-term operation of the Anammox process in a fixed bed reactor (FBR) filled with novel non-woven ring carriers. *Chemosphere*, 91 (5), 669-675, 2013.

WANG, T. et al. Start-up performance of Anammox process in a fixed bed reactor (FBR) filled with honeycomb-like polypropylene carriers. *Water Science And Technology*, 73 (8), 1848-1854, 2016.

WANG, T.; ZHANG, H.; YANG, F. Performance of Anammox process and low-oxygen adaptability of Anammox biofilms in a FBR with small ring non-woven carriers. *Ecological Engineering*, 86 (1), 126-134, 2016.

WEST, P. W.; RAMACHANDRAN, T.P. Spectrophotometric determination of nitrate using chromotropic acid. *Analytica Chimica Acta*, 35 (1), 317-324, 1966.

WUHRMAN, K. Nitrogen Removal in Sewage Treatment Processes. *Verhandlungenden Internationalen Verein Limnologie*, 15 (1), 580-596, 1964.

WYFFELS, S. et al. Modeling and simulation of oxygen-limited partial nitrification in a membrane-assisted bioreactor (MBR). *Biotechnology and Bioengineering*, 86 (5), 531-542, 2004.

YAMAMOTO, T. et al. Longterm stability of partial nitrification of swine wastewater digester liquor and its subsequent treatment by Anammox. *Bioresource Technology*, 99 (14), 6419-6425, 2008.

YANG, J. et al. High-rate nitrogen removal by the Anammox process at ambient temperature. *Bioresource Technology*, 102 (2), 672-676, 2011.

YANG, J. et al. High-rate nitrogen removal by the Anammox process with a sufficient inorganic carbon source. *Bioresource Technology*, 101 (24), 9471-9478, 2010.

ZHANG, Li et al. Treatment capability of an up-flow anammox column reactor using polyethylene sponge strips as biomass carrier. *Journal Of Bioscience And Bioengineering*, 110 (1), 72-78, 2010.

APÊNDICE

O presente texto acompanha um CD, onde encontram-se, na íntegra, todas as planilhas de cálculo, em formato “.xlsx”, criadas durante a pesquisa. Estão organizadas da seguinte maneira:

Apêndice A – Etapa 1

- A.1 Operação do reator contínuo
- A.2 Análises de biologia molecular
 - A.2.1 Metodologia
 - A.2.2 Dados brutos
 - A.2.3 Dados tratados

Apêndice B – Etapa 2

- B.1 Operação dos reatores em batelada

Na ausência do CD, as planilhas podem ser baixadas pelo link:

<https://www.dropbox.com/sh/8jgdb8nbb652old/AABXrbkv-MX4BG2GYw4afPGMa?dl=0>