

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Escola de Engenharia de São Carlos

**PROCESSOS METANOGÊNICO E ANAMMOX PARA  
REMOÇÃO DE MATÉRIA CARBONÁCEA E NITROGENADA  
DE ESGOTO SANITÁRIO SALINO EM REGIÕES DE CLIMA  
QUENTE**

CAROLINA TAVARES PAULA

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS  
DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E SANEAMENTO

CAROLINA TAVARES PAULA

**Processos metanogênico e anammox para remoção de matéria carbonácea e nitrogenada  
de esgoto sanitário salino em regiões de clima quente**

São Carlos

2023



CAROLINA TAVARES PAULA

Processos metanogênico e anammox para remoção de matéria carbonácea e nitrogenada de  
esgoto sanitário salino em regiões de clima quente

Tese apresentada à Escola de Engenharia de São  
Carlos da Universidade de São Paulo, como requisito  
para a obtenção do Título de Doutora em Ciências:  
Engenharia Hidráulica e Saneamento.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Márcia Helena Rissato  
Zamariolli Damianovic

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos  
2023

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

P324p Paula, Carolina Tavares  
Processos metanogênico e anammox para remoção de matéria carbonácea e nitrogenada de esgoto sanitário salino em regiões de clima quente / Carolina Tavares Paula; orientadora Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic. São Carlos, 2023.

Tese (Doutorado) - 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, 2023.

1. Efluente sanitário salino. 2. Eletrólitos mistos. 3. Reator anaeróbico de leito fixo. 4. Mainstream anammox. 5. Clima quente. I. Título.



## FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Engenheira **CAROLINA TAVARES PAULA**.

Título da tese: "PROCESSOS METANOGÊNICO E ANAMMOX PARA REMOÇÃO DE MATÉRIAS CARBONÁCEA E NITROGENADA DE ESGOTO SANITÁRIO SALINO, EM REGIÕES DE CLIMA QUENTE".

Data da defesa: 22/09/2023.

### Comissão Julgadora

### Resultado

**Profa. Dra. Marcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic**  
(Orientador)

(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC-USP)

Aprovada

**Profa. Dra. Deize Dias Lopes**

(Universidade Estadual de Londrina/UEL )

Aprovada

**Profa. Dra. Ana Cláudia Barana**

(Universidade Estadual de Ponta Grossa/UEPG)

Aprovada

**Profa. Dra. Rachel Biancalana Costa**

(Escola Politécnica/EP-USP)

Aprovada

**Prof. Dr. Paulo Igor Milen Firmino**

(Universidade Federal do Ceará/UFC)

Aprovada

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:  
Prof. Assoc. **Juliano Jose Corbi**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:  
Prof. Titular **Carlos De Marqui Junior**





## AGRADECIMENTOS

À minha família (Marize, Gêminson, Raquel e Vitor) por todo o carinho, apoio e por serem inspirações na minha vida, nos âmbitos pessoal e profissional. Vocês são as melhores pessoas que eu poderia ter junto comigo. Muito obrigada!

Ao meu companheiro de vida, Júlio, que está nos agradecimentos do meu TCC, do mestrado e, agora, do meu doutorado. Porque sempre esteve comigo ao longo de toda essa caminhada. Por sempre acreditar em mim, mesmo quando eu mesma não acreditei. Pelo amor, compreensão, paciência e apoio incondicional. Eu não poderia ter escolhido ninguém melhor para compartilhar a vida. Te amo.

À minha orientadora, Márcia Damianovic. Um exemplo de mulher, professora e orientadora. Por ter me recebido de braços abertos em São Carlos e por ter acreditado em mim e na minha capacidade. Pelos ensinamentos e toda a orientação.

Aos amigos do doutorado, especialmente Paula, Rhayssa e Mariê. Vocês foram o suporte que me fez continuar aparecendo todos os dias no laboratório. Não tenho palavras para agradecer o apoio de vocês, principalmente durante a pandemia. A Rhayssa, por ser o pedacinho de casa em São Carlos e por me lembrar todos os dias dos meus que torciam de longe por mim. A Mariê que sempre esteve presente para uma conversa, independente do momento. Vou levar a amizade de vocês para sempre!

Em especial a Paula Takeda. Minha amiga, eu não estaria escrevendo esses agradecimentos se não fosse por você (porque não haveria tese). Que exemplo de pesquisadora você é! Muito obrigada pelas discussões de dados, pelo apoio em tudo o que precisei no laboratório. Mas principalmente pela amizade dentro e fora dele.

Aos amigos que aliviavam a pressão do doc: André, Bia, Rodrigo, Guilherme (pelas quartas do gole!), Rafa, Dudu e Marina. Sem vocês não teria graça! Muito obrigada!

Aos amigos do Lab: Cris, Jean, Henrique, Will, Natália, Lilli, Lucas, Alex, Felipe, Luana e tantos outros. As análises ficavam mais fáceis porque vocês estavam na bancada comigo. Em especial a Cris, pelas eternas discussões salinas!

Às técnicas Carol, Bel, Janja e Elô por todo o suporte para a realização do trabalho. Em especial a Carol Sabatini, um exemplo de profissional que vou levar para a minha vida (e a amizade também).

Aos professores do departamento, por todos os ensinamentos, e ao corpo técnico e administrativo do PPg SHS, em especial a Sá e Rose, por todo o auxílio prestado ao longo do doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento para a execução do trabalho.



## RESUMO

PAULA, Carolina Tavares. **Processos metanogênico e anammox para remoção de matéria carbonácea e nitrogenada de esgoto sanitário salino em regiões de clima quente**. 2023. 137 f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2023.

A salinização de aquíferos subterrâneos tem se intensificado em regiões de clima árido e semiárido e, juntamente à escassez hídrica, tem despertado interesse em todo o mundo. Além dos fatores naturais, a demanda crescente por água para abastecimento público e industrial e o consequente uso de águas salobras e salinas, que retornam na forma de esgoto para recarga dos aquíferos, tem contribuído para o aumento da concentração de sais nas reservas hídricas. Apesar da presença de sais afetar negativamente os processos biológicos de tratamento de efluentes, o processo anammox tem sido apontado como alternativa promissora para a remoção da fração nitrogenada de efluentes com elevada salinidade, visto que essa rota metabólica foi descoberta em ambientes anóxicos marinhos. Ademais, a utilização do processo no fluxo principal aplicado ao efluente de reatores anaeróbios tem sido o foco de estudos recentes, por apresentar o potencial de tornar o balanço de energia de ETEs neutro ou mesmo positivo. No presente estudo, os processos metanogênico e anammox foram avaliados para o tratamento de esgoto sanitário salino sintético (NaCl, MgCl<sub>2</sub> e CaCl<sub>2</sub>). Para isso, foi elaborado e realizado planejamento fatorial para avaliação da produção de metano em ensaios em batelada (pressão osmótica ente 5,24 e 24,34 atm). Além disso, ensaios em reatores contínuos foram realizados para os processos metanogênico e anammox, separadamente. Os ensaios em batelada mostraram que a influência dos sais sobre o processo metanogênico ocorreu na ordem decrescente NaCl>MgCl<sub>2</sub>>CaCl<sub>2</sub>. Ademais, o efeito de antagonismo entre os sais foi observado, o que indica que a inibição provocada por um sal isoladamente pode ser mitigada pela presença dos demais. A metanogênese foi mantida em reator anaeróbio contínuo de leito fixo estruturado alimentado com efluente sanitário sintético e salinidade de 4,4% (em g.L<sup>-1</sup>: 28,4 NaCl, 12,0 MgCl<sub>2</sub> e 3,7 CaCl<sub>2</sub>), com eficiência de remoção de DQO de 70%. No entanto, a estabilidade do processo anaeróbio sob condições salinas se apresentou dependente da suplementação de alcalinidade afluente. Em fluxo contínuo, os gêneros de arqueas metanogênicas dominantes em meio salino foram *Methanomicrobium* e *Methanosaeta*, enquanto nos ensaios em batelada, em que foram impostos choques de salinidade, os gêneros dominantes foram *Methanolinea*, *Methanoregula* e *Methanosaeta*. A redução da concentração de nitrogênio de 232 (cultivo do inóculo) para 60 mgN.L<sup>-1</sup> não afetou a população anammox, em reator contínuo de biomassa granular, para tempo de detenção hidráulica de 1,4 horas. Isso indica o potencial de utilização da unidade na remoção de nitrogênio de esgoto sanitário, com adaptação da biomassa de condições de fluxo lateral para principal. Ainda, a salinidade total por eletrólitos mistos suportada pela comunidade anammox foi de 0,72% (em g.L<sup>-1</sup>: 4,7 NaCl, 2,0 MgCl<sub>2</sub> e 0,6 CaCl<sub>2</sub>), em reator contínuo alimentado com efluente sintético. A presença de sais favoreceu o gênero *Ca. Jettenia*, em detrimento do *Ca. Brocadia*, após período de longa exposição à salinidade. A aplicação do efluente salino do reator anaeróbio (0,72%) com relação DQO/N de 0,86 afetou o processo anammox e favoreceu a rota de desnitrificação heterotrófica via nitrito para remoção de nitrogênio, o que resultou em acúmulo de amônia no efluente (>10 mgN.L<sup>-1</sup>). A presença de matéria orgânica resultou na dominância do gênero *Ca. Brocadia*, em relação ao *Ca. Jettenia*.

**Palavras-chave:** Efluente sanitário salino; eletrólitos mistos; reator anaeróbio de leito fixo; *mainstream* anammox; clima quente.



## ABSTRACT

PAULA, Carolina Tavares. **Methanogenic and anammox processes for the removal of carbonaceous and nitrogenous matter from saline sewage in warm climate regions.** 2023. 137 f. Thesis (Doctorate) – São Carlos School of Engineering, University of São Paulo, São Carlos, 2023.

The salinization of underground aquifers has intensified in arid and semi-arid regions and, along with water scarcity, has aroused interest worldwide. In addition to natural factors, the growing demand for water for public and industrial supply, and the consequent use of brackish and saline waters, which return as sewage for aquifer recharge, has contributed to the increase in salt concentration in water reserves. Despite the presence of salts negatively affecting biological wastewater treatment processes, the anammox process has been identified as a promising alternative for removing the nitrogen fraction from high-salinity effluents, as this metabolic pathway was discovered in anoxic marine environments. Furthermore, the use of the process in the mainstream applied to anaerobic reactor effluents has been the focus of recent studies, as it has the potential to make the energy balance of WWTPs neutral or even positive. In this study, the methanogenic and anammox processes were evaluated for the treatment of synthetic saline sewage (NaCl, MgCl<sub>2</sub>, and CaCl<sub>2</sub>). For this purpose, a factorial design was developed and carried out to assess methane production in batch experiments (osmotic pressure ranging from 5.24 to 24.34 atm). In addition, continuous reactor tests were conducted for the methanogenic and anammox processes separately. Batch experiments showed that the influence of salts on the methanogenic process occurred in the decreasing order NaCl>MgCl<sub>2</sub>>CaCl<sub>2</sub>. Moreover, an antagonistic effect between salts was observed, indicating that inhibition caused by one salt alone can be mitigated by the presence of others. Methanogenesis was maintained in a continuous anaerobic fixed-bed reactor fed with synthetic sewage effluent and salinity of 4.4% (in g.L<sup>-1</sup>: 28.4 NaCl, 12.0 MgCl<sub>2</sub>, and 3.7 CaCl<sub>2</sub>), with a COD removal efficiency of 70%. However, the stability of the anaerobic process under saline conditions depended on the supplementation of influent alkalinity. In continuous flow, the dominant methanogenic archaea genera in saline media were *Methanomicrobium* and *Methanosaeta*, while in batch experiments, where salinity shocks were imposed, the dominant genera were *Methanolinea*, *Methanoregula*, and *Methanosaeta*. The reduction in nitrogen concentration from 232 (inoculum cultivation) to 60 mgN.L<sup>-1</sup> did not affect the anammox population in a continuous granular biomass reactor with a hydraulic retention time of 1.4 hours. This indicates the potential for using the unit in nitrogen removal from sewage, with biomass adaptation from sidestream conditions to the mainstream. Furthermore, the total salinity supported by the anammox community in a continuous reactor fed with synthetic effluent was 0.72% (in g.L<sup>-1</sup>: 4.7 NaCl, 2.0 MgCl<sub>2</sub>, and 0.6 CaCl<sub>2</sub>). The presence of salts favored the genus *Ca. Jettenia* over *Ca. Brocadia* after a long exposure period to salinity. The application of saline effluent from the anaerobic reactor (0.72%) with a COD/N ratio of 0.86 affected the anammox process and favored the heterotrophic denitrification route via nitrite for nitrogen removal, resulting in ammonia accumulation in the effluent (>10 mgN.L<sup>-1</sup>). The presence of organic matter resulted in the dominance of the genus *Ca. Brocadia* over *Ca. Jettenia*.

**Keywords:** Saline sewage; multi-electrolytes salinity; fixed-bed anaerobic reactor; mainstream anammox; warm climate.



## Lista de figuras

- Figura 3.1:** Rotas metabólicas envolvidas no processo de digestão anaeróbia. ....43
- Figura 4.1:** Fluxograma do procedimento experimental geral do presente estudo..... 68
- Figura 4.2:** (a) Montagem dos reatores em batelada (efluente + inóculo); (b) Detalhe da tampa de butila com válvula de 3 vias para coleta de amostras gasosas dos reatores em batelada. ... 71
- Figura 4.3:** (a) Desenho esquemático com dimensões (em cm) do reator anaeróbio utilizado (Fonte: adaptado de DIAS, 2020). Legenda: 1-Bomba peristáltica; 2-Reator de leito fixo estruturado; 3-Coleta do efluente do reator; 4-Coleta do biogás; 5-Selo hídrico; 6-Tubo U para medição do volume de biogás produzido; 7-Sistema Arduino; (b) Detalhe do posicionamento do material suporte em espuma de poliuretano; (c) Estrutura do reator anaeróbio com material suporte. .... 74
- Figura 4.4:** (a) Desenho esquemático do aparato experimental do reator anammox. Legenda: 1-Bomba peristáltica; 2-Reator anammox; 3-Coleta de efluente; 4-Coleta de biogás; 5-Selo hídrico. Fonte: modificado de Pereira (2020). (b) Reator anammox em câmara climatizada (30°C). .... 78
- Figura 4.5:** Fluxograma das coletas de amostras para caracterização microbiológica do reator anammox. PO: Pressão Osmótica; LES: Longa exposição à salinidade; EAS: Efluente Anaeróbio Salino. <sup>a</sup> Número da amostra coletada. .... 85
- Figura 5.1:** Dados observados e previstos (com o modelo de Gompertz modificado) da produção acumulada de metano (NmL) para cada ensaio: (a) 5,24 atm, (b) 7,87 atm, (c) 8,40 atm, (d) 10,95 atm, (e) 18,79 atm, (f) 21,26 atm, (g) 21,83 atm, (h) 24,34 atm..... 89
- Figura 5.2:** Produção acumulada de metano (NmL) ao longo do tempo (dias) nos ensaios controle e salinos (dados previstos com modelo de Gompertz modificado). .... 90
- Figura 5.3:** Concentrações iniciais e finais de DQO e eficiência de remoção de DQO dos ensaios em batelada. Identificação dos ensaios pela pressão osmótica (atm). .... 91
- Figura 5.4:** Diagrama de Pareto resultante do planejamento fatorial 2<sup>3</sup>. .... 92
- Figura 5.5:** Composição taxonômica das comunidades microbianas nos filos nos ensaios anaeróbios em batelada referentes às PO de 0, 5,24, 10,95 e 24,34 atm. Identificação das amostras: Pressão osmótica. Para possibilitar a visualização dos dados, estão apresentados os



filos com mais de 3,0% de abundância relativa (em pelo menos uma amostra). Os demais foram incluídos no grupo “Outros”..... 95

**Figura 5.6:** Composição taxonômica das comunidades microbianas nos gêneros nos ensaios anaeróbios em batelada referentes às PO de 0, 5,24, 10,95 e 24,34 atm. Identificação das amostras: Pressão osmótica. Para possibilitar a visualização dos dados, estão apresentados os gêneros com mais de 5,0% de abundância relativa (em pelo menos uma amostra). Os demais foram incluídos no grupo “Outros”. ..... 96

**Figura 5.7:** Abundância relativa dos gêneros de arqueas metanogênicas nos ensaios anaeróbios em batelada referentes às PO de 0, 5,24, 10,95 e 24,34 atm. Identificação das amostras: Pressão Osmótica. .... 98

**Figura 5.8:** DQO solúvel no afluente (●) e efluente (○) e eficiência de remoção de DQO solúvel (—) do reator metanogênico ao longo da operação. Área cinza representa a salinidade (wt%). ..... 101

**Figura 5.9:** Alcalinidade a bicarbonato, em  $\text{mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$  (●), e concentração de Ácidos Voláteis Totais, em  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (▲), no efluente do reator anaeróbio ao longo do período de operação. Área cinza representa a salinidade (wt%). ..... 103

**Figura 5.10:** pH afluente (●) e efluente (○) e relação AI/AP (▲) no efluente do reator anaeróbio ao longo do período de operação. Área cinza representa a salinidade (wt%). ..... 104

**Figura 5.11:** Frações (%) de  $\text{CH}_4$  (■) e  $\text{CO}_2$  (□) no biogás produzido no reator anaeróbio ao longo do período de operação. Área cinza representa a salinidade (wt%). ..... 107

**Figura 5.12:** Produção volumétrica de metano (●) do reator anaeróbio ao longo do período de operação. Área cinza representa a salinidade (wt%). ..... 108

**Figura 5.13:** Composição taxonômica das comunidades microbianas nos filos no reator anaeróbio. Identificação das amostras: Biomassa Suspensa (BS) ou Aderida (BA)\_Fase de operação do reator. Para possibilitar a visualização dos dados, estão apresentados os filos com mais de 1,5% de abundância relativa (em pelo menos uma amostra). Os demais foram incluídos no grupo “Outros”. ..... 109

**Figura 5.14:** Composição taxonômica das comunidades microbianas nas ordens no reator anaeróbio. Identificação das amostras: Biomassa Suspensa (BS) ou Aderida (BA)\_Fase de operação do reator. Para possibilitar a visualização dos dados, estão apresentadas as ordens com

mais de 3,0% de abundância relativa (em pelo menos uma amostra). As demais foram incluídas no grupo “Outras”..... 110

**Figura 5.15:** Composição taxonômica das comunidades microbianas nos gêneros no reator anaeróbio. Identificação das amostras: Biomassa Suspensa (BS) ou Aderida (BA)\_Fase de operação do reator. Para possibilitar a visualização dos dados, estão apresentados os gêneros com mais de 5,0% de abundância relativa (em pelo menos uma amostra). Os demais foram incluídos no grupo “Outras”..... 111

**Figura 5.16:** Desempenho do reator anammox na Etapa 1. (a) Concentrações afluentes de N-amônia (●) e N-nitrito (▲); concentrações efluentes de N-amônia (○), N-nitrito (Δ) e N-nitrato (□); e eficiência de remoção (—) de N-amônia (em preto) e N-nitrito (em verde); (b) Concentrações afluente (◆) e efluente (◇) e eficiência de remoção (—) de N total; (c) Relações estequiométricas de consumo de N-nitrito (Δ) ( $N-NO_2^-/N-NH_4^+$ ) e produção de N-nitrato (□) ( $N-NO_3^-/N-NH_4^+$ ) e relações estequiométricas teóricas (—) de 1,32 e 0,26. .... 117

**Figura 5.17:** Desempenho do reator anammox na Etapa 2. (a) Concentrações afluentes de N-amônia (●) e N-nitrito (▲); concentrações efluentes de N-amônia (○), N-nitrito (Δ) e N-nitrato (□); e eficiência de remoção (—) de N-amônia (em preto) e N-nitrito (em verde); (b) Concentrações afluente (◆) e efluente (◇) e eficiência de remoção (—) de N total; (c) Relações estequiométricas de consumo de N-nitrito (Δ) ( $N-NO_2^-/N-NH_4^+$ ) e produção de N-nitrato (□) ( $N-NO_3^-/N-NH_4^+$ ) e relações estequiométricas teóricas (—) de 1,32 e 0,26. .... 122

**Figura 5.18:** Perfil temporal da concentração de DQO (Demanda Química de Oxigênio) durante a fase 9: afluente (●), efluente (○) e eficiência de remoção (—). .... 129

**Figura 5.19:** Composição taxonômica das comunidades microbianas nos filos no reator anammox. Identificação das amostras: nº da amostra (condição de operação do reator). Para possibilitar a visualização dos dados, estão apresentados apenas os filos com mais de 0,5% de abundância relativa (em pelo menos uma amostra). Os demais foram incluídos no grupo “Outras”..... 133

**Figura 5.20:** Composição taxonômica das comunidades microbianas nas ordens no reator anammox. Identificação das amostras: nº da amostra (condição de operação do reator). Para possibilitar a visualização dos dados, estão apresentadas apenas as ordens com mais de 1,5% de abundância relativa (em pelo menos uma amostra). As demais foram incluídas no grupo “Outras”..... 135

**Figura 5.21:** Composição taxonômica das comunidades microbianas nos gêneros no reator anammox. Identificação das amostras: nº da amostra (condição de operação do reator). Para possibilitar a visualização dos dados, estão apresentados apenas os gêneros com mais de 3,0% de abundância relativa (em pelo menos uma amostra). Os demais foram incluídos no grupo “Outros”..... 136

**Figura 5.22:** Abundância relativa dos gêneros associados ao processo anammox (Ca. Brocadia e Ca. Jettenia) nas amostras sequenciadas. Identificação das amostras: nº da amostra (condição de operação do reator). ..... 140

**Figura 5.23:** Distribuição dos microrganismos envolvidos nas conversões de nitrogênio para cada amostra sequenciada. Identificação das amostras: nº da amostra (condição de operação do reator)..... 142



## Lista de tabelas

<b>Tabela 3.1:</b> Gêneros de bactérias oxidadoras de amônia (BOA) e nitrito (BON) encontrados em sistemas de remoção biológica de nitrogênio. ....	48
<b>Tabela 3.2:</b> Espécies de bactérias anammox identificadas na literatura. ....	52
<b>Tabela 3.3:</b> Resumo dos resultados de estudos relacionados ao efeito da salinidade sobre o processo anammox. ....	63
<b>Tabela 4.1:</b> Concentrações máximas encontradas para os íons que compõem os sais de estudo na área monitorada (sertão do estado de Alagoas) e as concentrações equivalentes dos respectivos cloretos.....	69
<b>Tabela 4.2:</b> Estimativa da atividade das soluções de estudo, correspondente pressão osmótica conferida por cada sal e pressão osmótica de final de estudo. ....	69
<b>Tabela 4.3:</b> Variáveis independentes (fatores) e respectivos valores codificados e reais. ....	70
<b>Tabela 4.4:</b> Matriz do planejamento fatorial dos ensaios em batelada e pressão osmótica de cada condição. ....	70
<b>Tabela 4.5:</b> Composição da solução de micronutrientes adicionada ao meio sintético do reator anaeróbio. ....	76
<b>Tabela 4.6:</b> Condições referentes a cada fase de operação do reator anaeróbio.....	76
<b>Tabela 4.7:</b> Concentração (em g.L <sup>-1</sup> ) das fontes de amônia e nitrito do meio sintético para alimentação do reator anammox.....	79
<b>Tabela 4.8:</b> Composição das soluções de macro e micronutrientes adicionadas ao meio sintético do reator anammox. ....	79
<b>Tabela 4.9:</b> Condições referentes a cada fase da Etapa 1 de operação do reator anammox. ....	81
<b>Tabela 4.10:</b> Condições referentes a cada fase da Etapa 2 de operação do reator anammox. ....	82
<b>Tabela 4.11:</b> Frequência das análises físico-químicas para monitoramento dos reatores. ....	82
<b>Tabela 5.1:</b> Potencial de produção de metano (P <sub>máx</sub> ), velocidade máxima de produção de metano (r <sub>máx</sub> ) e duração da fase lag ( $\lambda$ ) para cada ensaio em batelada. ....	88

<b>Tabela 5.2:</b> Índices de diversidade e indicador de riqueza microbiana obtidos por meio dos resultados do sequenciamento Illumina para as amostras dos ensaios em batelada referentes à PO de 0, 5,24, 10,95 e 24,34 atm. ....	94
<b>Tabela 5.3:</b> Resumo dos principais parâmetros de monitoramento obtidos durante o período de operação do reator anaeróbio. Média (desvio padrão). ....	100
<b>Tabela 5.4:</b> Caracterizações de efluentes sanitários reais brutos encontradas na literatura... ..	102
<b>Tabela 5.5:</b> Alcalinidade afluente ao reator anaeróbio em cada fase de operação. ....	102
<b>Tabela 5.6:</b> Índices de diversidade e indicador de riqueza microbiana obtidos por meio dos resultados do sequenciamento Illumina para as amostras das fases 1 e 6c do reator anaeróbio. ....	108
<b>Tabela 5.7:</b> Abundâncias relativas (%) dos gêneros associados à metanogênese nas amostras de biomassa suspensa e aderida das fases 1 e 6 de operação do reator anaeróbio. ....	113
<b>Tabela 5.8:</b> Resumo dos principais parâmetros de monitoramento obtidos durante a Etapa 1 de operação do reator anammox. Média (desvio padrão). ....	116
<b>Tabela 5.9:</b> Resumo dos principais parâmetros de monitoramento obtidos durante a Etapa 2 de operação do reator anammox. Média (desvio padrão). ....	121
<b>Tabela 5.10:</b> Tempo de duração das fases em estudos sobre influência da salinidade no processo Anammox. ....	127
<b>Tabela 5.11:</b> Resultados do balanço de massa do nitrogênio na fase 9. Média (desvio padrão). ....	130
<b>Tabela 5.12:</b> Índices de diversidade e indicador de riqueza microbiana obtidos por meio dos resultados do sequenciamento Illumina para a etapa 2 do reator anammox.....	132



## Lista de abreviaturas e siglas

ANAMMOX	<i>Anaerobic Ammonium Oxidation</i> (Oxidação Anaeróbia de Amônia)
BHD	Bactérias Heterotróficas Desnitrificantes
BOA	Bactérias oxidadoras de amônia
BON	Bactérias oxidadoras de nitrito
CNVA	Carga Nitrogenada Volumétrica Afluente
CNVR	Carga Nitrogenada Volumétrica Removida
COMAMMOX	<i>Complete Ammonia Oxidation</i> (Oxidação Completa da Amônia)
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EPS	<i>Extracellular Polymeric Substances</i> (Substâncias Poliméricas Extracelulares)
FAB	<i>Freshwater Anammox Bacteria</i> (Bactérias Anammox de água doce)
MAB	<i>Marine Anammox Bacteria</i> (Bactérias Anammox marinhas)
NDS	Nitrificação e Desnitrificação Simultâneas
NP	Nitritação Parcial
NP/A	Nitritação Parcial/Anammox
OD	Oxigênio Dissolvido
PMS	Produtos Metabólicos Solúveis
PO	Pressão Osmótica
RBN	Remoção Biológica de Nitrogênio
RDNA	Redução Dissimilatória do Nitrato a Amônia
SNAD	<i>Simultaneous Nitrification, Anammox and Denitrification</i> (Nitrificação, Anammox e Desnitrificação Simultâneas)
TDH	Tempo de Detenção Hidráulica
TRC	Tempo de Retenção Celular
UASB	<i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket</i> (Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente com Manta de Lodo)



USP

Universidade de São Paulo



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>30</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
2.1	OBJETIVO GERAL	33
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>35</b>
3.1	EFLUENTE SANITÁRIO SALINO	35
3.2	ATIVIDADE IÔNICA DOS ELETRÓLITOS E PRESSÃO OSMÓTICA TOTAL	38
3.3	DIGESTÃO ANAERÓBIA	40
3.3.1	Fundamentos do processo anaeróbio	40
3.3.2	Influência da salinidade sobre o processo	44
3.4	REMOÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO	47
3.5	OXIDAÇÃO ANAERÓBIA DA AMÔNIA (ANAMMOX)	51
3.5.1	Processo Anammox	51
3.5.2	Parâmetros de controle e inibição do processo Anammox	55
3.5.3	Influência da salinidade sobre o processo	57
3.5.4	Salinidade e bactérias Anammox: seleção ou adaptação?	60
3.5.5	Processo Anammox para o tratamento de efluente de reatores anaeróbios	64
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>67</b>
4.1	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	67
4.1.1	Salinidade aplicada no estudo	68
4.2	ENSAIOS EM BATELADA	69
4.2.1	Planejamento experimental	69
4.2.2	Procedimento experimental	71
4.2.3	Avaliação da produção de biogás	72
4.2.4	Determinação dos parâmetros cinéticos	72
4.3	REATOR CONTÍNUO ANAERÓBIO	74
4.3.1	Aparato experimental	74
4.3.2	Inóculo e <i>start-up</i>	75
4.3.3	Água residuária de estudo	75
4.3.4	Procedimento experimental	76
4.4	REATOR CONTÍNUO ANAMMOX	78
4.4.1	Aparato experimental	78
4.4.2	Inóculo e <i>start-up</i>	78

<b>4.4.3</b>	<b>Água residuária de estudo .....</b>	<b>79</b>
<b>4.4.4</b>	<b>Procedimento experimental.....</b>	<b>80</b>
4.5	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS .....	82
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	84
4.7	ANÁLISES DA COMUNIDADE MICROBIANA .....	84
<b>4.7.1</b>	<b>Identificação das amostras analisadas .....</b>	<b>84</b>
<b>4.7.2</b>	<b>Extração de DNA.....</b>	<b>85</b>
<b>4.7.3</b>	<b>Sequenciamento do gene 16S rRNA .....</b>	<b>85</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>88</b>
5.1	ENSAIOS EM BATELADA .....	88
<b>5.1.1</b>	<b>Produção de metano e remoção de DQO nos ensaios .....</b>	<b>88</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Efeito de interação entre os sais .....</b>	<b>92</b>
<b>5.1.3</b>	<b>Análises da comunidade microbiana .....</b>	<b>94</b>
5.2	REATOR CONTÍNUO ANAERÓBIO .....	99
<b>5.2.1</b>	<b>Desempenho do reator anaeróbio .....</b>	<b>99</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Análises da comunidade microbiana .....</b>	<b>108</b>
5.3	REATOR CONTÍNUO ANAMMOX .....	115
<b>5.3.1</b>	<b>Desempenho do reator Anammox .....</b>	<b>115</b>
<b>5.3.2</b>	<b>Análises da comunidade microbiana .....</b>	<b>131</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>144</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>147</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A salinização de aquíferos subterrâneos tem sido observada de forma intensa em regiões de clima árido e semiárido, como relatado em estudos realizados em regiões áridas de vários países, como China, Irã, África do Sul, México e Brasil (ADAMS et al., 2001; CARDONA et al., 2004; MAHLKNECHT et al., 2004; JALALI, 2007; JIANG, 2009). Fatores naturais colaboram para esse fenômeno, como baixo índice pluviométrico, a elevada taxa de evaporação (concentração dos sais), e a própria formação geológica dessas regiões. A demanda crescente por água para abastecimento público e industrial, que retorna na forma de esgoto para recarga dos aquíferos, também tem contribuído para esse processo (YAOUTI et al., 2009; SUN et al., 2016).

No Brasil, o estresse hídrico está presente principalmente em estados do Nordeste e em parte do estado de Minas Gerais, resultando na salinização da água subterrânea que abastece os semiáridos e sertões dessas regiões (CAVALCANTE et al., 2017). O uso dessas águas para abastecimento tem como consequência a produção de esgoto sanitário salino, contribuindo para o processo de salinização com a ciclagem da água no ambiente. Os esgotos gerados apresentam elevadas dureza, alcalinidade e concentrações de diversos elementos inorgânicos, como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{SO}_4^{2-}$ , que podem trazer prejuízos à atividade microbiana de sistemas de tratamento biológicos de esgoto sanitário (CHEN et al., 2008).

O efeito da presença de sais sobre os sistemas biológicos de tratamento de efluentes tem sido investigado recentemente. Estudos realizados em sistemas anaeróbios (ISMAIL et al., 2010; GAGLIANO et al., 2017; SYAZWANI et al., 2017; SUDMALIS et al., 2018) e aeróbios (CORTÉS-LORENZO et al., 2015; WANG et al., 2016) de tratamento contribuem para a verificação dos efeitos adversos desses sais. Entretanto, investigações que permitam associar os sais presentes nos esgotos sanitários, isoladamente ou combinados, ao desempenho dos processos de conversão de matéria orgânica e nitrogenada ainda são escassos e geralmente limitados à interferência do NaCl.

Em meio aquoso com elevadas concentrações de sais, os microrganismos estão submetidos aos efeitos da elevada pressão osmótica e da toxicidade específica dos íons (LEFEBVRE; MOLETTA, 2006; ZHAO et al., 2016). Isso significa que os processos biológicos de tratamento podem ser parcial ou completamente inibidos pela salinidade. No entanto, o processo anammox se apresenta como alternativa de elevado potencial para a remoção de nitrogênio de efluentes com elevadas concentrações de sais (JIN et al., 2012), visto

que a via metabólica anammox foi descoberta em ambientes anóxicos marinhos (KUYPERS, 2003).

Para a remoção biológica de nitrogênio em estações de tratamento, utilizam-se, em grande medida, sistemas com processos convencionais de nitrificação autotrófica e desnitrificação heterotrófica. No entanto, em relação a essa rota, o processo anammox apresenta as vantagens de redução nos custos com aeração (em torno de 60%), nos requisitos de matéria orgânica (100%) e na geração de lodo (devido ao crescimento lento da biomassa) (JETTEN et al., 1997; GAO; TAO, 2011; ALI; OKABE, 2015).

Desde a descoberta da rota metabólica anammox, o processo tem sido aplicado com êxito para o tratamento de efluentes com elevadas cargas nitrogenadas e baixa relação matéria orgânica/nitrogênio (DQO/N) (KARTAL; KUENEN; VAN LOOSDRECHT, 2010). Isso se deve ao potencial inibidor da matéria orgânica sobre a comunidade anammox (JIN et al., 2012), principalmente pela competição entre as bactérias heterotróficas desnitrificantes e as anammox pelo nitrito, promovida pela presença de matéria orgânica (CHAMCHOI et al., 2008).

Em contrapartida, estudos mais recentes relatam que o desempenho do processo não é afetado por razões DQO/N de 1,4 (JENNI et al., 2014) e até mesmo de 2 a 6 (SÁNCHEZ-GUILLÉN et al., 2014). Alguns autores relatam que a presença de concentração remanescente de matéria orgânica pode contribuir para a eficiência de remoção de nitrogênio total, por meio do consumo do nitrato produzido na reação anammox por bactérias desnitrificantes heterotróficas (JENNI et al., 2014; LI et al., 2017). Assim, a aplicação do processo anammox para tratamento de efluente de reatores anaeróbios tem sido o foco de estudos recentes (MALOVANYY et al., 2015; LEAL et al., 2016; LI et al., 2017), devido ao potencial dessa associação de tornar o balanço de energia do tratamento de águas residuárias neutro ou mesmo positivo (KARTAL; KUENEN; VAN LOOSDRECHT, 2010).

Vários estudos afirmam que a salinidade nos esgotos, devida a sais específicos avaliados isoladamente, apresenta efeito tóxico sobre as comunidades microbianas anaeróbias e anammox, em processos biológicos de tratamento (MCCARTY; MCKINNEY, 1961; RINZEMA et al., 1988; SPEECE, 1996; KARTAL et al., 2006; LEFEBVRE et al., 2007; ISMAIL et al., 2010; YI et al., 2011). Mas a associação desses tratamentos com aplicação de efluente sanitário salino, em fluxo contínuo, ainda precisa ser avaliada.

Dessa forma, o presente trabalho visa contribuir no preenchimento da lacuna sobre a utilização dos processos anaeróbio e anammox para o tratamento de esgoto sanitário salino visando à remoção de matérias carbonácea e nitrogenada, contemplando aspectos relacionados à interferência de diferentes sais no desenvolvimento dos processos.





## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem como objetivo geral avaliar os processos metanogênico e anammox para o tratamento de esgoto sanitário salino por eletrólitos mistos, na remoção de matérias carbonácea e nitrogenada.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a existência de interação entre os sais (NaCl, MgCl<sub>2</sub> e CaCl<sub>2</sub>), de sinergismo ou antagonismo, e como isso altera o efeito da salinidade sobre o processo metanogênico;
- b) Analisar o efeito dos sais NaCl, MgCl<sub>2</sub> e CaCl<sub>2</sub> sobre a atividade e a composição da comunidade microbiana metanogênica após choque de salinidade em biomassa não adaptada;
- c) Avaliar o desempenho dos processos metanogênico e anammox em reatores contínuos independentes, sob influência de diferentes níveis de salinidade;
- d) Estudar a influência da presença de matéria orgânica sobre o desempenho da comunidade microbiana associada ao processo anammox no tratamento de efluente anaeróbio salino;
- e) Caracterizar a comunidade microbiana dos reatores contínuos e associá-la aos processos de conversão observados, identificando as alterações promovidas pelo aumento da salinidade;
- f) Avaliar alterações na comunidade microbiana do reator anammox estimuladas pela presença de matéria orgânica.



### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 EFLUENTE SANITÁRIO SALINO

A escassez de água potável se apresenta como um problema global inegável e tem levado vários países a recorrerem a recursos alternativos de água para disponibilização à população. O uso de água salobra ou salina tem sido uma solução adotada para suprir a demanda de diversos usos de natureza doméstica (VOUTCHKOV, 2018). Em algumas cidades costeiras, como Hong Kong e Qingdao, na China, a aplicação direta de água do mar para o abastecimento dos sistemas de combate a incêndio, descarga de vasos sanitários, lavagem de ruas e outros usos, que não envolvam o contato com seres humanos, tem sido considerada uma alternativa importante para aliviar a pressão sobre as reservas de água doce (CHEN et al., 2012; LI et al., 2018c). Em Hong Kong, essa prática promoveu a redução em 22% do consumo de água potável (LEUNG et al., 2012).

Em regiões de climas áridos e semiáridos, os longos períodos de seca provocam a salinização dos solos e, conseqüentemente, das águas subterrâneas. A salinização de aquíferos nesses locais pode ser atribuída à acentuada evapotranspiração, possível intrusão salina, exploração exacerbada dos lençóis freáticos e dissolução de evaporito no processo de recarga dos aquíferos (TWEED et al., 2011; YAOUTI et al., 2009). A recarga hídrica limitada combinada à acentuada evapotranspiração resulta em baixo gradiente hidráulico, que configura a principal causa da concentração de sais em aquíferos (NATIV et al., 1997). Ademais, a própria formação geológica local e a relação com as mudanças climáticas podem originar aquíferos naturalmente salinos (WALTER et al., 2017).

Estima-se que mais 20% do território mundial destinado à agricultura está ameaçado pela salinização (ZHAO et al., 2020a). Na China, foi observado o aumento da área agrícola considerada salina-alcálica e a contínua desertificação e salinização do solo no país. Quando essa área é irrigada em excesso ou encharcada pela chuva, torna-se uma fonte de efluente salino (LIANG et al., 2017). Aproximadamente  $1,3$  a  $2 \times 10^8$  m<sup>3</sup> de água salina proveniente da drenagem dessas áreas flui para o Lago Chagan todo ano (YANG et al., 2015).

Nas regiões áridas e semiáridas de vários países, tem-se observado a ocorrência de salinização dos aquíferos subterrâneos cada vez mais frequente (YAOUTI et al., 2009; SUN et al., 2016), a qual juntamente à escassez hídrica tem despertado o interesse em todo o mundo. No Irã, por exemplo, uma avaliação da qualidade da água subterrânea para irrigação evidenciou os riscos da aplicação dessa água no solo. A prática ocasionaria o retorno dos sais em

concentrações ainda maiores para os aquíferos, devido à elevada evapotranspiração na região (JALALI, 2007), e intensificaria o ciclo de salinização das águas para abastecimento e outros usos.

No norte da China, a escassez hídrica extrema provocou a grande exploração de águas subterrâneas, o que tem contribuído para a salinização de aquíferos, combinada à intrusão salina na região (JIANG, 2009). Na região de Karoo, na África do Sul, a qual depende do abastecimento por água subterrânea, as características topográficas dos maciços rochosos e climatológicas têm aumentado a concentração de sais nos aquíferos (ADAMS et al., 2001). Em regiões áridas do México, estudos mostram que, além das práticas agrícolas, da elevada exploração nos poços e da intrusão salina, a salinização dos aquíferos também pode ser associada a processos erosivos de rochas como albitas (CARDONA et al., 2004; MAHLKNECHT et al., 2004).

A crescente demanda por água potável, além de acelerar a salinização de aquíferos, aumenta o consumo de água salinas para fins domésticos menos nobres, cultivo, criação de animais e na indústria, gerando efluentes com elevada concentração de sais. As águas subterrâneas são de crucial importância para o desenvolvimento e manutenção da vida em regiões de climas áridos, sendo na maioria das vezes a única fonte de água (JILALI, 2006; MONDAL et al., 2010; SINGH, 2011).

No Brasil, os estados do Nordeste e parte do estado de Minas Gerais, que sofrem com a condição de escassez hídrica, são afetados por esse problema de forma intensa (CAVALCANTE et al., 2017). Lima et al. (2008) mapearam a variação da concentração de sais na água subterrânea do nordeste brasileiro e relataram que os maiores índices de salinidade estão concentrados na porção central do Nordeste. Os autores observaram o aumento gradual da salinidade do litoral para o interior da região, na razão inversa ao índice pluviométrico. Nos estados em que foi encontrada salinidade mais elevada (Alagoas, Paraíba, Bahia, Pernambuco e Rio Grande do Norte), as concentrações de sais observadas variaram de 2000 até 8000 mg.L<sup>-1</sup>. No estado de Alagoas, além do uso não regulamentado das fontes de água subterrâneas e da intrusão salina, outro fator que apresenta risco à qualidade dos aquíferos por intensificar a salinização é o uso de efluentes pré-tratados das indústrias de cana-de-açúcar na irrigação (NOBRE et al., 2007). Em Pernambuco, na região de Recife, a salinização foi atribuída à intensificação da exploração da água e perfuração indiscriminada de poços, à proximidade a ecossistemas salinos como estuários e mangue que contribuem para a recarga dos aquíferos, ao clima, à urbanização e à atividade antropogênica (CABRAL et al., 2008; CARY et al., 2015; MONTENEGRO et al., 2006).

Uma das soluções propostas para eliminar as elevadas concentrações de sais nos mananciais subterrâneos de abastecimento de água é o processo de dessalinização. Contudo, apesar de águas salinas e salobras se apresentarem como um problema em várias regiões de diversos países, a dessalinização é uma técnica pouco aplicada, pela necessidade de elevados investimentos financeiro e energético (LEFEBVRE; MOLETTA, 2006; SHANNON et al., 2009). Assim, o uso de águas salinas para abastecimento resulta em esgotos sanitário e industriais altamente concentrados em sais, o que torna a salinidade um fator importante a ser considerado em tecnologias de tratamento de efluentes (ZHAO et al., 2020a). Em Hong Kong, por exemplo, onde a água do mar é utilizada para usos menos nobres, como a descarga em vasos sanitários, aproximadamente 2 milhões de m<sup>3</sup> por dia de efluente sanitário salino são gerados (YANG et al., 2015).

O Programa Água Doce (PAD) promoveu a caracterização da água consumida em 18 municípios do sertão do estado de Alagoas. Essa iniciativa do governo federal teve como objetivo a instalação e operação de dessalinizadores no semiárido e sertão brasileiro, para o atendimento de 20 milhões de habitantes (BRASIL, 2012). Contudo, segundo a mesma fonte, a água dessalinizada é destinada apenas para ingestão direta e preparo de alimentos, de modo que água salobra e salina ainda é utilizada para usos menos nobres, o que resulta na geração de um esgoto sanitário concentrado em sais e em matéria orgânica e nitrogenada. Dentre os íons quantificados, destacam-se as concentrações de Na<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> e CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> (ZHAO et al., 2020a), os mesmos elementos identificados em grandes concentrações pelos autores dos trabalhos supracitados nesta seção. Assim, é necessária a investigação do efeito da salinidade composta por eletrólitos mistos no tratamento biológico de efluentes com essas características.

Vários estudos aplicados ao tratamento biológico de efluentes salinos relatam que elevadas concentrações de sais no esgoto podem afetar negativamente o metabolismo microbiano. Esse efeito adverso pode ocorrer devido à plasmólise e morte celular dos microrganismos, pelo aumento da pressão osmótica exercida sobre as células ou o efeito tóxico direto dos íons na comunidade bacteriana (UYGUR; KARGD, 2004; LEFEBVRE; MOLETTA, 2006; ZHAO et al., 2016).

No entanto, na maioria desses estudos são utilizados efluentes de natureza industrial (LEFEBVRE et al., 2007; ISMAIL et al., 2010; GAGLIANO et al., 2017; WANG et al., 2017), de modo que ainda são poucas as investigações realizadas com esgoto sanitário salino, de características predominantemente domésticas (CORTÉS-LORENZO et al., 2015; GONZALEZ-SILVA et al., 2016; SYAZWANI et al., 2017). Além disso, esses estudos geralmente limitam suas análises apenas à interferência do NaCl sobre os processos

microbiológicos de tratamento. Dessa forma, são necessários estudos que permitam a associação dos sais isoladamente ou combinados à eficiência dos processos de conversão de matéria orgânica e nitrogenada em esgoto sanitário.

### 3.2 ATIVIDADE IÔNICA DOS ELETRÓLITOS E PRESSÃO OSMÓTICA TOTAL

A atividade de um íon em solução se refere à concentração efetiva deste no meio e é igual ao produto de sua respectiva concentração em quantidade de matéria pelo coeficiente de atividade a ele atribuído. No cenário de diluição infinita, assume-se que o estado padrão dos íons em solução é tal que as atividades iônicas se aproximam das próprias concentrações das espécies, ou seja, os coeficientes de atividade se aproximam da unidade; entretanto, tal suposição não tem validade para soluções reais de concentração finita (TRUESDALL; JONES, 1974). Quanto mais concentradas as soluções, menor é a distância média entre os íons, e menos moléculas de solvente interpostas estão disponíveis para cercar cada íon, forçando-as a se unirem, induzindo a formação do complexo iônico (TRUESDALL; JONES, 1969).

Diversas equações foram desenvolvidas para a estimativa do coeficiente de atividade de vários eletrólitos. Essas equações foram, de modo geral, baseadas no abaixamento do ponto de congelamento, elevação do ponto de ebulição, redução da pressão de vapor ou solubilidade das forças eletromotoras (HAMER; WU, 1972). É importante enfatizar que a maioria dessas equações estão limitadas a forças iônicas relativamente baixas. A força iônica é uma medida da intensidade do campo elétrico dos íons em solução (população total das espécies iônicas em solução) e foi introduzida por Lewis e Randall (1921) para representar a variação do coeficiente de atividade com a concentração, especialmente quando outros eletrólitos são adicionados ao meio.

O método mais utilizado para avaliar a atividade dos íons é a equação de Debye-Hückel, que é justificada por estudos teóricos e amplamente referenciada, embora seja limitada para forças iônicas de até 0,1 molal. A equação de Davies contempla soluções com força iônica de até 0,5 molal, porém não contém parâmetros ajustáveis para cada sal individualmente, no caso de soluções de eletrólitos mistos. A precisão experimental do método de Davies assume que o parâmetro mais importante na solubilidade é o efeito da associação iônica, de modo que, para todos os outros parâmetros, pode-se esperar que, com forças iônicas baixas, o efeito seja o mesmo para diferentes sais, ou não muito expressivo (DAVIES, 1938).

Segundo MacInnes (1919), a atividade dos íons cloreto é independente da atividade do íon positivo univalente. Para cloretos alcalinos, como o NaCl, a condutividade equivalente dos

íons cloreto é constante, e para concentrações crescentes, esta condutividade diminui devido à diminuição na ionização do cloreto ou à diminuição de sua mobilidade. Esses fatores afetam diretamente a concentração efetiva (atividade) dos íons cloreto. O autor também aponta que a atividade dos íons  $K^+$  e  $Cl^-$  em uma solução de KCl é a mesma, já que ambos os íons têm quase a mesma massa e mobilidade e são univalentes. Assim, a conclusão de MacInnes é que os coeficientes de atividade de íons individuais são aproximadamente os mesmos do coeficiente de atividade média em soluções de cloreto alcalino. Robinson e Stokes (1940; 1949) e Stokes (1948) estudaram a atividade de muitos eletrólitos e seus respectivos coeficientes de atividade em função da molalidade dos sais (até 5 molal). Esses estudos permitem estimar a atividade dos sais em soluções simples, embora não possam ser aplicados às misturas.

Em águas naturais ou residuárias, é comum a existência de muitos eletrólitos em concentrações consideravelmente elevadas, como cloretos, sulfatos e carbonatos, geralmente associados aos cátions sódio, magnésio, cálcio e potássio. Água do mar, estuários, salmouras naturais e corpos d'água em regiões áridas são alguns exemplos de sistemas hídricos com elevada salinidade. Para avaliar processos que ocorrem em ambientes naturais, i. e., na presença de eletrólitos múltiplos, a atividade dos íons pode ser estimada com base em suposições de modelos desenvolvidos para soluções de sal único, aplicados a soluções complexas de múltiplos íons em concentrações variáveis e elevadas (TRUESDELL; JONES, 1969). Truesdell e Jones (1969) afirmam que o cálculo de coeficientes de atividade em uma fonte natural de sais altamente concentrados exige a suposição de que o coeficiente de atividade de íons em soluções simples pode ser estendido para soluções mais complexas de mesma força iônica. Em misturas, a força total iônica é constante, mas a atividade média de um sal pode depender da força iônica exercida por outro sal que também esteja presente (HARNED; OWEN, 1958). Em soluções com presença exclusiva ou predominante de sais de cloretos, no entanto, os pares iônicos são mínimos, em comparação aos pares iônicos formados com outros ânions.

Apesar da existência de vários elementos químicos diferentes em águas naturais, algumas simplificações devem ser adotadas para a aplicabilidade em sistemas de tratamento de águas residuárias. Garrels e Thompson (1962) apontaram que a conclusão de MacInnes sobre o KCl é válida não somente para soluções de KCl puro, mas também para misturas mais complexas, como a água do mar. Os autores também aplicaram os mesmos conceitos de MacInnes para os coeficientes de atividade de cálcio e magnésio, assumindo que não há complexação de íons significativa em solução aquosa de força iônica elevada, como a água do mar. Dessa forma, os coeficientes de atividade do sal puro são os mesmos que na água do mar com a mesma força iônica. Ainda no mesmo estudo, os autores calcularam a distribuição das

principais espécies dissolvidas, a partir do pressuposto de que as interações entre os principais íons resultam apenas na formação de pares de íons. A conclusão foi que os principais íons existem como espécies não complexadas na água do mar. Essencialmente, todos os íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  estão não complexados e apenas 10 a 15% de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  estão ligados a ânions, enquanto os ânions, com exceção de  $\text{Cl}^-$ , são fortemente complexados (GARREL; THOMPSON, 1962; GARREL; CHRIST, 1965).

Truesdell e Jones (1974) desenvolveram um software para o cálculo do equilíbrio químico em águas naturais denominado "WATEQ". Neste software, os autores consideraram as equações de Debye-Huckel e MacInnes com parâmetros ajustáveis. Para elevadas concentrações, os coeficientes de atividade calculados pelos autores mostraram-se de acordo com os coeficientes médios calculados por Bates et al. (1970) baseados na equação de Robinson e Stokes (1949). Para estimar esses coeficientes, os autores assumiram que os coeficientes de atividade em soluções simples são iguais àqueles em soluções complexas da mesma força iônica. Embora eletrólitos mistos em soluções concentradas possam indicar que essa suposição nem sempre é verdadeira, os desvios da dependência da força iônica são pequenos e considerados insignificantes (PYTKOWICZ; KESTER, 1969; TRUESDELL; JONES, 1969; YEATTES et al., 1972).

Portanto, para avaliar o efeito da salinidade no tratamento biológico de águas residuárias, faz-se necessário estimar a concentração efetiva (atividade) dos íons, e assim, estimar a pressão osmótica no meio. Assim, torna-se possível o direcionamento da inibição microbiana, relacionando-a à toxicidade de um íon específico, por natureza, ou à pressão osmótica exercida sobre o microrganismo em análise. Para encontrar esses coeficientes, no presente estudo, assumiu-se que os coeficientes de atividade em soluções simples são iguais àqueles em soluções complexas de mesma força iônica e os dados de Robinson e Stokes (1949) foram a base para esta estimativa.

### 3.3 DIGESTÃO ANAERÓBIA

#### 3.3.1 Fundamentos do processo anaeróbio

A digestão anaeróbia compreende uma série de processos metabólicos sequenciais e autorregulados que se desenvolvem na ausência de oxigênio livre (MOSEY, 1983). As etapas do processo são realizadas por um consórcio de diferentes tipos de microrganismos, os quais



atuam a fim de promover a transformação de compostos orgânicos complexos em produtos mais simples, resultando principalmente nos produtos finais metano e dióxido de carbono (KHANAL, 2008).

A etapa inicial do processo consiste na hidrólise do material orgânico particulado, mais complexo, a compostos dissolvidos mais simples, a qual ocorre por meio da ação de enzimas extracelulares de microrganismos hidrolíticos e fermentativos. Em seguida, os produtos formados são convertidos em ácidos orgânicos, como acético, propiônico e butírico, álcoois, dióxido de carbono e hidrogênio. Na etapa seguinte, denominada acetogênese, os ácidos orgânicos produzidos são oxidados a acetato. Por último, o acetato e o hidrogênio produzidos são convertidos a metano e dióxido de carbono pelas arqueas metanogênicas (AM) acetoclásticas e hidrogenotróficas (CHERNICHARO, 2007).

O processo metanogênico pode ser limitado devido a aspectos termodinâmicos das reações. Isso porque a acetogênese se apresenta como uma reação com termodinâmica desfavorável. Em reações de redução de ácidos orgânicos, como propiônico e butírico, e álcoois, como etanol, para formação de acetato, o hidrogênio é um dos subprodutos, e essas reações se tornam termodinamicamente favoráveis somente se a pressão parcial de  $H_2$  for mantida abaixo de valores de  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-1}$  atm para ácido propiônico, butírico e etanol, respectivamente (SPEECE, 1996).

Assim, torna-se necessário que o equilíbrio da reação seja deslocado para que ocorra a produção de acetato. Isso é possível quando o  $H_2$  é consumido continuamente por reações receptoras de elétrons, como a produção de metano pelas AM hidrogenotróficas. Caso os níveis de  $H_2$  estejam muito elevados, a conversão de ácidos a acetato não pode prosseguir, o que implica no acúmulo de ácidos orgânicos no sistema, podendo causar inibição da metanogênese. Dessa forma, a transferência de hidrogênio interespecies, entre bactérias acetogênicas e AM hidrogenotróficas, é considerada essencial à oxidação dos produtos da etapa acidogênica (STAMS et al., 2006).

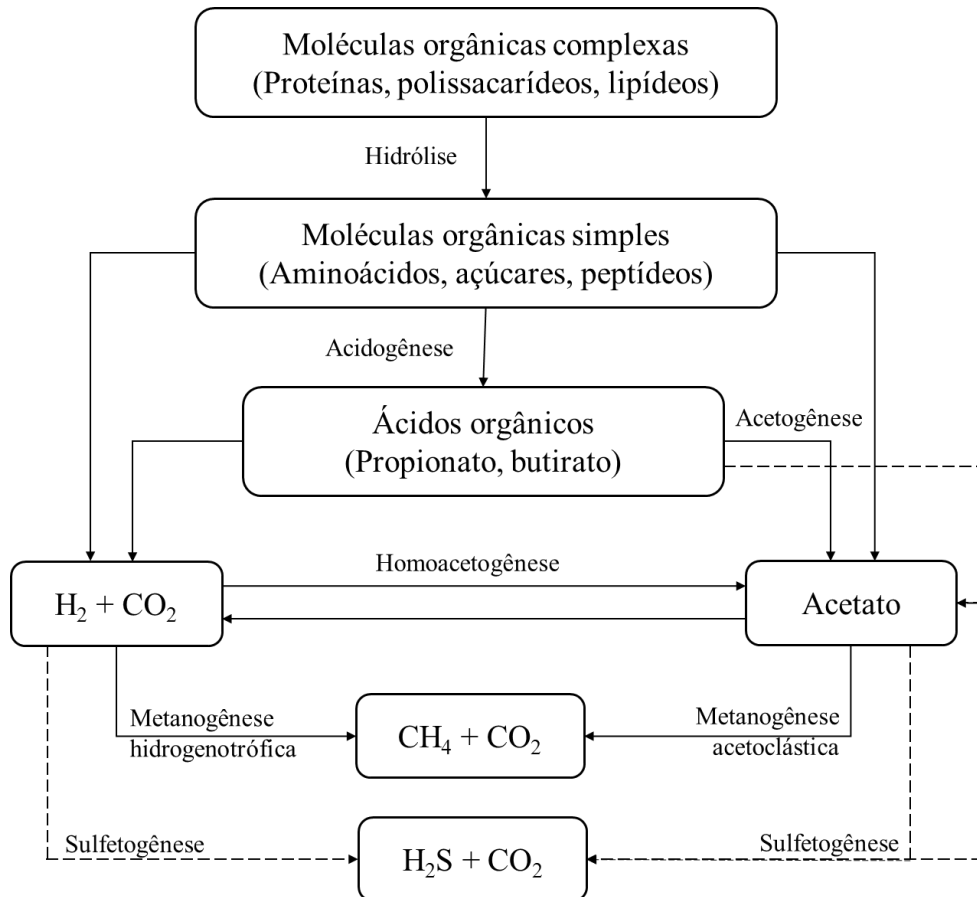
Além da metanogênese acetoclástica, outra rota metabólica de utilização do acetato para produção de metano é a oxidação sintrófica de acetato, na qual um grupo de microrganismos oxidam acetato a  $CO_2$  e  $H_2$  e as arqueas metanogênicas hidrogenotróficas utilizam esses produtos para a geração de metano (HATTORI, 2007). Assim, quando há inibição sobre a metanogênese acetoclástica durante a fermentação de substratos complexos, o potencial acúmulo do excesso de acetato pode ser removido via rota alternativa de oxidação sintrófica do acetato, para manutenção da estabilidade dos reatores anaeróbios (WERNER et al., 2014). A

oxidação do acetato a  $H_2$  e  $CO_2$  também é dependente da baixa pressão parcial de hidrogênio no meio, ou seja, da atividade das AM hidrogenotróficas.

Em relação à cinética das reações, o crescimento das AM é mais lento (1-9 dias) (LIU et al., 2015), comparado ao dos outros microrganismos participantes do processo anaeróbio. Dessa forma, qualquer mudança significativa no meio ao qual estas estão adaptadas causa distúrbio em seu crescimento, o que pode interromper a formação de metano. Em termos de comunidade microbiana metanogênica, Zhang et al. (2018) identificaram as AM acetoclásticas *Methanosaetaceae* e AM hidrogenotróficas *Methanomicrobiales* em biofilme anaeróbio tratando esgoto sanitário, enquanto as AM acetoclásticas *Methanosarcinaceae* não foram detectadas.

Em águas residuárias que contenham sulfato ( $SO_4^{2-}$ ) em sua composição, este pode ser utilizado como aceptor final de elétrons por bactérias redutoras de sulfato (BRS). Nesse processo, compostos orgânicos e hidrogênio são utilizados para redução do sulfato a sulfeto (sulfetogênese), reduzindo, assim, a disponibilidade de substrato para a metanogênese. De acordo com aspectos cinéticos e termodinâmicos da metabolização do acetato, as BRS apresentam vantagem competitiva sobre as AM, uma vez que a reação da sulfetogênese libera mais energia na degradação de acetato e que as BRS possuem maior velocidade de crescimento, em comparação às AM (OUDE ELFERINK et al., 1994). A relação  $DQO/SO_4^{2-}$  é o principal parâmetro para determinação da via predominante de remoção de matéria orgânica em reatores anaeróbios (metanogênica ou sulfetogênica). Segundo Damianovic e Foresti (2007), para águas residuárias com relação  $DQO/SO_4^{2-}$  superior a 10, a prevalência da metanogênese é observada, enquanto para razões  $DQO/SO_4^{2-}$  inferiores a 1, há a predominância da rota sulfetogênica. Os esgotos sanitários apresentam, em geral, baixas concentrações de sulfato ( $10-30 \text{ mg.L}^{-1}$ ), o que resulta em elevadas relações  $DQO/SO_4^{2-}$  e, em geral, limitam o crescimento de BRS em sistemas de tratamento de esgoto doméstico, predominando a via metanogênica (LIU et al., 2015). A Figura 3.1 apresenta um fluxograma simplificado da sequência de processos da digestão anaeróbia via metanogênese e sulfetogênese.

**Figura 3.1:** Rotas metabólicas envolvidas no processo de digestão anaeróbia.



Fonte: adaptado de Lyberatos e Skiadas (1999).

Diante desses aspectos, a presença de vários microrganismos diferentes coexistindo em sintrofismo é importante para o balanceamento do processo de digestão anaeróbia. Ademais, diversos fatores ambientais influenciam diretamente o consórcio microbiano, como temperatura, pH, alcalinidade, macronutrientes (N, P,  $\text{SO}_4^{2-}$ ) e micronutrientes (metais traços), fonte de carbono e características do reator (crescimento de biomassa suspensa ou aderida) (SPEECE, 1996). A presença de compostos tóxicos, como amônia, sulfeto, metais pesados e cátions de metais alcalinos e alcalino-terrosos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ), objeto deste estudo, também interferem no desempenho do processo anaeróbio. Dessa forma, associar o efeito dos sais nos diferentes grupos de microrganismos pode contribuir para a compreensão do papel dos interferentes.

### 3.3.2 Influência da salinidade sobre o processo

O processo metanogênico apresenta elevada sensibilidade à presença de sais no afluente do reator (MCCARTY; MCKINNEY, 1961; FEIJOO et al., 1995; SPEECE, 1996), inclusive superior à sensibilidade apresentada pelos microrganismos acidogênicos (LEFEBVRE et al., 2007). Em virtude do potencial tóxico de afluente bruto salino sobre a metanogênese, vários estudos têm sido realizados com o objetivo de determinar os principais aspectos que influenciam esse processo. Tais aspectos incluem as concentrações limites de sais suportadas pela comunidade metanogênica, influência da natureza do substrato, adaptação da biomassa e efeito de antagonismo pela presença de um cátion sobre outro (FEIJOO et al., 1995).

A maioria desses estudos apresentam apenas os efeitos associados ao sódio, definindo concentrações limites de  $\text{Na}^+$  toleradas por reatores anaeróbios (SYAZWANI et al., 2017). Apesar disso, ainda é difícil estabelecer um consenso sobre o limite máximo para o cátion. Em trabalhos realizados em reator UASB com a utilização de acetato como substrato, Rinzema et al. (1988) relataram que concentrações de 5, 10 e 15 g  $\text{Na}^+ \cdot \text{L}^{-1}$  causaram inibição de 10, 50 e 100% no processo de metanogênese e Ismail et al. (2010) afirmaram que uma concentração de sódio de até 10 g  $\cdot \text{L}^{-1}$  não causou prejuízo à digestão anaeróbia.

Gagliano et al. (2017) observaram que reatores anaeróbios de leito fixo estruturado suportaram concentrações de até 10 g  $\text{Na}^+ \cdot \text{L}^{-1}$  sem prejuízo à capacidade de degradação da biomassa metanogênica, quando o substrato tratado foi acetato. A influência do sódio também foi avaliada em reatores de leito fixo por Rovirosa et al. (2004), que verificaram que a concentração de até 4,6 g  $\cdot \text{L}^{-1}$  de sódio não afetou o desempenho de reatores anaeróbios com TDH de 24 horas tratando efluente de pocilga associado a solução salina.

Essas diferenças são atribuídas por muitos pesquisadores à forma de aplicação do efluente salino, isto é, se o reator é submetido a um choque de concentrações elevadas de sais ou se o aumento da salinidade é gradativo, bem como à concentração (RINZEMA et al., 1988) e ao tipo de substrato (LEFEBVRE et al., 2007; ISMAIL et al., 2010) disponibilizado para a digestão anaeróbia. Outros aspectos responsáveis pelas discrepâncias entre os resultados dos estudos são a adaptação ou não do inóculo utilizado e a forma de cultivo da biomassa nos reatores (em grânulos ou imobilizadas em meio suporte).

Lefebvre et al. (2007) avaliaram a influência da natureza do substrato sobre o processo de digestão anaeróbia em elevada concentração de NaCl, ao comparar o desempenho de um reator UASB alimentado por substrato simples (etanol) e outro por substrato complexo

(vinhaça). Os autores observaram que, para uma mesma concentração do sal, o processo metanogênico foi afetado negativamente de forma mais intensa quanto maior a complexidade do substrato a ser digerido. Isso indica que, para uma mesma concentração de NaCl, a população metanogênica teve a atividade mais prejudicada do que a acidogênica. Em sentido contrário, Ismail et al. (2010) relataram que a alimentação com substrato mais complexo, parcialmente acidificado, produziu grânulos de maiores dimensões e mais resistentes, do que a alimentação com substrato mais simples, completamente acidificado, na presença de  $\text{Na}^+$  ( $20 \text{ g.L}^{-1}$ ).

Além da influência do excesso de sódio sobre a metanogênese, o efeito associado a elevadas concentrações de cálcio e o efeito isolado do cálcio têm sido estudados. Cátions divalentes como  $\text{Ca}^{2+}$  são reconhecidos por terem um papel importante na agregação de microrganismos em reatores anaeróbios, por formarem pontes carregadas positivamente entre as superfícies negativas de substâncias poliméricas extracelulares e bactérias (YU et al., 2001). Entretanto, ao comparar o desempenho de reatores UASB na presença de sódio e na associação de sódio e cálcio, foi observado que a adição de  $\text{Ca}^{2+}$  acarretou prejuízos à adaptação do lodo e ao desempenho do reator em longo prazo (ISMAIL et al., 2010), bem como alterou a comunidade microbiana (GAGLIANO et al., 2017). De acordo com Wang et al. (2018b), na ausência de sódio, baixas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  são benéficas ao desempenho da metanogênese, mas quando combinadas e em elevadas concentrações prejudicam drasticamente o processo.

A intensificação do efeito negativo do  $\text{Na}^+$  na presença de outros compostos (sinergismo) sobre o processo anaeróbio também foi relatado por Callado, Damianovic e Foresti (2017). Os autores avaliaram o desempenho da rota metanogênica em reator UASB na presença simultânea de sódio e sulfeto e observaram maior inibição do processo nessa condição, quando comparado à presença de sódio e sulfeto individualmente.

O efeito de antagonismo de sais, o qual é definido pela capacidade de alguns cátions de amenizar o efeito de outros cátions tóxicos ao metabolismo de microrganismos (MCCARTY; MCKINNEY, 1961; KUGELMAN; MCCARTY, 1965; FEIJOO et al., 1995), também tem sido avaliado. Gagliano et al. (2017) compararam o desempenho de reatores anaeróbios de leito estruturado alimentados com afluente sintético à base de acetato, um contendo  $\text{Na}^+$  isoladamente e outro no qual foi adicionado pequena quantidade de  $\text{K}^+$ , além do sódio. Os autores observaram um alívio à toxicidade provocada pelo  $\text{Na}^+$  promovido pelo potássio, o que também foi observado por Syazwani et al. (2017) ao operar reator anaeróbio de mistura completa (crescimento disperso), tratando esgoto sanitário salino. Segundo Welsh et al. (2000) e Roessler e Müller (2001), os microrganismos submetidos à presença dos sais aumentam a

concentração intracelular de íons para balancear a pressão osmótica externa exercida pela elevada concentração de sódio no meio extracelular. Na maioria dos casos, o potássio é o cátion acumulado no meio intracelular para que seja atingido tal equilíbrio.

Em relação ao inóculo dos reatores anaeróbios para tratamento de efluentes com elevada salinidade, grande parte dos estudos relata a inoculação dos reatores em análise com lodo adaptado à condição salina (GAGLIANO et al., 2017; SUDMALIS et al., 2018). No entanto, outros estudos realizados com a utilização de inóculo não adaptado à elevada salinidade também relataram êxito na operação de reatores anaeróbios avaliados, alimentados a partir do aumento gradativo da salinidade do afluente (ROVIROSA et al. 2004; LEFEBVRE et al., 2007; SYAZWANI et al., 2017).

No que se refere ao efeito dos sais sobre a comunidade microbiológica responsável pela metanogênese em reatores anaeróbios, Rinzema et al. (1988) observaram efeito inibitório intenso de elevadas concentrações de  $\text{Na}^+$  sobre as arqueas metanogênicas *Methanotherix* spp, hoje *Methanosaeta* spp. Segundo os autores, não foi observada adaptação da biomassa com a predominância desse gênero em ambiente salino ( $10\text{-}15 \text{ g Na}^+ \cdot \text{L}^{-1}$ ) por um período de até 12 semanas. Por outro lado, Gagliano et al. (2017) e Sudmalis et al. (2018) relataram o bom desempenho e predominância das arqueas metanogênicas *Methanosaeta* spp. no tratamento de efluente salino (até  $20 \text{ g Na}^+ \cdot \text{L}^{-1}$ ). A esses microrganismos foi atribuída a capacidade de agregação necessária à formação e manutenção do biofilme nos reatores anaeróbios de leito estruturado (GAGLIANO et al., 2017).

Dessa forma, observa-se que ainda não há um consenso em relação a diversos aspectos associados ao desempenho da metanogênese em elevada concentração de sais, no que se refere ao nível de salinidade suportada pela comunidade metanogênica e à influência de outros sais, além do sódio, sobre o processo. Ademais, a capacidade de um inóculo não halofílico de se adaptar à condição salina também precisa ser caracterizada. Por meio da alimentação em diferentes níveis de salinidade, de forma gradativa, e composição considerando diferentes sais, o presente trabalho busca preencher essas lacunas.

### 3.4 REMOÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

O nitrogênio é um dos elementos mais abundantes na composição química das células, sendo o constituinte básico de aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos. Cada vez mais, o ciclo do nitrogênio tem sido alterado no meio ambiente devido à distribuição desbalanceada de compostos nitrogenados causada pela intervenção antropogênica, especialmente nos sistemas aquáticos (MISHRA et al., 2022). Em todo o mundo, os efluentes gerados no âmbito doméstico, nas indústrias e na agricultura apresentam concentrações relevantes de compostos nitrogenados, especificamente nitrogênio orgânico, amônia, nitrito e nitrato. O lançamento desses efluentes em corpos d'água, sem o devido tratamento para a remoção de nitrogênio, resulta na deterioração da qualidade da água, estimula a eutrofização e altera a biodiversidade aquática dos corpos hídricos (CAREY; MIGLIACCIO, 2009).

Com o objetivo de minimizar os efeitos deletérios do excesso de nitrogênio nos aquíferos, os processos de remoção biológica de nitrogênio (RBN) têm sido amplamente empregados em estações de tratamento de efluentes (ETEs) (WEIßBACH et al., 2017). A RBN pode ser implantada pela associação de diversas rotas metabólicas, como nitrificação completa ou parcial, desnitrificação completa ou parcial, desnitrificação via nitrito, anammox (*Anaerobic Ammonium Oxidation*) e comammox (*Complete Ammonia Oxidizing*) (CHEN et al., 2023).

O processo de nitrificação ocorre em duas etapas sequenciais: primeiramente, a oxidação de amônia a nitrito é realizada pelas bactérias oxidadoras de amônia (BOA) e, em seguida, o nitrito é oxidado a nitrato pelas bactérias oxidadoras de nitrito (BON). A Equação 3.1 mostra a reação completa de nitrificação, incluindo a síntese celular (AHN, 2006). Ambos os grupos de microrganismos envolvidos no processo apresentam metabolismo quimiolitotrófico, utilizando carbono para síntese celular a partir de uma fonte inorgânica e oxidando compostos inorgânicos (N-amoniaco e nitrito) para geração de energia. Ademais, os dois processos (nitritação e nitratação) ocorrem na presença de oxigênio. Os principais gêneros de BOA encontrados nos sistemas de tratamento são *Nitrosomonas* e *Nitrospira*. Os gêneros de BON geralmente observados em reatores nitrificantes são *Nitrobacter* e *Nitrospira* (CHEN et al., 2023). A Tabela 3.1 representa os gêneros de BOA e BON encontrados em estudos focados na remoção de nitrogênio de efluentes.



Equação 3.1

**Tabela 3.1:** Gêneros de bactérias oxidadoras de amônia (BOA) e nitrito (BON) encontrados em sistemas de remoção biológica de nitrogênio.

<b>Grupo</b>	<b>Gêneros</b>	<b>Espécies</b>
Bactérias oxidadoras de amônia (BOA)	<i>Nitrospira</i>	<i>Nitrospira briensis</i>
		<i>Nitrospira lacus</i>
		<i>Nitrospira multiformis</i>
		<i>Nitrospira tenuis</i>
	<i>Nitrosolobus</i>	<i>Nitrosolobus multiformis</i>
	<i>Nitrosovibrio</i>	<i>Nitrosovibrio tenuis</i>
	<i>Nitrosomonas</i>	<i>Nitrosomonas aestuarii</i>
		<i>Nitrosomonas marina</i>
		<i>Nitrosomonas ureae</i>
		<i>Nitrosomonas oligotropha</i>
		<i>Nitrosomonas nitrosa</i>
		<i>Nitrosomonas communis</i>
		<i>Nitrosomonas halophila</i>
<i>Nitrosomonas eutropha</i>		
<i>Nitrosomonas europaea</i>		
<i>Nitrosomonas cryotolerans</i>		
Bactérias oxidadoras de nitrito (BON)	<i>Nitrobacter</i>	<i>Nitrobacter alkalicus</i>
		<i>Nitrobacter winogradskyi</i>
		<i>Nitrobacter vulgaris</i>
		<i>Nitrobacter hamburgensis</i>
	<i>Nitrospira</i>	<i>Nitrospira marina</i>
		<i>Nitrospira moscoviensis</i>
		<i>Candidatus Nitrospira bockiana</i>
		<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i>

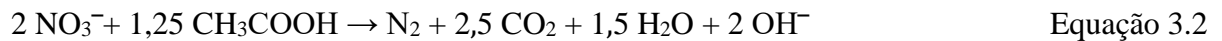
Fonte: Chen et al. (2023).

A desnitrificação é o processo de redução de nitrato ( $N-NO_3^-$ ) a nitrogênio gasoso ( $N_2$ ). Essa redução ocorre sob condições anóxicas ou de limitação de oxigênio dissolvido, nas quais os microrganismos utilizam compostos nitrogenados inorgânicos em substituição ao oxigênio como aceptores finais de elétrons (JETTEN, 2008). O processo pode ser realizado por bactérias quimiorganotróficas, litoautotróficas, fototróficas e alguns fungos. A maioria dos microrganismos desnitrificantes em sistemas de tratamento de efluentes são bactérias anaeróbias facultativas de metabolismo heterotrófico, que são capazes de utilizar diversos compostos orgânicos, como metanol, acetato, glicose e etanol como fonte de carbono e doadores de elétrons para obtenção de energia (AHN, 2006; CHEN et al., 2023).

A desnitrificação completa (Equação 3.2) pode ser dividida em quatro etapas. Primeiramente, o nitrato ( $NO_3^-$ ) é reduzido a nitrito ( $NO_2^-$ ), em reação envolvendo a enzima nitrato redutase. Em seguida, pela ação da enzima nitrito redutase, o nitrito formado é reduzido



a óxido nítrico (NO), o qual é convertido a óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) e, finalmente, este é reduzido a N<sub>2</sub>. A terceira e quarta etapas são mediadas pelas enzimas óxido nítrico redutase e óxido nitroso redutase, respectivamente (MADIGAN et al., 2016). Em condição de limitação de matéria orgânica no meio, identificada pela baixa relação C/N, a desnitrificação pode ocorrer de forma incompleta, de modo que a redução do nitrato acontece apenas até a formação de nitrito, em processo denominado desnitrificação parcial (MOHAN et al., 2016).



Em geral, a comunidade microbiana de bactérias desnitrificantes heterotróficas em sistemas de tratamento de efluentes apresenta elevada diversidade e riqueza de espécies (CHEN et al., 2023). Alguns microrganismos que realizam a desnitrificação heterotrófica são *Anaerolinea*, *Denitratisoma*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Thauera*, *Thiobacillus*, *Azoarcus*, *Acidovorax*, *Turcibacter*, *Rhodopseudomonas* e *Saccharibacteria* (HE et al., 2018; SOUZA et al., 2020). Além da via heterotrófica, compostos inorgânicos reduzidos, como o sulfato, também podem ser utilizados como doadores de elétrons para a redução de nitrato, no processo denominado desnitrificação autotrófica via sulfato. A utilização dessa rota metabólica pode ser observada por microrganismos como *Thauera*, *Comamonas*, *Alcaligenes*, *Brachymonas* e *Acidovorax* (OLIVEIRA et al., 2013).

Além da redução de nitrato como aceptor de elétrons, a reação de desnitrificação também pode ocorrer via nitrito. Essa rota metabólica é denominada “*short-cut denitrification*” ou desnitrificação pela via curta. Nos últimos anos, vários estudos foram realizados em busca da otimização da remoção biológica de nitrogênio via nitrito, com a combinação da nitrificação parcial (oxidação da amônia a nitrito) à desnitrificação via nitrito (YANG et al., 2007). Essa associação é baseada no fato de que o nitrito é um composto intermediário de ambos os processos de nitrificação e desnitrificação. O resultado da oxidação da amônia a nitrito e a redução do nitrito direto a N<sub>2</sub> é a redução de 60% nos custos com aeração, devido ao menor requisito de oxigênio para oxidação do N-amoniaco, e diminuição de até 40% nos requisitos de doador de elétrons para desnitrificação (PENG; ZHU, 2006).

Até a década de 90, acreditava-se que a única rota metabólica de oxidação da amônia era a nitrificação, realizada por microrganismos estritamente aeróbios. No entanto, em estudo realizado por Mulder et al. (1995), foi demonstrada a existência de um outro processo de oxidação da amônia, observado em ambiente anóxico, com a utilização de nitrito como aceptor de elétrons, em substituição ao oxigênio. Essa reação, que foi denominada Anammox

(*Anaerobic Ammonium Oxidation*) e revolucionou o cenário da RBN em todo o mundo (NI; ZHANG, 2013), será abordada mais detalhadamente no item 3.5 ‘Oxidação Anaeróbia da Amônia (Anammox)’.

Mais recentemente, o estudo de van Kessel et al. (2015) revelou a existência de outra via metabólica aeróbia de oxidação da amônia (Equação 3.3). Nesse processo, denominado comammox (*Complete Ammonia Oxidation*), um único microrganismo oxida o N-amoniaco diretamente a nitrato, utilizando o oxigênio como aceptor final de elétrons. Até o momento, todas as bactérias comammox foram classificadas no gênero *Nitrospira*, sendo muito similares geneticamente a típicas BON desse mesmo gênero (CHEN et al., 2023). Estudos recentes mostraram que o processo de nitrificação dominado por bactérias comammox foi mais eficiente que aqueles dominados por BOA e BON, em meio com baixa concentração de  $\text{N-NH}_4^+$  e oxigênio dissolvido (OD), além da emissão de  $\text{N}_2\text{O}$  ter sido menor (KITS et al., 2019; PROSSER et al., 2020). Segundo Camejo et al. (2017), as bactérias comammox apresentam maior afinidade pelo oxigênio, em relação às bactérias nitrificantes, o que as torna mais competitivas em meio com reduzida concentração de OD. Assim, a associação do processo comammox ao anammox ou à desnitrificação pode levar à economia em aeração e ciclos internos em Estações de Tratamento de Efluentes (ETEs).

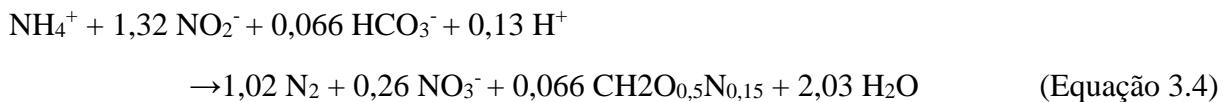


A associação de duas ou mais rotas metabólicas deram origem a várias tecnologias de tratamento, como NDS (nitrificação e desnitrificação simultâneas), na qual são estabelecidos os processos de nitrificação e desnitrificação em um mesmo reator; PN/A (do inglês *partial nitrification/anammox*) de um e de dois estágios, em que são empregados nitrificação parcial e anammox em reator único e em reatores separados, respectivamente; PD/A (do inglês *partial denitrification/anammox*), no qual são utilizados os processos de desnitrificação parcial e anammox; e SNAD (do inglês *Simultaneous Nitrification, Anammox and Denitrification*), que combina os três processos de nitrificação parcial, anammox e desnitrificação, e tem sido o mais estudado atualmente (MISHRA et al., 2022).

### 3.5 OXIDAÇÃO ANAERÓBIA DA AMÔNIA (ANAMMOX)

#### 3.5.1 Processo Anammox

A rota metabólica anammox (*anaerobic ammonium oxidation* – oxidação anaeróbia da amônia) foi primeiramente observada em um reator desnitrificante de leito fluidizado em escala piloto na Holanda, na década de 90 (MULDER et al., 1995). O processo anammox é realizado por microrganismos capazes de oxidar o íon amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) diretamente a nitrogênio gasoso ( $\text{N}_2$ ) em condições anóxicas, utilizando nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) como acceptor final de elétrons (Equação 3.3) (VAN DE GRAAF et al., 1996). As bactérias com atividade anammox possuem metabolismo quimiolitotrófico e apresentam baixa taxa de crescimento, o que resulta numa baixa produção de biomassa por mol de amônio consumido (STROUS et al., 1998).



Os microrganismos responsáveis pelo processo anammox são pertencentes ao filo *Planctomycetes* do Dominio Bacteria, classe *Planctomycetia*, ordem *Planctomycetales* e família *Brocadiaceae*. Até o momento, 26 espécies, em sete gêneros de bactérias anammox, foram identificadas, conforme descrito na Tabela 3.2. Os gêneros mais comuns em sistemas de remoção biológica de nitrogênio são *Candidatus Brocadia*, *Candidatus Jettenia* e *Candidatus Kuenenia* (CHEN et al., 2023).

**Tabela 3.2:** Espécies de bactérias anammox identificadas na literatura.

<b>Gênero</b>	<b>Espécie</b>	<b>Referência</b>
<i>Ca. Anammoximicrobium</i>	<i>Ca. Anammoximidrobium moscowii</i>	Khramenkov et al. (2013)
<i>Ca. Anammoxoglobus</i>	<i>Ca. Anammoxoglobus propionicus</i>	Hsu et al. (2014)
	<i>Ca. Anammoxoglobus sulfate</i>	Hsu et al. (2014)
<i>Ca. Brasilis</i>	<i>Ca. Brasilis concordiensis</i>	Viancelli et al. (2011)
<i>Ca. Brocadia</i>	<i>Ca. Brocadia anammoxidans</i>	Kartal et al. (2008)
	<i>Ca. Brocadia fulgida</i>	Kartal et al. (2008)
	<i>Ca. Brocadia sinica</i>	Hu et al. (2010)
	<i>Ca. Brocadia brasiliensis</i>	Araujo et al. (2011)
	<i>Ca. Brocadia caroliniensis</i>	Rothrock et al. (2011)
	<i>Ca. Brocadia sapporoensis</i>	Kartal et al. (2007)
<i>Ca. Jettenia</i>	<i>Ca. Jettenia asiatica</i>	Dang et al. (2013)
	<i>Ca. Jettenia caeni</i>	Quan et al. (2008)
	<i>Ca. Jettenia moscoviensis</i>	Nikolaev et al. (2015)
<i>Ca. Kuenenia</i>	<i>Ca. Kuenenia stuttgartiensis</i>	Narita et al. (2017)
<i>Ca. Scalindua</i>	<i>Ca. Scalindua arabica</i>	Woebken et al. (2008)
	<i>Ca. Scalindua brodae</i>	Liu et al. (2008)
	<i>Ca. Scalindua wagneri</i>	Liu et al. (2008)
	<i>Ca. Scalindua marina</i>	Brandsma et al. (2011)
	<i>Ca. Scalindua profunda</i>	van de Vossenbergh et al. (2013)
	<i>Ca. Scalindua richardsii</i>	Hong et al. (2011)
	<i>Ca. Scalindua sinooilfield</i>	Li et al. (2010)
	<i>Ca. Scalindua sorokinii</i>	Jetten et al. (2003)
	<i>Ca. Scalindua zhenghei I, II, III</i>	Li et al. (2013)
	<i>Ca. Scalindua rubra</i>	Speth et al. (2017)
	<i>Ca. Scalindua flavia</i>	Speth et al. (2017)
	<i>Ca. Scalindua pacifica</i>	Dang et al. (2013)

Fonte: Chen et al. (2023)

A estrutura celular das bactérias anammox é dividida em três compartimentos, delimitados por membranas: periplasma, citoplasma e anamoxossomo, sendo nesse último onde ocorrem as reações metabólicas desses microrganismos e onde estão presentes as enzimas que participam das reações de oxidação anaeróbia da amônia (PEETERS; VAN NIFTRIK et al., 2019). Além disso, uma característica única das bactérias anammox é a coloração laranja-avermelhada desses microrganismos, que ocorre devido à presença da proteína heme c no interior das células (KARTAL; KELTJENS, 2016).

As bactérias anammox geralmente apresentam longo tempo de duplicação, de 10 a 14 dias (STROUS et al., 1998; JIN et al., 2011). Essa característica é uma das principais desvantagens do processo, uma vez que implica em maiores tempos de partida dos reatores. O crescimento lento pode ser um obstáculo ainda maior para o tratamento de efluentes com baixas

concentrações de nitrogênio, uma vez que a baixa disponibilidade de substrato pode reduzir ainda mais a produção de biomassa (MORALES et al., 2015; GANI et al., 2020). A depender das condições de cultivo e da espécie anammox, o tempo de duplicação pode variar de 2,1 (LOTTI et al., 2015) a 32 (KHRAMENKOV et al., 2013) dias. A observação de reduzidos tempos de duplicação, como 2,1, 3,3 e 7 dias reportados na literatura (LAURENI et al., 2015; LOTTI et al., 2015; ZHANG et al., 2017) tem levantado o questionamento sobre a característica de crescimento lento das bactérias anammox (ZHANG et al., 2017).

Uma das estratégias para compensar o crescimento lento dos microrganismos é o emprego de um elevado tempo de retenção celular (TRC) para o aumento da concentração de biomassa no sistema e para a garantia do crescimento das bactérias anammox em condições de baixo fornecimento de substrato, como é o caso dos reatores em *mainstream* (fluxo principal da linha de tratamento) (LOTTI et al., 2015). Uma das alternativas para o estabelecimento de altos TRC é o uso de biomassa granular, que tem sido uma estratégia aplicada com sucesso para o processo anammox (STROUS et al. 1998; VAN DER STAR et al., 2007; FERNÁNDEZ et al., 2008; GANI et al., 2020). Ademais, o tempo de partida dos reatores pode ser reduzido com o emprego de inóculo com atividade anammox e concentração de sólidos suspensos voláteis adequada (WETT et al., 2015; CHENG et al., 2020).

Uma vez que a matéria nitrogenada da maioria dos efluentes a serem tratados se apresenta quase em sua totalidade na forma de nitrogênio amoniacal, a aplicação do processo anammox em Estações de Tratamento implica na consideração de uma etapa aeróbia de conversão parcial da amônia afluenta a nitrito (nitritação parcial). Essa etapa deve fornecer um efluente com as características ótimas para o processo anammox, sendo responsável pela conversão de mais de 50% da amônia a nitrito, atendendo aos requisitos estequiométricos da reação anammox (relação N-amônia/N-nitrito de 1:1,32) (STROUS et al., 1998).

Convencionalmente, a remoção biológica de nitrogênio (RBN) é realizada pelos processos de nitrificação seguido de desnitrificação heterotrófica nas estações de tratamento. No entanto, em relação a essa rota, o processo nitritação parcial/anammox apresenta-se mais vantajoso devido à redução nos custos com aeração (em torno de 60%, visto que a amônia é oxidada apenas a nitrito), nos requisitos de matéria orgânica (100%, por se tratar de processo autotrófico) e na geração de lodo (devido ao baixo rendimento celular da biomassa anammox) (JETTEN et al., 1997; GAO; TAO, 2011; ALI; OKABE, 2015).

O processo de nitrificação é realizado por dois grupos de microrganismos, como já descrito anteriormente, as BOA, responsáveis pela oxidação da amônia a nitrito, e as BON, que oxidam o nitrito a nitrato. Assim, para que seja obtida a nitritação parcial, faz-se necessário o

emprego de estratégias de inibição da atividade das BONs, resultando na lavagem desses microrganismos do sistema com o tempo (LEMAIRE et al., 2008; MA et al., 2015; YANG et al., 2007). Os principais fatores utilizados para promover a seleção das BOAs em relação às BONs são a concentração de oxigênio dissolvido e o tempo de retenção celular (LIU; WANG, 2013; REGMI et al., 2014). Segundo Peng e Zhu (2006), elevadas concentrações de sais também limitam o crescimento das BON e favorecem as BOA.

Uma vez que ambos os processos de nitrificação parcial (NP) e anammox são realizados por microrganismos autotróficos, a associação dessas duas rotas para o tratamento de efluentes se apresenta como uma alternativa de remoção biológica de nitrogênio completamente autotrófica. Essa combinação pode ser implantada pelo estabelecimento dos dois processos em uma única unidade de tratamento (sistema de estágio único) ou em dois reatores separadamente (sistema de dois estágios).

Apesar de sistemas de estágio único serem os mais adotados atualmente, o estudo de Bonassa et al. (2021) traz uma análise de que nem sempre essa é a alternativa mais vantajosa. Os autores mostram que, para sistemas tratando efluentes com concentração de matéria orgânica mais elevada (relação DQO/N superior a 1), a separação dos processos pode ser a melhor opção. Embora o custo de implantação seja maior, os custos de operação seriam menores, com o aumento da estabilidade operacional (BONASSA et al., 2021). As principais vantagens dos sistemas de dois estágios são: o reator anammox pode ser operado em ambiente anóxico, sem o risco de competição por nitrito com as bactérias oxidadoras de nitrito; e os processos podem ser otimizados separadamente (CAO et al., 2017).

De acordo com Reino e Carrera (2017), muitos estudos focaram na implantação da RBN autotrófica no tratamento de efluentes pouco concentrados por meio de sistemas de estágio único NP/A. No entanto, os autores ressaltam que esses sistemas frequentemente apresentam desvantagens significativas, como baixas cargas de nitrogênio removidas, desestabilização da nitrificação parcial em longo prazo e competição pelo nitrito entre bactérias oxidadoras de nitrito e bactérias anammox na presença de oxigênio, com subsequente desestabilização do processo anammox. Assim, o sistema de dois estágios se apresenta como uma alternativa para a solução de tais impasses, uma vez que um desempenho e controle operacional mais estáveis podem ser obtidos nos processos de nitrificação parcial e anammox. (MA et al., 2011; REINO; CARRERA, 2017).

### 3.5.2 Parâmetros de controle e inibição do processo Anammox

Segundo Chen et al. (2023), em sistemas de RBN nos quais o processo anammox são associados a uma outra via metabólica (p.ex., nitrificação parcial ou desnitrificação parcial), os microrganismos anammox são considerados os mais críticos. Isso porque essas bactérias apresentam crescimento lento e elevada sensibilidade a alterações de fatores ambientais. Parâmetros como temperatura, concentração de substrato, oxigênio dissolvido, matéria orgânica, sulfeto e salinidade influenciam a reação anammox.

A temperatura é um fator comumente apontado como limitação para o processo anammox em *mainstream*. Ali e Okabe (2015) reportaram que a temperatura ótima para o processo anammox é de 37°C, enquanto Gao e Tao (2011) mostraram que o processo foi afetado apenas para temperaturas inferiores a 25°C. Segundo Zhu et al. (2008), a faixa de temperatura ótima para bactérias anammox é entre 26 e 28°C, com redução acentuada de atividade sob temperaturas abaixo de 15°C ou acima de 40°C. Similarmente, Zhang et al. (2018) estudaram o desempenho do sistema NP/A a temperaturas entre 24 e 26°C e observaram atividade específica do processo anammox de 1,68 mg N.g SSV<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Ao reduzir a temperatura para 13°C, a atividade específica anammox diminuiu para cerca de 1,00 mg N.g SSV<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Fernandes et al. (2018) reportaram elevadas remoções de amônia e nitrito em reator RBS anammox, independente da temperatura no intervalo de 20 a 35°C. Esses resultados indicam que a temperatura não se apresenta como um obstáculo à aplicação do processo anammox em *mainstream* em regiões tropicais, conforme também sugerido por Azevedo et al. (2021).

A toxicidade por sulfeto, que está presente em efluentes sanitários anaeróbios, é outro aspecto que pode afetar as bactérias anammox. Segundo Azevedo et al. (2021), os efluentes de reatores UASB em *mainstream* geralmente apresentam concentrações de sulfeto entre 2 e 35 mg.L<sup>-1</sup>. No entanto, estudos que avaliaram o efeito do sulfeto sobre a comunidade anammox observaram inibição para concentrações acima de 330 mg.L<sup>-1</sup> de sulfeto (GUO et al., 2016), muito superiores àquelas encontradas em efluentes sanitários anaeróbios. Ademais, o pH desses efluentes geralmente se encontram na faixa de 7,1-7,6, de modo que mais de 50% das espécies de enxofre estarão na forma de sulfeto ionizado, com potencial menos tóxico (Azevedo et al., 2021).

Em relação à inibição do processo anammox pela matéria orgânica, Jin et al. (2012) afirmam que esta é dependente da concentração de carbono orgânico e pode ocorrer por dois mecanismos. No primeiro, bactérias heterotróficas competem com as autotróficas anammox pelo substrato (nitrito). Devido à maior velocidade de crescimento das heterotróficas em relação

às anammox, as primeiras são capazes de eliminar as últimas em reatores com elevada concentração de matéria orgânica (CHAMCHOI et al., 2008; LACKNER et al., 2008). No segundo, a comunidade anammox ainda é dominante no reator, mas realiza o processo via diferentes rotas metabólicas, utilizando matéria orgânica, no lugar do nitrito, como substrato (KARTAL et al., 2007; KARTAL et al., 2008).

Kartal et al. (2007) descreveram um grupo de bactérias anammox – *Ca. Anammoxoglobus propionicus* – capazes de utilizar ácidos orgânicos para a realização do processo, a uma taxa elevada, de modo a superar os microrganismos que utilizam o nitrito na competição pelo substrato. Segundo os autores, esse novo grupo também é capaz de superar outras bactérias, como as desnitrificantes heterotróficas, na competição pelo substrato orgânico. Em estudo posterior, Kartal et al., (2008) verificaram o desenvolvimento de microrganismos anammox na presença de acetato, apontando para a nova descoberta de uma outra espécie anammox, denominada *Ca. Brocadia fulgida*. O cultivo contínuo demonstrou que, em presença de acetato, amônia, nitrito e nitrato, *Ca. Brocadia fulgida* foi favorecida na competição com outras espécies, o que também foi observado por Laurení et al. (2015) em reator anammox aplicado ao tratamento de efluente de reator anaeróbio em *mainstream*. Lotti et al. (2015) também reportaram dominância da espécie *Ca. Brocadia fulgida* em reatores NP/A operados sob condições de *mainstream* para o tratamento de efluente sanitário pré-tratado anaerobiamente.

No que se refere à razão DQO/N limite para inibição do processo, segundo Chamchoi et al. (2008), concentrações acima de 300 mg DQO/L e DQO/N de 2 podem inibir completamente o processo anammox e, ao mesmo tempo, estimular a atividade de bactérias desnitrificantes heterotróficas. Outro estudo mostra que, para razões DQO/N acima de 4, o processo é interrompido (NI et al., 2012). No entanto, de acordo com Sánchez-Guillén et al. (2014), que analisaram o efeito da adição de carbono orgânico (acetato e amido), relações DQO/N de 2 e 6 não afetam a reação anammox. Não há, portanto, um consenso na literatura sobre os limites da concentração de matéria orgânica (em termos de DQO) e da razão DQO/N que provocam efeitos adversos ao processo anammox. Sánchez-Guillén et al. (2014), ainda, não observaram efeito de matéria orgânica lentamente, nem rapidamente biodegradável sobre o metabolismo anammox, apontando que o processo como uma alternativa para o tratamento de efluente sanitário de reator anaeróbio, especialmente em regiões de clima quente e moderado.

Jenni et al. (2014) operaram reator de estágio único NP/A para o tratamento de sobrenadante de digestor de lodo (baixa razão DQO/N). Os autores suplementaram o efluente a ser tratado com acetato, com o objetivo de enriquecer as bactérias desnitrificantes



heterotróficas e favorecer uma rota de remoção de nitrato. Foi observado um aumento da eficiência de remoção de nitrogênio total de 85%, da situação sem acetato, para 95% com a adição do substrato orgânico, aplicando a razão DQO/N de 1,4. Segundo os autores, os microrganismos anammox podem coexistir com as bactérias heterotróficas em reatores com razão DQO/N elevada, se o tempo de residência celular for suficiente. Miao et al. (2018) investigaram o efeito de diferentes relações DQO/N (1,1, 1,5, 2,0 e 2,5) em RBS NP/A tratando efluente sanitário de reator anaeróbio. Os autores verificaram que o aumento gradual da razão DQO/N resultou no aumento da eficiência de remoção de N total. O incremento na eficiência do reator foi atribuído à associação do processo anammox à desnitrificação parcial heterotrófica, com a redução de nitrato a nitrito.

Apesar de vários estudos analisarem diferentes razões DQO/N, Azevedo et al. (2021) afirmam que a biodegradabilidade da matéria orgânica geralmente não é considerada. Após uma etapa de tratamento anaeróbio, a maior parte da matéria orgânica biodegradável tende a ser assimilada, limitando assim o carbono disponível para o crescimento de desnitrificantes heterotróficas (LI et al., 2018a). No tratamento de efluente sanitário em reator UASB em *mainstream*, p. ex., a maior parte da DQO rapidamente biodegradável é removida nessa unidade (AQUINO et al., 2009). Assim, mesmo para maiores valores de DQO/N no efluente anaeróbio e as concentrações de DQO na faixa de 120–180 mgDQO.L<sup>-1</sup>, a razão efetiva  $DQO_{\text{biodegradável}}/N$  tende a ser baixa, pois o carbono orgânico residual não se encontra prontamente disponível para o crescimento bacteriano. Esta é uma característica do efluente sanitário tratado anaerobiamente, o que pode sustentar a hipótese de que a relação DQO/N não é um entrave ao estabelecimento da remoção autotrófica de nitrogênio, via anammox, para esses efluentes.

### 3.5.3 Influência da salinidade sobre o processo

Apesar de geralmente os processos biológicos de tratamento serem reconhecidamente inibidos pela salinidade, o processo anammox se apresenta como alternativa promissora para o tratamento de efluentes com elevadas concentrações de sais (JIN et al., 2012). Isso porque a via metabólica anammox foi descoberta em ambientes anóxicos marinhos, indicando que os microrganismos associados ao processo apresentam maior potencial de desenvolvimento em meio salino, em relação a outras comunidades microbianas (XIAO; ROBERTS, 2010).

A aplicação do processo anammox para tratamento de esgoto salino tem sido o foco de estudos recentes. Os principais fatores avaliados estão relacionados às concentrações limites para a ocorrência do processo (WINDEY et al., 2005; JIN et al., 2011; MALOVANYYY et al.,

2014), às espécies dominantes em meio salino (GONZALEZ-SILVA et al., 2017; LI et al., 2018b; GARCIA-RUIZ et al., 2018), ao efeito da salinidade sobre biomassa adaptada e não adaptada (KARTAL et al., 2006; ENGELBRECHT et al., 2018) e a aspectos associados à granulação (DAPENA-MORA et al., 2010; XING et al., 2015; FANG et al., 2018).

Jin et al. (2011) avaliaram a atividade dos microrganismos anammox quando submetidos ao aumento gradual da concentração de NaCl, em reator contínuo com biomassa suspensa. Os autores observaram estabilidade do processo anammox para o tratamento de efluente com concentração de NaCl de até 30 g.L<sup>-1</sup>, com desempenho equivalente à condição de ausência de sais. Para a concentração de 10 g NaCl.L<sup>-1</sup>, os autores verificaram maior remoção de nitrogênio total no reator em relação à condição de ausência de sais, o que indica que os microrganismos anammox tiveram sua atividade estimulada nessa concentração de NaCl. Li et al. (2018b) também observaram maior remoção de nitrogênio com o aumento da salinidade (até 15 g NaCl.L<sup>-1</sup>), durante operação de reator contínuo anammox. Ademais, o desempenho e estabilidade do processo anammox a 30 g NaCl.L<sup>-1</sup> equivalentes à condição sem salinidade também foi observado por Fang et al. (2018), que operaram reator granular de leito expandido.

Engelbrecht et al. (2018) e Kartal et al. (2006) avaliaram o efeito da salinidade, na forma de NaCl, em diferentes concentrações sobre a atividade de biomassas anammox não adaptada e adaptada a 30 g NaCl.L<sup>-1</sup>, em ensaios em batelada. Os autores observaram que, para a biomassa não adaptada, o aumento da salinidade até a concentração de 10 g NaCl.L<sup>-1</sup> promoveu um estímulo à atividade específica dos microrganismos anammox, a qual foi superior àquela obtida na ausência de salinidade. A concentração de estímulo encontrada por Dapena-Mora et al. (2010) foi de 15 g NaCl.L<sup>-1</sup>, também em ensaios de atividade específica. Nos ensaios com a biomassa adaptada, Engelbrecht et al. (2018) encontraram atividade máxima dos microrganismos na concentração de 10 g NaCl.L<sup>-1</sup> e Kartal et al. (2006) observaram atividade máxima para 30 g NaCl.L<sup>-1</sup>.

Qi et al. (2018) estudaram inibição do processo anammox por salinidade adicionando água do mar a efluente sintético em proporções variadas (10-100% ou 3,5-35 g sal.L<sup>-1</sup>), em reator em batelada sequencial. Os autores observaram que, para concentração de até 7 g sal.L<sup>-1</sup> não houve inibição sobre o desempenho do reator e, para salinidade de 10,5 g sal.L<sup>-1</sup>, a atividade anammox foi brevemente suprimida, mas recuperou-se totalmente em 3 dias (6 ciclos de operação). Ao elevar a salinidade afluente para 14 g sal.L<sup>-1</sup>, a princípio o desempenho do reator não foi afetado, até que, após 16 dias (32 ciclos), a eficiência de remoção diminuiu e estabilizou em patamar inferior ao das fases anteriores. Os autores atribuíram essa diferença ao efeito mais severo dos sais em longo prazo, em relação ao de curto prazo. Com o aumento da concentração

de sais para  $17,5 \text{ g.L}^{-1}$ , foi observado declínio gradual da eficiência de remoção de N, o qual só pôde ser revertido com a adição de meio suporte para possibilitar a retenção da biomassa no reator. Com crescimento microbiano aderido, foi possível aplicar salinidade para até  $35 \text{ g sal.L}^{-1}$  e observar eficiência de remoção similar àquelas obtidas nas primeiras fases ( $3,5\text{-}7 \text{ g sal.L}^{-1}$ ).

No que se refere ao processo de granulação, Fang et al. (2018) relataram que o aumento da salinidade para até  $30 \text{ g NaCl.L}^{-1}$  afetou negativamente a agregação da biomassa anammox. O aumento da concentração de sais estimulou os microrganismos a alterarem a composição das substâncias poliméricas produzidas para agregação da biomassa, com o objetivo de resistir à salinidade, o que desfavoreceu a estabilidade dos grânulos. O efeito negativo da salinidade (até  $15 \text{ g NaCl.L}^{-1}$ ) sobre a granulação da biomassa também foi relatado por Xing et al. (2015). Os autores verificaram, ainda, que a adição de  $\text{Ca}^{2+}$  promoveu um alívio do impacto do NaCl sobre a agregação dos microrganismos. A presença desse cátion favoreceu a retenção e sedimentabilidade do lodo e o diâmetro e estabilidade dos grânulos.

Por outro lado, Dapena-Mora et al. (2010) observaram que elevadas concentrações de sais (até  $15 \text{ g NaCl.L}^{-1}$ ) não apresentaram efeito negativo sobre as propriedades físicas do lodo, e até favoreceram a agregação na forma de grânulos da biomassa anammox. O mesmo foi relatado por Fernández et al. (2008), para salinidade de até  $10 \text{ g NaCl.L}^{-1}$ . Os autores observaram que a presença do NaCl promoveu o aumento da densidade dos grânulos e da sedimentabilidade do lodo. As alterações foram atribuídas à precipitação de sais inorgânicos, devido à adição de NaCl, de modo que os precipitados atuaram como material suporte para o crescimento da biomassa. Apesar do aumento da retenção dos microrganismos no reator, os autores ressaltam a importância do controle da formação dos precipitados, os quais, quando formados na superfície dos grânulos existentes, podem aumentar a resistência à difusão de substrato para o interior dos grânulos.

Em relação à etapa de nitrificação parcial do sistema, poucos estudos foram realizados para investigar especificamente o efeito dos sais sobre a comunidade nitritante. Segundo Li et al. (2018b), concentrações de até  $15 \text{ g NaCl.L}^{-1}$  favorecem a operação de reatores contínuos de nitrificação parcial. Os autores também relataram que, para elevada salinidade, o gênero dominante no meio é o *Nitrospira*, enquanto que o gênero *Nitrosomonas* tem abundância reduzida. O desaparecimento do gênero *Nitrosomonas* na condição de elevada salinidade também foi verificado por Garcia-Ruiz et al. (2018). Malovanyy et al. (2014), que operaram reator MBBR de nitrificação parcial/anammox, relataram que as bactérias oxidadoras de amônia são mais resistentes à salinidade, em comparação às anammox.

Em trabalho recente desenvolvido no Laboratório de Processos Biológicos (EESC/USP), foi estudado o efeito da presença de diferentes sais sobre os processos de nitrificação e desnitrificação (MACÊDO, 2018). O tratamento de esgoto sanitário em sistema aeróbio/anóxico, composto por reator contínuo de leito fixo estruturado, para remoção de carbono e nitrogênio foi avaliado (MACEDO et al., 2019a). Os autores, que operaram reator alimentado com eletrólitos mistos, relataram que a presença dos sais nas concentrações de 11,2 g.L<sup>-1</sup> de NaCl, 4,7 g.L<sup>-1</sup> de MgCl<sub>2</sub> e 1,4 g.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> provocou a redução da eficiência de remoção de DQO de 97 para 86%. A nitrificação foi mais prejudicada, com eficiência reduzida de 96 para 15%. Além disso, Macêdo et al. (2019c) avaliaram, em ensaios em batelada, a toxicidade desses eletrólitos sobre a nitrificação e desnitrificação. Os autores observaram que o efeito de inibição de cada sal é distinto quando em mistura ou separadamente, e o efeito de toxicidade específica de cada sal é superior ao efeito de inibição pela pressão osmótica do meio.

#### **3.5.4 Salinidade e bactérias Anammox: seleção ou adaptação?**

Um total de sete gêneros de bactérias anammox foram identificados até o momento, conforme descrito anteriormente: *Ca. Anammoxoglobus*, *Ca. Anammoximicrobium*, *Ca. Brasilis*, *Ca. Brocadia*, *Ca. Jettenia*, *Ca. Kuenenia* e *Ca. Scalindua* (STROUS et al., 1999; KARTAL et al., 2011; LIN et al., 2021). Esses gêneros podem ser divididos entre bactérias anammox de água doce (FAB, do inglês *freshwater anammox bactéria*) e bactérias anammox marinhas (MAB, do inglês *marine anammox bactéria*). Apenas o gênero *Ca. Scalindua* é classificado como MAB, sendo todos os demais gêneros considerados FAB (VAN DE VOSSENBERG et al., 2012).

O tratamento de efluentes salinos pelo processo anammox pode ser conduzido por meio de duas estratégias: o emprego direto de bactérias anammox marinhas ou a utilização de espécies anammox de água doce adaptadas (HUANG et al., 2021). Devido ao tempo de duplicação extremamente baixo das culturas anammox marinhas, do gênero *Ca. Scalindua* (AWATA et al., 2015), a adaptação de bactérias anammox de água doce para o tratamento de efluentes salinos tem sido o método mais estudado (LIN et al., 2021). Além disso, sistemas baseados em espécies marinhas podem sofrer perturbações e até deterioração em épocas chuvosas, com a diluição do efluente e redução da salinidade, ou pela falta de disponibilidade de efluente salino por problemas mecânicos. Isso se deve à dependência das espécies marinhas pela salinidade (WU et al., 2018; HUANG et al., 2021), o que também faz com que a estratégia do emprego de bactérias de água doce seja mais eficiente.

Kartal et al. (2006) inocularam um reator contínuo com lodo composto por aproximadamente 50% de espécie anammox marinha (*Ca. Scalindua wagneri*) e 50% de espécie não adaptada a meio salino (*Ca. Kuenenia stuttgartiensis*). O reator operado sem a presença de sais, ao final do experimento, apresentou dominância da espécie do gênero *Kuenenia* (99% da população anammox). O reator salino, para o qual se esperava dominância da espécie marinha, apresentou a distribuição da população anammox de 30% desta (*Ca. Scalindua wagneri*) e 70% *Ca. Kuenenia stuttgartiensis*. Dessa forma, os microrganismos do gênero *Kuenenia* conseguiram se adaptar à concentração de até 30 g.L<sup>-1</sup> de NaCl e contribuir para o processo anammox.

Xing et al. (2016) estudaram o efeito da salinidade em reator anammox contínuo, aplicando afluente com concentração de NaCl de 8 g.L<sup>-1</sup>, 13 g.L<sup>-1</sup> e 18 g.L<sup>-1</sup>. O reator foi inoculado com biomassa granular anammox com predominância da espécie *Ca. Kuenenia*, a qual não se caracteriza como espécie marinha. Apesar da inibição imediata da atividade anammox a cada aumento de salinidade imposto, o desempenho do reator foi recuperado com sucesso ao final de cada fase. Isso indica que a inoculação de reatores para o tratamento de efluentes salinos não exige o emprego de biomassa com dominância de espécies anammox marinhas.

A dominância dessa espécie (*Ca. Kuenenia stuttgartiensis*) em reator anammox operado com elevada concentração de sais também foi observada por Li et al. (2018b), González-Silva et al. (2017) e Huang et al. (2021). No estudo de González-Silva et al. (2017), houve uma alteração da comunidade microbiana com o aumento da salinidade de 0 para 3 g NaCl.L<sup>-1</sup>, com a substituição da dominância da espécie *Ca. Brocadia fulgida* para *Ca. Kuenenia stuttgartiensis*, a qual permaneceu dominante com a elevação da concentração de NaCl para até 30 g.L<sup>-1</sup>. Bactérias do gênero *Brocadia* também foram inibidas em reator de leito fixo quando submetidas à salinidade de 3 g NaCl.L<sup>-1</sup> em estudo realizado por Garcia-Ruiz et al. (2018), indicando que esse gênero não consegue se adaptar a elevadas concentrações de sais.

Em contrapartida, Zhu et al. (2021) estudaram o efeito da salinidade sobre biomassa anammox com dominância do gênero *Ca. Brocadia* e observaram a substituição desse gênero pelo gênero de espécies marinha, *Ca. Scalindua*, à salinidade de 1,8 wt%. O gênero *Ca. Brocadia* foi severamente afetado a cada aumento de salinidade e teve sua atividade suprimida com o estabelecimento da salinidade afluente a 1,0 wt%. A redução da concentração de NaCl possibilitou a recuperação da atividade anammox por esse gênero, o qual foi capaz de suportar até 1,2 wt% de salinidade. Com o aumento para 1,8 wt% da salinidade, no entanto, o gênero *Ca. Brocadia* foi completamente inibido e *Ca. Scalindua* passou a ser o gênero dominante no

reator. Para essa concentração de sais, o desempenho do processo anammox foi muito inferior em relação às fases anteriores, apresentando eficiência de remoções médias de N-amônia e N-nitrito em torno de 20%.

No que se refere à diversidade da comunidade microbiana, Gonzalez-Silva et al. (2017) relataram um aumento desta na condição salina, em relação à condição de ausência de sais. No entanto, o contrário foi observado por Wang et al. (2019c), que verificaram redução da riqueza e da diversidade microbiana com o aumento da salinidade de 0 para 5, 10 e 15 g NaCl.L<sup>-1</sup>.

A Tabela 3.3 apresenta um resumo dos estudos relacionados ao efeito da salinidade sobre o processo anammox. Observa-se que a quase totalidade dos trabalhos considera apenas o impacto do NaCl sobre a comunidade anammox. Além disso, ainda não há um consenso na literatura em relação a diversos aspectos associados ao desempenho do processo em elevada concentração de sais. O nível de salinidade suportado pela comunidade microbiana e as espécies que apresentam a capacidade de adaptação à condição salina precisam ser investigados.

**Tabela 3.3:** Resumo dos resultados de estudos relacionados ao efeito da salinidade sobre o processo anammox.

Referência	Reator	Inóculo	T (°C)	TDH (h)	Afluente	CNVA (kg N.m <sup>-3</sup> .d <sup>-1</sup> )	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> <sub>af</sub> (mgN.L <sup>-1</sup> )	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> <sub>af</sub> (mgN.L <sup>-1</sup> )	Salinidade		Efeito sobre atividade AMX	Recuperação da atividade AMX
									Sal	g.L <sup>-1</sup>		
Xing et al. (2016)	Anammox Contínuo (UASB)	Biomassa anammox ( <i>Ca. Kuenenia</i> )	32	11	Sintético		200	200	NaCl	8	Sem inibição	n.a.
										13	Inibição em 60%	Total após 40 dias
										18	Inibição em 40%	Total após 40 dias
Qi et al. (2018)	Anammox Batelada sequencial	Biomassa anammox	35	12 <sup>d</sup>	Sintético		107	133	Água do mar	3,5-7	Sem inibição	n.a.
										10,5	Supressão	Total em 3 dias
										14-17,5	Inibição	Parcial <sup>b</sup>
										35	Inibição	Total <sup>b</sup>
Wang et al. (2019)	Anammox Contínuo	Biomassa anammox + Lodo de decantador secundário	15	2	Sintético	4,2	39	36,5	NaCl	4	Aumento em 15%	n.a.
										12	Sem inibição	n.a.
										20	Inibição em 40%	Sem recuperação
Lin et al. (2021)	Anammox Bateladas	Grânulos anammox de reator tratando efluente real ( <i>Ca. Brocadia</i> )	35	n.a.	Sintético		100-120	110-130	NaCl, KCl, Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,5- 22,5	Inibição: NaCl<KCl< Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	n.a.
Huang et al. (2021)	NP/A Batelada sequencial	Biomassa anammox tratando efluente sanitário	20-	12 <sup>d</sup>	Lixiviado de aterro		510	0	NaCl	7	Sem inibição	n.a.
			23,5 <sup>a</sup>							15	Sem inibição	n.a.
										30	Sem inibição	n.a.
Zhu et al. (2021)	Anammox Batelada sequencial	Biomassa anammox ( <i>Ca. Brocadia</i> )	35	6,2 <sup>d</sup>	Sintético	1,3	100	130	NaCl	0-12	Supressão	Total após 43 ciclos
										18	Inibição	Sem recuperação
Huang et al. (2023)	NP/A FMBR <sup>c</sup>	Lodo de digestor anaeróbio salino	14,5- 34,5 <sup>a</sup>	8-30	Efluente sanitário		22	0	Água do mar	11	Inibição	
Pilot-scale	Contínuo				real							

T: Temperatura; TDH: Tempo de Detenção Hidráulica; CNVA: carga nitrogenada volumétrica afluente; N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup><sub>af</sub>: concentração de N-amoniaco afluente; N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup><sub>af</sub>: concentração de N-nitrito afluente; AMX: Anammox; NP/A: Nitritação Parcial/Anammox; n.a.: não se aplica ao estudo; <sup>a</sup>: estudo conduzido a temperatura ambiente; <sup>b</sup>: recuperação mediante adição de meio suporte ao reator; <sup>c</sup>: *Fluidized-bed Membrane Bioreactor*; <sup>d</sup>: tempo de um ciclo completo, em horas.

### 3.5.5 Processo Anammox para o tratamento de efluente de reatores anaeróbios

Atualmente, a rota metabólica anammox é considerada de elevado potencial para a remoção biológica de nitrogênio em estações de tratamento de efluentes (ETEs) (KARTAL; KUENEN; VAN LOOSDRECHT, 2010). A aplicação do processo anammox em *mainstream*, para a remoção de nitrogênio de efluentes de reatores anaeróbios de alta taxa (p.ex. UASB), tem sido apontada como uma alternativa para tornar o balanço de energia do tratamento de águas residuárias neutro ou mesmo positivo. Segundo Siegrist et al. (2008), a utilização de sistemas anammox para o tratamento de efluentes anaeróbios resultaria no consumo de 21 Wh por pessoa por dia ( $21 \text{ Wh.p}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ), enquanto o processo convencional de remoção de nitrogênio resultaria num consumo de  $44 \text{ Wh.pessoa}^{-1}.\text{d}^{-1}$ . Essa diferença é devida não somente à redução dos custos com aeração, mas também ao fato de o processo anammox não requerer fonte orgânica de carbono, o que aumenta a disponibilidade de matéria orgânica para conversão a metano e, conseqüentemente, o potencial de geração de energia.

Desde a descoberta da rota metabólica anammox, o processo já foi empregado em mais de 140 estações de tratamento em escala plena em todo o mundo, para a remoção de nitrogênio do sobrenadante de digestores de lodo (*sidestream*, ou fluxo lateral de tratamento) (LIU et al., 2020). Esse efluente apresenta como principais características a elevada carga nitrogenada e a baixa relação entre as concentrações de matéria orgânica e nitrogênio (DQO/N). O fato de o processo não ser geralmente aplicado para o tratamento de efluentes com a relação DQO/N mais elevada deve-se principalmente ao potencial inibidor da matéria orgânica sobre a comunidade anammox (JIN et al., 2012; GANI et al., 2020). Além disso, a menor temperatura dos efluentes em *mainstream*, em relação ao *sidestream*, também tem sido apontada como um obstáculo à implantação do processo anammox na linha principal de tratamento (AGRAWAL et al., 2018). Atualmente, apenas três ETEs apresentam reatores anammox implantados em *mainstream* em escala plena, mas a presença de bactérias anammox e a ocorrência do processo já foi relatada em outras estações de tratamento desse porte, que não consideram o processo na linha de tratamento (NEJIDAT et al., 2008; CAO et al., 2014). Cao et al. (2014) avaliaram as rotas de remoção de nitrogênio predominantes em reator de lodo ativado na ETE de Changi, em Singapura, e observaram que a via anammox contribuía para cerca de 38% da remoção de nitrogênio.

Em países de clima quente, como Brasil, Índia, Colômbia e México, reatores anaeróbios, principalmente de alta taxa (e.g. UASB), são comumente empregados como primeira unidade de tratamento biológico de efluentes sanitários (*mainstream*) (CHERNICHARO et al., 2015).



O efluente desses reatores apresenta baixa concentração de sólidos, pH neutro e baixa concentração de matéria orgânica, o que dificulta a aplicação desses efluentes para a RBN via processo convencional de nitrificação/desnitrificação (VON SPERLING; CHERNICHARO, 2005; CHERNICHARO et al., 2015). Ao mesmo tempo, a concentração reduzida de carbono orgânico, combinada à temperatura alta/moderada dessas regiões, torna o processo anammox uma alternativa interessante para RBN (CAO et al., 2017; QIU et al., 2020).

Segundo Agrawal et al. (2017), ainda que a unidade de tratamento anaeróbia que antecede o processo NP/A seja eficiente para a remoção de carbono orgânico, a presença de bactérias heterotróficas desnitrificantes (BHD) é inevitável em sistemas PN/A em *mainstream*. Isso se deve à disponibilidade de DQO residual do efluente anaeróbio ou de produtos metabólicos solúveis (PMS) liberados pelos microrganismos envolvidos na via NP/A. No entanto, as BHD podem participar do processo reduzindo o nitrato produzido no processo anammox a  $N_2$  e removendo o carbono orgânico residual do meio, promovendo o polimento do efluente tratado (AZEVEDO et al., 2021).

De acordo com Li et al. (2017), após o pré-tratamento orgânico, o nitrogênio do efluente anaeróbio pode ser removido em reator único de nitrificação parcial/anammox (NP/A), enquanto a matéria orgânica residual é consumida por meio da desnitrificação heterotrófica com o nitrato como aceptor de elétrons. Os autores relataram eficiências de remoção de 92 e 90% de matéria orgânica e nitrogênio total, respectivamente, em sistema composto por reator anaeróbio seguido de reator NP/A. Leal et al. (2016), estudaram a aplicação de efluente sanitário de reator anaeróbio em reator anammox e concluíram que a DQO afluente de  $200 \text{ mg.L}^{-1}$  não inibiu o processo e permitiu a coexistência de bactérias anammox e bactérias desnitrificantes heterotróficas, desde que o reator fosse suplementado em excesso com nitrato.

Dessa forma, o tratamento de efluentes de reatores anaeróbios por sistema NP/A apresenta potencial de aplicação em *mainstream*. De acordo com Liu et al. (2017), resultados contraditórios têm sido relatados na literatura no que se refere à influência da presença de DQO biodegradável residual sobre o processo anammox. Ademais, ainda não há um consenso na literatura relacionado à razão DQO/N limite para a coexistência das bactérias desnitrificantes e anammox. Observa-se também a possibilidade de favorecimento de determinadas espécies, em detrimento de outras, com a adição de diferentes fontes de carbono (CHEN et al., 2020). Para a definição das espécies competitivas na presença de matéria orgânica e a razão limite DQO/N suportada pelo sistema, ainda são necessárias novas investigações.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

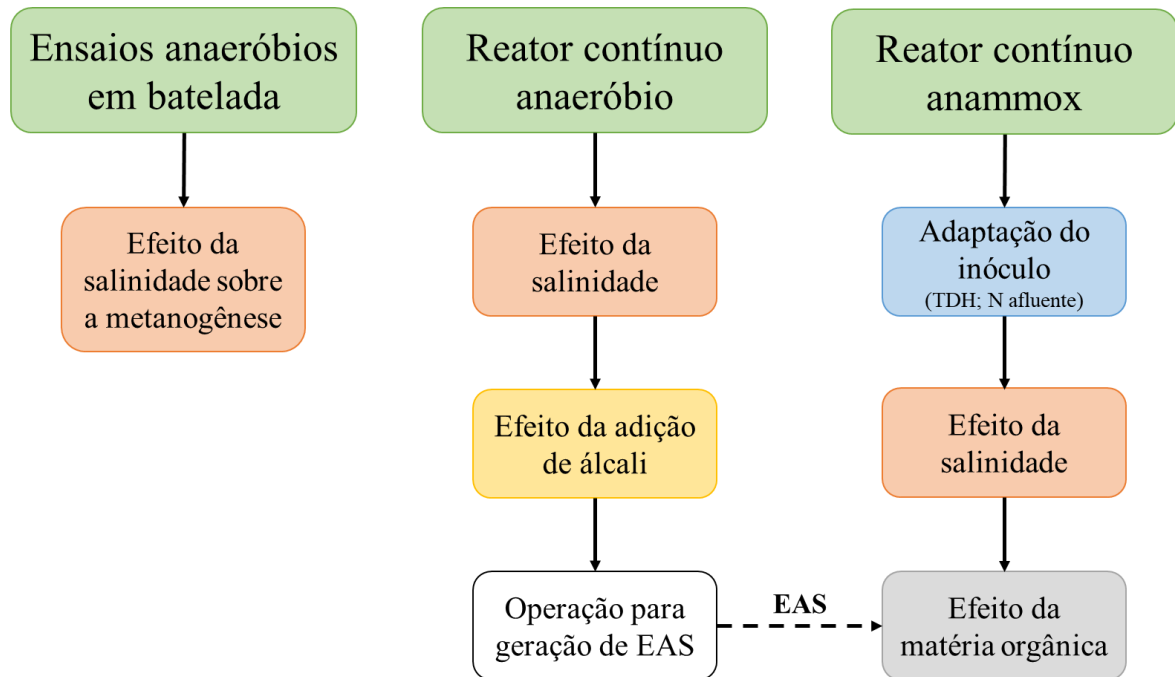
### 4.1 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O experimento foi realizado por meio da execução de ensaios cinéticos em batelada e operação de reatores biológicos contínuos (Figura 4.1). Para os ensaios contínuos, foram operados dois reatores: um anaeróbio, de leito fixo estruturado, visando a remoção de matéria orgânica de água residuária salina, e um anóxico para o processo anammox, com biomassa granular, para remoção de nitrogênio de água residuária salina. Os reatores foram expostos a diferentes níveis de salinidade por eletrólitos mistos ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{MgCl}_2$  e  $\text{CaCl}_2$ ), adicionados à alimentação com efluente sintético em cada reator. O reator anaeróbio foi alimentado com efluente sanitário sintético e o reator anammox, a princípio, foi alimentado com efluente sintético específico para cultivo das bactérias anammox (VAN DE GRAAF et al., 1996). No reator anammox, previamente ao estudo do efeito da salinidade, foi realizada a adaptação do lodo de inóculo às características definidas para operação do reator, em relação a tempo de detenção hidráulica e concentrações de nitrogênio.

Os reatores anaeróbio e anammox de fluxo contínuo, foram operados de forma independente, sendo elevada gradualmente a salinidade no afluente. Essa forma de operação possibilitou a verificação da capacidade de cada unidade na função para a qual foi projetada, sem a interferência da unidade anterior, que poderia ser concomitantemente ajustada. Uma vez atingida a salinidade máxima tolerada por cada comunidade microbiana, outras investigações foram conduzidas. No reator anaeróbio, o efeito da adição de álcali sobre o desempenho do processo metanogênico foi avaliado. No reator anammox, a alimentação com efluente sintético foi substituída pela alimentação com o efluente do reator anaeróbio. Assim, no reator anammox, além do efeito dos sais, também foi avaliada a influência da presença de matéria orgânica sobre o processo.

Os ensaios em batelada foram realizados para analisar a influência de sais em diferentes concentrações sobre o processo metanogênico. Ademais, esses testes foram executados com o objetivo de separar os efeitos de inibição pelo aumento da pressão osmótica e pela toxicidade específica dos íons. Os sistemas contínuos e em batelada foram monitorados e avaliados por meio de análises físico-químicas, cromatográficas e biomoleculares, descritas a seguir. A Figura 4.1 apresenta a descrição esquemática do procedimento experimental do presente estudo.

**Figura 4.1:** Fluxograma do procedimento experimental geral do presente estudo.



EAS: Efluente Anaeróbico Salino.

#### 4.1.1 Salinidade aplicada no estudo

A salinidade foi introduzida à corrente líquida de alimentação dos reatores contínuos com eletrólitos e concentrações baseados no estudo de Macêdo (2018). A autora utilizou como base a caracterização da água de abastecimento de 18 municípios do sertão do estado de Alagoas, no Nordeste brasileiro, realizada pelo Governo Federal no escopo do Programa Água Doce (PAD) (BRASIL, 2012), que se refletem nos esgotos gerados. A partir dessa caracterização, foram comparadas as concentrações dos íons detectados. Os íons de maior concentração foram os cátions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e o ânion  $\text{Cl}^-$ , e as concentrações mais elevadas destes elementos também foram a base para a composição da água residuária do presente estudo. Na Tabela 4.1 estão apresentadas as concentrações máximas que foram observadas para cada íon no levantamento do Programa Água Doce e a concentração equivalente dos respectivos cloretos ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{MgCl}_2$  e  $\text{CaCl}_2$ ).

**Tabela 4.1:** Concentrações máximas encontradas para os íons que compõem os sais de estudo na área monitorada (sertão do estado de Alagoas) e as concentrações equivalentes dos respectivos cloretos.

Elemento	Concentração máxima observada (g.L <sup>-1</sup> )	Sal de cloreto correspondente	Concentração de sal correspondente (g.L <sup>-1</sup> )	Concentração final do cátion (g.L <sup>-1</sup> )
Na <sup>+</sup>	11,12	NaCl	28,00	11,0
Mg <sup>2+</sup>	3,06	MgCl <sub>2</sub>	11,77	3,0
Ca <sup>2+</sup>	1,30	CaCl <sub>2</sub>	3,61	1,3
Cl <sup>-</sup>	24,00	-	-	28,1

Fonte: Macêdo (2018).

As concentrações dos sais calculadas na Tabela 4.1 foram utilizadas como base para o cálculo da pressão osmótica (PO) de final de estudo, i. e., a máxima salinidade a ser imposta no afluente dos reatores contínuos. A partir dos parâmetros estabelecidos no item 3.2, a PO de final de estudo foi estimada em 21,2 atm (Tabela 4.2). Os reatores foram submetidos ao aumento progressivo da pressão osmótica, por meio da elevação gradual da salinidade afluente. Em cada fase de operação dos reatores, quando se impôs uma nova PO, foi mantida a proporção entre os sais apresentada na Tabela 4.1.

**Tabela 4.2:** Estimativa da atividade das soluções de estudo, correspondente pressão osmótica conferida por cada sal e pressão osmótica de final de estudo.

Sal	Massa (g)	Molalidade (mol.kgH <sub>2</sub> O <sup>-1</sup> )	Força iônica (molal.L <sup>-1</sup> )	Coefficientes de atividade	Atividade (molal.L <sup>-1</sup> )	PO (atm)	PO de final de estudo (atm)
NaCl	28,0	0,479		0,659	0,315	15,70	
MgCl <sub>2</sub>	11,8	0,124	0,947	0,480	0,059	4,42	<b>21,2</b>
CaCl <sub>2</sub>	3,6	0,033		0,457	0,015	1,11	

PO: Pressão Osmótica. Fonte: Macêdo (2018).

## 4.2 ENSAIOS EM BATELADA

### 4.2.1 Planejamento experimental

Os ensaios em batelada tiveram caráter exploratório e o objetivo de avaliar a influência dos sais NaCl, MgCl<sub>2</sub> e CaCl<sub>2</sub> sobre o processo anaeróbico via metanogênese e as possíveis interações entre os cloretos de sódio, magnésio e cálcio. Para isso, foi elaborado um planejamento fatorial completo, com três fatores (NaCl, MgCl<sub>2</sub> e CaCl<sub>2</sub>). Um total de oito experimentos para o planejamento fatorial 2<sup>3</sup> com uma réplica genuína em todos os pontos foram realizados, totalizando-se 16 bateladas. A variável resposta foi a produção máxima de metano.

Os níveis definidos para os fatores NaCl, MgCl<sub>2</sub> e CaCl<sub>2</sub> do planejamento foram baseados nas concentrações dos eletrólitos em águas naturais fornecidas para abastecimento doméstico em áreas com escassez de água no Nordeste brasileiro (BRASIL, 2012). Os valores codificados e reais estão apresentados na Tabela 4.3. O planejamento foi baseado em Macêdo et al. (2019c), que estudaram o efeito da salinidade por eletrólitos mistos sobre as comunidades nitrificante e desnitrificante no Laboratório de Processos Biológicos (EESC/USP).

**Tabela 4.3:** Variáveis independentes (fatores) e respectivos valores codificados e reais.

Fatores	Valores codificados e reais	
	-1	+1
NaCl (g.L <sup>-1</sup> )	5	30
MgCl <sub>2</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	3	12
CaCl <sub>2</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	3	12

Fonte: Macêdo (2018).

A matriz que caracteriza as condições dos ensaios do planejamento fatorial (Tabela 4.4) e o processamento dos dados foram elaborados por meio do *software* Statistica 12.0. A análise de variância (ANOVA) foi realizada por meio do *software* Chemoface® 1.61.

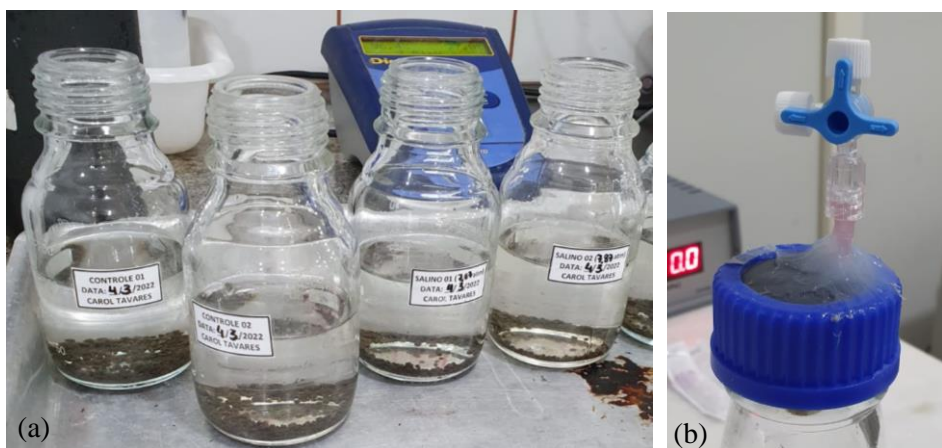
**Tabela 4.4:** Matriz do planejamento fatorial dos ensaios em batelada e pressão osmótica de cada condição.

Ensaio	Concentração codificada			Força Iônica (molal.L <sup>-1</sup> )	Pressão Osmótica (atm)
	NaCl	MgCl <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub>		
1	-1	1	-1	0,544	8,40
2	1	-1	1	0,931	21,26
3	1	1	-1	0,971	21,83
4	1	1	-1	0,971	21,83
5	1	-1	1	0,931	21,26
6	-1	-1	1	0,504	7,87
7	1	-1	-1	0,688	18,79
8	-1	-1	-1	0,260	5,24
9	-1	-1	1	0,504	7,87
10	1	1	1	1,215	24,34
11	1	-1	-1	0,688	18,79
12	-1	1	1	0,787	10,95
13	1	1	1	1,215	24,34
14	-1	1	1	0,787	10,95
15	-1	-1	-1	0,260	5,24
16	-1	1	-1	0,544	8,40

#### 4.2.2 Procedimento experimental

Os ensaios metanogênicos foram realizados em frascos *Duran*®, com capacidade total de 306 mL. O volume reacional para os ensaios foi de 150 mL, restando um volume de *headspace* de 156 mL no frasco. Para a inoculação dos reatores em batelada, foram utilizados grânulos do lodo de reator UASB proveniente do tratamento de águas residuárias da Avícola Dacar (Tietê/SP), com elevada diversidade microbiana (DELFORNO et al., 2017). Foi empregada relação alimento/microrganismo (A/M) de 0,2 g DQO.g SSV<sup>-1</sup>. Assim, para atender a razão A/M definida, foi adotada a concentração de 3,0 g SSV.L<sup>-1</sup> de inóculo para cada reator, tendo em vista a concentração de 600 mg DQO.L<sup>-1</sup> utilizada em todos os ensaios. O meio sintético utilizado foi composto por (mg.L<sup>-1</sup>): sacarose (52,5), amido (171), extrato de carne (312) e bicarbonato de sódio (500), baseado na composição de meio sintético para simulação de efluente sanitário (TORRES, 1992). Além disso, também foi adicionada solução de micronutrientes, descritas na Tabela 4.5 no item 4.3.3, na proporção de 1 mL por litro de meio sintético.

Para a montagem dos ensaios, o lodo de inóculo foi centrifugado (10 minutos, 9000 rpm) e o sobrenadante descartado, para minimizar o aporte de matéria orgânica presente na fase líquida do inóculo utilizado. Em seguida, foram adicionados biomassa e efluente sintético em cada reator (Figura 4.2a) e os frascos foram purgados por 10 minutos com nitrogênio para expulsão do oxigênio dissolvido. Os reatores foram fechados com tampa de butila para vedação hermética, na qual foi colocada agulha conectada a válvula de 3 vias para coleta de biogás (Figura 4.2b). Por fim, os frascos foram dispostos em *shaker* (150 rpm) e mantidos em câmara climatizada (30°C) ao longo do ensaio.



**Figura 4.2:** (a) Montagem dos reatores em batelada (efluente + inóculo); (b) Detalhe da tampa de butila com válvula de 3 vias para coleta de amostras gasosas dos reatores em batelada.

### 4.2.3 Avaliação da produção de biogás

Amostras gasosas do *headspace* dos reatores foram coletadas a cada quatro horas ao longo dos ensaios, com maior intervalo de tempo entre coletas à medida que se aproximava a estabilização da produção de metano. As amostras foram analisadas via cromatografia gasosa (método descrito em 4.5) para determinação da composição do biogás (frações de CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>). Além disso, a pressão interna dos reatores era medida antes e após coleta da amostra gasosa, por meio de um manômetro. Com base nessas medições, calculou-se a variação de pressão no reator ao longo do ensaio, referente à diferença entre a pressão após coleta de biogás, no tempo “t”, e a pressão observada antes da coleta de amostra gasosa, no tempo “t-1”. A concentração molar obtida pela análise cromatográfica e a variação de pressão no reator foram utilizadas para calcular a produção acumulada de CH<sub>4</sub> em cada ensaio, conforme Equação 2:

$$V_{\text{CH}_4}^t = \frac{C_{\text{CH}_4}^t \cdot V_{\text{hs}} \cdot R \cdot T}{P} + V_{\text{CH}_4}^{t-1}, \quad \text{Equação 2}$$

em que:  $V_{\text{CH}_4}^t$  e  $V_{\text{CH}_4}^{t-1}$  representam o volume acumulado de metano produzido até o tempo “t” e até o tempo “t-1” (mL), respectivamente;  $C_{\text{CH}_4}^t$  é a concentração de metano no *headspace* do reator no tempo “t” (mol.L<sup>-1</sup>);  $V_{\text{hs}}$  representa o volume do *headspace* do frasco (mL); R é a constante dos universal dos gases (0,082 L.atm.K<sup>-1</sup>.mol<sup>-1</sup>); e T e P se referem às condições normais de temperatura e pressão (CNTP, T=273K e P=1atm).

### 4.2.4 Determinação dos parâmetros cinéticos

A biomassa, proveniente de reator anaeróbio e com capacidade metanogênica, foi avaliada em relação à atividade metabólica via produção máxima de metano e velocidade máxima de produção de metano, após adição de substrato, para cada condição testada nos ensaios em batelada. O modelo de Gompertz modificado (ZWIETERING et al., 1990) foi ajustado aos dados de produção acumulada de CH<sub>4</sub> para cada batelada, com modelo descrito na Equação 3:

$$G(t) = G_0 \cdot \exp \left\{ -\exp \left[ \frac{R_{\text{máx}} \cdot e}{G_0} (\lambda - t) + 1 \right] \right\}, \quad \text{Equação 3}$$

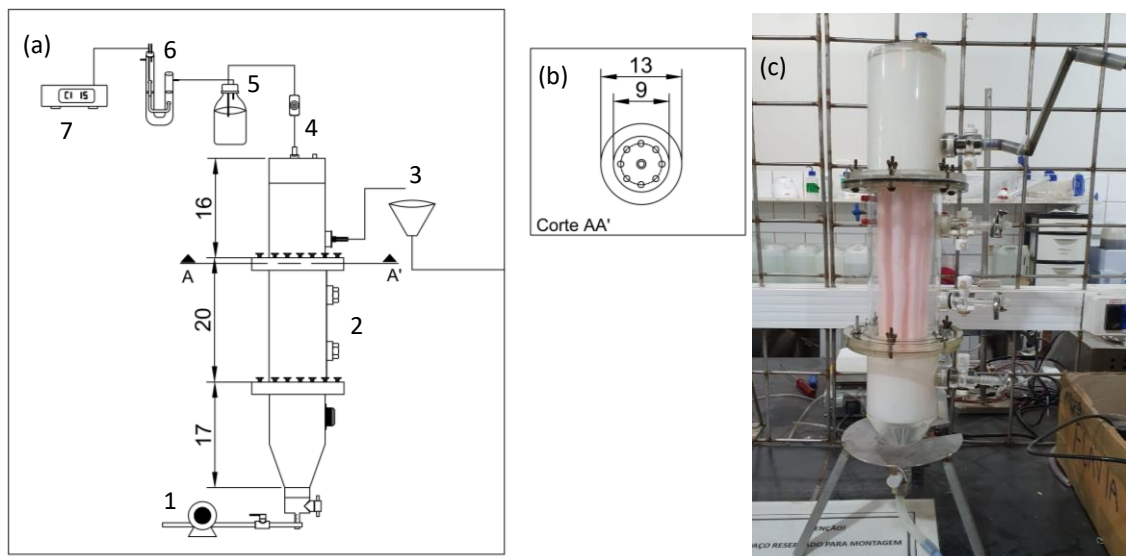


em que:  $G(t)$  representa a produção acumulada de metano no tempo  $t$  horas (mL);  $G_0$  é o volume máximo de biogás produzido (mL);  $R_{máx}$  representa a velocidade máxima de produção de  $CH_4$ ;  $e = 2,7183$  e  $\lambda$  representa a duração da fase lag que antecedeu o início da produção de biogás (horas). Os resultados foram modelados com os dados ajustados às condições normais de temperatura e pressão (CNTP). Os ensaios foram encerrados após observação da estabilidade na produção de metano (coeficiente de variação dos últimos 3 dados obtidos menor ou igual a 10%).

## 4.3 REATOR CONTÍNUO ANAERÓBIO

### 4.3.1 Aparato experimental

O processo anaeróbio foi avaliado em reator anaeróbio de leito fixo estruturado para imobilização da biomassa, conforme configuração estudada por Dias (2020) (Figura 4.3 a e b). Esse reator foi confeccionado em acrílico e apresenta diâmetro interno de 90 mm, altura de 530 mm, com volume total de 2 L e volume útil de 1,6 L. O material suporte do reator foi de espuma de poliuretano, com densidade aparente de  $20 \text{ kg/m}^3$  e porosidade de 92% com arestas entre 0,8 e 1,0 cm, e foram utilizadas 8 hastes verticais de espuma (Figura 4.3c), fixadas em telas de aço inoxidável junto à estrutura do acrílico. O reator de leito fixo estruturado tem sido aplicado em diversos trabalhos do grupo de pesquisa em Processos Anaeróbios da EESC/USP (ANZOLAROJAS et al., 2016; FUESS et al., 2017; TAKEDA et al., 2022). Esse tipo de reator não apresenta, geralmente, anomalias hidrodinâmicas, como caminhos preferenciais e zonas mortas. Ademais, não há acúmulo de biomassa nos interstícios, prevenindo a redução do volume útil ao longo do período operacional.



**Figura 4.3:** (a) Desenho esquemático com dimensões (em cm) do reator anaeróbio utilizado (Fonte: adaptado de DIAS, 2020). Legenda: 1-Bomba peristáltica; 2-Reator de leito fixo estruturado; 3-Coleta do efluente do reator; 4-Coleta do biogás; 5-Selo hídrico; 6-Tubo U para medição do volume de biogás produzido; 7-Sistema Arduíno; (b) Detalhe do posicionamento do material suporte em espuma de poliuretano; (c) Estrutura do reator anaeróbio com material suporte.

O sistema foi operado em escoamento ascendente e alimentação contínua. A alimentação do reator foi realizada por meio de bomba peristáltica *Grundfos* modelo DDA 30-

4 AR. O meio sintético era mantido em refrigeração (4°C) durante aplicação para alimentação do reator. Para a medição do volume de biogás produzido, foi utilizado medidor em formato de U ('Tubo U'), grafites HB, retirados de lápis preto (9000 HB Faber-Castell), como material condutor, acoplado a um sistema arduíno de medição de pulsos obtidos por deslocamento de uma solução salina – 37 mL NaCl, 270 g.L<sup>-1</sup> em pH 2,0 –, desenvolvido no Laboratório de Processos Biológicos (LBP) baseado em Veiga et al. (1990). O sistema de medição de gás (medidor/arduíno) (representado na Figura 4.3a) foi previamente calibrado, e cada pulso contabilizado era equivalente a uma produção de biogás de 7,32 NmL.

#### **4.3.2 Inóculo e *start-up***

O reator anaeróbico foi inoculado a partir da maceração dos grânulos do lodo de reator UASB proveniente do tratamento de águas residuárias da Avícola Dacar (Tietê/SP). O lodo foi diluído em água na proporção de 1:1 previamente à maceração dos grânulos. Em seguida, o meio suporte do reator permaneceu submerso na mistura por aproximadamente 2 horas, período após o qual foi drenado o excesso de lodo do reator, conforme metodologia de Zaiat, Cabral e Foresti (1994).

#### **4.3.3 Água residuária de estudo**

A alimentação do reator anaeróbico contínuo foi realizada com água residuária sintética, com composição adaptada de Torres (1992). O efluente simulado foi composto por DQO de aproximadamente 600 mg.L<sup>-1</sup>, contendo (mg.L<sup>-1</sup>): sacarose (52,5), amido (171) e extrato de carne (312) (fonte de N e P), sendo caracterizado como esgoto sanitário concentrado (METCALF; EDDY, 2003). Para a dissolução do amido, soluções com a massa de amido necessária para a alimentação do reator eram preparadas em frascos Duran e levadas à autoclave por 1 hora, para posterior adição ao meio sintético uma vez atingida a temperatura ambiente. A composição da água residuária também incluiu bicarbonato de sódio, em concentração variável, conforme a fase de operação do reator (descrito no item 4.3.4). Além disso, considerando-se a importância da disponibilidade de nutrientes para a multiplicação celular e o desenvolvimento dos microrganismos presentes no sistema, foi utilizada a solução de micronutrientes descrita por Torres (1992) (Tabela 4.5), na proporção de 1 mL para cada litro de afluente preparado.

**Tabela 4.5:** Composição da solução de micronutrientes adicionada ao meio sintético do reator anaeróbio.

Componente	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )
Ácido Nitrilotriacético (NTA)	12,8
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,35
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,1
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,024
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,1
ZnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,1
CuCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,025
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,01
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,024
NaCl	1
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,026
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,12

Fonte: Torres (1992).

Uma vez preparado, o meio sintético era armazenado sob refrigeração (4°C) para minimizar a fermentação e garantir a preservação das características do substrato. Ademais, análises de monitoramento do afluente foram realizadas após período máximo de armazenamento de 2 dias.

#### 4.3.4 Procedimento experimental

O reator anaeróbio foi inoculado e operado durante 452 dias, com operação dividida em 8 fases (Tabela 4.6). Ao longo desse período, o reator foi alimentado com meio sintético de Torres (1992) adaptado (descrito em 4.3.3) e adição de sais em aumento progressivo até que fosse atingida a PO de final de estudo de 21 atm (Fases 1 a 5). Uma vez atingida tal pressão osmótica, foi analisado o desempenho do reator com operação sob adição de menor concentração de álcali – NaHCO<sub>3</sub> – no afluente (Fases 6a, 6b e 6c). Após 8 dias da fase 6a, a operação do reator foi suspensa, devido à pandemia de COVID-19, e a biomassa foi armazenada em câmara fria, à temperatura de 4°C, por 47 dias. Depois desse período, foi retomada a operação do reator, quando se deu continuidade à fase 6a. O tempo de detenção hidráulica (TDH) adotado foi de 12 horas e a carga orgânica volumétrica aplicada foi de 1,0 kg DQO.m<sup>-3</sup>.dia<sup>-1</sup>. A operação do reator foi conduzida à temperatura controlada de 30°C.

**Tabela 4.6:** Condições referentes a cada fase de operação do reator anaeróbio.

<b>Fase</b>	<b>Período (dias)</b>	<b>NaCl (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>MgCl<sub>2</sub> (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>CaCl<sub>2</sub> (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>PO (atm)</b>	<b>Salinidade (wt%)</b>	<b>Adição de NaHCO<sub>3</sub> (g.L<sup>-1</sup>)</b>
1	0-67	1,87	0,37	0,24	1,5	0,25	0,4
2	67-87	4,68	0,91	0,60	3,6	0,62	0,4
3	88-108	14,26	2,79	1,83	10	1,89	0,4
4	109-184	28,42	5,60	3,65	19	3,77	0,4
5	185-213	28,42	11,95	3,65	21	4,40	0,4
6a*	214-309	28,42	11,95	3,65	21	4,40	0,3
6b	310-338	28,42	11,95	3,65	21	4,40	0,15
6c	339-452	28,42	11,95	3,65	21	4,40	0,4

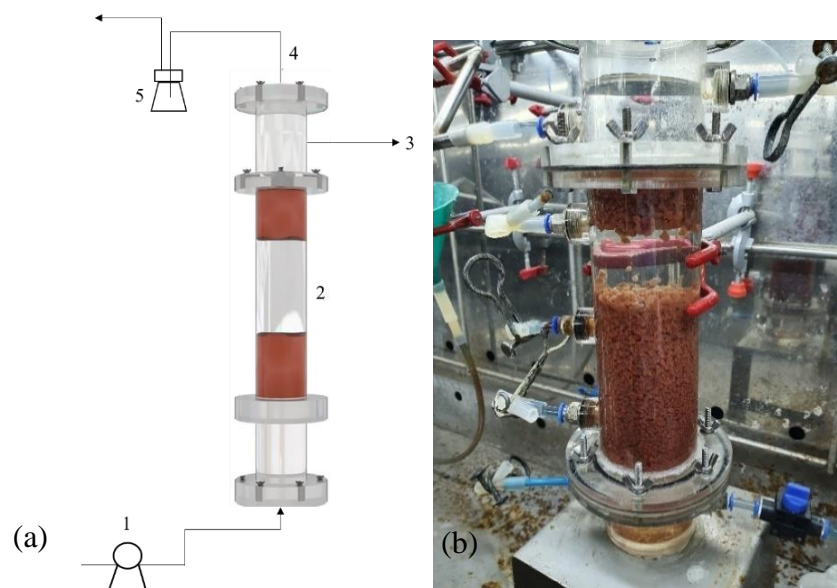
PO: Pressão osmótica. \*Após o dia 8 da fase 6a, a operação foi suspensa por 47 dias.

Após o período de 114 dias de operação nas condições da fase 6c, o monitoramento do desempenho do reator anaeróbio foi encerrado. No entanto, o reator permaneceu em operação, com frequência de monitoramento reduzida, apenas para geração de efluente para posterior aplicação no reator anammox. Para isso, a salinidade aplicada ao reator foi reduzida para a condição de 5,5 atm de pressão osmótica (6,7 g NaCl.L<sup>-1</sup>, 2,8 g MgCl<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> e 0,9 g CaCl<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>; salinidade de 1,0 wt%). O efluente anaeróbio começou a ser coletado apenas depois de observada a estabilidade nos valores de remoção de matéria orgânica para a nova condição de operação. Devido à diferença entre as cargas hidráulicas aplicadas aos reatores (15 L.d<sup>-1</sup> no reator anammox e 4 L.d<sup>-1</sup> no reator anaeróbio), fez-se necessário o armazenamento de grandes volumes do efluente anaeróbio salino (EAS) para posterior utilização. Assim, após a coleta, o EAS era armazenado à temperatura de -4°C e assim permanecia até o momento de aplicação no reator anammox.

## 4.4 REATOR CONTÍNUO ANAMMOX

### 4.4.1 Aparato experimental

O processo anammox foi estudado em reator de crescimento disperso e biomassa granular. O reator foi construído em tubo de acrílico de diâmetro interno de 70 mm, altura de 350 mm, e volume útil de 0,9 L (Figura 4.4a e b), configuração similar à estudada por Pereira (2020).



**Figura 4.4:** (a) Desenho esquemático do aparato experimental do reator anammox. Legenda: 1-Bomba peristáltica; 2-Reator anammox; 3-Coleta de efluente; 4-Coleta de biogás; 5-Selo hídrico. Fonte: modificado de Pereira (2020). (b) Reator anammox em câmara climatizada (30°C).

### 4.4.2 Inóculo e *start-up*

O reator anammox foi inoculado com biomassa granular ativa, coletada de reator anammox em operação no Laboratório de Processos Biológicos (EESC-USP), a qual era cultivada à temperatura de 37 °C em meio sintético com 232 mg N.L<sup>-1</sup> e apresentava carga nitrogenada volumétrica removida média de 1,30 ± 0,14 kgN.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>. A operação do reator anammox foi iniciada à concentração de 5,0 g SSV.L<sup>-1</sup>, conforme Yuan et al. (2022). O lodo foi introduzido no reator e, logo em seguida, foi dado início à alimentação do sistema.

#### 4.4.3 Água residuária de estudo

A concentração de nitrogênio total adotada para o estudo foi de  $60 \text{ mg.L}^{-1}$ , considerando as características de esgoto sanitário concentrado. Durante as Etapas 1 e 2 (Fases 1 a 8b), o reator anammox contínuo foi alimentado por efluente sintético com composição baseada em van de Graaf (1996). Na Etapa 1, as concentrações dos substratos foram variáveis, com a redução do N afluente até a adaptação da biomassa às condições do estudo ( $120 \rightarrow 90 \rightarrow 60 \text{ mg N.L}^{-1}$ ). Durante toda a Etapa 2, foi mantida a concentração de  $60 \text{ mg N.L}^{-1}$  ( $26 \text{ mg N-NH}_4^+.\text{L}^{-1}$  e  $34 \text{ mg N-NO}_2^-.\text{L}^{-1}$ ). O meio sintético era composto por (em  $\text{g.L}^{-1}$ ):  $0,30 \text{ MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ ,  $0,60 \text{ NaHCO}_3$ ,  $0,03 \text{ KH}_2\text{PO}_4$  e concentrações variáveis de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e  $\text{NaNO}_2$  (fontes de N-amoniacal e N-nitrito, respectivamente) (Tabela 4.7). Além disso, foram adicionadas soluções de macro e micronutrientes (Tabela 4.8), na proporção de 1 e 1,25 mL para cada litro de meio sintético preparado, respectivamente, em todas as etapas.

**Tabela 4.7:** Concentração (em  $\text{g.L}^{-1}$ ) das fontes de amônia e nitrito do meio sintético para alimentação do reator anammox.

Componente	Etapa 1				Etapa 2 (Fases 1-8b)
	Fase 1	Fase 2	Fase 3	Fase 4	
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,250	0,250	0,195	0,130	0,130
$\text{NaNO}_2$	0,345	0,345	0,250	0,162	0,162

Fonte: adaptado de Van de Graaf (1996).

**Tabela 4.8:** Composição das soluções de macro e micronutrientes adicionadas ao meio sintético do reator anammox.

Solução	Componente	Concentração ( $\text{g.L}^{-1}$ )
Macronutrientes	EDTA	5
	$\text{FeCl}_3$	5
Micronutrientes	EDTA	15
	$\text{ZnSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$	0,43
	$\text{CoCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$	0,24
	$\text{MnCl}_2.4\text{H}_2\text{O}$	0,99
	$\text{Cu SO}_4.5\text{H}_2\text{O}$	0,25
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4.5\text{H}_2\text{O}$	0,22
	$\text{NiCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$	0,19
	$\text{Na}_2\text{SeO}_3.5\text{H}_2\text{O}$	0,21
	$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,014

Fonte: Van de Graaf (1996).

Na fase 9 da Etapa 2, a alimentação do reator anammox foi realizada com o efluente do reator anaeróbio salino (EAS). Simultaneamente à aplicação do EAS, foi iniciada a suplementação de nitrito, visto que o efluente de reatores anaeróbios apresenta nitrogênio, em sua quase totalidade, na forma amoniacal. Assim, era adicionada à alimentação do reator massa de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) suficiente para o fornecimento de N-amoniacal e N-nitrito nas concentrações de 26 e 34 mg N.L<sup>-1</sup>, respectivamente, como nas fases anteriores. Assim, foi mantida a relação estequiométrica afluyente  $\text{N-NO}_2^-/\text{N-NH}_4^+$  próxima a 1,32, que corresponde à estequiometria teórica da reação anammox proposta por Strous et al. (1998). Além disso, uma vez que o EAS apresentava concentração de N amoniacal média de  $39 \pm 2$  mg.L<sup>-1</sup>, foi necessária a diluição em 70% antes da aplicação do efluente no reator anammox.

#### 4.4.4 Procedimento experimental

O sistema foi operado em escoamento ascendente e alimentação contínua. A alimentação do reator foi realizada por meio de bomba peristáltica *Grundfos* modelo DDA 30-4 AR. O meio sintético era preparado em galão de polietileno e, em seguida, purgado com mistura de argônio (95%) e CO<sub>2</sub> (5%), previamente à alimentação do reator, até que o valor de oxigênio dissolvido no meio fosse inferior a 0,2 mg.L<sup>-1</sup>, minimizando-se, assim, a entrada de oxigênio no reator.

O reator anammox foi inoculado e operado pelo período de 684 dias, e esse período foi dividido em duas etapas. Na Etapa 1, foi gradualmente reduzida a concentração afluyente de nitrogênio (120 → 60 mg N.L<sup>-1</sup>) para adaptação da biomassa, com a manutenção da carga nitrogenada volumétrica aplicada. Na Etapa 2, foi elevada gradualmente a salinidade afluyente durante as 8 primeiras fases e, na última fase, foi aplicado o efluente do reator anaeróbio na alimentação do reator anammox. Foram necessárias duas paralisações na operação do reator, devido à pandemia de COVID-19, que ocorreram entre os dias 140 e 202 e entre os dias 396 e 467, conforme descrito a seguir. A operação do reator foi conduzida à temperatura controlada de 30°C.

A Etapa 1 da operação durou 140 dias e teve como objetivo promover a adaptação da biomassa de inóculo à água residuária de baixa concentração de nitrogênio, como o caso dos esgotos sanitários. Essa etapa foi dividida em 4 fases, conforme descrito na Tabela 4.9, durante as quais foram variados tempo de detenção hidráulica, concentração afluyente de nitrogênio (mantendo-se a relação  $\text{N-NO}_2^-:\text{N-NH}_4^+$  igual a 1:1,32) e carga nitrogenada volumétrica aplicada.



**Tabela 4.9:** Condições referentes a cada fase da Etapa 1 de operação do reator anammox.

Fase	Período (dias)	TDH (h)	Concentração afluyente (mg.L <sup>-1</sup> )			CNVA (kgN.m <sup>-3</sup> .dia <sup>-1</sup> )
			N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	N total	
1	0-22	2,2	52	68	120	1,3
2	23-106	2,8	52	68	120	1,1
3	107-121	2,2	39	51	90	1,0
4	122-140	1,4	24	36	60	1,0

TDH: Tempo de Detenção Hidráulica; CNVA: Carga Nitrogenada Volumétrica Aplicada.

Ao final da Etapa 1, no dia 140, foi necessário suspender a operação do reator anammox. A biomassa foi então retirada do reator e lavada e preservada em solução de nitrato de sódio (1,21 g.L<sup>-1</sup>) e mantida em câmara fria, à temperatura de 4°C. Após período de suspensão de 62 dias, no dia 202, a biomassa foi retornada ao reator e foi reiniciada a alimentação do reator anammox, já adaptada às condições de concentração de N e TDH deste estudo, para dar seguimento à etapa seguinte.

Na Etapa 2, foi dado início ao aumento progressivo das concentrações de sais no afluyente do reator anammox (Tabela 4.10), fixadas as condições de operação (TDH, CNVA e concentração afluyente de N total) iguais às da última fase da Etapa 1. A Etapa 2 teve a duração total de 482 dias e foi dividida em 9 fases. A salinidade foi elevada de 0 a 2,20 wt% (Fase 4), porém, devido à instabilidade observada no desempenho do processo anammox, foi necessário reduzir as concentrações de sais nas fases subsequentes. Durante a fase 8 dessa etapa, no dia 396, a operação do reator foi novamente suspensa e o mesmo procedimento de lavagem e preservação da biomassa foi executado. Após 71 dias de suspensão, no dia 467, a operação foi retomada e foi dado início à fase 8b da Etapa 2, nas mesmas condições da fase anterior (fase 8a). Na fase 9, iniciou-se a alimentação do reator anammox com o efluente do reator anaeróbio salino (EAS), previamente armazenado para este fim, com suplementação de nitrito, conforme descrito no item 4.2.4. Essa fase durou 28 dias de operação e a salinidade aplicada permaneceu igual a 4 atm de pressão osmótica (salinidade total de 0,72 wt%).

**Tabela 4.10:** Condições referentes a cada fase da Etapa 2 de operação do reator anammox.

Fase	Período (dias)	PO (atm)	NaCl (g.L <sup>-1</sup> )	MgCl <sub>2</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	CaCl <sub>2</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	Salinidade (wt%)
1	202-224	0	0	0	0	0
2	225-237	1,7	1,87	0,78	0,24	0,29
3	238-287	4	4,68	1,95	0,60	0,72
4	288-302	11	14,26	5,95	1,83	2,20
5	303-319	4	4,68	1,95	0,60	0,72
6	320-354	7	8,65	3,61	1,11	1,55
7	355-371	5,5	6,69	2,79	0,86	1,24
8a	372-396 <sup>a</sup>	4	4,68	1,95	0,60	0,72
8b	467-656	4	4,68	1,95	0,60	0,72
9 <sup>b</sup>	657-684	4	4,68	1,95	0,60	0,72

PO: Pressão osmótica; <sup>a</sup> Entre os dias 396 e 467, houve uma paralisação na operação do reator; <sup>b</sup> Início da aplicação do Efluente Anaeróbio Salino (EAS).

#### 4.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

O desempenho dos reatores contínuos foi monitorado por meio de análises físico-químicas com frequência, método e referência descritos na Tabela 4.11. O oxigênio dissolvido no meio líquido foi monitorado com sonda de medidor por luminescência Hach, modelo HQ40d multi, e a condutividade elétrica foi medida por meio de condutivímetro Digimed DM-31.

**Tabela 4.11:** Frequência das análises físico-químicas para monitoramento dos reatores.

Parâmetro	Frequência na semana	Método analítico	Referência
DQOs	3x	Espetrofotométrico (Refluxo fechado)	APHA et al., 2012
pH	3x	Potenciométrico	APHA et al., 2012
Alcalinidade e Ácidos voláteis totais	3x	Titulométrico	Kapp (1984)
SSV	1x	Gravimétrico	APHA et al., 2012
Composição do biogás	3x	Cromatografia gasosa	Perna et al., 2013
Vazão de biogás	Diária	Sistema arduíno	-
Nitrogênio amoniacal	3x	Espetrofotométrico	APHA et al., 2012
Nitrito e nitrato	3x	Espetrofotométrico	APHA et al., 2012

DQO: Demanda Química de Oxigênio; SSV: Sólidos Suspensos Voláteis.

Devido à interferência do cloreto nas amostras sobre a análise de DQO, foi utilizada a metodologia de Vyrides e Stuckey (2009) para o tratamento de todas as amostras, previamente à realização da análise. O procedimento consiste na adição de sulfato de mercúrio ( $\text{HgSO}_4$ ) à amostra, na proporção de 20:1 ( $\text{HgSO}_4:\text{Cl}^-$ ), para a precipitação do cloreto na forma de  $\text{HgCl}_2$ . Haja vista a necessidade de filtração das amostras ( $0,45\mu\text{m}$ ) após a adição do sulfato de mercúrio, todos os resultados referentes à análise de DQO nesse estudo correspondem à fração de DQO solúvel (DQOs) das amostras.

Para as amostras do reator anammox, devido à interferência do nitrito sobre a análise de nitrato, foi aplicado pré-tratamento com 0,5 mL de solução de ácido sulfâmico (4%) e 0,1 mL de HCl (1M) para alíquota de 5 mL de amostra a ser analisada, com base no procedimento desenvolvido por Granger e Sigman (2009). O aperfeiçoamento da metodologia da análise de nitrato é baseado na redução do nitrito a  $\text{N}_2$ , pelo ácido sulfâmico, na presença de HCl (meio ácido).

A vazão de biogás do reator anaeróbio foi monitorada continuamente por medidor de gás, baseado no deslocamento de líquido ( $\text{NaCl}$ ,  $270\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) em tubo de vidro, conectado a um sistema arduíno desenvolvido no Laboratório de Processos Biológicos, acoplado ao *headspace* do sistema. A análise da composição do biogás – metano ( $\text{CH}_4$ ) e dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) – foi realizada em cromatógrafo gasoso modelo GC 2014 em sistema Shimadzu® equipado com detector de condutividade térmica (TCD), com coluna HP-PLOT/Q (30m de comprimento, 0,53 mm de diâmetro externo e 0,40  $\mu\text{m}$  de espessura), e gás de arraste hidrogênio. As temperaturas do injetor e detector eram de  $160^\circ\text{C}$  e  $170^\circ\text{C}$ , respectivamente, e tempo de corrida de aproximadamente 5,25 minutos (PERNA et al., 2013).

Diante das análises realizadas, as variáveis resposta para a verificação do desempenho do reator contínuo anaeróbio foram: eficiência de remoção de DQOs (%); relação entre alcalinidade intermediária e parcial (AI/AP); produção volumétrica de metano (PVM, em  $\text{mL CH}_4\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ); e fração de metano no biogás (%). Para os ensaios anaeróbios em batelada, foram avaliados a produção de metano (NmL) e remoção de DQO. Vale ressaltar que os valores para as variáveis-resposta referentes à produção de biogás correspondem às condições normais de temperatura e pressão (CNTP).

Para o reator anammox, foram avaliados: eficiência de remoção de N-amônia, N-nitrito e N-total (%); produção de N-nitrato; e relações estequiométricas  $\text{N-NO}_2^-/\text{N-NH}_4^+$ , referente ao nitrito e amônia consumidos, e  $\text{N-NO}_3^-/\text{N-NH}_4^+$ , referente ao nitrato produzido e amônia consumida. Na última fase de operação, na qual o reator foi alimentado com efluente anaeróbio salino, também foi avaliada a eficiência de remoção de DQOs (%).

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de eficiência de remoção de DQO, para o reator anaeróbio, e eficiência de remoção de nitrogênio, para o reator anammox, foram analisados em relação à aderência à distribuição normal por meio do teste estatístico de Shapiro-Wilk, a nível de confiança de 95%. Com base nos resultados, quando os conjuntos de dados apresentaram distribuição normal, optou-se pela comparação das médias pelo teste t de Student. Quando os conjuntos de dados não apresentaram distribuição normal, utilizou-se o teste não paramétrico de Mann Whitney para comparação das medianas. Os testes foram realizados por meio do software *Past 4* (University of Oslo, Noruega).

#### 4.7 ANÁLISES DA COMUNIDADE MICROBIANA

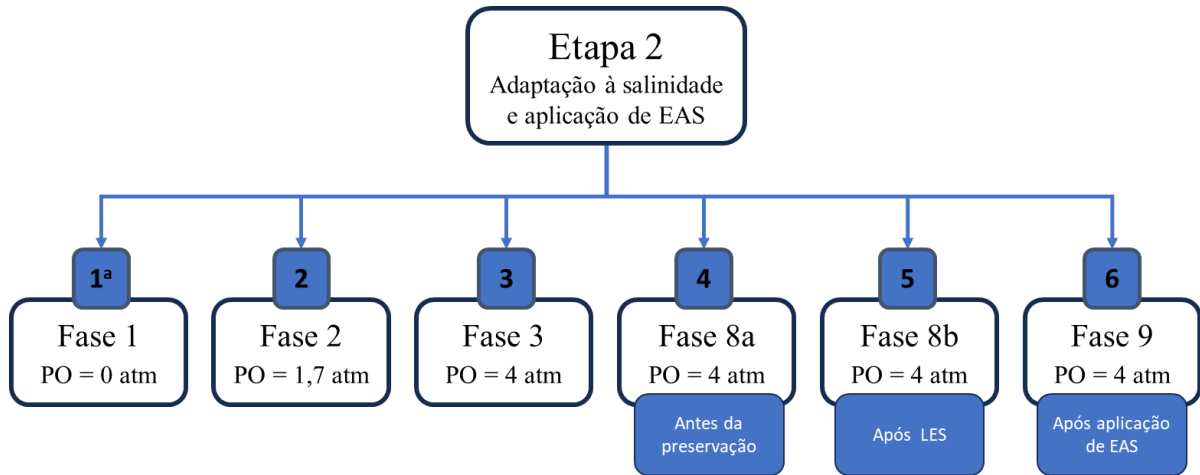
As análises de biologia molecular foram utilizadas para avaliar as alterações na comunidade microbiana ao longo do experimento. Foram analisadas as biomassas dos reatores contínuos, ao final de cada fase de interesse, e a biomassa de 4 condições dos reatores em batelada, ao final dos ensaios. As amostras das réplicas de uma mesma condição em batelada foram misturadas e sequenciadas juntas. Para o reator anaeróbio de leito fixo estruturado, foram coletadas amostras da biomassa aderida ao material suporte e da biomassa suspensa, as quais foram analisadas separadamente.

Após cada coleta, foi realizado o mesmo procedimento para todas as amostras: centrifugação e lavagem em tampão fosfato-salino (PBS 1X), seguida de centrifugação novamente. As amostras foram então armazenadas a -20°C até o momento de extração do DNA.

##### 4.7.1 Identificação das amostras analisadas

Um total de 4 amostras foram coletadas dos ensaios em batelada: uma representando os reatores controle e as demais se referindo às condições de PO de 5,24, 10,95 e 24,34 atm. Em relação aos reatores contínuos, foram coletadas amostras de biomassa do reator anaeróbio (suspensa e aderida) durante a primeira fase de operação (fase 1, PO = 1,5 atm) e ao final da última (fase 6c, PO = 21 atm), totalizando 4 amostras. Do reator anammox, foram realizadas

coletas de biomassa durante a etapa 2 de operação. Um total de 6 amostras foram coletadas do reator, com coletas indicadas na Figura 4.5.



**Figura 4.5:** Fluxograma das coletas de amostras para caracterização microbiológica do reator anammox. PO: Pressão Osmótica; LES: Longa exposição à salinidade; EAS: Efluente Anaeróbico Salino. <sup>a</sup> Número da amostra coletada.

#### 4.7.2 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído a partir de alíquotas de biomassa de 0,5g de cada amostra. O procedimento de extração foi realizado com uso do kit comercial FastDNA Kit for Soil (*MP Biomedicals*), seguindo as instruções do fabricante. A concentração e pureza do DNA foram avaliadas por meio de espectrofotômetro Nanodrop 2000 (*Thermo Fisher Scientific*, Wilmington, EUA), sendo a relação de absorvância 260/280nm no intervalo de 1,8 a 2,0 indicativa de pureza dos ácidos nucleicos. Ademais, a verificação da integridade do DNA extraído foi realizada por eletroforese em gel de agarose (0,8%).

#### 4.7.3 Sequenciamento do gene 16S rRNA

As amostras foram enviadas para a empresa NGS Soluções Genômicas (Piracicaba, SP) para realização do sequenciamento e análise de bioinformática. A amplificação do gene 16S rRNA foi realizada com set de primers 341F/806R e purificadas com AMPure XP beads. Foi utilizado o kit Nextera XT na inclusão dos barcodes. O preparo das bibliotecas de sequenciamento foi realizado com uso do DNA Ultra NBNext Kit para *Illumina* (New England Biolabs, Ipswich, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. O sequenciamento foi realizado na plataforma Illumina Miseq, e as leituras produzidas foram de 2x250 pb. O

processamento dos dados de sequenciamento foi realizado no programa DADA2, um pacote de código aberto implementado na linguagem R. Após o processamento inicial, as taxonomias foram atribuídas a cada ASV (do inglês *Amplicon Sequencing Variants*) utilizando uma implementação do programa DADA2 do método de classificador bayesiano ingênuo para essa finalidade. A função que atribui a taxonomia toma como entrada um conjunto de sequências (ASVs) a serem classificadas e um conjunto de treinamento de sequências de referência com taxonomia conhecida, e atribui taxonomias. O banco de dados SILVA foi utilizado como referência. As sequências foram depositadas no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) com o número de acesso PRJNA1001937.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos a partir do monitoramento dos reatores contínuos e dos ensaios em batelada são apresentados.

### 5.1 ENSAIOS EM BATELADA

Os ensaios em batelada foram avaliados quanto à produção acumulada de metano e remoção de DQO (item 5.1.1). No item 5.1.2, foi analisado o efeito de interação entre os sais (NaCl, MgCl<sub>2</sub> e CaCl<sub>2</sub>). A variação da composição da comunidade microbiana com o aumento da salinidade também foi avaliada (itens 5.1.3).

#### 5.1.1 Produção de metano e remoção de DQO nos ensaios

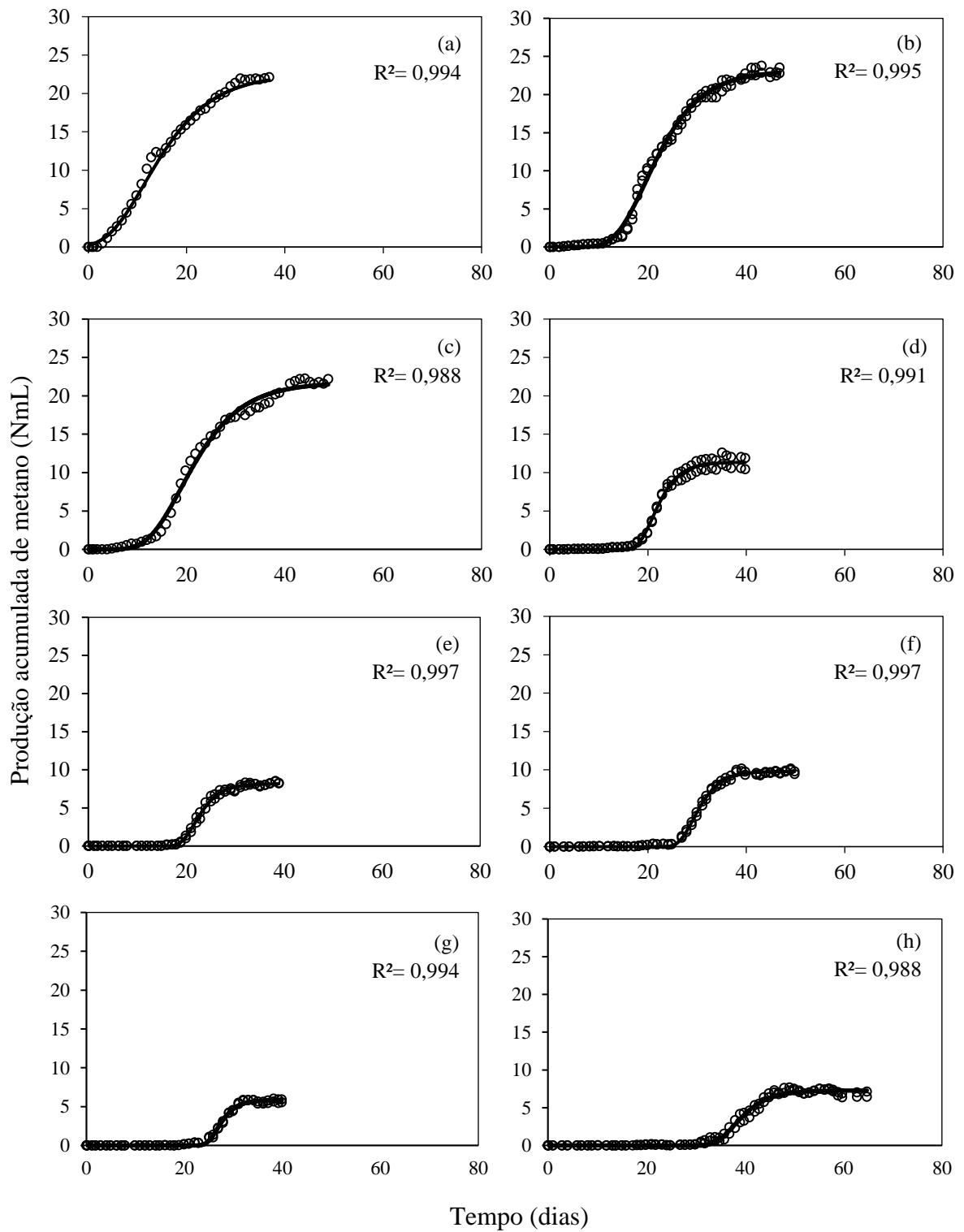
Os ensaios do planejamento fatorial 2<sup>3</sup> foram executados, em duplicata, totalizando 16 bateladas. Além disso, um ensaio sem adição de sais também foi realizado, em duplicata, para avaliação da atividade do lodo de inóculo na ausência de sais, denominada condição controle (PO=0 atm). O modelo de Gompertz modificado (ZWIETERING et al., 1990) foi ajustado aos dados de produção acumulada de metano ao longo do tempo de cada ensaio, para obtenção dos parâmetros cinéticos (duração da fase lag, potencial de produção de metano e velocidade máxima ( $r_{m\acute{a}x}$ ) de produção de metano) (Tabela 5.1). Foi observado ajuste do modelo aos dados experimentais ( $R^2 > 0,98$ ) para todas as condições salinas testadas (Figura 5.1).

**Tabela 5.1:** Potencial de produção de metano ( $P_{m\acute{a}x}$ ), velocidade máxima de produção de metano ( $r_{m\acute{a}x}$ ) e duração da fase lag ( $\lambda$ ) para cada ensaio em batelada.

Ensaio	NaCl (g.L <sup>-1</sup> )	MgCl <sub>2</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	CaCl <sub>2</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	Salinidade (wt%)	$P_{m\acute{a}x}$ (mL)	$r_{m\acute{a}x}$ (mL.d <sup>-1</sup> )	$\lambda$ (dias)
Controle	0,500	0,014	0,009	0,05	20,7	5,19	0
5,24 atm	5	3	3	1,1	22,5	1,09	3,9
7,87 atm	5	3	12	2,0	23,1	1,37	13,3
8,40 atm	5	12	3	2,0	19,2	1,10	12,5
10,95 atm	5	12	12	2,9	11,4	1,41	18,0
18,79 atm	30	3	3	3,6	8,2	1,07	18,9
21,26 atm	30	3	12	4,5	9,8	1,21	26,3
21,83 atm	30	12	3	4,5	5,8	1,01	24,6
24,34 atm	30	12	12	5,4	7,3	0,71	34,1

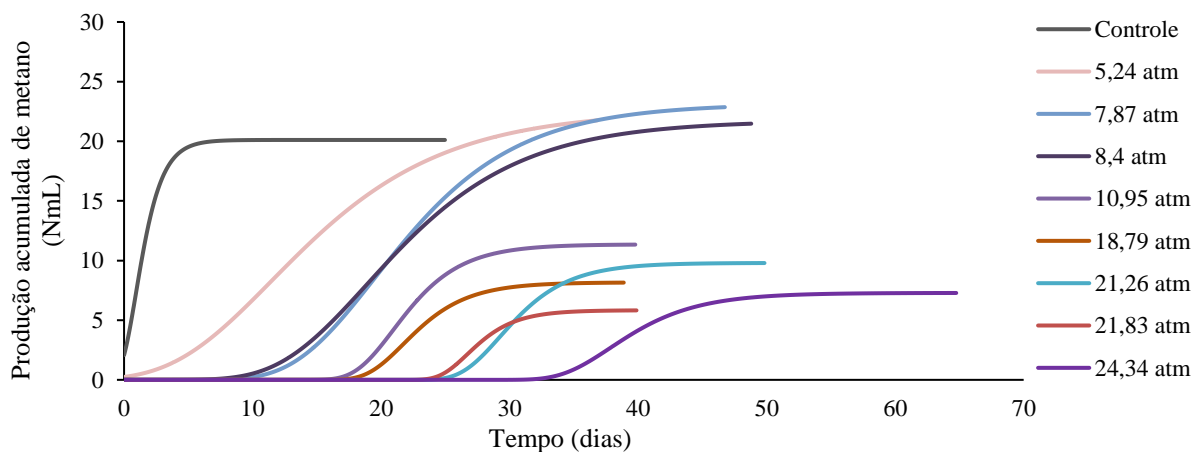


**Figura 5.1:** Dados observados e previstos (com o modelo de Gompertz modificado) da produção acumulada de metano (NmL) para cada ensaio: (a) 5,24 atm, (b) 7,87 atm, (c) 8,40 atm, (d) 10,95 atm, (e) 18,79 atm, (f) 21,26 atm, (g) 21,83 atm, (h) 24,34 atm.



A fase lag, a qual não ocorreu para o ensaio controle, foi maior com o aumento da pressão osmótica (Figura 5.2), atingindo valores de até 34 dias, o que já era esperado, uma vez que o lodo utilizado como inóculo não era adaptado à salinidade (ZHAO et al., 2017). Zeb et al. (2019) comparou o emprego de biomassa adaptada e não adaptada à salinidade e verificou que a fase lag foi três vezes menor nos ensaios com lodo adaptado, em relação ao não adaptado, para todas as concentrações de sal impostas (NaCl), na degradação de efluente da indústria de laticínios. Em relação à produção máxima de metano observada, os ensaios de 5,24 atm, 7,87 atm e 8,4 atm apresentaram valores próximos àquele referente ao reator controle. A partir da pressão osmótica de 10,95 atm, no entanto, foi observada redução acentuada na produção de CH<sub>4</sub> nos ensaios, com produção máxima igual a 55% daquela na condição da ausência de sais. Os ensaios de 18,79; 21,26; 21,83 e 24,34 atm apresentaram valores para esse parâmetro inferiores a 50% daquele observado no reator controle. Assim, enquanto a salinidade por eletrólitos mistos de até 8,4 atm (5, 12 e 3 g.L<sup>-1</sup> de NaCl, MgCl<sub>2</sub> e CaCl<sub>2</sub>, respectivamente) não afetou a produção de metano no tratamento de efluente sanitário sintético, pressões osmóticas acima de 10,95 atm (5, 12 e 12 g.L<sup>-1</sup> de NaCl, MgCl<sub>2</sub> e CaCl<sub>2</sub>, respectivamente) resultaram em elevada inibição sobre o processo metanogênico.

**Figura 5.2:** Produção acumulada de metano (NmL) ao longo do tempo (dias) nos ensaios controle e salinos (dados previstos com modelo de Gompertz modificado).

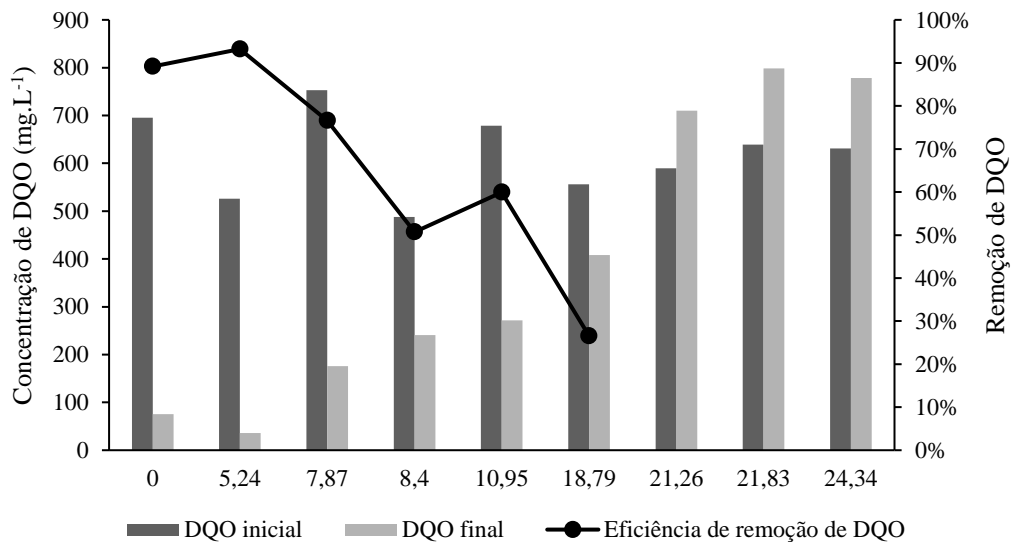


Zeb et al. (2019) avaliaram a influência da salinidade na forma de NaCl sobre a produção de metano por biomassa não halofílica a partir de efluente da indústria de laticínios em ensaios em batelada durante 20 dias. Na presença de 4 gNaCl.L<sup>-1</sup> (PO de 2,6 atm), os autores observaram inibição de 48% na produção máxima de CH<sub>4</sub>, em relação ao controle, a qual foi de 25% no presente estudo (após 20 dias de ensaio e PO de 5,4 atm). Apesar da menor pressão

osmótica aplicada, a inibição foi maior para o estudo de Zeb et al. (2019), o que pode ser atribuído à presença exclusiva de NaCl, enquanto que, no presente estudo, foram adicionados também  $\text{CaCl}_2$  e  $\text{MgCl}_2$ .

Além do monitoramento constante da produção de metano nos reatores, foram coletadas amostras líquidas no início e ao final dos ensaios para análises de DQO (Figura 5.3). A pressão osmótica de 5,24 atm, não afetou a remoção de DQO, uma vez que a eficiência de remoção nessa condição (93%) foi similar e inclusive superior à da condição de ausência de sais (89%). Em estudo conduzido por Zhang et al. (2022), foi avaliada a influência do NaCl sobre a produção de metano a partir de efluente sintético simulando água residuária da extração de petróleo. Foram realizados ensaios em batelada sob salinidade variada ( $8\text{-}85 \text{ g NaCl.L}^{-1}$ ), a  $35^\circ\text{C}$ . Os autores observaram resultado similar no que se refere à maior eficiência de remoção de DQO para baixas salinidades ( $8 \text{ g.L}^{-1}$  de NaCl;  $\text{PO}=5 \text{ atm}$ ), o que sugere que a presença de sais em baixas concentrações é benéfica à degradação de matéria orgânica no tratamento anaeróbio. Esse benefício foi atribuído à regulação mais eficiente da pressão osmótica e atividade enzimática dos microrganismos.

**Figura 5.3:** Concentrações iniciais e finais de DQO e eficiência de remoção de DQO dos ensaios em batelada. Identificação dos ensaios pela pressão osmótica (atm).



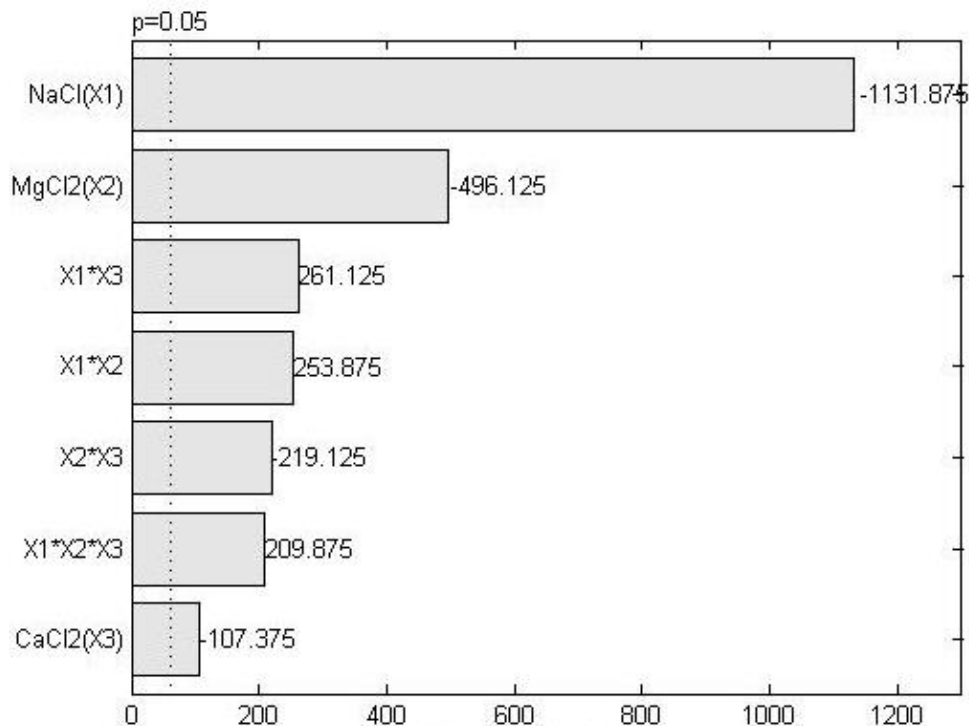
A partir da pressão osmótica de 7,87 atm, no entanto, foi observada diminuição da eficiência de remoção de DQO em todos os ensaios, em relação ao controle. Nas condições de pressão osmótica mais elevada (21,26; 21,83 e 24,34 atm), a DQO de final de ensaio superou a inicial, o que também foi relatado por Zhang et al. (2022). Os autores reportaram menores

eficiências de DQO com o aumento da salinidade (NaCl) e maiores valores de DQO foram observados ao final dos ensaios, em relação à DQO inicial, para salinidades mais elevadas (PO de 36 e 46 atm). A diminuição na remoção de matéria orgânica foi atribuída à inibição pela salinidade, a qual provocou plasmólise e redução da atividade microbiana. Assim, o aumento da concentração de DQO no meio foi associado à liberação do material celular dos microrganismos que não conseguiram se adaptar à salinidade, cujas células se desintegraram (ZHANG et al., 2022).

### 5.1.2 Efeito de interação entre os sais

Em relação aos resultados do planejamento fatorial de três fatores (NaCl, MgCl<sub>2</sub> e CaCl<sub>2</sub>), a identificação das variáveis independentes significativas e a magnitude do efeito de cada fator para o processo metanogênico estão representadas no gráfico de Pareto (Figura 5.4). Os efeitos das interações entre os sais avaliados estão representados por X1\*X3 (NaCl e CaCl<sub>2</sub>), X1\*X2 (NaCl e MgCl<sub>2</sub>) e X2\*X3 (MgCl<sub>2</sub> e CaCl<sub>2</sub>). Observa-se que os efeitos isolados dos sais avaliados, assim como a interação entre esses, foram significativos sobre o processo.

**Figura 5.4:** Diagrama de Pareto resultante do planejamento fatorial 2<sup>3</sup>.



O sal de maior efeito negativo sobre a produção de metano foi o NaCl (-1131,875), seguido pelo MgCl<sub>2</sub> (-496,125) e, por último, CaCl<sub>2</sub> (-219,125). As interações entre os cloretos de sódio e de cálcio (261,125) e de sódio e de magnésio (253,875) influenciaram de forma positiva o processo. Esse efeito está relacionado à relação de antagonismo entre cátions divalentes e monovalentes, proposto por McCarty e McKinney (1961). Os autores estudaram a influência de cátions sobre o consórcio microbiano anaeróbio e relataram que sais de cátions divalentes Mg<sup>2+</sup> e Ca<sup>2+</sup> podem mitigar e até eliminar o efeito inibitório de sais de Na<sup>+</sup>. Os autores reportaram, ainda, que a toxicidade de sais sobre as comunidades microbianas em sistemas de tratamento está geralmente associada aos cátions e que os ânions, como o cloreto, exercem ação tóxica pouco significativa. Kugelman e McCarty (1965) também avaliaram a inibição de cátions sobre a digestão anaeróbia e relataram que a magnitude do efeito negativo da presença dos cátions decresce na ordem sódio, cálcio e magnésio. No presente estudo, no entanto, a ordem de intensidade dos efeitos dos cloretos desses cátions obedeceu a ordem NaCl>MgCl<sub>2</sub>>CaCl<sub>2</sub>.

Em estudo de Feijoo et al. (1995), o efeito do NaCl sobre a produção de metano foi avaliado, para concentrações de sal de até 30 g.L<sup>-1</sup>. Apesar da inibição observada pelo sal isolado, os autores relataram que ensaios com a utilização de soluções com composição similar à água do mar, i.e., com adição de Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> e SO<sub>4</sub><sup>-</sup>, além do NaCl, resultaram em menor efeito inibitório à metanogênese, em comparação ao efeito apenas do NaCl. Assim, Feijoo et al. (1995) levantaram a hipótese da relação de antagonismo entre os elementos envolvidos e alívio do efeito inibidor da salinidade, ainda que empregando lodos adaptados à salinidade.

Syazwani et al. (2017) compararam o efeito inibidor de NaCl e KCl isoladamente e em mistura sobre a digestão anaeróbia de esgoto doméstico. Os autores observaram que a presença de ambos os sais resultou em menor efeito negativo sobre a metanogênese em relação às condições de adição apenas de um dos sais. Isso indica o efeito de antagonismo também entre os cátions monovalentes Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>. Ademais, a ordem de intensidade do efeito negativo dos sais foi NaCl>KCl>NaCl+KCl.

Em estudo conduzido por Dang et al. (2014), o efeito do cátion Ca<sup>2+</sup> sobre a degradação anaeróbia de meio sintético composto por acetato e extrato de levedura foi avaliado em ensaios em batelada com o emprego de grânulos anaeróbios. As concentrações de 0; 0,5; 1; 2; 3; 5 e 8 g Ca<sup>2+</sup>.L<sup>-1</sup> foram utilizadas e os autores reportaram que concentrações de até 3 g.L<sup>-1</sup> do cátion divalente não afetaram negativamente a produção de metano pelo consórcio microbiano, enquanto as concentrações de 5 e 8 g Ca<sup>2+</sup>.L<sup>-1</sup> inibiram severamente o processo. O limite de Ca<sup>2+</sup> a partir do qual a metanogênese foi inibida (5 g.L<sup>-1</sup>) corresponde à pressão osmótica de

6,4 atm (salinidade de 1,4 wt%), para a qual os autores observaram redução em 67% na produção acumulada de metano, em relação ao ensaio na ausência de  $\text{CaCl}_2$ . No presente estudo, a presença de  $4,3 \text{ g Ca}^{2+} \cdot \text{L}^{-1}$ , associada a  $5 \text{ g NaCl} \cdot \text{L}^{-1}$  e  $3 \text{ g MgCl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$  (PO = 7,87 atm), não resultou em inibição da metanogênese, e foi observado, inclusive, um aumento da produção acumulada de  $\text{CH}_4$  em 12%, em relação ao ensaio na ausência de sais. Assim, apesar da maior pressão osmótica imposta e concentração similar de  $\text{Ca}^{2+}$ , não foi observada inibição no presente trabalho, o que pode ser atribuído ao efeito de antagonismo entre os sais estudados. Isso mostra a importância da consideração do efeito tóxico específico dos cátions e das interações entre eles, além da avaliação da inibição pela pressão osmótica sobre a atividade microbiana.

### 5.1.3 Análises da comunidade microbiana

A diversidade e riqueza das comunidades microbianas das amostras de biomassa dos reatores em batelada operados às PO de 0, 5,24, 10,95 e 24,34 atm foram avaliadas. O consórcio microbiano foi avaliado por meio dos índices de diversidade e indicador de riqueza apresentados na Tabela 5.2. O incremento da salinidade resultou em aumento da diversidade microbiana, evidenciado pelos maiores índices de Shannon (3,19-3,35) nas condições salinas, em relação à de ausência de sais (3,07). A riqueza das espécies, no entanto, diminuiu com o aumento da PO, conforme redução do índice Chao1 de 107 (sem sais) para 91 (24,34 atm; 5,40 wt%).

**Tabela 5.2:** Índices de diversidade e indicador de riqueza microbiana obtidos por meio dos resultados do sequenciamento Illumina para as amostras dos ensaios em batelada referentes às PO de 0, 5,24, 10,95 e 24,34 atm.

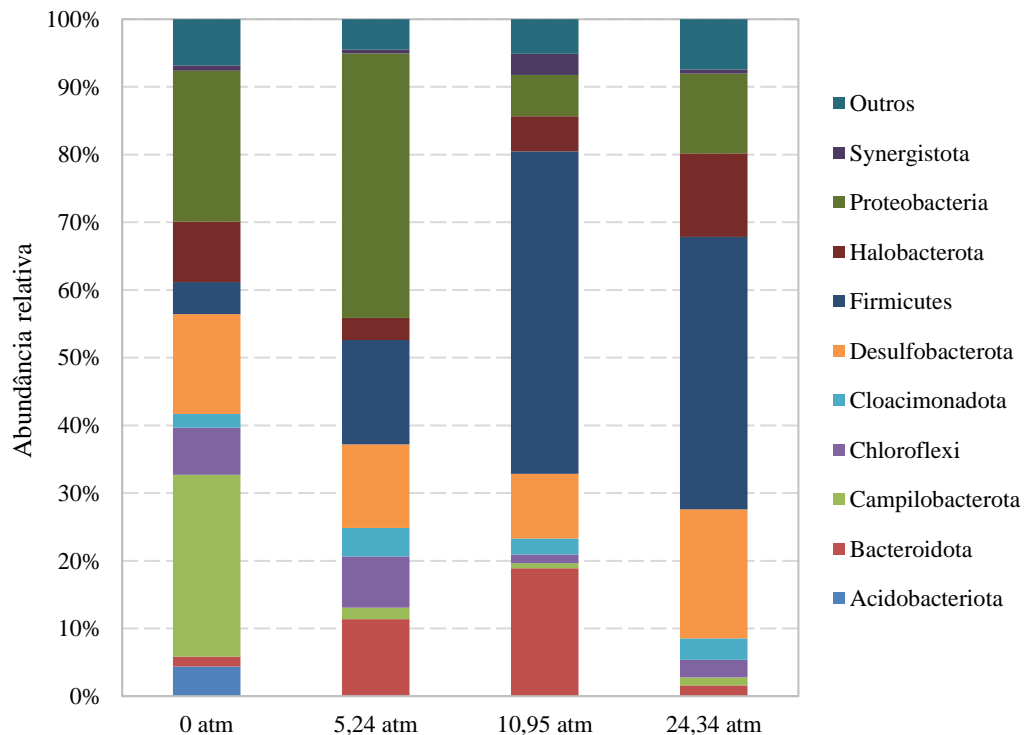
PO do ensaio (atm)	Salinidade (wt%)	Chao1	Shannon <sup>a</sup>	Sequências
0,00	0,00	107	3,07	42.360
5,24	1,10	103	3,19	41.292
10,95	2,90	105	3,35	41.574
24,34	5,40	95	3,20	38.843

PO: Pressão Osmótica; <sup>a</sup>: Maior índice de Shannon representa maior diversidade.

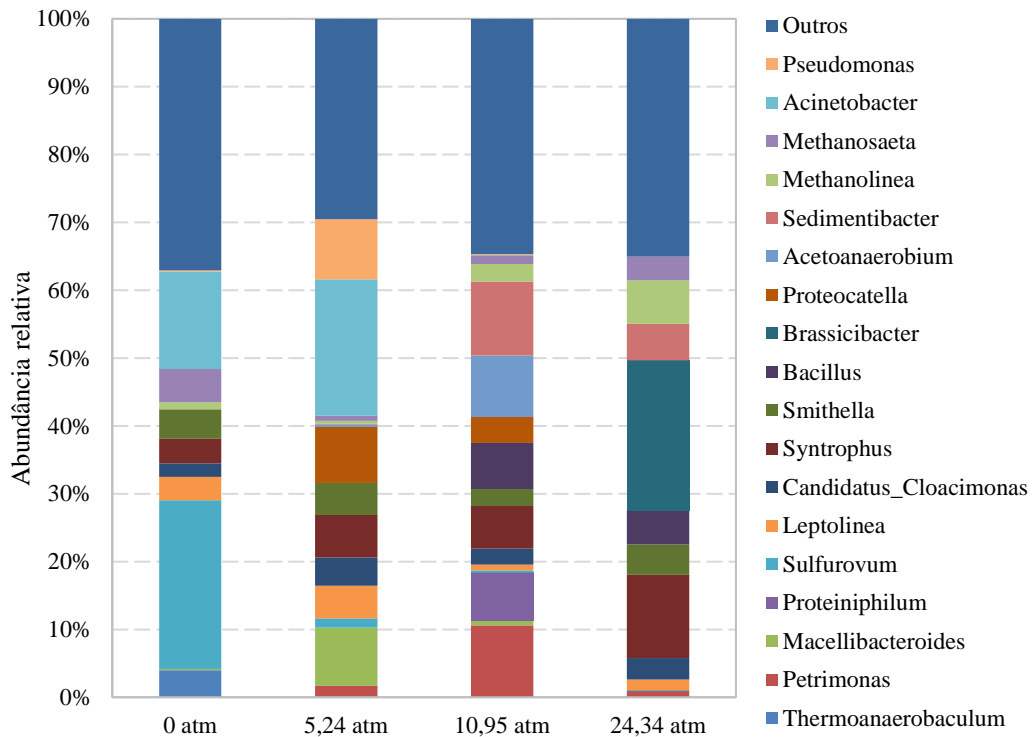
Um total de 26 filos dentre os domínios Bacteria (22) e Archaea (4) foi observado nas amostras analisadas do reator anaeróbio (Figura 5.5). Dentre eles, os filos Campilobacterota (0,8-26,9%) Firmicutes (4,7-47,6%), Desulfobacterota (9,6-19,1%), Halobacterota (3,3-12,4%)

e Proteobacteria (6,1-39,0%) foram os de maior abundância relativa, representando pelo menos 70% das sequências extraídas de cada amostra. Os principais gêneros encontrados nas amostras estão apresentados na Figura 5.6. Os gêneros de maior abundância relativa foram *Acinetobacter* (0,0-20,1%), *Sulfurovum* (0,2-25,9%), *Syntrophus* (3,8-12,3%), *Bacillus* (0,0-6,8%), *Acetoanaerobium* (0,0-9,1%), *Sedimentibacter* (0,0-10,9%), *Brassicibacter* (0,0-22,2%), *Methanolinea* (0,4-6,4%), *Methanosaeta* (0,8-5,1%) e *Proteocatella* (0,0-8,3%), representando pelo menos 61% das sequências extraídas de cada amostra.

**Figura 5.5:** Composição taxonômica das comunidades microbianas nos filos nos ensaios anaeróbios em batelada referentes às PO de 0, 5,24, 10,95 e 24,34 atm. Identificação das amostras: Pressão osmótica. Para possibilitar a visualização dos dados, estão apresentados os filos com mais de 3,0% de abundância relativa (em pelo menos uma amostra). Os demais foram incluídos no grupo “Outros”.



**Figura 5.6:** Composição taxonômica das comunidades microbianas nos gêneros nos ensaios anaeróbios em batelada referentes às PO de 0, 5,24, 10,95 e 24,34 atm. Identificação das amostras: Pressão osmótica. Para possibilitar a visualização dos dados, estão apresentados os gêneros com mais de 5,0% de abundância relativa (em pelo menos uma amostra). Os demais foram incluídos no grupo “Outros”.



O filo Firmicutes abrange microrganismos capazes de realizar hidrólise de material orgânico complexo, como celulose e proteínas, a ácidos orgânicos de cadeia curta (LIM et al., 2014). Segundo Park et al. (2014), membros desse filo podem produzir endósporos para resistir a condições extremas, como estresse devido à salinidade. No presente estudo, o incremento da PO resultou no aumento significativo da população desse filo, com abundância relativa de 15,4-47,6% nas amostras salinas e 4,7% na amostra em ausência de sais, demonstrando resposta positiva à salinidade. Maior presença do filo Firmicutes com o aumento da concentração de sais (NaCl) também foi observado por Ma et al. (2021) e Zhang et al. (2022) (6,7% na ausência de sais para 16,3% em salinidade de 8,5 wt%). Os gêneros desse filo de maior abundância relativa identificados nas amostras salinas foram da ordem Peptostreptococcales-Tissierellales: *Sedimentibacter* (0,1-10,9%), *Acetoanaerobium* (0,0-9,1%), *Proteocatella* (0,0-8,3%) e *Brassicibacter* (0,0-22,2%).

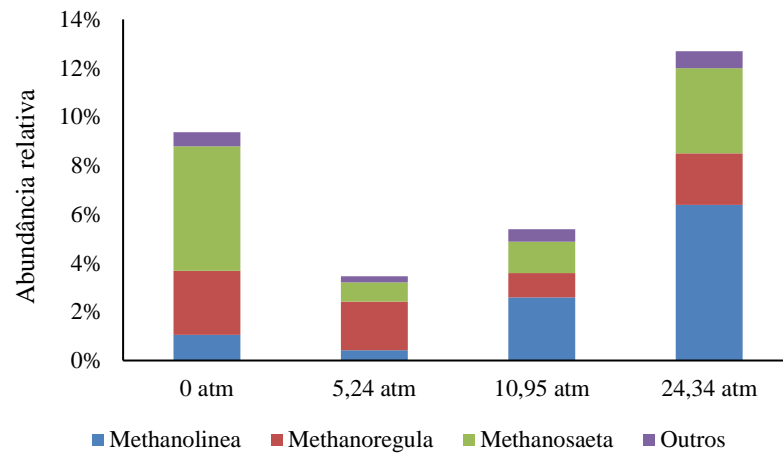
Membros do filo Proteobacteria foram significativamente inibidos por elevadas concentrações de sal (10,95 atm: 6,1%; 24,34 atm: 11,8%), em relação à condição sem salinidade (22,3%). A pressão osmótica moderada de 5,24 atm (1,10 wt%), no entanto, parece



ter favorecido bactérias desse filo, uma vez que a abundância relativa observada para essa condição foi de 39,0%. O principal gênero de Proteobacteria identificado nas amostras de 0 e 5,24 atm foi o *Acinetobacter*, com abundância relativa de 15,0% e 20,1%, respectivamente. Ademais, o gênero *Pseudomonas* apresentou abundância relativa significativa, de 8,9%, na amostra de 5,24 atm. Zhang et al. (2022) também reportaram menor presença de Proteobacteria nas condições de 4,5 e 8,5 wt%, em relação à condição controle. À salinidade de 1,5 wt%, os autores não observaram alteração na abundância relativa desse filo. Membros do filo Proteobacteria são conhecidos por apresentarem função crucial na remoção de nutrientes e matéria orgânica em sistemas de tratamento de águas residuárias (CHEN et al., 2019). Assim, a menor remoção de DQO nas condições 10,95 atm e 24,34 atm pode estar associada à redução da população desse filo (ZHANG et al., 2022), bem como o inverso pode ser relacionado à condição de 5,24 atm, que apresentou remoção de DQO maior que a condição na ausência de sais.

O filo Halobacterota compreende as arqueas que realizam a metanogênese e apresentou redução na abundância relativa nas condições de 5,24 (1,10 wt%) e 10,95 atm (2,90 wt%) (3,3 e 5,2%, respectivamente), em relação à condição de ausência de sais (8,9%), evidenciando a inibição das AM pela salinidade. À PO de 24,34 atm (5,40), no entanto, um aumento da população metanogênica foi observado (12,4%). O gênero de AM hidrogenotróficas *Methanolinea* foi favorecido com o aumento da salinidade, enquanto as acetoclásticas *Methanosaeta* foram inibidas, até PO de 10,95 atm (Figura 5.7). Em estudo realizado por Zhang et al. (2022), a redução na abundância relativa do gênero *Methanolinea* simultaneamente ao aumento de *Methanobacterium* também foi observada com o aumento da concentração de NaCl de 0 para 15 g.L<sup>-1</sup> (PO = 9 atm). No entanto, o posterior incremento da salinidade a 45 g NaCl.L<sup>-1</sup> (25 atm) resultou no contrário, i. e., dominância do gênero *Methanolinea* em relação ao *Methanobacterium*. O gênero de AM hidrogenotróficas *Methanoregula* foi identificado em todas as amostras, sendo dominante em baixa salinidade (5,24 atm; 1,10 wt%). Dessa forma, choques de elevada salinidade (a partir de 11 atm) podem favorecer o gênero *Methanolinea*, em detrimento do *Methanoregula*.

**Figura 5.7:** Abundância relativa dos gêneros de arqueas metanogênicas nos ensaios anaeróbios em batelada referentes às PO de 0, 5,24, 10,95 e 24,34 atm. Identificação das amostras: Pressão Osmótica.



## 5.2 REATOR CONTÍNUO ANAERÓBIO

O processo anaeróbio foi avaliado em relação ao desempenho na remoção de matéria orgânica e na produção de metano (item 5.2.1) e à composição da comunidade microbiana (item 5.2.2), em resposta a variações na salinidade e alcalinidade afluentes.

### 5.2.1 Desempenho do reator anaeróbio

O reator contínuo anaeróbio foi operado por 452 dias, com operação dividida em 8 fases. As fases de operação de 1 a 5 do reator anaeróbio foram realizadas com o objetivo de investigar o potencial de tratamento de efluente sanitário salino em reator de leito fixo estruturado. Após inoculação, a operação do reator foi iniciada já sob alimentação com presença de sais (fase 1, PO = 1,5 atm; 0,25 wt%), para que a possível presença de microrganismos halotolerantes no lodo de inóculo fosse mantida. A Tabela 5.3 mostra os valores médios obtidos para cada parâmetro de monitoramento do reator anaeróbio ao longo do período de operação.

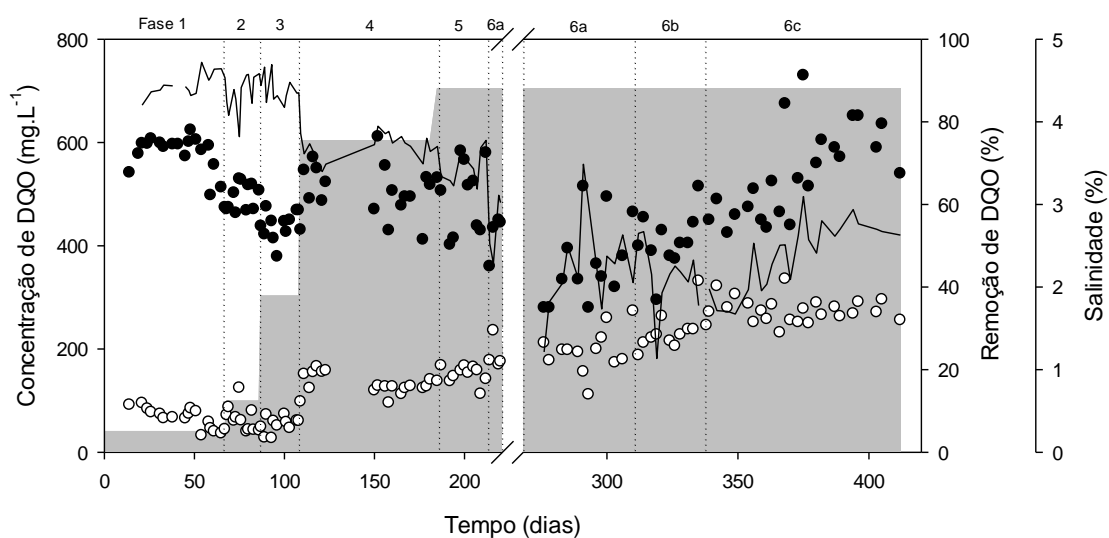
**Tabela 5.3:** Resumo dos principais parâmetros de monitoramento obtidos durante o período de operação do reator anaeróbio. Média (desvio padrão).

Parâmetros	Fases de operação e respectivas pressões osmóticas (atm)								
	1	2	3	4	5	6a	6b	6c	
	1,5atm	3,6atm	10atm	19atm	21atm	21atm	21atm	21atm	
<b>Eficiência de remoção de DQOs (%)</b>		91 (1)	90 (3)	87 (2)	74 (2)	70 (5)	48 (3)	42 (4)	54 (1)
<b>DQOs (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	Afluente	511 (35)	497 (25)	452 (18)	490 (47)	498 (63)	390 (74)	429 (54)	604 (50)
	Efluente	45 (8)	50 (17)	60 (10)	129 (7)	147 (21)	204 (39)	181 (16)	279 (18)
<b>pH</b>	Afluente	7,6 (0,3)	7,5 (0,1)	7,4 (0,2)	6,9 (0,1)	7,3 (0,3)	7,4 (0,2)	7,7 (0,1)	7,5 (0,1)
	Efluente	7,3 (0,1)	7,1 (0,1)	7,0 (0,1)	6,7 (0,2)	6,7 (0,1)	6,7 (0,0)	6,3 (0,2)	6,6 (0,0)
<b>Alcalinidade a bicarbonato (mgCaCO<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup>)</b>	Afluente	222,5 (5,7)	230,3 (10,7)	243,4 (4,7)	212,7 (20,2)	245,9 (10,4)	176,2 (2,9)	115,6 (5,2)	249,7 (16,5)
	Efluente	338,9 (11,6)	372,1 (28,7)	395,0 (15,5)	389,9 (23,3)	403,6 (19,2)	315,8 (6,2)	124,5 (27,2)	297,0 (14,4)
<b>AVT (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	Efluente	32,1 (5,9)	43,1 (6,7)	38,6 (4,0)	105,7 (9,2)	126,0 (16,2)	189,7 (10,7)	204,4 (8,7)	84,7 (3,9)
<b>AI/AP</b>	Efluente	0,05 (0,01)	0,05 (0,01)	0,05 (0,01)	0,15 (0,04)	0,16 (0,03)	0,30 (0,02)	0,85 (0,18)	0,29 (0,03)
<b>COV (kg DQO.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>)</b>	Aplicada	1,16 (0,08)	1,13 (0,06)	1,03 (0,04)	1,12 (0,11)	1,14 (0,14)	0,87 (0,16)	0,98 (0,12)	1,40 (0,11)
	Removida	1,07 (0,08)	1,02 (0,05)	0,89 (0,04)	0,82 (0,10)	0,80 (0,14)	0,39 (0,10)	0,41 (0,04)	0,77 (0,09)
<b>PVM (NmLCH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>)</b>		109,5 (18,8)	176,1 (10,6)	173,1 (4,3)	132,2 (27,4)	136,1 (14,5)	66,7 (12,7)	75,9 (10,2)	92,0 (20,5)
<b>Fração no biogás (%)</b>	CH <sub>4</sub>	84,2 (0,7)	83,3 (0,6)	83,8 (0,6)	83,4 (2,1)	84,5 (0,8)	83,7 (0,4)	83,6 (0,7)	81,8 (0,2)
	CO <sub>2</sub>	15,8 (0,7)	16,7 (0,6)	16,2 (0,6)	16,6 (2,1)	15,5 (0,8)	16,3 (0,4)	16,4 (0,7)	18,2 (0,2)

DQOs: DQO solúvel; AVT: Ácidos Voláteis Totais; AI/AP: Alcalinidade Intermediária/Alcalinidade Parcial; COV: Carga Orgânica Volumétrica; PVM: Produção Volumétrica de Metano.

Em relação à eficiência de remoção de matéria orgânica (Figura 5.8), nas fases 1 e 2, as médias de remoção de DQOs foram de  $92 \pm 1,3$  e  $89 \pm 3,1\%$ , e as DQOs efluentes foram de  $45 \pm 8$  e  $50 \pm 17$  mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente, de modo que o incremento da salinidade de 0,25 para 0,62 wt% (PO de 1,5 para 3,6 atm) não interferiu significativamente na eficiência do processo ( $p > 0,05$ ). O aumento da salinidade para 1,89 wt% (PO = 10 atm), na fase 3, resultou em eficiência média de  $87 \pm 3\%$ , havendo diferença significativa entre as eficiências de remoção de DQO entre as fases 1 e 3 ( $p < 0,05$ ), mas não entre as fases 2 e 3 ( $p > 0,05$ ).

**Figura 5.8:** DQO solúvel no afluente (●) e efluente (○) e eficiência de remoção de DQO solúvel (—) do reator metanogênico ao longo da operação. Área cinza representa a salinidade (wt%).



Na fase 4, no entanto, a elevação da salinidade de 1,89 para 3,77 wt% (PO de 10 para 19 atm) resultou em redução da eficiência média de remoção de DQO solúvel para  $74 \pm 2\%$ , a qual diferiu significativamente de todas as fases anteriores ( $p < 0,05$ ), e aumento da DQOs efluente média de  $60 \pm 9,5$  para  $129 \pm 6,8$  mg.L<sup>-1</sup>. O efluente dessa fase já apresentou DQOs efluente 30% superior à média observada por Saliba e Von Sperling (2017), que avaliaram o desempenho de reator UASB sem a condição salina para o tratamento de esgoto sanitário (442 mgDQO.L<sup>-1</sup>).

Na fase 5, à pressão osmótica final de estudo de 21 atm (4,4 wt%), cujo incremento foi causado pelo aumento somente na concentração de MgCl<sub>2</sub> (de 5,60 para 11,95 g.L<sup>-1</sup>), o reator apresentou eficiência média de remoção de DQOs de  $70 \pm 4\%$  e DQOs efluente de  $150 \pm 20$  mg.L<sup>-1</sup>. A análise estatística mostrou que não houve diferença significativa entre as médias de eficiência de remoção de DQO das fases 4 e 5 ( $p > 0,05$ ), indicando que o aumento isolado da concentração desse sal não afetou o processo.

Após a fase 5, foi dado início à redução gradual da concentração de bicarbonato de sódio adicionada ao meio sintético, correspondente à fase 6 de operação. Essa alteração foi proposta considerando-se que, em geral, o tratamento de efluentes sanitários não ocorre com a adição de álcali nas Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs) e que essa prática acrescentaria um custo ao processo.

O tratamento de esgoto doméstico dispensa a adição de álcali, uma vez que as condições aplicadas aos reatores permitem a operação estável, em função da capacidade do processo anaeróbio em se autorregular. A etapa de metanogênese a partir da utilização do acetato – um

dos produtos intermediários do processo –, realizado pelas arqueas acetoclásticas, resulta na produção de alcalinidade a bicarbonato nos reatores. Como a carga orgânica afluyente às ETEs geralmente não é suficiente para causar distúrbios à digestão anaeróbia, de modo que a produção e o consumo dos produtos intermediários do processo permanecem em equilíbrio, a alcalinidade produzida pelos próprios microrganismos participantes do processo seria suficiente para tamponar o sistema, mesmo que ocorra pequeno acúmulo de ácidos no reator. A

Tabela 5.4 apresenta a caracterização de efluentes sanitários reais utilizados em outros estudos, inclusive em termos de alcalinidade.

**Tabela 5.4:** Caracterizações de efluentes sanitários reais brutos encontradas na literatura.

<b>Parâmetros</b>	<b>Granatto et al. (2016)</b>	<b>Moura et al. (2018)</b>	<b>Murata et al. (2021)</b>
DQO	653	493	411
NTK	45	45	36
Alcalinidade total (CaCO <sub>3</sub> )	216	177	181
pH	7,2	7,0	6,9

A alcalinidade total média observada nos efluentes reais foi de 191 mg CaCO<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup>. Assim, o objetivo das fases 6a-6c (Tabela 5.5) foi avaliar o desempenho do processo anaeróbio no tratamento de esgoto sanitário salino com a redução da adição do bicarbonato de sódio ao afluyente do reator, à PO de 21 atm (4,4 wt%).

**Tabela 5.5:** Alcalinidade afluyente ao reator anaeróbio em cada fase de operação.

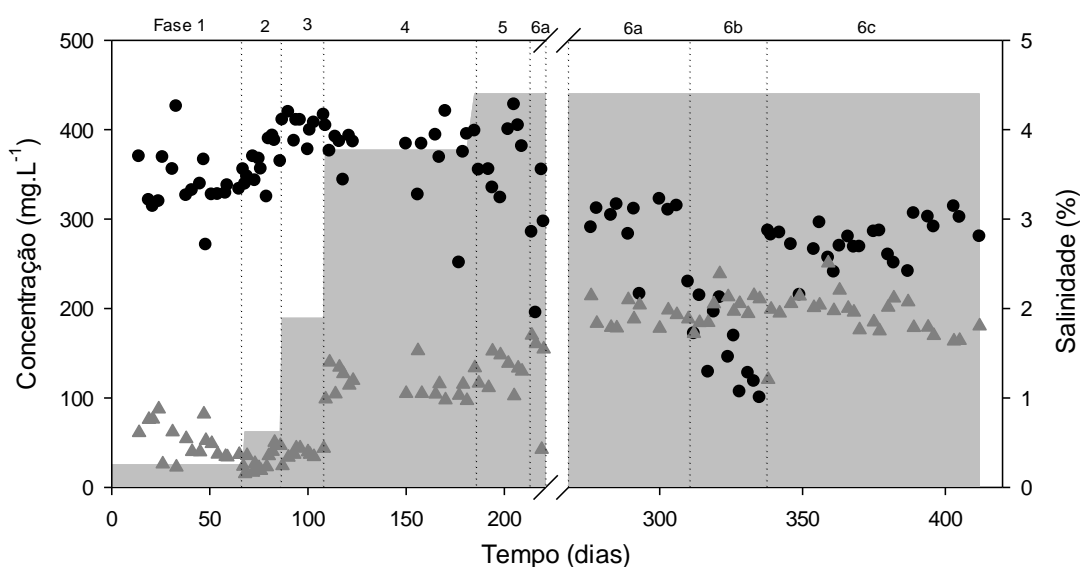
<b>Fase de operação</b>	<b>Adição de álcali ao afluyente (g NaHCO<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Alcalinidade afluyente (mgCaCO<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup>)</b>	
		<b>Total</b>	<b>A bicarbonato</b>
1 a 5	0,4	266,0 ± 15,6	233,6 ± 14,7
6a	0,3	222,5 ± 4,0	182,3 ± 8,0
6b	0,15	145,9 ± 6,2	114,0 ± 5,1
6c	0,4	294,5 ± 11,4	254,6 ± 9,2

Inicialmente, a concentração de NaHCO<sub>3</sub> foi reduzida de 0,4 g.L<sup>-1</sup> para 0,3 g.L<sup>-1</sup> (fase 6a). Porém, após o período de 8 dias nessa condição, foi necessário suspender a operação do reator pelo intervalo de 47 dias, período durante o qual o reator foi mantido em câmara fria, à temperatura de 4°C, para manutenção da comunidade microbiana. A retomada da operação do reator anaeróbio ocorreu pelo retorno do reator à câmara climatizada a 30°C e início da

alimentação com meio sintético, na mesma condição àquela imediatamente anterior à suspensão (fase 6a: PO de 21 atm, adição de  $0,3 \text{ g NaHCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ ). Após 30 dias de operação na fase 6a, a média da DQOs efluente aumentou de  $150 \pm 20$  para  $207 \pm 35 \text{ mg.L}^{-1}$ . Na fase seguinte, 6b, quando a concentração de  $\text{NaHCO}_3$  foi reduzida a  $0,15 \text{ g.L}^{-1}$ , o reator apresentou aumento da DQOs efluente média para  $225 \pm 14 \text{ mg.L}^{-1}$ . No entanto, não foi observada diferença significativa entre as eficiências médias de remoção de DQO das fases 6a e 6b ( $p > 0,05$ ).

Além da variação da eficiência de remoção de matéria orgânica, alterações em outros parâmetros também são utilizadas como indicadores de distúrbios no processo anaeróbio, como o aumento da concentração de ácidos voláteis, o aumento da fração de  $\text{CO}_2$  no biogás, a redução do pH e a diminuição da produção total de biogás. No que se refere à concentração efluente de ácidos voláteis totais (AVT), foi observado aumento a partir da fase 4, e, de forma ainda mais acentuada, a partir da fase 6a (Figura 5.9), associado à redução da eficiência de remoção de DQOs. O acúmulo de AVT indica desequilíbrio entre os processos de produção e consumo de ácidos e alerta para o risco de colapso do reator.

**Figura 5.9:** Alcalinidade a bicarbonato, em  $\text{mgCaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$  (●), e concentração de Ácidos Voláteis Totais, em  $\text{mg.L}^{-1}$  (▲), no efluente do reator anaeróbio ao longo do período de operação. Área cinza representa a salinidade (wt%).

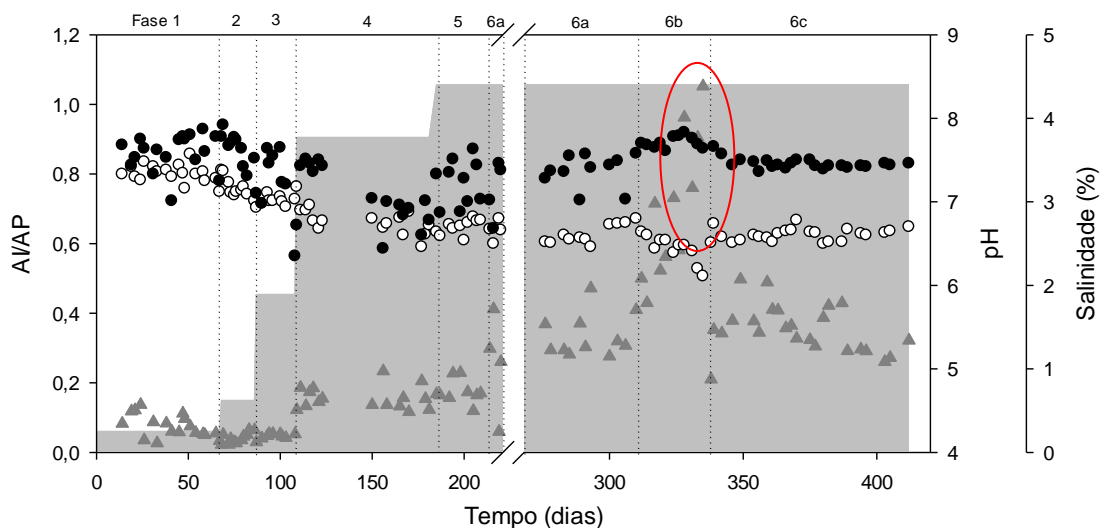


A concentração média de AVT foi de  $37,8 \pm 6,7 \text{ mg.L}^{-1}$ , durante as fases 1 a 3, e atingiu os valores médios de  $105,8 \pm 9,2$  e  $130,4 \pm 17,2 \text{ mg.L}^{-1}$  nas Fases 4 e 5, respectivamente. Apesar do aumento de AVT, os valores de alcalinidade a bicarbonato das fases 4 e 5 mantiveram-se os mesmos das fases 1 a 3, suficiente para manutenção do pH do sistema próximo ao neutro. De Vrieze et al. (2012) afirmam que o acúmulo de AVT ocorre com o aumento da salinidade,

devido à comunidade metanogênica ser a mais sensível, em reatores anaeróbios, a elevadas concentrações de sais. Já na fase 6a, a média de AVT após estabilização do reator foi de  $193,3 \pm 11,2 \text{ mg.L}^{-1}$ , e na fase 6b,  $204,4 \pm 8,7 \text{ mg.L}^{-1}$ . Com a redução da alcalinização do afluente na fase 6b, apesar de não ter sido observado aumento significativo na média de AVT em relação à fase anterior, o sistema não foi capaz de sustentar a alcalinidade a bicarbonato no efluente, o que apresentou risco elevado de falência do sistema. Ao final da fase 6b, a alcalinidade a bicarbonato no efluente do reator atingiu valores inferiores aos do afluente, indicando o consumo da alcalinidade fornecida na alimentação e o desbalanceamento entre os processos envolvidos.

Em relação ao pH efluente, foram observados os valores mínimo e máximo de 6,9 e 7,4, durante as fases 1 a 3, com média de  $7,1 \pm 0,1$ , e nas fases 4 e 5, a média de pH foi de  $6,7 \pm 0,1$ . O aumento da concentração de  $\text{H}^+$  no meio está associada ao aumento da concentração de ácidos orgânicos no efluente, a partir da fase 4 do experimento. Na fase 6a não foi observada diferença do pH em relação à média das fases anteriores (4 e 5), apesar da redução da suplementação de álcali no afluente. Já na fase 6b, o pH efluente foi reduzido, atingindo os valores mínimos de 6,2 e 6,1 (Figura 5.10).

**Figura 5.10:** pH afluente (●) e efluente (○) e relação AI/AP (▲) no efluente do reator anaeróbio ao longo do período de operação. Área cinza representa a salinidade (wt%).



No momento em que foi observado o pH efluente de 6,1, foi interrompida a alimentação do reator, que permaneceu desligada pelo período de 72 horas, para evitar o processo de acidificação irreversível, a qual pode ocorrer para valores de pH inferiores a 6 (CHERNICHARO, 2007). Segundo Mullai et al. (2020), o intervalo ótimo de pH para a



produção de metano é de 6,6 a 7,6 e valores abaixo de 6,6 começam a inibir o processo, com severa inibição das arqueas metanogênicas a pH inferior a 6,2. A interrupção da operação do reator foi realizada para que os microrganismos consumissem os ácidos disponíveis no meio e os parâmetros de alcalinidade a bicarbonato e pH retornassem aos valores do início da fase. Após 72h, o pH aumentou para 6,5, a concentração de AVT diminuiu para 60,3 mg.L<sup>-1</sup>, e a alcalinidade a bicarbonato foi de 287,0 mg CaCO<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup> (AI/AP = 0,21), condições nas quais foi retomada a alimentação do reator.

A repartida do reator foi dada pelo retorno à condição de 0,4 gNaHCO<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup> no afluente (fase 6c). A imposição de condições idênticas à fase 5 teve como objetivo explorar a razão da deterioração do efluente na fase 6, ou seja, identificar se foi associada à redução da suplementação de alcalinizante no afluente do reator ou à exposição prolongada à salinidade. Em relação à eficiência de remoção de matéria orgânica, foi observado aumento da média de remoção na fase 6c para 54 ± 1,1%, com diferença significativa em relação às fases 6a e 6b (p<0,05). No entanto, diferença significativa entre a remoção de DQO das fases 5 e 6c também foi verificada, de modo que a atividade microbiana não foi capaz de retomar o desempenho que apresentou na fase 5, em que o reator foi operado nas mesmas condições da fase 6c.

Além do pH e da alcalinidade, a relação AI/AP fornece informações importantes para o monitoramento de reatores anaeróbios, uma vez que relaciona o acúmulo de ácidos orgânicos no sistema e a disponibilidade de alcalinidade. A instabilidade dessa relação representa um indicativo do desbalanceamento e desequilíbrio dos processos de produção e consumo de ácidos pelo consórcio microbiano.

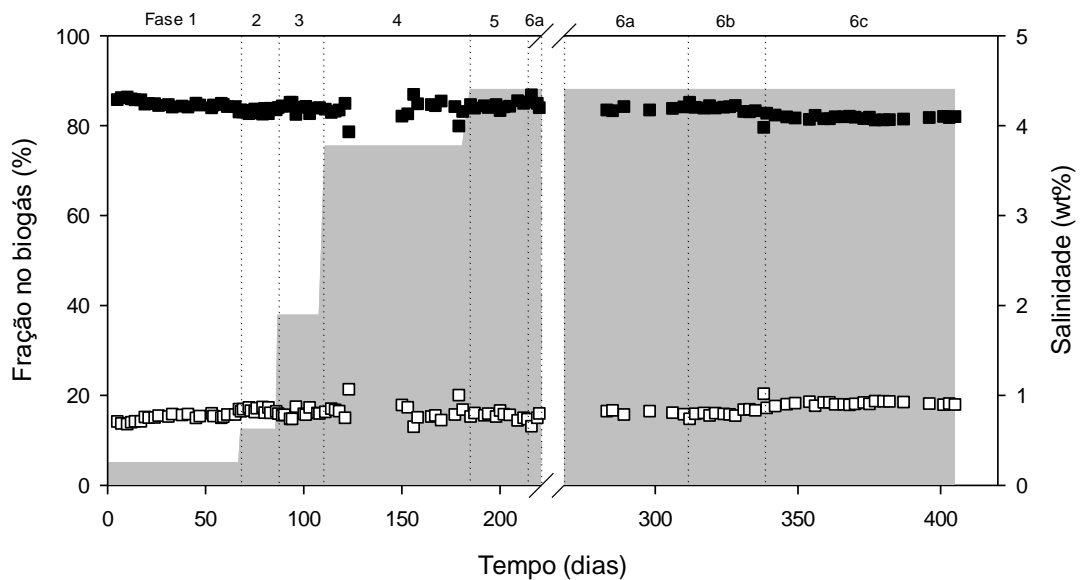
Durante as fases 1, 2 e 3, a relação AI/AP do efluente do reator anaeróbio permaneceu abaixo de 0,10, sem oscilações significativas nesse período (Figura 5.10). O sistema apresentou aumento nesse parâmetro, nas fases 4 e 5, atingindo médias de 0,15 e 0,17, respectivamente, devido à maior concentração de ácidos voláteis no efluente. Na fase 6a, o reator atingiu a estabilidade com valor médio de AI/AP de 0,30. O aumento da relação já era esperado, uma vez que nessa fase foi reduzida a alcalinidade afluente, mas o aumento da concentração de ácidos voláteis também contribuiu para a alteração da AI/AP. Na fase 6b, foram observados valores de AI/AP variando de 0,52 até o pico de 1,05, muito superiores aos valores registrados até então. Visto que não foi observado aumento significativo na concentração de AVT no efluente entre as fases 6a e 6b, o aumento da AI/AP ocorreu somente devido à redução da alcalinidade a bicarbonato efluente.

A deterioração da qualidade do efluente, que culminou no aumento da relação AI/AP para valores de 0,9-1,1 e na redução do pH efluente para 6,1, após 18 dias de operação na fase

6b, sugere que o processo anaeróbio era dependente da adição de alcalinizante na alimentação do reator. Isso indica que as arqueas metanogênicas acetoclásticas, responsáveis pela produção de alcalinidade a bicarbonato em reatores anaeróbios, estavam com atividade reduzida e que a via metanogênica hidrogenotrófica deveria estar sendo responsável pela maior parcela do metano produzido, sob condições salinas. Assim, a redução da disponibilidade de alcalinidade a bicarbonato no afluente sugeriu menor atividade da população acetoclástica. De Vrieze et al. (2017), observaram a predominância da via metanogênica hidrogenotrófica, em relação à acetoclástica, com o aumento da concentração de sais (NaCl), devido à maior sensibilidade das AM acetoclásticas ao estresse pela salinidade. No item 5.2.2, no qual são apresentados os resultados das análises de biologia molecular, é dada continuidade à discussão relacionada às populações metanogênicas no reator.

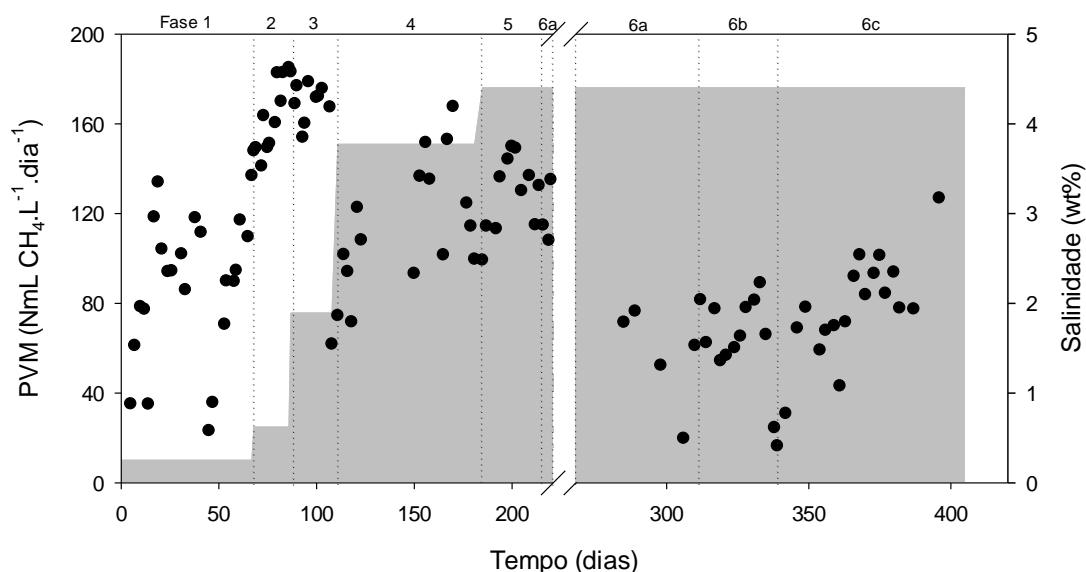
A hipótese da predominância da via hidrogenotrófica, em detrimento da acetoclástica também é baseada na porcentagem de  $\text{CH}_4$  e  $\text{CO}_2$  no biogás produzido (Figura 5.11). No caso de falha do processo metanogênico de forma geral, a fração de metano tende a diminuir no biogás produzido, com o concomitante aumento da fração de dióxido de carbono. Isso porque, primeiramente, o  $\text{CO}_2$  produzido via acidogênese, nesse cenário, não seria consumido via metanogênese. Além disso, o acúmulo de ácidos provenientes da etapa acidogênica resultaria no consumo da alcalinidade a bicarbonato no reator, deslocando o equilíbrio do ácido carbônico no sentido dos produtos  $\text{H}_2$  e  $\text{CO}_2$  e aumentando a disponibilidade de  $\text{CO}_2$  no meio. Assim, como não houve aumento significativo da porcentagem de dióxido de carbono no biogás na fase 6b, em relação às fases anteriores, apesar da redução da eficiência e do pH, os microrganismos metanogênicos hidrogenotróficos possivelmente utilizaram o  $\text{CO}_2$  para produção de metano. A porcentagem de metano na fase 6c, no entanto, foi diferente significativamente das demais fases de operação, com exceção da fase 4. A redução de  $\text{CH}_4$  no biogás pode ser associado à baixa recuperação da atividade metanogênica no reator após a redução da adição de alcalinizante. Como descrito anteriormente, apesar de impostas condições de operação na fase 6c idênticas às da fase 5 (PO e adição de álcali), o sistema não retomou o desempenho em termos de remoção de matéria orgânica. O mesmo ocorreu para a produção de metano, o que foi evidenciado pela reduzida fração de metano no biogás.

**Figura 5.11:** Frações (%) de CH<sub>4</sub> (■) e CO<sub>2</sub> (□) no biogás produzido no reator anaeróbio ao longo do período de operação. Área cinza representa a salinidade (wt%).



Em relação à produção volumétrica de metano (PVM) (Figura 5.12), foi observada diminuição significativa associada à redução da eficiência de remoção de DQO, a partir da fase 4, confirmando a inibição da metanogênese pela salinidade. De Vrieze et al. (2012) reportaram que elevadas concentrações de sais resultam em produção de metano instável, devido à elevada susceptibilidade da comunidade metanogênica à elevada salinidade. Após a repartida do reator, na fase 6a, a produção de metano registrada foi significativamente inferior à das fases anteriores. Esse comportamento é coerente com o declínio do processo metanogênico após a redução da alcalinidade afluente. Assim como para o parâmetro de remoção de DQO, também foi observado aumento da PVM do reator na fase 6c, com a retomada da concentração de álcali afluente de  $0,4\text{g NaHCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ . Porém não houve recuperação total do desempenho, em comparação à produção de metano apresentada na fase 5.

**Figura 5.12:** Produção volumétrica de metano (●) do reator anaeróbico ao longo do período de operação. Área cinza representa a salinidade (wt%).



### 5.2.2 Análises da comunidade microbiana

A diversidade e riqueza das comunidades microbianas das amostras de biomassa suspensa e aderida coletadas nas fases 1 e 6c de operação do reator anaeróbico foram avaliadas. O consórcio microbiano foi avaliado por meio dos índices de diversidade e indicador de riqueza apresentados na Tabela 5.6. Enquanto o índice de Shannon representa a diversidade, o índice de Chao 1 indica a riqueza microbiana.

**Tabela 5.6:** Índices de diversidade e indicador de riqueza microbiana obtidos por meio dos resultados do sequenciamento Illumina para as amostras das fases 1 e 6c do reator anaeróbico.

Fase de operação	Especificação da amostra	PO (atm)	Salinidade (wt%)	Chao1	Shannon <sup>a</sup>	Sequências
1	BS	1,5	0,25	62	2,79	27.233
	BA			57	2,97	24.546
6c	BS	21	4,40	42	2,45	28.628
	BA			62	2,93	32.116

PO: Pressão Osmótica; BS: Biomassa Suspensa; BA: Biomassa Aderida; <sup>a</sup>: Maior índice de Shannon representa maior diversidade.

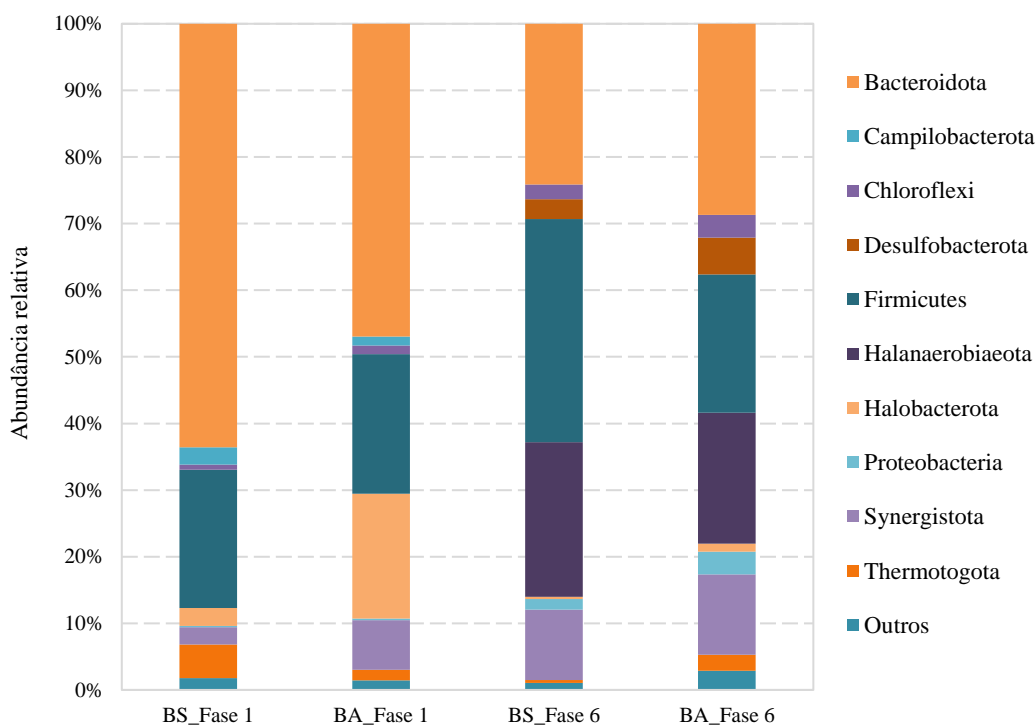
Dentre as amostras de biomassa suspensa e aderida, foi observada maior diversidade microbiana na BA, em relação à BS, para ambas as fases, evidenciado pelos maiores índices de Shannon nas amostras de BA, o que também foi reportado por Zhang et al. (2011), em estudo

do tratamento de melação em reator anaeróbio de leito fixo. Ademais, o aumento da salinidade resultou na redução acentuada da riqueza e diversidade da comunidade microbiana suspensa e no aumento da riqueza microbiana no material suporte, considerando os valores dos índices de Shannon e Chao1 para cada amostra.

Um total de 19 filos (Figura 5.13) dentre os domínios Bacteria (17) e Archaea (2) foi observado nas amostras analisadas do reator anaeróbio. Dentre eles, os filos Bacteroidota (24,1-63,6%), Firmicutes (20,8-33,5%), Halanaerobiaeota (0,0-23,2%), Halobacterota (0,3-18,7%) e Synergistota (2,6-12,1%) foram os de maior abundância relativa, representando pelo menos 82% das seqüências extraídas de cada amostra. As principais ordens (Figura 5.14) identificadas nas amostras sequenciadas foram Bacteriodales (24,1-62,3%), Exiguobacterales (0,0-22,9%), Peptostreptococcales-Tissierellales (5,0-13,7%), Halanaerobiales (0,0-23,2%), Methanomicrobiales (0,1-10,4%), Methanosarciniales (0,0-8,3%) e Synergistales (2,6-12,1%) representando pelo menos 78% das seqüências extraídas de cada amostra.

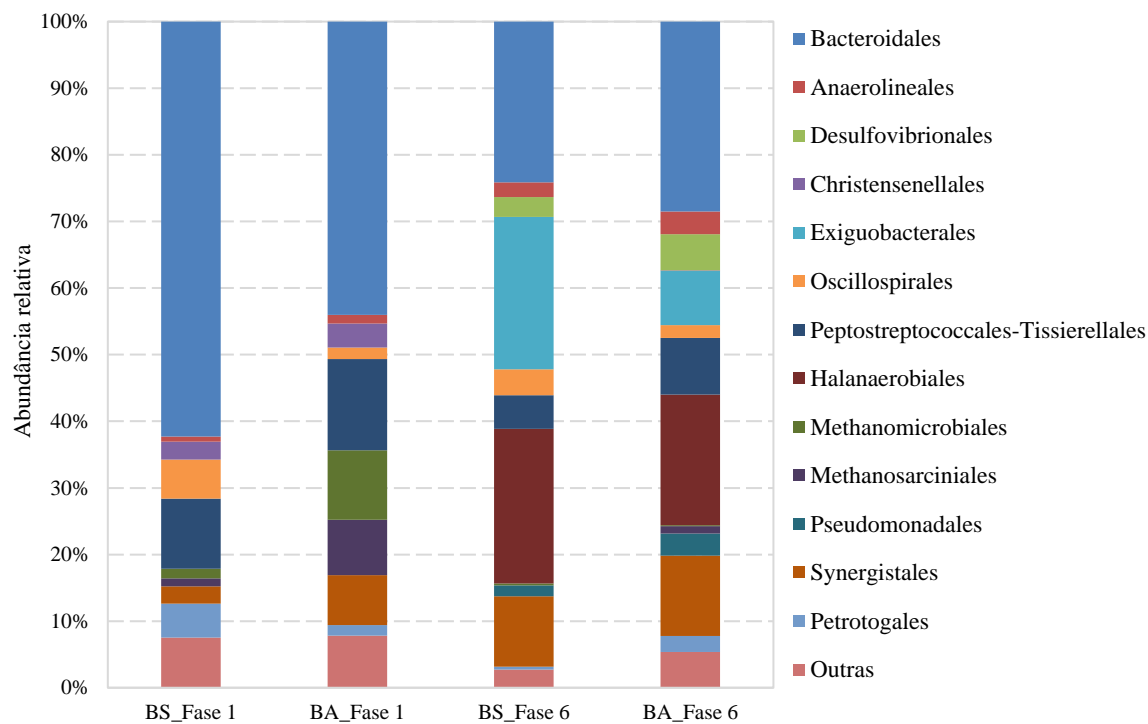
**Figura 5.13:** Composição taxonômica das comunidades microbianas nos filos no reator anaeróbio. Identificação das amostras: Biomassa Suspensa (BS) ou Aderida (BA)\_Fase de operação do reator.

Para possibilitar a visualização dos dados, estão apresentados os filos com mais de 1,5% de abundância relativa (em pelo menos uma amostra). Os demais foram incluídos no grupo “Outros”.



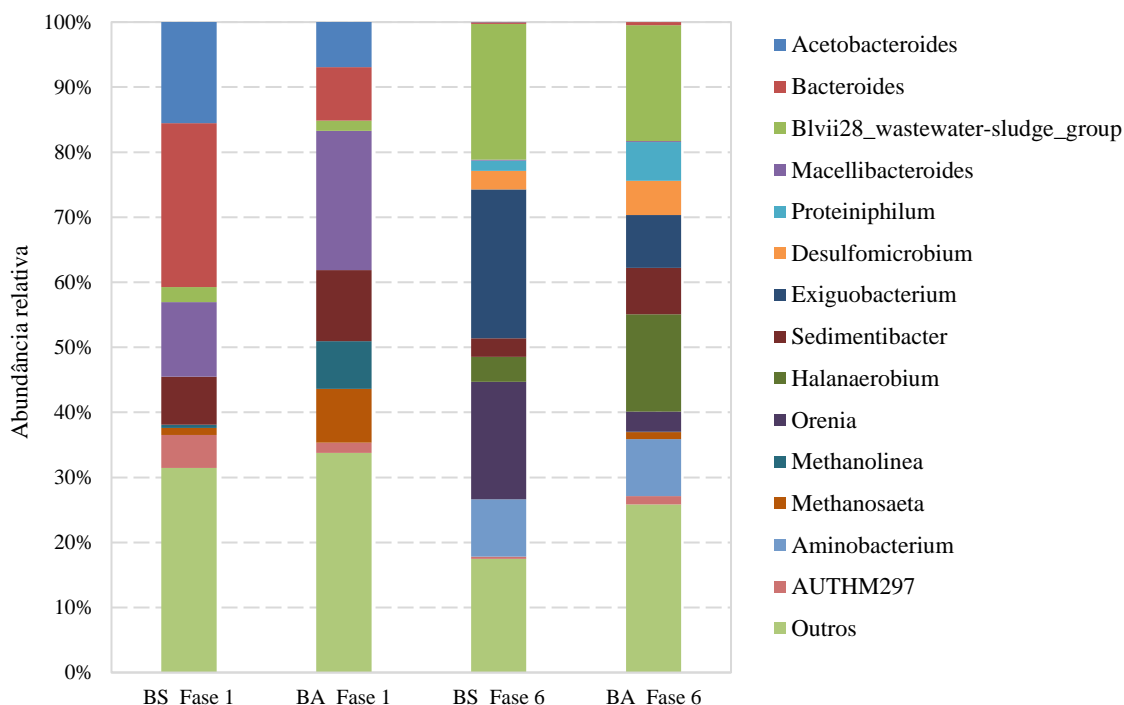
**Figura 5.14:** Composição taxonômica das comunidades microbianas nas ordens no reator anaeróbio. Identificação das amostras: Biomassa Suspensa (BS) ou Aderida (BA)\_Fase de operação do reator.

Para possibilitar a visualização dos dados, estão apresentadas as ordens com mais de 3,0% de abundância relativa (em pelo menos uma amostra). As demais foram incluídas no grupo “Outras”.



Os principais gêneros encontrados nas amostras sequenciadas do reator anaeróbio estão apresentados na Figura 5.15. Os gêneros de maior abundância relativa foram *Acetobacteroides* (0,0-15,5%), *Bacteroides* (0,3-25,2%), *Blvii28\_wastewater-sludge\_group* (1,6-20,8%), *Macellibacteroides* (0,2-21,4%), *Exiguobacterium* (0,0-22,9%), *Halanaerobium* (0,0-14,9%), *Orenia* (0,0-18,0%), *Methanolinea* (0,0-7,3%), *Methanosaeta* (0,0-8,3%) e *Aminobacterium* (0,0-8,8%), representando pelo menos 66% das sequências extraídas de cada amostra.

**Figura 5.15:** Composição taxonômica das comunidades microbianas nos gêneros no reator anaeróbio. Identificação das amostras: Biomassa Suspensa (BS) ou Aderida (BA)\_Fase de operação do reator. Para possibilitar a visualização dos dados, estão apresentados os gêneros com mais de 5,0% de abundância relativa (em pelo menos uma amostra). Os demais foram incluídos no grupo “Outros”.



O filo Firmicutes foi favorecido na presença de sais, com aumento da abundância relativa na BS (de 20,8 para 33,5%) e sem alteração na BA (de 21,0 para 20,8%), após incremento da salinidade. A maior presença desse filo com o aumento da PO também foi observada nos ensaios em batelada e corrobora resultados encontrados na literatura, conforme anteriormente discutido no item 5.1.3. O gênero *Exiguobacterium*, o qual não foi identificado nas amostras da fase 1, foi o de maior abundância relativa do filo Firmicutes, nas amostras da fase 6c (BS: 22,9%; BA: 8,1%). Microrganismos desse gênero são capazes de tolerar salinidade de até 10 wt% (NaCl) e podem realizar diversas reações, incluindo hidrólise de amido e produção de ácidos a partir de vários compostos, como glicose, frutose e sacarose (KIM et al., 2005).

O filo Synergistota apresentou aumento na abundância relativa de 2,6 e 7,5% em BS e BA, respectivamente, para 10,6 e 12,1%. Membros desse filo incluem bactérias fermentativas capazes de metabolizar aminoácidos e proteínas a compostos orgânicos mais simples de forma eficiente, fornecendo substrato (acetato e H<sub>2</sub>) para as AM (NELSON et al., 2011). Zhang et al (2020) também observaram favorecimento desse filo com o aumento da salinidade (NaCl) a até 1,6 wt%, e Zhang et al. (2022) reportaram o mesmo comportamento para salinidade de até 8,5

wt% (NaCl). A ordem de maior abundância desse filo foi a Synergistales, a qual compreende bactérias que podem degradar aminoácidos para produção de acetato (WANG et al., 2017b).

Microrganismos do filo Halanaerobiaeota, ordem Halanaerobiales, que não foram identificados nas amostras da fase 1, apresentaram elevadas abundâncias relativas nas amostras do final do experimento (BS: 23,2% e BA: 19,6%). Dessa ordem, o gênero *Orenia*, da família Halobacteroidaceae, foi o de maior abundância relativa na amostra de biomassa suspensa (18,0%), e o gênero *Halanaerobium*, da classe *Halanaerobiaceae*, na biomassa aderida do reator (14,9%). Além desses, o gênero *Halocella*, também da classe *Halanaerobiaceae*, foi identificado nas amostras, em menor abundância relativa (BS: 1,3%; BA: 1,6%).

Os gêneros *Halanaerobium* e *Orenia* abrangem bactérias fermentativas halofílicas anaeróbias estritas, que apresentam metabolismo quimiorganotrófico e atuam na fermentação de matéria orgânica complexa, como carboidratos, proteínas, açúcares e aminoácidos, produzindo metabólitos intermediários para outros grupos, como as arqueas metanogênicas e bactérias redutoras de sulfato (ZEIKUS et al., 1983; RAINEY et al., 1985). O gênero *Halanaerobium* foi primeiramente descrito e isolado por Zeikus et al. (1983), a partir de sedimento hipersalino. O aumento da abundância relativa desse gênero com o incremento de salinidade também foi descrito por Jeddi et al. (2020), que operaram reator anaeróbico de leito fixo estruturado para o tratamento de efluente salino de fábrica de atum. Os autores observaram maior presença das bactérias fermentativas halofílicas do gênero *Halanaerobium* após o acúmulo de ácidos orgânicos voláteis no meio com o aumento simultâneo da salinidade e da carga orgânica afluentes.

O sequenciamento das amostras do final do experimento (PO = 21 atm) mostra que a população de arqueas metanogênicas do filo Halobacterota, que antes representavam 2,7 e 18,7% das biomassas suspensa e aderida, respectivamente, foi severamente inibida pela salinidade (BS: 0,3% e BA: 1,2%). Em contrapartida, arqueas do filo Euryarcheota, que também abrange microrganismos metanogênicos, apresentou aumento de 0,3% na fase 1 para 1,0% na fase 6, nas amostras de biomassa aderida. Nas amostras de biomassa suspensa, foi observada redução desse filo de 0,8 para 0,4%. A redução, de forma geral, na população de AM está associada ao declínio da produção de metano na fase 6c, como discutido em 5.2.1.

As ordens relacionadas às arqueas metanogênicas identificadas nas amostras sequenciadas foram Methanobacteriales, Methanofastidiosales, Methanomicrobiales e Methanosarcinales. As maiores abundâncias relativas de gêneros de arqueas metanogênicas foram observadas nas amostras de biomassa aderida, para ambas as fases, como também reportado por Zhang et al. (2011). A Tabela 5.7 apresenta os principais gêneros identificados e



respectivas abundâncias relativas. A salinidade afetou de forma acentuada a população dos microrganismos associados à metanogênese, o que explica a menor eficiência de remoção de DQO e menor produção de metano nas fases 5 e 6 (PO de 21 atm).

**Tabela 5.7:** Abundâncias relativas (%) dos gêneros associados à metanogênese nas amostras de biomassa suspensa e aderida das fases 1 e 6 de operação do reator anaeróbio.

Ordem	Gênero	Fase 1 (1,7 atm)		Fase 6 (21 atm)	
		Suspensa	Aderida	Suspensa	Aderida
Methanosarcinales	<i>Methanosaeta</i>	1,1	8,3	0,0	1,1
Methanobacteriales	<i>Methanobacterium</i>	0,6	0,3	0,4	1,0
Methanomicrobiales	<i>Methanolinea</i>	0,5	7,3	0,0	0,1
	<i>Methanoregula</i>	0,3	2,5	0,0	0,0
	<i>Methanospirillum</i>	0,7	0,6	0,0	0,0
	<i>Methanofollis</i>	0,0	0,0	0,3	0,1

Na fase 1, os gêneros dominantes de arqueas metanogênicas foram *Methanosaeta* e *Methanolinea*, que realizam a metanogênese acetoclástica e hidrogenotrófica, respectivamente (ZHANG et al., 2019). Apesar da redução na população de *Methanosaeta* na fase 6, as arqueas desse gênero ainda foram identificadas como um dos principais grupos relacionados à metanogênese à PO de 21 atm. A dominância desse gênero na comunidade microbiana metanogênica em meio salino foi reportada por Zhang et al. (2020a) e Zhang et al. (2022).

Arqueas do gênero *Methanolinea* apresentaram elevada sensibilidade ao aumento da salinidade, o que resultou na redução acentuada dessa população ao final do experimento. Com o aumento da pressão osmótica a 21 atm (fase 6), o gênero *Methanobacterium*, também de arqueas metanogênicas hidrogenotróficas, assumiu a dominância desse grupo, o que indica que a salinidade favoreceu esses microrganismos, em detrimento do gênero *Methanolinea*, para a realização dessa rota metabólica. Em estudo realizado por Liu et al. (2017), também foi observado o aumento da abundância relativa de *Methanobacterium* com o aumento da salinidade ( $MgCl_2$ ), e redução das populações de *Methanospirillum* e *Methanoregula*. A dominância do gênero *Methanobacterium* em meio salino foi atribuída à redução do pH no meio, o qual também foi observado no presente estudo.

Assim como o gênero *Methanolinea*, o *Methanoregula* também compreende arqueas metanogênicas hidrogenotróficas (ambos membros da família *Methanoregulaceae*) (ZHANG et al., 2019) e foi observado nas amostras da fase 1 em abundância relativa de 2,5% (BA) e 0,3% (BS). No entanto, nas amostras da fase 6 não foi identificada a presença desse gênero, ao que se deve provavelmente ao aumento da salinidade. Dessa forma, observou-se elevada

sensibilidade dos membros da família *Methanoregulaceae* à salinidade por eletrólitos mistos aplicada no presente estudo, os quais praticamente desapareceram do sistema à pressão osmótica de 21 atm.

Ao contabilizar todos os gêneros de arqueas metanogênicas identificadas nas amostras, observa-se que aquelas que realizam a via acetoclástica corresponderam a 42 e 37% da população metanogênica das fases 1 e 6, respectivamente, e as hidrogenotróficas corresponderam a 58 e 63% da comunidade metanogênica no reator nas fases 1 e 6, respectivamente. Essa diferença pode reforçar a hipótese de que a rota metabólica da metanogênese hidrogenotrófica foi favorecida durante a fase 6, com a redução da alcalinidade afluyente, discutida no item 5.2.1.

### 5.3 REATOR CONTÍNUO ANAMMOX

O processo anammox foi avaliado em relação ao desempenho na remoção de nitrogênio (item 5.3.1) e à composição da comunidade microbiana (item 5.3.2), em resposta a variações na concentração de substratos, na salinidade e na concentração de matéria orgânica afluentes.

#### 5.3.1 Desempenho do reator Anammox

##### ETAPA 1: Adaptação da biomassa à baixa concentração de N

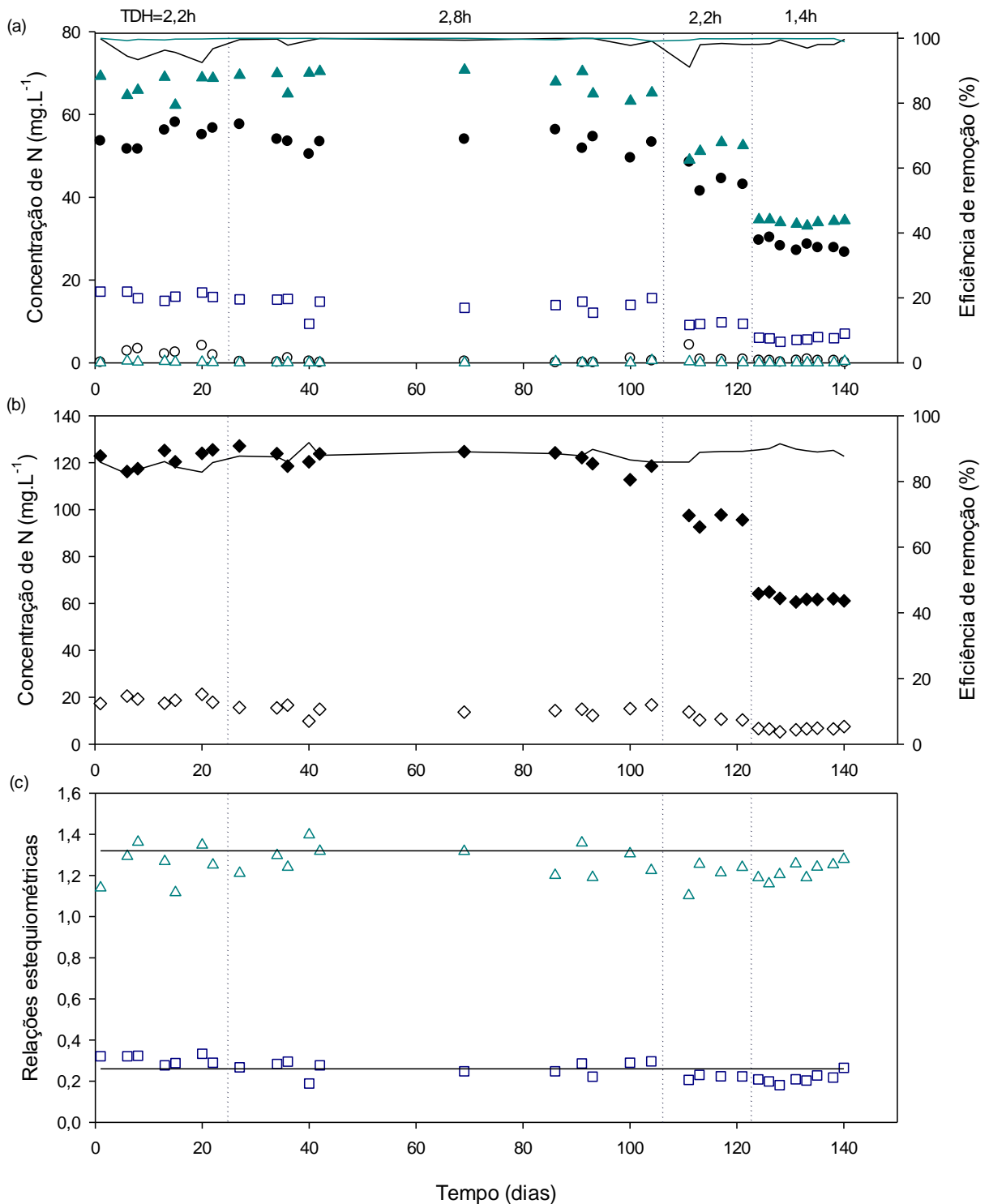
A etapa 1 de operação do reator anammox foi realizada com o objetivo de adaptar a biomassa de inóculo, cultivada em meio com elevada concentração de nitrogênio, a condições de baixas concentrações afluentes de substratos. Para isso, além da diminuição gradual das concentrações afluentes de amônia e nitrito do meio de cultivo do inóculo, foi reduzido também o TDH de operação, para que fosse mantida, assim, a carga nitrogenada volumétrica aplicada ao reator. Segundo Cheng et al. (2020), essa estratégia é importante para retardar o decaimento dos grânulos anammox devido à escassez de substrato (*starvation*) com a transição para o tratamento em *mainstream*.

As variações da vazão e, conseqüentemente, do TDH, além das alterações das concentrações afluentes de substrato (nitrito e amônia) não afetaram o desempenho do reator anammox (Tabela 5.8). Após a redução para 25% da concentração de N afluente (fase 4), em relação à concentração afluente do reator de cultivo ( $232 \text{ mgN.L}^{-1}$ ), em nenhum momento da operação foi observado acúmulo de N-nitrito ou N-amônia no efluente do reator anammox (Figura 5.16a). As eficiências de remoção médias de N-nitrito e N-amoniaco na última fase foram de  $99,7 \pm 0,4\%$  e  $98,1 \pm 1,0\%$ , respectivamente (Figura 5.16b), e a remoção média de N-total na foi de  $89,1 \pm 0,8\%$ , que equivale à remoção máxima teórica do processo, tendo em vista a produção de nitrato inerente ao processo (11%). Além disso, as médias das relações estequiométricas  $\text{N-NO}_2^-/\text{N-NH}_4^+$ , referente ao nitrito e amônia consumidos (1,24-1,42), e  $\text{N-NO}_3^-/\text{N-NH}_4^+$ , referente ao nitrato produzido e amônia consumida (0,22-0,31), permaneceram próximas às razões teóricas da reação anammox, de 1,32 e 0,26, respectivamente (Figura 5.16c) (STROUS et al., 1998).

**Tabela 5.8:** Resumo dos principais parâmetros de monitoramento obtidos durante a Etapa 1 de operação do reator anammox. Média (desvio padrão).

<b>Parâmetros</b>		Fase 1	Fase 2	Fase 3	Fase 4
<b>pH</b>	<b>Afluente</b>	7,3 (0,4)	6,8 (0,1)	7,0 (0,1)	6,9 (0,1)
	<b>Efluente</b>	8,2 (0,3)	7,9 (0,1)	7,9 (0,0)	7,8 (0,1)
<b>N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Afluente</b>	55,5 (2,5)	48,3 (9,1)	43,0 (1,5)	27,6 (0,7)
	<b>Efluente</b>	2,8 (1,0)	0,4 (0,5)	0,8 (0,1)	0,5 (0,3)
<b>N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Afluente</b>	67,0 (2,9)	65,9 (2,7)	52,3 (1,1)	33,8 (0,5)
	<b>Efluente</b>	0,2 (0,1)	0,2 (0,2)	0,1 (0,0)	0,1 (0,1)
<b>N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Efluente</b>	15,9 (0,7)	14,1 (1,3)	9,4 (0,3)	1,2 (0,0)
<b>N total (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Afluente</b>	122,5 (3,5)	114,2 (9,8)	95,3 (2,3)	61,4 (0,6)
	<b>Efluente</b>	18,9 (1,5)	13,7 (2,9)	10,4 (0,2)	6,7 (0,5)
<b>CNV (kg N.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>)</b>	<b>Aplicada</b>	1,36 (0,04)	1,05 (0,04)	1,05 (0,03)	1,02 (0,02)
	<b>Removida</b>	1,15 (0,05)	0,92 (0,04)	0,93 (0,02)	0,90 (0,02)
<b>Eficiência de remoção (%)</b>	<b>N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	94,9 (1,9)	99,3 (0,9)	98,1 (0,2)	98,1 (1,0)
	<b>N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	99,7 (0,1)	99,7 (0,4)	99,8 (0,0)	99,7 (0,4)
	<b>N total</b>	84,5 (1,4)	88,1 (1,9)	89,1 (0,2)	89,1 (0,8)
<b>Relações estequiométricas</b>	<b>N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> /N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	1,27 (0,10)	1,42 (0,34)	1,24 (0,02)	1,24 (0,03)
	<b>N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> /N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	0,31 (0,03)	0,28 (0,03)	0,23 (0,00)	0,22 (0,02)

CNV: Carga Nitrogenada Volumétrica.



**Figura 5.16:** Desempenho do reator anammox na Etapa 1. (a) Concentrações afluentes de N-amônia (●) e N-nitrito (▲); concentrações efluentes de N-amônia (○), N-nitrito (Δ) e N-nitrato (□); e eficiência de remoção (—) de N-amônia (em preto) e N-nitrito (em verde); (b) Concentrações afluente (◆) e efluente (◇) e eficiência de remoção (—) de N total; (c) Relações estequiométricas de consumo de N-nitrito (Δ) ( $\text{N-NO}_2^-/\text{N-NH}_4^+$ ) e produção de N-nitrato (□) ( $\text{N-NO}_3^-/\text{N-NH}_4^+$ ) e relações estequiométricas teóricas (—) de 1,32 e 0,26.

A eficiência de remoção de N total média ( $89,1 \pm 0,8\%$ ) da última fase dessa etapa foi superior à do reator do qual foi coletada a biomassa para inóculo no presente estudo ( $84,3 \pm 3,0\%$ ), apesar das alterações das condições de cultivo promovidas: redução da concentração de substrato ( $232 \rightarrow 60 \text{ mg.L}^{-1}$ ), da temperatura ( $37 \rightarrow 30^\circ\text{C}$ ) e do TDH ( $3,5 \rightarrow 1,4\text{h}$ ). Isso indica que a biomassa apresentou adaptação satisfatória às novas condições impostas.

Cheng et al. (2020) também inocularam reator anammox para operação em condições de *mainstream* (30 e 40 mg N.L<sup>-1</sup> de amônia e nitrito, respectivamente) com biomassa de sistema operado em *sidestream* (280 mg N.L<sup>-1</sup> de amônia e nitrito). Os autores adotaram TDH de 1,4h e temperatura de 35°C e reportaram elevada eficiência de remoção de N total desde os primeiros dias de operação. Ainda, após a redução da temperatura para 25°C, os autores observaram o aumento da eficiência de remoção de N total via anammox, de 82% para 89%, e a diminuição do TDH para 0,23h não afetou negativamente sobre o processo. A mesma estratégia de inoculação de reator anammox em *mainstream* foi empregada por Yuan et al. (2022), que adotaram as condições de 35°C e TDH de 2h para operação. Após um período de estabilidade de 10 dias, os autores obtiveram remoção de N total de 89%, tratando efluente sintético com 31 e 35 mg N.L<sup>-1</sup> de amônia e nitrito, respectivamente.

Na etapa 1, foi possível observar elevada remoção de nitrogênio em reator anammox operado com TDH de 1,4 horas, resultando na carga de nitrogênio volumétrica removida de 0,9 kg N.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>. Segundo Azevedo et al. (2021), um dos desafios para a aplicação do processo anammox em *mainstream* é a baixa concentração de substrato presente nos efluentes sanitários, (35-50 mg.L<sup>-1</sup> na forma de amônia), devido ao crescimento lento dos microrganismos responsáveis pelo processo. Os resultados obtidos no presente estudo, no entanto, demonstraram a viabilidade da estratégia de redução gradativa das concentrações de N total afluente ( $120 \rightarrow 60 \text{ mg.L}^{-1}$ ), com a manutenção da CNVA, sem prejuízo ao processo anammox.

Agrawal et al. (2018) afirmam que a elevada carga hidráulica frequentemente observada em sistemas de tratamento em *mainstream*, o que implica em TDH reduzidos, pode ser um obstáculo para a implantação do processo anammox no fluxo principal das ETEs. Além disso, os autores sugerem que a utilização de um baixo TDH para esse processo pode dificultar a retenção dos microrganismos anammox e prejudicar o desempenho da remoção de nitrogênio. No entanto, a utilização de curtos tempos de detenção hidráulica (1,4h) não implicou em redução da eficiência da oxidação anaeróbia da amônia.

Outro possível entrave do emprego da via anammox para *mainstream* apontado na literatura (QIU et al., 2020) é a temperatura mais baixa normalmente observada no fluxo principal, em relação ao *sidestream* nas ETEs. Entretanto, no presente trabalho, a redução da

temperatura de 37 °C (reator de cultivo do qual foi retirada a biomassa de inóculo) para 30 °C, próxima às observadas em estudos em regiões de clima quente (XU et al., 2012; PAULA, 2018; ALVES, 2019; AZEVEDO, 2022), não afetou negativamente a atividade anammox. Isso indica que, para essas regiões, a aplicação do processo anammox no fluxo principal da linha de tratamento (temperaturas moderadas e baixas concentrações de substrato) pode ser uma alternativa para RBN.

O sucesso da inoculação do reator em *mainstream* com grânulos anammox maduros, retirados de reator tratando efluente com características de *sidestream* foi demonstrado. A redução do tempo de partida de reatores anammox pelo emprego de biomassa de inóculo contendo microrganismos anammox já foi relatado na literatura (NI et al., 2013; WETT et al., 2015; CHENG et al., 2020; ZHANG et al., 2020b). Segundo Cheng et al. (2020), a inoculação de reatores anammox em *mainstream* em escala plena com biomassa anammox retirada de reatores anammox em *sidestream* é, inclusive, essencial para o êxito do processo.

Wett et al. (2015) avaliou, ainda, o efeito da retirada de lodo de reator anammox de escala plena em *sidestream* para emprego em reator em *mainstream*, simulando o procedimento que pode ser realizado para a implantação de reatores em fluxo principal de escala plena. Os autores concluíram que não houve prejuízo ao reator de onde o inóculo foi retirado. Há alguns anos, o emprego de biomassa anammox como inóculo para a partida de reatores era impraticável, devido à pequena quantidade de estações de tratamento com aplicação do processo anammox. Atualmente, com mais de 140 ETEs em escala plena operando com o emprego dessa via para a RBN, além do desenvolvimento avançado de técnicas moleculares para identificação desses microrganismos, o emprego de lodo com atividade anammox se torna uma alternativa mais acessível (NI et al., 2013; LIU et al., 2020).

## ETAPA 2: Adaptação da biomassa à salinidade e aplicação de efluente anaeróbio salino

O desempenho do reator anammox sob aumento gradual da salinidade foi avaliado nas fases 1 a 8b (Tabela 5.9), sob TDH de  $1,46 \pm 0,03$  horas. Entre as etapas 1 e 2 do experimento, a operação do reator anammox foi interrompida por 62 dias, com preservação (por adição de  $\text{NaNO}_3$ ) e refrigeração da biomassa. Por isso, na primeira fase da etapa 2, o reator foi alimentado com meio sintético sem adição de sais, nas mesmas condições da última fase da etapa 1. Assim, a atividade da biomassa foi avaliada após o período em que permaneceu refrigerada em solução de preservação. A suspensão da operação do reator por até 62 dias não afetou negativamente o processo anammox, visto que, após apenas 6 dias de operação, as eficiências de remoção de amônia e nitrito observadas foram de 96% e 99%, respectivamente (Figura 5.17). Ao final da fase 1, a média de remoção observada de N total foi de  $89,2 \pm 1,0$  %, similar à eficiência média obtida na fase 4 da etapa 1.

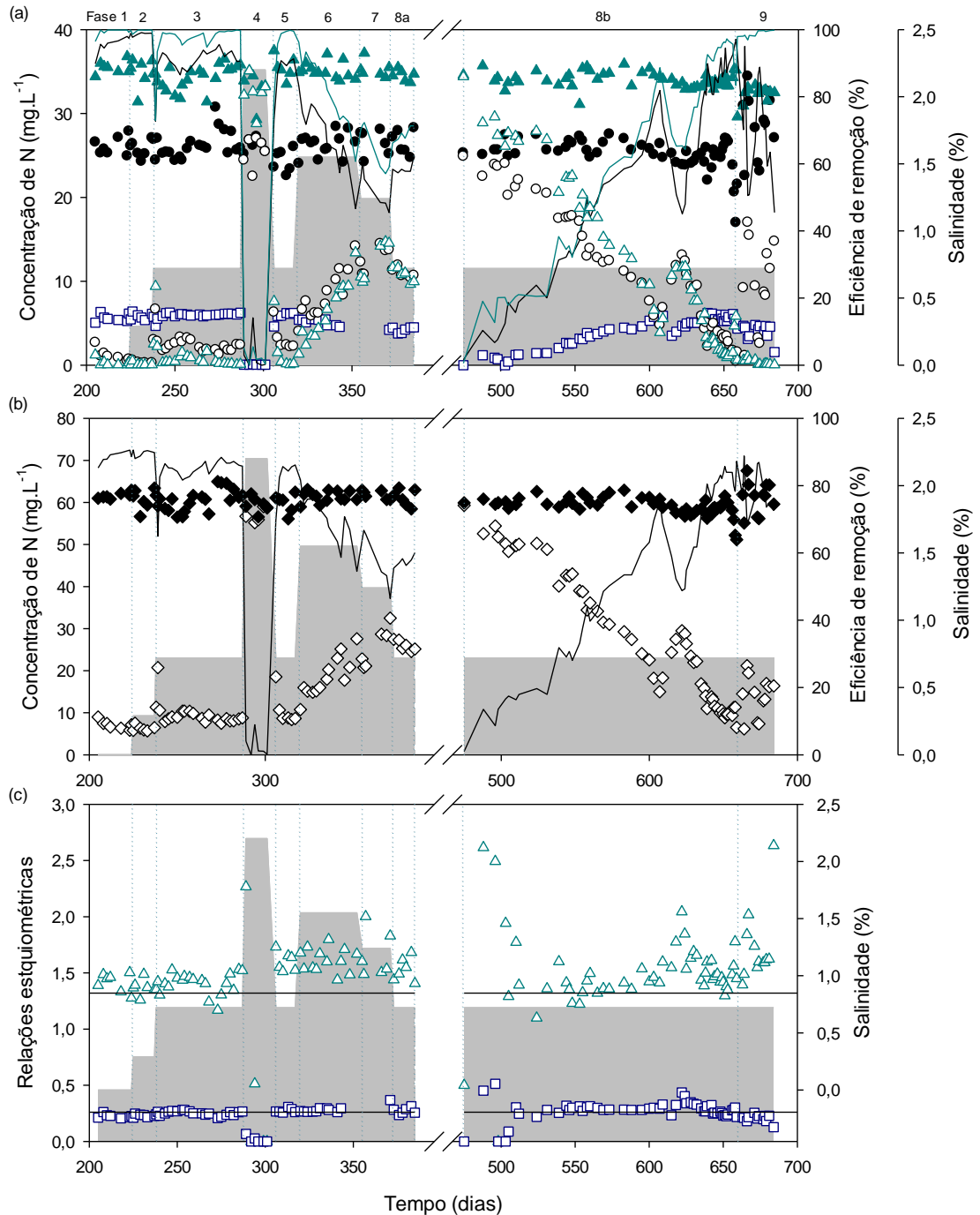
Segundo Chen e Jin (2017), o uso de biomassa adequada para o inóculo de reatores anammox é um fator crucial para garantir a rápida partida das unidades de tratamento. Assim, o desenvolvimento de métodos otimizados de armazenamento e transporte de biomassa pode resultar em economia significativa de tempo e recursos. No entanto, o cultivo e armazenamento de biomassa ativa em escala industrial ou mesmo laboratorial é difícil. Assim, o uso de biomassa preservada como fonte de inóculo é uma alternativa possível e promissora para o rápido estabelecimento do processo anammox (CHEN; JIN, 2017; BOLSAN et al., 2023). Recentemente, várias técnicas de preservação têm sido estudadas para o armazenamento dos microrganismos anammox, como congelamento ( $-200$  a  $-20$  °C), liofilização e refrigeração. À temperatura de 4 °C, a preservação de biomassa anammox em solução de nitrato de sódio durante três (BOLSAN et al., 2023) e quatro meses (ROTHROCK et al., 2011) resultou em sucesso na reativação. No presente trabalho, também foi possível reativar biomassa preservada por 2 meses com essa mesma técnica, porém no curto período de 6 dias. Os resultados aqui obtidos reforçam a eficiência da estratégia de preservação com nitrato de sódio a 4 °C para rápida reativação de biomassa anammox e contribuem para a redução do tempo de partida de reatores em maiores escalas empregando inóculo anammox preservado.



**Tabela 5.9:** Resumo dos principais parâmetros de monitoramento obtidos durante a Etapa 2 de operação do reator anammox. Média (desvio padrão).

Parâmetros		Fases de operação e respectivas pressões osmóticas									
		1	2	3	4	5	6	7	8a <sup>a</sup>	8b	9*
		0atm	1,7atm	4atm	11atm	4atm	7atm	5,5atm	4atm	4atm	4atm
<b>pH</b>	<b>Afluente</b>	7,0 (0,3)	6,9 (0,1)	6,7 (0,1)	6,6 (0,1)	6,7 (0,1)	6,7 (0,1)	6,8 (0,1)	6,7 (0,1)	6,8 (0,1)	6,8 (0,1)
	<b>Efluente</b>	7,4 (0,1)	7,4 (0,1)	7,2 (0,1)	7,0 (0,2)	7,3 (0,1)	7,1 (0,1)	7,2 (0,1)	7,2 (0,0)	7,3 (0,2)	7,3 (0,2)
<b>N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Afluente</b>	26,2 (1,3)	25,7 (1,1)	27,5 (2,2)	26,5 (0,7)	24,5 (1,5)	26,9 (1,7)	26,3 (1,6)	26,5 (1,6)	26,1 (1,3)	29,9 (2,2)
	<b>Efluente</b>	0,9 (0,3)	0,3 (0,1)	1,7 (0,3)	25,7 (1,9)	2,5 (0,4)	11,1 (2,1)	12,7 (1,7)	10,9 (0,6)	2,5 (0,9)	11,3 (2,8)
<b>N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Afluente</b>	35,6 (0,7)	34,8 (2,1)	34,3 (1,7)	33,1 (2,3)	35,1 (1,1)	34,7 (1,1)	35,3 (1,1)	34,6 (0,8)	33,8 (0,6)	32,4 (0,5)
	<b>Efluente</b>	0,2 (0,2)	0,1 (0,2)	0,6 (0,6)	32,4 (2,3)	0,5 (0,6)	9,9 (2,1)	12,7 (2,4)	10,6 (0,8)	1,2 (0,2)	0,1 (0,1)
<b>N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Efluente</b>	5,6 (0,3)	5,9 (0,4)	6,1 (0,1)	0,1 (0,0)	6,1 (0,2)	4,9 (0,4)	NA	4,2 (0,3)	5,7 (0,4)	3,7 (1,3)
<b>N total (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Afluente</b>	61,8 (0,8)	60,5 (2,7)	61,8 (3,2)	59,5 (2,0)	59,6 (2,5)	61,5 (1,1)	61,5 (1,1)	61,0 (2,2)	60,0 (1,2)	62,3 (1,9)
	<b>Efluente</b>	6,7 (0,6)	6,4 (0,7)	8,3 (0,8)	58,2 (2,7)	9,0 (0,9)	22,9 (3,8)	26,3 (5,2)	25,7 (1,0)	9,4 (0,4)	15,1 (1,9)
<b>DQO (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Afluente</b>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	53,2 (7,3)
	<b>Efluente</b>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	17,2 (3,6)
<b>CNV (kg N.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>)</b>	<b>Aplicada</b>	1,02 (0,01)	1,00 (0,05)	1,02 (0,03)	0,98 (0,03)	0,99 (0,04)	1,01 (0,02)	1,01 (0,02)	1,00 (0,04)	0,98 (0,02)	1,02 (0,03)
	<b>Removida</b>	0,91 (0,01)	0,90 (0,05)	0,88 (0,03)	0,02 (0,04)	0,84 (0,04)	0,64 (0,07)	0,58 (0,09)	0,58 (0,03)	0,89 (0,02)	0,77 (0,04)
<b>Eficiência de remoção (%)</b>	<b>N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	96,5 (1,4)	98,7 (0,6)	93,7 (1,4)	3,0 (6,2)	89,8 (1,7)	58,7 (7,5)	51,7 (6,2)	58,7 (2,0)	90,3 (3,2)	61,9 (10,4)
	<b>N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	99,6 (0,4)	99,6 (0,6)	98,1 (1,9)	1,9 (2,2)	98,7 (1,7)	71,4 (6,2)	63,8 (7,5)	69,4 (1,9)	96,4 (0,6)	99,7 (0,2)
	<b>N total</b>	89,2 (1,0)	89,5 (1,0)	86,5 (1,9)	2,3 (3,8)	84,9 (1,5)	62,8 (6,4)	57,3 (8,7)	57,9 (1,5)	84,3 (0,8)	75,7 (3,0)
	<b>DQO</b>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	67,1 (8,3)
<b>DQO/N</b>	<b>Afluente</b>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,86 (0,14)
<b>Relações estequiométricas</b>	<b>N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> /N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	1,40 (0,10)	1,37 (0,08)	1,31 (0,11)	0,10 (0,23)	1,58 (0,07)	1,58 (0,12)	1,67 (0,23)	1,55 (0,11)	1,39 (0,07)	1,81 (0,46)
	<b>N- NO<sub>3</sub><sup>-</sup> /N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	0,22 (0,01)	0,23 (0,01)	0,23 (0,02)	0,01 (0,01)	0,28 (0,02)	0,28 (0,02)	NA	0,27 (0,03)	0,24 (0,02)	0,19 (0,04)

Legenda: DQO: Demanda Química de Oxigênio; CNV: Carga Nitrogenada Volumétrica; NA: Não analisado; <sup>a</sup> Entre os dias 194 e 265, houve uma paralisação na operação do reator; \*Fase de aplicação do efluente anaeróbico salino.



**Figura 5.17:** Desempenho do reator anammox na Etapa 2. (a) Concentrações afluentes de N-amônia (●) e N-nitrito (▲); concentrações efluentes de N-amônia (○), N-nitrito (Δ) e N-nitrato (□); e eficiência de remoção (—) de N-amônia (em preto) e N-nitrito (em verde); (b) Concentrações afluente (◆) e efluente (◇) e eficiência de remoção (—) de N total; (c) Relações estequiométricas de consumo de N-nitrito (Δ) ( $N\text{-NO}_2^-/N\text{-NH}_4^+$ ) e produção de N-nitrato (□) ( $N\text{-NO}_3^-/N\text{-NH}_4^+$ ) e relações estequiométricas teóricas (—) de 1,32 e 0,26.

O aumento da salinidade para 1,7 atm de pressão osmótica (0,29 wt%) não interferiu no desempenho do reator anammox (Figura 5.17 a e b). As eficiências médias de remoção de nitrogênio total e nitrito permaneceram as mesmas da fase anterior ( $p > 0,05$ ), sem adição de salinidade (89% e 99%, respectivamente), enquanto a eficiência de conversão de amônia aumentou de 96 para 99%. O mesmo não ocorreu com o incremento da PO para 4 atm (0,72 wt%), quando foi observada redução pontual acentuada nas eficiências de remoção de N total, nitrito e amônia. Ademais, o reator apresentou período de instabilidade na remoção de amônia, com início da recuperação da estabilidade após 16 dias do início dessa fase. Apesar disso, não foram observadas diferenças significativas entre as eficiências de remoção de nitrito e amônia ao final dessa fase e das anteriores (0 e 0,29 wt%) ( $p > 0,05$ ).

Ao analisar desempenho do processo anammox em reator UASB em condição salina (NaCl), Wang et al. (2019b) também não observaram efeito negativo com o aumento da salinidade de 0 para 0,4 wt%. Os autores, inclusive, relataram um aumento da eficiência do reator anammox, para essa concentração de sal. O efeito benéfico da salinidade a baixas concentrações ( $< 0,4$  wt%) sobre a remoção biológica de nitrogênio também foi reportado em outros estudos (DAPENA-MORA et al., 2007; KARTAL et al., 2006; QI et al., 2018).

Qi et al. (2018) avaliaram a inibição do processo anammox por salinidade adicionando água do mar a efluente sintético em proporções variadas (10-100%, ou 3,5-35 g sal.L<sup>-1</sup>), em reator em batelada sequencial. Os autores não observaram prejuízo à atividade anammox nas proporções de 10 e 20% de água do mar (0,35 e 0,7 wt%), mas houve uma redução pontual acentuada da eficiência do reator com o aumento para 30% de água do mar (1,05 wt%), com recuperação total após 3 dias de operação. A mesma diminuição pontual de eficiência, com recuperação total, ocorreu no presente estudo, porém para concentração total de sais igual a 0,72 wt% (PO de 4 atm).

Uma vez atingida a estabilidade do processo para a salinidade de 4 atm, a pressão osmótica afluente foi aumentada para 11 atm (2,2 wt%). A atividade no reator foi suprimida abruptamente, de modo que foram observadas eficiências praticamente nulas de remoção de amônia e nitrito, por todo o período de 14 dias de operação, com exceção de apenas um dia dessa fase. O choque de salinidade afluente imposto provocou a inibição total da comunidade microbiana. Resposta similar foi obtida por Zhu et al. (2021), com o aumento da salinidade (NaCl) de 0,5 para 1,0 wt% no afluente de reator anammox. Os autores atribuíram a redução significativa da atividade anammox à plasmólise celular devido ao aumento acentuado da salinidade, conforme descrito anteriormente por Liu et al. (2014). Para evitar a morte dos microrganismos no reator, foi reduzida a concentração de sais no meio sintético e retomada a

pressão osmótica de 4 atm. A atividade anammox foi imediatamente recuperada e, após 6 dias à PO de 4 atm, as eficiências de remoção de nitrito e amônia foram de 96% e 87%, respectivamente. Ao final dessa fase, média de remoção de 85% de nitrogênio total foi observada.

Após o choque de salinidade imposto na fase 4 (PO = 11 atm), foi observado aumento da relação estequiométrica  $N-NO_2^-/N-NH_4^+$  consumidos (Figura 5.17c). As relações  $N-NO_2^-/N-NH_4^+$  permaneceram superiores à teórica de 1:1,32 proposta por Strous et al. (1998) até o fim da fase 7. Isso indica que o efeito negativo sobre a remoção de nitrito foi menor que para a remoção de amônia, o que também pode ser observado por uma redução menos significativa na eficiência de remoção desse composto. Assim, a remoção de nitrito passou a ocorrer com contribuição de outra rota metabólica, provavelmente via desnitrificação heterotrófica, a qual pode ter sido favorecida pelo incremento da concentração de sais. O favorecimento de rotas heterotróficas se deve à plasmólise e morte dos microrganismos presentes, decorrente do aumento da pressão osmótica do meio (LIU et al., 2014), e consequente liberação do material celular, que se torna disponível para utilização por microrganismos heterotróficos. Além disso, a desnitrificação heterotrófica provavelmente ocorreu via nitrito, uma vez que a relação  $N-NO_3^-$  produzido/ $N-NH_4^+$  consumida entre as fases 5-7 permaneceram próximas ao valor teórico de 0,26 proposto por Strous et al. (1998) para a reação anammox, o que indica que não houve consumo de nitrato nesse período.

A continuação da investigação do potencial de tratamento do processo anammox em meio salino se deu pelo aumento da pressão osmótica afluyente para 7 atm (1,55 wt%) na fase 6. Nessa condição, a redução da eficiência do processo ocorreu de forma gradativa ao longo dos 35 dias de operação dessa fase (Figura 5.17). Ao final desse período, o reator anammox apresentou eficiência média de remoção de nitrogênio total de 62%. Tendo em vista o declínio no desempenho do processo, a salinidade do meio sintético foi reduzida para PO de 5,5 atm (1,24 wt%), na fase 7, em procedimento similar ao adotado por Zhu et al. (2021), para o alívio do efeito da salinidade. O emprego desse procedimento resultou em incremento na eficiência de remoção de N total do reator para até 67%. No entanto, após 17 dias, a tendência de diminuição das eficiências permaneceu e o reator apresentou valores de remoção de N total inferiores a 50%, com média de 57%.

Huang et al. (2021) inocularam reator NP/A em reator em batelada sequencial com alimentação por lixiviado de aterro e adição de NaCl. Os autores concluíram que salinidades de 0,7, 1,5 e 3,0 wt% (NaCl) não causaram prejuízo ao desempenho do reator. Wang et al. (2019c) relataram que a eficiência de reator contínuo anammox à salinidade de 1,2 wt% foi afetada

negativamente pela presença de sal, mas ainda resultou em remoção média de N total de 70%. Quando a salinidade foi elevada para 2,0 wt%, no entanto, os autores relataram que a média da eficiência diminuiu para 45%. Baixa eficiência do processo anammox na remoção de N em meio salino também foi observada no presente trabalho, porém para salinidade inferior, de 1,24 wt% (5,5 atm). Outros estudos que aplicaram salinidade apenas na forma de NaCl também obtiveram sucesso na operação do processo anammox a concentrações de sal mais elevadas (KARTAL et al., 2006; FERNÁNDEZ et al., 2008; DAPENA-MORA et al., 2010; HUANG et al., 2021; ZHU et al., 2021).

Uma das principais diferenças entre o presente trabalho e os citados acima é a composição da salinidade aplicada em cada um, a qual consistia em diferentes sais no presente estudo (NaCl, CaCl<sub>2</sub> e MgCl<sub>2</sub>) e apenas NaCl nos demais. Em estudo conduzido por Lin et al. (2021), foram realizados ensaios em batelada para comparar o efeito inibitório de sais isoladamente e combinados (NaCl, KCl e Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) sobre a comunidade anammox. Os autores concluíram que a inibição causada pelos sais em conjunto é maior que aquela de cada sal isolado, comprovando o efeito de sinergismo entre os três sais avaliados.

Um dos poucos estudos encontrados que considerou o emprego de efluente com salinidade por eletrólitos mistos (água do mar) em reator anammox foi realizado por Qi et al. (2018). Nesse trabalho, ao elevar a salinidade afluente de 1,05 para 1,4 wt%, a princípio o desempenho do reator não foi afetado, até que, após 16 dias (32 ciclos), a eficiência de remoção diminuiu e estabilizou em patamar inferior ao das fases anteriores. Os autores atribuíram essa diferença ao efeito mais severo dos sais em longo prazo, em relação ao de curto prazo. Ainda no estudo de Qi et al. (2018), com o aumento da concentração de sais para 1,75 wt%, foi observado declínio gradual da eficiência de remoção de N, o qual só pôde ser revertido com a adição de meio suporte para possibilitar a retenção da biomassa no reator. Com crescimento microbiano aderido, foi possível aplicar salinidade para até 3,5 wt% e observar eficiência de remoção similar àquelas obtidas nas primeiras fases (0,35-0,7 wt%). Assim, a substituição da biomassa em grânulos pela biomassa aderida a material suporte pode ser uma alternativa interessante para o estabelecimento do processo anammox em salinidade por eletrólitos mistos mais elevada.

Jeong et al. (2023) inocularam dois reatores (R1 e R2) com biomassa anammox para a avaliação do efeito da salinidade (NaCl) sobre o desempenho do processo. Os autores verificaram redução das eficiências de remoção de N total de 95-96 para 54-57% com o aumento gradual da concentração de NaCl a até 10 g.L<sup>-1</sup>, em ambos os reatores. Concomitantemente à diminuição da eficiência, foi observada redução da concentração de SSV

nos reatores, de 63 e 47% nos reatores 1 e 2, respectivamente, em relação à concentração após inoculação. A retomada da eficiência do processo em ambos os reatores só foi possível com a suplementação de biomassa (“reinoculação”) para o aumento da concentração de SSV. Os autores apontam que a reposição dos grânulos de reatores anammox pode ser uma alternativa para a adaptação de bactérias anammox de água doce (FAB) a condições salinas.

De acordo com Wang et al. (2019b), baixas salinidades (até 1,2 wt% NaCl) podem ser benéficas à propriedade de granulação da biomassa, devido ao estímulo à produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS, do inglês *Extracellular Polymeric Substances*), as quais estão diretamente associadas à agregação dos grânulos. Essa associação também foi relatada por Zhu et al. (2021), em reator anammox de biomassa granular. Por outro lado, concentrações mais elevadas (p. ex. 2,0 wt%) afetam negativamente a secreção de EPS, provocando a desintegração dos grânulos e conseqüentemente a flotação da biomassa. Altas salinidades também podem resultar na desativação dos microrganismos e, em casos mais severos, na morte celular.

Em estudo realizado por Xing et al. (2016), no entanto, não foi observado aumento da produção de EPS com o aumento da salinidade (NaCl) a até 1,8 wt%. Os autores reportaram que o aumento pontual da salinidade provocou a redução da secreção de EPS pelas bactérias anammox, porém, ao longo do tempo de exposição à nova concentração de sal, os microrganismos recuperaram a produção dos polímeros. Ao final de cada fase, após o processo atingir a estabilidade, a concentração de EPS observada foi a mesma para todas as concentrações de sal impostas (0,8, 1,3 e 1,8 wt% NaCl).

A curta duração das fases pode ser apontada como um fator para a não adaptação das bactérias anammox a salinidades mais elevadas. Uma vez que o TDH adotado para o reator anammox foi baixo, de 1,4 horas, a fase mais curta, que durou 14 dias (fase 4), foi operada pelo período equivalente a 240 TDHs. As fases 6 e 7, referentes às PO de 7 e 5,5 atm, tiveram durações equivalentes a 600 e 290 TDHs, respectivamente. A manutenção das condições de uma fase de operação por períodos mais curtos é comum em estudos nos quais são utilizados baixos TDH em reatores anammox tratando efluente salino, principalmente quando inoculados com biomassa ativa anammox (Tabela 5.10). Ainda assim, o tempo estabelecido para cada condição salina imposta pode ter impossibilitado ou dificultado a adaptação da população anammox no reator.

**Tabela 5.10:** Tempo de duração das fases em estudos sobre influência da salinidade no processo Anammox.

Referência	Reator	Inóculo	Duração das fases (dias)	TDH (h)	CNVA (kg N.m <sup>-3</sup> .d <sup>-1</sup> )	Salinidade máxima suportada
Xing et al. (2016)	Anammox contínuo (UASB)	Biomassa anammox ( <i>Ca. Kuenenia</i> )	20-48	11	0,9 <sup>a</sup>	1,8 wt% (NaCl)
Wang et al. (2019b)	Anammox Contínuo	Biomassa anammox + Lodo de decantador secundário	4-8	2	4,2	1,2 wt% (NaCl)
Zhu et al. (2021)	Anammox Batelada sequencial	Biomassa anammox ( <i>Ca. Brocadia</i> )	2-11	6,2 <sup>a</sup>	1,3	1,2 wt% (NaCl)
Presente estudo (2023)	Anammox contínuo	Biomassa anammox ( <i>Ca. Brocadia</i> )	12-49	1,4	1,0	0,7 wt% (NaCl, MgCl <sub>2</sub> , CaCl <sub>2</sub> )

<sup>a</sup>: calculado com base nos dados do respectivo estudo.

Devido à eficiência reduzida observada para o processo anammox, retornou-se ao patamar de 4 atm de PO afluyente (fase 8a), o que resultou no aumento das remoções de nitrito e amônia no reator. Após 25 dias nessa condição, quando as eficiências observadas de remoção de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> eram superiores a 60% e 70%, respectivamente, a operação do reator anammox foi suspensa. A biomassa foi lavada e preservada em solução de nitrato de sódio e armazenada em câmara fria, à temperatura de 4°C, por 71 dias. Após esse período, o reator foi reinoculado com a biomassa e foi dado início à fase 8b, nas mesmas condições experimentais da fase 8a.

Ao contrário do comportamento apresentado entre o fim da etapa 1 e início da etapa 2, quando a biomassa também permaneceu preservada, por 62 dias, a retomada da operação do reator anammox na fase 8b resultou na ausência de atividade microbiana, a princípio. Eficiência de remoção de amônia superior a 15% foi observada apenas 38 dias após o início dessa fase e somente após 94 dias ultrapassou 50%. Após 180 dias de operação, o processo anammox atingiu a estabilidade, com médias de remoção de 84% de N total, 90% de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e 96% de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. O longo período para a retomada da atividade, em comparação à suspensão anterior, pode ser atribuído ao efeito de longo prazo da salinidade, ou ao fato de o reator não ter atingido a estabilidade antes da operação ter sido interrompida, na fase 8a.

No estudo de Qi et al. (2018), sobre o efeito da salinidade em reator anammox em batelada sequencial, durante a etapa de alimentação com 3,5 wt% de salinidade, uma falha mecânica no sistema automatizado suspendeu a operação do reator durante 5 dias. O

desempenho do reator foi severamente prejudicado, e a recuperação levou cerca de 80 ciclos (40 dias). Os autores atribuíram a redução da eficiência de remoção de nitrogênio a danos na estrutura celular resultantes da elevada pressão osmótica. Uma vez que as possíveis estratégias utilizadas pelos microrganismos para sobrevivência sob elevada pressão osmótica exigem o consumo de energia, os autores concluíram que a ausência do fornecimento de substrato durante o período de falha mecânica impediu o uso de tais estratégias pelas bactérias anammox. Quando foi retomado o fornecimento de substrato, o processo anammox foi capaz de se estabelecer novamente apenas em longo prazo. No presente estudo, no entanto, essa provavelmente não foi a causa da perda da atividade anammox, visto que a biomassa foi lavada e preservada com solução de nitrato de sódio, não permanecendo em meio salino durante o período de refrigeração.

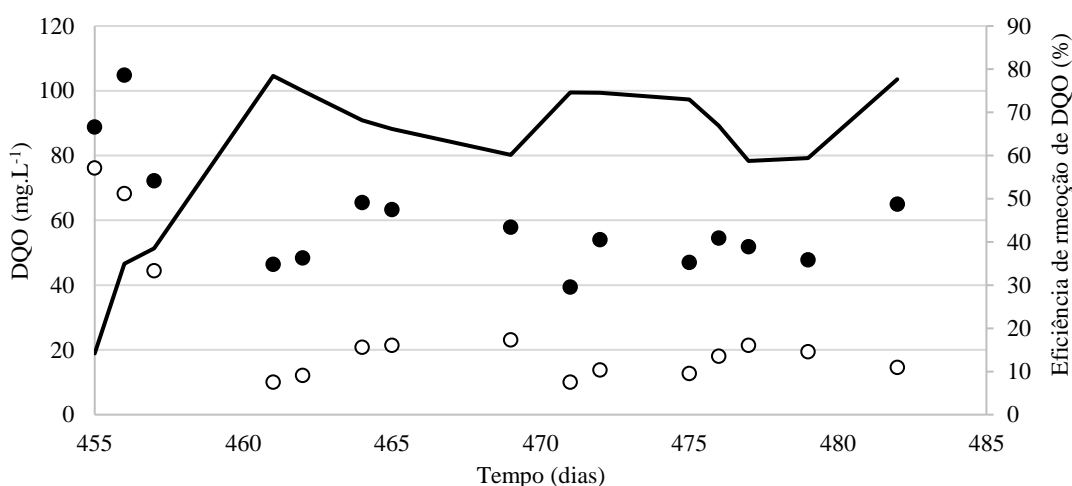
Alguns estudos apontam a dependência do gênero anammox marinho (MAB), *Candidatus Scalindua*, pela salinidade (WU et al., 2018; HUANG et al., 2021), o que significa que essas bactérias não são capazes de sobreviver por longos períodos na ausência de sais. Assim, no presente estudo, as bactérias não marinhas (FAB) presentes no inóculo do reator, uma vez adaptadas à salinidade, podem ter perdido a capacidade de sobreviver em ambiente não salino, pelo menos parcialmente. Essa hipótese é reforçada pelas análises de biologia molecular apresentadas no item 5.3.2 ‘Análises da comunidade microbiana’, que mostram a substituição do gênero anammox dominante ao final da fase 8b, após a retomada da atividade anammox no reator. Ao final da fase 8b, a eficiência média de remoção de nitrogênio total foi de  $84,3 \pm 0,8\%$ . Dessa forma, no presente trabalho, a biomassa anammox não halofílica foi capaz de adaptação à salinidade por eletrólitos mistos de até 0,72% (PO=4atm; em g.L<sup>-1</sup>: 4,7 NaCl, 2,0 MgCl<sub>2</sub> e 0,6 CaCl<sub>2</sub>), em reator contínuo com TDH de 1,4 horas e CNVA de 1 kg N.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>.

Na Fase 9, foi dado início à alimentação do reator anammox com o efluente do reator anaeróbio salino (EAS) previamente armazenado para este fim. Uma vez que o EAS apresentava concentração de N amoniacal média de  $39 \pm 2$  mg.L<sup>-1</sup>, foi necessária a diluição em 70% antes da aplicação do efluente no reator anammox. Por isso, foi mantida a pressão osmótica de 5,5 atm na alimentação do reator anaeróbio, durante o período em que foi operado com o objetivo de gerar efluente para a alimentação do reator anammox. Assim, a diluição resultava em concentração de N amoniacal próxima àquela das fases anteriores da etapa 2 do reator anammox (cerca de 27 mg N.L<sup>-1</sup>) e concentrações de sais também similares às da fase anterior (salinidade de 0,72 wt%). A fase 9 durou 28 dias de operação, equivalente a 480 tempos de detenção hidráulica, e a relação DQO/N média aplicada foi de  $0,86 \pm 0,14$ .



A aplicação do efluente anaeróbio causou prejuízo à eficiência de remoção de amônia no reator anammox. A remoção de nitrito, no entanto, permaneceu elevada (>99%), o que indica que o consumo desse composto nitrogenado passou a ocorrer também por meio de outra rota metabólica, além da via anammox. Concomitantemente à remoção de nitrito, foi observado também o consumo de matéria orgânica no reator (Figura 5.18), o qual apresentou eficiência média de remoção de DQO solúvel de  $67,1 \pm 8,3\%$ . Assim, o consumo de nitrito provavelmente ocorreu pela rota da desnitrificação heterotrófica pela via curta, com o nitrito como acceptor de elétrons. Essa hipótese do desvio parcial de rota é reforçada, ainda, pelos valores da relação estequiométrica de  $N\text{-NO}_2^-/N\text{-NH}_4^+$  no reator durante essa etapa (Tabela 5.9), os quais foram muito superiores (média de  $1,81 \pm 0,46$ ) aos valores da fase anterior (média de  $1,39 \pm 0,07$ ), na ausência de matéria orgânica.

**Figura 5.18:** Perfil temporal da concentração de DQO (Demanda Química de Oxigênio) durante a fase 9: afluente (●), efluente (○) e eficiência de remoção (—).



O desvio de rota para a desnitrificação heterotrófica também pode ter sido favorecido pela redução da relação  $N\text{-NO}_2^-/N\text{-NH}_4^+$  fornecida no afluente do reator anammox, durante essa etapa. Na fase anterior, a média dessa relação estequiométrica afluente foi de  $1,30 \pm 0,08$ , enquanto que na fase 9 foi de  $1,09 \pm 0,09$ . Em estudo conduzido por Tang et al. (2010), que operaram reator anammox com TDH de 0,83h e relação afluente  $N\text{-NO}_2^-/N\text{-NH}_4^+$  igual a 1, a relação DQO/N de 0,83 provocou a redução da eficiência de remoção de amônia de 75% (sem adição de matéria orgânica) para 38% (DQO de  $400 \text{ mg.L}^{-1}$ ), porém a eficiência de remoção de nitrito manteve-se a mesma superior a 99%. Segundo Cheng et al. (2020), a qualidade satisfatória do efluente de reatores anammox requer o controle rigoroso da relação

estequiométrica afluyente de N-amônia/N-nitrito. No entanto, esse controle se torna um desafio para o tratamento de efluentes reais.

Leal et al. (2016) estudaram a influência da relação DQO/N e da concentração de matéria orgânica sobre o processo anammox em RBS. Os autores também utilizaram efluente de reator anaeróbio diluído, primeiramente com diluição de 60% em meio autotrófico com nitrito. Foi observado que, para razão  $N\text{-NO}_2^-/N\text{-NH}_4^+$  próximo a 1, com N total de  $80 \text{ mg.L}^{-1}$  e DQO de  $240 \text{ mg.L}^{-1}$  (DQO/N de 3), as remoções médias de amônia e nitrito foram de 51 e 99%, respectivamente, similar ao resultado observado no presente estudo. Em etapa posterior do estudo de Leal et al. (2016), foi aplicado o efluente de reator anaeróbio sem diluição e com suplementação de nitrito para uma razão  $N\text{-NO}_2^-/N\text{-NH}_4^+$  igual a 2,4 (DQO/N de 1). Para essa condição, os autores observaram eficiência média de remoção de amônia de 98%. A suplementação em excesso de nitrito mostrou-se essencial para a recuperação da remoção de amônia e, conseqüentemente, do processo anammox.

A dependência da aplicação de nitrito para uma relação final  $N\text{-NO}_2^-/N\text{-NH}_4^+$  muito superior à teórica para o processo anammox tem se mostrado necessária em vários estudos (LEAL et al., 2016; FERNANDES et al., 2018). No estudo de Tang et al. (2010), no entanto, o aumento da relação afluyente  $N\text{-NO}_2^-/N\text{-NH}_4^+$  de 1 para até 1,67 não foi suficiente para recuperar a eficiência de remoção de amônia durante adição de matéria orgânica em reator anammox, devido à competição pelo nitrito com as bactérias desnitrificantes heterotróficas.

A Tabela 5.11 mostra o balanço de massa do nitrogênio aplicado à fase 9, utilizando-se os coeficientes estequiométricos propostos por Strous et al. (1998) para o processo anammox e as relações de 2,86 g DQO para cada g de  $N\text{-NO}_3^-$  reduzido e 1,14 g DQO para cada g de  $N\text{-NO}_2^-$  reduzido, para a desnitrificação heterotrófica (DH) (CAO et al., 2019). O desvio parcial de rota para a DH ocorreu pelo processo via nitrito, tendo em vista a baixa remoção de nitrato observada. Os resultados mostram que 83,7% da remoção de N ocorreu via anammox, 14,2% por DH via nitrato e 2,1% pela DH via nitrito (total de 16,3% via desnitrificação heterotrófica), para a relação DQO/N afluyente de  $0,86 \pm 0,14$ .

**Tabela 5.11:** Resultados do balanço de massa do nitrogênio na fase 9. Média (desvio padrão).

$N\text{-NH}_4^+$	$N\text{-NO}_2^-$	$N\text{-NO}_3^-$	DQO			
Consumo via AMX	Consumo via AMX	Consumo via DH	Produção via AMX	Consumo via DH	Total removida	Consumo via DH
18,5 (3,5)	24,5 (4,6)	7,8 (4,7)	4,8 (0,9)	1,1 (0,5)	36,0 (8,7)	12,2 (6,2)

AMX: Anammox; DH: Desnitrificação Heterotrófica. Valores em  $\text{mg.L}^{-1}$ .

Ma et al. (2011) estudaram o processo NP/A em sistema de estágio duplo aplicado ao tratamento de efluente sanitário real de decantador primário. Os autores obtiveram eficiência superior a 88% na remoção de N total, para DQO/N = 1. No presente trabalho, o nitrito foi suplementado ao reator anammox. O reator aeróbio no sistema de dois estágios, como no estudo de Ma et al. (2011), pode contribuir para o consumo da matéria orgânica residual de efluentes anaeróbios, reduzindo a competição entre bactérias anammox e desnitrificantes heterotróficas no reator anammox.

Segundo Agrawal et al. (2017), a presença de bactérias heterotróficas desnitrificantes (BHD) é inevitável em sistemas anammox em *mainstream*, devido à disponibilidade de DQO residual do efluente anaeróbio ou de produtos metabólicos solúveis (PMS) liberados pelas bactérias anammox. Muitos estudos têm relatado que as BHD podem contribuir para a remoção de N total, reduzindo o nitrato produzido no processo anammox a N<sub>2</sub> e removendo o carbono orgânico residual do meio, promovendo, assim, o polimento do efluente tratado (JENNI et al., 2014; MIAO et al., 2018; AZEVEDO et al., 2021). Entretanto, no presente estudo, a adição de matéria orgânica ( $53,2 \pm 7,3$  mg DQO.L<sup>-1</sup>) resultou em competição por substrato (nitrito) entre as bactérias anammox e desnitrificantes heterotróficas, reduzindo a eficiência de remoção de amônia no reator. Ainda assim, o processo anammox permaneceu como a principal via de remoção de nitrogênio no reator.

### 5.3.2 Análises da comunidade microbiana

A diversidade e riqueza das comunidades microbianas das amostras coletadas na etapa 2 de operação do reator anammox foram avaliadas. O consórcio microbiano foi avaliado por meio dos índices de diversidade e indicador de riqueza apresentados na Tabela 5.12. Enquanto o índice de Shannon representa a diversidade, o índice de Chao 1 indica a riqueza microbiana.

**Tabela 5.12:** Índices de diversidade e indicador de riqueza microbiana obtidos por meio dos resultados do sequenciamento Illumina para a etapa 2 do reator anammox.

Etapa	Amostra	PO (atm)	Especificação da amostra	Chao1	Shannon <sup>d</sup>	Sequências
2	1	0	-	57	2,20	41.380
	2	1,7	-	49	2,67	30.880
	3	4	-	43	2,09	28.730
	4	4	ACS <sup>a</sup>	56	2,54	29.567
	5	4	LES <sup>b</sup>	52	2,35	31.179
	6	4	EAS <sup>c</sup>	76	2,68	40.110

PO: Pressão Osmótica; <sup>a</sup> 'ACS': amostra coletada após choques de salinidade; <sup>b</sup> 'LES': amostra coletada após período de longa exposição à salinidade de 4 atm; <sup>c</sup> 'EAS': amostra coletada após aplicação do efluente anaeróbio salino (EAS); <sup>d</sup> Maior índice de Shannon representam maior diversidade.

Os baixos valores dos índices de riqueza e diversidade das amostras podem ser atribuídos à fonte da biomassa de inóculo, a qual era cultivada em reator alimentado com meio sintético adaptado de Van de Graaf et al. (1996) há mais de 2 anos. Essa forma de cultivo pode ter selecionado grupos de microrganismos específicos, o que diferencia esse tipo de inóculo de outros que são cultivados com alimentação por efluentes reais (SILVEIRA, 2022). No presente estudo, o inóculo utilizado ainda permaneceu sendo alimentado com efluente sintético não salino durante a etapa 1, o que pode ter reforçado a seleção da comunidade microbiana. Além disso, segundo Gonzalez-Gil et al. (2015), os grânulos presentes em reatores anammox são menos diversos, em termos de comunidades microbianas, quando comparados a grânulos ou flocos encontrados em outros sistemas de tratamento de efluentes, como reatores anaeróbios aplicados ao tratamento de efluente de processamento de alimentos, de indústria de papel e sistemas de lodo ativado. Isso indica que em reatores anammox forma-se uma comunidade altamente especializada com poucos filotipos dominantes, resultado de uma faixa mais estreita de doadores e aceptores de elétrons nesses sistemas (GONZALEZ-GIL et al., 2015).

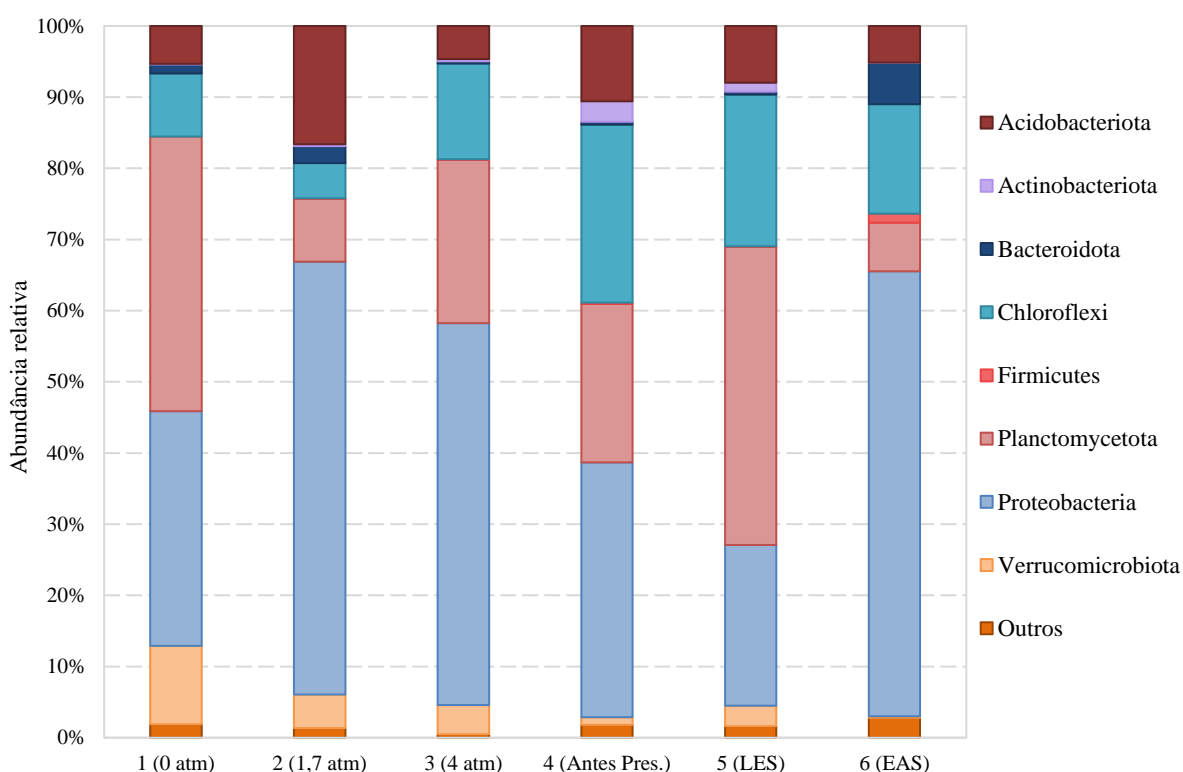
O aumento da salinidade resultou no aumento da diversidade microbiana no reator, evidenciado pelo maior índice de Shannon na amostra 5 (2,35), após longo período de exposição à salinidade de 0,72 wt%, em relação à amostra 1 (2,20), referente à ausência de sais. Além disso, a riqueza microbiana diminuiu com o aumento da concentração de sais (menor Chao1 da amostra 5, comparado à amostra 1). A aplicação do efluente anaeróbio salino resultou no aumento da riqueza das espécies, com a amostra 6 apresentando o maior índice Chao1 observado (76), dentre todas as amostras sequenciadas. Além disso, a adição de matéria orgânica também estimulou o aumento da diversidade microbiana, o que pode ser observado pelo maior índice de Shannon da amostra 6 (2,68) em relação à amostra 1 (2,20) e à amostra 5 (2,35).

### Diversidade microbiana nos filós

Um total de 19 filós do domínio Bacteria foi observado nas amostras analisadas do reator anammox, e os mais representativos estão apresentados na Figura 5.19. Dentre eles, os filós Acidobacteriota (4,7-16,6%), Chloroflexi (4,9-25,0%), Planctomycetota (6,8-38,6%), Proteobacteria (22,6-62,0%) e Verrucomicrobiota (0,2-11,0%) foram os de maior abundância relativa, representando pelo menos 90% das sequências extraídas de cada amostra. Os filós Actinobacteriota e Bacteroidota também foram observados, em menor abundância, nas amostras.

**Figura 5.19:** Composição taxonômica das comunidades microbianas nos filós no reator anammox.

Identificação das amostras: nº da amostra (condição de operação do reator). Para possibilitar a visualização dos dados, estão apresentados apenas os filós com mais de 0,5% de abundância relativa (em pelo menos uma amostra). Os demais foram incluídos no grupo “Outros”.



'Antes Pres.': amostra coletada imediatamente antes da suspensão da operação do reator e preservação da biomassa (PO = 4 atm); 'LES': amostra coletada após período de longa exposição à salinidade de 4 atm; 'EAS': amostra coletada após aplicação do efluente anaeróbico salino (EAS) (PO = 4 atm).

Bactérias do filo Chloroflexi estiveram presentes em todas as amostras, com maior abundância nas amostras PCS (25,0%) e LES (21,4%). Segundo Cho et al. (2010), esses microrganismos são comumente encontrados em sistemas anammox e podem degradar e

utilizar macromoléculas provenientes do decaimento bacteriano e reforçar a estrutura dos grânulos com uma rede de biomassa filamentososa. Ademais, a coexistência dessas bactérias com as bactérias anammox parece estar relacionada à compatibilidade destes dois grupos de microrganismos com ambientes ricos em amônio e nitrito, oligotróficos e anaeróbios.

O filo Planctomycetota corresponde ao grupo que abrange as bactérias anammox. Apesar da redução na abundância relativa com o primeiro incremento de salinidade (8,8%), em relação à condição da ausência de sal (38,6%), os membros desse filo se adaptaram à salinidade em longo prazo, conforme recuperação da abundância relativa observada na amostra 5 (41,9%). A diminuição da proporção desse filo foi observada novamente na amostra 6 (6,8%), referente ao período de adição de matéria orgânica ao reator, devido à proliferação de microrganismos heterotróficos pertencentes a outros filios.

O filo Proteobacteria é o maior dentro do Domínio Bacteria, e também o de maior diversidade. Esse grupo inclui microrganismos gram-negativos que podem apresentar variados mecanismos de produção de energia, abrangendo espécies fototróficas, quimiorganotróficas e quimiolitotróficas (MADIGAN et al., 2016). O grande número de microrganismos incluídos nesse filo, aliado à enorme diversidade e versatilidade metabólica de seus membros, pode explicar a elevada abundância relativa deste em todas as amostras.

A presença dos filios Firmicutes e Gemmatimonadota não foi expressiva (0,0-0,2%) nas amostras de 1 a 5, mas apresentaram abundância relativa mais representativa na amostra 6 (Pós-MO), referente à condição após aplicação do efluente anaeróbio (1,2% de abundância relativa para ambos). O filo Firmicutes é comumente encontrado em reatores Anammox (LEAL et al., 2016). O aumento da abundância relativa desse filo com o aumento da concentração de matéria orgânica também foi observado por Chen et al. (2020), que realizaram ensaios em batelada com meio sintético baseado em van de Graaf et al. (1996) adicionando compostos orgânicos. De acordo com Madigan et al. (2016), membros do filo Firmicutes são bactérias anaeróbias obrigatórias, aeróbias ou facultativas, capazes de assimilar vários substratos orgânicos. Assim, esses microrganismos podem ter contribuído na remoção de MO observada na última fase, como também sugerido por Azevedo (2022).

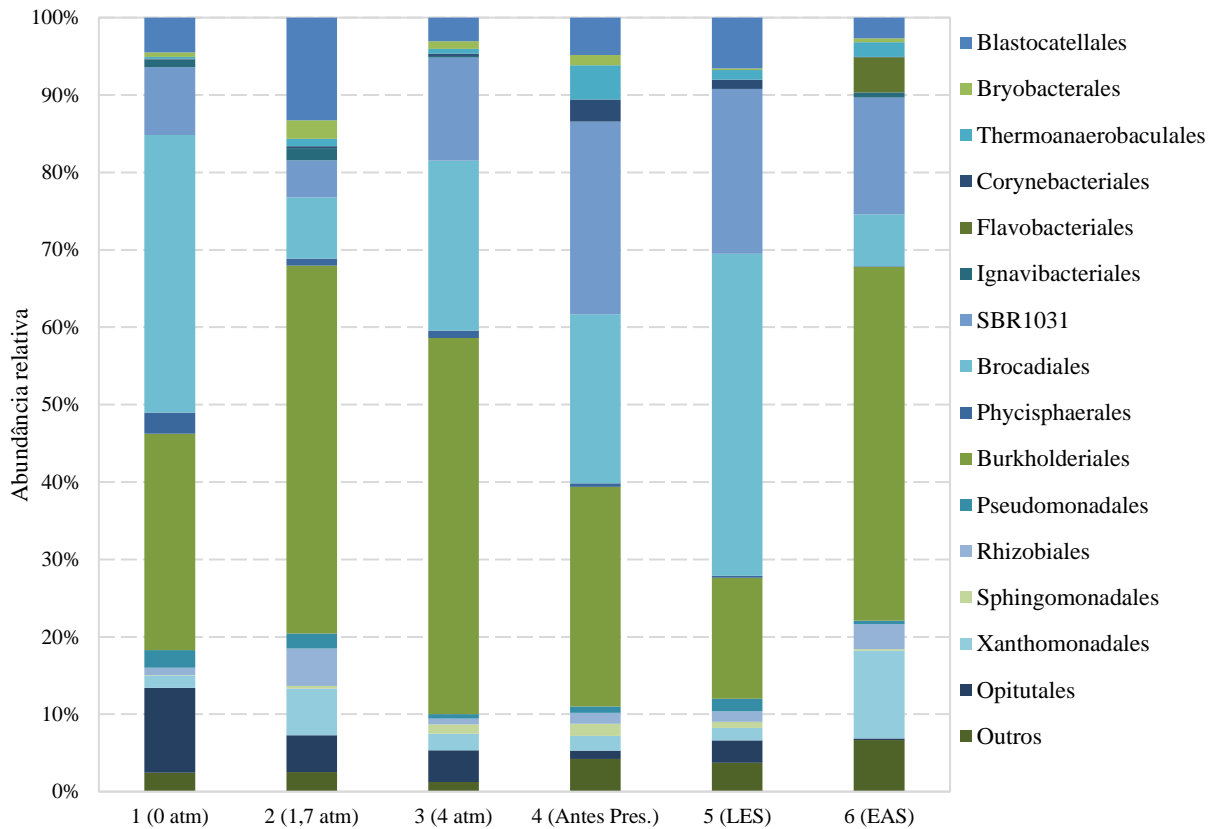
#### Diversidade microbiana nas ordens e gêneros

As principais ordens encontradas nas amostras sequenciadas estão apresentadas na Figura 5.20. As ordens de maior abundância relativa foram Blastocatellales (2,7-13,3%), *SBR1031* (4,8-24,9%), Brocadiales (6,7-35,9%), Burkholderiales (15,6-48,6%),

Xanthomonadales (1,6-11,4%) e Opitutales (0,2-11,0%), representando pelo menos 81% das sequências extraídas de cada amostra. Os principais gêneros encontrados nas amostras sequenciadas estão apresentados na Figura 5.21. Os gêneros de maior abundância relativa foram *Denitratisoma* (2,3-37,1%), *Candidatus Brocadia* (6,0-35,9%), *Candidatus Jettenia* (0,0-29,7%), *OLB13* (4,8-24,9%), *Simplicispira* (0,1-22,0%), *OLB17* (2,7-13,3%), *Limnobacter* (0,7-11,3%), *Thermomonas* (0,6-11,0%), *Ellin6067* (0,0-10,8%), *Lacunisphaera* (0,1-10,1%) e *Ottowia* (0,0-7,2%) representando pelo menos 80% das sequências extraídas de cada amostra.

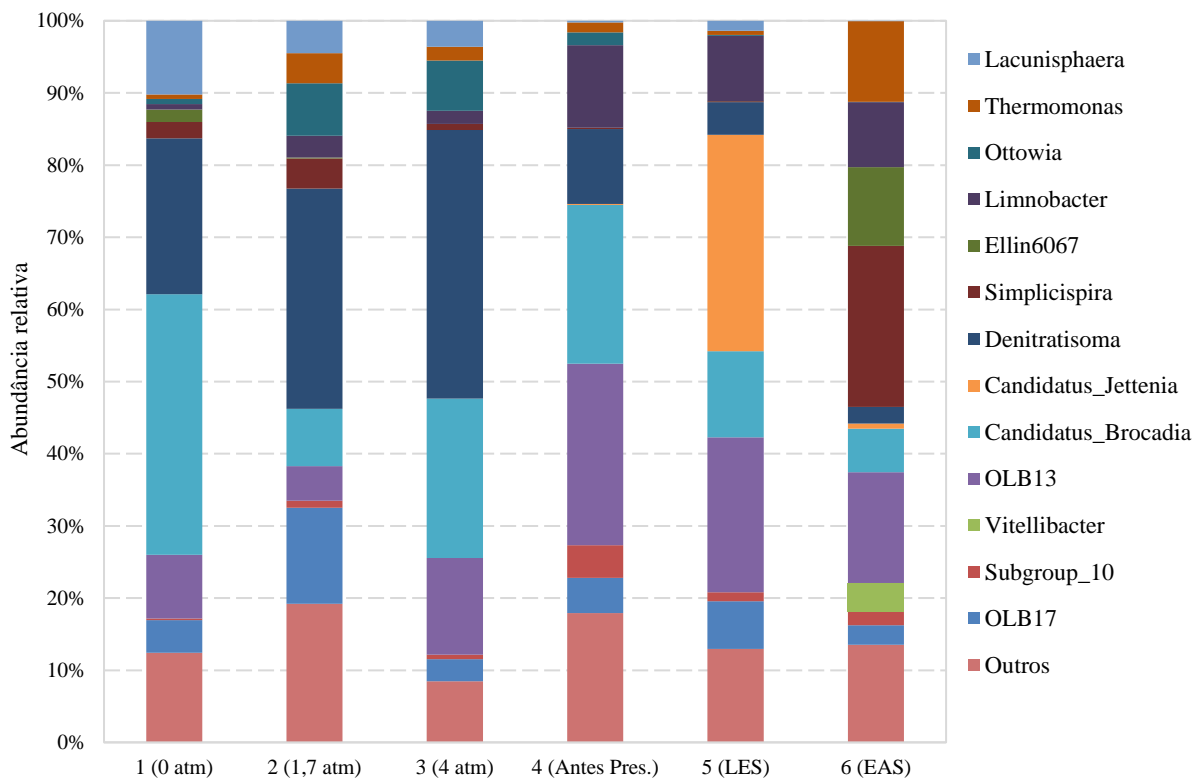
**Figura 5.20:** Composição taxonômica das comunidades microbianas nas ordens no reator anammox.

Identificação das amostras: n° da amostra (condição de operação do reator). Para possibilitar a visualização dos dados, estão apresentadas apenas as ordens com mais de 1,5% de abundância relativa (em pelo menos uma amostra). As demais foram incluídas no grupo “Outros”.



'Antes Pres.': amostra coletada imediatamente antes da suspensão da operação do reator e preservação da biomassa (PO = 4 atm); 'LES': amostra coletada após período de longa exposição à salinidade de 4 atm; 'EAS': amostra coletada após aplicação do efluente anaeróbico salino (EAS) (PO = 4 atm).

**Figura 5.21:** Composição taxonômica das comunidades microbianas nos gêneros no reator anammox. Identificação das amostras: n° da amostra (condição de operação do reator). Para possibilitar a visualização dos dados, estão apresentados apenas os gêneros com mais de 3,0% de abundância relativa (em pelo menos uma amostra). Os demais foram incluídos no grupo “Outros”.



'Antes Pres.': amostra coletada imediatamente antes da suspensão da operação do reator e preservação da biomassa (PO = 4 atm); 'LES': amostra coletada após período de longa exposição à salinidade de 4 atm; 'EAS': amostra coletada após aplicação do efluente anaeróbio salino (EAS) (PO = 4 atm).

O gênero de maior abundância relativa da ordem *Blastocatellales*, do filo *Acidobacteria*, foi o *OLB17*, o qual foi identificado em todas as amostras. Em estudo de Chen et al. (2021), esse gênero apresenta forte e positiva interação com *Ca. Brocadia*. Os autores reportaram que *OLB17* contém bactérias filamentosas que podem reforçar a estrutura de grânulos em sistemas de tratamento, mas o papel desse gênero ainda não foi totalmente esclarecido. Baixa salinidade parece ter um efeito positivo sobre as *OLB17*, visto que a abundância relativa desse gênero na amostra 2 (PO = 1,7 atm) foi a maior observada (13,3%), em relação às amostras 1 e 3-6 (2,7-6,6%).

A ordem *SBR1031*, pertencente ao filo *Chloroflexi*, inclui microrganismos filamentosos identificados a partir de um RBS aplicado ao tratamento de efluentes com remoção biológica de nitrogênio (BJORNSSON et al., 2002) e estiveram presentes em todas as amostras sequenciadas. O gênero de maior abundância relativa dessa ordem foi o *OLB13* (8,8-24,9%), que possui a capacidade de reduzir nitrito e nitrato. Segundo Ma et al. (2023), *OLB13* foi o



grupo desnitrificante predominante em reator para os processos simultâneos anammox e desnitrificação, com o aumento da abundância relativa desse gênero de acordo com o incremento da relação DQO/N. Xu et al. (2021) reportaram que o gênero OLB13 interage positivamente com as bactérias anammox e utilizam EPS excretados pelos microrganismos anammox para a redução de  $\text{N-NO}_3^-$  e  $\text{N-NO}_2^-$ . Vários estudos reportaram o aumento da excreção de EPS pelas bactérias anammox em meio salino, como estratégia para melhoria da agregação dos grânulos e alívio ao efeito negativo dos sais (WANG et al., 2019b; ZHU et al., 2021; KIM et al., 2022). Isso explica as maiores abundâncias relativas observadas do gênero *OLB13* para as amostras de maior salinidade (24,9 e 21,3% nas amostras 4 e 5, respectivamente).

A ordem *Brocadiales* abrange as bactérias anammox e esteve presente em todas as amostras. As menores abundâncias relativas observadas foram nas amostras 2 e 6, quando foi dado início à aplicação da salinidade e do efluente anaeróbio salino, respectivamente. Os microrganismos anammox apresentaram sensibilidade ao aumento das concentrações de sais, porém foram capazes de adaptação em longo prazo, o que também foi observado pelas análises físico-químicas. A abundância relativa da ordem *Brocadiales* na fase 5 (41,6%), após longa exposição à salinidade, foi superior àquelas em condições de mesmas concentrações de sais, porém por exposição de curto prazo (amostra 3: 22,0%; amostra 4: 21,9%), e inclusive superior à fase 1 (35,9%), na condição sem adição de sais. Com a adição de matéria orgânica, a presença de bactérias dessa ordem decresceu (6,7%), devido à competição pelo acceptor de elétrons (nitrito) com os microrganismos heterotróficos desnitrificantes, o que também foi constatado pela análise de desempenho da RBN. As variações das abundâncias relativas referentes aos microrganismos associados ao processo anammox (*Ca. Brocadia* e *Ca. Jettenia*) serão abordadas no item a seguir, '*Microrganismos envolvidos na remoção de N*'.

Os gêneros *Simplicispira* e *Ottowia* pertencem à família *Comamonadaceae* e o gênero *Denitratisoma*, à família *Rhodocyclaceae*. Ambas as famílias são da ordem *Burkholderiales* e são caracterizadas por microrganismos associados à desnitrificação parcial ou completa e/ou desnitrificação de redutores intermediários (AGRAWAL et al., 2017). Microrganismos do gênero *Ottowia* são comuns em sistemas de lodos ativados e algumas espécies apresentam metabolismo anaeróbio facultativo com a utilização de nitrito e nitrato como acceptor de elétrons. Bactérias do gênero *Simplicispira* são desnitrificantes heterotróficas que utilizam nitrato como acceptor de elétrons, o que explica o aumento significativo da abundância relativa desses microrganismos na amostra 6, referente à fase em que foi adicionada matéria orgânica (REN et al., 2022).

Bactérias do gênero *Denitratisoma* são comumente encontradas em sistemas anammox (HE et al., 2018) e podem metabolizar o nitrato produzido pelas bactérias anammox com a utilização de fonte de carbono a partir da hidrólise de produtos metabólicos solúveis (PMS) e substâncias poliméricas extracelulares (EPS) (CHO et al., 2010). O aumento da abundância desse gênero nas amostras 2 (30,4%) e 3 (37,1%), em relação à amostra 1 (21,4%) está associado à disponibilização de PMS no meio provenientes da morte celular de microrganismos anammox com o aumento da salinidade afluyente e também ao provável aumento de EPS excretadas por esses microrganismos, como mecanismo de sobrevivência em condição salina (WU et al., 2022). Após adaptação da comunidade anammox à salinidade, uma redução de *Denitratisomas* foi observada, nas amostras 4 e 5 (10,2 e 4,5%, respectivamente). Na amostra 6, a menor abundância relativa desse gênero foi observada (2,3%), apesar da adição de matéria orgânica ao reator, o que pode estar relacionado à baixa tolerância das *Denitratisoma* à salinidade.

O gênero *Limnobacter* da família *Burkholderiaceae*, ordem *Burkholderiales*, inclui bactérias capazes de realizar a desnitrificação heterotrófica parcial e total (WANG et al., 2021b). Em estudo de Wang et al. (2018a), os microrganismos anammox sobreviveram em ambientes contendo matéria orgânica devido a correlações positivas estabelecidas com bactérias heterotróficas do gênero *Limnobacter*, as quais protegeram as bactérias anammox em ambientes hostis. A presença desse gênero na amostra 1 (ausência de sais) não foi significativa (0,7%), mas aumentou com o incremento de salinidade (1,8-11,3%), o que mostra capacidade de adaptação à concentração de sais.

Microrganismos do gênero *Ellin6067* pertencem à família *Nitrosomonadaceae* do filo *Proteobacteria*, a qual inclui bactérias nitrificantes que oxidam amônia a nitrito (HE et al., 2022). Wang et al. (2021a) estudaram o efeito da radiação solar sobre o processo de nitrificação e observaram um favorecimento desse gênero em relação a bactérias oxidadoras de amônia (BOA) canônicas, como *Nitrosomonas*. Segundo os autores, o *Ellin6067* não é um gênero típico de BOA em sistemas RBN, mas já foi observada atuação importante dessas bactérias na oxidação de amônia a nitrito sob condições ambientais desfavoráveis em ETEs. No presente estudo, o afluyente do reator anammox foi purgado com mistura de argônio (95%) e CO<sub>2</sub> (5%) para a expulsão do oxigênio dissolvido do meio (<0,2 mg.L<sup>-1</sup>), previamente à alimentação do reator, em todas as fases de operação, então o aporte de OD ao reator era baixo, o que não deveria estimular o crescimento de bactérias aeróbias. A abundância relativa do gênero *Ellin6067* foi maior na amostra 6 (10,8%), em relação às demais amostras (0,0-1,8%). Outro gênero de BOA não-canônico, *mle1-7*, também foi identificado nas amostras, mas em

abundâncias menores (0,48-1,48%), com maior valor também observado na amostra 6. Esse gênero também foi identificado no estudo de Wang et al. (2021a). Ademais, o único gênero canônico de BOA observado foi o *Nitrosospira*, porém em abundâncias relativas menos expressivas (0,0-0,5%).

Em relação à ordem *Xanthomonadales*, o gênero predominante foi o *Thermomonas*, caracterizado por incluir espécies desnitrificantes heterotróficas que utilizam principalmente nitrato. Segundo Wang et al. (2019a), bactérias do grupo *Thermomonas* podem utilizar fonte de carbono externa, em vez de componentes de células em decomposição, o que justifica o aumento significativo da presença desse gênero na amostra 6, após adição de matéria orgânica (11,0%), e permaneceu em menores abundâncias relativas nas amostras 1-5 (0,60-4,17%). Os autores observaram o enriquecimento desse gênero após adição de glicose em reator de desnitrificação e anammox simultâneos.

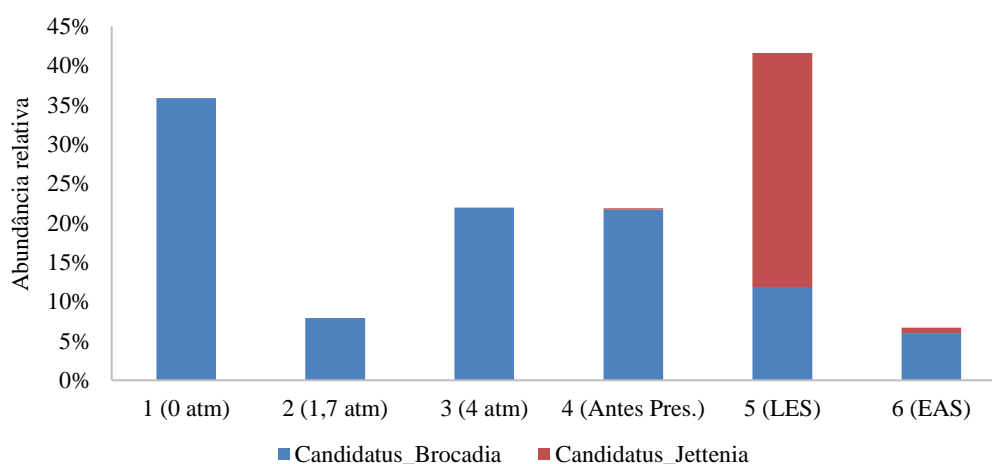
O gênero *Lacunisphaera* foi o mais abundante da ordem *Opitiales* e está relacionado ao processo de redução dissimilatória de nitrato a amônia (RDNA), segundo Zhao et al. (2020b). Microrganismos desse gênero foram identificados em elevada abundância relativa na condição referente à ausência de sais (amostra 1: 10,1%), o que pode explicar a menor relação  $N\text{-NO}_3/N\text{-NH}_4^+$  efluente na fase 1 da etapa 2. No entanto, foi observada redução da população desse gênero nas amostras 2 e 3, com o aumento da salinidade (4,5 e 3,6%, respectivamente), e presença inexpressiva nas últimas amostras (0,1-1,4%). Isso indica a elevada sensibilidade da *Lacunisphaera* à presença de sais, uma vez que uma baixa salinidade (0,29 wt%) já provocou a redução em mais de 50% da abundância relativa desses microrganismos.

#### Microrganismos envolvidos na remoção de N

Os gêneros associados ao processo anammox observados nas amostras foram *Candidatus Brocadia* (6,0-35,9%) e *Candidatus Jettenia* (0,1-27,9%) (Figura 5.22), ambos gêneros de água doce (FAB). Além desses, o gênero *SMIA02*, também pertencente ao filo *Planctomycetes*, ordem *Phycisphaerales*, foi identificado nas amostras 1, 2 e 3, com abundâncias relativas de 2,7, 0,9 e 0,9%, respectivamente, e nas amostras de 4 a 6 em menor proporção (0,1-0,4%). Segundo Xie et al. (2021), as *SMIA02* se caracterizam como uma nova cepa de bactérias identificadas com potencial para contribuir ao processo anammox. Os autores observaram dominância desse gênero (4,39%) dentro do filo *Planctomycetes*, em relação ao *Ca. Kuenenia* em reator anammox. Bactérias do gênero *SMIA02* também foram identificadas em reator NP/A estudado por Akaboci et al. (2018), e apresentaram abundância relativa duas

vezes maior à temperatura de 15°C, em relação à condição de 25°C, ao que os autores apontaram como flexibilidade e resistência desse gênero em sistemas anammox. Em meio salino, no entanto, microrganismos *SMIA02* não foram capazes de adaptação, apresentando menores abundâncias relativas com o aumento da salinidade.

**Figura 5.22:** Abundância relativa dos gêneros associados ao processo anammox (*Ca. Brocadia* e *Ca. Jettenia*) nas amostras sequenciadas. Identificação das amostras: nº da amostra (condição de operação do reator).



‘Antes Pres.’: amostra coletada imediatamente antes da suspensão da operação do reator e preservação da biomassa (PO = 4 atm); ‘LES’: amostra coletada após período de longa exposição à salinidade de 4 atm; ‘EAS’: amostra coletada após aplicação do efluente anaeróbio salino (EAS) (PO = 4 atm).

A amostra 5 (Pré-MO), referente ao período de operação com aplicação de efluente sintético salino (4 atm ou 0,72 wt%) se destaca pela alteração da comunidade microbiana anammox, com substituição da dominância do gênero *Ca. Brocadia* (21,7-11,9%) pela *Ca. Jettenia* (0,1-29,7%) (Figura 5.13). Apesar da *Ca. Brocadia* ter sido o gênero dominante nas fases salinas anteriores (1,7 atm e 4 atm), o longo período sob elevada pressão osmótica selecionou bactérias *Ca. Jettenia*, em detrimento da *Ca. Brocadia*. Outro fator que poderia ter reforçado a redução da população de *Ca. Brocadia* e favorecido a de *Ca. Jettenia* foi o período de preservação e refrigeração da biomassa anammox, que durou 71 dias. No entanto, em estudo realizado por Zhu et al. (2022), não foi observada alteração da dominância do gênero *Ca. Brocadia* após preservação e refrigeração por 180 dias. Os autores adotaram o mesmo procedimento de preservação do presente estudo para a biomassa anammox. Dessa forma, pode-se concluir, com base nos resultados aqui obtidos, que o favorecimento da população de *Ca. Jettenia* foi devido à longa exposição da comunidade à elevada concentração de sais.

Jeong et al. (2023) inocularam um reator anammox com biomassa composta por 50% *Ca. Brocadia* e 50% *Ca. Jettenia* (R1), e outro com 100% *Ca. Brocadia* (R2). Além do aumento da abundância de *Ca. Jettenia* e concomitante redução da população de *Ca. Brocadia* no R1, os autores também observaram que o reator com dominância de *Ca. Jettenia* apresentou maior estabilidade, em relação ao R2, com dominância de *Ca. Brocadia*. A dominância de *Ca. Jettenia* em reator anammox operado a elevada salinidade (0,5-2,75 wt%, NaCl) também foi reportado no estudo de Jeong et al. (2020), em que o gênero *Ca. Jettenia* foi selecionado pela salinidade em detrimento do *Ca. Kuenenia*, o qual geralmente apresenta tolerância a elevadas concentrações de sais (KARTAL et al., 2006; LI et al. 2018b; GONZÁLEZ-SILVA et al., 2017; HUANG et al. 2021). Assim, os resultados do presente estudo corroboram com a hipótese do potencial, ainda pouco explorado, das bactérias pertencentes ao gênero *Ca. Jettenia* para o tratamento de efluentes salinos em longo prazo.

Com a aplicação do efluente salino do reator anaeróbio, foi observada uma diminuição acentuada da abundância relativa das bactérias relacionadas ao processo anammox (41,6-6,7%) – *Candidatus Brocadia* (11,9-6,0%) e *Candidatus Jettenia* (29,7-0,7%). O efeito negativo da presença de matéria orgânica foi maior sobre o gênero *Ca. Jettenia*, em relação ao *Ca. Brocadia*. A dominância do gênero *Ca. Brocadia* em sistemas anammox em *mainstream*, na presença de baixas concentrações de matéria orgânica, é comumente observada, como reportado em vários estudos (WEN et al., 2017; LAURENI et al., 2015; LOTTI et al., 2014; LEAL et al., 2016; YANG et al., 2017; CAO et al., 2019), enquanto o gênero *Candidatus Jettenia* foi pouco observado como dominante em populações anammox em *mainstream* (DU et al., 2016; LI et al., 2017). A redução da população de *Ca. Jettenia* na presença de matéria orgânica também foi relatada por Cao et al. (2019) e He et al. (2018). Em estudo conduzido por Li et al. (2017), além da redução de *Ca. Jettenia*, foi reportado também aumento de *Ca. Brocadia*.

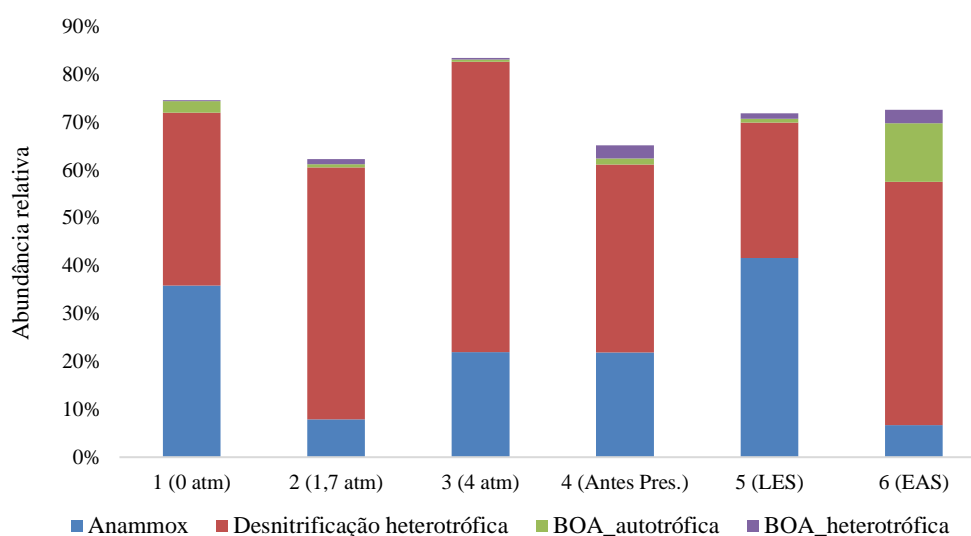
Assim como no presente estudo, Mojiri et al. (2019) observou diminuição na abundância relativa de *Ca. Jettenia* e aumento da de *Ca. Brocadia* após a adição de matéria orgânica no sistema. Em contrapartida, Chini et al. (2019) relatou redução da população de *Ca. Brocadia* e incremento de *Ca. Jettenia* ao substituir a alimentação do reator anammox de efluente sintético (sem carbono orgânico) para efluente com MO. Segundo Bonassa et al. (2021), a diferença entre as respostas das comunidades anammox na presença de carbono orgânico se deve ao fato de as alterações nas populações dependerem não somente da concentração de matéria orgânica no meio, mas também da biodegradabilidade da MO disponível. Enquanto Mojiri et al. (2019) estudou as alterações na comunidade microbiana sob adição de efluente sintético, com DQO

proveniente de leite em pó, extrato de levedura e peptona, Chini et al. (2019) utilizaram efluente suíno e de digestor anaeróbio de lodo.

Em relação aos microrganismos nitrificantes, além dos gêneros *Ellin6067* e *mle1-7*, foram identificadas também bactérias associadas ao processo de nitrificação heterotrófica, que são capazes de crescer aerobiamente utilizando amônia, como fonte de nitrogênio, e uma fonte orgânica, como acetato ou glicerol, como fonte de carbono (MADIGAN et al., 2016). Um dos gêneros encontrados foi o *Mycobacterium* (0,0-2,7%), predominante após choques de salinidade das fases 4-7 da etapa 2 de operação (amostra 4), o que pode ter proporcionado carbono orgânico devido à morte celular das bactérias anammox. O outro foi *Shinella* (0,0-2,7%), predominante na amostra 6, após adição de matéria orgânica ao reator.

Além das mudanças da comunidade anammox, também foi observada a presença de microrganismos relacionados ao processo de desnitrificação heterotrófica, parcial ou completa. Os gêneros *Simplicispira* e *Thermomonas* se destacam pelo aumento das abundâncias relativas na amostra 6, devido à disponibilidade de fonte externa de carbono. Já o gênero *Denitratisoma* apresentou redução significativa de abundância na amostra 6, com maiores valores nas amostras 2 e 3, com o aumento da salinidade. A Figura 5.23 mostra a distribuição dos microrganismos envolvidos nas conversões de nitrogênio no reator, para cada amostra sequenciada.

**Figura 5.23:** Distribuição dos microrganismos envolvidos nas conversões de nitrogênio para cada amostra sequenciada. Identificação das amostras: n° da amostra (condição de operação do reator).



'Antes Pres.': amostra coletada imediatamente antes da suspensão da operação do reator e preservação da biomassa (PO = 4 atm); 'LES': amostra coletada após período de longa exposição à salinidade de 4 atm; 'EAS': amostra coletada após aplicação do efluente anaeróbio salino (EAS) (PO = 4 atm); 'BOA': Bactérias Oxidadoras de Amônia.



## 6 CONCLUSÃO

- A pressão osmótica imposta por eletrólitos mistos de até 8,4 atm (5, 12 e 3 g.L<sup>-1</sup> de NaCl, MgCl<sub>2</sub> e CaCl<sub>2</sub>, respectivamente) não afetou a metanogênese, a partir de inóculo não halofílico, submetido a efluente sanitário salino em reatores em batelada. Testes com pressões osmóticas a partir de 10,95 atm (5, 12 e 12 g.L<sup>-1</sup> de NaCl, MgCl<sub>2</sub> e CaCl<sub>2</sub>, respectivamente), no entanto, apresentaram severa inibição do processo.
- O efeito inibitório de sais de cloreto sobre o processo metanogênico ocorre na ordem NaCl>MgCl<sub>2</sub>>CaCl<sub>2</sub>. Ainda, a inibição provocada pela presença isolada de um dos cloretos pode ser atenuada na presença dos demais, segundo relação de antagonismo identificada entre os sais.
- Em sistema contínuo, não foi observada inibição significativa da metanogênese à pressão osmótica de até 10 atm por eletrólitos mistos. No entanto, o processo foi inibido sob PO a partir de 19 atm. Ainda assim, o reator anaeróbico, inoculado com lodo não adaptado à salinidade, apresentou eficiência de remoção média de DQO de 70 ± 5% à PO de 21 atm, demonstrando adaptação do consórcio microbiano à presença de sais.
- O sucesso do desempenho do reator contínuo anaeróbico de leito fixo estruturado no tratamento de esgoto sanitário salino (PO = 21 atm) mostrou-se dependente da adição de álcali, na concentração de 0,4 g NaHCO<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup>.
- As arqueas metanogênicas acetoclásticas do gênero *Methanosaeta* e hidrogenotróficas do gênero *Methanomicrobium* foram dominantes na população metanogênica do reator à PO de 21 atm. O gênero *Methanomicrobium* foi favorecido em detrimento do gênero *Methanolinea*, que dominou a população metanogênica na fase de 1,5 atm, mas foi completamente inibido pela salinidade.
- O emprego de biomassa granular retirada de reator anammox operando em elevada concentração de N (232 mg.L<sup>-1</sup>), como no *sidestream* de ETEs, se apresenta como estratégia eficiente para a inoculação de reatores anammox em *mainstream*, com a redução gradual simultânea da concentração de nitrogênio afluente e do TDH de operação, para manutenção da CNVA de 1 kg N.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>.
- A biomassa granular anammox não halofílica suportou salinidade de até 0,72 wt% por eletrólitos mistos (4,7 g NaCl.L<sup>-1</sup>, 2,0 g MgCl<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> e 0,6 g CaCl<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>) sem prejuízo à atividade microbiana, quando submetida a efluente sintético com baixa concentração de nitrogênio (60 mg.L<sup>-1</sup>), a TDH de 1,4h.



- O gênero *Candidatus Brocadia* foi capaz de suportar salinidade em curto prazo, mas, em longo prazo, o gênero *Candidatus Jettenia* apresentou maior resistência à elevada pressão osmótica, e tornou-se dominante, em relação ao *Ca. Brocadia*.
- A presença de matéria orgânica (DQO = 53 mg.L<sup>-1</sup>; DQO/N = 0,86) favoreceu a rota metabólica da desnitrificação heterotrófica, principalmente via nitrito, em detrimento do processo anammox, para a remoção de nitrogênio de efluente salino de reator anaeróbio (0,72 wt%).
- A adição de matéria orgânica favoreceu o gênero *Ca. Brocadia*, em relação ao *Ca. Jettenia*, mesmo em baixas concentrações de até 53 mg DQO.L<sup>-1</sup> e relação DQO/N de 0,86.



## REFERÊNCIAS

- ADAMS, S. et al. Hydrochemical characteristics of aquifers near Sutherland in the Western Karoo, South Africa. **Journal of Hydrology**, v. 241, n. 1-2, p. 91-103, 2001.
- AGRAWAL, Shelesh et al. Success of mainstream partial nitritation/anammox demands integration of engineering, microbiome and modeling insights. **Current Opinion In Biotechnology**, v. 50, p. 214-221, abr. 2018.
- AGRAWAL, Shelesh et al. The role of inoculum and reactor configuration for microbial community composition and dynamics in mainstream partial nitritation anammox reactors. **Microbiology Open**, v. 6, n. 4, mar. 2017.
- AHN, Young-Ho. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: a review. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 8, p. 1709-1721, ago. 2006.
- AKABOCI, T. R. V. et al. Assessment of operational conditions towards mainstream partial nitritation-anammox stability at moderate to low temperature: Reactor performance and bacterial community. **Chemical Engineering Journal**, v. 350, p. 192–200, 2018.
- ALI, M.; OKABE, S. Anammox-based technologies for nitrogen removal: Advances in process start-up and remaining issues. **Chemosphere**, v. 141, p. 144-153, dez. 2015.
- ALVES, Jéssica Ysabelly Torres. **Avaliação de sistema de lodo ativado híbrido empregado no pós-tratamento de reator UASB em região de clima quente**. 2019. 40 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2019.
- ANZOLA-ROJAS, M. DEL P.; ZAIAT, M.; DE WEVER, H. Improvement of hydrogen production via ethanol-type fermentation in an anaerobic down-flow structured bed reactor. **Bioresource Technology**, v. 202, p. 42–49, fev. 2016.
- APHA; AWWA; WEF. **Standard Methods for Examination of Water and Wastewater**, 22nd ed.; APHA: Washington D.C.; AWWA: Denver, Colorado; WEF: Alexandria, Virginia. 2012.
- AQUINO, Sergio F. et al. Quantification of the Inert Chemical Oxygen Demand of Raw Wastewater and Evaluation of Soluble Microbial Product Production in Demo-Scale Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactors under Different Operational Conditions. **Water Environment Research**, v. 81, n. 6, p. 608-616, jun. 2009.
- AWATA, Takanori et al. Biomass Yield Efficiency of the Marine Anammox Bacterium, “Candidatus Scalindua sp.”, is Affected by Salinity. **Microbes And Environments**, v. 30, n. 1, p. 86-91, 2015.
- AZEVEDO, L. S. et al. Mainstream partial nitritation-anammox as post-treatment of anaerobic effluents under warm climate regions: a critical review of the reported drawbacks. **Environmental Technology Reviews**, v. 10, n. 1, p. 143-160, jan. 2021.
- AZEVEDO, Lariza dos Santos. **Biofilm reactors for nitrogen removal from anaerobically treated sewage: assessment of aeration strategies and microbial dynamics**. 2022. 180 f. Tese (Doutorado) - Curso de Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2022.
- BJORNSSON, L. et al. Filamentous Chloroflexi (green non-sulfur bacteria) are abundant in wastewater treatment processes with biological nutrient removal. **Microbiology**, v. 148, p. 2309-2318, 2002.

BOLSAN, Alice Chiapetti et al. Anammox Sludge Preservation Strategies for Short-Term Reactivation. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 234, n. 4, abr. 2023.

BONASSA, G. et al. Organic carbon bioavailability: is it a good driver to choose the best biological nitrogen removal process? **Science Of The Total Environment**, v. 786, p. 147390, 2021.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Programa água doce** – documento base. Brasília (DF), 2012. Acesso em: <www.mma.gov.br>. Acesso em: 10 out. 2018.

CALLADO, Nelia H.; DAMIANOVIC, Marcia H. Z.; FORESTI, Eugenio. Influência da razão DQO/[SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>] e da concentração de Na<sup>+</sup> na remoção de matéria orgânica e sulfato em reator UASB. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 22, n. 2, p. 381-390, nov. 2016.

CAMEJO, Pamela Y. et al. Genome-Enabled Insights into the Ecophysiology of the Comammox Bacterium “Candidatus Nitrospira nitrosa”. **Msystems**, v. 2, n. 5, out. 2017.

CAO, Shenbin et al. Novel two stage partial denitrification (PD)-Anammox process for tertiary nitrogen removal from low carbon/nitrogen (C/N) municipal sewage. **Chemical Engineering Journal**, v. 362, p. 107-115, abr. 2019.

CAO, Y. et al. Mainstream partial nitrification and anammox in a 200,000 m<sup>3</sup>/day activated sludge process in Singapore: scale-down by using laboratory fed-batch reactor. **Water Science And Technology**, v. 74, n. 1, p. 48-56, 2016.

CAO, Y. S. et al. The mainstream partial nitrification-anammox nitrogen removal in the largest activated sludge process and comparisons with other BNR activated sludge process in Singapore. In: **Proceedings of IWA World Water Congress**, 21–26, Lisbon, Portugal, 2014.

CAO, Y.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; DAIGGER, G. T. Mainstream partial nitrification–anammox in municipal wastewater treatment: status, bottlenecks, and further studies. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 101, n. 4, p. 1365-1383, 2017.

CARDONA, A. et al. Salinization in coastal aquifers of arid zones: an example from Santo Domingo, Baja California Sur, Mexico. **Environmental Geology**, v. 45, n. 3, p. 350-366, 2004.

CAREY, Richard O.; MIGLIACCIO, Kati W. Contribution of Wastewater Treatment Plant Effluents to Nutrient Dynamics in Aquatic Systems: a review. **Environmental Management**, v. 44, n. 2, p. 205-217, maio 2009.

CAVALCANTE, K. L.; DEON, M. D.; SILVA, H. K. P. Estudo das características restritivas dos efluentes das estações de tratamento de esgoto de Petrolina-PE para uso na agricultura irrigada. **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada**, v. 11, n. 2, p. 1331-1338, 2017.

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

CHEN, C. et al. Effects of Organic-Matter-Induced Short-Term Stresses on Performance and Population Dynamics of Anammox Systems. **Journal Of Environmental Engineering**, v. 146, n. 10, 2020.

CHEN, Daying et al. Effect of increasing salinity and low C/N ratio on the performance and microbial community of a sequencing batch reactor. **Environmental Technology**, v. 42, n. 8, p. 1213-1224, 31 ago. 2019.

CHEN, G. H. et al. An innovative triple water supply system and a novel SANI® process to alleviate water shortage and pollution problem for water-scarce coastal areas in China. **Journal of Water Sustainability**, v. 2, p. 121-129, 2012.

CHEN, Hong et al. A critical review on microbial ecology in the novel biological nitrogen removal process: dynamic balance of complex functional microbes for nitrogen removal. **Science Of The Total Environment**, v. 857, p. 159462, jan. 2023.

CHEN, Hui; JIN, Ren-Cun. Summary of the preservation techniques and the evolution of the anammox bacteria characteristics during preservation. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 101, n. 11, p. 4349-4362, abr. 2017.

CHEN, W. et al. Deciphering the mechanism of medium size anammox granular sludge driving better nitrogen removal performance. **Bioresource Technology**, v. 336, 2021.

CHEN, Y., CHENG, J.J., CREAMER, K.S. Inhibition of anaerobic digestion process: a review. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4044-4064, 2008.

CHENG, Y. F. et al. Anammox Granules Acclimatized to Mainstream Conditions Can Achieve a Volumetric Nitrogen Removal Rate Comparable to Sidestream Systems. **Environmental Science and Technology**, v. 54, n. 20, p. 12959-12966, 2020.

CHERNICHARO, C. A. L. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias: Reatores anaeróbios**. Vol. 5. 2 ed. Belo Horizonte: UFMG, 2007. 379 p.

CHERNICHARO, C. A. L. et al. Anaerobic sewage treatment: state of the art, constraints and challenges. **Reviews In Environmental Science And Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 649-679, set. 2015.

CHINI, Angélica et al. Process performance and anammox community diversity in a deammonification reactor under progressive nitrogen loading rates for swine wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v. 311, p. 123521, set. 2020.

CHO, Sunja et al. Nitrogen removal performance and microbial community analysis of an anaerobic up-flow granular bed anammox reactor. **Chemosphere**, v. 78, n. 9, p. 1129-1135, fev. 2010.

CORTÉS-LORENZO, C. et al. Effect of salinity on nitrification efficiency and structure of ammonia-oxidizing bacterial communities in a submerged fixed bed bioreactor. **Chemical Engineering Journal**, v. 266, p. 233-240, abr. 2015.

DAMIANOVIC, M. H. R. Z., FORESTI, E. Anaerobic degradation of synthetic wastewaters at different levels of sulfate and COD/sulfate ratios in horizontal-flow anaerobic reactors (HAIB). **Environmental Engineering Science**, v. 24, n. 3, p. 383-393, 2007.

DANG, Yan et al. Calcium effect on anaerobic biological treatment of fresh leachate with extreme high calcium concentration. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 95, p. 76-83, nov. 2014.

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**, v. 40, n. 4, p. 859-865, mar. 2007.

DAPENA-MORA, A. et al. Monitoring the stability of an Anammox reactor under high salinity conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 51, n. 3, p. 167-171, set. 2010.

DAVIES, C. W. The Extent of dissociation of salts in water. Part VIII. An equation for the mean ionic activity coefficient of an electrolyte in water, and a revision of the dissociation constants of some sulphates. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, Paper 397, p. 2093-2098, 1938.

DE VRIEZE, Jo et al. Methanosarcina: the rediscovered methanogen for heavy duty biomethanation. **Bioresource Technology**, v. 112, p. 1-9, maio 2012.

DE VRIEZE, Jo et al. Microbial community redundancy in anaerobic digestion drives process recovery after salinity exposure. **Water Research**, v. 111, p. 109-117, mar. 2017.

DELFORNO, Tiago Palladino et al. Microbial diversity of a full-scale UASB reactor applied to poultry slaughterhouse wastewater treatment: integration of 16s rRNA gene amplicon and shotgun metagenomic sequencing. **Microbiology Open**, v. 6, n. 3, p. 1-2, 23 fev. 2017.

DIAS, Heitor Roger Alves. **Co-digestão anaeróbia de efluente têxtil com levedura residual oriunda do processo de fermentação alcoólica visando remoção de cor e produção de biogás**. 2020. 119 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

DU, R. et al. Performance of partial denitrification (PD)-ANAMMOX process in simultaneously treating nitrate and low C/N domestic wastewater at low temperature. **Bioresource Technology**, v. 219, n. 3, p. 420-429, 2016.

ENGELBRECHT, S. et al. Effect of increasing salinity to adapted and non-adapted Anammox biofilms. **Environmental Technology**, v. 40, n. 22, p. 2880-2888, mar. 2018.

FANG, F. et al. Effect of high salinity in wastewater on surface properties of anammox granular sludge. **Chemosphere**, v. 210, p. 366-375, nov. 2018.

FEIJOO, G. et al. Sodium inhibition in the anaerobic digestion process: Antagonism and adaptation phenomena. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, n. 2, p. 180-188, 1995.

FERNANDES, Luyara de Almeida et al. Effect of temperature on microbial diversity and nitrogen removal performance of an anammox reactor treating anaerobically pretreated municipal wastewater. **Bioresource Technology**, v. 258, p. 208-219, jun. 2018.

FERNÁNDEZ, I. et al. Biofilm and granular systems to improve Anammox biomass retention. **Biochemical Engineering Journal**, v. 42, n. 3, p. 308-313, dez. 2008.

FUESS, L. T. et al. Thermophilic two-phase anaerobic digestion using an innovative fixed-bed reactor for enhanced organic matter removal and bioenergy recovery from sugarcane vinasse. **Applied Energy**, v. 189, p. 480-491, 2017.

GAGLIANO, M.c. et al. Biofilm formation and granule properties in anaerobic digestion at high salinity. **Water Research**, v. 121, p. 61-71, 2017.

GANI, Khalid Muzamil et al. Potential strategies for the mainstream application of anammox in treatment of anaerobic effluents - A review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 51, n. 21, p. 2567-2594, jul. 2020.

GAO, D. W.; TAO, Y. Versatility and application of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 4, p. 887-894, 2011.

- GARCÍA-RUIZ, M.j. et al. Effects of salinity on the nitrogen removal efficiency and bacterial community structure in fixed-bed biofilm CANON bioreactors. **Chemical Engineering Journal**, v. 347, p. 156-164, 2018.
- GARRELS, R. M.; CHRIST, C. L. **Minerals, solutions, and equilibria**. San Francisco: W.H.Freeman, 1965.
- GARRELS, R. M.; THOMPSON, M. E. A Chemical model for sea water at 25 degrees C and one atmosphere total pressure. **American Journal of Science**, v. 260, n. 1, p. 57-66, 1962.
- GONZALEZ-GIL, G. et al. Microbial Community Composition and Ultrastructure of Granules from a Full-Scale Anammox Reactor. **Microbial Ecology**, v. 70, n. 1, p. 118-131, 2015.
- GONZALEZ-SILVA, B. M. et al. Changes in the microbial community of an anammox consortium during adaptation to marine conditions revealed by 454 pyrosequencing. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 12, p. 5149-5162, 2017.
- GONZALEZ-SILVA, B. M. et al. Nitrification at different salinities: Biofilm community composition and physiological plasticity. **Water Research**, v. 95, p. 48-58, 2016.
- GRANATTO, C.F. et al. Scale-up evaluation of anaerobic degradation of linear alkylbenzene sulfonate from sanitary sewage in expanded granular sludge bed reactor. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 138, p. 23-32, mar. 2019.
- GRANGER, J.; SIGMAN, D. M. Removal of nitrite with sulfamic acid for nitrate N and O isotope analysis with the denitrifier method. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 24, p. 3753-3762, 2009.
- GUO, Qiong et al. Towards simultaneously removing nitrogen and sulfur by a novel process: anammox and autotrophic desulfurization + denitrification (aadd). **Chemical Engineering Journal**, v. 297, p. 207-216, ago. 2016.
- HAMER, W. J.; WU, Y. C. Osmotic coefficients and mean activity coefficients of univalent electrolytes in water at 25°C. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, v. 1, n. 4, p. 1047-1100, out. 1972.
- HARNED, H. S.; OWEN, B. B. **The Physical chemistry of electrolytic solutions**. 3rd ed. New York: Reinhold, 1958.
- HATTORI, Satoshi. Syntrophic Acetate-Oxidizing Microbes in Methanogenic Environments. **Microbes And Environments**, v. 23, n. 2, p. 118-127, 2008.
- HE, Shilong et al. Performance and microbial community of anammox in presence of micro-molecule carbon source. **Chemosphere**, v. 205, p. 545-552, ago. 2018.
- HE, Yuan et al. Soil Microbial Communities Altered by Titanium Ions in Different Agroecosystems of Pitaya and Grape. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 1, fev. 2022.
- HUANG, X.; MI, W.; ITO, H.; KAWAGOSHI, Y. Probing the dynamics of three freshwater Anammox genera at different salinity levels in a partial nitrification and Anammox sequencing batch reactor treating landfill leachate. **Bioresource Technology**, v. 319, 2021.
- ISMAIL, S. B. et al. Extracellular polymeric substances (EPS) in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors operated under high salinity conditions. **Water Research**, v. 44, n. 6, p. 1909-1917, 2010.

JALALI, M. Salinization of groundwater in arid and semi-arid zones: an example from Tajarak, western Iran. **Environmental Geology**, v. 52, n. 6, p. 1133-1149, 2007.

JEDDI, Mariem et al. Anaerobic biological treatment of industrial saline wastewater: fixed bed reactor performance and analysis of the microbial community structure and abundance. **Environmental Technology**, v. 41, n. 13, p. 1715-1725, nov. 2019.

JENNI, S. et al. Successful application of nitrification/anammox to wastewater with elevated organic carbon to ammonia ratios. **Water Research**, v. 49, p. 316-326, 2014.

JEONG, Dawoon et al. Shift in bacterial community structure in response to salinity in a continuous anaerobic ammonium oxidation (anammox) reactor. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 147, p. 104873, fev. 2020.

JEONG, Soyeon et al. Long-term adaptation of two anammox granules with different ratios of *Candidatus Brocadia* and *Candidatus Jettenia* under increasing salinity and their application to treat saline wastewater. **Science Of The Total Environment**, v. 860, p. 160494, fev. 2023.

JETTEN, Mike S. M., HORN, S.J., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., Towards a more sustainable wastewater treatment system. **Water Science and Technology**, v. 35, p. 171-180, 1997.

JETTEN, Mike S. M. The microbial nitrogen cycle. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 11, p. 2903-2909, nov. 2008.

JIANG, Y. China's water scarcity. **Journal of Environmental Management**, v. 90, n. 11, p. 3185-3196, 2009.

JIN, R. et al. Anammox in a UASB reactor treating saline wastewater. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 89, n. 5, p. 342-348, 2011.

JIN, R. et al. The inhibition of the Anammox process: A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 197, p. 67-79, 2012.

KAPP, H. Schlammfäulung mit hohem Feststoffgehalt. **Stuttgarter Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft**, Bd. 86, Oldenbourg Verlag, München, 1984.

KARTAL, B. et al. Adaptation of a freshwater anammox population to high salinity wastewater. **Journal of Biotechnology**, v. 126, n. 4, p. 546-553, dez. 2006.

KARTAL, B. *et al.* *Candidatus 'Brocadia fulgida'*: an autofluorescent anaerobic ammonium oxidizing bacterium. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 63, p. 46-55, 2008.

KARTAL, B. *et al.* *Candidatus "Anammoxoglobus propionicus"* a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. **Syst Appl Microbiol**, v. 30, p. 39-49, 2007.

KARTAL, B.; KELTJENS, J. T. Anammox Biochemistry: a Tale of Heme c Proteins. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 12, p. 998-1011, 2016.

KARTAL, B.; KUENEN, J. G.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Sewage Treatment with Anammox. **Science**, v. 328, n. 5979, p. 702-703, 2010.

KHANAL, S. K. **Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production: Principles and Applications**. Wiley-Blackwell, 2008.



- KHRAMENKOV, S. V. et al. A novel bacterium carrying out anaerobic ammonium oxidation in a reactor for biological treatment of the filtrate of wastewater fermented sludge. **Microbiology**, v. 82, n. 5, p. 628-636, set. 2013.
- KIM, I. G., et al. *Exiguobacterium aestuarii* sp. nov. and *Exiguobacterium marinum* sp. nov., isolated from a tidal flat of the Yellow Sea in Korea. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**, v. 55, 885e889, 2005.
- KIM, Yeonju et al. Differences in the Effects of Calcium and Magnesium Ions on the Anammox Granular Properties to Alleviate Salinity Stress. **Applied Sciences**, v. 12, n. 1, p. 19, 21 dez. 2022.
- KITS, K. Dimitri et al. Low yield and abiotic origin of N<sub>2</sub>O formed by the complete nitrifier *Nitrospira inopinata*. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, abr. 2019.
- KUGELMAN, I. J., MCCARTY, P. L. Cation toxicity and stimulation in anaerobic waste treatment. **Journal Water Pollution Control Federation**, v. 37, n. 1, p. 97-116, jan. 1965.
- KUYPERS, Marcel M. M. et al. Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. **Nature**, v. 422, n. 6932, p. 608-611, abr. 2003.
- LACKNER, S.; TERADA, A.; SMETS, B. F. Heterotrophic activity compromises autotrophic nitrogen removal in membrane-aerated biofilms: Results of a modeling study. **Water Research**, v. 42, n. 4-5, p. 1102-1112, fev. 2008.
- LAURENI, M. et al. Activity and growth of anammox biomass on aerobically pre-treated municipal wastewater. **Water Research**, v. 80, p. 325-336, 2015.
- LEAL, C. D. et al. Anammox for nitrogen removal from anaerobically pre-treated municipal wastewater: Effect of COD/N ratios on process performance and bacterial community structure. **Bioresource Technology**, v. 211, p. 257-266, jul. 2016.
- LEFEBVRE, O. et al. Impact of increasing NaCl concentrations on the performance and community composition of two anaerobic reactors. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 1, p. 61-69, jan. 2007.
- LEFEBVRE, O., MOLETTA, R. Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: A literature review. **Water Research**, v. 40, n. 20, p. 3671-3682, dez. 2006.
- LEMAIRE, R.; MARCELINO, M.; YUAN, Z. Achieving the nitrite pathway using aeration phase length control and step-feed in an SBR removing nutrients from abattoir wastewater. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 100, n. 6, p. 1228-1236, 2008.
- LEUNG, R. W. K. et al. Integration of seawater and grey water reuse to maximize alternative water resource for coastal areas: the case of the Hong Kong international airport. **Water Science And Technology**, v. 65, n. 3, p. 410-417, fev. 2012.
- LEWIS, Gilbert N.; RANDALL, Merle. The activity coefficient of strong electrolytes. **Journal Of The American Chemical Society**, v. 43, n. 5, p. 1112-1154, maio 1921.
- LI, Jianwei et al. A critical review of one-stage anammox processes for treating industrial wastewater: optimization strategies based on key functional microorganisms. **Bioresource Technology**, v. 265, p. 498-505, out. 2018a.

- LI, X. et al. Effects of salinity on the denitrification efficiency and community structure of a combined partial nitritation-anaerobic ammonium oxidation process. **Bioresource Technology**, v. 249, p. 550-556, 2018b.
- LI, X. et al. Mainstream upflow nitritation-anammox system with hybrid anaerobic pretreatment: Long-term performance and microbial community dynamics. **Water Research**, v. 125, p. 298-308, nov. 2017.
- LI, Yating et al. Seawater toilet flushing sewage treatment and nutrients recovery by marine bacterial-algal mutualistic system. **Chemosphere**, v. 195, p. 70-79, mar. 2018c.
- LIANG, Yinxiu et al. Constructed wetlands for saline wastewater treatment: a review. **Ecological Engineering**, v. 98, p. 275-285, jan. 2017.
- LIM, Jun Wei et al. Microbial community structure reveals how microaeration improves fermentation during anaerobic co-digestion of brown water and food waste. **Bioresource Technology**, v. 171, p. 132-138, nov. 2014.
- LIMA, E. A. et al. Mapa de variação da concentração total de sais das águas subterrâneas da região nordeste do Brasil. In: XV Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas, 2008, Natal. Anais. **Revista Águas Subterrâneas**, Suplemento, 2008.
- LIN, L.; PRATT, S.; CRICK, O.; XIA, J.; DUAN, H.; YE, L. Salinity effect on freshwater Anammox bacteria: ionic stress and ion composition. **Water Research**, v. 188, 2021.
- LIU, Congcong et al. The effect of  $Mg^{2+}$  on digestion performance and microbial community structures in sludge digestion systems. **Environmental Science And Pollution Research**, v. 24, n. 21, p. 17474-17484, 7 jun. 2017.
- LIU, G.; WANG, J. Long-term low DO enriches and shifts nitrifier community in activated sludge. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 10, p. 5109-5117, 2013.
- LIU, Mu et al. Enhancement of anammox activity by addition of compatible solutes at high salinity conditions. **Bioresource Technology**, v. 167, p. 560-563, set. 2014.
- LIU, T. et al. Evaluation of mainstream nitrogen removal by simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification (SNAD) process in a granule-based reactor. **Chemical Engineering Journal**, v. 327, p. 973-981, nov. 2017.
- LIU, Yiwen et al. Methane emission from sewers. **Science Of The Total Environment**, v. 524-525, p. 40-51, ago. 2015.
- LIU, Xiaoguang et al. Partial nitrification-reactor configurations, and operational conditions: performance analysis. **Journal Of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, n. 4, p. 103984, ago. 2020.
- LOTTI, T. et al. Faster through training: the anammox case. **Water Research**, v. 81, p. 261-268, set. 2015.
- LOTTI, T. et al. Pilot-scale evaluation of anammox-based mainstream nitrogen removal from municipal wastewater. **Environmental Technology**, v. 36, n. 9, p. 1167-1177, dez. 2014.
- LYBERATOS, G.; SKIADAS, I. V. Modelling of anaerobic digestion – a review. **Global NEST The International Journal**, v. 1, n. 2, p. 63-76, 1999.

MA, Bin et al. The feasibility of using a two-stage autotrophic nitrogen removal process to treat sewage. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 17, p. 8331-8334, set. 2011.

MA, B. et al. Suppressing Nitrite-oxidizing Bacteria Growth to Achieve Nitrogen Removal from Domestic Wastewater via Anammox Using Intermittent Aeration with Low Dissolved Oxygen. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2015.

MA, Jingwei et al. Microbial community dynamics and performance of simultaneous anammox and denitrification (SAD) process at varying substrate loadings during long-term operation. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 11, n. 3, p. 110225, 2023.

MA, Kaili et al. Effect of magnetite on anaerobic digestion treating saline wastewater: methane production, biomass aggregation and microbial community dynamics. **Bioresource Technology**, v. 341, p. 125783, dez. 2021.

MACÊDO, W. V. et al. Establishing simultaneous nitrification and denitrification under continuous aeration for the treatment of multi-electrolytes saline wastewater. **Bioresource Technology**, v. 288, 2019a.

MACÊDO, W. V. et al. The effect of cations ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , and  $\text{Ca}^{2+}$ ) on the activity and structure of nitrifying and denitrifying bacterial communities. **Science of The Total Environment**, v. 679, p. 279-287, 2019b.

MACÊDO, Williane Vieira. **Influência de diferentes sais e da pressão osmótica em sistema de tratamento de esgoto sanitário de regiões de escassez hídrica**. 187 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos, USP, São Carlos, 2018.

MADIGAN, Michael T. et al. **Microbiologia de Brock**, 14<sup>a</sup> ed., Porto Alegre: Artmed, 987p, 2016.

MAHLKNECHT, J. et al. Groundwater recharge in a sedimentary basin in semi-arid Mexico. **Hydrogeology Journal**, v. 12, n. 5, p. 511-530, 2004.

MALOVANY, A. et al. Ammonium removal by partial nitrification and Anammox processes from wastewater with increased salinity. **Environmental Technology**, v. 36, n. 5, p. 595-604, set. 2014.

MALOVANY, A. et al. Combination of upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor and partial nitrification/anammox moving bed biofilm reactor (MBBR) for municipal wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v. 180, p. 144-153, mar. 2015.

MCCARTY, P. L.; MCKINNEY, R. E. Salt toxicity in anaerobic digestion. **Journal Water Pollution Control Federation**, v. 33, n. 4, p. 399-415, abr. 1961.

METCALF & EDDY. **Wastewater Engineering: Treatment and Reuse**. 5th ed.; McGraw-Hill: New York, 2016. 1980 p.

MIAO, Yuanyuan et al. Partial nitrification-anammox (PNA) treating sewage with intermittent aeration mode: effect of influent C/N ratios. **Chemical Engineering Journal**, v. 334, p. 664-672, fev. 2018.

MISHRA, Saurabh et al. Nitrogen removal from wastewater: a comprehensive review of biological nitrogen removal processes, critical operation parameters and bioreactor design. **Journal Of Environmental Chemical Engineering**, v. 10, n. 3, p. 107387, jun. 2022.

- MOHAN, T.V. Krishna et al. Effect of C/N ratio on denitrification of high-strength nitrate wastewater in anoxic granular sludge sequencing batch reactors. **Ecological Engineering**, v. 91, p. 441-448, jun. 2016.
- MOJIRI, Amin et al. Integrated anammox-biochar in synthetic wastewater treatment: performance and optimization by artificial neural network. **Journal Of Cleaner Production**, v. 243, p. 118638, jan. 2020.
- MORALES, N. et al. Integration of the Anammox process to the rejection water and main stream lines of WWTPs. **Chemosphere**, v. 140, p. 99-105, dez. 2015.
- MOSEY, F. E. Mathematical modelling of the anaerobic digestion process: Regulatory mechanisms for the formation of short-chain volatile acids from glucose. **Water Science and Technology**, v. 15, p. 209–232, 1983.
- MOURA, Rafael B. et al. Carbon-nitrogen removal in a structured-bed reactor (SBRRRIA) treating sewage: operating conditions and metabolic perspectives. **Journal Of Environmental Management**, v. 224, p. 19-28, out. 2018.
- MULDER, A. et al. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. **Fems Microbiology Ecology**, v. 16, n. 3, p. 177-184, mar. 1995.
- MULLAI, P. et al. Methane production and recovery from wastewater. **Current Developments In Biotechnology And Bioengineering**, p. 17-36, 2020.
- MURATA, Kiemi de Brito et al. Pilot-scale study of a structured bed reactor for nitrogen and organic matter removal from sanitary sewage: advances and design challenges. **Research, Society And Development**, v. 10, n. 13, 22 out. 2021.
- NEJIDAT, Ali et al. Abundance and diversity of anammox bacteria in a mainstream municipal wastewater treatment plant. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 102, n. 15, p. 6713-6723, 1 jun. 2018.
- NELSON, Michael C. et al. A meta-analysis of the microbial diversity observed in anaerobic digesters. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 4, p. 3730-3739, fev. 2011.
- NI, S. Q.; NI, J. Y.; HU, D. L.; SUNG, S. Effect of organic matter on the performance of granular anammox process. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 701–705, 2012.
- NI, Shou-Qing; ZHANG, Jian. Anaerobic Ammonium Oxidation: from laboratory to full-scale application. **Biomed Research International**, v. 2013, p. 1-10, 2013.
- OLIVEIRA, Andreliza C. del Grossi et al. NMP de bactérias nitrificantes e desnitrificantes e sua relação com os parâmetros físico-químicos em lodo ativado para remoção biológica de nitrogênio de lixiviado de aterro sanitário. **Revista DAE**, v. 61, n. 192, p. 60-69, 2013.
- OUDE ELFERINK, S. L. W. H. et al. Sulfate reducing in methanogenic reactors. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 3, p. 217-243, 2018.
- PARK, Jeong-Hoon et al. Predominance of cluster I Clostridium in hydrogen fermentation of galactose seeded with various heat-treated anaerobic sludges. **Bioresource Technology**, v. 157, p. 98-106, abr. 2014.
- PAULA, Carolina Tavares. **Avaliação do desempenho de sistema de lodo ativado com pré-desnitrificação como pós-tratamento de reator UASB em região de clima quente**. 2018. 41 f.

Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2018.

PEETERS, S. H.; VAN NIFTRIK, L. Trending topics and open questions in anaerobic ammonium oxidation. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 49, p. 45-52, 2019.

PENG, Y.; ZHU, G. Biological nitrogen removal with nitrification and denitrification via nitrite pathway. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n. 1, p. 15-26, 2006.

PEREIRA, Tiago Duarte Santos. **Dinâmica e mecanismos da produção de óxido nítrico durante a remoção de nitrogênio em reatores biológicos contendo biomassa anammox enriquecida**. 2020. 136 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

PERNA, V. et al. Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 1, p. 54-62, 2013.

PROSSER, James I. et al. Nitrous oxide production by ammonia oxidizers: physiological diversity, niche differentiation and potential mitigation strategies. **Global Change Biology**, v. 26, n. 1, p. 103-118, 29 nov. 2020.

QI, P. et al. Performance of anammox process treating nitrogen-rich saline wastewater: kinetics and nitrite inhibition. **Journal Of Cleaner Production**, v. 199, p. 493-502, 2018.

QIU, Songkai et al. What's the best way to achieve successful mainstream partial nitrification-anammox application? **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 51, n. 10, p. 1045-1077, abr. 2020.

RAINEY, Frederick A. et al. The Taxonomic Status of the Fermentative Halophilic Anaerobic Bacteria: description of haloanaerobiales ord. nov., halobacteroidaceae fam. nov., orenia gen. nov. and further taxonomic rearrangements at the genus and species level. **Anaerobe**, v. 1, n. 4, p. 185-199, ago. 1995.

REGMI, P. et al. Control of aeration, aerobic SRT and COD input for mainstream nitrification/denitrification. **Water Research**, v. 57, p. 162-171, 2014.

REINO, C.; CARRERA, J. Low-strength wastewater treatment in an anammox UASB reactor: effect of the liquid upflow velocity. **Chemical Engineering Journal**, v. 313, p. 217-225, abr. 2017.

REN, Xinghao et al. The Nitrogen Removal Performance and Functional Bacteria in Heterotrophic Denitrification and Mixotrophic Denitrification Process. **Water**, v. 14, n. 22, p. 3603, nov. 2022.

RINZEMA, A.; VAN LIER, J.; LETTINGA, G. Sodium inhibition of acetoclastic methanogens in granular sludge from a UASB reactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, n. 1, p. 24-32, jan. 1988.

ROBINSON, R. A.; STOKES, R. H. Tables of osmotic and activity coefficients of electrolytes in aqueous solution at 25° C. **Transactions of the Faraday Society**, v. 45, p. 612-624, 1949.

ROBINSON, R. A.; STOKES, R. H.; WILSON, J. M. A Thermodynamic study of bivalent metal halides in aqueous solution. **Transactions of the Faraday Society**, v. 36, p. 733-748, fev. 1940.

ROESSLER, M.; MÜLLER, V. Osmoadaptation in bacteria and archaea: common principles and differences. **Environmental Microbiology**, v. 3, n. 12, p.743-754, 2001.

ROTHROCK, M. J. et al. Long-term preservation of anammox bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, p. 147–157, 2011.

ROVIROSA, N. et al. Coliform concentration reduction and related performance evaluation of a down-flow anaerobic fixed bed reactor treating low-strength saline wastewater. **Bioresource Technology**, v. 94, n. 2, p. 119-127, set. 2004.

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

SHANNON, M. A. et al. Science and technology for water purification in the coming decades. **Nanoscience and Technology**, v. 452, p. 10, 2009.

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

SILVEIRA, Natália Carolina da. **Avaliação dos processos de nitrificação parcial e anammox para o tratamento de efluente de UASB de fábrica de ração animal**. 2022. 145 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

SOUZA, Aline dos Reis et al. Evaluation of nitrogen removal and the microbial community in a submerged aerated biological filter (SABF), secondary decanters (SD), and horizontal subsurface flow constructed wetlands (HSSF-CW) for the treatment of kennel effluent. **Environmental Science And Pollution Research**, v. 27, n. 34, p. 43125-43137, 29 jul. 2020.

SPEECE, R. E. **Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters**. Nashville (TN): Archae Press. 393 p., 1996.

STAMS, Alfons J. M. et al. Exocellular electron transfer in anaerobic microbial communities. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 371-382, mar. 2006.

STOKES, R. H. A thermodynamic study of bivalent metal halides in aqueous solution, Part XVII - revision of data for all 2:1 and 1:2 electrolytes at 25°C, and discussion of results. **Transactions of the Faraday Society**, v. 44, p. 295–307, 1948.

STROUS, M. et al. Missing lithotroph identified as new planctomycete. **Nature**, v. 400, n. 6743, p. 446-449, jul. 1999.

STROUS, M., HEIJNEN, J.J., KUENEN, J.G., JETTEN, M.S.M. The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 50, n. 5, p. 589-596, 1998.

SUDMALIS, D. et al. Fast anaerobic sludge granulation at elevated salinity. **Water Research**, v. 128, p. 293-303, jan. 2018.

SUN, Ziyong et al. Hydrogeological and hydrogeochemical control of groundwater salinity in an arid inland basin: Dunhuang Basin, northwestern China. **Hydrological Processes**, v. 30, n. 12, p. 1884-1902, jan. 2016.

SYAZWANI, I.; NORSYAHARIATI, N.; DAUD, N.; AHSAN, A. Anaerobic Digestion of Domestic Wastewater in different Salinity Levels: The Adaptation Process. **Pertanika Journal of Science and Technology**, v. 25, n. 1, p. 211-220, jan. 2017.

TANG, Chong-Jian et al. Suppression of anaerobic ammonium oxidizers under high organic content in high-rate Anammox UASB reactor. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 6, p. 1762-1768, mar. 2010.

TORRES, Patrícia. **Desempenho de um reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) de bancada no tratamento de substrato sintético simulando esgotos sanitários**. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos, USP, São Carlos, 1992.

TRUESDELL, A. H.; JONES, B. F. Ion association in natural brines. **Chemical Geology**, v. 4, n. 1-2, p. 51-62, mar. 1969.

TRUESDELL, A. H.; JONES, B. F. WATEQ, a computer program for calculating chemical equilibria on natural waters. **Journal of Research of the US Geological Survey**, v. 2, p. 233-248, mar. 1974.

UYGUR, A.; KARGĐ, F. Salt inhibition on biological nutrient removal from saline wastewater in a SBR. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, n. 3-4, p. 313-318, 2004.

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

VAN DE VOSSENBERG, J. et al. The metagenome of the marine anammox bacterium 'Candidatus Scalindua profunda' illustrates the versatility of this globally important nitrogen cycle bacterium. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 1275-1289, maio 2012.

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 Research**, v. 41, n. 18, p. 4149-4163, out. 2007.

VAN KESSEL, Maartje A. H. J. et al. Complete nitrification by a single microorganism. **Nature**, v. 528, n. 7583, p. 555-559, nov. 2015.

VEIGA, M.C. et al. A new device for measurement and control of gas production by bench scale anaerobic digesters. **Water Research**, v. 24, n. 12, p. 1551-1554, dez. 1990.

VIANCELLI, A. et al. Bacterial biodiversity from an anaerobic up flow bioreactor with ANAMMOX activity inoculated with swine sludge. **Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1035-1041, 2011.

VON SPERLING, M., CHERNICHARO, C. A. de L. **Biological Wastewater Treatment in Warm Climate Regions**. IWA Publishing, London, 2005.

VOUTCHKOV, Nikolay. Energy use for membrane seawater desalination – current status and trends. **Desalination**, v. 431, p. 2-14, abr. 2018.

VYRIDES, I.; STUCKEY, D.C. A modified method for the determination of chemical oxygen demand (COD) for samples with high salinity and low organics. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 979-982, jan. 2009.

WANG, Chao et al. Achieving mainstream nitrogen removal through simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification process in an integrated fixed film activated sludge reactor. **Chemosphere**, v. 203, p. 457-466, jul. 2018a.

WANG, Depeng et al. Roles and correlations of functional bacteria and genes in the start-up of simultaneous anammox and denitrification system for enhanced nitrogen removal. **Science Of The Total Environment**, v. 655, p. 1355-1363, mar. 2019a.

WANG, G.; TANG, Z.; WEI, J.; LI, J. Effect of salinity on anammox nitrogen removal efficiency and sludge properties at low temperature. **Environmental Technology**, v. 41, n. 22, p. 2920-2927, 2019b.

WANG, Han et al. Underlying mechanisms of ANAMMOX bacteria adaptation to salinity stress. **Journal Of Industrial Microbiology And Biotechnology**, v. 46, n. 5, p. 573-585, maio 2019c.

WANG, Lingfeng et al. Light Irradiation Enables Rapid Start-Up of Nitritation through Suppressing nxrB Gene Expression and Stimulating Ammonia-Oxidizing Bacteria. **Environmental Science & Technology**, v. 19, n. 55, p. 13297-13305, set. 2021a.

WANG, S. et al. Exploring the role of heterotrophs in partial nitritation-anammox process treating thermal hydrolysis process - anaerobic digestion reject water. **Bioresource Technology**, v. 341, n. 2, 2021b.

WANG, Shaojie; HOU, Xiaocong; SU, Haijia. Exploration of the relationship between biogas production and microbial community under high salinity conditions. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, abr. 2017.

WANG, Wei et al. Performance robustness of the UASB reactors treating saline phenolic wastewater and analysis of microbial community structure. **Journal Of Hazardous Materials**, v. 331, p. 21-27, jun. 2017b.

WANG, Z. et al. Effect of the Ca<sup>2+</sup> concentration on anaerobic digestion and microbial communities of granular sludge. **Bioresources**, v. 13, n. 3, p. 6062-6076, jun. 2018b.

WANG, Z. et al. Long-term effects of salinity on extracellular polymeric substances, microbial activity and microbial community from biofilm and suspended sludge in an anoxic-aerobic sequencing batch biofilm reactor. **Journal of The Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 68, p. 275-280, nov. 2016.

WANG, Z.; VAN LOOSDRECHT, Mark C. M.; SAIKALY, Pascal E. Gradual adaptation to salt and dissolved oxygen: Strategies to minimize adverse effect of salinity on aerobic granular sludge. **Water Research**, v. 124, p. 702-712, nov. 2017.

WEIßBACH, Max et al. A proposed nomenclature for biological processes that remove nitrogen. **Environmental Science: Water Research & Technology**, v. 3, n. 1, p. 10-17, 2017.

WELSH, D.T. Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: from single cells to global climate. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 3, p. 263-290, 2000.

WEN, Xin et al. Efficient simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification (SNAD) system equipped with a real-time dissolved oxygen (DO) intelligent control system and microbial community shifts of different substrate concentrations. **Water Research**, v. 119, p. 201-211, ago. 2017.

WERNER, Jeffrey J. et al. Microbial Community Dynamics and Stability during an Ammonia-Induced Shift to Syntrophic Acetate Oxidation. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 80, n. 11, p. 3375-3383, jun. 2014.

WETT, B. et al. Expanding DEMON Sidestream Deammonification Technology Towards Mainstream Application. **Water Environment Research**, v. 87, n. 12, p. 2084-2089, 1 dez. 2015.

WINDEY, K.; BO, I.; VERSTRAETE, W. Oxygen-limited autotrophic nitrification–denitrification (OLAND) in a rotating biological contactor treating high-salinity wastewater. **Water Research**, v. 39, n. 18, p. 4512-4520, nov. 2005.



WU, L.; LI, Z.; ZHAO, C.; LIANG, D.; PENG, Y. A novel partial-denitrification strategy for post-anammox to effectively remove nitrogen from landfill leachate. **Science Of The Total Environment**, v. 633, p. 745-751, 2018.

WU, Rui Xin et al. Role of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> in changing biofilm structure and enhancing biofilm formation of *P. stutzeri* strain XL-2. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, v. 220, p. 112972, dez. 2022.

XIAO, Y.; ROBERTS, D. J. A review of anaerobic treatment of saline wastewater. **Environmental Technology**, v. 31, n. 8-9, p. 1025-1043, jul. 2010.

XIE, Fei et al. Enhancing nitrogen removal performance of anammox process after short-term pH and temperature shocks by coupling with iron-carbon micro-electrolysis. **Journal Of Cleaner Production**, v. 289, p. 125753, mar. 2021.

XING, B. et al. The properties of anaerobic ammonium oxidation (anammox) granules: Roles of ambient temperature, salinity and calcium concentration. **Separation and Purification Technology**, v. 147, p. 311-318, jun. 2015.

XING, H; WANG, H; FANG, F. et al. Effect of increase in salinity on ANAMMOX–UASB reactor stability. **Environmental Technology**, v. 38, n. 9, 2016.

XU, Guangjing et al. Partial nitrification adjusted by hydroxylamine in aerobic granules under high DO and ambient temperature and subsequent Anammox for low C/N wastewater treatment. **Chemical Engineering Journal**, v. 213, p. 338-345, dez. 2012.

XU, Jiajia et al. Particle size-dependent behavior of redox-active biochar to promote anaerobic ammonium oxidation (anammox). **Chemical Engineering Journal**, v. 410, p. 127925, abr. 2021.

YANG, Qing et al. Nitrogen Removal via Nitrite from Municipal Wastewater at Low Temperatures using Real-Time Control to Optimize Nitrifying Communities. **Environmental Science & Technology**, v. 41, n. 23, p. 8159-8164, dez. 2007.

YANG, M.; LIU, J.; ZHANG, X.; RICHARDSON, S. D. Comparative Toxicity of Chlorinated Saline and Freshwater Wastewater Effluents to Marine Organisms. **Environmental Science & Technology**, v. 49, n. 24, p. 14475-14483, nov. 2015.

YANG, Y.N.; SHENG, Q.; ZHANG, L.; KANG, H.Q.; LIU, Y. Desalination of saline farmland drainage water through wetland plants. **Agricultural Water Management**, v. 156, p. 19-29, jul. 2015.

YANG, Yandong et al. Achieve efficient nitrogen removal from real sewage in a plug-flow integrated fixed-film activated sludge (IFAS) reactor via partial nitrification/anammox pathway. **Bioresource Technology**, v. 239, p. 294-301, set. 2017.

YAOUTI, F. El et al. Salinization processes in the unconfined aquifer of Bou-Areg (NE Morocco): A geostatistical, geochemical, and tomographic study. **Applied Geochemistry**, v. 24, n. 1, p. 16-31, jan. 2009.

YI, Yuan; YONG, Huang; HUIPING, Deng. Effect of Salt on Anammox Process. **Procedia Environmental Sciences**, v. 10, p. 2036-2041, 2011.

YU, H.; TAY, J. H.; FANG, H. H. The roles of calcium in sludge granulation during UASB reactor start-up. **Water Research**, v. 35, n. 4, p. 1052-1060, mar. 2001.

YUAN, Quan et al. Morphological, kinetic, and microbial community characterization of anammox bacteria with different inoculations and biofilm types for low-ammonium wastewater treatment. **Journal Of Water Process Engineering**, v. 47, p. 102748, jun. 2022.

ZAIAT, M.; CABRAL, A.K.A.; FORESTI, E. Reator anaeróbio horizontal de leito fixo para tratamento de águas residuárias: concepção e avaliação preliminar de desempenho. **REBEQ**, v. 11, p. 33-42, 1994.

ZEB, I. et al. Kinetic and microbial analysis of methane production from dairy wastewater anaerobic digester under ammonia and salinity stresses. **Journal of Cleaner Production**, v. 219, p. 797-808, 2019.

ZEIKUS, J. G. et al. Isolation and description of *Haloanaerobium praevalens* gen. nov. and sp. nov., an obligately anaerobic halophile common to Great Salt Lake sediments. **Current Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 225-233, jul. 1983.

ZHANG, Anlong et al. Treatment of fracturing wastewater by anaerobic granular sludge: the short-term effect of salinity and its mechanism. **Bioresource Technology**, v. 345, p. 126538, fev. 2022.

ZHANG, Dongdong et al. Dynamic transition of microbial communities in response to acidification in fixed-bed anaerobic baffled reactors (FABR) of two different flow directions. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 7, p. 4703-4711, abr. 2011.

ZHANG, Jing et al. Adaptation to salinity: response of biogas production and microbial communities in anaerobic digestion of kitchen waste to salinity stress. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, n. 2, p. 173-178, ago. 2020a.

ZHANG, L. et al. Maximum specific growth rate of anammox bacteria revisited. **Water Research**, v. 116, p. 296-303, 2017.

ZHANG, Qiuting et al. High variations of methanogenic microorganisms drive full-scale anaerobic digestion process. **Environment International**, v. 126, p. 543-551, maio 2019.

ZHANG, Quan et al. Exogenous extracellular polymeric substances as protective agents for the preservation of anammox granules. **Science Of The Total Environment**, v. 747, p. 141464, dez. 2020b.

ZHAO, Jianwei *et al.* Potential impact of salinity on methane production from food waste anaerobic digestion. **Waste Management**, v. 67, p. 308-314, set. 2017.

ZHAO, Y. et al. Effect of different salinity adaptation on the performance and microbial community in a sequencing batch reactor. **Bioresource Technology**, v. 216, p. 808-816, 2016.

ZHAO, Yiyi et al. Biotreatment of high-salinity wastewater: current methods and future directions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 3, fev. 2020a.

ZHAO, Yiyi et al. Survey of dissimilatory nitrate reduction to ammonium microbial community at national wetland of Shanghai, China. **Chemosphere**, v. 250, p. 126-195, jul. 2020b.

ZHU, Guibing et al. Biological Removal of Nitrogen from Wastewater. **Reviews Of Environmental Contamination And Toxicology**, p. 159-195, 2008.

Zhu, W., et al. Storage without nitrite or nitrate enables the long-term preservation of full-scale partial nitrification/anammox sludge. **Science Of The Total Environment**, v. 806, 151330, 2022.

ZHU, Zebang et al. Insight into quorum sensing and microbial community of an anammox consortium in response to salt stress: from “*Candaditus Brocadia*” to “*Candaditus Scalindua*”. **Science Of The Total Environment**, v. 796, p. 148979, nov. 2021.

ZWIETERING, M. H. et al. Modeling of the Bacterial Growth Curve. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1875-1881, jun. 1990.



***EESC • USP***