

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

NATÁLIA CAROLINA DA SILVEIRA

Avaliação dos processos de Nitrificação parcial e Anammox para o tratamento de efluente de UASB de fábrica de ração animal

São Carlos

2022

NATÁLIA CAROLINA DA SILVEIRA

Avaliação dos processos de Nitrificação parcial e Anammox para o tratamento de efluente de UASB de fábrica de ração animal

Versão Corrigida

Tese apresentada à Escola da Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento

Área de Concentração: Hidráulica e Saneamento

Orientador: Prof. Tit. Eugênio Foresti

São Carlos

2022

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

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

SS587a Silveira, Natália Carolina da
Avaliação dos processos de Nitrificação parcial e Anammox para o tratamento de efluente de fábrica de ração animal / Natália Carolina da Silveira; orientador Eugênio Foresti. São Carlos, 2022.

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, 2022.

1. NP/A. 2. Anammox. 3. Desnitrificação heterotrófica. 4. Matéria orgânica. I. Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

Candidata: Bacharela **NATÁLIA CAROLINA DA SILVEIRA.**

Título da tese: "Avaliação dos processos de Nitrificação parcial e Anammox para o tratamento de efluente de UASB de fábrica de ração animal".

Data da defesa: 29/09/2022.

Comissão Julgadora

Resultado

Prof. Titular **Eugenio Foresti**

Aprovada

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

Profa. Dra. **Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic**

Aprovada

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

Profa. Dra. **Juliana Calábria de Araújo**

Aprovada

(Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG)

Profa. Dra. **Deize Dias Lopes**

Aprovada

(Universidade Estadual de Londrina/UEL)

Prof. Dr. **Rafael Brito de Moura**

Aprovada

(Universidade Federal de Alfenas/UNIFAL)

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

Prof. Dr. **Luiz Antonio Daniel**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Titular **Murilo Araujo Romero**

Com carinho e amor dedico este trabalho aos meus pais e irmãs, alicerces da minha vida

Agradecimentos

“É melhor viver do que ser feliz”

Vinícius de Moraes

Estes dias li essa frase e fiquei pensando... pensando nestes anos: 2020 a 2022. E decidi começar meus agradecimentos por aqui.

Agradecendo a Deus pelo dom da vida! Pois estar viva nesse momento deve ser o maior motivo de alegria de um ser humano que está passando por todo este caos mundial.

Estar viva e com a família saudável é outra oportunidade que outros milhares de pessoas já não têm mais. Pai, mãe, Naiara, Joyce, Liz e Vó Tereza (in memória), eu amo muito vocês. E sei que nunca serei capaz de retribuir o tamanho do esforço que todos fizeram para que eu estivesse aqui nesse momento. Naiara e Joyce, vocês podem não saber, mas são inspirações de mulheres fortes em minha vida!

E eu estou aqui, viva, com família, um emprego e defendendo o doutorado na USP. O doutorado que, por muitos anos, foi um sonho que jurava nunca ser capaz de realizar. Um sonho que ser concluído no meio de uma pandemia foi algo ainda mais difícil para uma pessoa ansiosa como eu. E eu jamais realizaria este meu sonho se não fossem as pessoas que caminharam comigo até aqui.

Ao professor Foresti, só tenho a agradecer pela paciência ímpar que sempre teve comigo. Pelo aluguel dos ouvidos, pelo ombro amigo e por toda a delicadeza na hora dos puxões de orelha e correções. Sua gentileza para com as palavras não é algo usual no meio acadêmico. Ser sua orientada é uma honra para mim e sinto muito orgulho em falar que estive ao seu lado. Não sou de longe a aluna que o senhor está acostumado: das notas altas da USP e centrada, mas sei que consegui desenvolver um trabalho que me trouxe muito conhecimento pessoal e hoje sou extremamente satisfeita com a profissional que me tornei, graças ao conhecimento que o senhor soube passar com tanta maestria.

Professora Márcia, muito obrigada pela coorientação, paciência e correções durante toda a fase experimental e de escrita. Por ser o suporte para o professor Foresti na parte de Anammox e por não deixa-lo desistir deste trabalho.

No LPB conheci profissionais incríveis e, graças a Deus, e um pouco de sorte, muitos deles se tornaram meus grandes amigos e motivadores deste trabalho.

GHDO, que sorte a minha o dia que Foresti e Márcia sugeriram que eu te procurasse. Eu não sei o que seria do meu trabalho, dos meus artigos sem você. Eu desejo que outros alunos tenham a sorte de te encontrar na vida. Que você siga seu caminho de professor e orientador, pois você nasceu para isso! Ô pessoa disciplinada, com uma didática incrível e incentivadora!

“Não é o Foresti” esse é nome do meu melhor trio acadêmico. Composto pelo Bruno Giz e Jean. O Giz, junto com a Renata, foram os que primeiro me ensinaram a lidar com reatores. “Giz, me socorre! Giz a bomba! Giz quero chorar!” E lá estava o Giz. Ele só olhava e sabia o que estava acontecendo. Que olhar clínico e certo. Já o Jean, era meu companheiro

dentro e fora do LPB, virou meu amigo/marido que me levava para concertos, festinhas com glíter no corpo e me ensinava a fazer os gráficos e figuras mais lindas que existem. Eu devia ter aproveitado mais da companhia de vocês, devia ter sentado todos os dias para escrever tudo o que eu tinha para escrever lá no LPB. Mas eu não dava conta e agora, distante, eu vejo o quanto isso me fez falta. Mas ainda bem que tiveram paciência comigo e a tecnologia foi nossa aliada.

Foresti, Márcia, GHDO, Giz e Jean, sem vocês isso aqui não existiria!

Minhas relações no LPB não se resumem a estas cinco pessoas, não, mas é que elas ocuparam um espaço muito grande quando estávamos juntos e continuaram agora, que estamos em estados e até em países diferentes.

Não posso deixar de agradecer aos companheiros das análises diárias. Ao Cebola que me ensinou que reator não nasceu para vazar (já que limpar aquela sala de reatores dia sim e o outro também era terrível) e me fez experct em morte e vida de Anammox. A Cris, Mariê, Lili, Pâmela, Alana, Jaque, Rachel, Heitor e Henrique, que diariamente estavam na sala de análises comigo, seja ouvindo música, cantando, falando em inglês, rindo ou chorando... pois se tem uma coisa que pós-graduando sabe fazer é chorar. A gente chora de alegria, chora de tristeza, de raiva, de ansiedade. Chora, porque o choro é livre! Ao Gui Soares que me ajudou nos exercícios de cinética e a entender que a gente é muito mais que os padrões que a sociedade exige e que é preciso coragem para nos assumirmos! São muitos os que passaram por mim, e de alguma forma se fizeram importantes. Era um prazer organizar os cafés, as lembranças de formatura e as despedidas, pois de alguma maneira, era minha forma de agradecer a cada um dos meus companheiros de trabalho.

As técnicas Carol, Janja, Bel e Elô, obrigada pela paciência e companheirismo nesses anos, já sinto muita saudade de ter vocês por perto. Agora quero saber quem vai organizar a limpeza e encher o saco de todo mundo como eu?!

Zaiat, como era bom poder conversar sobre assuntos diversos com alguém tão inteligente e claro nas colocações.

Jamille, minha colega de LPB, que acabou virando amiga de casa. Obrigada por todos os momentos vividos! Cumuruxatiba/BA está gravada em meu coração graças a você!

Este trabalho foi viabilizado pela empresa Incofap, através da doação da água residuária utilizada nesse estudo e isso só foi possível graças a engenheira Valéria Del Nery que, conseguiu acesso à indústria para coleta do efluente de UASB. E agradeço à Universidade de São Paulo, à Escola de Engenharia de São Carlos e ao Departamento de Hidráulica e Saneamento. Ao corpo técnico e administrativo do departamento: Sá, Priscila e Rose, por toda atenção, auxílio prestado ao longo de minha trajetória na pós-graduação. E também ao Conselho Nacional Científico e Tecnológico (CNPQ) pela bolsa concedida. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro para execução do trabalho.

Eu não poderia deixar de agradecer às famílias que me acolheram em São Carlos. Minha amiga e vizinha dona Izabel, que virou minha grande companheira dos cafés da tarde, almoços de domingo, pipoca à noite e de tomar sol nos jardins do condomínio. Ela e seus 89 aninhos foram minha fortaleza nos meses iniciais da pandemia. Só tenho a agradecer a ela, as filhas e ao neto que cuidaram de mim enquanto eu cuidava dela - Um amor mútuo!

Ao meu primeiro amigo de Sanca: André, que me deixou entrar na família dele sem ciúme nenhum e aos pais João e Vânia que abriram as portas da casa deles com tanto carinho, inclusive pude receber meus amigos em todos os meus aniversários lá. Que me deixaram passar um tempo com a Melody. Como eram bons os momentos que desfrutamos juntos. Na próxima ida a Bahia, vocês já têm parada obrigatória aqui em casa.

A minha terapeuta Roberta, que me acompanha desde o momento em que eu ainda não sabia se queria o doutorado. A caminhada ainda é longa, mas olhar para trás e escrever isso aqui, já é uma vitória.

Lu e Dany, amigas que a vivência no Rio de Janeiro me deu e que o cotidiano nos fez ainda mais presentes e essenciais, uma na vida da outra, a troca que nós temos é muito valiosa.

Manu e Débora, amigas do ensino médio, que nem o oceano Atlântico conseguiu separar! É incrível, como mesmo com vidas completamente diferentes, a gente encontra motivos para seguirmos! Eu amos todas vocês!

Não poderia deixar de agradecer aos meus amigos Sheila e Dalmir que confiaram em mim para a gestão de uma Estação de Tratamento de Efluentes onde, diariamente, posso colocar em prática todo o conhecimento adquirido ao longo desses anos de estudo. Além disso, agradeço imensamente por deixarem eu participar da família de vocês, pelos finais de semana na lagoa, e principalmente, por deixarem a Tia Tagarela amar o Bento e Maitê.

Outras tantas pessoas passaram em minha vida e foram significativas, entretanto, meu espaço é curto e eu finalizo aqui com um muito obrigada e desejo de que todos que cruzaram meu caminho, vivam bem cada minuto dessa experiência terrena, pois o amanhã é muito incerto. E que cada um, encontre motivos para ser feliz durante a jornada do viver!

“Sorri, trabalhando e aprendendo, auxiliando e amando sempre. Lembre-se de que o sorriso é o orvalho da caridade e que em cada manhã, o dia remanescente no céu é um sorriso de Deus.”

(Chico Xavier)

Resumo

SILVEIRA, Natália Carolina. **Avaliação dos processos de Nitrificação parcial e Anammox para o tratamento de efluente de fábrica de ração animal.** 2022. 146 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

A produção de insumos para fabricação de ração animal, a partir de resíduos de abatedouro de aves, gera efluente contendo elevadas concentrações de matéria orgânica e de nutrientes que trazem diversos prejuízos ao meio ambiente e por isso têm sido alvo de estudos recentes. O efluente de reator UASB usado no tratamento da água residuária de uma indústria desse ramo, contém residual de matéria orgânica e nitrogênio, sendo necessária sua remoção para a adequação ambiental do efluente final. O objetivo deste trabalho, é avaliar o processo de nitrificação parcial, seguido do processo Anammox (NP/A) para águas residuárias com altas concentrações de nitrogênio amoniacal e baixa relação C/N, como é o caso do efluente estudado, uma vez que este processo ser considerado uma alternativa tecnicamente viável e economicamente favorável para remoção de nitrogênio. A avaliação da NP foi feita utilizando-se dois tipos de reatores: reator de leito estruturado (R1.1) que, na Etapa I apresentou eficiência de oxidação de N-amoniaco de $30,6 \pm 15,4\%$ para TDH de $6,5 \pm 0,8$ horas e na Etapa II apresentou $42,8 \pm 12,3\%$ de remoção de N-amoniaco para TDH de $11,3 \pm 11,1$ horas e reator de biomassa suspensa (R1.2) que apresentou $49,2 \pm 19,4$ de eficiência de remoção de N-amoniaco. Nas condições adotadas, ambos os reatores se mostraram ineficientes para promover a NP na proporção adequada para a aplicação do processo Anammox. A carga de nitrogênio aplicada ao reator Anammox variou de 1,3 a 6,1 $\text{gN.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, sendo a relação C/N constante e igual a 0,5. Períodos com e sem correção das proporções estequiométricas dos componentes nitrogenados, pela adição de nitrito, foram avaliados e apresentaram interferência na eficiência de remoção de nitrogênio total ao longo de 440 dias de operação que foi de $78,5 \pm 18,21\%$. A manutenção da nitrificação parcial nas proporções desejadas foi a etapa mais crítica do uso dessa tecnologia. Análises microbiológicas tanto da biomassa aderida quanto da biomassa suspensa, realizadas ao final de cada experimento, revelaram a baixa taxa de abundância relativa de microrganismos BOA e BON, e predominância de microrganismos heterotróficos desnitrificantes nos reatores destinados à nitrificação parcial, o que pode justificar a instabilidade do processo para o tratamento da água residuária escolhida. No reator destinado ao processo Anammox, as análises microbiológicas do lodo granular em meio sintético e após a operação com água residuária real, indicaram o aumento de gêneros de espécies desnitrificantes heterotróficas, enquanto que a abundância relativa das espécies que realizam a oxidação anaeróbia da amônia diminuía. Embora ambas as espécies possam coexistir de forma sinérgica, a matéria orgânica contribuiu para o crescimento das espécies desnitrificantes e redução da proporção das bactérias responsáveis pelo processo Anammox.

Palavras-chave: NP/A, Anammox, desnitrificação heterotrófica, matéria orgânica

Abstract

SILVEIRA, Natália Silveira. **Two-stage partial nitrification-Anammox process for nitrogen removal from animal feed processing wastewater**. 2022. 146 p. These (PHD of Science) – School of Arts, Sciences and Humanities, University of São Paulo, São Paulo, 2022.

The production of animal feed from slaughterhouse by products is a predominant waste valorization route of the meat industry. This practice generates complex effluents containing high concentrations of organic matter and nutrients. The UASB reactor effluent used in the treatment of wastewater from a slaughterhouse by products in this field contains residual organic matter and nitrogen, and its removal is necessary for the environmental adequacy of the final effluent. The partial nitrification process followed by the Anammox process (PN/A) has been considered a technically viable and economically favorable alternative, particularly for wastewaters with high concentrations of ammonia and low COD/N ratios, such as case of the studied effluent. The efficiency of the Anammox process depends on the synergy between the existing species, in such a way that the organic matter is not inhibitory. The PN evaluation was performed using two types of reactors: structured bed reactor (R1.1) which, in Stage I, showed an ammonia oxidation efficiency of $30.6 \pm 15.4\%$ for TDH of 6.5 ± 0.8 hours and in Stage II it showed $42.8 \pm 12.3\%$ of removal of N-ammoniacal for TDH of 11.3 ± 11.1 hours and suspended biomass reactor (R1.2) which showed $49.2 \pm 19.4\%$ N-ammoniacal removal efficiency. Under the conditions adopted, both reactors proved to be inefficient to promote NP in the appropriate proportion for the application of the Anammox process. The nitrogen loading rate (NLR) in the Anammox reactor varied from 1.3 to $6.1 \text{ g N L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, with a constant COD/N ratio of $0.5 \pm 0.1 \text{ mg COD} \cdot \text{mg N}^{-1}$. Periods with and without correction of the stoichiometric proportions of the nitrogen components, by the addition of nitrite, were evaluated and showed interference in the efficiency of total nitrogen removal over 440 days of operation, which was $78.5 \pm 18.2\%$. Maintaining partial nitrification in the desired proportions was the most critical step in using this technology. Microbiological analyzes of both adhered and suspended biomass revealed the low rate of relative abundance of AOB and NOB microorganisms, and the predominance of denitrifying heterotrophic microorganisms in the reactors intended for partial nitrification, which may explain the instability of the process for the treatment of wastewater chosen. In the reactor intended for the Anammox process microbiological analyzes of both adhered and suspended biomass revealed a low rate of relative abundance of AOB and NOB microorganisms, and a predominance of denitrifying heterotrophic microorganisms in the reactors intended for partial nitrification, which may explain the instability of the process for the treatment of the chosen wastewater. In the reactor intended for the Anammox process, the microbiological analyses of the granular Anammox sludge performed before and after the operation revealed an increase in the population of heterotrophic denitrifying bacteria, while the relative abundance of Anammox species decreased. It was demonstrated that although both microbial groups can coexist synergistically, the presence of organic matter contributed to the growth of heterotrophic denitrifying species and impaired the growth of Anammox bacteria, without affecting system performance.

Keywords: PN/A, Anammox granule, denitrification, organic matter

Lista de Figuras

Figura 3.1- Principais rotas metabólicas exploradas em sistemas biológicos de remoção de nitrogênio.....	5
Figura 3.2 - Mecanismos metabólicos possíveis e localização celular dos sistemas enzimáticos envolvidos na oxidação anaeróbia do N-amoniacoal	9
Figura 3.3- Processo NP/A para remoção de nitrogênio	25
Figura 3.4 – Estratégias para projeto e operação de um reator NP/A em um ou dois estágios	30
Figura 3.5 - Organização modular da desnitrificação. Quatro módulos representam os sistemas respiratórios que utilizam (a) $N-NO_3^-$, (b) $N-NO_2^-$, (c) NO e (d) N_2O . A desnitrificação completa (h) é alcançada somente quando todos os quatro módulos estão ativados. As sobreposições pareadas (e, g, f) dos módulos respiratórios individuais ocorrem naturalmente em bactérias que utilizam outros N-óxido	32
Figura 4.1- Organograma dos experimentos. Em destaque estão as etapas adotadas durante o presente trabalho.....	41
Figura 4.2 - Esquema do aparato experimental, nos dois momentos (A – leito estruturado e B – biomassa em suspensão) com as correntes de entrada e saída de cada reator e componentes nitrogenados do meio reacional.....	42
Figura 4.3- Montagem do leito fixo estruturado de espuma de poliuretano.....	43
Figura 5.1- Curvas E(t) e F(t) obtidas a partir do ensaio hidrodinâmico	54
Figura 5.2 - Espécies nitrogenadas presentes durante o período de inoculação do reator R.1.1	55
Figura 5.3 - Leito estruturado antes e após o período de adaptação do lodo aeróbio.....	55
Figura 5.4 – (A) Concentração dos compostos nitrogenados e (B) oxigênio dissolvido no reator R1.1	57
Figura 5.5 - Mangueira de silicone acoplada na saída o R1.1, antes e depois de 90 dias de operação.....	59
Figura 5.6 - Microscopia de contraste de fase (A e B) e Microscopia eletrônica de varredura (C, D, E e F) da mangueira de silicone acoplada à saída do reator R1 após 20 dias de início da operação	60
Figura 5.7 – Razões observada e teórica de alcalinidade consumida por N-amoniacoal removido.....	64
Figura 5.8 – Perfil temporal do reator R1.1 para (a) concentração de alcalinidade afluente e efluente e pH; (b) razão entre amônia removida e alcalinidade consumida; (c) Amônia livre e ácido nitroso livre	67
Figura 5.9 - Resultados do monitoramento das diferentes formas de nitrogênio no reator R1.2. (A) NT Afluente e NT efluente; (B) N-amoniacoal efluente, N-nitrito e N-nitrato .	69

Figura 5.10 - Desempenho do reator R1.2 em relação à nitrificação parcial durante a operação	72
Figura 5.11 - Variação da concentração de oxigênio dissolvido ao longo da operação do reator R1.2	73
Figura 5.12 - Perfil temporal do reator R1.2 para (a) concentração de alcalinidade afluente e efluente e pH; (b) razão entre amônia removida e alcalinidade consumida; (c) Amônia livre e ácido nitroso livre	77
Figura 5.13 - Comparação dos microrganismos presentes nos reatores R1.1 e R1.2.....	79
Figura 5.14 - Taxa de abundância relativa dos microrganismos encontrados nas amostras do reator R1.1, a partir do banco de dados Midas 4 (A) abundância relativa superior a 0,1% e (B) taxa de abundância relativa superior a 1,0%	80
Figura 5.15 - Taxa de abundância relativa dos microrganismos encontrados nas amostras do reator R1.2, a partir do banco de dados Midas 4 (A) abundância relativa superior a 0,1% e (B) taxa de abundância relativa superior a 1,0%	81
Figura 5.16 -Taxa de abundância relativa dos filos encontrados nas amostras dos reatores R1.1 e R1.2.....	82
Figura 5.17 - (A) Resultado do monitoramento de NT afluente e das formas nitrogenadas presentes no reator R2; (B) concentração das espécies nitrogenadas e eficiência de remoção de NT no reator R2	89
Figura 5.18 – Biomassa (A) exposta às relações amônia/nitrito próximas à estequiométrica e (B) exposta à água residuária fora das concentrações estequiométricas ideais ao processo Anammox	90
Figura 5.19 – Concentração e eficiência de remoção de NT ao longo do período experimental	92
Figura 5.20 – Carga orgânica nitrogenada aplicada (CNA) e carga orgânica removida (CNR) do reator R2	93
Figura 5.21 Variações na performance do reator R2.....	95
Figura 5.22 Variação entre AL e CNR ao longo do procedimento experimental	96
Figura 5.23 Variação da concentração de DQO afluente e efluente no reator R2	97
Figura 5.24 - Visão esquemática do fluxo de carbono entre as populações envolvidas na remoção de N-amoniaco e matéria orgânica (Anammox, NP, desnitrificação, DNRA e N-damo).....	99
Figura 5.25 - Rotas de remoção de nitrogênio no reator R2 de acordo com o balanço de massa nitrogenado	100
Figura 5.26 Variação do pH afluente e efluente ao longo da operação do reator R2.....	101
Figura 5.27 - Taxa de abundância relativa dos filos encontrados nas amostras do reator R2 (A3: água residuária sintética e A4: água residuária real).....	103

Figura 5.28 - Composição taxonômica das comunidades microbianas ao nível ordem. As OTUs com menos de 1% de abundância (em cada amostra) foram incluídas no grupo 'Outros' para melhorar a visualização dos dados.....	104
Figura 5.29 - Taxa de abundância relativa dos gêneros encontrados nas amostras do reator R2 (A3 e A4).....	108
Figura 5.30 Interações propostas entre as principais associações funcionais de remoção de nitrogênio no sistema NP/A.....	110

Lista de tabelas

Tabela 3-1- Parâmetros operacionais que favorecem a ocorrência dos processos biológicos relacionados remoção do nitrogênio.....	13
Tabela 3-2– Taxas de crescimento e tempo de duplicação da biomassa Anammox em diferentes temperaturas.....	15
Tabela 3-3- Pesquisas com inibição por N-nitrito da atividade Anammox.....	19
Tabela 3-4 – Variações da carga nitrogenada aplicada em processos Anammox	21
Tabela 3-5 – Aplicação dos processos NP/A em diferentes trabalhos	29
Tabela 3-6 – Coexistência de Anammox e desnitrificação em reatores em escala laboratorial e escala plena.....	35
Tabela 3-7– Efeito das condições ambientais sobre microrganismos Anammox e desnitrificantes.....	39
Tabela 4-1- Fases de operação do sistema e os parâmetros operacionais adotados	44
Tabela 4-2- Caracterização do efluente da fábrica de insumos para ração animal (efluente filtrado) e do efluente após diluição	45
Tabela 4-3- Parâmetros operacionais do R2 em cada fase	46
Tabela 5-1 - Valores médios dos principais parâmetros de desempenho d reator R1.1 ao longo da operação.....	62
Tabela 5-2 - Balanço de alcalinidade em cada etapa para o reator R1.1	63
Tabela 5-3 – Principais variáveis de monitoramento do desempenho do reator R1.2	68
Tabela 5-4 - Condições operacionais do reator R1.2.....	71
Tabela 5-5 – Relações e variáveis observadas no Reator R1.2	71
Tabela 5-6 – Balanço da alcalinidade no reator R1.2.....	74
Tabela 5-7 - Riqueza relativa e índice de diversidade das amostras	78
Tabela 5-8 Riqueza relativa e índice de diversidade das amostras.....	79
Tabela 5-9 - Parâmetros e condições experimentais utilizadas no reator R2	88
Tabela 5-10 - Principais parâmetros de desempenho do reator R2 em cada fase experimental	91
Tabela 5-11 - Alcalinidade para o reator R2	101
Tabela 5-12 - Riqueza relativa e índice de diversidade das amostras	102

Lista de abreviaturas e siglas

ABRA	Associação Brasileira de Reciclagem Animal
AL	Amônia livre
Anammox	<i>Anaerobic Ammonium Oxidation</i>
ANL	Ácido nitroso livre
AnAOB	Bactérias anaeróbias oxidadoras de amônia
BH	Bactérias heterotróficas
BOA	Bactérias oxidadoras de amônia
BON	Bactérias oxidadoras de nitrito
BRS	Bactérias redutoras de sulfato
CNA	Carga Nitrogenada Volumétrica Aplicada
CNR	Carga Nitrogenada Volumétrica Removida
COT	Carbono Orgânico Total
DP/A	Desnitrificação parcial seguida pelo processo Anammox
DNRA	Redução dissimilatória do N-nitrato para N-amoniaco
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EESC	Escola de Engenharia de São Carlos
EGSB	Reator de leito granular expandido
LPB	Laboratório de Processos Biológicos (EESC/USP)
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Nar	Nitrato redutase
NAR	Taxa de acúmulo de N-nitrito
NDS	Nitrificação e Desnitrificação Simultânea
Nir	Nitrito redutase
Nor	Óxido nítrico redutase
NP	Nitrificação parcial
NP/A	Nitrificação parcial seguida pelo processo Anammox
NT	Nitrogênio total
OD	Oxigênio dissolvido
OMS	Organização Mundial de Saúde
pH	Potencial hidrogeniônico
PPG-SHS	Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento (EESC/USP)
RBS	Reator de batelada sequencial
RSBA	Reator sequencial em bateladas alimentadas
SHS	Departamento de Hidráulica e Saneamento
SNAD	Simultaneous Partial Nitrification, Anammox and Denitrification (Nitrificação parcial, anammox e desnitrificação simultâneos)
SSF	Sólidos Suspensos Fixos
SST	Sólidos Suspensos Totais
SSV	Sólidos Suspensos Voláteis
ST	Sólidos Totais
STF	Sólidos Totais Fixos
STV	Sólidos Totais Voláteis
TDH	Tempo de Detenção Hidráulica

TRC	Tempo de Retenção Celular
UASB	<i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket</i> reactor (reator de anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo)
UBF	Reator de biofilme de fluxo ascendente
USP	Universidade de São Paulo

Sumário

1	Introdução.....	1
2	Hipótese e objetivos.....	3
3	Revisão Bibliográfica	4
3.1	<i>Ciclo do nitrogênio</i>	4
3.1.1	Nitrificação parcial	6
3.2	<i>Processos baseados na desnitrificação autotrófica.....</i>	7
3.2.1	Anammox	8
3.2.1.1	Parâmetros de controle e inibição do processo Anammox	12
3.2.1.2	Processo Nitrificação parcial/Anammox – NP/A	25
3.2.1.3	Processo com acoplamento Anammox e redução do N-nitrato	31
4	Material e métodos.....	40
4.1	<i>Organograma experimental.....</i>	40
4.2	<i>Aparato Experimental.....</i>	41
4.3	<i>Operação dos reatores para nitrificação parcial.....</i>	43
4.3.1	Reator R1.1	43
4.3.2	Reator R1.2.....	44
4.3.3	Inóculo.....	44
4.3.4	Adaptação do inóculo	44
4.3.5	Água residuária.....	45
4.4	<i>Operação do reator Anammox.....</i>	46
4.4.1	Inóculo.....	47
4.4.2	Água residuária.....	47
4.5	<i>Monitoramento dos reatores.....</i>	47
4.6	<i>Ensaio hidrodinâmico.....</i>	48
4.7	<i>Análises físico-químicas.....</i>	49
4.8	<i>Análise estatística.....</i>	50
4.9	<i>Balanço de massa.....</i>	50
4.10	<i>Análises Microbiológicas.....</i>	50

4.10.1	Extração do DNA genômico	50
4.10.2	Sequenciamento do gene 16S rRNA	51
4.10.3	Cálculos de índices ecológicos	52
4.11	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV</i>	52
4.12	<i>Microscopia ótica de contraste de fase e de fluorescência</i>	53
5	Resultados e Discussão	53
5.1	<i>Nitrificação parcial</i>	53
5.1.1	Monitoramento do Reator de leito estruturado - R1.1	53
5.1.1.1	Ensaio hidrodinâmico	53
5.1.1.2	Adaptação do inóculo	54
5.1.1.3	Remoção de nitrogênio	56
5.1.1.4	Alcalinidade e pH	63
5.1.2	Reator de biomassa suspensa	68
5.1.2.1	Remoção de nitrogênio	68
5.1.2.2	Oxigênio dissolvido	72
5.1.2.3	Alcalinidade e pH	74
5.1.2.4	Análise microbiológica	78
5.2	<i>Monitoramento do reator R2</i>	87
5.2.1	Remoção de nitrogênio	87
5.2.2	Amônia livre e ácido nitroso livre	94
5.2.3	Compostos nitrogenados e DQO	97
5.2.4	Alcalinidade e pH	100
5.2.5	Análises microbiológicas	102
6	Conclusão	110
7	Referências Bibliográficas	112

1 Introdução

A reciclagem animal é uma atividade realizada em todo o mundo, indispensável para a sustentabilidade da cadeia produtiva de proteína animal. Essa atividade gera benefícios ambientais, pois evita que os resíduos oriundos do abate de animais sejam destinados incorretamente (incineração) ou descartados em lixões e/ou aterros. Ao realizar o recolhimento e a destinação correta dos resíduos das indústrias, o setor da reciclagem animal produz ingredientes que são utilizados por diversos setores: alimentação animal, rações para pets, agricultura, indústria farmacêutica entre outras (ABRA, 2020).

No processo produtivo, a proteína animal é extraída da chamada carcaça, parte aproveitada dos animais, que representa o animal abatido, sangrado, desprovido da cabeça, patas e, rabada, dentre outras características peculiares a cada animal. Essas partes não aproveitadas são os resíduos do abate, representados principalmente pelo sangue, cabeça, vísceras, penas, cascos, aparas de gordura, além de resíduos de processamento ou industrialização da carne. O setor de reciclagem animal é formado por indústrias que processam esses resíduos. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a reciclagem animal é atividade de significativa importância para o desenvolvimento sustentável, sendo classificada como uma “atividade de interesse público” e importante relevância ambiental. Esta agroindústria recebe essa classificação, pois se responsabiliza em retirar do ambiente os resíduos do abate dos animais, que possuem alto potencial para causar danos ambientais, sanitários e econômicos, transformando-os em coprodutos utilizados em diversas indústrias.

No processo industrial para fabricação de farinha de origem animal, ocorre a digestão dos resíduos sob elevada pressão e temperatura, são gerados gases, cujo condensado juntamente com as águas de lavagem formam os efluentes líquidos, ricos em matéria orgânica e nitrogênio.

Em 2020, a produção nacional de farinhas de origem animal chegou a 3.633.273 toneladas, apresentando 6% de aumento em comparação a 2010. Desta produção, 188.744 toneladas, ou seja, 94% são destinadas à exportação, o que gerou US\$ 98.020.000 de receita, em 2020 (ABRA, 2020).

Tendo em vista o aumento na produção de ração animal com consequente aumento na geração de resíduos por essa atividade, torna-se necessário o estudo de tecnologias

para o tratamento dos efluentes gerados por essas indústrias. A utilização de sistemas biológicos para remoção da fração orgânica tem sido utilizada para remoção de matéria orgânica no segmento industrial de produção de proteína animal e nas indústrias associadas, como as de produção de ração. Portanto, torna-se necessária a adoção de unidades de pós tratamento dessas águas residuárias, uma vez que os sistemas de tratamento em nível secundário, em geral, são ineficientes na remoção de nutrientes, como no caso de sistemas anaeróbios de tratamento (LI et al., 2017a; ZHU et al., 2017).

A remoção de compostos nitrogenados de efluentes de reatores anaeróbios requer que esses compostos sejam oxidados em uma primeira etapa de nitrificação a nitrato ou nitrito e, posteriormente, reduzidos a nitrogênio gasoso (N_2). A nitrificação a nitrito é denominada Nitrificação Parcial (NP). Existem muitas alternativas tecnológicas para a remoção de nitrogênio de efluentes de reatores anaeróbios nas quais a nitrificação aeróbia autotrófica (completa ou parcial) é seguida pela desnitrificação heterotrófica ou autotrófica.

Entre os processos mais pesquisados recentemente sobre a desnitrificação autotrófica, encontra-se o processo Anammox (*Anaerobic Ammonia Oxidation*), observado inicialmente por (MULDER et al., 1995). Os organismos responsáveis pelo processo, denominados genericamente por bactérias Anammox, são organismos quimioautotróficos que usam nitrogênio amoniacal como doador de elétrons e nitrito como receptor de elétrons para produzir N_2 .

Assim, a remoção de nitrogênio de muitos efluentes pode ser obtida pela combinação dos processos NP e Anammox (NP/A) em sistemas com um ou mais reatores.

A empresa INCOFAP, produtora de insumos para fabricação de ração animal, possui um sistema de tratamento composto de reator de fluxo ascendente com manta de lodo (UASB) e lagoa aerada, seguida por um sistema de flotação por ar dissolvido. O sistema visa principalmente a remoção de matéria orgânica. Para o presente estudo, utilizou-se o efluente do reator UASB da empresa INCOFAP para avaliação de estratégias para remoção da matéria orgânica remanescente e da carga nitrogenada.

Dadas as características do efluente citado, o estudo dos processos de remoção de nitrogênio via Anammox apresenta ótimas perspectivas, quando acoplado à nitrificação parcial. Assim, é imprescindível estudar as condições operacionais que permitam a remoção da matéria orgânica remanescente e o nitrogênio do efluente de UASB para a avaliação de sua aplicação para essa classe de água residuária.

2 Hipótese e objetivos

Hipótese A: O processo NP/A será estável em termos de oxidação do N-amoniaco a nitrogênio gasoso.

Objetivo: Avaliar a estabilidade do processo de Nitrificação parcial/Anammox em termos de eficiência de remoção de nitrogênio e remoção de DQO, tratando água residual real de indústria de produção de insumos para ração animal.

Hipótese B: O reator de leito estruturado será capaz de proporcionar a ocorrência da oxidação do N-amoniaco a N-nitrito, a partir da seleção das bactérias oxidadoras de amônia (BOA) em detrimento das bactérias oxidadoras de nitrito (BON).

Objetivo: Verificar a ocorrência da nitrificação parcial de uma água residual real, com alta concentração de N-amoniaco e baixa concentração de matéria orgânica, em reator de leito estruturado sob baixas concentrações de oxigênio dissolvido ($OD < 2,0 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$).

Hipótese C: O controle do tempo de retenção celular (TRC) irá proporcionar a lavagem das BON e desta forma, favorecerá a nitrificação.

Objetivo: Utilizar um reator de biomassa suspensa, como estratégia de controle da idade do lodo e, assim, criar condições desfavoráveis para o crescimento e permanência das bactérias oxidadoras de nitrito (BON) no reator.

Hipótese D: A matéria orgânica remanescente do processo de nitrificação parcial poderá ter efeito inibitório sob a comunidade Anammox.

Objetivo: Estudar os possíveis efeitos inibitórios da matéria orgânica, presente no efluente anaeróbio em questão, sobre o processo Anammox.

Hipótese E: Ao longo do período de operação, haverá predominância de microrganismos nitrificantes no reator de nitrificação parcial e de microrganismos Anammox no reator Anammox.

Objetivo: Verificar e comparar a composição da comunidade microbiana, ao longo dos experimentos.

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Ciclo do nitrogênio

O nitrogênio atua no metabolismo dos seres vivos, sendo o constituinte básico de aminoácidos, proteínas e ácidos nucléicos. Está presente em todo ecossistema terrestre e sob diferentes formas e estados oxidativos: nitrogênio orgânico (N-org), nitrogênio amoniacal (N-amoniacal ou $N - NH_4^+$), nitrito (N-nitrito ou $N - NO_2^-$), nitrato (N-nitrato ou $N - NO_3^-$), óxido nitroso (N_2O), óxido nítrico (NO) e nitrogênio gasoso (N_2). Existem outras formas, mas estas são as diretamente ligadas aos processos escolhidos durante a realização deste trabalho.

As rotas bioquímicas envolvendo o nitrogênio são apresentadas na Figura 3.1, e as reações simplificadas, que representam os processos de remoção do nitrogênio, desconsiderando a assimilação do nitrogênio pelas bactérias para a síntese do material celular, são apresentadas a seguir:

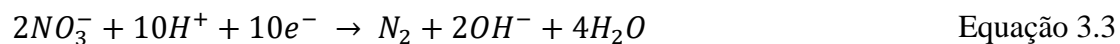
Nitritação



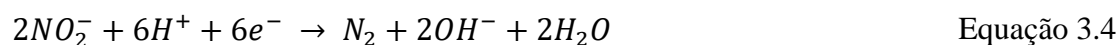
Nitratação



Desnitrificação heterotrófica do Nitrato



Desnitrificação heterotrófica do Nitrito



Anammox simplificada



Acoplamento Anammox com redução do Nitrato

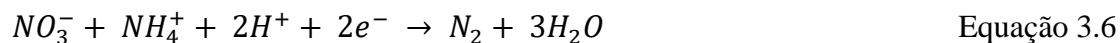
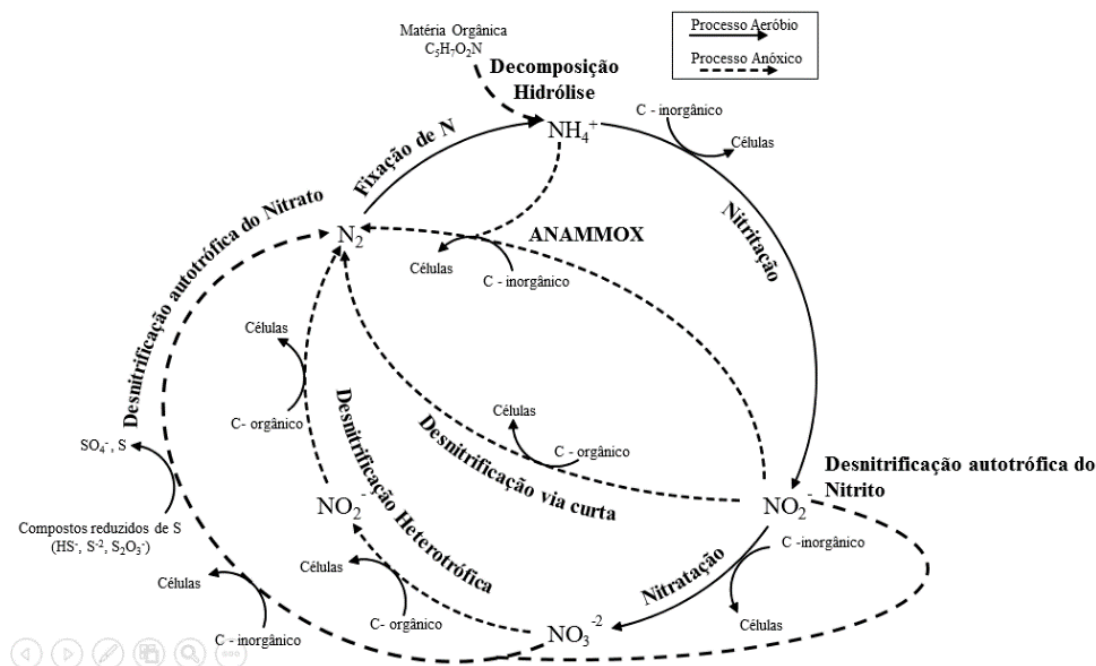


Figura 3.1- Principais rotas metabólicas exploradas em sistemas biológicos de remoção de nitrogênio



Fonte: SILVA (2016)

A fim de evitar o desequilíbrio no ecossistema, causados pelo excesso de nitrogênio, deve-se investir em alternativas de remoção dos compostos nitrogenados. Sistemas convencionais, que promovem a remoção do nitrogênio do meio líquido, são compostos por duas unidades. A primeira unidade destinada à nitrificação e a segunda à desnitrificação. A unidade nitrificante é provida de aeração e requer baixa concentração de matéria orgânica no afluente. A desnitrificação ocorre em uma unidade anóxica, com ou sem adição de fonte externa de carbono (AHN, 2006). Nestes sistemas, a biomassa responsável pela manutenção dos processos estão aglomeradas em flocos e são mantidas em suspensão, nos reatores, por meio de aeradores ou agitadores. A biomassa do efluente é removida em unidade subsequente de separação (ex. decantador). Os sistemas convencionais demandam diversas unidades de tratamento e apresentam complexidade operacional. Para alcançar níveis satisfatórios de eficiência de remoção, é necessário o controle da taxa de recirculação, da alcalinidade e a dosagem de carbono exógeno. Devido à complexidade dos sistemas convencionais, novas tecnologias estão em desenvolvimento, de forma a diminuir os custos de implantação, manutenção e operação dos sistemas que visam a remoção do nitrogênio do meio líquido. O processo

NP/Anammox (Equação 3.10) desponta como alternativa importante nesse cenário e será abordada no item 3.2.1.2.

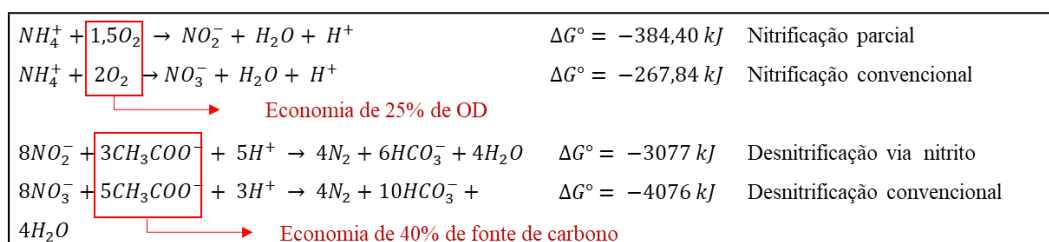
3.1.1 Nitrificação parcial

Na nitrificação parcial, a oxidação do N-amoniaco é interrompida em N-nitrito, reduzindo a necessidade de aporte de oxigênio e a disponibilidade de doadores de elétrons para desnitrificação. Os processos de remoção biológica do nitrogênio que utilizam a nitrificação parcial apresentam menores custos operacionais e por isso, diversos estudos são realizados a fim de identificar e otimizar os parâmetros de controle que favorecem este processo (CIUDAD et al., 2005; LIANG; LIU, 2007; WAKI et al., 2007).

Diversas são as estratégias estudadas a fim de verificar a viabilidade da nitrificação parcial para diferentes tipos de águas residuárias (esgoto doméstico, lixiviado de aterro, esgoto municipal). A remoção do N-amoniaco via N-nitrito pode ser obtida com acúmulo das bactérias oxidadoras de amônia (BOA) e/ou inibição ou lavagem das bactérias oxidadoras de nitrito (BON). Isso ocorre devido a diferentes reações fisiológicas e também em resposta às condições operacionais (GE et al., 2015).

Considerando a versatilidade das bactérias nitrificantes, a nitrificação parcial apresenta, como vantagens, a redução de 25% no consumo de oxigênio dissolvido, além da redução de 35% na produção de lodo e de 40% na demanda de DQO pela via nitrito, quando comparada à desnitrificação via nitrato (Quadro 3.1) (NHAT et al., 2017; STROUS et al., 1997; TANG et al., 2014; VAN DONGEN; JETTEN; LOOSDRECHT, 2001; VAN KEMPEN R.; MULDER J.W.; UIJTERLLNDE C.A.; VAN LOOSDRECHT, 2001).

Quadro 3.1 – Vantagens energéticas da nitrificação parcial em relação ao processo de nitrificação e desnitrificação convencional



Fonte: SILVA FILHO (2009)

Alguns fatores colaboram para que as BOA predominem em reatores. A atividade das BON está diretamente relacionada à concentração de amônia livre. Valores superiores a $1,0 \text{ mgN-NH}_3\text{.L}^{-1}$ provocam um decréscimo exponencial da atividade das BON (ANTHONISEN et al., 1976). A atividade das *Nitrobacter* apresentam melhores resultados em temperaturas relativamente baixas, de 10 a 20°C. Assim, em temperaturas superiores a 25°C, há maior atividade das BOA em relação as BON, favorecendo o acúmulo de nitrito no meio (VERSTRAETE, W.; PHILIPS, 1998). A seleção das BOA pode ser favorecida pelo processo de lavagem das BON, submetendo o sistema à vazão de alimentação superior à velocidade específica de crescimento das BON. A utilização de hidroxilamina para inibição do crescimento das BON durante a etapa de nitrificação parcial tem sido sugerida por alguns autores, como Cho et al. (2011); Okabe et al. (2011) e Tang et al. (2014). A manutenção da concentração de oxigênio dissolvido (OD) abaixo de $1,0 \text{ mgO}_2\text{.L}^{-1}$ favorece as bactérias oxidadoras de amônia (GUO et al., 2009; EGLI et al., 2003; PARK, S.; BAE, W.; RITTMAN, 2009).

É geralmente aceito que baixas concentrações de OD são melhores para o processo de nitrificação parcial do que altas concentrações de OD. Bao et al. (2017), estudaram a inibição das BON no processo de nitrificação parcial, através da variação na concentração de OD. Durante o período de baixa concentração de OD ($0,3 \pm 0,14 \text{ mgO}_2\text{.L}^{-1}$), houve aumento de 60% de abundância relativa das bactérias *Nitrospira* (responsáveis pela oxidação do N-nitrito), o que resultou na nitrificação completa e estável do N-amoniaco afluente. Após o período com concentração de OD entre 1,5 e 2,0 $\text{mgO}_2\text{.L}^{-1}$, foi alcançada a nitrificação parcial e decaiu a abundância relativa das *Nitrospira*. Verificou-se que a mudança brusca de uma condição de baixo OD para alto OD poderia inibir a atividade e abundância de bactérias oxidadoras de N-nitrito, o que favoreceu a nitritação.

Numerosos parâmetros (fatores individuais ou múltiplos) foram propostos, e a viabilidade da nitrificação parcial também foi verificada em processos de tratamento biológico com vários tipos de efluentes. As principais estratégias de controle da nitrificação parcial são temperatura, pH, OD, tempo de retenção de lodo (GE et al., 2015).

3.2 Processos baseados na desnitrificação autotrófica

A diversidade e a flexibilidade dos microrganismos envolvidos no ciclo do nitrogênio permitem o avanço na proposição de novos processos e tecnologias para

remoção do N- amoniacal das águas residuárias. Segundo Egli et al. (2003), o processo convencional, apesar de amplamente empregado, apresenta desvantagens (ex. alto consumo de oxigênio, requerimento de grande quantidade de matéria orgânica como acceptor de elétrons e dificuldade de eliminação de altas concentrações de nitrogênio) quando comparado com as novas tecnologias, tais como a desnitrificação autotrófica, nitrificação por via curta, sistemas de nitrificação e desnitrificação simultâneas (NDS) e o processo de nitrificação parcial seguido do processo Anammox (NP/A).

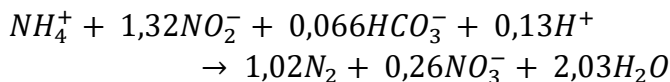
3.2.1 Anammox

A aplicação das bactérias Anammox fornece uma alternativa econômica às atuais tecnologias de tratamento de águas residuárias ricas em compostos nitrogenados. Esta rota tornou-se importante nas pesquisas desde seus experimentos iniciais, datados de mais de duas décadas atrás, e é considerada como um processo promissor, devido à redução de 90% dos custos operacionais, por não necessitar de fonte de carbono, pela menor produção de lodos devido à baixa velocidade de duplicação de microrganismos Anammox e por não gerar gás carbônico (CO₂). Além disso, apresenta vantagens como maior eficiência de remoção de nitrogênio e menores requisitos de área. É considerado um processo neutro em termos energéticos. Kartal; Kuenen; Van Loosdrecht, (2010) afirmaram que a implementação de processos de remoção de nitrogênio de alta taxa, como o Anammox, para o tratamento de águas residuárias, oferece uma enorme oportunidade de tornar o tratamento não apenas sustentável, mas, também, uma base para a produção de água limpa que pode ser reciclada para diversos fins.

O processo de oxidação anaeróbia da amônia (Anammox) foi primeiramente observado em reator desnitrificante de leito fluidizado (MULDER et al., 1995). Baseia-se no metabolismo de bactérias quimiautotróficas, ou seja, que usam CO₂ como a única fonte de carbono (JETTEN et al., 1998; STROUS, M., HEIJNEN, J. J., KUENEN, J. G., & JETTEN, 1998). Sob condições anóxicas, o N-amoniaco é oxidado a nitrogênio gasoso, utilizando o N-nitrito como acceptor de elétrons (Equação 3.5) (KARTAL; KELTJENS; JETTEN, 2008; STROUS, M., HEIJNEN, J. J., KUENEN, J. G., & JETTEN, 1998). A principal vantagem desse processo é tornar desnecessária a adição de fonte de carbono orgânico exógena para que ocorra a redução de formas oxigenadas de

nitrogênio. A principal desvantagem é que o crescimento destes microrganismos é lento, com tempo de duplicação de 11 dias (STROUS et al., 1998). A estequiometria global do processo, é representada pela Equação 3.7 (VAN DE GRAAF et al., 1995).

Anammox



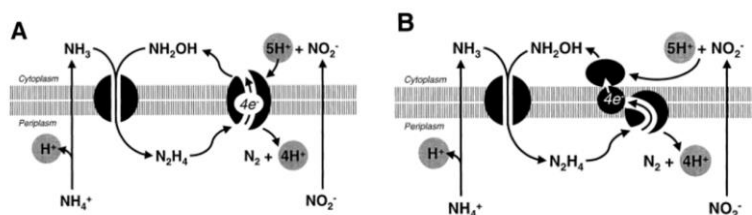
Equação 3.7

Os microrganismos capazes de oxidar anaerobiamente o N-amoniacal, usando o N-nitrito como acceptor de elétrons são conhecidos como bactérias Anammox. Na classificação biológica, tem-se as bactérias Anammox pertencentes ao Domínio *Bacteria*; Filo *Planctomycetes*; Classe *Planctomycetia*; Ordem *Brocadiales*; Família *Candidatus Brocadiaceae* e os Gêneros “*Candidatus Brocadia*”, “*Ca. Kuenenia*”, “*Ca. Scalindua*”, “*Ca. Anammoxoglobus*” e “*Ca. Jettenia*” (KARTAL et al., 2011).

As etapas metabólicas envolvidas na oxidação anaeróbia do N-amoniacal não são totalmente conhecidas e os mecanismos propostos são apresentados na Figura 3.2. Durante a oxidação do N-amoniacal, a hidroxilamina (NH_2OH) é utilizada como acceptor de elétrons, formando a hidrazina (N_2H_4) como intermediário. A conversão da hidrazina em nitrogênio gasoso gera elétrons que reduzem o N-nitrito a hidroxilamina (JETTEN et al., 1998; KARTAL et al., 2011).

A conversão da hidrazina em N_2 pode ser descrita como uma reação que gera elétrons equivalentes para a redução do N-nitrito em hidroxilamina. Esta redução do N-nitrito e oxidação da hidrazina podem ocorrer em locais diferentes da mesma enzima (Figura 3.2 A) ou as reações podem ser catalisadas por diferentes sistemas enzimáticos conectados via cadeia de transporte de elétrons (Figura 3.2 B) (JETTEN et al., 1998).

Figura 3.2 - Mecanismos metabólicos possíveis e localização celular dos sistemas enzimáticos envolvidos na oxidação anaeróbia do N-amoniacal



Fonte: Jetten et al. (1998)

As bactérias Anammox possuem forma de cocos e um compartimento intracelular provido de membrana, onde estão localizadas enzimas que possibilitam a oxidação anaeróbia do N-amoniaco (FUERST; SAGULENKO, 2011). A elevada concentração de citocromos na membrana das células confere coloração avermelhada característica às Anammox (JETTEN et al., 1998).

A utilização destes microrganismos, que apresentam metabolismo singular, para remoção de compostos nitrogenados no tratamento de efluente, está em expansão. Há vinte anos atrás, acreditava-se na lenta partida dos sistemas baseados em processo Anammox e instável desempenho do processo devido ao tempo de duplicação em torno de 11 dias, ao baixo rendimento de biomassa e da sensibilidade às condições ambientais (STROUS et al., 1998). Além disso, o emprego do processo Anammox, em larga escala, ainda é limitado devido à necessidade de rigoroso controle do processo, e dos parâmetros como pH, temperatura, concentração do substrato e de substâncias inibitórias. Atualmente, são apresentadas estratégias que integram avanços tecnológicos alinhados com observações empíricas que permitem avanços na modelagem e na seleção dos microrganismos desejados (AGRAWAL et al., 2018; LI et al., 2018a, 2020).

Até 2017 existiam cerca de 114 instalações, em escala plena, utilizando o processo Anammox no mundo (ALI; OKABE, 2015; LACKNER et al., 2014; MAO et al., 2017). Destas, 88 estações estão localizadas na Europa, a Ásia conta com 13 e América do Norte com 8 instalações. A maioria dessas estações de tratamento em larga escala foi instalada de maneira que parte do fluxo é submetido à nitrificação parcial em unidade paralela ao fluxo principal. Assim, a unidade em que ocorre o processo Anammox recebe uma fração do fluxo parcialmente nitrificado a N-nitrito. Em termos de taxa de carregamento, os principais alvos são águas residuárias de indústria de glutamato, aminoácidos e abatedouros (MAO et al., 2017).

Com base nos princípios fundamentais do processo Anammox, várias tecnologias foram patenteadas nos últimos anos. Em geral, os processos baseados em Anammox podem ser divididos em sistemas de único estágio e sistemas de dois estágios (MAO et al., 2017). Devido à lenta taxa de crescimento das Anammox e problemas de toxicidade, os processos de tratamento de águas residuárias combinando nitrificação parcial e Anammox (NP/A) foram conduzidos principalmente com biofilme, com lodo granular e com biomassa em suspensão. O reator operado em bateladas sequenciais (RBS) foi amplamente aplicado com sucesso no desenvolvimento do processo Anammox

(DAPENA-MORA et al., 2004; STROUS et al., 1998). Os reatores de biofilme também são adequados, uma vez que o oxigênio pode ser consumido pelas BOA em zonas externas aeróbias e as Anammox podem se desenvolver nas zonas internas do biofilme, portanto, anóxicas (FUX et al., 2002; STROUS et al., 1997; TSUSHIMA et al., 2007; TSUSHIMA; KINDAICHI; OKABE, 2007). A biomassa granular, em sistemas de único estágio, permite maior atividade Anammox e menor nitratação e vem demonstrando ser uma ótima estratégia, a exemplo reatores de leito fluidizado, reatores anaeróbios de manta de lodo e fluxo ascendente, reatores de batelada de e reatores *gas-lift* (AHN; HWANG; MIN, 2004; LACKNER et al., 2014; SLIEKERS et al., 2003; STROUS et al., 1997).

Diferentes variedades de lodo Anammox não enriquecido têm sido usadas como inóculo das bactérias Anammox, incluindo lodo de nitrificação, de desnitrificação e grânulo aeróbio (TSUSHIMA et al., 2007; VAN DER STAR et al., 2007; VÁZQUEZ-PADÍN et al., 2009). Todavia, estes estudos reportaram sobre o longo tempo de operação (meses) para que os reatores atingissem desempenho Anammox satisfatório. Já os reatores que foram inoculados com lodo Anammox enriquecido obtiveram resultados satisfatórios em poucas semanas (BONASSA et al., 2021a; VAN DER STAR et al., 2007). O longo tempo de partida dos reatores Anammox é um dos principais desafios na aplicação do processo. Assim, é necessário a escolha de um inóculo adequado e de configurações dos reatores que favoreçam a retenção da biomassa durante o período de partida.

Nos reatores onde a biomassa cresce na forma de biofilmes ou grânulos, a formação de agregados compactos aumenta a velocidade de sedimentação da biomassa, melhora a retenção e a quantidade de biomassa que cresce em suspensão é minimizada (FERNÁNDEZ et al., 2008). A formação de grânulos Anammox, implica em alta concentração microbiana, o que supera a desvantagem do alto tempo de duplicação e baixa taxa de crescimento (STROUS et al., 1998). A estrutura granular do lodo Anammox também fornece uma comunidade bacteriana estável capaz de resistir aos inibidores ambientais, como N-amoniaco, N-nitrito, metais pesados, matéria orgânica, fosfatos e sulfatos (JIN et al., 2012). Quanto maior a densidade dos grânulos, maiores as forças de coesão entre os microrganismos, resultando em menor acúmulo de gases no interior dos grânulos, redução da lise celular e das perdas de substratos intermediários importantes (DAPENA-MORA et al., 2004). A escolha do lodo granular leva a projetos com reatores compactos, que combinam curto tempo de retenção hidráulica e longo e estável tempo de

retenção de sólidos. Reatores com biomassa granular Anammox apresentam elevada taxa de conversão do nitrogênio e, por isso, são alvos de vários estudos (MA et al., 2017; VAN DER STAR et al., 2007).

O N-amoniaco frequentemente coexiste com a matéria orgânica em águas residuárias, como as de criação de animais. Na presença de N-nitrito e matéria orgânica, as bactérias desnitrificantes heterotróficas crescem mais rapidamente que as bactérias Anammox e a desnitrificação heterotrófica supera o processo Anammox (ISAKA et al., 2008; NI; RUSCALLEDA; SMETS, 2012; TANG et al., 2010a; WANG; GAO, 2016).

Águas residuárias com concentração elevada de N-amoniaco e baixa concentração de matéria orgânica biodegradável, como a estudada nesse trabalho, podem ser tratadas pelo processo Anammox, quando combinado com uma etapa anterior de nitrificação parcial – NP/A (KUYPERS et al., 2003). O processo NP/A surge como uma alternativa frente ao processo convencional de remoção de nitrogênio amoniaco. Uma vez que ocorre sob condições autotróficas, nitrogênio e matéria orgânica podem ser removidos em processos distintos (MA et al., 2016). Desta forma, a matéria orgânica poderia ser removida quase que completamente em etapa anterior por processo anaeróbio visando à produção de metano. Permitindo a recuperação de energia a partir de diversos tipos de águas residuárias.

3.2.1.1 Parâmetros de controle e inibição do processo Anammox

Uma variedade de processos biológicos de remoção de compostos nitrogenados é encontrada em sistemas que visam a promoção da atividade Anammox. São eles: Nitrificação parcial, desnitrificação heterotrófica e autotrófica. A ocorrência exclusiva ou conjunta de determinados processos depende da escolha e otimização dos parâmetros operacionais que irão influenciar no aumento da atividade dos microrganismos desejados (JIN et al., 2012).

A aplicação e industrialização do processo Anammox são dificultadas pelas características de crescimento das bactérias Anammox e pelos fatores de inibição existentes nas águas residuárias ricas em nitrogênio. As bactérias Anammox têm uma taxa de crescimento lenta (tempo de duplicação a 30 /40 °C é de aproximadamente 10 a 14 dias) (JETTEN et al., 1998; VAN DER STAR et al., 2007), baixo rendimento celular (0,11 gSSV.(gN-NH₄⁺)⁻¹) e alta sensibilidade às mudanças nas condições ambientais

(JETTEN et al., 1998), o que as tornam extremamente difíceis de serem cultivadas. Embora a taxa de crescimento possa ser aprimorada pela otimização das condições operacionais, a exemplo de Tang et al. (2011), que alcançaram tempo de duplicação de 4,8 dias, o cultivo permanece difícil. A complexidade da composição industrial dos efluentes e esgotos dificulta o início do processo Anammox e torna o desempenho do processo mais vulnerável, o que resulta em efeitos inibitórios na atividade Anammox (HU et al., 2010; TANG et al., 2010a). No entanto, estudos recentes demonstram que estes obstáculos podem ser contornados, de modo a favorecer a remoção de nitrogênio e a estabilidade operacional do processo (LI et al., 2020).

O processo Anammox sofre inibição por muitos fatores, o que prejudica o estudo de melhorias e a aplicação do processo. Uma variedade de substâncias inibitórias, como substratos (N-amoniaco e N-nitrito), matéria orgânica (matéria orgânica não tóxica e matéria orgânica tóxica), sais, metais pesados, fosfato e sulfeto, estão comumente presentes nas aplicações práticas. E os parâmetros mais importantes, na remoção de nitrogênio total (NT), são: pH, temperatura, OD, substratos, configuração do reator, TDH, tempo de retenção celular ou idade do lodo (TRC), carga nitrogenada aplicada (CNA) e estratégias de alimentação (BONASSA et al., 2021a; GANIGUÉ et al., 2007). Os principais parâmetros para promoção destes processos são apresentados na Tabela 3.1:

Tabela 3-1- Parâmetros operacionais que favorecem a ocorrência dos processos biológicos relacionados remoção do nitrogênio

Parâmetro	Nitrificação	Nitratação	Desnitrificação heterotrófica	Anammox
OD	>0,2 mg.L ⁻¹	>1,0 mg.L ⁻¹	<1,0 mg.L ⁻¹	<1,0
Temperatura	>25°C			10 a 43°C
pH	~ 7			6,7 a 8,3
DQO	-	-	Presente	-
N-nitrito				<98 mg.L ⁻¹
Amônia livre	<250 mg.L ⁻¹	<1,0		-
Alcalinidade	4,05 mgCaCO ₃ ⁻ .(mgN-NH ₄ ⁺) ⁻¹	3,02 mgCaCO ₃ ⁻ .(mgN-NH ₄ ⁺) ⁻¹		

Fonte: Adaptado de Oliveira (2015)

Um parâmetro operacional crítico para garantia contínua da atividade Anammox é a concentração de OD (JUNG et al., 2007; SLIEKERS et al., 2002). Baixas concentrações de OD acarretam em inibição reversível. Strous et al. (1997) relataram inibição reversível do processo Anammox quando saturação do ar é menor que 2%. Egli

et al. (2001) observaram inibição reversível em baixas concentrações de OD (saturação do ar < 1%), sendo que em maiores concentrações de OD, relataram inibição irreversível. Além do mais, a limitação da concentração de OD é o fator primordial para seleção dos microrganismos nitrificantes, garantindo a nitrificação parcial. Devido à maior afinidade por oxigênio das BOA, há acúmulo de N-nitrito em reatores operados em baixas concentrações de OD. Condições limitantes de oxigênio podem oferecer ambiente adequado para interação estável entre microrganismos aeróbios, como as *Nitrosomonas* e bactérias anaeróbias oxidadoras de N-amoniaco, como as do grupo *Brocadiales* (SLIEKERS et al., 2002; WANG et al., 2010).

A concentração de bicarbonato é, também, importante para o processo Anammox. Geralmente a adição apropriada de carbono inorgânico pode promover o crescimento e aumentar a atividade Anammox (LIAO et al., 2008). Ademais, a alcalinidade exerce papel importante de tampão do meio, suavizando mudanças de pH no decorrer da reação, evitando que intermediários tóxicos ao processo se formem inibindo, parcial ou totalmente, os microrganismos com atividade Anammox (PAREDES et al., 2007). Quando se combinam vários processos, em um único reator, os processos Anammox e desnitrificação heterotrófica podem produzir alcalinidade suficiente para manter constante o pH do meio, mesmo ocorrendo o consumo pela nitrificação parcial (WANG et al., 2010).

O carbono orgânico tem sido apontado pelos efeitos adversos nas bactérias Anammox (JIN et al., 2012a). A matéria orgânica, juntamente com o nitrogênio, tornou-se uma grande preocupação nas aplicações do processo Anammox devido às possíveis influências. Diferentes trabalhos relatam que altas concentrações de DQO cessaram completamente o processo Anammox (NI et al., 2012; TANG et al., 2010a).

Para maior aplicabilidade do processo Anammox em águas residuárias reais, é necessário conhecimento do efeito inibitório causado pela matéria orgânica nos microrganismos Anammox. Dois mecanismos diferentes foram propostos como modos de inibição da matéria orgânica na atividade Anammox. O primeiro prediz que a alta concentração de matéria orgânica promove o crescimento de microrganismos heterotróficos. Estas bactérias competem com as Anammox pelo N-nitrito. No tratamento de águas residuárias reais, na coexistência de bactérias Anammox e desnitrificantes, He et al. (2015) ressaltaram a conveniência da aplicação do balanço de massa do reator como abordagem adequada para permitir o estabelecimento funcional destas comunidades. O

segundo mecanismo proposto para o efeito da matéria orgânica nas bactérias Anammox se refere à matéria orgânica especial (como metanol, fenol e antibióticos), que é considerada altamente tóxica para a comunidade Anammox (JIN et al., 2012a). Esta matéria orgânica tóxica inibe, geralmente irreversivelmente, o processo Anammox por envenenamento microbiano ou inativação enzimática (GÜVEN et al., 2005). Experimentos em batelada demonstraram que a atividade Anammox diminuiu com o aumento da concentração de metanol. A atividade máxima alcançada foi de 29% quando 5 mmol de metanol foi adicionado. Quando adicionado metanol ao sistema de alimentação contínua, a atividade relativa foi reduzida para 46% após 80 horas. A adição de metanol foi interrompida e a atividade não foi retomada, sugerindo inibição irreversível (ISAKA et al., 2008). Güven et al. (2005) também observou a perda irreversível da atividade, em culturas de enriquecimento Anammox com 0,5 mmol.L⁻¹ de metanol.

De acordo com Jetten et al. (1998) e Tomaszewski et al. (2017), pH e temperatura são fatores importantes para controle e crescimento das bactérias Anammox. Estes parâmetros têm influência direta nestas bactérias, pois intervêm na determinação da cinética reacional (PUYOL et al., 2013). De maneira generalizada, pode-se dizer que os processos Anammox ocorrem na faixa de pH entre 6,7 a 8,3, com pH ótimo em 8,0 e em ampla faixa de temperatura entre 20 a 43°C, com temperatura ótima a 40°C (EGLI et al., 2001; JETTEN et al., 1998; STROUS et al., 1997). Estudos iniciais com bactérias Anammox relataram taxa de crescimento específico de 0,0033 e 0,001 h⁻¹ e tempo de duplicação (t_d) de aproximadamente 9 e 29 dias, respectivamente (JETTEN et al., 1998; STROUS, M., HEIJNEN, J. J., KUENEN, J. G., & JETTEN, 1998; VAN DE GRAAF et al., 1996). No entanto, estudos recentes mostram que a taxa de crescimento específico máximo ($\mu_{\text{máx}}$) pode ser muito maior (Tabela 3.2).

Tabela 3-2– Taxas de crescimento e tempo de duplicação da biomassa Anammox em diferentes temperaturas

Taxa de crescimento específico (d⁻¹)	Tempo de duplicação (dias)	T (°C)	Referência
0,190 – 0,130	3,6-5,4	37	Tsushima; Kindaichi; Okabe (2007)
0,140	4,9	30	Sobotka et al. (2017)
0,118	5,8	35	Liu; Ni (2015)
0,172	4,0	35	Liu; Ni (2015)

Tabela 3-2 (continuação)

0,210	3,3	30	Lotti et al. (2014)
0,334	2,2	30	Lotti et al. (2015)
0,0038	18	29	Laureni et al. (2015)
0,0088	79	12,5	Laureni et al. (2016)

Fonte: Natália C. Silveira, 2022

Sobotka et al. (2017) demonstraram que a taxa de crescimento específica observada foi $0,14 \text{ d}^{-1}$ ($t_d \pm 4,9$ dias) a 30°C , em um reator de batelada sequencial. Liu & Ni (2015) mostraram que o aumento na concentração de ferro na alimentação, de 0,03 e 0,09 mM, aumentou a taxa de crescimento específico de $0,118 \text{ d}^{-1}$ (t_d 5,8 dias) para $0,172 \text{ d}^{-1}$ (t_d 4 dias) a 35°C . Lotti et al. (2015) demonstraram que a diminuição gradual no tempo de retenção de lodo permitiu atingir $\mu_{\max} \pm 0,334 \text{ d}^{-1}$ (t_d 2,2 dias) a 30°C . Laureni et al., (2016, 2015) mostraram que a redução da temperatura de 29°C para $12,5^\circ\text{C}$ resultou em aumento do tempo de duplicação de 18 para 79 dias. Essas discrepâncias indicam que ainda existem muitos aspectos a serem estudados em relação ao processo Anammox. No entanto, a lenta taxa de crescimento de biomassa geralmente está relacionada a danos à biomassa, em reatores em escala ampliada, o que é um problema significativo, pois a restauração da biomassa é demorada. Para minimizar esse problema, é necessário um desempenho estável do processo (JIN et al., 2012a; TOMASZEWSKI; CEMA; ZIEMBIŃSKA-BUCZYŃSKA, 2017).

Indiretamente, pH e temperatura determinam a toxicidade dos dois substratos básicos (N-amoniacoal e N-nitrito), o que é significativo para o tratamento de altas cargas de nitrogênio (FERNÁNDEZ et al., 2012). Tal interferência ocorre através da determinação da concentração de amônia livre (AL) e ácido nitroso livre (ANL) em equilíbrio com o N-amoniacoal, de acordo com Equação 3.8 e 3.9 (PARK; BAE, 2009):

Concentração de amônia livre

$$AL = C_{AL} = \frac{17}{14} \cdot \frac{N - NH_4^+ \times 10^{pH}}{e^{[6334/(273+T)]} + 10^{pH}} \quad \text{Equação 3.8}$$

Concentração de ácido nitroso

$$ANL = C_{AN} = \frac{47}{14} \cdot \frac{N - NO_2^-}{\{e^{[2300/(273+T)]} + 10^{pH}\} + 1} \quad \text{Equação 3.9}$$

Onde: C_{AL} : AL: concentração de amônia livre ($\text{mg NH}_3 \cdot \text{L}^{-1}$); $N - NH_4^+$: Concentração de N-amoniacoal ($\text{mgN} - NH_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$); T: temperatura ($^\circ\text{C}$); C_{AN} : ANL: concentração de

ácido nitroso ($\text{mg HNO}_2\cdot\text{L}^{-1}$); N-NO_2^- : Concentração de N-nitrito ($\text{mgN-NO}_2^-\cdot\text{L}^{-1}$).

Fernández et al. (2012) detectaram redução de 50% na atividade da biomassa granular Anammox, com concentração de amônia livre de $38 \text{ mgN-NH}_3\cdot\text{L}^{-1}$. Reatores de batelada sequencial apresentaram instabilidade no desempenho em concentrações de amônia livre superiores a $20\text{-}25 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$. Com longo prazo de exposição da biomassa Anammox a níveis de amônia livre superiores a $35\text{-}40 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$, o desempenho do reator tornou-se instável com drástica redução da eficiência de remoção de NT.

Tang Chong-Jian, Zheng Ping, Mahmood Q, (2010) avaliaram concentrações dos substratos N-amoniaco e N-nitrito que podem ser inibitórios ao processo Anammox em dois reatores de biofilme com fluxo ascendente. Para CNA maior que $1,0 \text{ gN}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ os reatores se tornaram instáveis. A alta na concentração de amônia livre, de 57 para $178 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$, acompanhou o aumento do pH de 8,7 a 9,05. O limite de tolerância à amônia livre, nesse estudo, foi superior aos anteriores, o que indica que reatores de biofilme proporcionam condições adequadas para a tolerância de níveis maiores de amônia livre, pelas bactérias Anammox. No entanto, valores de pH extremamente elevados devem ser evitados nos sistemas Anammox (JAROSZYNSKI et al., 2012).

Os efeitos inibitórios devem ser considerados em todas as etapas dos processos de remoção de nitrogênio. Como exemplo, o fenômeno da inibição por amônia livre das BOA e BON é apresentado em diversos trabalhos (GANIGUÉ et al., 2007; KIM; LEE; KELLER, 2006; MA et al., 2016). As BON são mais sensíveis à amônia livre na faixa de $0,1$ a $1,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, enquanto as BOA são inibidas na faixa de 10 a $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (KIM; LEE; KELLER, 2006). Como resultado, pode ocorrer acúmulo de N-nitrito ou de N-amoniaco, caso o nível de amônia livre no reator seja alto, prejudicando a etapa posterior de tratamento por Anammox.

O N-nitrito é um substrato do processo Anammox que, em altas concentrações, tem efeito inibitório e acarreta em instabilidade ao processo (DAPENA-MORA et al., 2007; KIMURA et al., 2010). Os microrganismos Anammox são mais vulneráveis à inibição por N-nitrito do que por N-amoniaco. Entretanto, o valor crítico de N-nitrito varia sob diferentes condições e modos de operação (Tabela 3.3). Kimura et al. (2010), em testes de alimentação contínua, observaram inibição da atividade Anammox em baixas concentrações de N-nitrito. Jetten et al. (1998) relataram que a biomassa granular,

em solução contendo $100 \text{ mg N-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$, perdia completamente a atividade Anammox. Fux et al. (2002) encontraram inativação irreversível dos microrganismos Anammox após exposição a longo prazo de $40 \text{ mgN-nitrito} \cdot \text{L}^{-1}$. Outros estudos encontraram valores maiores para a inibição da atividade Anammox. Egli et al. (2001) observaram desativação completa, em concentração de N-nitrito superior a $185 \text{ mgN} \cdot \text{L}^{-1}$. Dapena-Mora et al. (2007) relataram redução de 50% da atividade Anammox quando a concentração de N-nitrito era de $350 \text{ mgN} \cdot \text{L}^{-1}$.

Tabela 3-3- Pesquisas com inibição por N-nitrito da atividade Anammox

Biomassa	Reator	pH	TDH (h)	T (°C)	N-nitrito mgN.L ⁻¹	AL e/ou ANL mgN.L ⁻¹	Efeito	Referência
Aderida - (<i>Candidatus Kuenenia stuttgartiensis</i> , <i>Planctomycetes KSU-1</i> and similar- <i>Candidatus Brocadia anammoxidans</i>)	Reator de leito fixo - fluxo contínuo	-	-	36	>274	-	Inibição	Kimura et al. (2010)
	Bateladas	-	1-24	30	>750	-	Inibição	Kimura et al. (2010)
Lodo Anammox	SBR	-	-	-	>100	-	Inibição	Jetten et al. (1998)
Biomassa flocular – CSTR	Bateladas	7,8	-	30	770	FA: 47 ^a	50% inibição	Dapena-Mora et al. (2007)
Lodo granular, UASB	Bateladas	7,3-8,1	-	20	167	FA: 13-90 ^a	Inibição	Waki et al. (2007)
Lodo floculento desnitrificante	Reator com biofilme	6,8	15,3	35±1	390	-	85% inibição	TANG Chong-Jian, Zheng Ping, Mahmood Q (2010)
Lodo granular Anammox	Batelada	7,8	-	37	224	5,9	Inibição 50%	Tang et al. (2010b)
Lodo granular Anammox	EGSB - contínuo	6,8-7,0	1,5-8,0	35±1	768	134,4-213,1 ^a	-	Chen et al. (2011)
Biofilme Anammox	Batelada	7,8	-	30	-	ANL: 11	Biof. 70%, floc. 100%	Fernández et al. (2012)
Biofilme Anammox	SBR - Contínuo	-	24	30	<240	ANL: 0,5	Não inibição	Fernández et al. (2012)

^a Valores calculados a partir das concentrações iniciais experimentais apresentadas.

Fonte: Park et al., (2010)

Com base nesses resultados, considera-se que a concentração de N-nitrito afluente de 280 mgN.L⁻¹ pode, geralmente, ser considerada como o valor de alerta para o processo Anammox. Atenção deve ser dada quando a concentração de N-nitrito efluente exceder 100 mgN.L⁻¹, devendo ser adotada alguma intervenção para garantir a eficiência de remoção de nitrogênio total e evitar o acúmulo de N-nitrito no reator (JIN et al., 2012a).

O controle da concentração de substrato é uma estratégia importante para evitar a inibição de bactérias Anammox. A diminuição da concentração do substrato a valores mais baixos é, sem dúvida, o meio mais direto de controle da inibição (JIN et al., 2012a). Porém, durante a partida do reator, esta estratégia se torna perigosa, pois pode levar à inibição por falta de substrato (VAN DER STAR et al., 2007). Além disso, a exigência de baixas concentrações de substratos dificulta a aplicação do processo Anammox em águas residuárias reais que apresentam elevadas concentrações de nitrogênio e que são o foco da aplicação Anammox. Para tanto, pode-se adotar a estratégia de recirculação do efluente no tratamento de águas residuárias reais com alta carga nitrogenada. Em condições ideais de operação, a recirculação do efluente é vantajosa para a melhoria da carga nitrogenada removida (CNR), ou seja, melhora na eficiência de remoção de NT. Os valores máximos toleráveis de CNA, em diversas condições experimentais, são apresentados na Tabela 3.4.

Chen et al. (2010) estudaram o tratamento de água residuária sintética através da oxidação anaeróbia do N-amoniaco em reator de biofilme de fluxo ascendente, a 35°C, por 435 dias. As concentrações dos substratos foram controladas pelo uso de diferentes razões de recirculação. A remoção de NT média foi de 88,84%. A biomassa produzida cresceu com atividade Anammox específica de 1,8 gN.(gSSV)⁻¹ e tempo de duplicação de 4,3 a 7,4d. A granulação e formação do biofilme contribuíram para o enriquecimento da biomassa Anammox, enquanto a recirculação apropriada, aliada à temperatura relativamente alta, ajudaram a promoção da atividade específica Anammox. Este é considerado o fator chave para o processo eficiente e estável das bactérias Anammox.

Tabela 3-4 – Variações da carga nitrogenada aplicada em processos Anammox

Reator	Tipo de lodo	T (°C)	TDH (h)	pH	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₂ ⁻	Tempo de operação (d)	CNA _{máx} Kg.m ⁻³ d ⁻¹	CNR _{máx} Kg.m ⁻³ d ⁻¹	Eficiência de remoção NT ^a (%)	Referências
UFFBB	Lodo desnitrificante	37	0,2-8	7,0-7,5	20-555	20-460	247	58,5	26	44	Tsushima et al. (2007)
UBF	Lodo anaeróbio	30±1	3,02-24	7,5-8,0	70-301	70-315	-	2,5	1,99	79,6	Jin et al. (2008a)
GLR	Lodo Anammox	-	6,7-43	7,5	-	-	86-100	10,7	8,9	83	Sliekers et al. (2003)
UASB	Lodo Anammox	35±1	0,16-0,21	6,8-7,0	300	360	450	125	66,8-82,8		Tang et al. (2011)
UASB	Lodo Anammox	35±1	0,11-0,15	6,8-7,0	200	240	450	137,1	69,8-84,6		Tang et al. (2011)
UASB	Lodo granular Anammox	37	<24	7,5-8,0	100-458	100-575	235	1,03	0,93	90	Ni et al. (2011)
SBR	Lodo ativado anaeróbio	30 ±1	2,43-24	7,5-8,0	70-269	70-301	-	2,73	2,01	74	Jin et al. (2008a)
SBR	Mix lodo ativado	36,0±0,3	45,6-88,4	7,2-8,7	14,9-1268	9,6-1661,4	226-365	1,6	1,57	98	H. López, et al. (2008)
ABF	Lodo Anammox	37	0,67-3,0	7,2	93,3-350	40,6-330,7	97	19,1	11,5	60	Isaka; Sumino; Tsuneda (2007)

Tabela 3.4 (continuação)

Reator	Tipo de lodo	T (°C)	TDH (h)	pH	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₂ ⁻	Tempo de operação (d)	CNA _{máx} Kg.m ⁻³ d ⁻¹	CNR _{máx} Kg.m ⁻³ d ⁻¹	Eficiência de remoção NT ^a (%)	Referências
ABF	Lodo Anammox	20-22	0,67-3,0	7,2	93,3-350	40,6-330,7	446	~12	8,1	~68	Isaka; Sumino; Tsuneda (2007)
CSTR	Lodo anaeróbio	25-38	48	7,5-8,0	50-200	50-260	280-310	0,23	0,22	96	Bagchi; Biswas; Nandy (2010)

UFFBB: Reator de biofilme de leito fixo e fluxo ascendente; UBF: Biofiltro ascendente; GLR: Reator *gas-lift*; UAGSB: Leito de lodo granular Anammox *upflow*; UASB: *upflow anaerobic sludge blanket*; SBR: reator de batelada sequencial; ABF: Biofiltro anaeróbio; CSTR: Reator de agitação contínua.

^a calculado a partir dos dados da literatura.

Fonte: Jin et al. (2012)

A aplicação de altas taxas de carga de nitrogênio, em reatores Anammox, leva à queda na eficiência de remoção de NT, resultando em instabilidade do processo (MA et al., 2017). Ao estudar o efeito do substrato na estabilidade do processo Anammox, Tang Chong-jian, Zheng Ping, Mahmood Q. (2010) avaliaram diferentes faixas de CNA (0,422; 0,963 e 1,711) $\text{kgN.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ e observaram que, apesar da eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal média ser de 70%, com o aumento da carga aplicada, houve diminuição da taxa de remoção do nitrogênio. Os autores associam a diminuição da CNR ao efeito inibitório causado pela amônia livre presente no meio reacional, após aumento do pH de 6,8 a 8,7. Ma et al. (2017) estudaram o desempenho do processo através da operação de um reator UASB-Anammox, após variações da CNA (2,4; 3,6 e 5,6) $\text{kgN.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, e constataram queda significativa do pH e diminuição da eficiência de remoção de NT por efeito da inibição por substrato.

A carga nitrogenada específica aplicada, como já mencionado, está ligada à concentração de biomassa no reator e ao valor da atividade específica máxima Anammox (DAPENA-MORA et al., 2004). Adicionalmente, para maior estabilidade e controle do processo, o projeto de operação deve levar em conta a boa retenção da biomassa no reator e a manutenção dos parâmetros operacionais. Um bom modelo experimental para cultivo de microrganismos Anammox é através do reator em batelada sequencial (RBS). Este é um reator capaz de reter a biomassa de forma eficiente e homogênea, o que permite a otimização das condições e evita o acúmulo de N-nitrito até concentrações inibitórias ao processo Anammox (DAPENA-MORA et al., 2004).

Outras configurações de reatores também apresentam boa retenção de biomassa. Um reator gás-lift-Anammox alcançou conversão de NT de $9,5 \text{ kgN.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, no primeiro processo Anammox operado em larga escala (VAN DER STAR et al., 2007). Reatores de leito fixo e de leito fluidizado também apresentam retenção de biomassa adequada. No entanto, o padrão de fluxo dos reatores UASB faz com que o substrato seja distribuído de forma heterogênea, ao longo da altura do reator. Este padrão de fluxo, além de limitar a aplicação de reatores UASB para altas concentrações de substrato, leva a mudanças na composição biológica do lodo com a altura do reator (MA et al., 2017a).

A operação de dois reatores UASB, contendo biomassa granular Anammox, permitiu a comparação da influência da aplicação de alta e baixa concentração de substratos (TANG et al., 2010b). No reator com baixa concentração de substratos ($220 < \text{N-nitrito} < 280 \text{ mg.L}^{-1}$), houve variação significativa no desempenho quando a

concentração de N-nitrito afluente atingiu 280 mgN.L^{-1} , com decréscimo da remoção de NT de 91 para 78%, o que revela a influência da inibição por N-nitrito. No reator operado sob alta concentração de substrato ($320 < \text{N-nitrito} < 450 \text{ mg.L}^{-1}$), os autores observaram eficiência de remoção de N-amoniaco e N-nitrito de 84% e 98%, respectivamente. Apesar das diferenças morfológicas evidenciadas na microscopia eletrônica de transmissão e na microscopia eletrônica de varredura, o lodo granular contribuiu para o alto desempenho do processo. Verificou-se que a aplicação da baixa concentração de substrato em alta vazão demonstrou ser mais eficaz para remoção de alta taxa de nitrogênio do que a aplicação de alta concentração de substrato em baixa vazão.

O reator de leito granular expandido (EGSB), estudado por Chen et al. (2011), foi considerado tolerante ao substrato e capaz de tratar água residuária sintética contendo alta concentração de N-amoniaco. O sistema apresentou eficiência de remoção de 81,57% quando a concentração de NT afluente foi de $1429,1 \text{ mgN.L}^{-1}$ e CNA $22,87 \text{ kgN.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$.

Outro importante fator para ocorrência do processo Anammox é a estequiometria do processo. É possível observar a ocorrência do processo Anammox quando a relação $\text{N-NH}_4^+/\text{N-NO}_2^-$ difere da relação 1/1,32 apresentada por Strous, et al. (1998). Outros estudos demonstraram que o coeficiente estequiométrico da reação Anammox também pode ser afetado pelo estado fisiológico das bactérias anaeróbias oxidadoras de amônia e também sob diferentes condições experimentais. Yao et al. (2015) encontraram a relação $\text{N-NH}_4^+/\text{N-NO}_2^-$ de 1/1,022 ao realizarem testes com e sem adição de hidrazina com água residuária sintética e biomassa granular. Também usando água residuária sintética e lodo granular Anammox em reator de membrana, Lotti et al. (2014) encontraram 1/1,146 como relação estequiométrica, durante ensaios cinéticos, em que consideraram N-NH_4^+ como fonte de nitrogênio e nitrito/nitrato como par doador de elétrons para redução do carbono inorgânico durante o anabolismo.

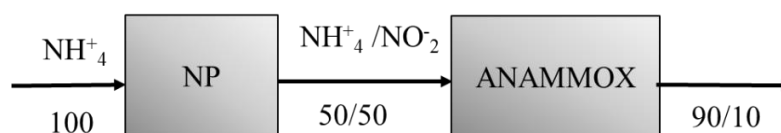
Pouco se sabe sobre o efeito da razão do substrato afluente no processo Anammox (Zhu et al., 2017). Conforme relatado por Strous et al. (1998), uma proporção adequada de 1/1,32 é necessária para alcançar alta eficiência de remoção de nitrogênio. Desviando-se desta razão, o desempenho da remoção de nitrogênio é afetado. No entanto, é comum que ocorram flutuações quando o substrato é água residuária real. Zhu et al. (2017) observaram que afluente com razão $\text{N-NH}_4^+/\text{N-NO}_2^-$ maiores que 0,5 apresentavam um aumento na eficiência de remoção de NT e, com a diminuição desta razão para valores

inferiores a 0,22, ocorreu inibição da atividade Anammox. A inibição foi maior quando a razão foi de 0,15. A concentração inibitória de N-nitrito encontrada, após os ensaios cinéticos, foi de 462 mgN.L⁻¹, indicando a inibição por excesso de N-nitrito.

3.2.1.2 Processo Nitrificação parcial/Anammox – NP/A

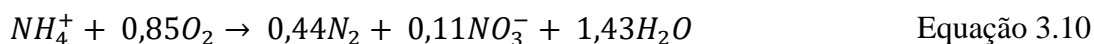
Para suprir a demanda de N-nitrito, em efluente industriais e esgoto doméstico que já contenham N-amoniaco, pode ser empregado o processo de nitrificação parcial previamente ao processo Anammox (Figura 3.3 e Equação 3.10).

Figura 3.3- Processo NP/A para remoção de nitrogênio



Fonte: BAGCHI; BISWAS; NANDY (2012) modificado

NP/A



Por ser um processo autotrófico, não requer suplementação com fontes de carbono para a desnitrificação e pouco excesso de lodo é produzido (AGRAWAL et al., 2018). Como ocorre apenas a nitrificação parcial do N-amoniaco, há economia na quantidade de OD a ser fornecida e na alcalinidade requerida. Há previsão de economia de 60% na energia gasta com aeração e 100% na demanda de fonte de carbono, quando comparado com o processo de nitrificação/desnitrificação convencional. (KARTAL; KUENEN; VAN LOOSDRECHT, 2010).

O processo NP/A foi implementado com sucesso no tratamento de efluente de digestores anaeróbios de lodo do esgoto doméstico (JIN et al., 2019; MIAO et al., 2016) e de águas residuárias que contêm altas concentrações de N-amoniaco (FUX et al., 2002; LI et al., 2017b; VÁZQUEZ-PADÍN et al., 2009).

A remoção autotrófica do nitrogênio pode ser realizada em sistema composto por dois reatores, um para nitrificação parcial e outro para o processo Anammox (DOSTA et al., 2015). Outra possibilidade é que ambas as etapas ocorram em um único reator (ex.

processo CANON), desde que a concentração de OD seja bem controlada (MA et al., 2011; MIAO et al., 2016). Apesar do custo operacional para instalação do processo com dois estágios ser maior, as vantagens da operação do sistema são proeminentes quando o enriquecimento das BOA e das bactérias Anammox é realizado em diferentes reatores, evitando a competição do N-nitrito pelas Anammox e BON. Esse sistema pode permitir a otimização dos parâmetros de controle para cada microrganismo tornando possível a inibição do crescimento das BON (CAO et al., 2016a).

Durante o processo de NP/A, é essencial o controle da etapa de nitrificação, a fim de fornecer a proporção adequada entre N-nitrito e N-amoniaco para o estágio seguinte - Anammox (JIN et al., 2019). Quando o processo NP/A é realizado num único estágio, o acúmulo de N-nitrato é uma questão crítica, podendo resultar em alta concentração de nitrogênio no efluente, diminuindo a eficiência de remoção de nitrogênio total. Quando o N-nitrito é consumido rapidamente pelas BON, há limitação da atividade bacteriana das Anammox (MIAO et al., 2016). Esse fenômeno é mais comum quando há flutuações na qualidade da água residuária (JIN et al., 2019).

Dentre as estratégias estudadas para a promoção do processo de NP/A em um único estágio, Li et al. (2018) ressaltaram o equilíbrio apropriado entre BOA e Anammox concomitante à inibição das BON e das bactérias heterotróficas (BH). Uma forma de conservação das relações de sinergia e competição entre essas populações microbianas é a existência de um sistema de retenção da biomassa Anammox eficaz, uma vez que a manutenção da eficiência da nitrificação parcial torna-se difícil durante longos períodos de operação. E, por isso, diferentes estratégias para supressão das BON em relação a BOA durante o processo NP/A devem ser adotadas. Dentre elas pode-se destacar: estrito controle de OD (NHAT et al., 2017), manutenção da concentração de N-amoniaco, aeração intermitente (BAO et al., 2017; MIAO et al., 2018) e inibição pelo substrato (GANIGUÉ et al., 2007; KIM; LEE; KELLER, 2006; MA et al., 2016).

A suscetibilidade e resiliência do processo NP/A frente às diferentes fontes de instabilidade são pouco conhecidas (WELLS et al., 2017). O entendimento dessas interferências, presentes nas águas residuárias reais, pode levar a estratégias mais preditivas para controle e estabilidade dos sistemas NP/A, independente se realizado em único estágio ou em dois estágios, levando à implementação de processo robusto.

Yamamoto et al. (2008) verificaram a estabilidade do processo NP/A, em dois estágios, para o tratamento do licor resultante do processo fermentativo do efluente de

suinocultura. Durante a nitrificação parcial, não houve acúmulo de N-nitrato e a eficiência de conversão de N-amoniaco em N-nitrito foi de 58%, quando estudada CNA de 1,0 kgN.m⁻³.d⁻¹. Além disso, os autores afirmaram que ácido nitroso livre é um inibidor mais potente da atividade das BON no longo prazo. Já no reator Anammox, houve eficiência de remoção de NT estável de 73%, mesmo com incremento de 27% na CNA (variação de 0,67 para 0,92 kgN.m⁻³.d⁻¹). Já a redução para CNA de 0,22, levou à queda na eficiência de remoção de NT para 55%. Os autores afirmaram que a DQO remanescente do processo de NP foi a principal responsável pela queda da atividade Anammox.

A estabilidade do processo NP/A foi avaliada, em escala piloto, no tratamento de esgoto municipal. O reator de NP foi operado em sistema de batelada sequencial, com aeração intermitente e concentração de OD de 2,5 ± 0,2 mgO₂.L⁻¹, quando aeração era ligada, e o TRC controlado para 4,6 ± 1,1 dias. As bactérias Anammox foram imobilizadas em biofiltro. No processo de NP, a lavagem das BON foi facilitada quando a concentração de OD foi maior que 0,7 mgO₂.L⁻¹. Através deste sistema, foi possível a seleção das bactérias BOA em relação às BON, comprovada pelo aumento de 8% na abundância relativa das *Nitrosomonas*. O gênero *Candidatus Brocadia* e *Asahi BRW_2* foram encontrados no interior do biofiltro e estes são microrganismos comuns ao processo Anammox (JIANG et al., 2018a).

Dosta et al. (2015) avaliaram o processo NP/A, em dois estágios, para o tratamento de água residuária de Estação de Tratamento de esgoto. A NP e também o processo Anammox foram realizados em reator de batelada sequencial, com biomassa granular. A caracterização microbiana do reator de NP revelou predominância de β -*proteobacteria* que tem as *Nitrosomonas* como principal bactéria autotrófica oxidante do N-amoniaco. As BON estavam abaixo do limite de detecção do método, o que revela inibição efetiva. Análises microbiológicas revelaram a presença de biomassa heterotrófica no reator Anammox, que continha *Chlorobi* e *Chloroflexi* como principais microrganismos, além de *Planctomycetes* (7%) e *Brocadia* (1,4%) como o principal oxidante de N-amoniaco detectado.

Chini et al. (2020) avaliaram o desempenho do processo NP/A com taxas crescentes de CNA para água de tratamento de efluente suíno. O sistema suportou CNA de até 3,27 ± 0,13mgN. L⁻¹.d⁻¹ com eficiência de remoção de nitrogênio de 83%. Os autores concluíram que o processo NP/A pode ser facilmente controlado apenas com o monitoramento de OD e pH.

A análise da Tabela 3.5, que apresenta a aplicação do processo NP/A para diferentes tipos de águas residuárias, revela que quando a NP/A ocorre em único estágio, é necessário controle mais seletivo do tempo de retenção celular para as diferentes biomassas presentes no reator (AGRAWAL et al., 2018; CHINI et al., 2020). Um longo TRC é necessário para crescimento das bactérias Anammox. Por isso, reatores com biofilme têm sido utilizados, principalmente com configuração de grânulos ou material suporte, quando aplicadas cargas nitrogenadas mais baixas. Em contraste, é preciso um TRC curto para lavagem da biomassa floculenta (BON), mas que seja suficiente para crescimento das BOA.

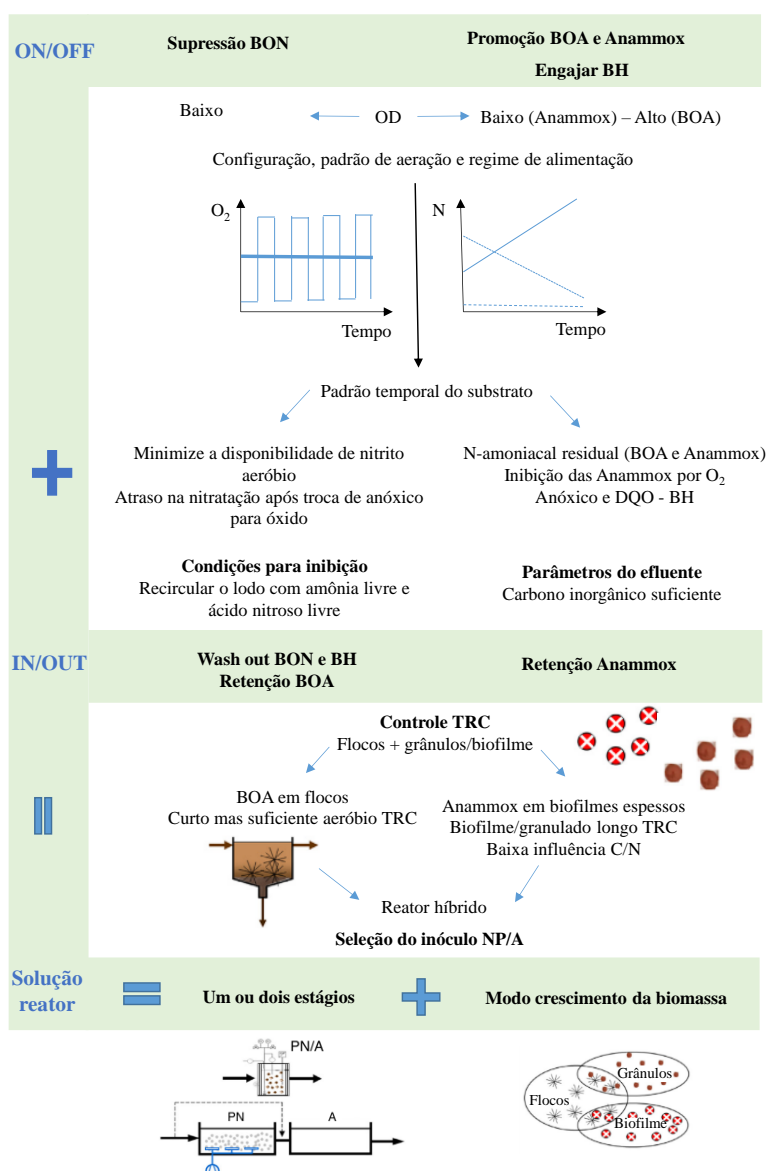
Tabela 3-5 – Aplicação dos processos NP/A em diferentes trabalhos

Processo	Água residuária	Substrato	T(°C)	pH	OD (mg.L-1)	TDH	Eficiência	Referências
NP/A	Esgoto municipal	65 ± 15 mg N-NH ₄ .L ⁻¹ 1,5 ± 0,9 mg N-NO ₃ .L ⁻¹	25	-	2,5 ± 0,2	-	90% conversão N-NH ₄ - N-NO ₂	Jiang et al. (2018a)
NP/A	Licor de digestão	100, 200, 300, 600 e 1000 mg N-NH ₄ .L ⁻¹	35	6,5	5	24h	78% Remoção NT	Yamamoto et al. (2008)
NP/A	Sintética com hidroxilamina	100 mg NT.L ⁻¹	25	7,8 – 8,2	5,5/0	8h	80% Remoção NT	Xu et al. (2012)
NP/A	Sintética	1,5 kgN.m ⁻³	25	7,8	0,5 -2,4	7h	95% Remoção NT	Ciudad et al. (2005)
NP/A	Esgoto municipal	500 mg N-NH ₄ .L ⁻¹	30	7,2-7,4	PN: 6,5	8h	88% Remoção NT	Dosta et al. (2015)
NP/A	Esgoto doméstico	50 mg NT.L ⁻¹	32	7,5	0,17	6h	-	Miao et al. (2016)
NP/A	Sintético	150 mg N-NH ₄ .L ⁻¹	37	7,8	2,0	3h	80% Remoção NT	Cho et al. (2011)
NP/A	Sintético com hidroxilamina	40-300 mg N-NH ₄ .L ⁻¹	35	7,8	0,0-2,0	4h	0% conversão N-NH ₄ - N-NO ₂	Okabe et al., (2011)
NP/A	Sobrenadante de digestor anaeróbio	400-700mg N-NH ₄ .L ⁻¹	30	7,5-8,3	2,7	-	-	Vázquez-Padín et al. (2009)
NP/A	Sintético	103-263mg N-NH ₄ .L ⁻¹	29	7,5-7,9	-	10h/12h	-	Li et al. (2017b)
NP/A	Sobrenadante digestor ETE	600g N-NH ₄ .m ⁻³	30	7,52	-	14h	-	Fux et al. (2002)
NP/A	Efluente suíno	309-824mg N-NH ₄ .L ⁻¹	25	7,2-7,6	0,5	6h	83% Remoção NT	Chini et al. (2020)

Fonte: Natália C. Silveira, 2022

Todavia, o processo NP/A não é completamente entendido somente com a avaliação do desempenho do reator, da composição da comunidade microbiana e da dinâmica existente. Para tanto, os autores propõem uma estrutura metodológica que destaca os parâmetros menos estudados até o momento e o vínculo entre eles, com ênfase na abordagem multiparâmetro para determinação da melhor estrutura para ocorrência do processo NP/A (Figura 3.4).

Figura 3.4 – Estratégias para projeto e operação de um reator NP/A em um ou dois estágios



Legenda: BON: Bactérias oxidadoras de nitrito. BOA: Bactérias oxidadoras de amônio. AnAOB: Bactérias anaeróbicas oxidadoras de amônio. BH: Bactérias heterotróficas. TRC: Tempo de retenção celular. C/N: demanda química biodegradável de oxigênio sobre nitrogênio.

Fonte: Agrawal et al. (2018) modificado

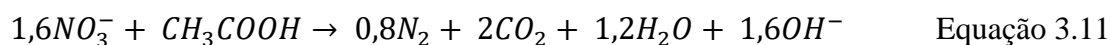
3.2.1.3 Processo com acoplamento Anammox e redução do N-nitrato

A descoberta da oxidação anaeróbia da amônia melhorou o entendimento do ciclo do nitrogênio. Estudos foram estabelecidos de forma que a remoção completa do carbono orgânico ocorra na primeira fase, para que, posteriormente, ocorra a remoção do nitrogênio.

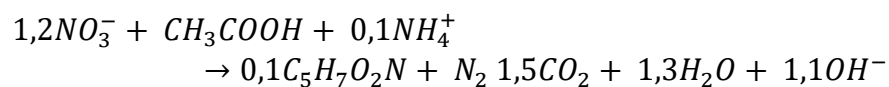
A coexistência dos processos Anammox e desnitrificação heterotrófica pode ser útil para remoção simultânea de matéria orgânica e nitrogenada, em um único sistema, ao invés de uma cadeia sequencial de unidades de tratamento. A junção destes dois processos pode contribuir também para o aumento da remoção de NT do sistema (LI et al., 2016). O acoplamento do processo Anammox e redução do nitrato garante economia de doadores de elétrons, em comparação à desnitrificação tradicional (Equação 2.9). Durante a desnitrificação do N-nitrato, 10 mol de elétrons são requeridos para formação de 1 mol de nitrogênio gasoso (Equação 3.3). No processo acoplado (Equação 3.6), apenas 2 mol de elétrons são consumidos para produção de 1 mol de N₂ (WAKI et al., 2013). Entretanto, a estratégia de inicialização dos processos combinados e seus mecanismos microbiológicos raramente foram documentados (WANG et al., 2019).

Embora as bactérias Anammox tenham sido identificadas pela primeira vez em um reator de desnitrificação (STROUS et al., 1998), a interação entre os organismos Anammox com os desnitrificantes heterotróficos e o papel dos compostos orgânicos no processo Anammox ainda não são claros (KUENEN, 2008a). Então, nesse tópico serão abordadas questões relacionadas à coexistência de Anammox e desnitrificantes heterotróficos para remoção simultânea de carbono e nitrogênio.

Como visto até o momento, a degradação de compostos carbonáceos em águas residuárias ocorre com o uso de N-nitrito e N-nitrato por bactérias desnitrificantes. A maioria dos microrganismos desnitrificantes são facultativos anaeróbios/heterotróficos. As reações globais de produção de energia (catabolismo) e síntese celular (anabolismo) da desnitrificação em presença de ácido acético como fonte de carbono, são apresentadas (Equações 3.11 e 3.12). O íon hidroxila (OH⁻) e parte do dióxido de carbono (CO₂) produzidos durante o processo são retornados ao sistema.



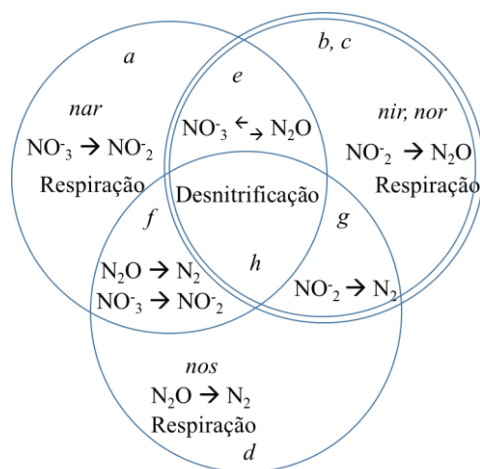
$$\Delta G^\circ = -843 \text{kJ.M}^{-1}$$



Equação 3.12

As bactérias desnitrificantes degradam a matéria orgânica na ausência de OD para obter energia para atividade celular e carbono para a síntese celular. O sistema respiratório do processo de desnitrificação é representado por quatro módulos (Fig. 3.5). Quatro enzimas estão envolvidas em um sistema de desnitrificação completa. A redução de N-nitrato para N-nitrito é catalisada pela enzima nitrato redutase (*nar*). Tanto a síntese, quanto a atividade dessa enzima, são inibidas pelo oxigênio. A segunda enzima nessa via é a nitrito redutase (*nir*), que catalisa a conversão de N₂O (óxido nitroso) a NO (óxido nítrico). A óxido nitroso redutase (*nos*) é a última enzima da rota e converte NO em N₂. A óxido nitroso redutase é a enzima mais sensível ao OD e é inibida por concentrações de OD inferiores a 0,2 mgO₂.L⁻¹. No entanto, alguns microrganismos desnitrificantes não possuem sistemas de enzima chave-fechadura para desnitrificar completamente e a falta desses sistemas enzimáticos pode permitir a produção e acúmulo de intermediários livres (KUMAR; LIN, 2010).

Figura 3.5 - Organização modular da desnitrificação. Quatro módulos representam os sistemas respiratórios que utilizam (a) N-NO₃⁻, (b) N-NO₂⁻, (c) NO e (d) N₂O. A desnitrificação completa (h) é alcançada somente quando todos os quatro módulos estão ativados. As sobreposições pareadas (e, g, f) dos módulos respiratórios individuais ocorrem naturalmente em bactérias que utilizam outros N-óxido



Fonte: Kumar and Lin (2010); Zumft (1997) modificado

Existem alguns problemas na coexistência de Anammox e desnitrificação heterotrófica. Em primeiro lugar, o acoplamento dos processos Anammox e desnitrificação em um único reator pode induzir à competição entre as espécies autotróficas (Anammox) e heterotróficas desnitrificantes. A reação de desnitrificação é termodinamicamente mais favorável quando comparada à reação Anammox (AHN, 2006; JETTEN et al., 1998). Isto porque os microrganismos desnitrificantes têm maior coeficiente de crescimento ($Y = 0,3 \text{ gSSV/gN-NH}_4^+$) quando comparados com as bactérias Anammox ($Y = 0,066 \pm 0,01 \text{ gSSV/gN-NH}_4^+$) (AHN, 2006; JETTEN et al., 1998). Além disso, a taxa de crescimento dos microrganismos desnitrificantes heterotróficos é quase cem vezes mais rápida do que Anammox. Por exemplo, a taxa de crescimento do gênero *Rhizobium*, um microrganismo desnitrificante, é de $0,35 \cdot \text{h}^{-1}$, enquanto que a da *Candidatus Brocadia*, um microrganismo Anammox, é de $0,003 \cdot \text{h}^{-1}$ (EL HASSAN; ZABLOTOWICZ; FOCHT, 1985).

A outra questão da coexistência entre os dois processos é a disponibilidade de N-nitrato. Em ambientes ricos em N-nitrato, o processo Anammox depende de outros processos para a redução do N-nitrato a N-nitrito. Sob condições anóxicas, o N-nitrato pode ser reduzido por desnitrificantes ou por outras espécies que promovam a redução do N-nitrato, conhecida como redução dissimilatória do N-nitrato para N-amoniaco (DNRA) e libera N-nitrito como intermediário. Posteriormente, o N-nitrito pode ser utilizado por bactérias Anammox. No entanto, a redução da matéria orgânica não é possível no caso da DNRA (TIEDJE, 1988; WANG et al., 2010).

A determinação da via a ser estabelecida pode ser feita através do controle da razão C/N. Alta relação C/N favorece a redução do N-nitrato a N-amoniaco através da DNRA, devido ao alto poder redutor.

O acoplamento de Anammox e desnitrificação heterotrófica será bem-sucedido somente quando a reação de desnitrificação não estiver competindo com o Anammox pelo N-nitrito. Ou seja, é preferível que aconteça a desnitrificação parcial (KUMAR; LIN, 2010). Como as duas primeiras etapas da desnitrificação (N-nitrato a N-nitrito) e (N-nitrito a óxido nítrico) não são interligadas, pode ocorrer acumulação de N-nitrito (SLIEKERS et al., 2002). Em escala laboratorial, a adição de acetileno e N_2H_4 como inibidores da desnitrificação em reatores Anammox apresentam ótimos resultados (YAO et al., 2015). Todavia, não é uma aplicação viável em escala plena. Alternativamente, a taxa de desnitrificação pode ser controlada pela adição regular de matéria orgânica

biodegradável (DONG and TOLLNER, 2003; METCALF, A.; EDDY, 2003; van RIJN et al., 2006). Mas, dificilmente as bactérias Anammox poderiam suportar longo prazo de operação sob alta carga orgânica.

Embora a coexistência dos processos Anammox e desnitrificação heterotrófica seja complicada, diversos pesquisadores relataram a ligação bem sucedida entre eles, seja em escala laboratorial, escala real e em ambientes naturais (BONASSA et al., 2021b; HULTH et al., 2005; KUYPERS et al., 2003; WANG et al., 2010). A tabela 3.6 mostra alguns estudos que relatam a coexistência de Anammox e desnitrificação e as condições operacionais. Nela, pode-se observar que o desempenho das bactérias Anammox foi baixo em sistemas com alta relação C/N. A razão é que, em altas proporções C/N, os microrganismos desnitrificantes e os DNRA são altamente competitivos com os microrganismos Anammox. Portanto, a DQO do sistema deve ser mantida menor ou igual ao requisito estequiométrico para desnitrificação do N-nitrato a N-nitrito, o que facilita o acoplamento Anammox e desnitrificação heterotrófica. Os sistemas de biomassa aderida são eficazes para o desenvolvimento das Anammox, mesmo quando operados com concentração de OD um pouco mais elevada. Nesse caso, o excesso de OD pode ser consumido por microrganismos desnitrificantes nas camadas mais externas, ocorrendo o desenvolvimento de Anammox nas camadas anóxicas (mais internas).

Tabela 3-6 – Coexistência de Anammox e desnitrificação em reatores em escala laboratorial e escala plena

Tipo e natureza da investigação	Condições operacionais	Principais resultados experimentais	Observações	Referências
NP/A em dois estágios	Água residuária real diluída Reator Anammox: CNA: 1,3 – 6,3 gN.L ⁻¹ C/N: 0,5 ± 0,1	Reator NP: Oxidação N-NH ₄ ⁺ : 49% Reator Anammox: Eficiência oxidação 44,8 – 87,7%	Ajustes nos compostos nitrogenados para adequar o afluente no reator Anammox. A medida que aumentou o CNA, aumentou o CNR	Silveira et al. (2021)
RBS Anammox + desnitrificação parcial em dois estágios. N-nitrato produzido por Anammox foi utilizado num reator de desnitrificação parcial.	Fase I: água residuária sintética. Fase II: efluente do reator de desnitrificação parcial T: 30 ± 1 °C C/N-NO ₃ ⁻ : 3,0	Conversão N-NO ₃ ⁻ a N-NO ₂ ⁻ 80% Remoção NT 94,06%	A taxa de acumulação do N-nitrato foi de 80% com controle do tempo de reação anóxico (180 min no reator Anammox e 30 min para a desnitrificação parcial) e da relação C/N.	Du et al. (2015)
RBS - avaliação dos processos Anammox e desnitrificação heterotrófica na presença de matéria orgânica	N-NH ₄ ⁺ : 150 mg.L ⁻¹ N-NO ₃ ⁻ : 782 mg.L ⁻¹ DQO: 564 mg.L ⁻¹ (sacarose) pH 7,5 T 30-32°C	Remoção N-NH ₄ ⁺ : 44% Remoção N-NO ₃ ⁻ : 93% Remoção DQO: 82% A presença de sacarose ajudou a desnitrificação heterotrófica. O N-nitrato é o produto da oxidação Anammox preferido na presença de matéria orgânica	Alta relação C/N influenciou no baixo desempenho Anammox. Ao mesmo tempo a remoção do N-amoniaco (44%) se deve à oxidação do N-amoniaco por vias bioquímicas em pH < 7,0	Sabumon (2007)

Tabela 3.6 (continuação)

Tipo e natureza da investigação	Condições operacionais	Principais resultados experimentais	Observações	Referências
Reator UASB com um tanque de decantação para remoção anaeróbia de nitrogênio de resíduos de matadouro de porcos	N-NH ₄ ⁺ : kgN.m ⁻³ N-NH ₄ ⁺ / N-NO ₂ ⁻ : 0,83-1,02 kgN.m ⁻³ .dia DQO: 5,55 kgDQO.m ⁻³ pH 8,2-8,5 T 35°C TDH: 5 dias Alcalinidade: 5150-12400 mgCaCO ₃ L ⁻¹	Remoção NT: 0,59-0,66 kgNT.m ⁻³ Remoção DQO: 4,7-5,2 kg.DQO.(kg.N-NH ₄ ⁺) ⁻¹ Remoção N-NO ₂ ⁻ : 100% Taxa remoção N-NH ₄ ⁺ / N-NO ₂ ⁻ : 1:1,13 – 1:1,65 Composição do gás produzido: 95% N ₂ e 5% CO ₂	A análise dos gases produzidos foi uma boa alternativa para avaliação preliminar dos microrganismos heterotróficos no sistema. Os microrganismos desnitrificantes tem crescimento muito mais rápido, inicialmente, que os Anammox	Ahn; Hwang; Min (2004)
NP/A em dois estágios com posterior desnitrificação em uma estação de tratamento de água residuária que trata de lixiviados de aterros sanitários, Taiwan.	N-NH ₄ ⁺ 634 mg.L ⁻¹ N-NO ₃ ⁻ 0 mg.L ⁻¹ N-NO ₂ ⁻ 3 mg.L ⁻¹ DQO 554mg.L ⁻¹ pH 7,9 T 30-33°C TRC – 12-18 dias	Remoção N-NH ₄ ⁺ 80% Remoção de DQO 28% NT removido com NP/A 68% NT removido via desnitrificação 8% Predominância de bactérias Anammox confirmada por FISH e PCR. Além de bactérias semelhantes a <i>Planctomycetes</i> .	O balanço de massa do sistema usando as equações estequiométricas da nitrificação, Anammox e desnitrificação é a melhor abordagem para a avaliação do processo SNAD. Diferentes técnicas de microbiologia molecular podem ser usadas para a identificação de várias espécies envolvidas no sistema SNAD.	Wang et al. (2010)

Tabela 3.6 (continuação)

Tipo e natureza da investigação	Condições operacionais	Principais resultados experimentais	Observações	Referências
Anammox + desnitrificação parcial em dois estágios. Efluente rico em N-nitrato (proveniente do Anammox) alimentava o reator de desnitrificação parcial para produção de N-nitrito e depois retornava ao reator Anammox. Avaliação do Anammox durante a digestão anaeróbia	NT: 820 mg.L ⁻¹ T: 28°C C/N-NO ₃ ⁻ : 3,0 e 2,0 N-NH ₄ ⁺ : 250 mg.L ⁻¹ N-NO ₃ ⁻ : 200 mg.L ⁻¹ N-NO ₂ ⁻ : 250 mg.L ⁻¹ DQO: 5400 mg.L ⁻¹ pH 7,55 T 37°C TRC: 12-18 dias	Remoção NT 97,8% Remoção N-NH ₄ ⁺ 96,7% Remoção N-NH ₄ ⁺ : 22,5% Remoção N-NO ₂ ⁻ : 100% Relação de consumo N-NH ₄ ⁺ / N-NO ₂ ⁻ : > 1/1,32 Mais N-nitrito é consumido do que o necessário para Anammox. A redução do N-nitrito ocorre principalmente através da desnitrificação.	Remoção NT principal via Anammox. PCR confirmou presença Anammox e espécie predominante foi <i>Candidatus_Brocadia</i> . A alta relação C/N, favorece a competição dos desnitrificantes e DNRA com Anammox. Portanto, o controle da relação C/N é um fator essencial para estabelecimento do acoplamento entre os grupos desnitrificantes e Anammox.	Cao et al. (2016)

Fonte: KUMAR; LIN (2010) modificado

Como estudado até o momento, para estabelecimento do acoplamento entre Anammox e desnitrificação são importantes alguns requisitos: 1 – Configuração de reator com TDH e TRC adequados. 2 – Condições ambientais favoráveis, OD, temperatura, pH, alcalinidade e adequação da concentração de substratos (N-amoniaco, N-nitrito, N-nitrato, DQO) são essenciais. Reactores UASB apresentam uma boa configuração para estabelecimento dos processos Anamox e desnitrificação (JIN et al., 2008b). Como a principal limitação na aplicabilidade do processo é o tempo de duplicação das bactérias Anammox, o reator destinado a este processo deve ser capaz de reter a biomassa de forma eficiente. Ademais, a aplicação e o desempenho do reator dependem da sua estabilidade em relação às flutuações nas concentrações do substrato e vazão. JIN et al. (2008) relataram que o processo Anammox é mais tolerante ao choque hidráulico do que ao choque na carga do substrato. Além da seleção das configurações do reator, é essencial conhecer as condições ótimas / favoráveis de crescimento dos microrganismos Anammox e desnitrificantes.

A Tabela 3.7 mostra o efeito das condições ambientais sobre microrganismos Anammox e desnitrificantes. Sob condições ácidas ($\text{pH} < 5$), são observadas reduções no rendimento, taxa de desnitrificação e eficiência, por afetar a atividade das enzimas *Nir* e *Nor* da via desnitrificante devido à formação de óxido nítrico. A temperatura do sistema afeta a taxa de consumo do N-nitrato pelas desnitrificantes e tem grande influência na atividade máxima específica das Anammox. A temperatura desfavorável pode induzir mudanças na expressão genética do processo de desnitrificação e afetar a eficiência de consumo dos substratos e o rendimento da desnitrificação. Por outro lado, as condições aeróbias podem inibir reversivelmente as atividades Anamox e organismos desnitrificantes. A inibição da atividade desnitrificante pode ser devida à competição dos elétrons entre a oxidase e a nitrito redutase. No entanto, a sensibilidade ao oxigênio está relacionada ao gênero microbiano. As condições ambientais favoráveis para os microrganismos Anammox e desnitrificante variam muito de acordo com o gênero microbiano e sua atividade metabólica; assim, uma ampla gama de condições ambientais pode ser vista na literatura.

Tabela 3-7– Efeito das condições ambientais sobre microrganismos Anammox e desnitrificantes

Parâmetros	Anammox		Desnitrificantes heterotróficos	
	Faixa adequada	Efeito quando fora da faixa	Faixa adequada	Efeito quando fora da faixa
OD	05-0,7	- Inibição reversível da atividade. - Sob condições de excesso de OD, pode ocorrer oxidação indesejada do N-nitrito.	~0,0	- A sensibilidade ao OD está relacionada ao gênero microbiano. - Inibir a redução de N-nitrito.
pH	6,7-9,5	- Em valores de pH muito alto ou muito baixo, pode ocorrer supressão da atividade por alta acidez/alcalinidade. - Inibição por amônia livre.	6-9	- pH ácido diminui a taxa de desnitrificação, devido à formação de óxido nitroso (a pH <5). - Afeta as enzimas <i>Nir</i> e <i>Nor</i> da via desitrificante.
Temperatura (°C)	20-40	- Abaixo de 10°C, a atividade Anammox é completamente interrompida. - A atividade específica é diretamente proporcional à temperatura, que é maior entre 35 e 40°C.	20-35	- Temperaturas altas e baixas podem causar alterações físico-químicas na estrutura da membrana celular.
N-NH ₄ ⁺ : N-NO ₂ ⁻	Entre 1:1 e 1:5	- A melhor razão que não seja o valor estequiométrico (1:1,32) pode diminuir a eficiência de remoção de NT.	C:N entre 0,8 e 1,6	- Em altas relações C/N, a energia livre de Gibbs é menos favorável à desnitrificação.
Substrato	N ₂ H ₄ e NH ₂ OH	- O metanol é tóxico e pode produzir irreversibilidade.	Metanol é o preferido	A atividade de <i>Nar</i> é inibida por azida, tiocianato, cianeto, dinitrofenol. - A atividade do <i>Nir</i> pode ser fortemente inibida pelo óxido nitroso.

Fonte: Kumar and Lin (2010) modificado

Com o estudo dos trabalhos citados, pode-se resumir que o acoplamento dos processo Anammox e desnitrificação heterotrófica pode ser estabelecido em um único reator, desde que adotadas as seguintes etapas: (1) iniciar o processo Anammox sob quantidades estequiométricas de N-NH_4^+ e N-NO_2^- (1:1,32) com lodo grânular Anammox; (2) manutenção da concentração de OD em torno de $0,5 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ até a remoção de N-amoniaco atingir o estado estacionário; (3) estimar a quantidade de N-nitrato; (4) iniciar a desnitrificação heterotrófica adicionando DQO conforme o requisito estequiométrico (1 mol de NO_3^- por mol de DQO) para a conversão de N-nitrato em N-nitrito e (5) análise das atividades de bactérias Anammox e desnitrificantes usando técnicas de balanço de massa dos reatores e técnicas de biologia molecular (KUMAR; LIN, 2010).

A análise abrangente das características das águas residuárias afluentes é muito importante antes do desenvolvimento do processo acoplado Anammox e desnitrificação. A razão é que a proporção de N-NH_4^+ : N-NO_2^- tem maior influência sobre o processo Anammox do que sobre a desnitrificação, enquanto que a relação C:N tem maior influência sobre a desnitrificação. Por outro lado, controlar o acoplamento entre os dois processos é relativamente mais simples, por meio do balanço de massa do reator, do que por operações biotecnológicas, isto é, controlar a atividade enzimática (AHN; HWANG; MIN, 2004; CHEN et al., 2009). Todavia, estimar a quantidade de espécies nitrogenadas, ou seja, N-amoniaco, N-nitrito e N-nitrato, utilizados por espécies de Anammox e desnitrificantes autotróficos ou heterotróficos é difícil no processo acoplado. A presente pesquisa tem como objetivo contribuir no preenchimento das lacunas existentes, aproximando a utilização do processo Anammox para utilização no pós tratamento de efluente de UASB rico em N-amoniaco e com residual de matéria orgânica.

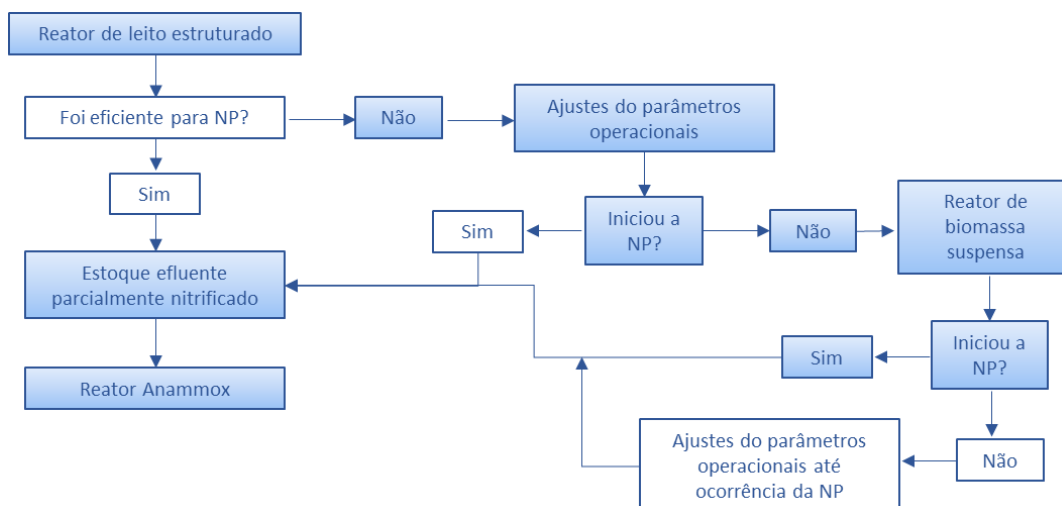
4 Material e métodos

4.1 Organograma experimental

O estudo do processo de nitrificação parcial seguido pelo processo Anammox foi pensado para uma água residuária real e em dois reatores sequenciais, de tal forma a facilitar a operação e ocorrência da NP baseado em estudos anteriores. Em um primeiro momento, com base no trabalho realizado por Almeida et al. (2018) foi estudada a

ocorrência da nitrificação parcial em reator de leito estruturado, com baixa concentração de oxigênio dissolvido. Contudo, este sistema mostrou-se ineficiente, passando a etapa de nitrificação parcial a ser estudada em reator de biomassa suspensa. O efluente parcialmente nitrificado foi armazenado e utilizado posteriormente no reator Anammox (Figura 4.1).

Figura 4.1- Organograma dos experimentos. Em destaque estão as etapas adotadas durante o presente trabalho

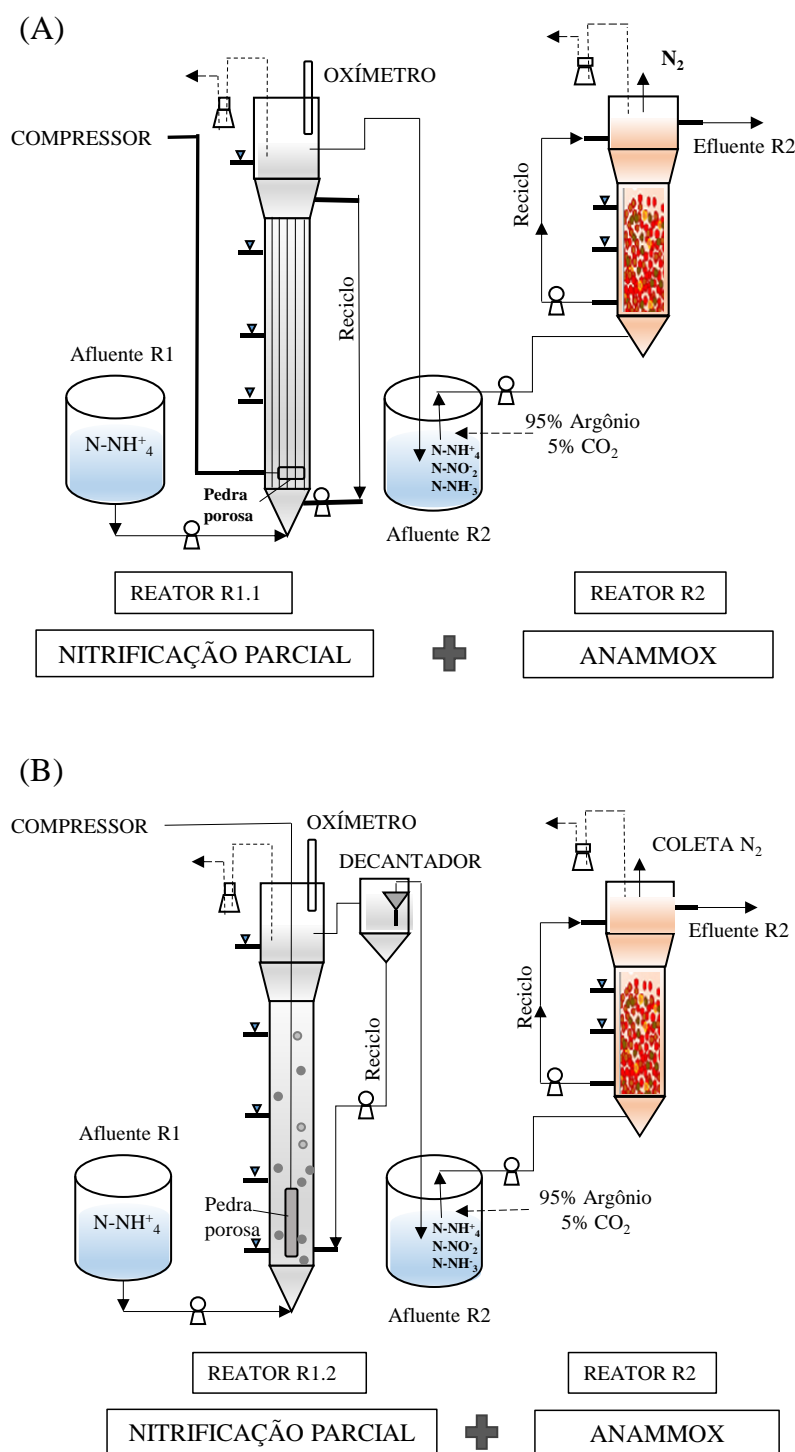


Fonte: Natália C. Silveira, 2022

4.2 Aparato Experimental

No presente trabalho, o processo NP/A foi avaliado em um sistema composto por dois reatores sequenciais (Figura 4.2). O reator (R1) foi empregado para a nitrificação parcial da água residuária, seguido de um reator de fluxo ascendente com biomassa granular para desenvolvimento do processo Anammox (R2). Para facilitar a compreensão, o primeiro reator testado para NP será denominado de R1.1, que é um reator de leito estruturado para aderência da biomassa (Figura 4.2 - A). O segundo reator testado para NP será denominado R1.2 e é um reator de biomassa suspensa (Figura 4.2 - B).

Figura 4.2 - Esquema do aparato experimental, nos dois momentos (A – leito estruturado e B – biomassa em suspensão) com as correntes de entrada e saída de cada reator e componentes nitrogenados do meio reacional



Fonte: SILVEIRA et al. (2021) modificado

Os reatores foram confeccionados em acrílico. O reator de leito estruturado, apresentou as seguintes características construtivas: diâmetro interno 21cm, diâmetro

externo de 22 cm e comprimento total aproximado de 57 cm (incluindo a altura da porção cônica), com volume total de 1,5L. O leito fixo estruturado foi montado a partir da fixação de tiras de poliuretano (10x10x36) entre telas de aço inoxidável alocadas na estrutura de acrílico, resultando em um volume útil de 1,0L. Foram utilizadas 9 tiras no total, conforme apresentado na Figura 4.3.

Figura 4.3- Montagem do leito fixo estruturado de espuma de poliuretano



Fonte: Natália C. Silveira, 2022

O reator R1.2 apresentou um volume útil de 1,6 L, considerando o volume do decantador. O reator R2 apresentou um volume útil de 0,5 L. Os reatores foram mantidos em câmara de controle de temperatura a $37,0 \pm 1,1$ °C. A vazão da linha de reciclo nos dois reatores foi mantida em três vezes o valor da vazão de alimentação de cada reator.

A aeração contínua dos reatores R1.1 e R1.2 foi realizada por meio de um compressor de aquário (Big Air, A420) e um difusor de pedra porosa. O compressor foi instalado em série a um rotâmetro e uma válvula para controle de vazão, que foi ajustada para a manutenção de concentrações de oxigênio dissolvido inferiores a $2,0 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$. A concentração de oxigênio dissolvido era verificada diariamente com o auxílio de oxímetro e corrigida sempre que necessário.

4.3 Operação dos reatores para nitrificação parcial

4.3.1 Reator R1.1

O reator R1.1 de leito estruturado foi estudado por 336 dias. O experimento foi dividido em 2 etapas operacionais - I: TDH $6,5 \pm 0,8$ horas; OD $1,0 \pm 0,3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e II:

TDH $11,3 \pm 1,1$ horas; OD $1,5 \pm 0,6 \text{ mg.L}^{-1}$ (Tabela 4.1), de acordo com os objetivos de cada uma.

Tabela 4-1- Fases de operação do sistema e os parâmetros operacionais adotados

Fase	TDH (h)	OD (mg.L^{-1})	T ($^{\circ}\text{C}$)	Período (dias)
Inoculação		$0,9 \pm 0,2$	$36 \pm 1,2$	0 – 6
Etapa I	$6,5 \pm 0,8$	$1,0 \pm 0,3$	$36 \pm 0,8$	7 – 101
Etapa II	$11,3 \pm 1,1$	$1,5 \pm 0,6$	$36,1 \pm 1,3$	102 - 336

Fonte: Natália C. Silveira, 2022

4.3.2 Reator R1.2

O reator R1.2, de biomassa suspensa, foi operado por 143 dias, com TDH de $9,8 \pm 1,6$ h, TRC de $6,4 \pm 3,1$ d e CNA de $0,5 \pm 0,1 \text{ gN.L.d}^{-1}$. O efluente do R1.2 era armazenado à temperatura ambiente para posterior uso como afluente do reator R2.

4.3.3 Inóculo

Tanto o reator de leito estruturado, quanto o reator de biomassa suspensa, foram inoculados com lodo aeróbio proveniente do sistema de lodos ativados da Estação de Tratamento de Águas Residuárias da fábrica de motores da Volkswagen, situada em São Carlos, SP. Esse lodo apresentou atividade nitrificante significativa constatada em trabalhos anteriores (BARANA et al., 2013; SANTOS et al., 2016 e ESPOSTO, 2018).

4.3.4 Adaptação do inóculo

A fase de adaptação dos reatores de nitrificação parcial foi realizada utilizando metodologia já empregada em estudos no LPB que consistiu em alimentar os reatores com uma mistura de $\frac{1}{4}$ do seu volume útil de lodo aeróbio e os outros $\frac{3}{4}$ de água residuária (BARANA et al., 2013; GUERRERO; ZAIAT, 2018). Esta mistura foi deixada em recirculação com controle da concentração de OD até a oxidação do N-amoniaco. O acompanhamento do processo foi feito através de análises de $N - \text{NH}_4^+$, $N - \text{NO}_2^-$ e

$N - NO_3^-$. Estabilizado o consumo de N-amoniacoal, iniciou-se a operação do reator com a água residuária real, diluída e filtrada.

4.3.5 Água residuária

A água residuária alimentada ao reator R1 foi originada do efluente do reator UASB proveniente da Estação de Tratamento da indústria INCOFAP (Araraquara, SP), fabricante de insumos para ração animal (farinha de sangue, penas e ossos). Este UASB realiza o tratamento de $100 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$ afluente com $813 \pm 257 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ e eficiência de remoção de DQO de 75% para a carga orgânica aplicada de $0,41 \pm 0,13 \text{ kg DQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$. Foram realizadas três coletas ao longo da pesquisa. O efluente coletado, foi homogeneizado e submetido à filtração simples em papel de filtro ($5 \mu\text{m}$ de poro) para a remoção sólidos suspensos e óleos e graxas residuais. Em seguida, foi diluído até que a concentração de N-amoniacoal fosse, em média, de $200 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$, e armazenado sob refrigeração à temperatura de 3°C para preservação das amostras. A Tabela 4.2 apresenta a caracterização do efluente de reator UASB após a filtração e do efluente filtrado e diluído.

Tabela 4-2- Caracterização do efluente da fábrica de insumos para ração animal (efluente filtrado) e do efluente após diluição

Parâmetros (unid.)	Efluente filtrado	Efluente filtrado e diluído
DBO ($\text{mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$)	195 ± 10	20 ± 10
DQO ($\text{mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$)	1292 ± 36	$45,3 \pm 26,9$
N-amoniacoal ($\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$)	1200 ± 180	$213,0 \pm 50,3$
N-nitrito ($\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$)	0	$0,3 \pm 0,5$
N-nitrato ($\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$)	0	$0,8 \pm 1,0$
pH	$7,9 \pm 0,1$	$8,05 \pm 0,07$
Alcalinidade a bicarbonato ($\text{mgCaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$)	723 ± 43	$614,1 \pm 112,2$

Fonte: Natália C. Silveira, 2022

4.4 Operação do reator Anammox

O reator R2 foi operado por 440 dias e a operação foi dividida em seis fases experimentais em que se avaliou a influência da carga nitrogenada aplicada. A Tabela 4.3 apresenta os parâmetros operacionais impostos em cada fase.

Tabela 4-3- Parâmetros operacionais do R2 em cada fase

Fases	Tempo de operação (dias)	CNA * g NL⁻¹.d⁻¹	TDH* h
I - Efluente real^b	52	1,5	4
II - Efluente sintético	85	1,5	4
III - Efluente real^a	87	1,5	4
IV - Efluente real^a	83	4,5	1,5
V - Efluente real^a	48	6,0	1,0
VI - Efluente real^b	85	6,5	1,0

*valores nominais. CNA: Carga nitrogenada aplicada TDH: Tempo de detenção hidráulica

^aÁgua residuária real parcialmente nitrificada com ajuste das proporções das espécies nitrogenadas

^bÁgua residuária real parcialmente nitrificada sem ajuste das proporções das espécies nitrogenadas

Fonte: Natália C. Silveira, 2022

As Fases I e II constituíram etapas de adaptação da biomassa. Na Fase I, avaliou-se o comportamento da biomassa na presença de um substrato logo após o processo de nitrificação parcial, mesmo não estando na estequiometria adequada ao processo Anammox. Na Fase II, o reator R1 foi alimentado com água residuária sintética visando fornecer o substrato mais adequado possível ao processo Anammox, proporcionando o enriquecimento da biomassa, favorecendo então a elevada eficiência de remoção dos compostos nitrogenados. Da Fase III, IV e V, a concentração de N-NO₂⁻ era ajustada conforme a concentração de N-NH₄⁺ remanescente no efluente do reator R1. Diferindo das demais fases, na Fase VI não houve necessidade de correção da concentração das espécies nitrogenadas, para valores próximos da estequiometria, na alimentação do reator R2.

Carga nitrogenada aplicadas (CNA) com médias nominais de 1,5 g N.L⁻¹.d⁻¹ (Fase I a III), 4,5 g N.L⁻¹.d⁻¹ (Fases IV), 6,0 g N.L⁻¹.d⁻¹ (Fase V) e 6,5 g N.L⁻¹.d⁻¹ (Fase VI) foram avaliadas por meio da alteração do tempo de detenção hidráulica (TDH) do reator R2. As cargas de 1,5, 5,0, 6,0 e 6,5 (g N.L⁻¹.d⁻¹) corresponderam a TDHs de 4,0, 1,5 e 1,0 (horas), respectivamente.

4.4.1 Inóculo

A biomassa utilizada para inocular o reator R2 foi retirada de um reator Anammox de fluxo ascendente e biomassa granular em operação no Laboratório de Processos Biológicos da Escola de Engenharia de São Carlos tratando água residuária sintética e submetido a uma carga nitrogenada aplicada de $1,0 \pm 0,15 \text{ g N.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. A coleta do inóculo foi realizada após 380 dias de operação, quando o reator apresentava eficiência de remoção de N-amoniacal superior a 80%.

4.4.2 Água residuária

Nas Fases I, III, IV e V o reator R2 foi alimentado com a água residuária parcialmente nitrificada efluente ao reator R1, após ajuste das proporções das espécies nitrogenadas de forma a se obter uma relação estequiométrica molar de $1,0 \text{ N-NH}_4^+$ para $1,32 \text{ N-NO}_2^-$. Na Fase VI, não houve ajuste das proporções das espécies nitrogenadas. Feitas as correções, o afluente do reator R2 era armazenado em um galão de 50 L, mantido à temperatura ambiente e no qual uma vez ao dia era fluxionada uma mistura gasosa com 95% argônio e 5% CO_2 visando manter a concentração de OD inferior a $0,3 \text{ mg O}_2.\text{L}^{-1}$.

Durante a fase II, foi utilizado como fonte de substrato para os microrganismos Anammox água residuária sintética, com a seguinte composição (g.L^{-1}): NaHCO_3 0.5, KH_2PO_4 0.0272, $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ 0.123, CaCl_2 0.05. Foi adicionado $1,0 \text{ ml.L}^{-1}$ da solução de elemento traço I, que é formada por (g.L^{-1}): EDTA 5, FeSO_4 5. Da solução elemento traço II, composta por (g.L^{-1}): 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, $\text{CuSO}_4.5\text{H}_2\text{O}$ 0.25, $\text{NaMoO}_4.2\text{H}_2\text{O}$ 0.22, $\text{NiCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$ 0.19, $\text{NaSeO}_4.10\text{H}_2\text{O}$ 0.21 e H_3BO_4 0.014, foram adicionados $1,25 \text{ ml.L}^{-1}$. N-amoniacal e N-nitrito foram adicionados a partir de soluções de NaNO_2 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. (VAN DE GRAAF et al., 1996).

4.5 Monitoramento dos reatores

Amostras do afluente e do efluente dos reatores R1.1, R1.2 e R2 foram coletadas e analisadas três vezes na semana e a alimentação de cada reator preparada duas vezes na

semana. A partir dos resultados das análises, foi possível calcular as eficiências de remoção de DQO e remoção de Nitrogênio Total, de oxidação do nitrogênio amoniacal e a taxa de acúmulo de N-nitrito - NAR (Equação 4.1 a 4.4).

$$\text{Remoção DQO (\%)} = \frac{DQO_{\text{afluente}} - DQO_{\text{efluente}}}{DQO_{\text{afluente}}} * 100 \quad \text{Equação 4.1}$$

$$\text{Remoção NT (\%)} = \frac{(N-NH_4^+ + N-NO_2^- + N-NO_3^-)_{\text{afluente}} - (N-NH_4^+ + N-NO_2^- + N-NO_3^-)_{\text{efluente}}}{(N-NH_4^+ + N-NO_2^- + N-NO_3^-)_{\text{afluente}}} * 100 \quad \text{Equação 4.2}$$

$$\text{Oxidação N-NH}_4 \text{ (\%)} = \frac{N-NH_4_{\text{afluente}} - N-NH_4_{\text{efluente}}}{N-NH_4_{\text{afluente}}} * 100 \quad \text{Equação 4.3}$$

$$\text{Taxa de acumulação de N-nitrito - NAR (\%)} = \frac{(N-NO_2^-)}{(N-NO_2^- + N-NO_3^-)} * 100 \quad \text{Equação 4.4}$$

Onde: DQO_{afluente} = Demanda Química de Oxigênio afluente (mg.L^{-1}); DQO_{efluente} = Demanda Química de Oxigênio efluente (mg.L^{-1}); $N-NH_4^+_{\text{afluente}}$ = N-amoniacal afluente (mg.L^{-1}); $N-NH_4^+_{\text{efluente}}$ = N-amoniacal efluente (mg.L^{-1}); $N-NO_2^-_{\text{afluente}}$ = Nitrogênio na forma de Nitrito afluente (mg.L^{-1}); $N-NO_2^-_{\text{efluente}}$ = Nitrogênio na forma de Nitrito efluente (mg.L^{-1}); $N-NO_3^-_{\text{afluente}}$ = Nitrogênio na forma de Nitrato afluente (mg.L^{-1}); $N-NO_3^-_{\text{efluente}}$ = Nitrogênio na forma de Nitrato efluente (mg.L^{-1})

4.6 Ensaio hidrodinâmico

O ensaio hidrodinâmico visa descrever o padrão de escoamento dos reatores, através da determinação da distribuição do tempo de residência (DTR) e o modelo de dispersão que melhor descreve o comportamento hidrodinâmico dos reatores.

O ensaio foi realizado com injeção do tipo degrau que consiste na introdução de traçador na corrente de alimentação, a qual é mantida constante durante todo o experimento. A curva resposta será sempre crescente até que se atinja a concentração do traçador aplicada. Nos ensaios, utilizou-se uma solução de cloreto de sódio (NaCl) a 10000 mg.l^{-1} como traçador, com base na metodologia descrita por (LEVENSPIEL, 2000).

O ensaio com injeção do tipo degrau resulta em uma curva resposta de concentração versus tempo, que será normalizada para uma curva denominada curva F, construída a partir da relação:

$$F = \frac{C}{C_{máx}} \quad \text{Equação 4.5}$$

A curva F é transformada na curva DTR (curva E). Para que as funções E e F sejam relacionadas adequadamente, é necessário que se relacione a concentração na saída do tanque (C_t) com a concentração na corrente de entrada (C_0) por meio da integral de convolução, conforme Equação 4.6:

$$C(t) = \int_0^t C_0 (t - t') \cdot E(t') dt' \quad \text{Equação 4.6}$$

Como na injeção do topo degrau C_0 é constante, a Equação 4.6 pode ser escrita como:

$$C(t) = \int_0^t E(t') dt' \quad \text{Equação 4.7}$$

Dividindo-se a Equação 4.7 por C_0 , chega-se a:

$$\frac{C(t)}{C_0} = \int_0^t E(t') dt' \quad \text{Equação 4.8}$$

Na Equação 4.8, C/C_0 é igual a função F (ver Equação 4.5). Então:

$$E = \frac{dF}{dt} \quad \text{Equação 4.9}$$

Dessa forma, A curva E (DTR) pode ser obtida a partir de ensaio com injeção tipo degrau.

4.7 Análises físico-químicas

Amostras líquidas do afluente e do efluente dos reatores R1.1, R1.2 e R2 foram analisadas para a determinação da concentração dos compostos nitrogenados (N-NH₄⁺, N-NO₂⁻ e N-NO₃⁻), bem como os valores de oxigênio dissolvido (OD), pH, DQO e alcalinidade. As análises foram realizadas de acordo com APHA (1998), exceto alcalinidade, que foi medida de acordo com (KAPP, 1984).

4.8 *Análise estatística*

A aderência dos dados à distribuição normal foi verificada por meio do teste estatístico de Shapiro-Wilk no nível de 95% de confiança. Com base nos resultados, optou-se pela utilização do teste não-paramétrico de Mann Whitney para comparação das medianas, quando os conjuntos de dados não aderiam à normalidade. Quando os conjuntos de dados aderiam à normalidade, optou-se pela utilização do teste t de Student para comparação das médias. O limite de significância utilizado foi de $p < 0,05$. Os cálculos foram realizados com o auxílio do software PAST 4 (University of Oslo, Oslo, Noruega).

4.9 *Balanço de massa*

O balanço de massa foi realizado considerando todas as formas nitrogenadas presentes. O modelo foi desenvolvido utilizando a ferramenta SOLVER do Microsoft Excel 2010 de modo a representar os processos que possivelmente estariam presentes no reator e que de fato são responsáveis pela remoção de nitrogênio da fase líquida. E não foi considerada a atividade heterotrófica relacionada ao ciclo do nitrogênio (bactérias heterotróficas aeróbias) para remoção da matéria orgânica.

As equações utilizadas no modelo foram as equações 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 e 3.5, já apresentadas neste trabalho. Para tanto, considerou-se que durante a desnitrificação via nitrato foram consumidos 2,5 mg de DQO.L⁻¹ e durante a desnitrificação via nitrito foram consumidos 1,7mg de DQO.L⁻¹.

4.10 *Análises Microbiológicas*

4.10.1 Extração do DNA genômico

Ao final da operação do reator R1.1 (336 dias), foram retiradas três amostras da biomassa em suspensão e do lodo aderido às hastas, à parede e na pedra porosa do reator. Esta amostra foi denominada A₁.

Ao final da operação do reator R1.2 (145 dias), foram retiradas três amostras da biomassa em suspensão e do lodo aderido às paredes do reator. Esta amostra foi denominada A₂.

No reator R2, foram realizadas duas coletas de biomassa granular. A primeira (A₃) após 80 dias de operação que o reator R2 estava sendo alimentado com água residuária sintética. Nessa ocasião, a CNA era de $1,5 \pm 0,3 \text{ g N.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e a eficiência de remoção de NT de $86 \pm 7\%$. A segunda (A₄), após 220 dias que o reator R2 estava sendo alimentado com água residuária real (ao final da Fase V). Nos dois casos, foram retiradas três amostras da biomassa granular presente no interior do reator.

As amostras coletadas (A₁, A₂, A₃ e A₄) foram lavadas com solução salina tampão de fosfato (PBSx1) e centrifugadas para remoção de impurezas e a biomassa úmida preservada a -20°C . A extração do DNA genômico foi realizado de acordo com o protocolo de (GRIFFITHS, 2000). A concentração e pureza do DNA foram avaliadas utilizando-se espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA), sendo a relação de absorvância (A₂₆₀/A₂₈₀) na faixa de 1,8 a 2,0, indicativa de pureza dos ácidos nucleicos (R. DESJARDINS; CONKLIN, 2011). A integridade do DNA ($> 10.000 \text{ pb}$) foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 0,8%. As amostras foram enviadas para a empresa Genone: Soluções em biotecnologia.

4.10.2 Sequenciamento do gene 16S rRNA

Foram utilizados os primers universais 341F (CCTAYGGGRBGCASCAG) e 806R (GGACTACNNGGGTATCTAAT) para amplificação do 16S DNAr de Bacteria. O preparo de biblioteca foi realizado com utilização do kit NEBNext® Ultra DNA Library Pre Kit for Illumina (New England Biolabs, Ipswich, EUA) seguindo as recomendações do fabricante. A biblioteca foi sequenciada na plataforma Illumina HiSeq 2000 e leituras pareadas de 250 pb foram geradas.

As leituras foram montadas e filtradas (QPhred ≥ 33) para a remoção de sequências contendo bases de baixa qualidade. Quimeras foram detectadas (UCHIME algorithm) e eliminadas. Após o alinhamento das sequências, utilizou-se o algoritmo UPARSE-OTU para a determinação de unidades taxonômicas operacionais (OTUs, do inglês operational taxonomic units) com 97% de similaridade. A classificação

taxonômica das OTUs foi realizada com o RDP classifier (Ribossomal Database Project; <http://rdp.cme.msu.edu/>).

As sequências de nucleotídeos foram depositadas no banco de dados Sequence Read Archive (SRA) do NCBI (National Center for Biotechnology Information) e está disponível sob o número de acesso PRJNA722874.

Para as amostras dos reatores R1.1 e R1.2 foi feita nova análise taxonômica de acordo com metodologia empregada por Silva et al. (2021) diferenciando apenas o banco de dados utilizados que foi o Midas Field Guide (DUEHOLM, M.S., NIERYCHLO, M., ANDERSEN, K.S., RUDKJØBING, V., KNUDSEN, S., THE MIDAS GLOBAL CONSORTIUM, ALBERTSEN, M., NIELSEN, 2021). A anotação taxonômica dos amplicons foi refinada por meio de buscas manuais na plataforma Blast.

4.10.3 Cálculos de índices ecológicos

A diversidade microbiana nos reatores biológicos foi avaliada de acordo com os índices de diversidade, dominância e riqueza relativa. Os índices foram calculados com base no número e intensidade relativa das bandas do DGGE. Nas amostras sequenciadas, os índices foram obtidos com base no número de sequências das OTUs com 97% de similaridade. O software utilizado para os cálculos foi o PAST 3 (University of Oslo, Oslo, Noruega). A diversidade de populações foi estimada com base no índice de Shannon (H) (MAGURRAN, 1988), a dominância (D) foi calculada de acordo com (HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T. A. T., RYAN, 2001) e o indicador de riqueza utilizado foi o estimador Chao-1 (S1) que considera o número de populações raras na amostra acrescido de um termo que traduz a possibilidade de encontrar novas populações não descobertas (CHAO; LEE, 1992).

4.11 *Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV*

Para as análises de MEV, foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura ZEISS modelo SIGMA equipado com canhão de elétrons por emissão de campo (MEV-FEG) e sistema de análise química qualitativa e quantitativa OXFORD para detecção de elementos.

As amostras foram preparadas com hexametildisilazane seguindo a metodologia descrita por Nation (1983) e banho de prata para observação dos microrganismos aderidos à mangueira de silicone acoplada à saída do reator.

4.12 Microscopia ótica de contraste de fase e de fluorescência

A caracterização morfológica da biomassa foi realizada através da microscopia ótica de contraste de fase e de fluorescência em microscópio Olympus BX60, acoplado à câmera com captura de imagem e software Image-Pro Plus 4.5.

As amostra dos microrganismos foram extraídas por maceramento e compressão das hastes do leito estruturado do reator R1.1 e por raspagem superficial, no caso da mangueira de silicone acoplada à saída do reator R1.2. Já os grânulos presentes no reator R2 foram separados por agitação com pérolas de vidro.

5 Resultados e Discussão

5.1 Nitrificação parcial

Os resultados do monitoramento dos reatores R1.1 e R1.2, destinados ao processo de nitrificação parcial, serão apresentados nos itens 5.1.1 e 5.1.2, respectivamente. Foram analisadas a remoção de nitrogênio, as concentrações de OD, o consumo e/ou produção de alcalinidade e o comportamento do pH.

Nos itens 5.1.1 e 5.1.2 estão apresentadas as discussões sobre a influência das duas diferentes alternativas de crescimento da biomassa na oxidação do nitrogênio amoniacal.

No item 5.1.2.4 estão apresentados os resultados das análises microbiológicas de amostras que foram coletadas nos dois reatores no final de cada etapa.

5.1.1 Monitoramento do Reator de leito estruturado - R1.1

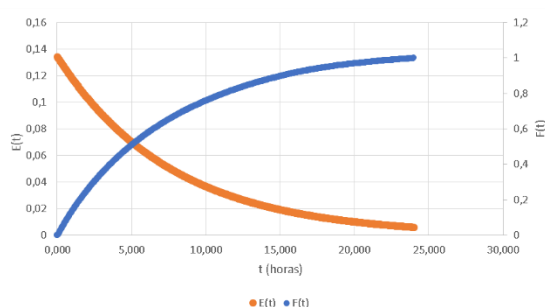
5.1.1.1 Ensaio hidrodinâmico

A injeção do traçador na forma de função degrau gerou a curva $F(t)$, que representa a massa de traçador que passa pelo reator em função de t . A curva $E(t)$ é a derivada da

curva $F(t)$, e representa a distribuição dos tempos de retenção do traçador em função de t . a Figura 5.1 mostra as curvas obtidas a partir do ensaio hidrodinâmico.

O TDH real obtido foi de 6,515 horas, muito próximo ao TDH teórico (6 horas), indicando que não houve atraso significativo ou qualquer outro tipo de anomalia de escoamento, como caminhos preferenciais ou regiões de estagnação, recirculação do fluido no reator, ou caminhos paralelos.

Figura 5.1- Curvas $E(t)$ e $F(t)$ obtidas a partir do ensaio hidrodinâmico

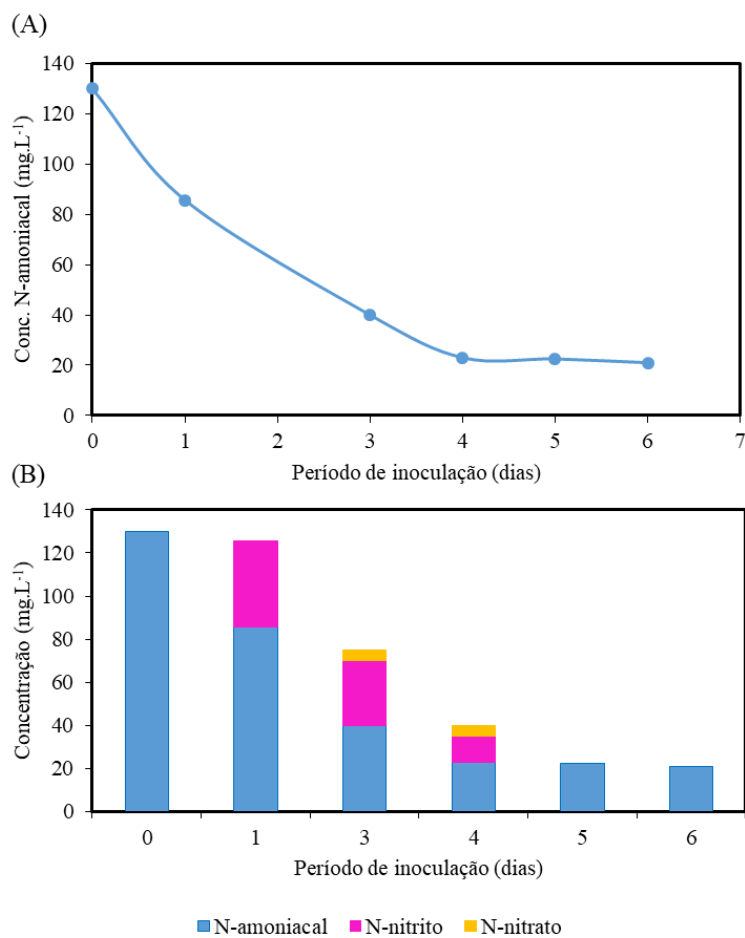


Fonte: Natália C. Silveira, 2022

5.1.1.2 Adaptação do inóculo

O consumo de N-amoniaco durante a fase de adaptação é apresentado na figura 5.2. Durante os 6 dias em que a mistura de lodo e água residuária foi recirculada no sistema, houve remoção de 83% de N-amoniaco (Figura 5.2 A). A oxidação do N-amoniaco levou à formação de N-nitrito já no primeiro dia de adaptação e, nos dois dias subsequentes houve formação de N-nitrato (Figura 5.3 B). Nos últimos dias observa-se que ocorreu a nitrificação completa do N-amoniaco, já que não foram observadas as outras formas nitrogenadas.

Figura 5.2 - Espécies nitrogenadas presentes durante o período de inoculação do reator R.1.1



Fonte: Natália C. Silveira, 2022

A mudança na coloração do leito estruturado antes e após a inoculação é apresentada na figura 5.3.

Figura 5.3 - Leito estruturado antes e após o período de adaptação do lodo aeróbio



Fonte: Natália C. Silveira, 2022

5.1.1.3 Remoção de nitrogênio

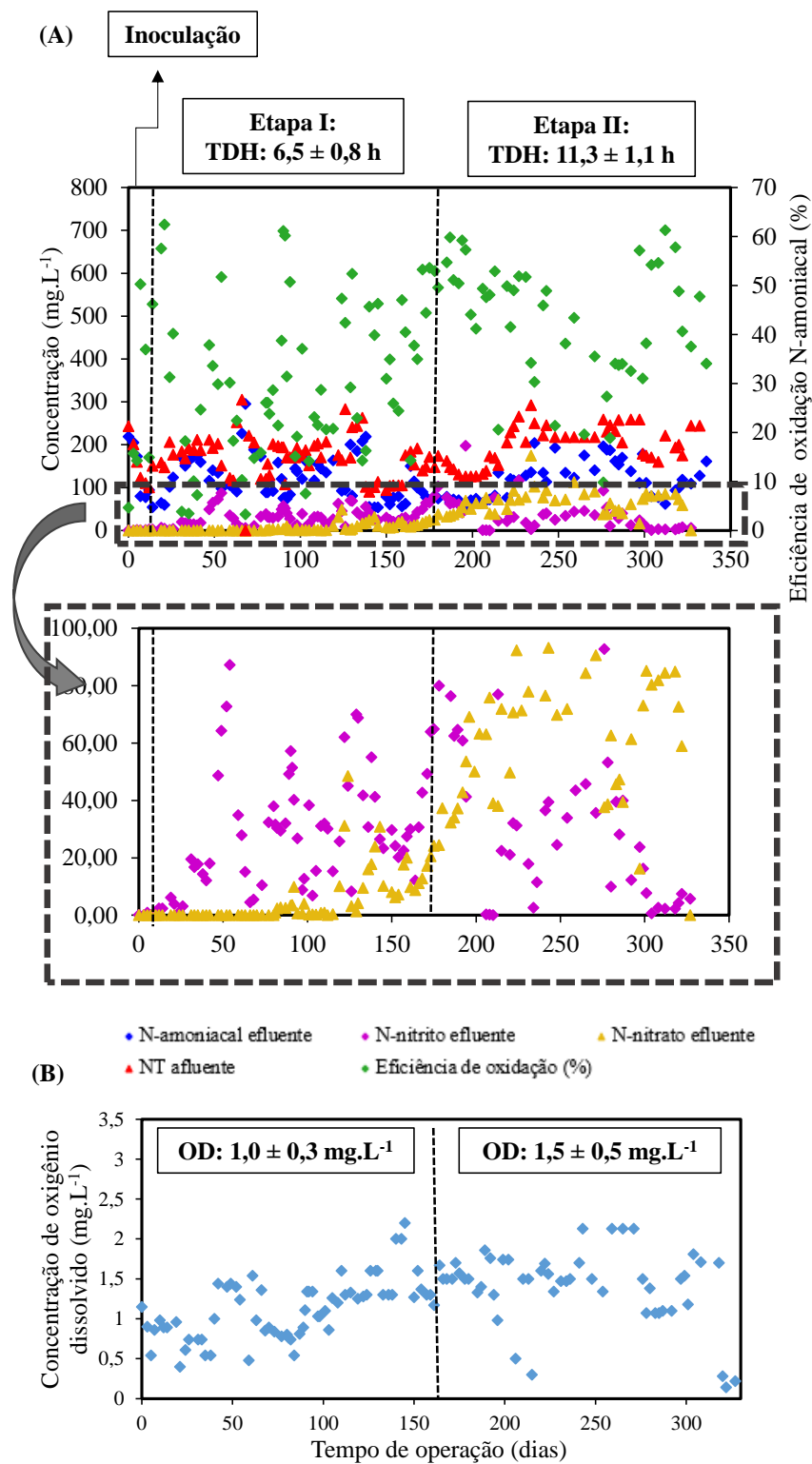
Efluentes de reatores anaeróbios, com altas concentrações de nitrogênio amoniacal e baixa concentração de DQO como a utilizada na presente pesquisa, apresentam características que propiciam o tratamento através do processo Anammox. Para tanto, o estabelecimento do processo de nitrificação parcial se faz necessário, previamente, para adequar as concentrações de N-amoniacal e N-nitrito ao processo Anammox. Desta forma, no reator R1.1, avaliou-se a ocorrência da nitrificação parcial da água residuária.

Durante o período de inoculação (6 dias), o OD foi mantido a $1,2 \pm 0,4 \text{ mg.L}^{-1}$, com o objetivo de favorecer a ocorrência da nitrificação parcial. Quando a eficiência de remoção de N-amoniacal atingiu 80%, iniciou-se a partida do R1.1 com a água residuária.

A fim de favorecer a ocorrência do processo de nitrificação parcial no reator R1.1, a água residuária utilizada como substrato foi mantida com concentrações de N-amoniacal próximas a 200 mg.L^{-1} (CHEN et al., 2009; MIAO et al., 2018). Ganigué et al.(2007) e Guo et al. (2009) observaram que concentrações superiores a 150 mg.L^{-1} de N-amoniacal podem ser inibitórias para as espécies oxidadoras de N-nitrito, o que favorece a manutenção da nitrificação parcial.

Inicialmente, a etapa I foi subdividida em 4 fases, nas quais variou-se a concentração de oxigênio dissolvido para valores entre 0,5 e $2,0 \text{ mgO}_2\text{.L}^{-1}$. Como não houve diferença estatística significativa entre os resultados com diferentes concentrações de OD, considerou-se apenas a etapa como um todo. Sob TDH médio de $6,5 \pm 0,8$ horas e OD $1,0 \pm 0,3 \text{ mg.L}^{-1}$, o percentual de oxidação média do N-amoniacal foi de $29,3 \pm 16,9\%$ (Figura 5.4).

Figura 5.4 – (A) Concentração dos compostos nitrogenados e (B) oxigênio dissolvido no reator R1.1



Fonte: Natália C. Silveira, 2022

Durante os primeiros 40 dias de operação, não foi comprovado o acúmulo de N-nitrito ou de N-nitrato no meio reacional, mesmo tendo sido constatada a eficiência média de remoção de N-amoniacoal de $27,3 \pm 19,6\%$, e a eficiência média de remoção de NT de $30,7 \pm 18,2\%$ (Figura 5.4), o que poderia ser indicativo da ocorrência dos processos NP/Anammox no mesmo reator. De acordo com essa hipótese, não era observado o acúmulo de N-nitrito, uma vez que este estava já sendo utilizado pelas bactérias Anammox que poderiam ter se desenvolvido nas regiões onde a transferência de massa de oxigênio era limitada (CIUDAD et al., 2005).

Nestes primeiros 40 dias de operação, a mangueira de silicone acoplada à saída do reator R1.1 apresentou coloração avermelhada. Indicativo do crescimento de microrganismos Anammox (Figura 5.5). Durante este período, a concentração de OD no reator era de $0,8 \pm 0,2 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ e o acúmulo de N-nitrito foi de 96%, enquanto que a oxidação de N-amoniacoal foi de $29,4 \pm 20,2\%$ (Figura 5.4). Todavia, não foi observado acúmulo de N-nitrato, como o esperado durante o processo Anammox, o que pode ser explicado pela atuação das bactérias heterotróficas desnitrificantes na redução do N-nitrato gerado pelas bactérias oxidadoras de amônia (AnAOB), utilizando carbono orgânico como doador de elétrons (GIUSTINIANOVICH, et al., 2016). Tais observações têm suporte no trabalho de Chen et al. (2009) que estudaram o desenvolvimento dos processos de NP/A e SNAD no tratamento do esgoto sintético em um único reator. Durante a etapa de nitrificação parcial, os autores citaram eficiência de remoção de nitrogênio total de 72% devido à estreita cooperação entre as bactérias BOA e Anammox. O reator de nitrificação parcial era operado com concentração de OD entre $0,5 - 0,7 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ e a produção de nitrato foi negligenciada, por ser considerada bem abaixo do esperado para o processo. Também foi constatada alteração na coloração marrom para coloração avermelhada, característica as bactérias Anammox, na superfície do biofilme do disco rotativo.

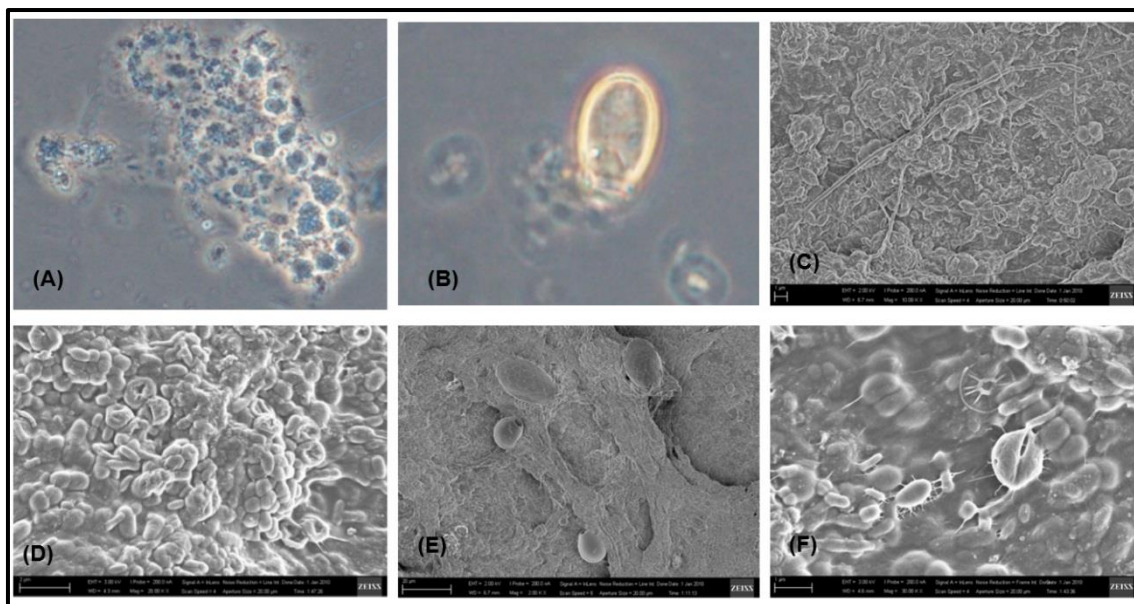
Figura 5.5 - Mangueira de silicone acoplada na saída o R1.1, antes e depois de 90 dias de operação



Fonte: Natália C. Silveira, 2022

A análise de microscopia de contraste de fase do lodo formado na mangueira de silicone, com um aumento de 1250 vezes e a análise de MEV revelaram a formação de cocos, bacilos e bacilocos (Figura 5.6 C), que são indicativos de microrganismos autotróficos nitrificantes, como os *nitrosococos* que convertem N-amoniaco a N-nitrito. Nas figuras 5.6 A e 5.6 D, observam-se aglomerados de clusters que podem ser indicativos da presença de bactérias Anammox. Na imagem da microscopia (5.6 A), estes clusters possuem uma coloração diferenciada das demais estruturas, que pode estar relacionada à cor avermelhada característica das bactérias Anammox. Nas Figuras 5.6 B e 5.6 E, observa-se a presença de ameba de teca e ameba *Euglypha* que são indicativas da ocorrência de nitrificação. Em 5.6 C, pode-se observar a heterogeneidade dos grupos aderidos ao meio suporte, onde, além dos grupos supracitados, observa-se a presença de microrganismos filamentosos heterotróficos. Em 5.6 F, observam-se bacilos com formação de fímbrias que auxiliam na adesão destes grupos ao meio suporte.

Figura 5.6 - Microscopia de contraste de fase (A e B) e Microscopia eletrônica de varredura (C, D, E e F) da mangueira de silicone acoplada à saída do reator R1 após 20 dias de início da operação



Fonte: Natália C. Silveira, 2022

Membranas gasosas de silicone têm se mostrado uma alternativa promissora para a remoção de nitrogênio através do processo NP/A, já que, nesses sistemas, elas são usadas para permear o gás e transferir o oxigênio, sem a formação de bolhas no decorrer do processo de difusão (MARTIN e NERENBERG, 2012). Ribeiro; Rosseto; Souza (2018) avaliaram o enriquecimento da biomassa Anammox e o início do processo de NP/A em um único estágio, em reator de biofilme com membrana aerada. Com carga de $50 \text{ gN.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ (período I) e $100 \text{ gN.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ (período II), após 48 dias foi observada atividade Anammox, permanecendo estável após 80 dias e a remoção média de nitrogênio total chegou 78% no período I e de 61% no período II.

Apesar de a mangueira de silicone apresentar potencial para desenvolvimento de microrganismos Anammox, os resultados encontrados nos primeiros 40 dias não se mantiveram constantes e ajustes operacionais (variação da concentração de OD e aumento na concentração de N-amoniaco no substrato) foram realizados a fim de favorecer a nitrificação parcial. Ao final de 175 dias, a nitrificação parcial não estava sendo alcançada, optou-se pelo aumento nominal do TDH de 6 para 12 horas e de OD de $1,0 \pm 0,3$ para $1,5 \pm 0,5 \text{ mg.O}_2.\text{L}^{-1}$ (LI et al., 2017b; THIRD et al., 2001). Na Figura 5.4, é possível observar que o incremento do TDH de $6,5 \pm 0,8$ para $11,3 \pm 1,1$ horas e OD

(Tabela 13), a partir do 175º dia, resultou em melhora na eficiência de oxidação $30,6 \pm 15,4 \%$ para $43,0 \pm 12,6 \%$. A produção de N-nitrito apresentou aumento de $25,4 \pm 21,7 \text{ mgN.L}^{-1}$ para $34,1 \pm 32,0 \text{ mgN.L}^{-1}$, com aumento na produção de N-nitrato de $5,6 \pm 9,4 \text{ mgN.L}^{-1}$ para $63,1 \pm 29,2 \text{ mgN.L}^{-1}$, o que indica o aumento das bactérias oxidadoras de N-nitrito. Liu et al. (2008), observaram que o consórcio Anammox adaptou-se ao efluente contendo oxigênio dissolvido, à medida que o OD foi aumentado gradativamente de $0,04$ até $8 \text{ mgO}_2\text{.L}^{-1}$. A atividade máxima de oxidação do N-amoniaco foi ligeiramente diminuindo após exposição prolongada ao oxigênio. Wang et al. (2015), demonstraram que as bactérias Anammox podem estar presentes em reatores aeróbios destinados ao tratamento tradicional de esgoto municipal, mesmo quando o OD excede $2 \text{ mgO}_2\text{.L}^{-1}$, e isso demonstra uma capacidade mais robusta do que se pensava anteriormente.

Em sistemas de biomassa de crescimento aderido, a baixa concentração de oxigênio dissolvido levou ao acúmulo de N-nitrito devido à resistência à difusão, que é capaz de limitar seletivamente as BON das BOA (BERNET et al., 2005). Quando comparado aos vários trabalhos apresentados por Paredes et al. (2007), que estudaram os efeitos do oxigênio dissolvido em reatores de nitrificação parcial com biomassa aderida, é possível concluir que o acúmulo de N-nitrito foi maior em sistemas operados com $0,5 < \text{OD} < 1,0 \text{ mgO}_2\text{.L}^{-1}$. No presente trabalho, quando a média de OD foi de $1,0 \pm 0,3 \text{ mgO}_2\text{.L}^{-1}$ a taxa de acúmulo de N-nitrito (NAR) foi de $88,8 \pm 17,0\%$, enquanto a relação $\text{N-NO}_2^-/\text{N-NH}_4^+$ efluente foi de $0,3 \pm 0,3$. Após a mudança do TDH, a nitrificação parcial foi alcançada nos primeiros 20 dias (Figura 5.4). Isto é, 50% do N-amoniaco afluente no reator 1 foi convertida a N-nitrito, estando este efluente com composição adequada para alimentar o reator R2. Entretanto, a taxa de acúmulo de nitrito decaiu para $31,2 \pm 24,8\%$, com o aumento da concentração de OD no meio para $1,5 \pm 0,5 \text{ mgO}_2\text{.L}^{-1}$, enquanto a relação $\text{N-NO}_2^-/\text{N-NH}_4^+$ efluente foi $0,4 \pm 0,7$. Esse resultado diverge do obtido por Jiang et al. (2018b) que alcançaram NAR de 90% em um sistema de NP com relação efluente $\text{N-NO}_2^-/\text{N-NH}_4^+$ de $0,96 \pm 0,18$.

Park, S.; Bae, W.; Rittmann (2009) estudaram os limites operacionais que favoreciam o acúmulo de N-nitrito e concluíram que a concentração de OD deve ser mantida abaixo de $1,0 \text{ mgO}_2\text{.L}^{-1}$ para que as BOA sejam favorecidas e as BON limitadas. Segundo Ge et al. (2015), a concentração de OD necessária para favorecimento das BOA varia de acordo com o sistema empregado, devido a diferenças na transferência de massa do oxigênio no sistema. Ciudad et al. (2005) estudaram a nitrificação parcial de águas

residuárias, em um processo de lodos ativados, com TDH de 7 horas, variando as concentrações de OD entre 0,5 e 2,4 mgO₂.L⁻¹ e obtiveram acúmulo máximo de N-nitrito para OD = 1,0 mg mgO₂.L⁻¹. Porém, com OD de 1,4 mg mgO₂.L⁻¹, obteve-se o máximo de remoção de N-amoniacoal, sem acúmulo de N-nitrito. Ruiz et al. (2003) conseguiram acúmulo de 65% de nitrito com OD de 0,7 mgO₂.L⁻¹, com valor médio de conversão de amônia de 98%. Para OD menor que 0,5 mgO₂.L⁻¹, a remoção de N-amoniacoal foi menor, o que resultou em acúmulo de N-amoniacoal no meio.

Tabela 5-1 - Valores médios dos principais parâmetros de desempenho do reator R1.1 ao longo da operação

Etapas	Taxa de acumulação de nitrito NAR (%)	Eficiência de oxidação do N-NH ₄ ⁺ (%)	N-NH ₄ ⁺ Efluente (mg N.L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ Efluente (mg N.L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ Efluente (mg N.L ⁻¹)	DQO Efluente (mgDQO.L ⁻¹)	pH	TDH (horas)	OD (mgO ₂ .L ⁻¹)
I	88,8±17,0	30,6±15,4	119,0±50,2	29,7±20,6	5,6±9,3	47,7±28,2	7,7±0,4	6,5±0,8	1,0±0,3
II	31,2±24,8	42,8±12,3	115,4±43,4	37,0±38,7	63,1±29,2	55,8±33,4	7,3±0,6	11,3±11,1	1,5±0,5

Fonte: Natália C. Silveira, 2022

A relação C/N relaciona a disponibilidade e a competição por carbono orgânico e N-amoniacoal. O carbono orgânico facilmente biodegradável que sustenta a atividade heterotrófica resulta no estabelecimento de uma competição entre nitrificantes quimioautotróficos e heterotróficos por oxigênio, nutrientes e espaço dentro dos biofilmes, causando uma redução das taxas de nitrificação (OKABE et al., 2011). Apesar da alteração da estratégia operacional, com aumento na relação C/N de 0,2 ± 0,2 para 0,4 ± 0,2 e aumento da concentração de OD de 1,0 ± 0,3 mgO₂.L⁻¹ para 1,5 ± 0,5 mgO₂.L⁻¹, a produção de N-nitrito não foi incrementada ou mantida constante. Entretanto houve aumento da produção de N-nitrato, para oxidação de N-amoniacoal similar (Figura 5.4). Esse resultado difere do encontrado por Hu et al. (2009) que demonstraram que a nitrificação foi reduzida após o suplemento de carbono orgânico na razão C/N de 0,5 para 1,6. Todavia, em ambos os casos, mais tempo foi gasto para alcançar a nitrificação completa. No caso do reator R1.1, o TDH na etapa II foi quase o dobro do TDH estudado na etapa I.

A operação do reator R1.1 não foi estável e no 206º dia, houve uma queda de energia, provocando a parada das bombas de alimentação e, desde então, o processo de nitrificação parcial não foi mais reestabelecido.

5.1.1.4 Alcalinidade e pH

A maioria dos trabalhos encontrados na literatura sugere que o pH na faixa de 7,5 - 8,5 é mais adequado para inibição das BON. O pH ideal para espécies de *Nitrosomonas* varia entre 7,9 e 8,2, enquanto para espécies de *Nitrobacter* varia entre 7,2 e 7,6 (SINHA; ANNACHHATRE, 2007). Além disso, o pH de 8,0 foi relatado como ideal para o acúmulo de N-nitrito em reatores em batelada, assim como o pH de 7,5 - 7,8 foi relatado como favorável para a nitrificação parcial de águas residuária de laticínios sob baixas concentrações de OD (BAE et al., 2001). A nitrificação parcial leva ao consumo da alcalinidade devido à produção de prótons H^+ e, por consequência, pode ocorrer a diminuição do pH, dependendo da capacidade tampão do sistema, que pode inibir a reação se inferior a 6,5 (PAREDES et al., 2007). Assim, fornecer ao reator concentração suficiente de alcalinidade é um importante parâmetro de controle para manter o pH na faixa necessária para estimular o acúmulo de N-nitrito.

Todavia, a fim de estudar o comportamento do processo de NP em realidades próximas às utilizadas em escala plena, sem agregar mais custo ao processo de tratamento, nenhuma adição de bicarbonato foi testada neste estudo, pare este tipo de água residuária. Além disso, considerou-se que a adição de alcalinidade poderia resultar em aumento do pH, com subsequente inibição por amônia livre, o que poderia afetar negativamente o crescimento das BOA (NHAT et al., 2017). A Tabela 5.2 apresenta o resultado do monitoramento do reator R1.1 em relação a alcalinidade e pH, respectivamente, para cada etapa da operação.

Tabela 5-2 - Balanço de alcalinidade em cada etapa para o reator R1.1

Etapa	Alcalinidade afluente	Alcalinidade efluente	Consumo observado	Consumo teórico*	Alcalinidade consumida/N- NH ₄ ⁺ removido	pH afluente	pH efluente
	mg CaCO ₃ .L ⁻¹	mg CaCO ₃ .L ⁻¹	mg CaCO ₃ .L ⁻¹	mg CaCO ₃ .L ⁻¹	mgCaCO ₃ / mgN-NH ₄ ⁺		
I	523,1 ± 214,0	364,4 ± 255,6	216,1 ± 150,5	424,7 ± 179,3	5,3 ± 3,8	8,1 ± 0,1	7,7 ± 0,4
II	522,5 ± 55,04	218,0 ± 143,2	349,4 ± 165,3	411,9 ± 154,8	4,7 ± 3,9	8,1 ± 0,2	7,3 ± 0,6

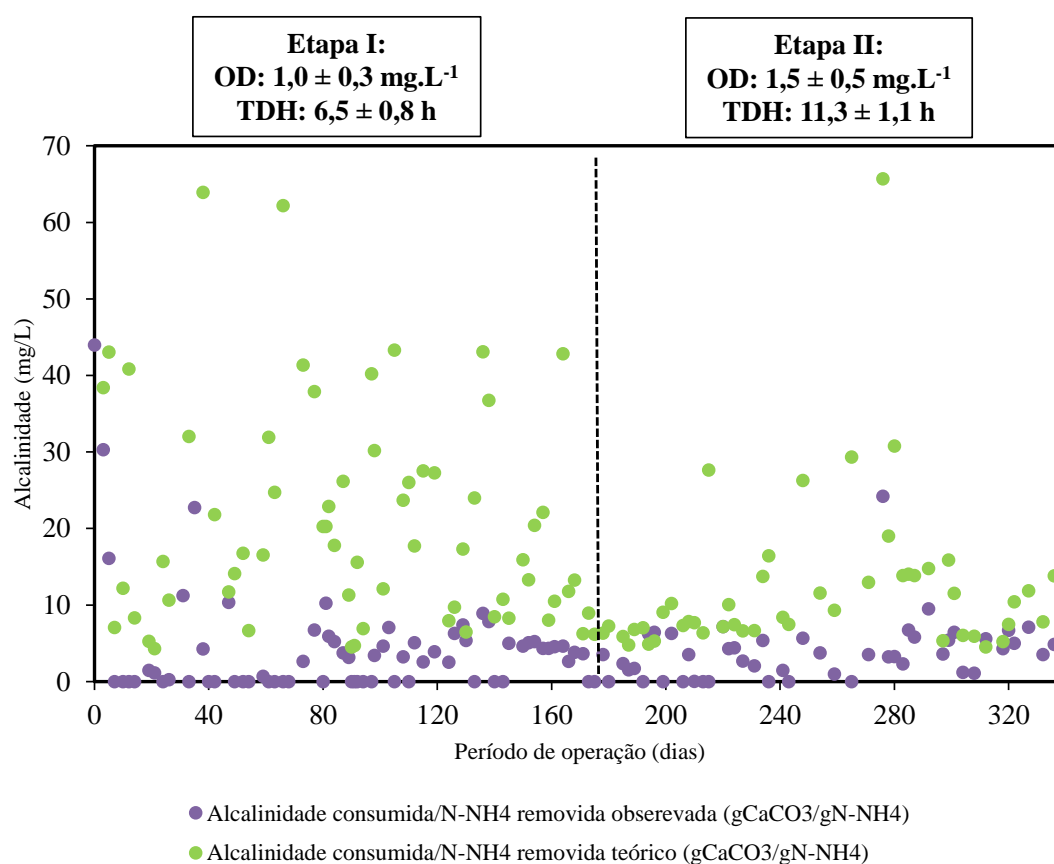
*Consumo teórico, considerando-se 50% do necessário para nitrificação completa.

Fonte: Natália C. Silveira, 2022

Ganigué et al. (2012) apontaram que a razão molar de 1,14, entre a alcalinidade consumida e o N-amoniaco oxidado ($HCO_3^-:NH_4^+$), foi usada como chave para controle da conversão de N-amoniaco em N-nitrito. Durante a Etapa I, o consumo unitário

médio de bicarbonato para a nitrificação foi de $5,3 \pm 3,8$ mg $\text{CaCO}_3/\text{mg N-NH}_4$ removida, que equivale à razão molar média de $2,0 \pm 1,8$. Na Etapa II, a razão foi de $4,7 \pm 3,9$ mg $\text{CaCO}_3/\text{mg N-NH}_4$ removida, equivalente à razão molar média de $2,3 \pm 1,6$. Durante todo o período experimental, a razão de alcalinidade consumida por concentração de N-amoniacoal removido observada foi inferior à razão teórica (Figura 5.7). Este consumo de bicarbonato foi superior ao valor encontrado por Nhat et al. (2017) de $1,06 \pm 0,14$ mg $\text{CaCO}_3/\text{mg N-NH}_4$ removida.

Figura 5.7 – Razões observada e teórica de alcalinidade consumida por N-amoniacoal removido



Fonte: Natália C. Silveira, 2022

O aumento do consumo da alcalinidade na etapa II pode estar relacionado ao aumento da concentração de OD de $1,0 \pm 0,3$ mgO₂.L⁻¹ para $1,5 \pm 0,6$ mgO₂.L⁻¹. O que resultou em aumento da eficiência de oxidação do N-amoniacoal de $30,6 \pm 15,4$ para $42,8 \pm 12,3\%$. A complexidade da água residuária e a diversidade dos microrganismos do lodo, sob as condições ambientais impostas, podem levar a processos oxidativos e redutivos de compostos nitrogenados e outros influenciando nos valores de alcalinidade.

O incremento da concentração da fonte de carbono inorgânico pode tornar a atividade da nitrificação parcial maior e o ciclo mais curto (CHEN; SONG; YUAN, 2021). No entanto, observou-se que a concentração de N-nitrato no efluente superou os valores esperados (Figura 5.4), indicando que o fluxo de elétrons não ocorreu como pretendido. Após a mudança das etapas, houve queda na concentração de alcalinidade efluente, devido ao aumento da eficiência de oxidação do N-amoniaco de $30,6 \pm 15,4$ mgN.L⁻¹ para $42,8 \pm 12,3$ mgN.L⁻¹, mas não houve diferença significativa na eficiência de conversão a N-nitrito. A concentração de N-amoniaco efluente decresceu de $119,0 \pm 50,2$ para $115,4 \pm 43,4$ mg.N.L⁻¹, a concentração de N-nitrito aumentou de $29,7 \pm 20,6$ para $37,0 \pm 38,7$ mg.N.L⁻¹ e a concentração de N-nitrato aumentou de $5,6 \pm 9,3$ para $63,1 \pm 29,2$ mgN.L⁻¹. Chen; Song; Yuan (2021) observaram que o incremento de 300 mg.L⁻¹ de bicarbonato resultaram em aumento da concentração de N-nitrato efluente, com queda na eficiência de conversão do N-nitrito, apresentando diferença significativa entre a eficiência de conversão do N-nitrito e a eficiência de remoção do N-amoniaco. Os autores afirmam que o aumento do carbono inorgânico favoreceu o crescimento das BOA no sistema.

Além disso, a alcalinidade é um parâmetro crucial para controlar a fração de N-amoniaco convertida em N-nitrito, visto que a oxidação de 1 mol de N-amoniaco requer o consumo de 2 mol de bicarbonato, de acordo com a estequiometria de nitrificação parcial. Assim, o controle da razão molar de N-amoniaco para alcalinidade em 0,5 deve ser mantido para garantia da nitrificação. Valores de razão molar mais baixos podem resultar em fração N-amoniaco não oxidada, o que é o caso, visto que o objetivo é atingir um efluente adequado para o processo Anammox subsequente. Todavia, como mostrado na figura 5.8 (b) na Etapa I, a média da razão de N-amoniaco oxidado por alcalinidade removida foi de $2,0 \pm 1,8$ mmol-N/mmol-CaCO₃. Na Etapa II, esta razão foi de $2,3 \pm 1,6$ mmol-N/mmol-CaCO₃, o que evidencia a ineficiência do processo de nitrificação parcial nas condições estudadas e a ocorrência de outros processos que consomem alcalinidade.

A presença de amônia livre (AL) e ácido nitroso livre (ANL) associado ao pH do meio pode atingir valores considerados tóxicos tanto para as BOA quanto para as BON. De acordo com Zhou et al. (2011), uma faixa de 0,011–0,07 mgN-HNO₂.L⁻¹ começa a inibir as BON enquanto a inibição completa ocorre em uma faixa de 0,026–0,22 mgN-HNO₂.L⁻¹. Já a inibição das BOA ocorre em uma faixa de 0,42–1,72 mgN-HNO₂.L⁻¹.

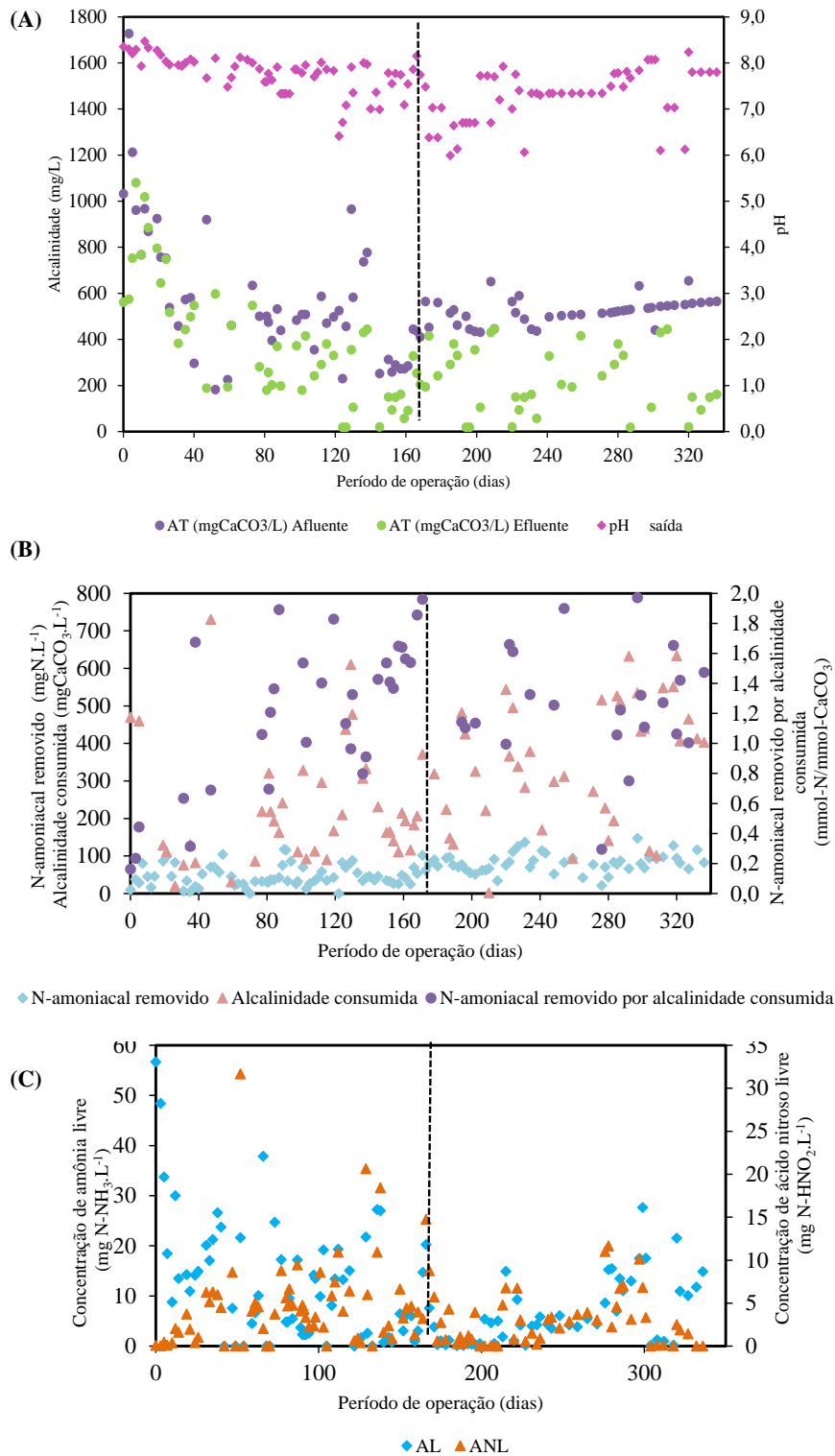
Portanto, concentrações entre $0,02-0,03 \text{ mgN-HNO}_2.\text{L}^{-1}$ foram sugeridas como adequadas para eliminar o microrganismos BON e estimular o crescimento das BOA.

Conforme mostrado na Figura 5.8(C), as concentrações de AL variaram durante o tempo de operação com a variação do pH e da concentração de N-amoniacal. Na etapa I, a concentração média de AL foi de $10,2 \pm 9,2 \text{ mgN-NH}_3.\text{L}^{-1}$ e de ANL foi de $5,8 \pm 5,2 \text{ mgN-HNO}_2.\text{L}^{-1}$. Na etapa II, a média foi de $6,6 \pm 6,6 \text{ mgN-NH}_3.\text{L}^{-1}$ e $2,8 \pm 3,0 \text{ mgN-HNO}_2.\text{L}^{-1}$, valores estes muito superiores aos considerados inibitórios para os microrganismos BOA e BON (ANTHONISEN et al., 1976).

Nos primeiros 20 dias de operação, os valores de AL e ANL medidos foram de $0,4 \pm 0,3 \text{ mgN-NH}_3.\text{L}^{-1}$ e $1,4 \pm 1,6 \text{ mgN-HNO}_2.\text{L}^{-1}$, respectivamente. E nesse curto período, como já mencionado, houve nitrificação parcial do efluente, deixando-o apto para o tratamento Anammox.

Todavia, nos demais dias, os valores de AL e ANL estavam muito acima dos valores considerados inibitórios o que prejudicou a ocorrência da nitrificação parcial.

Figura 5.8 – Perfil temporal do reator R1.1 para (a) concentração de alcalinidade afluente e efluente e pH; (b) razão entre amônia removida e alcalinidade consumida; (c) Amônia livre e ácido nitroso livre



Fonte: Natália C. Silveira, 2022

O uso do reator de leito estruturado para nitrificação (NP) do efluente de UASB, tratando a água residuária de indústria de produção de farinha de ossos e sangue, demonstrou ser ineficiente nas condições testadas. O conceito para o emprego do leito estruturado consiste na criação de área superficial para o crescimento da biomassa e elevação do tempo de retenção celular (TRC). A dificuldade do controle do tempo de retenção celular no reator de leito estruturado pode ser ter sido o grande responsável pela ineficiência da NP, uma vez que reatores de biomassa aderida possuem tempo de retenção celular elevados, o que inviabiliza a seleção das espécies BOA responsáveis pela nitrificação. Diante dessa dificuldade, buscando uma forma mais eficiente de alcançar o melhor desempenho na lavagem das BON, a NP foi estudada em reator de biomassa suspensa, como mostrado no item 5.1.2. Em trabalhos futuros, podem ser estudados outros possíveis constituintes inibitórios (ex. sais) da água residuária que poderiam ter levado ao fracasso do estabelecimento e manutenção da NP.

5.1.2 Reator de biomassa suspensa

5.1.2.1 Remoção de nitrogênio

Durante os 143 dias de operação, o reator R1.2 apresentou eficiência média de oxidação da amônia de $49,3 \pm 19,4\%$ para uma carga nitrogenada aplicada de $0,5 \pm 0,1$ g N.L⁻¹.d⁻¹ e relação C/N de $0,2 \pm 0,2$ (Tabela 5.3).

Tabela 5-3 – Principais variáveis de monitoramento do desempenho do reator R1.2

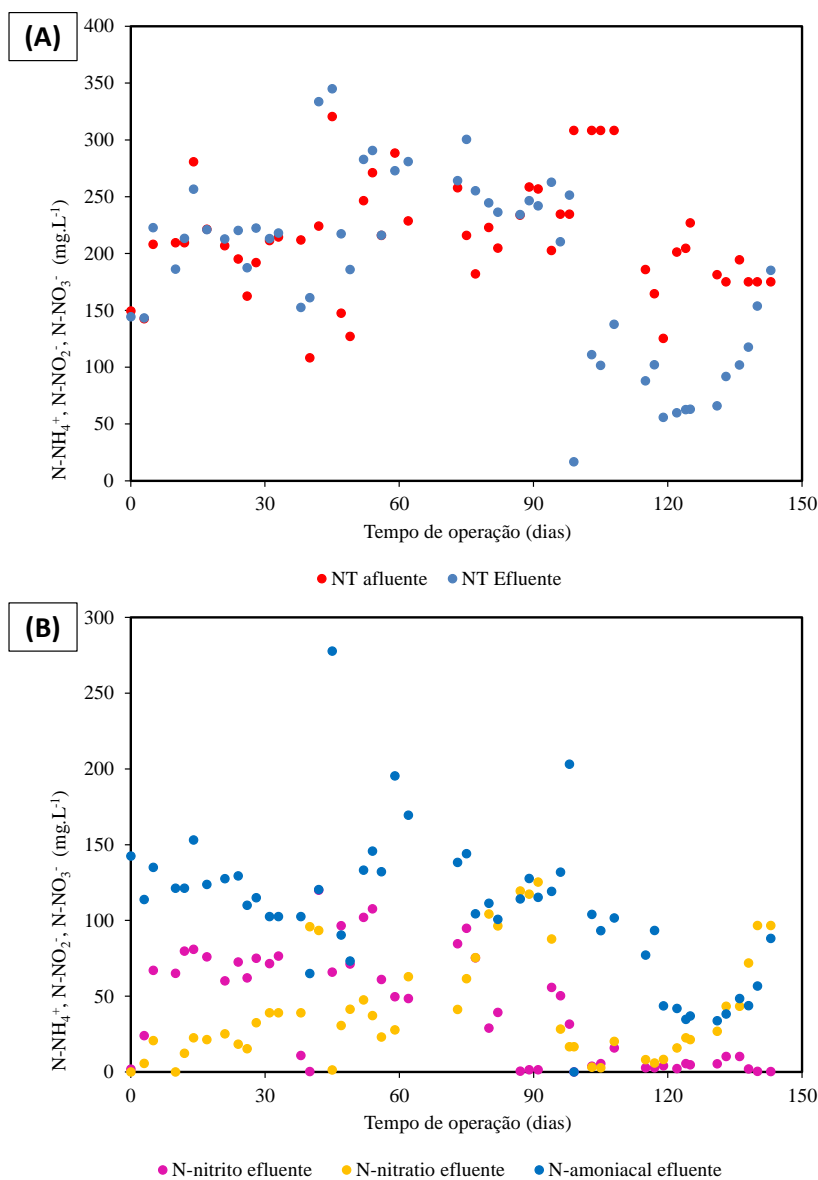
Itens	Parâmetros	Média	Unidade
Afluente	N-NO ₃	0.8 ± 1.0	mg N.L ⁻¹
	N-NH ₄	213.0 ± 50.3	mg N.L ⁻¹
	N-NO ₂	0.3 ± 0.5	mg N.L ⁻¹
	DQO	45.3 ± 26.9	mg DQO.L ⁻¹
Efluente	N-NO ₃	41.0 ± 36.0	mg N.L ⁻¹
	N-NH ₄	107.0 ± 49.0	mg N.L ⁻¹
	N-NO ₂	40.0 ± 36.0	mg N.L ⁻¹
	DQO	41.0 ± 27.0	mgDQO .L ⁻¹
Eficiência de remoção	N-NH ₄	49.3 ± 19.4	%
Taxa de acumulação de N-nitrito (NAR)*	N-NO ₂	47.7 ± 30.8	%

*A taxa de acumulação de N-nitrito (NAR) é um percentagem do total de N-amoniaco removido, a saber: $NAR = \frac{N-NO_2^-}{(N-NO_2^- + N-NO_3^-)}$

Fonte: Natália C. Silveira, 2022

Os resultados de monitoramento do nitrogênio afluente e efluente do reator R1.2 estão apresentados na figura 5.9.

Figura 5.9 - Resultados do monitoramento das diferentes formas de nitrogênio no reator R1.2. (A) NT Afluente e NT efluente; (B) N-amoniacal efluente, N-nitrito e N-nitrato



Fonte: Natália C. Silveira, 2022

As condições operacionais não foram adequadas para inibição do crescimento das BON, uma vez que, como observado na Figura 5.9, houve formação de N-nitrito e N-nitrato.

Nos primeiros 99 dias, a eficiência de oxidação do N-amoniacal média foi de $41,0 \pm 15,4 \text{ mg.L}^{-1}$, a relação de conversão de N-amoniacal para N-nitrito foi de $0,3 \pm 0,2$ e a

relação de N-amoniaco para N-nitrato foi de $0,2 \pm 0,2$. Neste período, com a grande formação das formas mais oxidadas de nitrogênio, não houve remoção de NT (Figura 5.9B). Além da presença de microrganismos BON e desnitrificantes heterotróficos, outro fator que pode justificar o aumento de N-nitrito e N-nitrato, no efluente do reator R1.2, foi o arraste de biomassa nitrificante para a saída do reator que ficou exposta ao ar e o acúmulo desta no recipiente em que o efluente era armazenado, favorecendo a continuação do processo de oxidação mesmo fora de um ambiente controlado, como o reator.

A partir do 120º dia, os níveis de N-NO_2^- no efluente sofreram gradativa diminuição. Em contrapartida, os níveis de N-NO_3^- aumentaram a partir deste ponto. Este comportamento poderia indicar o favorecimento da nitratação (ou nitrificação completa) em detrimento da nitritação. Neste momento, a eficiência de oxidação do N-amoniaco subiu para $69,2 \pm 12,1\%$ e a eficiência de remoção de NT foi $40,8 \pm 32,8\%$. Entretanto, ao se analisar todo o período de operação, a eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal foi de $49,3 \pm 19,4\%$, enquanto a remoção de NT foi de $9,2 \pm 36,0\%$,

As estratégias utilizadas, tal e qual, não suprimiram o processo de nitratação, uma vez que foi verificada uma produção excessiva de N-NO_3^- .

A concentração de amônia livre no reator R1.2 foi de $2,6 \pm 2,3 \text{ mg N-NH}_3.\text{L}^{-1}$. Valores de pH $7,0 \pm 0,5$ e temperatura média de $37,0 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ podem ter favorecido a disponibilidade de amônia livre ao sistema. Entretanto, este não foi um fator para supressão das BON, como era o desejado para ocorrência preferencial da nitrificação parcial. Wang; Gao (2016) alcançaram a supressão das BON com níveis de amônia livre entre $5 - 40 \text{ N-NH}_3.\text{L}^{-1}$ e baixo nível de OD ($<0,13 \text{ mgO}_2.\text{L}^{-1}$) em reator de biomassa granular.

A concentração de ácido nitroso livre calculada no reator foi de $2,9 \pm 3,6 \text{ mg N-N}_2\text{O}.\text{L}^{-1}$, sendo considerado inibitório entre $0,011$ a $0,3 \text{ mg ANL}.\text{L}^{-1}$ (YUN; ZHU; NAKHLA, 2020). Todavia, para as condições estudadas não houve inibição das BON, mesmo com concentrações de ácido nitroso superiores às indicadas na literatura. ZHOU et al. (2011) relatam que a inibição por ANL varia de acordo com as diferentes comunidades microbianas. Além disso, diferentes espécies e linhagens dentro de um mesmo gênero podem possuir tolerâncias distintas ao ANL, isso porque o ANL afeta as múltiplas vias metabólicas das BOA (VADIVELU; KELLER; YUAN, 2007; ZHOU et al., 2011).

Durante este trabalho, observou-se que, além deste e dos fatores de controle (temperatura, concentração de OD), outro ponto importante em um sistema de biomassa suspensa é o controle do tempo de retenção celular (TRC) no reator. A operação controlada pelo TRC é uma abordagem promissora para o sucesso da nitrificação parcial, uma vez que, através deste controle do TRC, ocorre o favorecimento do crescimento das BOA em detrimento das BON (NISHIMURA et al., 2012; REGMI et al., 2014). Baixos valores de tempo de retenção celular favorecem o crescimento das bactérias oxidadoras de amônia e, conseqüentemente, o processo de nitrificação parcial (BLACKBURNE; YUAN; KELLER, 2008; GANIGUÉ et al., 2007; HELLINGA et al., 1998; WU et al., 2011). Os valores de TRC geralmente apontados como favoráveis para nitrificação parcial estão entre 2 a 8 dias (NISHIMURA et al., 2012; REGMI et al., 2014; WU et al., 2011). Nishimura et al. (2012) conseguiram nitrificação parcial estável com TRC de 4 dias produzindo efluente com relação $N\text{-NO}_2^- / N\text{-NH}_4^+$ de 1,25.

No presente estudo, a perda de sólidos suspensos no efluente permitiu manter o TRC em $6,4 \pm 3,1$ dias (Tabela 5.4), com oxidação parcial de 49,2% do N-amoniaco (Tabela 5.5). Entretanto, a relação $N\text{-NO}_2^-_{\text{Ef}} / N\text{-NH}_4^+_{\text{Af}}$ foi de $0,2 \pm 0,2$, ou seja, 20% do N-amoniaco foi oxidado a N-nitrito, em função de outras rotas metabólicas de consumo do N-amoniaco, como a nitrificação total (GANIGUÉ et al., 2012).

Tabela 5-4 - Condições operacionais do reator R1.2

Dias	OD $\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$	TDH horas	TRC d	T $^{\circ}\text{C}$	pH	CNA $\text{gN}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$	Eficiência de oxidação (%)
143	$1,5 \pm 0,5$	$9,8 \pm 1,6$	$6,4 \pm 3,1$	$37,1 \pm 0,6$	$7,0 \pm 0,5$	$0,5 \pm 0,2$	$49,2 \pm 19,4$

Fonte: Natália C. Silveira, 2022

Tabela 5-5 – Relações e variáveis observadas no Reator R1.2

NAR (%)	AL $\text{mgN}\text{-}\text{NH}_3\cdot\text{L}^{-1}$	ANL $\text{mgN}\text{-}\text{N}_2\text{O}\cdot\text{L}^{-1}$	Relação* $N\text{-NO}_{2,\text{Ef}} / N\text{-}\text{NH}_{4,\text{Af}}$	Relação* $N\text{-NO}_{3,\text{Ef}} / N\text{-}\text{NH}_{4,\text{Af}}$	Relação* $N\text{-NO}_{2,\text{Ef}} / N\text{-}\text{NH}_{4,\text{Ef}}$	Relação* C/ N
$47,7 \pm 30,8$	$2,6 \pm 2,3$	$2,9 \pm 3,5$	$0,2 \pm 0,2$	$0,2 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,3$	$0,2 \pm 0,2$

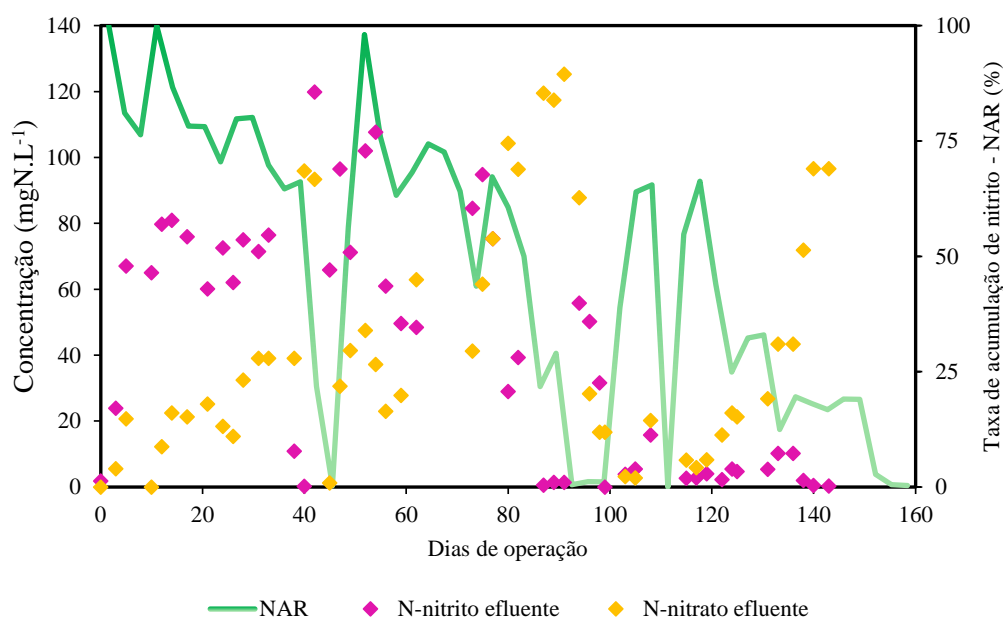
*Relação efluente/afluente.

Fonte: Natália C. Silveira, 2022

O desempenho da nitrificação parcial no reator R1.2 está apresentado na figura 5.10. Nos primeiros 90 dias, foi alcançada uma taxa de acumulação de N-nitrito média de $65,5 \pm 23,6\%$, a concentração média de N-nitrito no efluente foi de $60,4 \pm 32,9$ mgN-

$\text{NO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ e a concentração de N-amoniacal média foi de $127,2 \pm 38,0 \text{ mgN-NH}_4\cdot\text{L}^{-1}$. No entanto, houve queda no desempenho e a concentração de N-nitrito no efluente diminuiu para $10,7 \pm 16,2 \text{ mgN-NO}_2\cdot\text{L}^{-1}$, repercutindo em queda na taxa de acumulação de N-nitrito para $26,7 \pm 22,5\%$. Durante toda a operação, a concentração média de N-nitrato no efluente foi de $41,8 \pm 35,6 \text{ mgN-NO}_3\cdot\text{L}^{-1}$, o que evidencia que o crescimento das BON não foi suprimido. Chen et al. (2020) estudaram o processo NP/A em duas etapas e a diminuição na concentração de N-nitrito foi atribuída ao processo de nitrificação e desnitrificação simultânea no reator, associado à presença de microrganismos desnitrificantes conforme apresentado no item 5.1.2.4. Esses microrganismos foram predominantes nas análises de biologia molecular nos reatores R1.1 e R1.2 e estão associados à presença de formas oxidadas de nitrogênio e a disponibilidade de matéria orgânica.

Figura 5.10 - Desempenho do reator RI.2 em relação à nitrificação parcial durante a operação

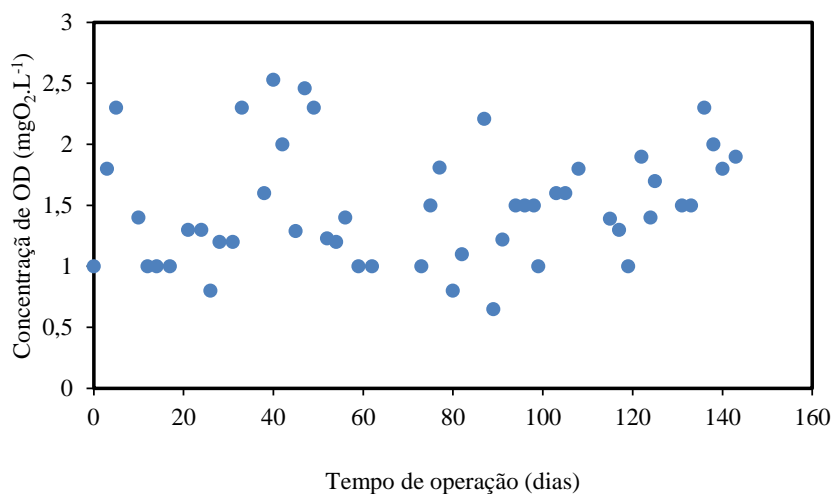


Fonte: Natália C. Silveira, 2022

5.1.2.2 Oxigênio dissolvido

Durante o período de operação do reator R1.2, a concentração média de oxigênio dissolvido no sistema foi de $1,49 \pm 0,47 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 5.11).

Figura 5.11 - Variação da concentração de oxigênio dissolvido ao longo da operação do reator R1.2



Fonte: Natália C. Silveira, 2022

O controle da nitrificação parcial através do oxigênio dissolvido tem sido amplamente estudado. Para sistemas de biomassa suspensa operando com limitação de oxigênio ($0,5 \text{ mgO}_2\text{.L}^{-1}$), foi obtida conversão completa e estável de N-amoniaco a N-nitrito, independentemente da idade do lodo. Porém, quando não havia limitação de oxigênio dissolvido, a idade do lodo tornou-se um parâmetro crítico para a nitrificação parcial (HANAKI; WANTAWIN; OHGAKI, 1990). Regmi et al. (2014a) realizaram o controle operacional do processo de nitrificação/desnitrificação convencional através da otimização de estratégias de controle da aeração ($>1,5 \text{ mgO}_2\text{.L}^{-1}$), TRC e suplementação de carbono. O sistema demonstrou ser eficiente para lavagem das BON e apresentou acúmulo de N-nitrito durante todo o período experimental e remoção de NT de $57 \pm 25\%$ quando aplicado TDH de 3 horas e TRC entre 4 – 8 dias. No entanto, o controle de OD em níveis baixos pode ser responsável pela ocorrência de crescimento excessivo de organismos filamentosos, diminuindo as propriedades de sedimentação do lodo o que resulta em efluente de baixa qualidade (BAO et al., 2017). Além disso, o baixo suprimento de OD continuamente também reduz a taxa de nitrificação e, portanto, estende o tempo de retenção hidráulica do sistema, dificultando a manutenção das bactérias nitrificantes no reator de NP.

A média de OD durante o procedimento experimental foi de $1,5 \pm 0,5 \text{ mgO}_2\text{.L}^{-1}$, e juntamente com outros fatores, se mostrou ineficiente para ocorrência e manutenção da nitrificação parcial no reator R1.2. A dificuldade no controle e manutenção da

concentração de oxigênio dissolvido nos valores próximos ao recomendado na literatura ($< 1,0 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}$) durante o procedimento experimental podem ter contribuído para a não obtenção de nitrificação parcial efetiva. Como o aparato escolhido para fazer a difusão do oxigênio era uma pedra porosa acoplada a uma bomba de aquário, a vazão de ar era instável, apesar de ajustada duas vezes ao dia, através de uma válvula. Além disso, algumas vezes, a biomassa crescia envolta da pedra porosa, obstruindo a passagem do gás para o meio reacional, sendo necessário o aumento do fluxo de ar para atingir os níveis de OD próximos ao desejado. Chen; Song; Yuan (2021) estudaram a NP a partir do controle de pH e alcalinidade e observaram que a atividade do BON foi inibida quando os níveis de oxigênio dissolvido estavam em, média, OD $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$, fazendo com que a concentração de N-nitrato diminuísse gradativamente no efluente e a concentração de N-nitrito aumentasse gradativamente, alcançando 87,25% de acúmulo de N-nitrito. De acordo com os autores, na fase inicial da NP, a faixa de OD deve ser limitada a $0,2 - 0,8 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}$, e o pH deve ser controlado a $8,2 - 8,5$. O baixo teor de OD pode inibir as BON e um pH alto é benéfico para inibir a atividade das bactérias desnitrificantes. Após a estabilização do processo, aumentar o teor de OD é importante para reduzir o tempo de reação. De acordo com os autores, iniciar o processo de NP a partir do controle de OD favorece a ocorrência de perturbações, então a recomendação é que a partida seja realizada através do controle de pH.

5.1.2.3 Alcalinidade e pH

A tabela 5.6 apresenta o resultado do monitoramento do reator R1.2 em relação a alcalinidade e pH.

Tabela 5-6 – Balanço da alcalinidade no reator R1.2

Alcalinidade afluente	Alcalinidade efluente	Consumo observado	Consumo teórico*	Alcalinidade consumida/N- NH ₄ ⁺ removido	pH afluente	pH efluente
mg CaCO ₃ .L ⁻¹	mg CaCO ₃ .L ⁻¹	mg CaCO ₃ .L ⁻¹	mg CaCO ₃ .L ⁻¹	mgCaCO ₃ / mgN-NH ₄ ⁺		
614,2 ± 112,2	144,3 ± 112,1	504,1 ± 172,4	389 ± 165,5	6,9 ± 9,1	8,0 ± 0,1	7,0 ± 0,5

*Consumo teórico, considerando-se 50% do necessário para nitrificação completa.

Fonte: Natália C. Silveira, 2021

Em relação à faixa ótima de pH para a nitrificação parcial, foram identificados três efeitos distintos nas bactérias nitrificantes. Um destes é o efeito nutricional e está

associado à disponibilidade do carbono mineral, que é usado como fonte de carbono para os microrganismos autotróficos nitrificantes. Com um pH baixo, as espécies de CO_2 predominantes podem ser facilmente removidas da água por separação de fases. Por outro lado, em valores elevados de pH, o carbono mineral estará presente principalmente nas espécies de carbonato, que dificilmente podem ser assimiladas (PAREDES et al., 2007). O reator R1.2 estava em operação sob pH de $7,0 \pm 0,5$, considerado baixo para crescimento das BOA, o que pode ter refletido na ineficiência do processo de NP.

Dependendo da alcalinidade da água residuária, pode-se converter uma fração ou mesmo a carga total de N-amoniaco em N-nitrito. No processo de nitrificação, para a oxidação completa de 1,0 mg de N-NH_4^+ são consumidos 7,14 mg de CaCO_3 ou 8,64 mg de HCO_3^- (METCALF, A.; EDDY, 2003; SINHA and ANNACHHATRE, 2007). Desta forma, para a ocorrência da nitrificação parcial de 50% do N-amoniaco afluente no reator R1.2, seriam necessários cerca de 400 mg $\text{CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$. O efluente usado como substrato ao reator R1.2 apresentou alcalinidade de $504,1 \pm 172,4$ mg $\text{CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$, sendo observado a oxidação de $49,3 \pm 19,4\%$ do N-amoniaco. Todavia, o sistema se mostrou ineficiente na interrupção da oxidação do N-amoniaco nesta etapa e 20% do N-amoniaco foi oxidado a N-nitrato, prejudicando a obtenção de um efluente adequado para ser usado no processo seguinte.

Durante a operação, o consumo unitário médio de bicarbonato foi de $6,9 \pm 9,1$ mg $\text{CaCO}_3/\text{mg N-NH}_4$ removida, que equivale à razão molar média de $1,5 \pm 1,2$. A razão de alcalinidade consumida por concentração de N-amoniaco removido observada, foi inferior à razão teórica, tal fato pode ser justificado pela ocorrência da desnitrificação simultânea em que há produção de alcalinidade no meio reacional. O consumo de bicarbonato foi inferior ao observado por Ahn (2006) para nitrificação que foi de 8,71 g $\text{HCO}_3^-/\text{g N-NH}_4$ convertido e superior aos valores encontrados por Nhat et al. (2017) de $1,06 \pm 0,14$ mg $\text{CaCO}_3/\text{mg N-NH}_4$ removida e Van Dongen; Jetten; Loosdrecht. (2001) de 4,36 mg $\text{CaCO}_3/\text{mg N-NH}_4$ removida, ao estudarem a nitrificação parcial. Todavia, quando comparado ao reator de leito estruturado (R1.1) foram obtidos valores mais próximos dos estequiométricos.

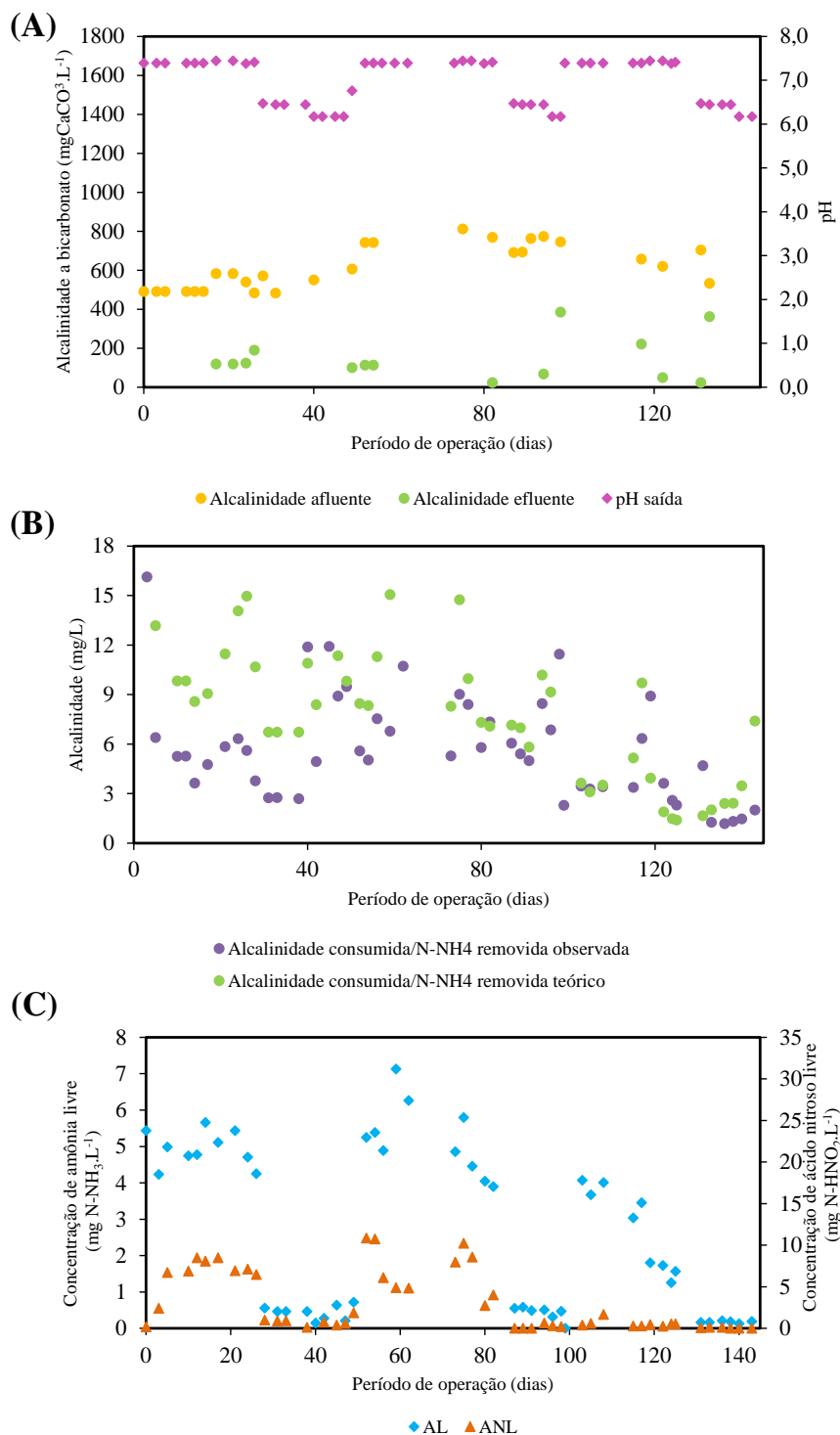
A concentração de N-nitrato no efluente superou os valores esperados. Houve queda na concentração de alcalinidade (Figura 5.12-A), resultando em um efluente com $106,8 \pm 48,5$ mg $\text{N-NH}_4 \cdot \text{L}^{-1}$ e eficiência de oxidação do N-amoniaco de $49,3 \pm 19,4\%$. A

produção de Nitrito média foi de $40,9 \pm 36,7$ mgN.L⁻¹ e a de N-nitrato foi de $41,8 \pm 35,6$ mgN.L⁻¹ (Figura 5.10).

A razão molar de N-amoniaco oxidado por alcalinidade consumida foi de $1,5 \pm 1,2$ mmol-N/mmol-CaCO₃, valor três vezes superior ao esperado para a nitritação (Figura 5.12-B).

Conforme mostrado na Figura 5.12-C, as concentrações de AL variaram durante o tempo de operação com a variação do pH e da concentração de N-amoniaco. A concentração média de AL foi $2,6 \pm 2,3$ mgN-NH₃.L⁻¹ e de ANL foram $2,9 \pm 3,5$ mgN-HNO₂.L⁻¹, valores estes, muito superiores aos considerados inibitórios para os microrganismos BOA e BON (ANTHONISEN et al., 1976), apesar de serem valores inferiores quando comparado ao reator R1.1. Esse resultado demonstra que, se realizados os ajustes necessários, o reator de biomassa suspensa pode apresentar melhor eficiência no processo de NP quando comparado ao reator de leito estruturado.

Figura 5.12 - Perfil temporal do reator R1.2 para (a) concentração de alcalinidade afluente e efluente e pH; (b) razão entre amônia removida e alcalinidade consumida; (c) Amônia livre e ácido nitroso livre



Fonte: Natália C. Silveira, 2022

Vários fatores ambientais influenciam a nitrificação parcial e alguns deles, ou uma combinação deles, são a base para o desenvolvimento da tecnologia NP/Anammox. Por isso, no presente estudo, a dificuldade no controle da concentração de OD e a indisponibilidade de alcalinidade nas dosagens adequadas foram alguns dos fatores que influenciaram no desempenho do reator abaixo do potencial. Na prática, todos eles são dependentes da inibição ou limitação da segunda etapa de nitrificação ou formação de N-nitrato (PAREDES et al., 2007).

5.1.2.4 Análise microbiológica

Nas análises taxonômicas, as amostras coletadas no reator R1.1 (A₁) foram agrupadas em 123 OTUs e as amostras coletadas no reator R1.2 (A₂) foram agrupadas em 151 OTU's.

A diversidade das populações estimadas com base no índice Shannon e o indicador de riqueza denominado Chao 1, são apresentados na Tabela 5.7.

Tabela 5-7 - Riqueza relativa e índice de diversidade das amostras

Amostra	OTUs	Chao-1 (S₁)	Shannon (H)	Good coverage (%)
A ₁	123	477,650	4,855	0,999
A ₂	151	362,500	5,149	0,999

Fonte: Natália C. Silveira, 2022

A amostra A₁ proveniente do reator R1.1 apresentou menor diversidade (H = 4,855) quando comprado a amostra A₂ proveniente do reator R1.2. A riqueza das amostras foi medida através do parâmetros Chao-1, considerando OTU's com 97% de similaridade. Observou-se que no reator de biomassa aderida houve maior diversidade de espécies, devido à maior facilidade de crescimento de diferentes microrganismos aderidos a um material suporte do que em biomassa suspensa (LEYVA-DÍAZ et al., 2014). Ou seja, o crescimento em suspensão demonstrou ser mais seletivo do que o crescimento aderido.

Todavia, a fim de investigar a baixa abundância relativa e até mesmo a ausência de microrganismos que participam da nitrificação parcial nos reatores R1.1 e R1.2, foi realizada nova análise taxonômica com base no trabalho de Silva et al. (2021), diferenciando apenas o banco de dados utilizados que foi o Midas Field Guide (DUEHOLM, M.S., NIERYCHLO, M., ANDERSEN, K.S., RUDKJØBING, V.,

KNUDSEN, S., THE MIDAS GLOBAL CONSORTIUM, ALBERTSEN, M., NIELSEN, 2021). Posteriormente, a anotação taxonômica dos amplicons foi refinada por meio de buscas manuais na plataforma blast.

A diversidade das populações estimadas com base no índice Shannon e o indicador de riqueza denominado Chao 1, são apresentados na Tabela 5.8.

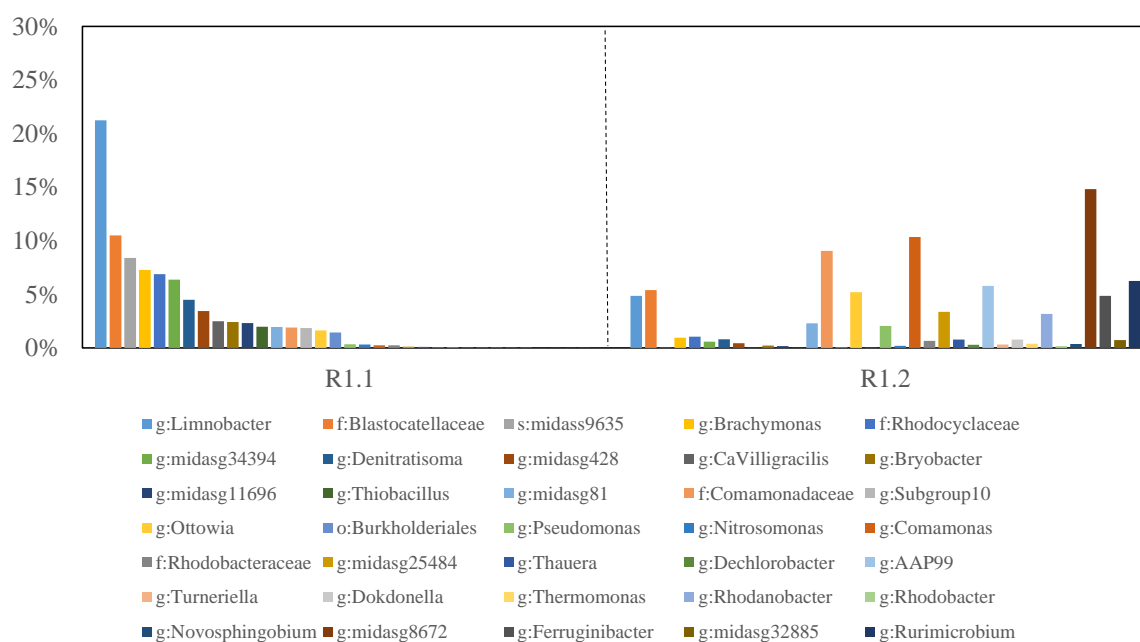
Tabela 5-8 Riqueza relativa e índice de diversidade das amostras

Amostra	OTUs	Chao-1 (S ₁)	Shannon (H)	Good coverage (%)
A ₁	225	469,8	3,342	0,999
A ₂	189	492,2	3,687	0,999

Fonte: Natália C. Silveira, 2022

As amostras coletadas no reator R1.1(A₁) foram agrupadas em 225 OTUs e as amostras coletadas no reator R1.2 (A₂) foram agrupadas em 189 OTU's. Indicando que a biomassa suspensa é mais rigorosa na seleção dos microrganismos quando comparada à biomassa com crescimento aderido. Apesar disso, a amostra A₁ proveniente do reator R1.1 apresentou menor diversidade de espécies (H = 3,342) quando comprado a amostra A₂ proveniente do reator R1.2 (H = 3,687), divergindo do esperado para um reator de biomassa aderida. A figura 5.13 apresenta os microrganismos mais abundantes, presentes em cada uma das amostras.

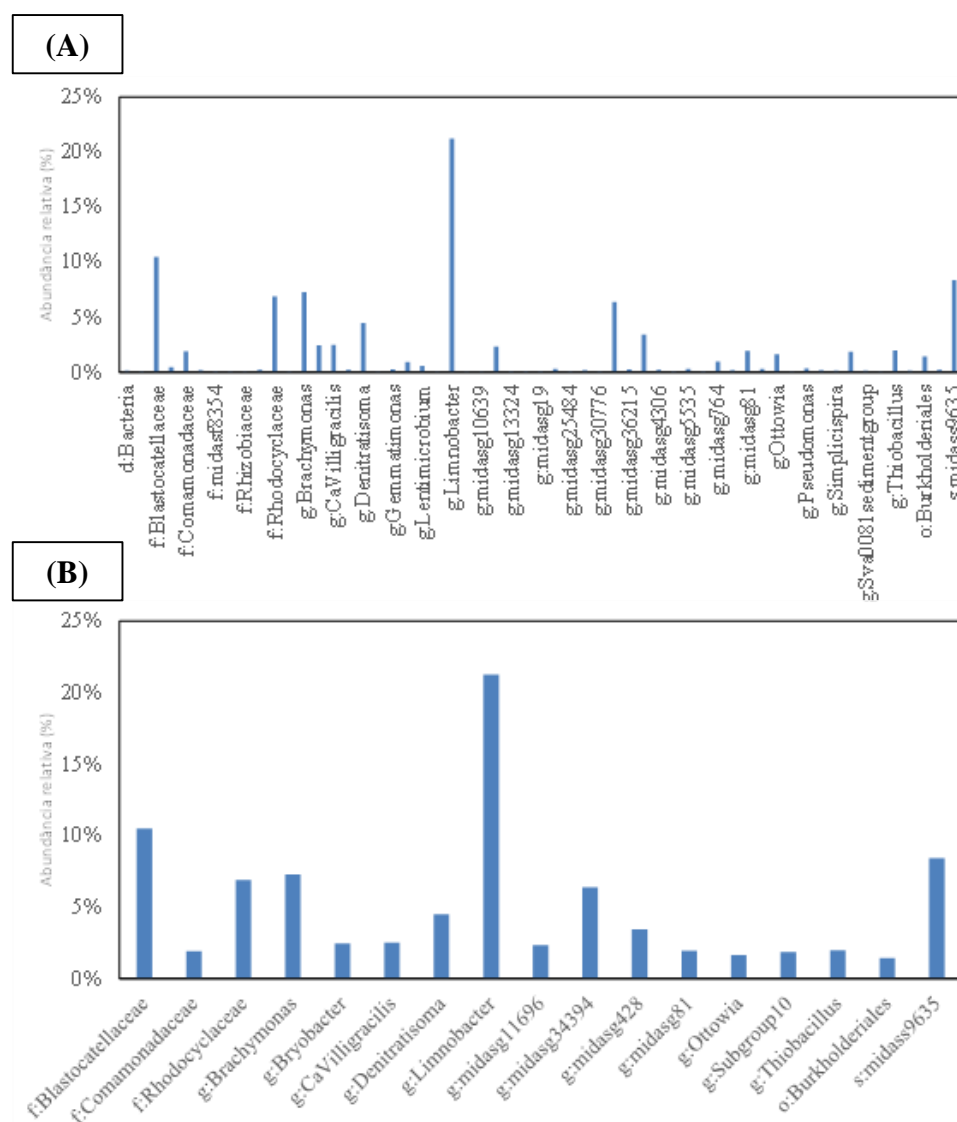
Figura 5.13 - Comparação dos microrganismos presentes nos reatores R1.1 e R1.2



Fonte: Natália C. Silveira, 2022

O Reator R1.1 apresentou 57 OTUS com abundância relativa superior a 0,1% (Figura 5.14a). Destas, apenas 17 apresentaram abundância relativa superior a 1,0% (Figura 5.14b).

Figura 5.14 - Taxa de abundância relativa dos microrganismos encontrados nas amostras do reator R1.1, a partir do banco de dados Midas 4 (A) abundância relativa superior a 0,1% e (B) taxa de abundância relativa superior a 1,0%

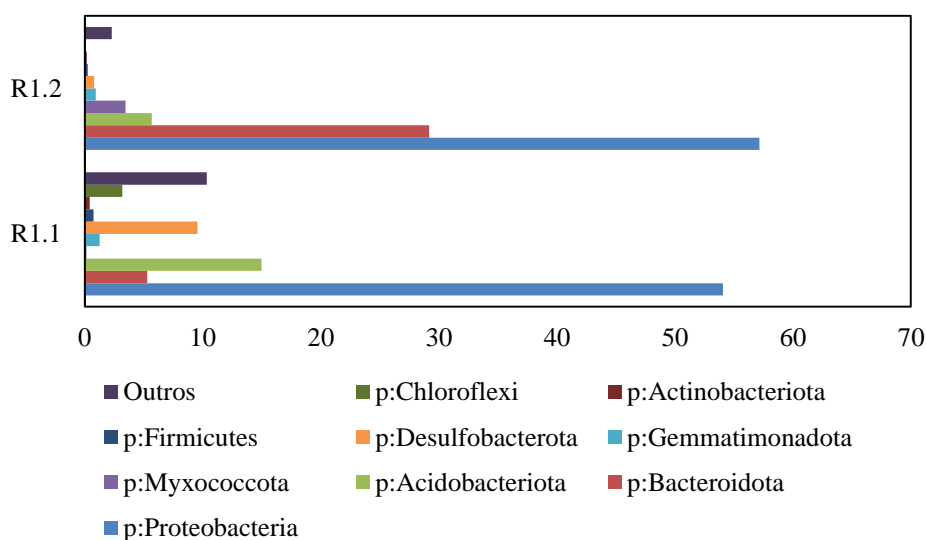


Fonte: Natália C. Silveira, 2022

O Reator R1.2 apresentou 67 OTUS com abundância relativa superior a 0,1% (Figura 5.16a). Destas, apenas 15 apresentaram abundância relativa superior a 1,0% (Figura 5.16b).

biomassa suspensa (R1.2) os filos predominantes foram: *Proteobacteria* (57,16%), *Bacteroidetes* (29,17%), *Acidobacteria* (5,69%), *Myxococcota* (3,45%), *Gemmatimonana* (0,94%), *Desulfobacterota* (0,81%) e *Chloroflexi* (0,06%).

Figura 5.16 -Taxa de abundância relativa dos filos encontrados nas amostras dos reatores R1.1 e R1.2



Fonte: Natália C. Silveira, 2022

O filo *Proteobacteria* é bastante diversificado filogeneticamente e inclui microrganismos com grande variedade metabólica (BROCK, T.D.; MADIGAN, M.T.; MARTINKO, 2006), cujos membros foram predominantes em ambos os reatores (Figura 5.16).

Dentre as ordens mais abundantes pertencentes a este filo, é possível citar os microrganismos dos gêneros *Ottowia* e *Limnobacter*, ambos pertencentes à ordem dos microrganismos desnitrificantes *Burkholderiales*. Os microrganismos pertencentes ao gênero *Limnobacter* foram os mais abundantes no reator R1.1 e apresentaram queda de 21,26 para 4,86% na abundância relativa na comparação entre reatores de leito fixo e biomassa suspensa (Figura 5.13). Membros do gênero *Limnobacter* têm sido frequentemente detectados em vários ambientes, mas apenas duas espécies deste gênero foram isoladas e caracterizadas como heterotróficas e capazes de utilizar aerobiamente o tiosulfato como fonte de energia, mas também são capazes de crescer em condições anaeróbias produzindo sulfato a partir de enxofre. Genes envolvidos na assimilação de nitrato/nitrito foram encontrados nessa bactéria, sugerindo que são capazes de produzir

nitrogênio a partir de nitrato/nitrito (CHEN et al., 2016). Wang et al. (2018) confirmaram, através da análise de rede, que as bactérias Anammox poderiam sobreviver em ambientes contendo certa quantidade de matéria orgânica, através de correlações positivas com as bactérias heterotróficas do gênero *Limnobacter*. Já os microrganismos pertencentes ao gênero *Ottowia* são comuns em sistemas de lodos ativados, algumas espécies pertencentes a este gênero apresentam crescimento anaeróbio facultativo utilizando N-nitrito e N-nitrato como aceptor de elétrons, e o produto da desnitrificação, neste caso, é o N_2O_2 . Comparando-se os reatores R1.1 e R1.2 houve aumento na abundância relativa destes microrganismos de 1,65 para 5,20%. Wang et al. (2020) também observaram aumento das bactérias desnitrificantes *Ottowia* no reator de NP ao avaliarem a evolução dos compostos orgânicos no tratamento de águas residuárias complexas.

Com a mudança no tipo de crescimento da biomassa, de aderida para suspensa, houve variação na abundância relativa dos microrganismos pertencentes ao gênero *Denitratisoma*, que apresentaram queda na abundância relativa de 4,50% no R1.1 para 0,82% do R1.2. São microrganismos responsáveis pela desnitrificação via nitrito e foram encontrados com abundância relativa de 3% no trabalho de Lu, H. et al., (2016), ao estudarem os processos NP/A com lodo granular tratando águas residuárias com baixa razão C/N. O reator foi operado com $0,8 \text{ mg.O}_2\text{.L}^{-1}$, pH de 7,8 a 8,5 e 30°C , com taxa média de remoção de NT de 64,5%. Os autores consideram as bactérias *Nitrosomonas*, *Thauera* e *Denitratisoma* como os principais responsáveis pela remoção de nitrogênio, revelando a existência de várias rotas de desnitrificação, como a desnitrificação autotrófica e a desnitrificação heterotrófica.

Usualmente, em reatores de NP para tratamento de águas residuárias com alto teor de N-amoniaco, predominam as bactérias pertencentes ao gênero *Nitrosomonas* (EGLI et al., 2003; GANIGUÉ et al., 2009; QIAO et al., 2010; SLIEKERS et al., 2002). No presente estudo, as *Nitrosomonas* não foram predominantes e houve queda na abundância relativa das *Nitrosomonas*, responsáveis pelo processo de nitrificação parcial, de 0,33 para 0,21% nos reatores R1.1 e R1.2, respectivamente. Estes baixos valores de ocorrência nos reatores destinados à nitrificação parcial podem explicar a baixa oxidação do N-amoniaco a N-nitrito observada, e podem estar relacionados às características da água residuária estudada e à baixa concentração de N-amoniaco efluente, quando comparado aos autores citados, que estudaram águas residuárias com N-amoniaco na faixa de 500 a 2700 mg.L^{-1} (EGLI et al., 2003; GANIGUÉ et al., 2009; QIAO et al., 2010; SLIEKERS

et al., 2002). Os filos mais abundantes nos estudos destes autores foram: *Proteobacteria* e *Bacteroidota* que também foram os filos de ocorrência expressiva nos reatores R1.1 e R1.2.

Os microrganismos pertencentes a família *Comamonadaceae* apresentaram aumento de 1,91% no R1.1 para 9,0% no R1.2 e são conhecidos por participar da oxidação aeróbia da amônia (CHO et al., 2010; DOSTA et al., 2015), o que pode ter favorecido a maior eficiência de oxidação do N-amoniaco observada no reator R1.2. Desta família, o gênero *Comamonas* apresentou aumento de 0,26 para 10,35% de abundância relativa com a mudança do tipo de crescimento de biomassa aderida para biomassa suspensa. Estas bactérias possuem células filamentosas com importante participação no ciclo do nitrogênio, na etapa de nitrificação. As *Comamonas* não são capazes de participar da desnitrificação, exceto as espécies *C. nitrivorans* e *C. denitrificans*, que podem reduzir N-nitrato a nitrogênio gasoso (GUMAELIUS et al., 2001).

Todavia, observa-se que para reatores de nitrificação parcial, a abundância relativa de microrganismos que efetivamente participam do processo de oxidação do N-amoniaco a N-nitrato, está muito aquém do esperado. Dosta et al. (2015) avaliaram a granulação em reatores de nitrificação parcial e Anammox e no reator de NP, as Nitrosomonas foram as principais BOA, com 18,3% de abundância relativa. Os autores encontraram inesperadamente o gênero *Rhodanobacter* com 25% de abundância relativa, e os membros deste gênero não são descritos como oxidantes de N-amoniaco. No entanto, eles são descritos como desnitrificantes e sua atividade redutora pode ser favorecida nas concentrações limitantes de OD, sendo que microrganismos BON também não foram identificados nas análises realizadas pelos autores. Nas análises realizadas no presente estudo, observou-se que o gênero *Rhodobacter* teve um aumento de 0,02% para 0,19%, estes pertencem a família *Rhodobacteraceae*, na qual também fazem parte o gênero *rhodanobacter* que apresentou um aumento significativo (0,02% – 3,17%). De acordo com o Midas Field Guide (2021) e Wang et al. (2020), são microrganismos que desempenham papel na desnitrificação e são encontrados em diversos estudos de sistemas NP/A (LI et al., 2018b; WANG et al., 2020a, 2020b; XIAO et al., 2021; ZHANG et al., 2021).

O aparecimento de bactérias desnitrificantes indicou que as bactérias dominantes mudaram de bactérias nitrificantes para bactérias desnitrificantes e o processo de nitrificação foi alterado para ocorrência da nitrificação e desnitrificação simultânea,

favorecendo a remoção de nitrogênio. Houve aumento na abundância relativa do gênero *Thauera* de 0,10 para 0,79% com a mudança de biomassa aderida para biomassa suspensa. O gênero *Thauera* é também considerado um tipo de bactéria desnitrificante com habilidade de degradar compostos complexos (CAO et al., 2016b; ZHANG et al., 2019). A presença dos microrganismos do gênero *Thauera* poderia ser favorável sob condições de relação C/N-NO₃ entre 2,0 – 3,5, pois eles podem reduzir o N-nitrato a N-nitrito (XIAO et al., 2021). Entretanto, nos reatores destinados à NP estudados, a relação C/N-NO₃ foi muito além da faixa considerada benéfica ao processo de remoção de nitrogênio amoniacal ou da faixa que poderia favorecer o crescimento desses microrganismos.

Outros microrganismos capazes de reduzir N-nitrato também apresentaram aumento na abundância relativa na comparação entre os dois reatores, como as bactérias *Pseudomonas* que aumentaram de 0,34 para 2,07%. Esses microrganismos utilizam o oxigênio como acceptor final de elétrons, mas algumas espécies podem realizar a desnitrificação e podem reduzir N-nitrato, N-nitrito e óxido nitroso a nitrogênio gasoso, na ausência de oxigênio livre, permitindo o crescimento em ambientes anóxicos (WANG et al., 2019; WEN et al., 2017). As *Thermomonas* que apresentaram aumento de 0,02 para 0,41%, são microrganismos que podem atuar na desnitrificação assim como podem participar da nitrificação. Estes dois gêneros apresentaram correlação positiva no tratamento de água residuária sintética através do processo simultâneo Anammox e desnitrificação (WANG et al., 2019). Os microrganismos pertencentes ao gênero indicado pelo número 32885, que não foram observados no reator R1.1, apareceram com 0,74% de abundância relativa no R1.2, pertencem à família *Xanthomonadaceae* e estão associados ao processo de desnitrificação (MERGAERT; CNOCKAERT; SWINGS, 2003). O gênero *Dechlorobacter* aumentou de 0,08% para 0,31% são microrganismos anaeróbios facultativos e podem participar da desnitrificação.

Gênero 25484 aumentou de 0,13% para 3,38% e são microrganismos heterotróficos pertencentes a ordem dos *Polyangiales* e à classe *Myxococcota* que são geralmente encontrados em águas residuárias de abatedouros suínos.

Microrganismos capazes de degradar matéria orgânica complexa também apresentaram aumento na comparação entre os reatores R1.1 e R1.2. Aumento de 0,01% para 14,82% foi observado para os microrganismos desnitrificantes pertencentes ao gênero 8672, que fazem parte da família *Saprospiraceae* cujos membros são importantes

para a quebra de compostos orgânicos complexos. *Turneriella* apresentaram aumento de 0,04% para 0,34%. São microrganismos estritamente aeróbios, com crescimento em temperaturas de 30 a 37°C, consomem ácidos graxos de cadeia longa e álcoois como fonte primária de carbono e energia.

No reator R1.1, a relação $N\text{-NO}_2^-/N\text{-NH}_4^+$ observada foi de apenas $0,3 \pm 0,2$ na Fase I e de $0,4 \pm 0,7$ na Fase II, confirmando a defasagem no processo de NP, em TDH $6,5 \pm 0,8$. Com o aumento do TDH para $11,3 \pm 11,1$ houve melhora na formação de N-nitrito, mas ainda inconsistente para o processo de NP a ser combinado com o processo Anammox. No reator R1.2, a relação $N\text{-NO}_2^-/N\text{-NH}_4^+$ observada foi de apenas $0,2 \pm 0,1$, indicando que 30% do N-nitrito resultante da oxidação do N-amoniaco foi consumido por outras rotas. Parte do N-nitrito produzido poderia ser utilizada pelas bactérias desnitrificantes (*Rhodanobacter* - 3,17% e *Thauera* 0,79%) e parte poderia ter sido oxidada a N-nitrito, através do processo de nitrificação realizados por bactérias BOA, como as *Nitrosomonas* que apresentaram queda na abundância relativa nos reatores R1.1 e R1.2.

Diferindo dos microrganismos citados até o momento, alguns outros microrganismos, apresentaram taxa de abundância relativa reduzida com a mudança de biomassa aderida para biomassa suspensa. Microrganismos pertencentes à família *Blastocatellaceae* apresentaram queda de 49% entre os reatores destinados à NP, no reator R1.1, apresentou 10,49% de abundância relativa e no reator R1.2 apresentou 5,4%. São microrganismos adaptados a uma ampla gama de valores de temperatura e pH e são capazes de usar compostos proteicos complexos para o crescimento. A utilização de água residuária complexa, pode ter dificultado o crescimento destes microrganismos, visto que poucos representantes são capazes de degradar compostos complexos de carbono (HUBER, KATHARINA J.; PASCUAL JAVIER; FOESEL, BÄRBEL U.; OVERMANN, 2017). Microrganismos do gênero *Thiobacillus* decaíram de 1,98% para 0,02% do reator R1.1 para o R1.2. Algumas espécies desse gênero utilizam o N-nitrato comoceptor final de elétrons, por isso podem participar da desnitrificação. Com a mudança do tipo de biomassa, as *Bryobacter* que são microrganismos acidotolerantes, mesofílicos e utilizam os açúcares como substratos preferidos também decaíram de 2,43% para 0,22%. Microrganismos do gênero 34394 decaíram de 6,38% para 0,60% e fazem parte do filo *desulfobacterota* e participam da redução do sulfato. As *brachimonas*

apresentaram queda de 7,28% para 0,95%, este gênero possui algumas espécies desnitrificantes que foram isolados de um sistema de lodos ativados.

Etchebehere et al. (2001) relataram alta atividade desnitrificante em reator tratando lixiviado de aterro sanitário e apresentaram crescimento em acetato, butirato, propionato, etanol e outros substratos potencialmente tóxicos pra microrganismos pertencentes ao ciclo de remoção do nitrogênio. São capazes de realizar a redução anóxica do nitrato, nitrito e óxido nitroso para nitrogênio gasoso. O aumento de microrganismos desnitrificantes no reator R1.2 em comparação ao reator R1.1.poderia justificar o aumento na remoção de N-amoniaco observado, quando comparado ao R1.1.

Estes resultados demonstram que os reatores destinados à nitrificação parcial, não foram capazes de realizar tal processo, mas apresentaram variada comunidade microbiológica com potencial de desnitrificação e, portanto, para trabalhos futuros, podem ser avaliados o tratamento Anammox e desnitrificação para este tipo de água residuária.

5.2 *Monitoramento do reator R2*

Os resultados do monitoramento do reator R2, destinado ao processo Anammox, estão apresentados nos itens 5.2.1 a 5.2.4. Foram analisadas a remoção de nitrogênio, as concentrações de OD, o consumo e/ou produção de alcalinidade e o comportamento do pH.

No item 5.2.5 estão apresentados os resultados das análises microbiológicas das amostras que foram coletadas no reator durante alimentação com água residuária real e na fase com água residuária sintética.

5.2.1 Remoção de nitrogênio

Os 440 dias de operação, foram divididos em 6 fases, definidas em função das características do afluente ao reator Anammox e CNA associada ao TDH. As médias e desvio-padrão dos parâmetros de monitoramento do reator R2 são apresentados na Tabela 5.9.

Tabela 5-9 - Parâmetros e condições experimentais utilizadas no reator R2

Fases	TDH	N-amoniacoal Afluente	N-nitrito Afluente	N-nitrato Afluente	Alcalinidade Afluente	DQO afluente	DQO/N Afluente	CNA
	horas	mgN.L ⁻¹	mgN.L ⁻¹	mgN.L ⁻¹	mgCaCO ₃ .L ⁻¹	mgDQO.L ⁻¹		gN.L ⁻¹ .d ⁻¹
I - Efluente real^b	3,7±0,7	113,2±44,4	51,9± 34,8	22,6±10,6	100,9±75,6	74,1±25,9	0,4±0,2	1,3±0,6
II - Efluente sintético	3,5±0,8	92,3±12,2	102,8±9,1	23,8±12,6	366,6±82,3	111,0±19,3	0,5±0,1	1,5±0,3
III - Efluente real^a	3,9±0,9	97,0±14,8	109,3±18,7	54,1±32,0	421,3±154,6	133,7±39,5	0,5±0,1	1,6±0,3
IV - Efluente real^a	1,5±0,2	101,1±26,7	137,6±21,7	62,3±35,6	489,1±131,5	166,0±42,7	0,6 ±0,1	4,7±0,8
V - Efluente real^a	1,1±0,1	97,4±25,8	127,8±33,2	60,7±27,4	454,9±140,8	121,5±41,8	0,4±0,2	5,9±1,3
VI - Efluente real^b	1,0±0,1	83,0±20,3	137,5±24,3	43,7±7,9	508,1±217,5	137,0±33,5	0,5±0,1	6,3±0,8

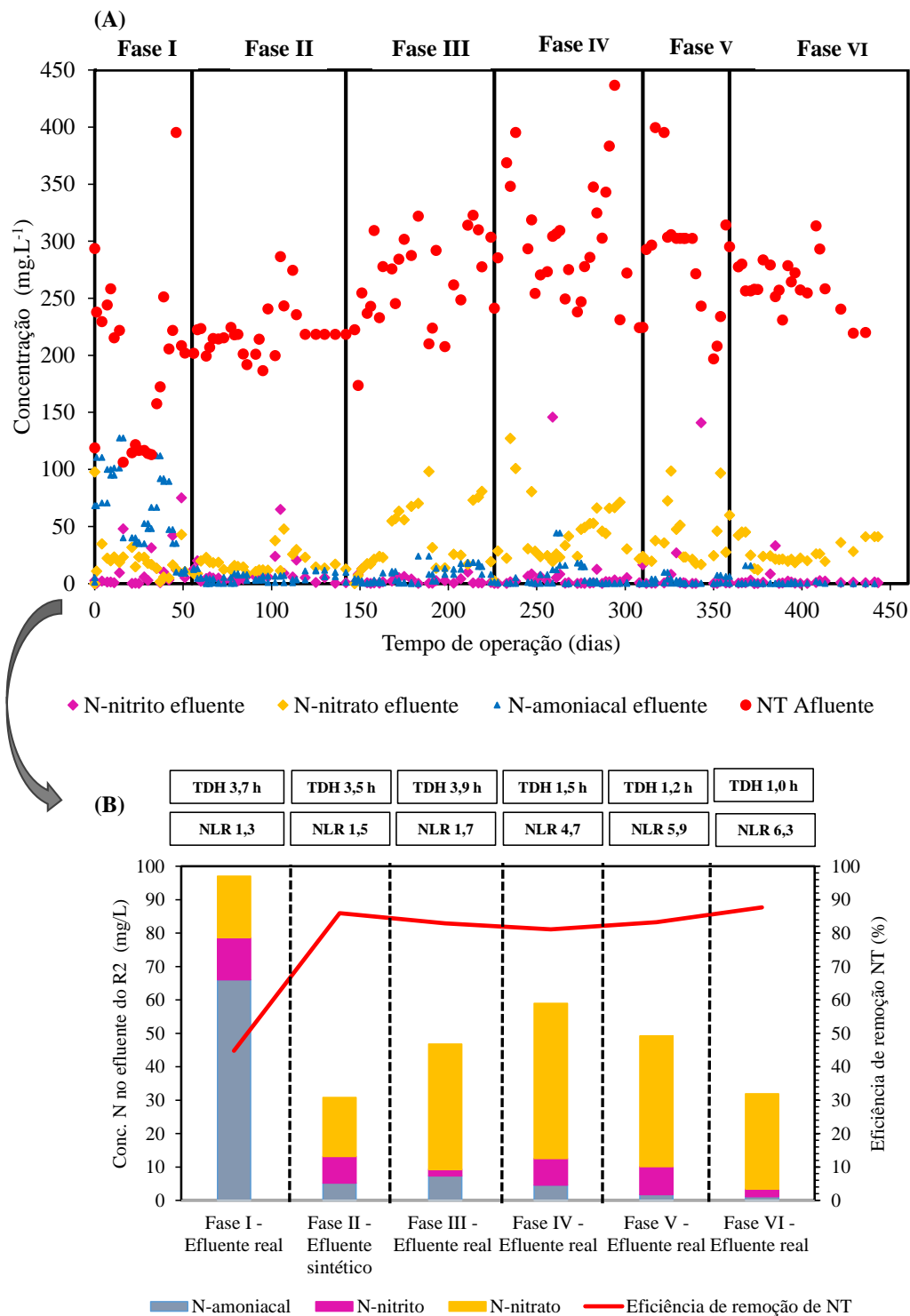
^aÁgua residuária real parcialmente nitrificada com ajuste das proporções das espécies nitrogenadas

^bÁgua residuária real parcialmente nitrificada sem ajuste das proporções das espécies nitrogenadas

Fonte: SILVEIRA et al. (2021)

Os resultados do monitoramento do nitrogênio afluente e efluente do reator R2 durante todas as fases estão apresentados na Figura 5.17.

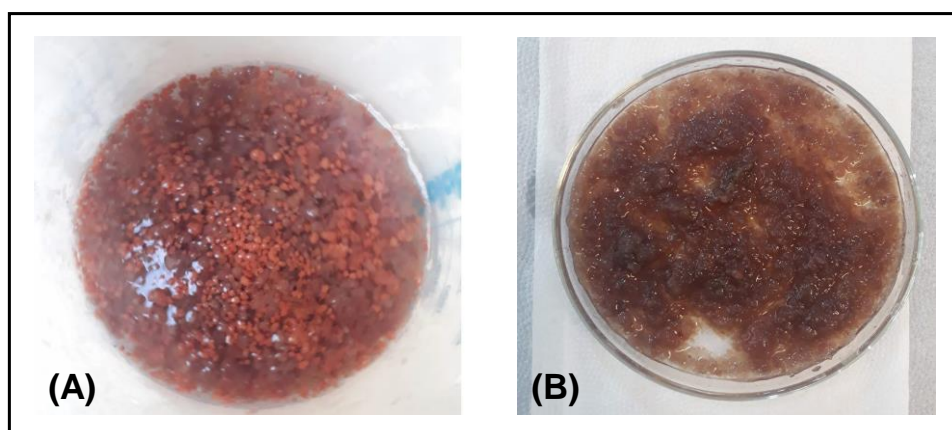
Figura 5.17 - (A) Resultado do monitoramento de NT afluyente e das formas nitrogenadas presentes no reator R2; (B) concentração das espécies nitrogenadas e eficiência de remoção de NT no reator R2



Fonte: SILVEIRA et al. (2021) modificado

Na Fase I, o reator R2 foi alimentado diretamente com o efluente do reator R1, destinado à NP, com razão média de $N\text{-NO}_2^-/N\text{-NH}_4^+$ de $0,5 \pm 0,2$. As proporções do substrato, diferentes das requeridas estequiometricamente para o processo Anammox, resultaram em instabilidade operacional com respeito à remoção de N, que apresentou eficiência média de remoção de NT de $44,8 \pm 17,8\%$ (Tabela 5.10). Observou-se no efluente do R2 $66,0 \pm 34,5 \text{ mgN.L}^{-1}$ na forma N-amoniacal (Figura 5.17). A biomassa no R2 foi submetida à concentração média de amônia livre (AL) de $4,1 \pm 3,7 \text{ mg N-NH}_3\text{.L}^{-1}$ (Tabela 5.10) que, embora relativamente baixa, pode ter causado a instabilidade do processo Anammox neste período (JAROSZYNSKI et al., 2012). Durante a Fase I, houve mudança na coloração dos grânulos Anammox de vermelho para marrom (Figura 5.18). Alteração na coloração da biomassa também foi observada por Du et al. (2017) que atribuíram tal mudança ao aumento de microrganismos desnitrificantes heterotróficos no lodo biológico e lançaram mão do uso de água residuária sintética para restaurar a eficiência do lodo granular Anammox. Segundo os autores, o uso da água residuária sintética com as proporções adequadas dos constituintes previne o crescimento excessivo das bactérias desnitrificantes heterotróficas.

Figura 5.18 – Biomassa (A) exposta às relações amônia/nitrito próximas à estequiométrica e (B) exposta à água residuária fora das concentrações estequiométricas ideais ao processo Anammox



Fonte: Natália C. Silveira, 2022

Visando à recuperação da biomassa, durante a Fase II, foi utilizada água residuária sintética (VAN DE GRAAF et al., 1996) até estabilização do processo Anammox (DOSTA et al., 2015; DU et al., 2017). A concentração de N-amoniacal efluente diminuiu

gradualmente e se manteve em $5,2 \pm 3,9 \text{ mgN.L}^{-1}$, após quatro dias do uso da água residuária sintética, indicando a recuperação da atividade Anammox, com remoção de NT para $86,0 \pm 7,3\%$. O efluente dos reatores R1.1 e R1.2 foi mantido em galões plásticos de 50 L, à temperatura ambiente, previamente à alimentação do reator R2. Durante o armazenamento ocorreu oxidação de N-nitrito a N-nitrato, com alteração das respectivas concentrações, comparativamente à saída dos reatores R1.1 e R1.2. Diante disto, da fase III em diante, optou-se pelo ajuste da relação $\text{N-NH}_4^+/\text{N-NO}_2^-$ afluyente ao R2 para valores próximos ao estequiométrico. Eficiências de remoção de NT semelhantes às observadas com o uso do meio sintético foram observadas nas fases seguintes (Figura 5.19), indicando a importância de se manter um equilíbrio adequado entre as espécies de nitrogênio, de acordo com a estequiometria teórica da reação e que a presença da matriz complexa do efluente real não prejudicou o desempenho do reator Anammox.

Quando o CNA foi aumentado gradativamente nas Fases IV, V e VI, o desempenho do reator R2 ficou praticamente inalterado em relação ao observado na Fase III, em todos os principais parâmetros de desempenho avaliados (Tabela 5.10), demonstrando a resiliência do reator ante o aumento de 3,7 vezes de CNA. A eficiência média de remoção de NT manteve-se acima de 80% (Figura 5.19), semelhante ao encontrado por Du et al. (2015), que investigaram o processo de NP/A em dois estágios, para tratamento de água sintética, e observaram remoção média de NT de 90%.

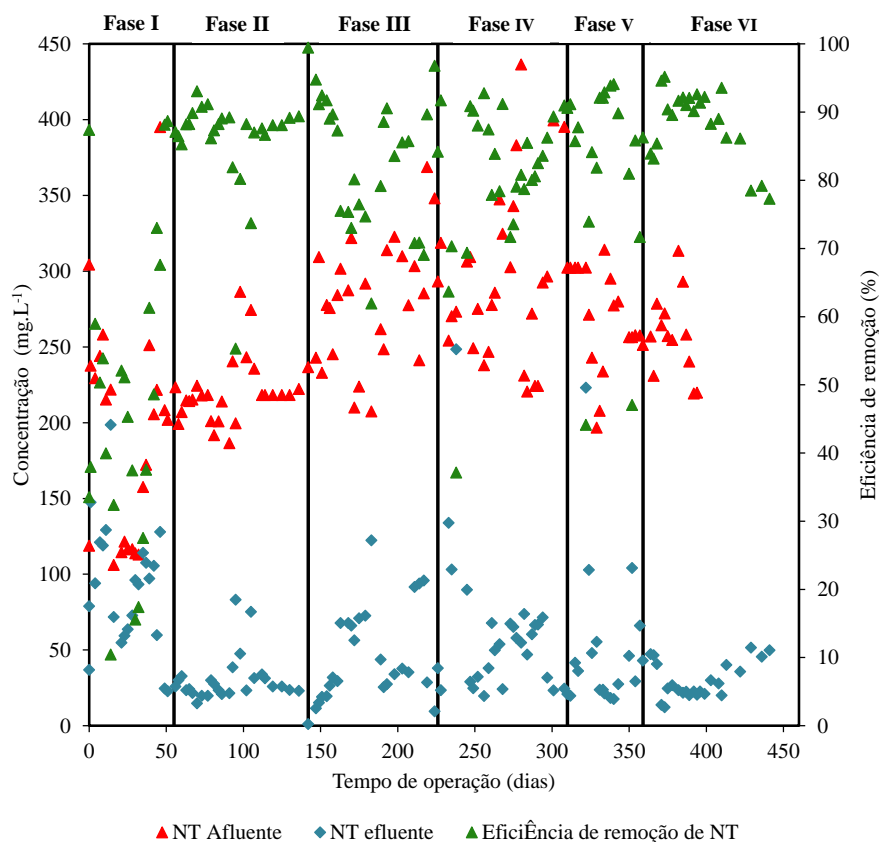
Tabela 5-10 - Principais parâmetros de desempenho do reator R2 em cada fase experimental

Fases	Remoção N-NH ₄ ⁺ (%)	Remoção N-NO ₃ ⁻ (%)	Remoção NT (%)	Remoção DQO (%)	AL (mg N- NH ₃ .L ⁻¹)	CNR (g N.L ⁻¹ .d ⁻¹)	N- NO ₃ / N-NH ₄	N- NO ₂ / N-NH ₄
I	38.2±25.7	21.3±18.8	44.8±19.7	72.4±42.1	4.1±3.7	0.6±0.5	0,2±0,2	0,5±0,2
II	94.4±4.2	15.0±47.3	86.0±7.3	81.9±18.2	0.7±0.6	1.3±0.2	0,3±0,1	1,1±0,2
III	92.6±7.1	31.5±33.7	82.9±9.4	82.6±19.9	0.9±0.9	1.4±0.3	0,6±0,4	1,2±0,3
IV	95.9±7.5	24.9±32.1	81.2±11.5	88.1±10.9	0.7±1.7	3.8±0.8	0,7±0,4	1,5±0,6
V	97.8±4.4	39.0±16.4	85.6±11.3	89.8±18.4	0.2±0.2	4.8±1.2	0,7±0,5	1,4±0,5
VI	98.8±3.5	36.0±19.0	87.7±5.6	93.9±3.1	0.2±0.5	5.5±0.8	0,6±0,2	1,8±0,8

AL: Amônia livre (mg N-NH₃.L⁻¹); CNR: Carga de nitrogênio removida (gN.L⁻¹.d⁻¹); Razão afluyente de N-NO₃/N-NH₄ e N-NO₂/N-NH₄.

Fonte: Natália C. Silveira, 2022

Figura 5.19 – Concentração e eficiência de remoção de NT ao longo do período experimental



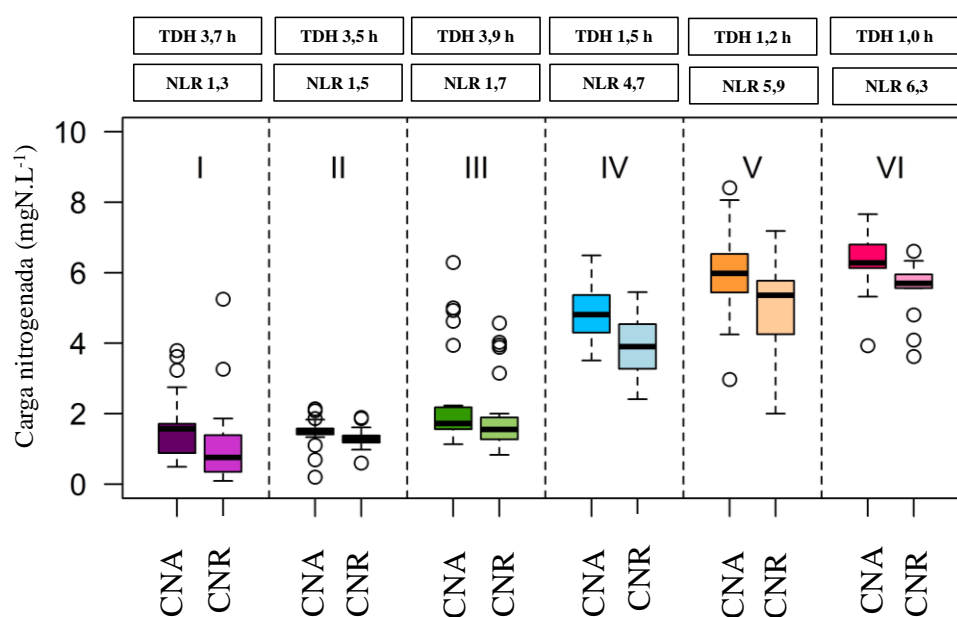
Fonte: Natália C. Silveira, 2022

O aumento de CNA foi acompanhado pelo aumento de CNR da fase II em diante (Figura 5.20), não sendo observados efeitos inibitórios. Esse desempenho difere do relatado por Ma et al. (2017), que observaram diminuição na eficiência de remoção de NT após aumento da CNA de 2,4 para 5,6 g N.L⁻¹.d⁻¹ em um sistema UASB-Anammox, a qual foi atribuída à inibição pelo substrato. Jin et al. (2012b); Li et al. (2021) e Tang et al. (2011) constataram que a estrutura granular do lodo de Anammox proporciona uma comunidade bacteriana estável capaz de resistir a inibidores ambientais que, associada à recirculação do efluente no R2, pode ter contribuído para a manutenção da elevada remoção de NT, mesmo com um aumento na CNA (ZHANG et al., 2016).

O valor de CNR médio, alcançado na fase VI, de $5,5 \pm 0,8$ g NL⁻¹.d⁻¹, é significativamente superior aos relatados anteriormente para outras tecnologias de remoção de nitrogênio aplicadas a águas residuais reais similares (ALMEIDA et al., 2018; PAN et al., 2014; RINQUEST et al., 2019). Esse resultado demonstra o potencial da aplicação de sistemas NP/A para esse tipo de água residuária complexa.

Ao estudarem o processo Anammox em reator UASB, Zhang et al. (2016) observaram que, à medida que o CNA aumentava, aumentava o CNR, mas a eficiência de remoção de NT diminuiu e, em dados momentos, ainda houve inibição do crescimento do lodo Anammox. O melhor resultado apontado pelos autores aconteceu com TDH 3 horas, CNA de $4,0 \text{ gN.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e CNR de $3,5 \text{ gN.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Segundo Li et al. (2021), a formação de flocos foram os principais responsáveis pela faixa de CNR entre 0,6 e $1,21 \text{ gN.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ em reator de NP/A tratando água residuária sintética com concentração média de $112,7 \text{ mgN-NH}_4.\text{L}^{-1}$. A granulação também foi apontada como principal fator para alta taxa de remoção de nitrogênio de $74,3-76,7 \text{ gN.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ para reator UASB Anammox sob TDH 0,16–0,11 horas (TANG et al., 2011). Este CNR foi três vezes maior ao encontrado anteriormente por Tsushima et al. (2007) ao avaliarem o processo Anammox em reatores de biofilme e alcançaram CNR de $26 \text{ gN.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, até então a maior taxa de remoção de nitrogênio estudada.

Figura 5.20 – Carga orgânica nitrogenada aplicada (CNA) e carga orgânica removida (CNR) do reator R2



Fonte: SILVEIRA et al. (2021) modificada

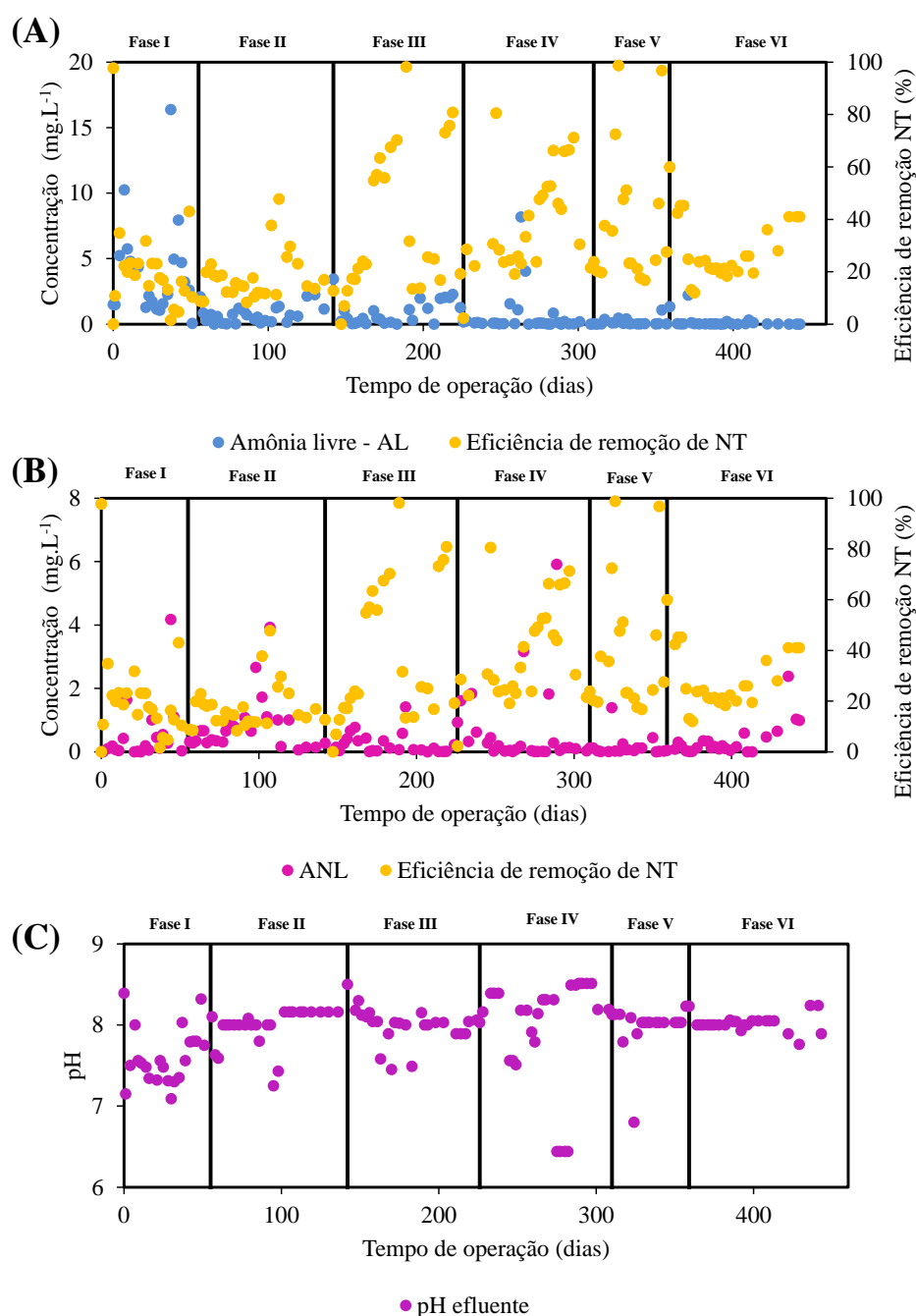
5.2.2 Amônia livre e ácido nitroso livre

É bem conhecido que o desempenho do tratamento por Anammox é melhorado com o aumento na concentração de substratos. No entanto, uma sobrecarga de substratos tem o potencial de resultar em inibição. Na figura 5,21 A, pode-se observar a variação da AL ao longo do procedimento experimental. A Fase I, em que foi usado o efluente sem nenhum ajuste, apresentou a maior variação com concentração média de AL de $4,2 \pm 3,7$ mgN-NH₃.L⁻¹. Após os ajustes realizados, a concentração de amônia livre foi decaindo para valores médios de $0,6 \pm 1,0$ mgN-NH₃.L⁻¹, enquanto a eficiência de remoção de NT aumentava, em relação à Fase I. A partir desta observação, pode-se dizer que não houve inibição pelo efeito da amônia livre. Há grande discrepância nas concentrações de inibição de AL apontadas na literatura. Alguns autores relataram ter observado limite de inibição de AL abaixo de 2 mg.L⁻¹ (JAROSZYNSKI et al., 2012; JUNG et al., 2007), enquanto que, em alguns outros estudos, os efeitos do AL no processo Anammox não foram considerados importantes quando a concentração de AL estava abaixo de 13-15 mg.L⁻¹ (FERNÁNDEZ et al., 2012). Essas discrepâncias podem ser atribuídas às condições operacionais, e, principalmente, à estrutura do lodo e às populações microbianas. Além disso, o lodo usado pode conter diferentes tipos de bactérias anaeróbias oxidadoras de amônia (AnAOB) ou diferentes populações microbianas e, portanto, diferentes capacidades de resistência para AL.

As diferentes espécies que realizam o processo de oxidação anaeróbia do N-amoniaco e as condições operacionais também estão ligadas aos discrepantes valores de N-nitrito relatados na literatura como inibitórios ao processo Anammox. Diversos autores afirmam que o ácido nitroso livre é o responsável pelo efeito de inibição do nitrito nas bactérias anaeróbias oxidadoras de amônia (AnAOB) (DAPENA-MORA et al., 2007; EGLI et al., 2001). A Figura 5.21B revela que a média de ANL ao longo do experimento foi de $0,9 \pm 3,9$ mgANL.L⁻¹. E a maior média também ocorreu quando as concentrações de substratos não haviam sido ajustadas, na Fase I ($1,4 \pm 4,2$ mgANL.L⁻¹). Após ajuste das proporções estequiométricas, ocorreu diminuição no ANL que se manteve praticamente inalterada, mesmo com aumento da CNA ao longo do experimento (Tabela 5.10) indicando que não houve inibição do processo Anammox.

Ao estudarem o efeito da concentração de ANL na atividades das BOA, Jiménez et al. (2012) concluíram que a inibição de ANL raramente afetará a taxa de nitrificação, quando o pH for superior a 7 e a concentração de N-nitrito inferior a 25 mgN-NO₂.L⁻¹. Portanto, as condições operacionais estudadas, além de não contribuírem para inibição por AL ou ANL para Anammox, também não prejudicaram as espécies BOA presentes no reator R2.

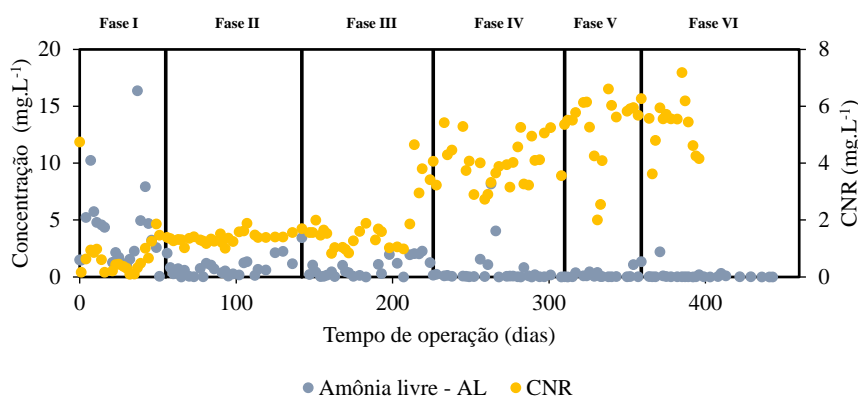
Figura 5.21 Variações na performance do reator R2



Fonte: Natália C. Silveira, 2022

Durante todo o procedimento experimental, foi observado um aumento da taxa de remoção de nitrogênio (CNR), após o ajuste da relação entre os compostos nitrogenados para valores próximos aos da estequiometria do processo. Na Fase I, a alta concentração de AL ($4,2 \pm 3,7 \text{ mgAL.L}^{-1}$) pode ter contribuído para a baixa CNR ($0,6 \pm 0,5 \text{ kgN.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$). Na Fase II, o uso de água residuária sintética favoreceu a diminuição da concentração de amônia livre para $0,7 \pm 0,7 \text{ mgAL.L}^{-1}$ e aumento da CNR para $1,3 \pm 0,2 \text{ kgN.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, que permaneceu praticamente estável durante os 90 dias de operação. Da Fase III em diante, o aumento da CNR foi acompanhado pela diminuição gradativa de AL no meio reacional, chegando a níveis de $5,5 \pm 0,8 \text{ kgN.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ removidos e $0,2 \pm 0,5 \text{ mgAL.L}^{-1}$ de amônia livre no reator R2 (Figura 5.22).

Figura 5.22 Variação entre AL e CNR ao longo do procedimento experimental



Fonte: Natália C. Silveira, 2022

Os resultados da presente pesquisa estão de acordo com dados da literatura em que valores de AL de até 15 mgN.L^{-1} não foram considerados importantes para provocar a instabilidade do reator Anammox. Na pesquisa realizada por Plaza; Trela; Hultman (2011), o efeito negativo da AL no sistema Anammox foi reduzido à etapa de nitrificação. Os autores não observaram nenhuma inibição de AL até 15 mgN.L^{-1} , pois, assim que o N-nitrito foi produzido, foi prontamente consumido e por isso apresentaram concentrações muito baixas.

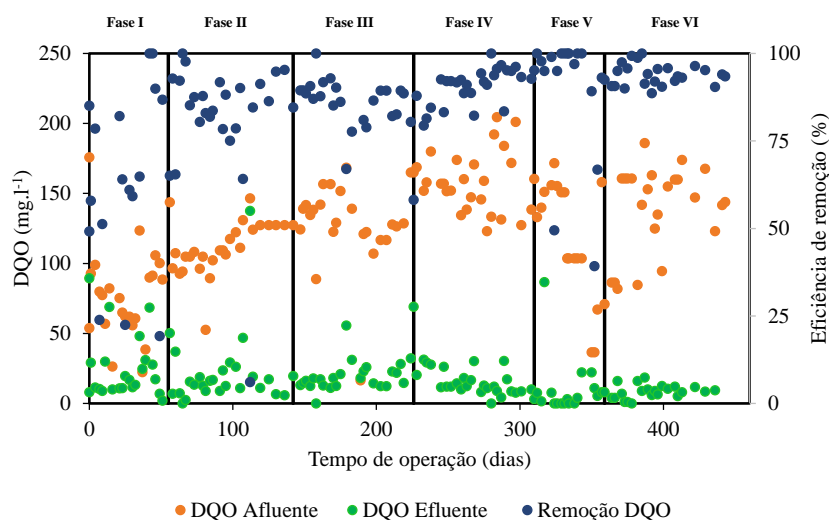
O efeito da AL pode ser efetivamente minimizado quando a capacidade da biomassa Anammox para remoção de nitrogênio (CNR) excede significativamente a taxa de carregamento de nitrogênio (CNA). Alternativamente, o controle de AL abaixo das concentrações inibitórias permite maiores taxas de remoção de nitrogênio ao operar com cargas de nitrogênio mais altas (JAROSZYNSKI; OLESZKIEWICZ, 2011).

Embora tenha sido verificado que N-amoniaco e o N-nitrito de fato causam inibição do processo Anammox, e que o efeito de inibição da pré-exposição ao N-nitrito sozinho é mais dramático do que N-nitrito alimentado simultaneamente com N-amoniaco (JIN et al., 2012b), as amplas faixas de N-nitrito e concentrações de inibição de amônia livre tornam as previsões difíceis, o que dificulta o projeto de tecnologias baseadas em Anammox. Os limiares de inibição de pH, AL e ANL precisam ser mais explorados, uma vez que o processo inibitório pode ser resultado da influência sinérgica de multifatores (ZHANG et al., 2016).

5.2.3 Compostos nitrogenados e DQO

A maior parte do nitrogênio presente no efluente de R2 estava na forma de N-nitrato, principalmente devido à alta concentração de N-nitrato afluente, mas também pela produção durante o processo Anammox. No entanto, as concentrações de N-nitrato no efluente foram sempre menores do que as concentrações do afluente em R2, indicando a ocorrência de vias de transformação do N-nitrato. O reator também apresentou alta eficiência de remoção de DQO (Tabela 5.10), o que aponta para a ocorrência de desnitrificação heterotrófica. A média da DQO do afluente em R2 foi de $123,9 \pm 30,6$ mg DQO.L⁻¹ (Figura 5.23), que poderia ser usada para desnitrificar o N-nitrato do afluente, contribuindo para a remoção do NT além da remoção de DQO residual.

Figura 5.23 Variação da concentração de DQO afluente e efluente no reator R2



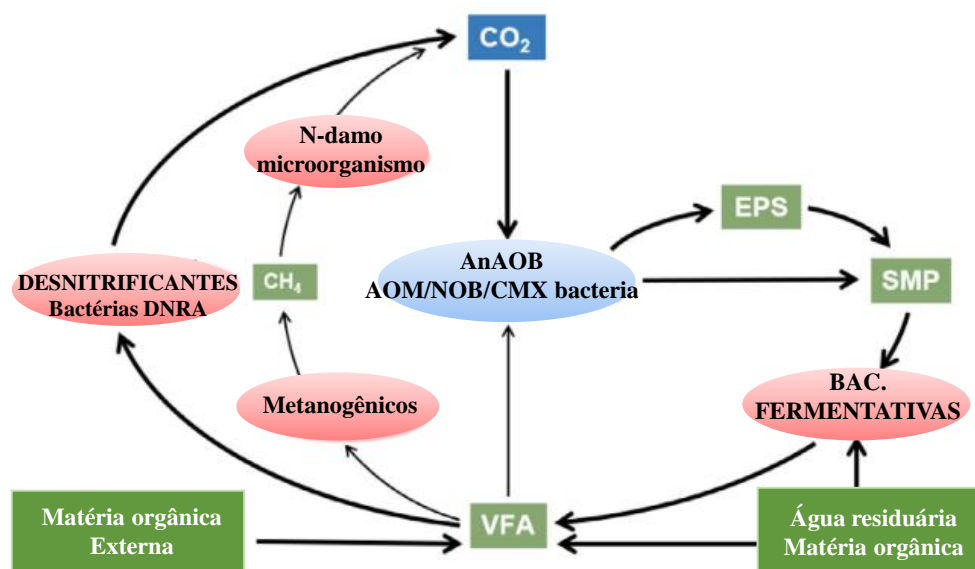
Fonte: Natália C. Silveira, 2022

Os compostos orgânicos são quimicamente complicados e estão presentes em uma ampla gama de concentrações em águas residuárias domésticas e industriais. Por causarem impactos significativos na eficiência e estabilidade dos processos Anammox é que os estudos mais recentes relatam como compostos orgânicos biodegradáveis e recalcitrantes afetam a remoção de nitrogênio via Anammox.

Compostos nitrogenados e matéria orgânica estão sempre presentes em águas residuárias passíveis de serem tratadas por processos Anammox. Águas residuárias domésticas apresentam DQO biodegradável entre 30% a 50% da DQO total. Efluente de UASB tratando água residuária de produção de ração animal, a partir de resíduos de abatedouros de aves, como a estudada, apresentam concentração de N-amoniaco e DQO entre 500-1500 mgN.L⁻¹ e 500-1800 mgDQO.L⁻¹ e relação DQO/N 0,5 – 3,0 (LACKNER et al., 2014). No presente trabalho, a média de DQO afluente foi de 126,0 ± 44,6 mgDQO.L⁻¹, a eficiência de remoção média de DQO foi de 85,4 ± 20,6% durante todo o procedimento experimental do reator R2.

Em processo NP/A de dois estágios, 75% da DQO biodegradável é removida no reator de NP (WANG et al., 2020b) e a DQO biodegradável residual flui para o processo Anammox a jusante, estimulando o crescimento mixotrófico e a coexistências de microrganismos heterotróficos, Anammox e AnAOB. Todavia, no presente trabalho, nos reatores R1.1 e R1.2, destinados a NP, não houve remoção de matéria orgânica, e no reator R2, a eficiência média de remoção de DQO foi de 85,4 ± 20,6% durante toda operação (Figura 5.23). A DQO residual é composta principalmente por ácidos húmico e fúlvico que, em baixas concentrações, podem estimular o crescimento Anammox (Figura 5.24). O excesso de DQO recalcitrante, por sua vez, promove o crescimento de microrganismos desnitrificantes heterotróficos que competem com as AnAOB por N-nitrito (LIU et al., 2020).

Figura 5.24 - Visão esquemática do fluxo de carbono entre as populações envolvidas na remoção de N-amoniacal e matéria orgânica (Anammox, NP, desnitrificação, DNRA e N-damo)



Legenda: A espessura da linha quantifica as interações baseadas na matéria orgânica (grossa: alto; fina: baixo). EPS: substância polimérica extracelular; SMP: produtos microbianos solúveis; AGV: ácidos graxos voláteis; OMA: microorganismos oxidantes de N-amoniacal; NOB: bactérias oxidantes de N-nitrito; CMX: oxidação completa do N-amoniacal; AnAOB: bactérias anaeróbias oxidantes de amônio. Oxidação de metano depende de N-damo:nitrito/nitrato; DNRA: redução dissimilatória de nitrato a amônio.

Fonte: Xiao et al. (2021) modificado

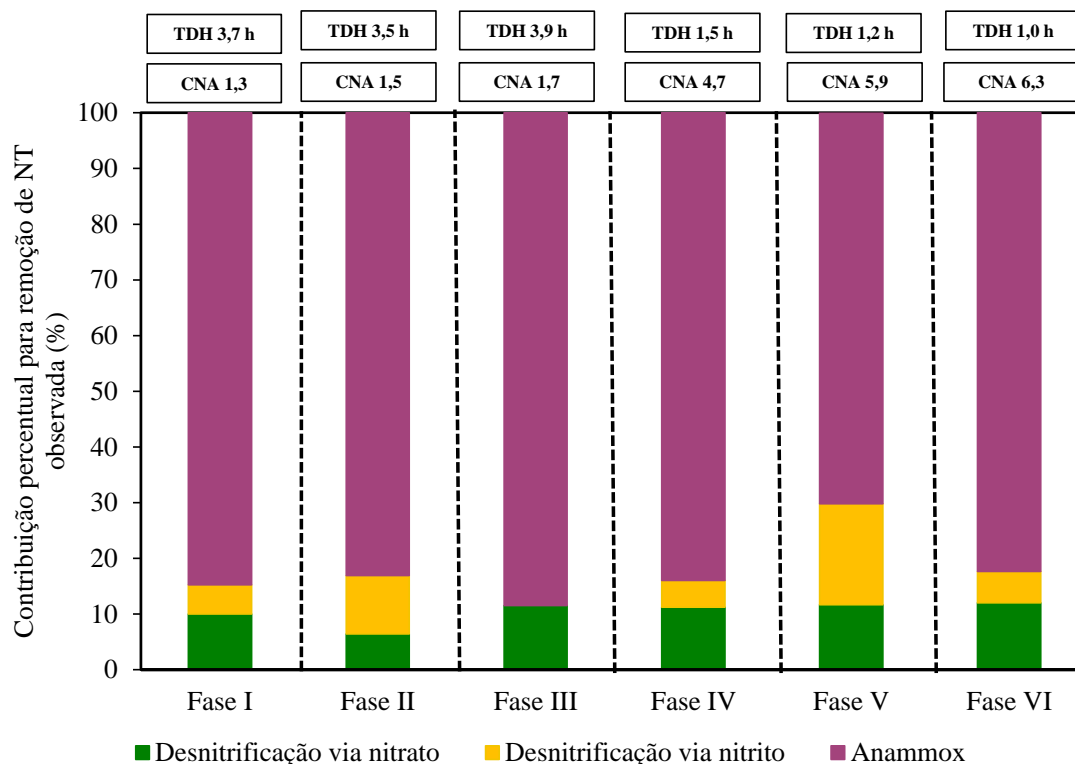
O balanço de massa de nitrogênio aplicado ao reator R2 (Figura 5.25) revelou que, embora parte da remoção de nitrogênio observada pudesse ser atribuída a vias heterotróficas, o Anammox foi a rota de remoção predominante em todas as fases operacionais. Foi responsável por, em média, $82,1 \pm 6,0\%$ da remoção de nitrogênio observada ao longo de todo o experimento. A desnitrificação heterotrófica do N-nitrato e N-nitrito representou, em média, $10,5 \pm 2,0\%$ e $7,4 \pm 6,0\%$ da remoção total de nitrogênio, respectivamente. O acoplamento do processo Anammox e redução de nitrato também foi observado por Cao et al. (2016) e Wang et al. (2018).

A matéria orgânica residual do reator de NP favoreceu a ocorrência de vias heterotróficas no reator R2, o que poderia representar uma potencial ameaça ao processo Anammox devido à competição por N-nitrito, que não foi observada no período de estudo.

Du et al. (2015) observaram a inibição da atividade de Anammox em um reator NP/A de estágio único para razões DQO/N maiores que 2. No presente estudo, no entanto, a razão média de DQO/N foi de $0,5 \pm 0,1$ mg DQO, relação para qual, segundo Du et al.

(2015) e Wang et al. (2019), as bactérias Anammox têm uma vantagem na competição por N-nitrito sobre as desnitrificantes, o que contribuiu para a atividade Anammox prevalecer durante toda a operação.

Figura 5.25 - Rotas de remoção de nitrogênio no reator R2 de acordo com o balanço de massa nitrogenado

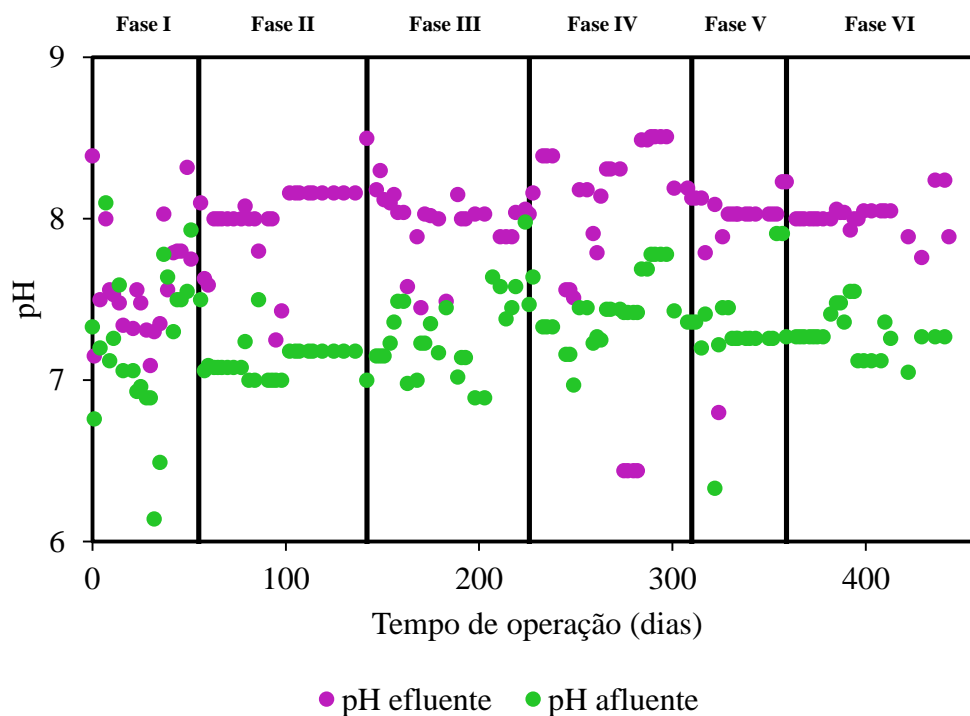


Fonte: Silveira et al. (2021) modificado

5.2.4 Alcalinidade e pH

Ao longo do procedimento experimental o pH afluente e efluente apresentaram a média de, respectivamente, $7,28 \pm 0,28$ e $7,88 \pm 0,64$. A Figura 5.26 apresenta os valores de pH afluente e efluente ao longo do experimento. É importante observar que o pH efluente apresentou pouca variação total, atingindo um valor máximo de 8,51. Dessa forma, é possível afirmar que a inibição do processo de nitrificação por excesso de amônia livre não foi significativa, uma vez que em valores inferiores a 8,0 ocorre a predominância do nitrogênio na forma de íon amônio (EPA, 1993), o que também já foi comparado anteriormente.

Figura 5.26 Variação do pH afluente e efluente ao longo da operação do reator R2



Fonte: Natália C. Silveira, 2022

A Tabela 5.11 apresenta os resultados do monitoramento da alcalinidade, para cada fase de operação do reator R2.

Tabela 5-11 - Alcalinidade para o reator R2

	I - Efluente real ^b	II - Efluente sintético	III- Efluente real ^a	IV - Efluente real ^a	V - Efluente real ^a	VI - Efluente real ^b
Alcalinidade Afluente (mgCaCO ₃ .L ⁻¹)	100,9±75,6	366,6±82,3	421,3±154,6	489,1±131,5	454,9±140,8	508,1±217,5
Consumo teórico (mgCaCO ₃ .L ⁻¹)	4,4 ±2,3	0,3 ± 0,3	0,5 ± 0,5	0,3 ± 0,6	0,1 ± 0,2	0,1 ± 0,2

^aÁgua residuária real parcialmente nitrificada com ajuste das proporções das espécies nitrogenadas

^bÁgua residuária real parcialmente nitrificada sem ajuste das proporções das espécies nitrogenadas

Fonte: Natália C. Silveira, 2022

No processo Anammox o consumo de alcalinidade é baixo (Tabela 5.11). Os resultados indicam que não houve limitação de alcalinidade no reator R2, o que implicou na manutenção de pH próximo ao neutro em todas as fases operacionais (Figura 5.26).

5.2.5 Análises microbiológicas

Nas análises taxonômicas, as amostras coletadas no reator R2 (A3 e A4) foram agrupadas, respectivamente em 102 e 146 OTUs. A diversidade das populações estimadas com base o índice Shannon e o indicador de riqueza, indicado como Chao1, são apresentados na Tabela 5.12.

Tabela 5-12 - Riqueza relativa e índice de diversidade das amostras

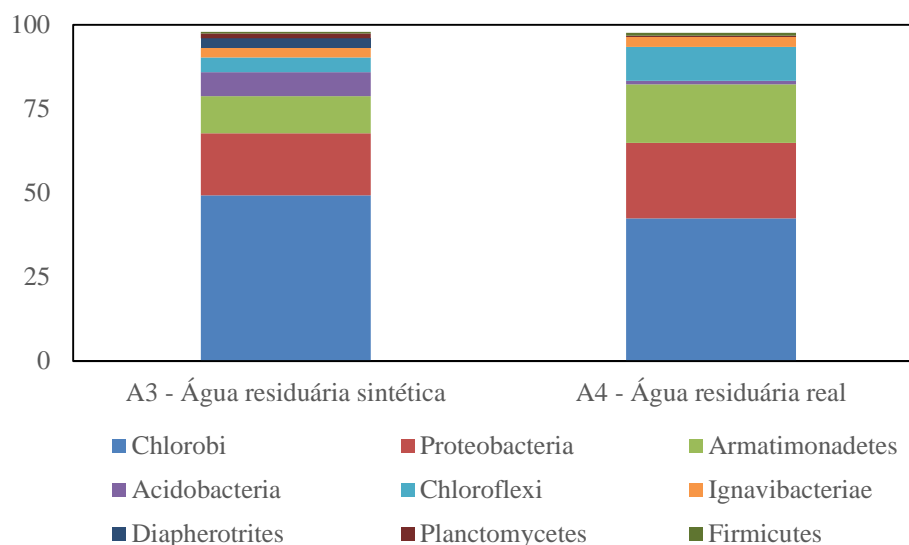
Amostra	OTUs	Chao 1	Shannon	Good coverage (%)
A ₃	102	286.565	3.355	99,9
A ₄	146	354.543	3.340	99,9

Fonte: Natália C. Silveira, 2022

Verificou-se que a riqueza de espécies no reator R2 aumentou com a operação, revelada pelas OTUs e Chao1 (Tabela 5.12). A análise desta tabela revela que a adição de efluente real já parcialmente nitrificado, aumentou a riqueza das espécies, quando comparado ao período em que foi utilizado água residuária sintética, indicando que grupos envolvidos na degradação da matéria orgânica e N-amoniacal foram favorecidos, tal qual comprovado por De Almeida Fernandes et al. (2018) ao estudarem o efeito da diminuição da temperatura no desempenho da remoção de nitrogênio e na diversidade microbiana, em reatores SBR Anammox para tratamento de efluente sanitário pré tratado anaerobiamente.

Os filos predominantes nas amostras coletadas no reator R2, tanto no início (A3) quanto ao final da operação (A4) foram os mesmos (Figura 5.27). A saber: *Chlorobi* (A3: 49,25% e A4: 42,78%), *Proteobacteria* (A3: 18,49% e A4: 22,40%) e *Armatimonadetes* (A3: 11,03% e A4: 17,39%). As bactérias pertencentes aos filos *Proteobacteria*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, *Acidobacteria*, *Chlorobi* e *Bacteroidetes* estão frequentemente presentes em reatores Anammox, mesmo quando operados com características operacionais diversas, diferentes águas residuárias e diferentes tipos de inóculos (CHO et al., 2010; LI et al., 2009).

Figura 5.27 - Taxa de abundância relativa dos filos encontrados nas amostras do reator R2 (A3: água residuária sintética e A4: água residuária real)



Fonte: Natália C. Silveira, 2022

No reator R2, a ocorrência do filo *Chlorobi* no início da operação foi de 49,25% diminuindo para 42,78% ao final da operação do R2. Concomitantemente a esta diminuição, houve aumento das *Proteobactérias* de 18,49% para 22,40%, que comumente atuam no processo de desnitrificação heterotrófica, e tiveram o crescimento favorecido pela presença de matéria orgânica do efluente real durante a operação do reator R2. Este aumento é consistente com resultados obtidos por Cao et al. (2016a) ao avaliarem a integração dos processos de oxidação da amônia com nitrificação parcial para tratar água residuária sintética com alta concentração de N-nitrato e relação DQO/N-NO₃⁻ igual a três, observaram aumento de 32,9 % para 39,4% do filo *Proteobactérias*.

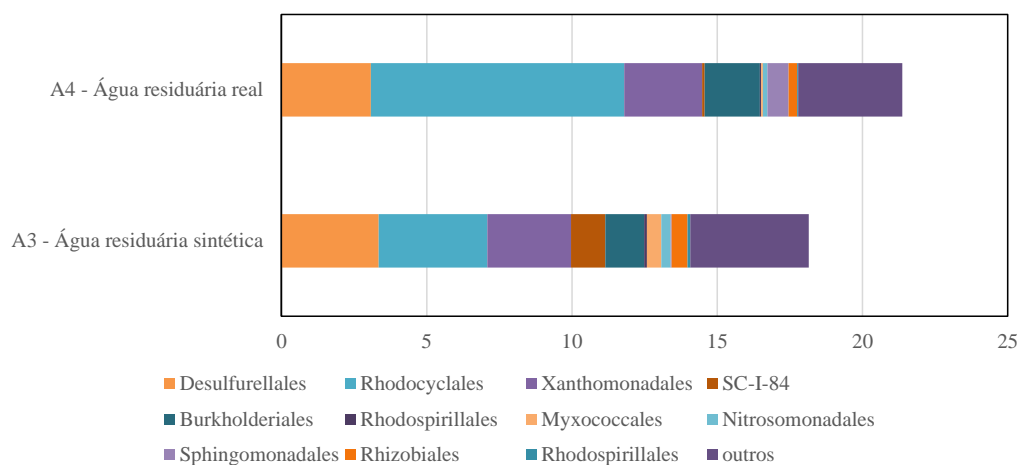
A adição de água residuária real favoreceu a variedade microbiana, indicando que a adição de efluente parcialmente nitrificado e contendo matéria orgânica influenciou a dinâmica da comunidade microbiana. Os filos de microrganismos favorecidos com a mudança da água residuária sintética para água residuária real, foram: *Proteobacterias* (18,49% para 22,40%); *Armatimonadetes* (11,03% para 17,39%), *Chloroflexi* (4,4% para 10,06%) e *Ignavibacteriae* (2,85% para 2,97%). Microrganismos do filo *Chloroflexi* juntamente com o filo *Proteobacteria* são frequentemente encontrados em reatores Anammox.

Houve presença significativa das *Proteobacterias*, especificamente das *Betaproteobacteria*. Dentro desta classe, os membros mais abundantes pertenciam as

seguintes ordens: *Rhodocyclales* (A₃: 3,74; A₄ 8,72), *Desulfurellales* (A₃: 3,35; A₄: 3,08), *Xanthomonadales* (A₃: 2,88; A₄: 2,68), SC-I-84 (A₃: 1,18; A₄: 0,9), *Burkholderiales* (A₃: 1,34; A₄: 1,9), *Rhizobiales* (A₃: 0,55; A₄: 0,29), *Myxococcales* (A₃: 0,5; A₄: 0,06), *Nitrosomonadales* (A₃: 0,32; A₄: 0,16), *Rhodospirillales* (A₃: 0,09; A₄: 0,04) e *Sphingomonadales* (A₃: 0,03; A₄: 0,73) (Figura 5.28).

Os membros das ordens *Rhodocyclales*, *Burkholderiales*, *Xanthomonadales* e *Rhodospirillales* são capazes de realizar a desnitrificação heterotrófica. Desta forma, a operação do reator R2 com efluente real favoreceu o crescimento de bactérias desnitrificantes pois a abundância relativa das ordens que participam deste processo aumentou de 8,05% (no período de uso da água residuária sintética) para 13,34% no final da operação com água residuária real (Figura 5.28),

Figura 5.28 - Composição taxonômica das comunidades microbianas ao nível ordem. As OTUs com menos de 1% de abundância (em cada amostra) foram incluídas no grupo ‘Outros’ para melhorar a visualização dos dados



Fonte: Natália C. Silveira, 2022

Microrganismos pertencente ao filo *Armatimonadetes* desempenham papéis importantes em reatores NP/A. Estão relacionados com o aumento de matéria orgânica em condições anóxicas, que em consórcio com *Planctomycetes* promove maior remoção de nitrogênio, incluindo transformação de nitrogênio inorgânico e orgânico (WANG et al., 2019).

Mesmo que em algum ponto do processo NP/A alguns desses filos tenham competido com as bactérias BOA e Anammox, conforme o processo foi estabelecido

dentro do reator R2, o número de filós identificáveis no sistema de remoção de N aumentou e a eficiência de remoção de NT também apresentou aumento.

A presença de bactérias desnitrificantes heterotróficas em reatores Anammox pode afetar consideravelmente o processo, uma vez que esses microrganismos podem competir com bactérias Anammox, que são autotróficas, pelo aceptor de elétrons N-nitrito, que é utilizado por ambos grupos microbianos. Como as bactérias heterotróficas são capazes de crescer mais rapidamente em relação às autotróficas, acabam por eliminar as bactérias Anammox na competição inibindo sua atividade (DU et al., 2015). No presente trabalho, o rápido crescimento das bactérias heterotróficas, foi inibido pela baixa relação DQO/N do reator $0,5 \pm 0,1$ mgDQO/mgN, desta forma a atividade Anammox prevaleceu durante todas as fases operacionais, mesmo sendo observado que o filo *Planctomyces*, apresentou diminuição de 76% na abundância relativa, neste filo, estão incluídas as bactérias funcionais Anammox (KUENEN, 2008b). Os níveis decrescentes do filo *Planctomyces* foram acompanhados pelos níveis crescentes do filo *Chloroflexi*, como também observado no estudo de (WANG et al., 2019). Os filós *Chloroflexi* e *Bacteroidetes* tem um papel importante no processo de granulação do lodo (FERNÁNDEZ-GÓMEZ et al., 2013). Este processo, é favorecido pela presença de matéria orgânica residual no reator, apoiando a produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) que atuam como importantes precursores na microbiota dos grânulos Anammox, adesão e agregação, beneficiando a formação e estabilidade da estrutura da comunidade microbiana. A produção de EPS é afetada pela CNA e afeta indiretamente a característica do lodo, eficiência de remoção de nitrogênio, comunidade de bactérias e consórcios com outras bactérias (BONASSA et al., 2021a). O filo *Chloroflexi* apresentou aumento de 4,41% para 10,06% e em consórcio com bactérias Anammox pode absorver o material celular das bactérias Anammox em decomposição (KINDAICHI et al., 2012; MENG; ZHOU; MENG, 2019a).

Membros do filo *Chloroflexi* incluem bactérias com metabolismo diversificado que são frequentemente encontradas em reatores Anammox (LEAL et al., 2016). Eles podem degradar amido, açúcares e peptídeos (HUG et al., 2013) e, portanto, podem estar envolvidos na remoção de matéria orgânica observada no presente estudo. Dentro deste filo, sequências relacionadas a *Anaerolineacea*, foram detectadas e apresentaram aumento de 1,54% para 5,80% com o uso da água residuária real. Esta ordem é composta por bactérias anaeróbias e heterotróficas que foram relatadas em diferentes ambientes

incluindo reatores Anammox (LEAL et al., 2016). Microrganismos fermentativos do tipo *Anaerolineacea* e *Ignavibacteria* (1,21 – 0,45%) participam da redução dissimilatória de N-nitrato para N-amoniaco (DNRA) oxidando macromoléculas orgânicas em pequenos ácidos orgânicos e H₂, enquanto reduzem N-nitrato a N-nitrito (DU et al., 2017; HU et al., 2018). Um estudo recente sugeriu que o excesso de bactérias DNRA fermentativas levou a um desempenho deteriorado do processo Anammox ao competir com o AnAOB por N-nitrito e outras necessidades metabólicas (KEREN et al., 2020).

Apesar da presença de carbono orgânico não prejudicar a remoção de NT do sistema, ela foi desfavorável ao crescimento dos gêneros associados a atividade Anammox, demonstrado pelo aumento de 3,69% para 8,66% na abundância relativa das *Denitratisomas* com concomitante diminuição das espécies responsáveis pela oxidação do N-amoniaco como o gênero *unidentified_SJA-28*, de 48,61% para 41,82%. As *Denitratisomas* são bactérias Gram-negativas e possuem metabolismo estritamente oxidativo. Algumas espécies podem realizar metabolismo oxidativo através da respiração de N-nitrato e N-nitrito, indicando sua participação como desnitrificantes. As condições ideais de crescimento ocorrem entre 28 e 30°C e pH entre 7, e 7,2. A partir dos dados físicos-químicos, observa-se que este aumento das desnitrificantes, se dá no momento em que a desnitrificação via nitrato foi a rota responsável por 11,7% da remoção de NT, já que a amostra foi coletada ao final da Fase V (Figura 5.27).

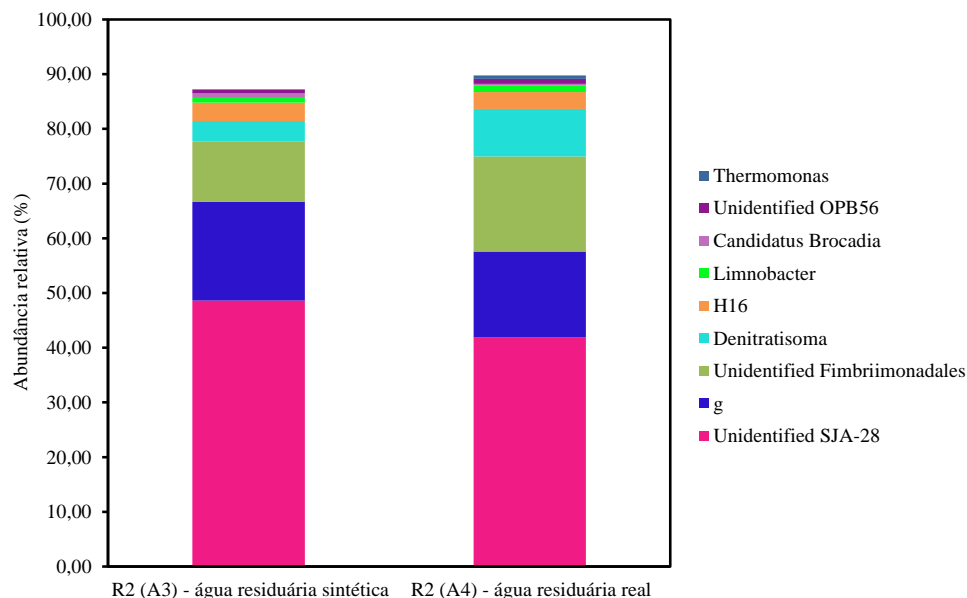
O gênero *Thauera*, identificado como a bactéria funcional para desnitrificação parcial com alta produção de N-nitrito em estudos anteriores (CAO et al., 2016a; DU et al., 2017) foi detectada no presente estudo com abundância muito baixa (0,04% e 0,00%), indicando que a desnitrificação parcial que estava ocorrendo no reator não era realizada por microrganismos deste gênero. Este resultado também foi observado por De Almeida Fernandes et al. (2018).

Em relação às bactérias envolvidas na remoção autotrófica de nitrogênio, bactérias oxidantes de amônia (BOA), bactérias oxidantes de nitrito (BON) e bactérias Anammox, o gênero *Nitrosomonas* foi detectado com 0,32% na amostra A3 e decaiu para 0,17% quando reator operou com água residuária real. Os organismos nitrificantes aeróbicos, como *Nitrosomonas*, são anaeróbios facultativos que também podem metabolizar N-amoniaco e N-nitrito anaerobiamente, mas sua taxa metabólica é pelo menos 30 vezes menor que a do *Ca. B. anammoxidans* (SCHMIDT et al., 2003). *Nitrosomonas spp.* foram os BOA predominantes com abundâncias relativas entre 1-5% em reatores NP/A. A

matéria orgânica é capaz de estimular o crescimento das bactérias heterotróficas que competem com as BOA por oxigênio dissolvido. Embora algumas espécies de BOA, como *Nitrosomonas europaea*, possa utilizar o piruvato, lactato e acetato para crescimento anaeróbio, suas taxas máximas de crescimento são muito menores do que as desnitrificantes que crescem em acetato (por exemplo, $\mu_{\text{máx}}$: 0,03–0,05 d⁻¹ vs. 3.7 d⁻¹ (SCHMIDT, 2009). Com a adição de glicose (C/N = 1), tanto a abundância relativa quanto a atividade de BOA em reatores NP/A diminuíram substancialmente (WEN et al., 2016). Além disso, compostos orgânicos recalcitrantes (por exemplo, ácidos húmicos) em efluentes de digestão anaeróbia podem causar a desativação enzimática ou limitação de difusão de BOA no processo NP/A (ZHANG et al., 2018). Não foram detectadas bactérias do gênero *Nitrospira* quando em água residuária sintética e com apenas 0,1% de abundância relativa na amostra com água residuária real, o que difere do crescimento excessivo frequentemente relatado em reatores NP/A, correspondendo a 3-16% da comunidade microbiana total, devido à dificuldade da supressão das BON em reatores NP/A (LIU et al., 2017).

A partir do balanço de massa realizado durante todo o período experimental, constatou-se que a $82,1 \pm 6,0\%$ da oxidação da amônia ocorreu através do processo Anammox. E os gêneros de maior abundância relativa encontrados no reator R2 (Figura 5.29) foram *unidentified_SJA-28*, com 48,61% e 41,88% no início e fim da operação do R2 e *unidentified Fimbriimonadales* com 11,03% e 17,39% no início e fim da operação, ambos são responsáveis pela oxidação do N-amoniacal a N₂ através do processo Anammox. Microrganismos do gênero *Candidatus Brocadia*, que atuam diretamente no processo Anammox, foram encontrados com baixa abundância relativa nas amostras do reator R2 (0,86 e 0,29%). A abundância relativa destes microrganismos pode ter sido afetada pela disputa entre as bactérias heterotróficas desnitrificantes (XIAO et al., 2021). Estes gêneros também foram encontrados no trabalho de Meng; Zhou; Meng., (2019b) ao estudarem os impactos da variação da temperatura na remoção de NT em reatores de biofilme Anammox.

Figura 5.29 - Taxa de abundância relativa dos gêneros encontrados nas amostras do reator R2 (A3 e A4)



Fonte: SILVEIRA et al. (2021) modificado

A abundância de filões e genes bacterianos também pode mudar ao longo da operação dos reatores NP/A. Fan et al. (2020), demonstraram que de acordo com a concentração de amônia ($70 - 490 \text{ mg.NH}_3\text{-N.L}^{-1}$), a diversidade e abundância relativa da comunidade microbiana dos filões *Planctomycetes*, *Proteobacteria* e *Chloroflexi* modularam o processo. Chini et al. (2020), observaram em um reator NP/A, tratando águas residuária de abatedouro sob taxas de CNA progressivo de até $300 \text{ mg.NH}_3\text{-N.L}^{-1}$ ($1,22 \text{ g.NL}^{-1}.\text{d}^{-1}$) a $800 \text{ mg.NH}_3\text{-N.L}^{-1}$ ($3,27 \text{ g.NL}^{-1}.\text{d}^{-1}$), mudanças na composição da comunidade microbiana, que se adaptaram de acordo com a concentração de NT de cada fase. Em maiores concentração de substrato, *Planctomycetes*, *Proteobacteria* e *Chloroflexi* também foram detectados. Do filo *Planctomycetes*, observou-se maior abundância de *Candidatus Brocadia*, como principal gênero de bactérias Anammox. Como já apresentado, no presente estudo, o CNA variou de 1,6 a $6,3 \text{ g.NL}^{-1}.\text{d}^{-1}$, e os filões predominantes, foram *Chlorobi*, *Proteobacteria* e *Armatimonadetes*.

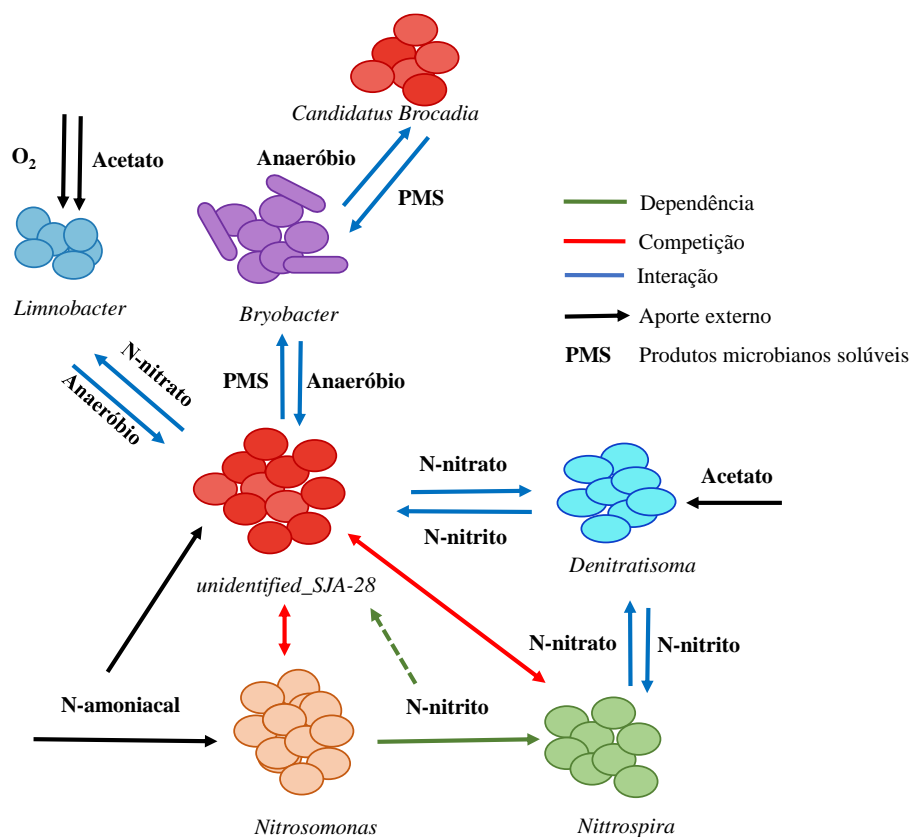
A aplicação de altas carga de nitrogênio podem estimular a atividade de Anammox, produzindo mais produtos microbianos solúveis (PMS) para bactérias DNRA fermentativas, que por sua vez repõem N-nitrito para o meio reacional (KEREN et al., 2020). No presente trabalho, microrganismos da família *Anaerolineaceae*, que participam da DNRA, aumentaram (A3: 1,57 para A4: 5,83) com o aumento da CNA e CNR.

Entretanto, diferindo do esperado, as bactérias AnAOB, que podem ser também representados pela família *Brocadiaceae*, diminuíram (A_3 : 0,86 para A_4 : 0,29) com o aumento da CNA e CNR.

Processos combinados como NP/A e desnitrificação parcial Anammox (DP/A) dependem de extensa cooperação metabólica entre AnAOB e outros grupos microbianos para alcançar a remoção eficiente de nitrogênio. Os reatores Anammox convencionais podem atingir a eficiência de remoção de nitrogênio superior a 70% com a adição de acetato (C/N: 0,5–1,4). Em todos os reatores Anammox, especialmente aqueles sob condições convencionais, o AnAOB representou apenas 0,1–38% de toda a comunidade, deixando o restante dominado por outras populações (XIAO et al., 2021). E por isso, os efeitos dos compostos orgânicos no metabolismo das populações coexistentes e suas interações metabólicas com AnAOB têm recebido mais atenção atualmente.

As associações funcionais de remoção de nitrogênio que podem descrever os processos existentes no reator R2 (Figura 5.30) são: Os microrganismos *unidentified_SJA-28* e *unidentified Fimbriimonadales* utilizam o N-amoniaco (fornecido pela água residuária) e N-nitrito (fornecido pelas *Nitrosomonas* - quando no R1 e pelas *Denitratisomas*) para gerar N_2 gasoso. O N-nitrato e os produtos microbianos solúveis (PMS) fornecidos pelas *unidentified_SJA-28* e *unidentified Fimbriimonadales* podem ser utilizadas como substrato para as *Limnobacter* e *Bryobacter*, que por sua vez protegem as *unidentified_SJA-28* e *unidentified Fimbriimonadales* da inibição por oxigênio e matéria orgânica. Em resumo, as bactérias Anammox (*unidentified_SJA-28*, *unidentified Fimbriimonadales* e *Candidatus Brocadia*) podem sobreviver no ambiente com matéria orgânica, devido a interações positivas com algumas bactérias heterotróficas (*Limnobacter* e *Bryobacter*), que podem proteger as Anammox em ambientes hostis (WANG et al., 2018).

Figura 5.30 Interações propostas entre as principais associações funcionais de remoção de nitrogênio no sistema NP/A.



Fonte: SILVEIRA et al. (2021) modificado

6 Conclusão

Um sistema NP/A de dois estágios foi investigado para remoção de nitrogênio de um efluente real de fábrica de ração animal, pré-tratado em um reator UASB. Constatou-se que, para o bom funcionamento do sistema, é fundamental a ocorrência da nitrificação parcial no reator R1, que não foi alcançada no presente trabalho, o que resultaria em concentrações de N-nitrito e N-amoniaco no efluente próximas à razão estequiométrica ideal para que ocorra a reação Anammox.

Para o processo de nitrificação parcial, foram testadas duas configurações. Na primeira, foi usado reator de biomassa aderida (reator de leito estruturado) e na segunda, optou-se pelo reator de biomassa suspensa. O uso do reator de leito estruturado (R1.1) se mostrou ineficiente devido a impossibilidade de controle do tempo de retenção celular, que prejudica o crescimento dos microrganismos BOA e dificulta a lavagem dos microrganismos BON. Nas condições estudadas, ambas as configurações não levaram à

oxidação de parcela da amônia a nitrito, nas concentrações estequiométricas, para ocorrência a manutenção do processo Anammox.

Diferindo do esperado, as análises microbiológicas, revelaram que o reator de biomassa suspensa apresentou maior diversidade de espécies quando comprado ao reator de biomassa aderida. A presença de microrganismos heterotróficos desnitrificantes foi predominante em todas as situações avaliadas, revelando que a existência de matéria orgânica, mesmo em baixas concentrações, pode facilitar o crescimento destes microrganismos, já que possuem vantagens metabólicas quando comparados aos microrganismos autotróficos.

A dificuldade no controle da concentração de OD no meio reacional e a indisponibilidade de alcalinidade na concentração adequada foram alguns dos fatores que prejudicaram o desempenho dos reatores R1.1 e R1.2. Foi comprovado que vários fatores ambientais influenciam no processo de nitrificação parcial. O estudo da influência desses fatores isoladamente e combinados é de grande importância para o desenvolvimento da tecnologia NP/A. Mais pesquisas são necessárias para investigar a baixa taxa de abundância relativas de microrganismos BOA e a atividade indesejada de BON no estágio de nitrificação parcial.

O reator Anammox foi submetido a cargas nitrogenadas de 1,3 a 6,3 g N L⁻¹.d⁻¹ e apresentou remoção consistente de NT, acima de 80% de eficiência independente do CNA, desde que a relação estequiométrica de N-nitrito e N-amoniaco fosse respeitada.

No reator R2, o processo Anammox foi a principal via de remoção de nitrogênio, responsável por, em média, 82,1 ± 6,0% da remoção total de NT durante todo o período experimental. A desnitrificação heterotrófica ocorreu no reator R2, devido à presença de matéria orgânica residual no efluente do reator nitrificante (R1). Esta via não afetou significativamente o desempenho do sistema. Em vez disso, permitiu que o efluente fosse polido, com uma remoção média de DQO de 85,4 ± 20,6% sendo observada no reator R2.

Análises de biologia molecular revelaram que o uso de águas residuais reais favoreceu o crescimento de bactérias heterotróficas em conjunto com microrganismos Anammox.

O processo Anammox mostrou-se robusto e resiliente quando aplicado a águas residuais reais de processamento de ração animal que ainda contenham matéria orgânica residual.

7 Referências Bibliográficas

ABRA, A. Anuário abra. 2020.

AGRAWAL, S. et al. Success of mainstream partial nitrification/anammox demands integration of engineering, microbiome and modeling insights. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 50, n. Figure 1, p. 214–221, 2018.

AHN, Y. H. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 8, p. 1709–1721, 2006.

AHN, Y. H.; HWANG, I. S.; MIN, K. S. ANAMMOX and partial denitrification in anaerobic nitrogen removal from piggery waste. **Water Science and Technology**, v. 49, n. 5–6, p. 145–153, 2004.

ALI, M.; OKABE, S. Anammox-based technologies for nitrogen removal: Advances in process start-up and remaining issues. **Chemosphere**, v. 141, p. 144–153, 2015.

ALMEIDA, R. G. B. DE et al. Nitrogen removal by simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification (SNAD) in a structured-bed reactor treating animal feed processing wastewater: Inhibitory effects and bacterial community. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 133, n. May, p. 108–115, 2018.

ANTHONISEN, A C. et al. Inhibition of nitrification by Ammonia and nitrous acid. **Journal of the Water Pollution Control Federation**, v. 48, n. 5, p. 835–852, 1976.

APHA. **American Public Health Association, AWWA, WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 20. ed. Washington: [s.n.].

BAE, W. et al. Optimal operational factors for nitrite accumulation in batch reactors. **Biodegradation**, v. 12, n. 5, p. 359–366, 2001.

BAGCHI, S.; BISWAS, R.; NANDY, T. Start-up and stabilization of an Anammox process from a non-acclimatized sludge in CSTR. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 9, p. 943–952, 2010.

BAGCHI, S.; BISWAS, R.; NANDY, T. Autotrophic ammonia removal processes: Ecology to technology. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 42, n. 13, p. 1353–1418, 2012.

BAO, P. et al. Achieving partial nitrification by inhibiting the activity of Nitrospira-like bacteria under high-DO conditions in an intermittent aeration reactor. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 56, n. 2013, p. 71–78, 2017.

BARANA, A. C. et al. Nitrogen and organic matter removal in an intermittently aerated fixed-bed reactor for post-treatment of anaerobic effluent from a slaughterhouse wastewater treatment plant. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 1, n. 3, p. 453–459, 2013.

BERNET, N. et al. Modeling and control of nitrite accumulation in a nitrifying biofilm reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 24, n. 2, p. 173–183, 2005.

BLACKBURNE, R.; YUAN, Z.; KELLER, J. Partial nitrification to nitrite using low dissolved oxygen concentration as the main selection factor. **Biodegradation**, v. 19, n.

2, p. 303–312, 2008.

BONASSA, G. et al. Performance and microbial features of Anammox in a single-phase reactor under progressive nitrogen loading rates for wastewater treatment plants. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 10, n. December 2021, p. 107028, 2021a.

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, 2021b.

BROCK, T.D.; MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J. P. **Microbiologia de Brock**. [s.l.: s.n.].

CAO, S. et al. Integrated anaerobic ammonium oxidization with partial denitrification process for advanced nitrogen removal from high-strength wastewater. **Bioresource Technology**, v. 221, p. 37–46, 2016a.

CAO, S. et al. Nitrite production in a partial denitrifying upflow sludge bed (USB) reactor equipped with gas automatic circulation (GAC). **Water Research**, v. 90, p. 309–316, 2016b.

CAO, S. et al. Feasibility of enhancing the DENitrifying AMmonium OXidation (DEAMOX) process for nitrogen removal by seeding partial denitrification sludge. **Chemosphere**, v. 148, p. 403–407, 2016c.

CHAO, A.; LEE, S. M. Estimating the number of classes via sample coverage. **Journal of the American Statistical Association**, v. 87, n. 417, p. 210–217, 1992.

CHEN, C.; SONG, Y.; YUAN, Y. The operating characteristics of partial nitrification by controlling Ph and alkalinity. **Water (Switzerland)**, v. 13, n. 3, p. 0–9, 2021.

CHEN, H. et al. The development of simultaneous partial nitrification, ANAMMOX and denitrification (SNAD) process in a single reactor for nitrogen removal. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 4, p. 1548–1554, 2009.

CHEN, J. et al. Promoting sludge quantity and activity results in high loading rates in Anammox UBF. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 8, p. 2700–2705, 2010.

CHEN, T. et al. Kinetic characteristics and microbial community of Anammox-EGSB reactor. **Journal of Hazardous Materials**, v. 190, n. 1–3, p. 28–35, 2011.

CHEN, Y. et al. Genome analysis of a *Limnobacter* sp. identified in an anaerobic methane-consuming cell consortium. **Frontiers in Marine Science**, v. 3, n. DEC, p. 1–8, 2016.

CHEN, Y. et al. Achieving stable two-stage mainstream partial-nitrification/anammox (PN/A) operation via intermittent aeration. **Chemosphere**, v. 245, p. 125650, 2020.

CHINI, A. 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, n. May, p. 123521, 2020.

CHO, S. 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, 2010.

CHO, S. et al. Development of a simultaneous partial nitrification and anaerobic ammonia oxidation process in a single reactor. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 652–659, 2011.

CIUDAD, G. et al. Partial nitrification of high ammonia concentration wastewater as a part of a shortcut biological nitrogen removal process. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1715–1719, 2005.

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

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, 2007.

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

DONG, X.; TOLLNER, E. W. Evaluation of Anammox and denitrification during anaerobic digestion of poultry manure. **Bioresource Technology**, v. 86, n. 2, p. 139–145, 2003.

DOSTA, J. et al. Two-step partial nitritation/Anammox process in granulation reactors: Start-up operation and microbial characterization. **Journal of Environmental Management**, v. 164, p. 196–205, 2015.

DU, R. et al. Advanced nitrogen removal from wastewater by combining anammox with partial denitrification. **Bioresource Technology**, v. 179, p. 497–504, 2015.

DU, R. et al. Performance and microbial community analysis of a novel DEAMOX based on partial-denitrification and anammox treating ammonia and nitrate wastewaters. **Water Research**, v. 108, n. 3, p. 46–56, 2017.

DU, R. et al. Combined Partial Denitrification (PD)-Anammox: A method for high nitrate wastewater treatment. **Environment International**, v. 126, n. March, p. 707–716, 2019.

DUEHOLM, M.S., NIERYCHLO, M., ANDERSEN, K.S., RUDKJØBING, V., KNUDSEN, S., THE MIDAS GLOBAL CONSORTIUM, ALBERTSEN, M., NIELSEN, P. H. MIDAS 4: A global catalogue of full-length 16S rRNA gene sequences and taxonomy for studies of bacterial communities in wastewater treatment plants. p. 6, 2021.

EGLI, K. et al. Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate. **Archives of Microbiology**, v. 175, n. 3, p. 198–207, 2001.

EGLI, K. R. et al. **On the use of anammox in treating ammonium-rich wastewater.** [s.l.: s.n.].

EL HASSAN, G. A.; ZABLOTOWICZ, R. M.; FOCHT, D. D. Kinetics of denitrifying growth by fast-growing cowpea rhizobia. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 517–521, 1985.

ETCHEBEHERE, C. et al. *Comamonas nitrivorans* sp. nov., a novel denitrifier isolated from a denitrifying reactor treating landfill leachate. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 977–983, 2001.

FAN, N. S. et al. A two-stage anammox process for the advanced treatment of high-strength ammonium wastewater: Microbial community and nitrogen transformation. **Journal of Cleaner Production**, v. 261, p. 121148, 2020.

FERNÁNDEZ-GÓMEZ, B. et al. Ecology of marine bacteroidetes: A comparative genomics approach. **ISME Journal**, v. 7, n. 5, p. 1026–1037, 2013.

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

FERNÁNDEZ, I. et al. Short- and long-term effects of ammonium and nitrite on the Anammox process. **Journal of Environmental Management**, v. 95, n. SUPPL., p. S170–S174, 2012.

FUERST, J. A.; SAGULENKO, E. Beyond the bacterium: Planctomycetes challenge our concepts of microbial structure and function. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 403–413, 2011.

FUX, C. et al. Biological treatment of ammonium-rich wastewater by partial nitrification and subsequent anaerobic ammonium oxidation (anammox) in a pilot plant. **Journal of Biotechnology**, v. 99, n. 3, p. 295–306, 2002.

GANIGUÉ, R. et al. Partial ammonium oxidation to nitrite of high ammonium content urban landfill leachates. **Water Research**, v. 41, n. 15, p. 3317–3326, 2007.

GANIGUÉ, R. et al. Long-term operation of a partial nitrification pilot plant treating leachate with extremely high ammonium concentration prior to an anammox process. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 23, p. 5624–5632, 2009.

GANIGUÉ, R. et al. Impact of influent characteristics on a partial nitrification SBR treating high nitrogen loaded wastewater. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 62–69, 2012.

GE, S. et al. Detection of nitrifiers and evaluation of partial nitrification for wastewater treatment: A review. **Chemosphere**, v. 140, p. 85–98, 2015.

GRIFFITHS, R. I. ET AL. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5488–5491, 2000.

GUERRERO, R. B. S.; ZAIAT, M. Wastewater post-treatment for simultaneous ammonium removal and elemental sulfur recovery using a novel horizontal mixed aerobic-anoxic fixed-bed reactor configuration. **Journal of Environmental Management**, v. 215, p. 358–365, 2018.

GUMAELIUS, L. et al. *Comamonas denitrificans* sp. nov., an efficient denitrifying

- bacterium isolated from activated sludge. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 999–1006, 2001.
- GUO, J. H. et al. Effective and robust partial nitrification to nitrite by real-time aeration duration control in an SBR treating domestic wastewater. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 9, p. 979–985, 2009.
- GÜVEN, D. et al. Propionate oxidation by and methanol inhibition of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 2, p. 1066–1071, 2005.
- HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T. A. T., RYAN, P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontol. Electron**, v. 4, n. 1, p. 1–9, 2001.
- HANAKI, K.; WANTAWIN, C.; OHGAKI, S. Nitrification at low levels of dissolved oxygen with and without organic loading in a suspended-growth reactor. **Water Research**, v. 24, n. 3, p. 297–302, 1990.
- HE, S. et al. The treatment performance and the bacteria preservation of anammox: A review. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 226, n. 5, 2015.
- HELLINGA, C. et al. The SHARON process: An innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich waste water. **Water Science and Technology**, v. 37, n. 9, p. 135–142, 1998.
- HU, B. LAN et al. Identification and quantification of anammox bacteria in eight nitrogen removal reactors. **Water Research**, v. 44, n. 17, p. 5014–5020, 2010.
- HU, J. et al. Effect of organic carbon on nitrification efficiency and community composition of nitrifying biofilms. **Journal of Environmental Sciences**, v. 21, n. 3, p. 387–394, 2009.
- HU, Q. Y. et al. Characterization of oligotrophic AnAOB culture: morphological, physiological, and ecological features. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 2, p. 995–1003, 2018.
- HUBER, KATHARINA J.; PASCUAL JAVIER; FOESEL, BÄRBEL U.; OVERMANN, J. Blastocatellaceae. In: **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. [s.l.: s.n.]. p. 542.
- HUG, L. A. et al. Community genomic analyses constrain the distribution of metabolic traits across the Chloroflexi phylum and indicate roles in sediment carbon cycling. **Microbiome**, v. 1, n. 1, p. 1–17, 2013.
- HULTH, S. et al. Nitrogen removal in marine environments: Recent findings and future research challenges. **Marine Chemistry**, v. 94, n. 1–4, p. 125–145, 2005.
- ISAKA, K. et al. Anaerobic ammonium oxidation (anammox) irreversibly inhibited by methanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 2, p. 379–385, 2008.
- ISAKA, K.; SUMINO, T.; TSUNEDA, S. High nitrogen removal performance at moderately low temperature utilizing anaerobic ammonium oxidation reactions. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 103, n. 5, p. 486–490, 2007.

- JAROSZYNSKI, L. W. et al. Impact of free ammonia on anammox rates (anoxic ammonium oxidation) in a moving bed biofilm reactor. **Chemosphere**, v. 88, n. 2, p. 188–195, 2012.
- JAROSZYNSKI, L. W.; OLESZKIEWICZ, J. A. Autotrophic ammonium removal from reject water: Partial nitrification and anammox in one-reactor versus two-reactor systems. **Environmental Technology**, v. 32, n. 3, p. 289–294, 2011.
- JETTEN, M. S. M. et al. The anaerobic oxidation of ammonium. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 22, n. 5, p. 421–437, 1998.
- JIANG, H. et al. A pilot-scale study on start-up and stable operation of mainstream partial nitrification-anammox biofilter process based on online pH-DO linkage control. **Chemical Engineering Journal**, v. 350, n. June, p. 1035–1042, 2018a.
- JIANG, H. et al. A pilot-scale study on start-up and stable operation of mainstream partial nitrification-anammox biofilter process based on online pH-DO linkage control. **Chemical Engineering Journal**, v. 350, n. June, p. 1035–1042, 2018b.
- JIMÉNEZ, E. et al. Effect of pH, substrate and free nitrous acid concentrations on ammonium oxidation rate. **Bioresource Technology**, v. 124, p. 478–484, 2012.
- JIN, P. et al. High-efficient nitrogen removal from municipal wastewater via two-stage nitrification/anammox process: Long-term stability assessment and mechanism analysis. **Bioresource Technology**, v. 271, n. September 2018, p. 150–158, 2019.
- JIN, R. C. et al. Performance comparison of two anammox reactors: SBR and UBF. **Chemical Engineering Journal**, v. 138, n. 1–3, p. 224–230, 2008a.
- JIN, R. C. et al. The inhibition of the Anammox process: A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 197, p. 67–79, 2012a.
- JIN, R. C. et al. The inhibition of the Anammox process: A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 197, p. 67–79, 2012b.
- JIN, R. CUN et al. Quantitative comparison of stability of ANAMMOX process in different reactor configurations. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 6, p. 1603–1609, 2008b.
- JUNG, J. Y. et al. Factors affecting the activity of anammox bacteria during start up in the continuous culture reactor. **Water Science and Technology**, v. 55, n. 1–2, p. 459–468, 2007.
- KAPP, H. **Schlammbau mit hohem Feststoffgehalt. Stugarter Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft, Band 86.** Munchen: [s.n.].
- KARTAL, B. et al. Molecular mechanism of anaerobic ammonium oxidation. **Nature**, v. 479, n. 7371, p. 127–130, 2011.
- KARTAL, B.; KELTJENS, J. T.; JETTEN, M. S. The Metabolism of Anammox. **Encyclopedia of Life Sciences**, n. 1, 2008.
- KARTAL, B.; KUENEN, J. G.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Sewage Treatment with Anammox. **Science**, v. 328, n. 5979, p. 702–703, 2010.

- KEREN, R. et al. Increased replication of dissimilatory nitrate-reducing bacteria leads to decreased anammox bioreactor performance. **Microbiome**, v. 8, n. 1, p. 1–21, 2020.
- KIM, D. J.; LEE, D. I.; KELLER, J. Effect of temperature and free ammonia on nitrification and nitrite accumulation in landfill leachate and analysis of its nitrifying bacterial community by FISH. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 3, p. 459–468, 2006.
- KIMURA, Y. et al. Effects of nitrite inhibition on anaerobic ammonium oxidation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 1, p. 359–365, 2010.
- KINDAICHI, T. et al. Ecophysiological role and function of uncultured Chloroflexi in an anammox reactor. **Water Science and Technology**, v. 66, n. 12, p. 2556–2561, 2012.
- KUENEN, J. G. Anammox bacteria: From discovery to application. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 320–326, 2008a.
- KUENEN, J. G. Anammox bacteria: from discovery to application. **Nature reviews. Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 320–326, 2008b.
- KUMAR, M.; LIN, J. G. Co-existence of anammox and denitrification for simultaneous nitrogen and carbon removal-Strategies and issues. **Journal of Hazardous Materials**, v. 178, n. 1–3, p. 1–9, 2010.
- KUYPERS, M. M. M. et al. Anaerobic Ammonium Oxidation by Anammox Bacteria in the Black Sea. **Nature**, v. 422, n. 6932, p. 608–611, 2003.
- LACKNER, S. et al. Full-scale partial nitritation/anammox experiences - An application survey. **Water Research**, v. 55, n. 0, p. 292–303, 2014.
- LAN, CHIEN-JU; KUMAR, MATHAVA; WANG, C.-C. L.; JIH-GAW. Development of simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification (SNAD) process in a sequential batch reactor. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 5514–5519, 2011.
- LAURENI, M. et al. Activity and growth of anammox biomass on aerobically pre-treated municipal wastewater. **Water Research**, v. 80, p. 325–336, 2015.
- LAURENI, M. et al. Mainstream partial nitritation and anammox: Long-term process stability and effluent quality at low temperatures. **Water Research**, v. 101, p. 628–639, 2016.
- LEAL, C. D. et al. Anammox for nitrogen removal from anaerobically pre-treated municipal wastewater: Effect of COD/N ratios on process performance and bacterial community structure. **Bioresource Technology**, v. 211, p. 257–266, 2016.
- LEVENSPIEL, O. **Chemicam reaction Engineering**. [s.l: s.n.]. v. 3
- LEYVA-DÍAZ, J. C. et al. Comparative kinetics of hybrid and pure moving bed reactor-membrane bioreactors. **Ecological Engineering**, v. 70, p. 227–234, 2014.
- LI, J. et al. Performance and microbial community of simultaneous anammox and denitrification (SAD) process in a sequencing batch reactor. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 1064–1072, 2016.
- LI, J. et al. Effect of low COD/N ratios on stability of single-stage partial

- nitritation/anammox (SPN/A) process in a long-term operation. **Bioresource Technology**, v. 244, n. June, p. 192–197, 2017a.
- LI, J. et al. Effect of low COD/N ratios on stability of single-stage partial nitritation/anammox (SPN/A) process in a long-term operation. **Bioresource Technology**, v. 244, n. June, p. 192–197, 2017b.
- LI, J. 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, n. May, p. 498–505, 2018a.
- LI, J. et al. Insight into the impacts of organics on anammox and their potential linking to system performance of sewage partial nitrification-anammox (PN/A): A critical review. **Bioresource Technology**, v. 300, n. December 2019, p. 122655, 2020.
- LI, J. et al. Rapid enrichment of anammox bacteria linked to floc aggregates in a single-stage partial nitritation-anammox process: Providing the initial carrier and anaerobic microenvironment. **Water Research**, v. 191, p. 116807, 2021.
- LI, X. et al. Bioresource Technology Highly efficient of nitrogen removal from mature landfill leachate using a combined DN-PN-Anammox process with a dual recycling system. **Bioresource Technology**, v. 265, n. June, p. 357–364, 2018b.
- LI, X. R. et al. The bacterial diversity in an anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) reactor community. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 278–289, 2009.
- LIANG, Y. et al. Microbial characteristics and nitrogen removal of simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification (SNAD) process treating low C/N ratio sewage. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 103–109, 2014.
- LIANG, Z.; LIU, J. XIN. Control factors of partial nitritation for landfill leachate treatment. **Journal of Environmental Sciences**, v. 19, n. 5, p. 523–529, 2007.
- LIAO, D. et al. Effect of inorganic carbon on anaerobic ammonium oxidation enriched in sequencing batch reactor. **Journal of Environmental Sciences**, v. 20, n. 8, p. 940–944, 2008.
- LIU, L. et al. Insight into the short-term effect of fulvic acid on nitrogen removal performance and N-acylated-L-homoserine lactones (AHLs) release in the anammox system. **Science of the Total Environment**, v. 704, p. 135285, 2020.
- LIU, S. et al. Evaluation of oxygen adaptation and identification of functional bacteria composition for anammox consortium in non-woven biological rotating contactor. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 8273–8279, 2008.
- 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, 2017.
- LIU, Y.; NI, B. J. Appropriate Fe (II) addition significantly enhances anaerobic ammonium oxidation (anammox) activity through improving the bacterial growth rate. **Scientific Reports**, v. 5, n. 11, p. 1–7, 2015.
- LOTTI, T. et al. Physiological and kinetic characterization of a suspended cell

- anammox culture. **Water Research**, v. 60, p. 1–14, 2014.
- LOTTI, T. et al. Faster through training: The anammox case. **Water Research**, v. 81, p. 261–268, 2015.
- M. RUSCALLEDA, M. D. B. AND J. H. L. S. P. R. G.; COLPRIM. Start-up and enrichment of a granular anammox SBR to treat high nitrogen load wastewaters. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 83, n. May, p. 233–241, 2008.
- MA, B. et al. Biological nitrogen removal from sewage via anammox: Recent advances. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 981–990, 2016.
- MA, H. et al. Substrate inhibition and concentration control in an UASB-Anammox process. **Bioresource Technology**, v. 238, p. 263–272, 2017a.
- MA, H. et al. Substrate inhibition and concentration control in an UASB-Anammox process. **Bioresource Technology**, v. 238, p. 263–272, 2017b.
- MA, Y. et al. Nitrogen removal performance of a hybrid anammox reactor. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 12, p. 6650–6656, 2011.
- MAGURRAN, A. E. **Ecological diversity and its measurement**. [s.l.: s.n.].
- MAO, N. et al. Engineering application of anaerobic ammonium oxidation process in wastewater treatment. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 8, p. 1–11, 2017.
- MENG, Y.; ZHOU, Z.; MENG, F. Impacts of diel temperature variations on nitrogen removal and metacommunity of anammox biofilm reactors. **Water Research**, v. 160, p. 1–9, 2019a.
- MENG, Y.; ZHOU, Z.; MENG, F. Impacts of diel temperature variations on nitrogen removal and metacommunity of anammox biofilm reactors. **Water Research**, v. 160, p. 1–9, 2019b.
- MERGAERT, J.; CNOCKAERT, M. C.; SWINGS, J. *Thermomonas fusca* sp. nov. and *Thermomonas brevis* sp. nov., two mesophilic species isolated from a denitrification reactor with poly(E-caprolactone) plastic granules as fixed bed, and emended description of the genus *Thermomonas*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 6, p. 1961–1966, 2003.
- METCALF, A.; EDDY, M. S. **Wastewater engineering: treatment and reuse**. 4. ed. New York: McGraw-Hill, 2003.
- MIAO, Y. et al. Start-up of single-stage partial nitrification-anammox process treating low-strength swage and its restoration from nitrate accumulation. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 771–779, 2016.
- MIAO, Y. et al. Partial nitrification-anammox (PNA) treating sewage with intermittent aeration mode: Effect of influent C/N ratios. **Chemical Engineering Journal**, v. 334, n. October 2017, p. 664–672, 2018.
- MULDER, A. et al. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 16, n. 3, p. 177–183, 1995.

NATION, J. L. A new method using hexamethyldisilazane for preparation of soft insect tissues for scanning electron microscopy. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 58, n. 6, p. 347–351, 1983.

NHAT, P. T. et al. Stability of partial nitrification in a sequencing batch reactor fed with high ammonium strength old urban landfill leachate. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 124, p. 56–61, 2017.

NI, B. J.; RUSCALLEDA, M.; SMETS, B. F. Evaluation on the microbial interactions of anaerobic ammonium oxidizers and heterotrophs in Anammox biofilm. **Water Research**, v. 46, n. 15, p. 4645–4652, 2012.

NI, S. Q. et al. Fast start-up, performance and microbial community in a pilot-scale anammox reactor seeded with exotic mature granules. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 2448–2454, 2011.

NI, S. Q. et al. Effect of organic matter on the performance of granular anammox process. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 701–705, 2012.

NISHIMURA, F. et al. 8Th iwa symposium on waste management problems in agro-industries- agro'2011: Removal of high concentration ammonia from wastewater by a combination of partial nitrification and anammox treatment. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 33, n. 13, p. 1485–1489, 2012.

OKABE, S. et al. Development of long-term stable partial nitrification and subsequent anammox process. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 13, p. 6801–6807, 2011.

OLIVEIRA, G. M. DE. De Águas Residuárias - Avaliação De Sistemas. 2015.

PAN, M. et al. Nitrogen removal from slaughterhouse wastewater through partial nitrification followed by denitrification in intermittently aerated sequencing batch reactors at 11°C. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 35, n. 4, p. 470–477, 2014.

PAREDES, D. et al. New aspects of microbial nitrogen transformations in the context of wastewater treatment - A review. **Engineering in Life Sciences**, v. 7, n. 1, p. 13–25, 2007.

PARK, S.; BAE, W.; RITTMANN, B. E. Operational boundaries for nitrite accumulation in nitrification based on minimum/maximum substrate concentrations that include effects of oxygen limitation, pH, and free ammonia and free nitrous acid inhibition. **Environmental science & technology**, v. 44, n. 1, p. 335–342, 2009.

PARK, S.; BAE, W. Modeling kinetics of ammonium oxidation and nitrite oxidation under simultaneous inhibition by free ammonia and free nitrous acid. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 6, p. 631–640, 2009.

PARK, S.; BAE, W.; RITTMANN, B. E. Operational boundaries for nitrite accumulation in nitrification based on minimum/maximum substrate concentrations that include effects of oxygen limitation, pH, and free ammonia and free nitrous acid inhibition. **Environmental Science and Technology**, v. 44, n. 1, p. 335–342, 2010.

PLAZA, E.; TRELA, J.; HULTMAN, B. Swedish Experience With Deammonification Process in Biofilm System. **Water Resources**, p. 31–40, 2011.

- PUYOL, D. et al. Kinetic characterization of *Brocadia* spp.-dominated anammox cultures. **Bioresource Technology**, v. 139, p. 94–100, 2013.
- QIAO, S. et al. High-rate nitrogen removal from livestock manure digester liquor by combined partial nitrification-anammox process. **Biodegradation**, v. 21, n. 1, p. 11–20, 2010.
- R. DESJARDINS, P.; CONKLIN, D. S. Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. In: **Current Protocols in Molecular Biology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2011.
- REGMI, P. et al. Control of aeration, aerobic SRT and COD input for mainstream nitrification/denitrification. **Water Research**, v. 57, p. 162–171, 2014.
- RIBEIRO, M.; ROSSETO, P.; SOUZA, T. S. O. DE. Fast start-up of the single-stage nitrogen removal using anammox and partial nitrification (SNAP) from conventional activated sludge in a membrane-aerated biofilm reactor. **Bioresource Technology**, v. 266, n. June, p. 151–157, 2018.
- RINQUEST, Z. et al. Poultry slaughterhouse wastewater treatment using a static granular bed reactor coupled with single stage nitrification-denitrification and ultrafiltration systems. **Journal of Water Process Engineering**, v. 29, n. January, p. 100778, 2019.
- SABUMON, P. C. Anaerobic ammonia removal in presence of organic matter: A novel route. **Journal of Hazardous Materials**, v. 149, n. 1, p. 49–59, 2007.
- SANTOS, C. E. D. et al. Influence of COD/N ratio and carbon source on nitrogen removal in a structured-bed reactor subjected to recirculation and intermittent aeration (SBRRIA). **Journal of Environmental Management**, v. 166, p. 519–524, 2016.
- SCHMIDT, I. et al. New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p. 481–492, 2003.
- SCHMIDT, I. Chemoorganoheterotrophic growth of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrosomonas eutropha*. **Current Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 130–138, 2009.
- SILVA, B. G. **Efeitos do tempo de aeração no desempenho de reator de leito estruturado e aeração intermitente na remoção de matéria orgânica e nitrogênio de efluente de reator UASB**. [s.l.] USP, 2016.
- SILVA, B. G. et al. Foam aerated biofilm reactor: a novel counter-diffusional process for COD and nitrogen removal from low COD/N effluents. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 0, n. 0, p. 1–13, 2021.
- SILVA FILHO, H. A. **Nitrificação em sistemas de lodos ativados**. [s.l.: s.n.].
- SILVEIRA, C. et al. Two-stage partial nitrification-Anammox process for nitrogen removal from slaughterhouse wastewater : Evaluation of the nitrogen loading rate and microbial community analysis. v. 296, n. April, p. 1–10, 2021.
- SINHA, B.; ANNACHHATRE, A. P. Partial nitrification - Operational parameters and microorganisms involved. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 6, n. 4, p. 285–313, 2007.

- SLIEKERS, A. O. et al. Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite in one single reactor. **Water Research**, v. 36, n. 10, p. 2475–2482, 2002.
- SLIEKERS, A. O. et al. CANON and Anammox in a gas-lift reactor. **FEMS Microbiology Letters**, v. 218, n. 2, p. 339–344, 2003.
- SOBOTKA, D. et al. Long-term performance and microbial characteristics of the anammox-enriched granular sludge cultivated in a bench-scale sequencing batch reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 120, p. 125–135, 2017.
- 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. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, p. 589–596, 1998.
- STROUS, M. et al. Ammonium removal from concentrated waste streams with the anaerobic ammonium oxidation (anammox) process in different reactor configurations. **Water Research**, v. 31, n. 8, p. 1955–1962, 1997.
- STROUS, M. et al. The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, n. 5, p. 589–596, 1998.
- TANG, C. J. 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, 2010a.
- TANG, C. J. et al. Influence of substrates on nitrogen removal performance and microbiology of anaerobic ammonium oxidation by operating two UASB reactors fed with different substrate levels. **Journal of Hazardous Materials**, v. 181, n. 1–3, p. 19–26, 2010b.
- TANG, C. J. et al. Performance of high-loaded ANAMMOX UASB reactors containing granular sludge. **Water Research**, v. 45, n. 1, p. 135–144, 2011.
- TANG, C. J. et al. Enhanced nitrogen removal from ammonium-rich wastewater containing high organic contents by coupling with novel high-rate ANAMMOX granules addition. **Chemical Engineering Journal**, v. 240, p. 454–461, 2014.
- TANG CHONG-JIAN, ZHENG PING, MAHMOOD Q, C. J. Effect of substrate concentration on stability of anammox biofilm reactors. **J. Cent. South Univ. Technol.**, v. 17, p. 79–84, 2010.
- THIRD, K. A. et al. The CANON system (completely autotrophic nitrogen-removal over nitrite) under ammonium limitation: Interaction and competition between three groups of bacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 24, n. 4, p. 588–596, 2001.
- TIEDJE, J. M. Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. In: A.J.B ZEHNDER (Ed.). **Environmental Microbiology of Anaerobes**. NY: Environmental Microbiology of Anaerobes, 1988. p. 179–244.
- TOMASZEWSKI, M.; CEMA, G.; ZIEMBIŃSKA-BUCZYŃSKA, A. Influence of temperature and pH on the anammox process: A review and meta-analysis.

Chemosphere, v. 182, p. 203–214, 2017.

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

TSUSHIMA, I.; KINDAICHI, T.; OKABE, S. Quantification of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in enrichment cultures by real-time PCR. **Water Research**, v. 41, n. 4, p. 785–794, 2007.

VADIVELU, V. M.; KELLER, J.; YUAN, Z. Effect of free ammonia on the respiration and growth processes of an enriched *Nitrobacter* culture. **Water Research**, v. 41, n. 4, p. 826–834, 2007.

VAN DE GRAAF, A. A. et al. Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1246–1251, 1995.

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

VAN DER STAR, W. R. L. et al. Startup of reactors for anoxic ammonium oxidation: Experiences from the first full-scale anammox reactor in Rotterdam. **Water Research**, v. 41, n. 18, p. 4149–4163, 2007.

VAN DONGEN, U.; JETTEN, M. S. M.; LOOSDRECHT, M. C. M. VAN. Ammonium Rich Wastewater. **Growth Lakeland**, v. 44, n. 1, p. 153–160, 2001.

VAN HULLE, S. W. H. et al. Engineering aspects and practical application of autotrophic nitrogen removal from nitrogen rich streams. **Chemical Engineering Journal**, v. 162, n. 1, p. 1–20, 2010.

VAN KEMPEN R.; MULDER J.W.; UIJTERLLINDE C.A.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Overview: full scale experience of the SHARON process for treatment of rejection water of digested sludge dewatering. **Water SciTechnol**, v. 44, n. 1, p. 145–452, 2001.

VAN RIJN, J.; TAL, Y.; SCHREIER, H. J. Denitrification in recirculating systems: Theory and applications. **Aquacultural Engineering**, v. 34, n. 3, p. 364–376, 2006.

VÁZQUEZ-PADÍN, J. et al. Applications of Anammox based processes to treat anaerobic digester supernatant at room temperature. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 12, p. 2988–2994, 2009.

VERSTRAETE, W.; PHILIPS, S. Nitrification-denitrification processes and technologies in new contexts. **Environmental Pollution**, v. 102, p. 717–726, 1998.

WAKI, M. et al. Nitrogen removal from animal waste treatment water by anammox enrichment. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 14, p. 2775–2780, 2007.

WAKI, M. et al. Effect of electron donors on anammox coupling with nitrate reduction for removing nitrogen from nitrate and ammonium. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 592–598, 2013.

WANG, B. et al. Recovering partial nitritation in a PN/A system during mainstream

- wastewater treatment by reviving AOB activity after thoroughly inhibiting AOB and NOB with free nitrous acid. **Environment International**, v. 139, n. April, p. 105684, 2020a.
- WANG, C. 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, 2018.
- WANG, C. C. et al. Simultaneous partial nitrification, anaerobic ammonium oxidation and denitrification (SNAD) in a full-scale landfill-leachate treatment plant. **Journal of Hazardous Materials**, v. 175, n. 1–3, p. 622–628, 2010.
- WANG, D. 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, 2019.
- WANG, S. et al. Anaerobic ammonium oxidation in traditional municipal wastewater treatment plants with low-strength ammonium loading: Widespread but overlooked. **Water Research**, v. 84, p. 66–75, 2015.
- WANG, W. et al. Organic compounds evolution and sludge properties variation along partial nitritation and subsequent anammox processes treating reject water. **Water Research**, v. 184, p. 116197, 2020b.
- WANG, X.; GAO, D. In-situ restoration of one-stage partial nitritation-anammox process deteriorated by nitrate build-up via elevated substrate levels. **Scientific Reports**, v. 6, n. July, p. 1–9, 2016.
- WELLS, G. F. et al. Comparing the Resistance, Resilience, and Stability of Replicate Moving Bed Biofilm and Suspended Growth Combined Nitritation-Anammox Reactors. **Environmental Science and Technology**, v. 51, n. 9, p. 5108–5117, 2017.
- WEN, X. et al. A novel process combining simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification (SNAD) with denitrifying phosphorus removal (DPR) to treat sewage. **Bioresource Technology**, v. 222, p. 309–316, 2016.
- WEN, X. 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, 2017.
- WU, C. et al. Effect of sludge retention time on nitrite accumulation in real-time control biological nitrogen removal sequencing batch reactor. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 19, n. 3, p. 512–517, 2011.
- XIAO, R. et al. Impacts of organics on the microbial ecology of wastewater anammox processes: Recent advances and meta-analysis. **Water Research**, v. 191, p. 116817, 2021.
- XU, G. 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, 2012.
- YAMAMOTO, T. et al. Long-term stability of partial nitritation of swine wastewater

digester liquor and its subsequent treatment by Anammox. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 14, p. 6419–6425, 2008.

YAO, Z. et al. Stoichiometry and kinetics of the anaerobic ammonium oxidation (Anammox) with trace hydrazine addition. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 70–76, 2015.

YUN, Y.; ZHU, J.; NAKHLA, G. Optimization for the Operational Parameters of the Partial Nitrification in a Fluidized Bed Bioreactor (PNFBR). **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 231, n. 2, 2020.

ZHANG, F. et al. Efficient step-feed partial nitrification, simultaneous Anammox and denitrification (SPNAD) equipped with real-time control parameters treating raw mature landfill leachate. **Journal of Hazardous Materials**, v. 364, n. October 2018, p. 163–172, 2019.

ZHANG, Q. et al. Supernatant organics from anaerobic digestion after thermal hydrolysis cause direct and/or diffusional activity loss for nitrification and anammox. **Water Research**, v. 143, n. 2018, p. 270–281, 2018.

ZHANG, T. et al. Microbial physiology and interactions in anammox systems with the intermittent addition of organic carbons. **Bioresource Technology**, v. 319, n. August 2020, p. 124226, 2021.

ZHANG, Y. et al. Characterization of three types of inhibition and their recovery processes in an anammox UASB reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 109, p. 212–221, 2016.

ZHOU, Y. et al. The role of nitrite and free nitrous acid (FNA) in wastewater treatment plants. **Water Research**, v. 45, n. 15, p. 4672–4682, 2011.

ZHU, W. et al. Effect of influent substrate ratio on anammox granular sludge: performance and kinetics. **Biodegradation**, v. 28, n. 5–6, p. 437–452, 2017.

ZUMFT, W. G. Cell Biology and Molecular Basis of Denitrification †. v. 61, n. 4, p. 533–616, 1997.