

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Escola de Engenharia de São Carlos

Processos de nitrificação parcial e anammox em efluentes anaeróbios de esgoto sanitário doméstico para regiões de clima quente.

Guilherme Lelis Giglio

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Helena Rissato Zamarioli
Damianovic

Coorientador: Prof. Dr. Julius Bernardus van Lier

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

GUILHERME LELIS GIGLIO

**Processos de nitrificação parcial e anammox em efluentes anaeróbios
de esgoto sanitário doméstico para regiões de clima quente**

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos
2023

GUIHERME LELIS GIGLIO

**Processos de nitrificação parcial e anammox em efluentes anaeróbios
de esgoto sanitário doméstico para regiões de clima quente**

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic

Coorientador: Prof. Dr. Julius Bernardus van Lier

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos
2023

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).

L459p Lelis Giglio, Guilherme
Processos de nitrificação parcial e anammox em
efluentes anaeróbios de esgoto sanitário doméstico
para regiões de clima quente / Guilherme Lelis Giglio;
orientadora Márcia Helena Rissato Zamariolli
Damianovic; coorientador Julius Bernardus van Lier. São
Carlos, 2023.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Hidráulica e Saneamento e Área de
Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de
Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo,
2023.

1. Anammox. 2. Mainstream PNA. 3. Efluente de UASB.
4. Relação C/N. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Engenheiro **GUILHERME LELIS GIGLIO**

Título da tese: “Processos de nitrificação parcial e anammox em efluentes anaeróbios de esgoto sanitário doméstico para regiões de clima quente.”

Data da defesa: 25/08/2023

<u>Comissão Julgadora</u>	<u>Resultado</u>
Prof. Dra. Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic (Orientadora) (Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)	Aprovado
Prof. Dr. Airton Kunz (EMBRAPA Suínos e Aves)	Aprovado
Prof. Dra. Camila Leite Madeira (University of Texas at El Paso)	Aprovado
Prof. Dra. Luana Mattos de Oliveira Cruz (Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP)	Aprovado
Prof. Dr. Theo Syrto Octavio de Souza (Escola Politécnica/EP-USP)	Aprovado

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

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

Dedicatória

Com carinho, dedico este trabalho aos meus pais, Leonice e Luiz, e à minha noiva, Juliana, pelo incentivo, apoio e presença constante ao longo desta jornada.

Agradecimentos

A Deus, pela vida.

Aos meus pais, Leonice e Luiz, pelo amor, generosidade, incentivo, ensinamentos, e por praticamente tudo que fizeram e tem feito em minha vida. Amo vocês!

À Maria, minha segunda mãe, sinônimo de bondade, amor e compaixão, sempre presente em meus pensamentos e coração.

Ao meu irmão, Vinicius, que mesmo distante, sei que torceu para o meu sucesso.

À minha noiva, Juliana, pelo amor, companheirismo, incentivo, cuidados com a casa, plantas, peixes, e com os nossos 'fios' felinos, Ping e Pong. Temos compartilhado tantos momentos juntos que não consigo te agradecer com menos do que um 'eu te amo!'.

À minha orientadora, professora Márcia Damianovic, pelos ensinamentos e cuidados, sempre me auxiliando de forma generosa e alegre. Sou extremamente grato por ter me apoiado em tantos momentos difíceis do meu doutorado, tanto no Brasil como na Holanda. Fico honrado por ter sido seu aluno e por termos aprendido juntos sobre as 'vermelhinhas' anammox. Jamais esquecerei as mensagens de incentivo que me deram tanta força para seguir em frente!

Ao meu coorientador, professor Jules van Lier, por ter literalmente me abraçado como aluno de doutorado. Apesar da distância, você me auxiliou, abriu portas, construiu pontes, organizou encontros e fez tudo que fosse ao seu alcance para contribuir à minha formação. Sua humildade, simpatia e competência inigualáveis me ensinaram muito. Espero que possamos nos encontrar em outros momentos de nossas vidas.

Ao pessoal da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC, em especial, ao prof. Airton Kunz e Bruno, pela recepção afetuosa na Embrapa e pelo auxílio, mesmo a distância, com várias questões a respeito do processo PNA.

Ao professor Michele Laurení, por compartilhar seu conhecimento sobre o processo PNA e ter contribuído ativamente com decisões assertivas ao final desta pesquisa.

Aos amigos que contribuíram para realizar o doutorado sanduíche na Holanda, Andreia, Andrezão, Cebola, Clarissa, Djalma, Laís, Lari, Maria, Maria Clara, Tales, e principalmente a Bia, que mesmo à distância, me ajudou com muito carinho na minha adaptação em Delft.

Aos colegas do Laboratório de Processos Biológicos (LPB), que fizeram desta jornada mais leve e prazerosa, compartilhando não só a bancada, mas suas experiências de vida, André, Carneiro, Carol, Capivara, Cris, Dudu, Francisco, Felipe, Jean, Jeny, Laís, Lili, Luana, Lucas, Luciana, Mariê, Matheus, Mayara, Paulinha, Pilar, Rafa, Renan, Renata, Rhayssa, Rômulo,

Sami, Sarah e Williane, em especial ao Léo, que me auxiliou ao longo de um ano na realização desta pesquisa.

Aos amigos que vivenciaram a saudosa época de XB, Bel, Bobo, Carlinha, Dico, Elias, Gabi, Goiaba, Pauleta, Teta, Tiago Topete, Txe, Xamego e Zé.

Aos meus familiares, pelo incentivo e acolhimento. Em especial, agradeço ao Fernandinho e à Nath pelo carinho e momentos de alegria.

Aos familiares da minha noiva, Dila, Dona Neiva, João Victor, Mari, Pedro, Vagner, e em especial, à minha sogra Ivana, que me acolheu por 5 meses em sua casa, devido à pandemia.

Ao pessoal da quarta do gole, Alex, Carol, Quixera e Rhayssa. Sempre dispostos a ajudar e conversar. Vocês são demais!

Ao Alex e Quixera, irmãos presentes durante toda esta jornada. Vocês são pessoas especiais e os tenho em meu coração e pensamento.

Aos amigos de moradia, Felipe, Nelson e Vitor, e em especial ao meu amigo português Carlos, que me ajudou com carinho paterno durante todo o meu período na Holanda.

Aos amigos de Delft, Anna, Alex, Ali, Antonella, Bilal, Carina, Damon, Dianita, Dhavissen, Emiel, Gladys, Jing, João, Job, Michael, Pamela, Pietro, Roberto, Rogelio, Roos, Sara, Simon, Vincenzo, Yana, especialmente ao Asif, Alireza, Iosif, Javier, Monica, Paula, Ranjeev, Rifki, Victor e Zhaoxu, pelas conversas amistosas, seja nos laboratórios e campus da Universidade de Tecnologia de Delft (TUD) ou mesmo nos bares holandeses.

Aos técnicos de laboratório Bel, Elô, Jane, Janja, Jasper, e em especial ao Armand e à Carol, sempre muito atenciosos.

À Universidade de São Paulo (USP), à Escola de Engenharia de São Carlos (EESC) e ao Departamento de Hidráulica e Saneamento (SHS), e todo o corpo técnico e administrativo do departamento e do LPB por fornecerem suporte a todos os pesquisadores.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por conceder as bolsas de estudo para que eu pudesse realizar esta pesquisa no Brasil (165365/2018-8) e na Holanda (201209/2020-9).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro na execução desta pesquisa.

À Fundação Lamminga da TUD, por complementar a bolsa de estudos para a finalização desta pesquisa na Holanda.

Epígrafe

*O sol, manhã de flor e sal
E areia no batom
Farol, saudades no varal
Vermelho, azul, marrom*

*Eu sou cordão umbilical
Pra mim nunca tá bom
E o sol queimando o meu jornal
Minha voz, minha luz, meu som*

*Todo homem precisa de uma mãe
Todo homem precisa de uma mãe*

*O céu, espuma de maçã
Barriga, dois irmãos
O meu cabelo negra lã
Nariz, e rosto, e mãos*

*O mel, a prata, o ouro e a rã
Cabeça e coração
E o céu se abre de manhã
Me abrigo em colo, em chão*

*Todo homem precisa de uma mãe
Todo homem precisa de uma mãe
Todo homem precisa de uma mãe
Todo homem precisa de uma mãe*

Caetano, Zeca e Moreno Veloso

RESUMO

GIGLIO, G. L. **Processos de nitrificação parcial e anammox em efluentes anaeróbios de esgoto sanitário doméstico para regiões de clima quente.** 2023. Tese (Doutorado) em Hidráulica e Saneamento – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

O processo de nitrificação parcial (PN) e oxidação anaeróbia de amônia (Anammox), PNA, em comparação ao processo convencional de nitrificação-desnitrificação, reduz o consumo energético demandado pela aeração, não requer adição de carbono orgânico (CO) na desnitrificação e diminui a produção de lodo, com potencial para melhorar o balanço de massa e energia das estações de tratamento de esgoto (ETEs). O processo PNA é considerado uma tecnologia consolidada para tratar águas residuárias com elevada concentração de nitrogênio, mas sua viabilidade no tratamento de esgoto doméstico ainda representa um desafio. Entretanto, em países de clima tropical e subtropical, como o Brasil, o uso de reatores UASB em ETEs é uma realidade, gerando efluentes anaeróbios com temperatura mesofílica e baixa relação CO/N, aumentando a possibilidade de sucesso de reatores PNA em ETEs. Desta forma, a presente pesquisa teve como principal objetivo investigar o desempenho do processo PNA para remover nitrogênio de esgotos domésticos pré-tratados anaerobiamente em países de clima quente. Inicialmente, três reatores (R1, R2 e R3) foram alimentados com efluente sintético sem matéria orgânica (MO). Para conduzir o processo anammox, R1 e R2 foram alimentados com proporção de nitrito/amônia ($N\text{-NO}_2^-/N\text{-NH}_4^+$) de 1,32. A biomassa granular anammox, enriquecida no reator R1 por 685 dias (232 mgN.L^{-1} e 37°C), apresentava alta eficiência de remoção de nitrogênio ($ERN = 89,3 \pm 3,5\%$) quando foi parcialmente transferida para realizar o *start-up* do R2, submetido às reduções graduais de nitrogênio (232 para 50 mgN.L^{-1}) e da temperatura (37 para 25°C). O R2, submetido à mesma carga a nitrogenada volumétrica aplicada (NLRA) entre $1,0$ a $1,4 \text{ kgN.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, apresentou alta ERN ($87,3 \pm 4,7\%$) em 65 dias de operação. R1 e R2 apresentaram alta abundância relativa de *Candidatus Brocadia* entre $18,9$ e $33,4\%$ e entre $18,9$ e $29,4\%$, respectivamente. No R3, utilizando inóculo de R2, nitrito deixou de ser adicionado para ser produzido por meio da aeração intermitente automatizada (AIA) sem controle de oxigênio dissolvido (OD), condição necessária para o processo PNA. Contudo, devido ao baixo desempenho de bactérias nitritantes, não foi observado o estabelecimento do processo PNA. A adição de nitrito fez com que a ERN atingisse 65% , indício para a presença ativa de biomassa anammox no R3. Utilizando-se de biomassa granular PNA de escala plena, um reator do tipo RBS (R4) foi continuamente operado com AIA (on:off = $15\text{min}:15\text{min}$), com controle de OD entre $0,01$ e $0,20 \text{ mgO}_2.\text{L}^{-1}$, temperatura de 25°C , baixa concentração de amônia ($25 \text{ mgN-NH}_4^+.\text{L}^{-1}$) e inicialmente sem MO. Apesar do R4 ter sido operado com AIA e baixa concentração de OD, observou-se acúmulo de nitrato e a ERN diminuiu gradativamente de $88,1\%$ para $25,1\%$. Com a adição de MO complexa ($100 \text{ mgO}_2.\text{L}^{-1}$), para simular efluentes de reatores UASB, observaram-se elevadas ERN ($93,9 \pm 2,2\%$), eficiência de remoção de MO ($80,5 \pm 7,7\%$) e efluente com concentração de nitrogênio inferior a $2,0 \text{ mgN.L}^{-1}$. Nessa configuração, a atividade anammox específica de $86,5 \pm 8,1 \text{ mgN.gSSV}^{-1}.\text{d}^{-1}$ permaneceu estável durante 170 dias de operação do R4. Os resultados obtidos realçam o potencial de aplicação do processo PNA para efluentes de esgoto doméstico pré-tratados anaerobiamente em países de clima quente.

Palavras-chave: Anammox. Efluente de UASB. Mainstream PNA. Relação C/N.

ABSTRACT

GIGLIO, G. L. **Partial nitrification and anammox processes in anaerobic effluents from domestic sewage for warm regions.** 2023. Tese (Doutorado) em Hidráulica e Saneamento – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

The partial nitrification (PN) and anaerobic ammonia oxidation (Anammox) process, PNA, compared to the conventional nitrification-denitrification (ND) process, decreases the energy consumption required for aeration, does not require organic carbon (OC) addition for denitrification, and decreases sludge production, with the potential to improve the mass and energy balance of sewage treatment plants (STPs). The PNA process is considered a mature technology for treating wastewater with high nitrogen concentration, but its feasibility in domestic sewage treatment still poses a challenge. Nevertheless, in tropical and subtropical countries like Brazil, the use of UASB reactors is a reality, producing anaerobic effluents with low OC/N ratio, augmenting the potential to implement PNA reactors in STP. Therefore, the general aim of this research was to investigate the performance of PNA process for nitrogen removal of anaerobically pretreated domestic sewage in warm countries. Initially, three reactors (R1, R2 and R3) were fed with synthetic effluent without organic matter (OM). To carry out the anammox process, R1 and R2 were fed with a nitrite/ammonia (NO_2^- -N/ NH_4^+ -N) ratio of 1.32. The anammox granular biomass, enriched in R1 for 685 days ($232\text{mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ and 37°C), showed a high nitrogen removal efficiency ($\text{NRE} = 89.3 \pm 3.5\%$) when it was partially transferred to start-up the R2 for adaptation with gradual reductions in nitrogen concentration (232 to $50\text{mgN}\cdot\text{L}^{-1}$) and temperature (37 to 25°C). In the R2, receiving the same nitrogen loading rate of R1, i.e., between 1.0 and $1.4\text{kgN}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$, achieved a high NRE of $87.3 \pm 4.7\%$ in 65 days of operation. R1 and R2 exhibited a high relative abundance of *Candidatus Brocadia* ranging from 18.9 to 33.4% and 18.9 to 29.4%, respectively. In the R3, which was inoculated with biomass from R2, the nitrite addition was discontinued, and automated intermittent aeration (AIA) without controlling the dissolved oxygen (DO) was implemented to observe the PNA process. However, due to the low performance of nitrifying bacteria, the establishment of the PNA process was not observed. The nitrite addition resulted in an NRE of 65%, indicating the presence of active anammox biomass in R3. Utilizing PNA biomass from a full-scale reactor, an SBR-type reactor (R4) was continuously operated with AIA (on:off = 15min:15min), DO control between 0.01 and $0.20\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$, temperature of 25°C , low nitrogen concentration ($25\text{mgN}\cdot\text{NH}_4^+\cdot\text{L}^{-1}$) and initially without OM. Although the R4 was operated with AIA and DO control, nitrate accumulation was observed, and the NRE gradually decreased from 88.1% to 25.1%. With the addition of complex OM ($100\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$), to simulate UASB reactor effluents treating domestic sewage, high NRE ($93.9 \pm 2.2\%$) and OM removal efficiency ($80.5 \pm 7.7\%$) were observed, resulting in an effluent with a low nitrogen concentration of $2.0\text{mgN}\cdot\text{L}^{-1}$. In this configuration, the specific anammox activity of $86.5 \pm 8.1\text{mgN}\cdot\text{gVSS}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ was kept stable during the 170 days of R4 operation. The results highlight the potential application of the PNA process for anaerobically pretreated domestic sewage effluents in warm countries.

Keywords: Anammox. UASB effluent. Mainstream PNA. C/N ratio.

Lista de Figuras

Figura 1 – Compostos nitrogenados com seus respectivos estados de oxidação e interligação das principais rotas do ciclo do nitrogênio.....	22
Figura 2 – Via curta do processo anammox para remoção de nitrogênio.....	27
Figura 3 – Estrutura celular das bactérias anammox.....	29
Figura 4 – Retenção de biomassa anammox (AMX) e bactérias oxidadoras de amônia (AOB) em grânulos e biofilmes para condução do processo PNA.....	32
Figura 5 – Simplificação esquemática da remoção de nitrogênio com aplicação de processos baseados na reação anammox, podendo ser nitrificação parcial – anammox (PNA), desnitrificação parcial – anammox (PDA) e nitrificação e desnitrificação simultânea (SNAD).....	33
Figura 6 – Processos de nitrificação parcial - anammox (PNA) aplicados em estágio duplo e único.....	38
Figura 7 – Fatores inibidores das bactérias oxidadoras de nitrito (NOB).....	44
Figura 8 – Implementação do processo <i>mainstream</i> anammox sendo implementadas em dois períodos distintos de operação denominados de Fase I e Fase II.....	46
Figura 9 – Representação dos Estágios A-B para captura de carbono orgânico (CO) para aplicação do processo <i>mainstream</i> anammox em estações de tratamento de esgoto doméstico.....	47
Figura 10 – Esquema demonstrativo para acoplar reatores anaeróbios aos reatores anammox com tratamento intermediário.....	49
Figura 11 – (A) Reator do tipo batelada inoculado com biomassa granular anammox e meio sintético; (B) <i>Shaker</i> utilizado para promover a agitação e o controle da temperatura.....	70
Figura 12 – (A) Foto do reator R3 durante a aeração (período óxico); (B) representação esquemática da separação trifásica entre sólido (grânulos), líquido (efluente) e gás (ar).....	72
Figura 13 – (A) Representação esquemática do reator batelada sequencial (RBS) ou R4, para realização do processo PNA em estágio único, com atuação do controlador lógico programável (PLC); (B) foto do R4 durante a fase reacional.....	74
Figura 14 – (A) Parâmetros de controle para a operação do sistema SBR-PNA no reator R4; (B) Exemplo do monitoramento da operação do R4 durante a fase anóxica com controle de OD e pH.....	75
Figura 15 – Fotos do dia de coleta do lodo granular de nitrificação parcial - anammox (PNA). (A) Reator PNA, ETE municipal de Olburgen, Holanda; (B) Lodo granular PNA continuamente coletado e reintroduzido no reator PNA; (C) Separação dos grânulos PNA (porosidade de 200 µm) para preservação em geladeira (4°C) e futura inoculação no reator R4 em escala de laboratório.....	77
Figura 16 – Fotografias demonstrando a separação dos flocos da biomassa granular para realização dos testes de atividade específica (<i>ex situ</i>) de nitrificação, nitratação e desnitrificação heterotrófica. (A) Flocos separados da biomassa granular; (B) Reatores em batelada, dentro da câmara termostática e acoplados às respectivas sondas de OD; (C) Diferença visual entre grânulos e flocos antes da calcinação em mufla.....	80
Figura 17 – Fotos exibindo o aspecto da biomassa granular anammox ao longo da operação do reator R1. (A) Dia 1 de operação exibindo todo o reator e (B) a biomassa flotada. (C) Dia 305 de operação exibindo todo o reator e (D) biomassas flotada (foto superior) e sedimentada (foto inferior). (E) Dia 607 de operação (dia de inóculo ao R2).....	83

Figura 18 – Resultados obtidos com o monitoramento do reator R1 (Fase IA). Os gráficos apresentam os seguintes dados: concentrações afluente e efluente de (A) amônia (N-NH ₄ ⁺), (B) nitrito (N-NO ₂ ⁻) e (C) nitrato (N-NO ₃ ⁻), (D) relações estequiométricas comparadas com Strous et al. (1998), (E) medições afluente e efluente de pH, e (F) carga nitrogenada volumétrica aplicada (CNVA) e removida (CNVR), e eficiência total de remoção de nitrogênio (ERN).....	84
Figura 19 – Perfil temporal do consumo de amônia (N-NH ₄ ⁺), nitrito (N-NO ₂ ⁻) e nitrogênio (N-NH ₄ ⁺ + N-NO ₂ ⁻) nos cinco testes de batelada.....	88
Figura 20 – Ensaios em batelada e os respectivos perfis temporais para amônia (N-NH ₄ ⁺), nitrito (N-NO ₂ ⁻), nitrogênio (N-NH ₄ ⁺ + N-NO ₂ ⁻), matéria orgânica (na forma de DQO) e produção final de nitrato (N-NO ₃ ⁻).....	90
Figura 21 – Ensaios em batelada ordenados em função da relação CO/N para avaliação (A) da taxa máxima de remoção de nitrogênio (r máx), e (B) da produção de nitrato e a relação NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺ em comparação ao valor teórico (0,26).....	91
Figura 22 – Concentração de nitrogênio (N, x1), concentração de matéria orgânica (DQO, x2) e a interrelação entre N e DQO para a eficiência total de remoção de nitrogênio (ERN, y1) para nível de significância de 10%. (A) Gráfico de Pareto e (B) correlação entre os valores experimentais e preditos.....	93
Figura 23 – Superfície de resposta para a eficiência de remoção de nitrogênio (ERN).....	94
Figura 24 – Efeito da concentração de nitrogênio (N, x1), concentração de matéria orgânica (DQO, x2) e a interrelação entre N e DQO para a eficiência total de remoção de nitrogênio (ERDQO, y2) para nível de significância de 10%. (A) Gráfico de Pareto e (B) correlação entre os valores experimentais e preditos.....	95
Figura 25 – (A) Foto dos reatores R1 e R2 mantidos a temperatura de 37°C e alimentados com 232 mgN.L ⁻¹ . (B) Foto do reator R2 mantido a temperatura de 25°C e alimentado com 50 mgN.L ⁻¹	99
Figura 26 – Resultados obtidos com o monitoramento do reator R2 (Fase II). Os gráficos apresentam os seguintes dados: concentrações afluente e efluente de (A) amônia (N-NH ₄ ⁺), (B) nitrito (N-NO ₂ ⁻) e (C) nitrato (N-NO ₃ ⁻), (D) relações estequiométricas comparadas com Strous et al. (1998), (E) medições afluente e efluente de pH, e (F) carga nitrogenada volumétrica aplicada (CNVA) e removida (CNVR), e eficiência de remoção de nitrogênio total (ERN).....	100
Figura 27 – Taxa de remoção de nitrogênio do processo anammox (μ_{AMX}) e concentração de biomassa durante a adaptação da biomassa granular anammox no R2.....	102
Figura 28 – Tempo de detenção hidráulico (TDH) e quantidade de TDHs aplicados aos sete estágios para realização da adaptação da biomassa granular anammox na operação do R2.....	103
Figura 29 – Resultados obtidos com o monitoramento do R3 (Fase III). Os gráficos apresentam os seguintes dados: concentrações afluente e efluente de (A) amônia (N-NH ₄ ⁺), (B) nitrito (N-NO ₂ ⁻) e (C) nitrato (N-NO ₃ ⁻), (D) relações estequiométricas comparadas com Strous et al. (1998) e Slijkers et al. (2002), (E) medições afluente e efluente de pH, (F) carga nitrogenada volumétrica aplicada (CNVA) e removida (CNVR), e eficiência de remoção de nitrogênio total (ERN), e (G) eficiências de remoção de amônia (ARR) e nitrito (ERNi), e relação afluente de nitrito/amônio (N-NO ₂ ⁻ /N-NH ₄ ⁺ af).....	105
Figura 30 – (A) Desenho técnico do <i>headspace</i> de separador trifásico do R3 (Fase III); (B) Foto do R3 durante o período de aeração e uso de cone <i>Imhoff</i> para captura de flocos.....	107
Figura 31 – Abundância relativa de gêneros durante a operação dos reatores R1 e R2.....	109
Figura 32 – Resultados obtidos com o monitoramento do reator R4 (Fase IV). Concentrações afluente e efluente de (A) amônia (N-NH ₄ ⁺), (B) nitrito (N-NO ₂ ⁻) e (C) nitrato (N-NO ₃ ⁻), (D) relação estequiométrica N-NO ₃ ⁻ /N-NH ₄ ⁺ , (E) concentração de biomassa no R4 e descartada, (F) demanda química de oxigênio	

(DQO) afluente e efluente, (G) relação matéria orgânica e nitrogênio (CO/N), (H) eficiências de remoção de amônio (ERA), nitrogênio (ERN) e demanda química de oxigênio (ERDQO).	113
Figura 33 – Avaliação do desempenho do sistema PNA-SBR no dia 63 de operação. (A) Perfis temporais de oxigênio dissolvido (OD) e pH, (B) temperatura, (C) concentrações de amônio (N-NH ₄ ⁺), nitrito (N-NO ₂ ⁻), nitrato (N-NO ₃ ⁻) e nitrogênio inorgânico total (NIT), e (D) eficiência de remoção de nitrogênio total (ERN).	116
Figura 34 – Perfis temporais dos testes de atividade de anammox in-situ no R4. (A) Relação nitrito consumido por amônio consumido (N-NO ₂ ⁻ /N-NH ₄ ⁺), (B) relação nitrato produzido por amônio consumido (NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺), (C) concentração da biomassa granular de PNA e (D) taxas máximas específicas de consumo e produção de espécies nitrogenadas (r _{max}) para amônio, nitrito e nitrato.....	121
Figura 35 – Resultados obtidos com os testes específicos de nitrificação (AOB) e nitratação (NOB) para grânulos e flocos. Concentração de biomassa em (A) grânulos e (B) flocos. Taxa máxima (r máx) de consumo de amônia e produção de nitrato para (C) grânulos e (D) flocos. Taxa específica máxima (s máx) de consumo de amônia e produção de nitrato para (E) grânulos e (F) flocos.....	123
Figura 36 – Distribuição do tamanho das partículas (PSD) para (A) grânulos e (B) flocos para realização de teste de atividade <i>ex situ</i> ao R4.	123
Figura 37 – Imagens microscópicas da biomassa granular PNA extraída do R4, demonstrando (A) o formato esférico de um grânulo (B) e região interna suavemente oca de grânulos cortados. (C) Representação da superfície externa e região oca dos grânulos da imagem microscópica B.	124

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Espécies reativas de nitrogênio e seus efeitos.....	23
Tabela 2 – Processos Nitritação, Nitratação e Comammox com respectivas reações e energia livre de Gibbs. ...	25
Tabela 3 – Reações e energia livre de Gibbs dos processos desnitratação e desnitrificação.	26
Tabela 4 – Tecnologias baseadas no processo anammox.	35
Tabela 5 – Comparação entre o processo nitrificação parcial-anammox (PNA) e o sistema convencional de nitrificação-desnitrificação (ND) na remoção de 1,0 kg de nitrogênio.....	37
Tabela 6 – Efeitos da matéria orgânica na remoção autotrófica de nitrogênio.....	52
Tabela 7 – Hipóteses e objetivos da presente pesquisa.	64
Tabela 8 – Principais características das fases operacionais para condução desta pesquisa.....	65
Tabela 9 – Meio sintético para alimentar R1 e obter 100 mgN-NH ₄ ⁺ .L ⁻¹ e 132 mgN-NO ₂ ⁻ .L ⁻¹	67
Tabela 10 – Planejamento experimental DCCR com 2 fatores (2 ^k) para execução dos ensaios em batelada.....	69
Tabela 11 – Estágios aplicados à Fase II para adaptação da biomassa granular anammox.	71
Tabela 12 – Composição do segundo meio sintético (F ₂) de forma a simular os efluentes de esgoto doméstico pré-tratados anaerobiamente na ETE Monjolinho, São Carlos, SP, Brasil.	77
Tabela 13 – Eficiências médias de remoção de nitrogênio (ERN) e de matéria orgânica (ERDQO) para os 11 ensaios em batelada.	92
Tabela 14 – Teste de ANOVA para avaliação do modelo obtido para ERN (y1).	94
Tabela 15 – Teste de ANOVA para avaliação do modelo obtido para ERDQO (y2).....	95
Tabela 16 – Coeficiente de correlação (R ²) para comparação cinética dos resultados obtidos com o consumo de amônio e nitrito para os modelos de Andrews, Edwards e Monod.....	96
Tabela 17 – Parâmetros cinéticos dos ensaios em batelada obtidos para o modelo de Monod.	98
Tabela 18 - Conclusões com base nas hipóteses e nos objetivos.....	125

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Descrição em português	Descrição em inglês
AGV	Ácidos graxos voláteis	<i>Volatile fatty acids</i>
AL	Amônia livre	<i>Free ammonia</i>
AMX	Bactérias anammox	<i>Anammox bacteria</i>
Anammox	Oxidação anaeróbia de amônia	<i>Anaerobic ammonium oxidation</i>
ANL	Ácido nítrico livre	<i>Free nitrous acid</i>
AOA	Arqueas oxidadoras de amônia	<i>Aerobic-oxidizing archaea</i>
AOB	Bactérias oxidadoras de amônia	<i>Aerobic-oxidizing bacteria</i>
CNVA	Carga nitrogenada volumétrica aplicada	<i>Nitrogen loading rate</i>
CNVR	Carga nitrogenada volumétrica removida	<i>Nitrogen removal rate</i>
CO	Carbono orgânico	<i>Organic carbon</i>
Comammox	Oxidação completa de amônia	<i>Complete ammonia oxidation</i>
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio	<i>Biochemical oxygen demand</i>
DQO	Demanda química de oxigênio	<i>Chemical oxygen demand</i>
DQOlb	Demanda química de oxigênio lentamente biodegradável	<i>Slowly biodegradable chemical oxygen demand</i>
DQOrb	Demanda química de oxigênio rapidamente biodegradável	<i>Readily biodegradable chemical oxygen demand</i>
EESC	Escola de Engenharia de São Carlos	<i>São Carlos School of Engineering</i>
EPS	Substâncias poliméricas extracelulares	<i>Extracellular polymeric substances</i>
ERN	Eficiência de remoção de nitrogênio	<i>Nitrogen removal efficiency</i>
ETE	Estação de tratamento de esgoto	<i>Sewage treatment plant</i>
GLR	Reator <i>gas-lift</i>	<i>Gas-lift reactor</i>
HB	Bactérias heterotróficas	<i>Heterotrophic bacteria</i>
IFAS	Lodo ativado com biofilme integrado	<i>Integrated fixed film activated sludge</i>
LPB	Laboratório de Processos Biológicos	<i>Laboratory of Biological Processes</i>
MBBR	Reator biológico de leito móvel	<i>Moving bed biofilm reactor</i>
MBfR	Reator de biofilme de membrana	<i>Membrane biofilm reactor</i>
MO	Matéria orgânica	<i>Organic matter</i>
Nar	Nitrato redutase	<i>Nitrate reductase</i>
ND	Nitrificação - Denitrificação	<i>Nitrification - Denitrification</i>
NDS	Nitrificação e desnitrificação simultânea	<i>Simultaneous nitrification and denitrification</i>
Nir	Nitrito redutase	<i>Nitrite reductase</i>
NOB	Bactérias oxidadoras de nitrito	<i>Nitrite-oxidizing bacteria</i>
Nor	Óxido nítrico redutase	<i>Nitric oxide reductase</i>
NTK	Nitrogênio Kjeldahl total	<i>Total Kjeldahl nitrogen</i>
OD	Oxigênio dissolvido	<i>Dissolved oxygen</i>
PDA	Denitrificação parcial - anammox	<i>Partial denitrification - anammox</i>
pH	Potencial hidrogeniônico	<i>Hydrogenionic potential</i>
PLC	Controle de programação lógica	<i>Programmable logic controller</i>
PN	Nitritação parcial	<i>Partial nitritation</i>
PNA	Nitritação parcial - anammox	<i>Partial nitritation - anammox</i>

(continua)

(continuação)

RBS	Reator de batelada sequencial	<i>Sequential batch reactor</i>
RDNA	Redução dissimilatória de N-nitrato para N-amoniaco	<i>Dissimilatory nitrate reduction to ammonium</i>
SNAD	Nitrificação parcial, anammox e desnitrificação simultâneos	<i>Simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification</i>
SSV	Sólidos suspensos voláteis	<i>Volatile suspended solids</i>
TDH	Tempo de detenção hidráulico	<i>Hydraulic retention time</i>
TRS	Tempo de retenção de sólidos	<i>Solids retention time</i>

Sumário

1	Introdução	19
2	Revisão da Literatura	21
2.1	Ciclo do nitrogênio e os compostos nitrogenados	21
2.2	Remoção biológica de nitrogênio em ETEs	23
2.2.1	<i>Nitrificação autotrófica (nitritação e nitratação)</i>	24
2.2.2	<i>Desnitrificação heterotrófica (desnitratação e desnitrificação)</i>	25
2.2.3	<i>Oxidação anaeróbia de amônia (anammox)</i>	26
2.3	Tecnologias baseadas no processo anammox	31
2.3.1	<i>Nitritação parcial - anammox (PNA)</i>	37
2.3.2	<i>Desnitrificação parcial - anammox (PDA)</i>	40
2.4	Sistemas PNA	42
2.4.1	<i>Sidestream PNA</i>	42
2.4.2	<i>Mainstream PNA</i>	43
2.5	<i>Mainstream PNA para esgoto doméstico pré-tratado anaerobiamente</i>	48
2.5.1	<i>Digestão anaeróbia como remoção de CO e características dos efluentes anaeróbios</i>	48
2.5.2	<i>Concentrações de N e DQO, e a relação CO/N</i>	50
2.5.3	<i>Composição de MO (DQOrb e DQOlb)</i>	53
2.5.4	<i>Temperatura, pH e alcalinidade</i>	54
2.5.5	<i>Concentração de OD e tempo de aeração</i>	57
2.5.6	<i>Amônia livre (AL) e ácido nitroso livre (ANL)</i>	58
2.5.7	<i>Metano dissolvido</i>	59
2.5.8	<i>Sulfeto</i>	60
2.5.9	<i>Fosfato</i>	61
2.5.10	<i>Salinidade</i>	61
2.5.11	<i>Outros interferentes</i>	62
2.6	Aspectos técnico-operacionais para otimização do processo <i>mainstream PNA</i>	62
3	Hipóteses e Objetivos	64
4	Material e Métodos	65
4.1	Fase I	65
4.1.1	<i>Fase I_A – Produção de biomassa granular anammox ativa</i>	66
4.1.2	<i>Fase I_B – Ensaios em batelada: efeito conjunto da relação CO/N e da baixa concentração de N</i>	68
4.2	Fase II – Adaptação da biomassa granular anammox enriquecida às condições <i>mainstream</i>	71
4.3	Fase III – Utilização de biomassa granular anammox adaptada para realização do processo <i>mainstream PNA</i>	72
4.4	Fase IV – Processo <i>mainstream PNA</i> sem e com adição de matéria orgânica complexa	73
4.4.1	<i>Testes de atividade específica do processo anammox (in situ)</i>	78

4.4.2 Testes de atividade específica dos processos de nitrificação (AOB) e nitratação (NOB) (<i>ex situ</i>).....	79
4.5 Métodos analíticos.....	80
4.6 Análises microbiológicas.....	81
5 Resultados e Discussão	82
5.1 Fase IA – Enriquecimento de biomassa granular anammox.....	82
5.2 Fase IB – Processo anammox e as relações CO/N em testes de curta duração	87
5.3 Fase II – Adaptação da biomassa granular anammox para condições mainstream	99
5.4 Fase III – Utilização de biomassa granular anammox para condução do processo PNA	104
5.5 Análise microbiológica – Fases IA, II e III	108
5.6 Fase IV – Efeito da adição de matéria orgânica complexa no processo <i>mainstream</i> PNA	111
5.6.1 Análise da AIA no processo <i>mainstream</i> PNA sem MO.....	115
5.6.2 Efeito da MO complexa no processo <i>mainstream</i> PNA	118
5.6.3 Testes de atividade específica do processo anammox (<i>in situ</i>)	120
5.6.4 Testes de atividade específica para AOB e NOB (<i>ex situ</i>).....	122
6 Conclusões	125
7 Recomendações	127
Referências	128
Apêndice A	141

1 Introdução

O aporte excessivo de nitrogênio em corpos hídricos tem comprometido a qualidade da água disponível para os usos doméstico, industrial, agrícola e recreativo (CAREY; MIGLIACCIO, 2009). A remoção biológica de nitrogênio representa uma das principais formas de evitar a degradação dos corpos receptores e pode ser realizada em estações de tratamento de esgoto (ETEs) por meio do processo convencional de nitrificação-desnitrificação (ND), aplicado em unidades subsequentes (ARDERN & LOCKETT, 1914). Entretanto, a ND detém aspectos negativos que são considerados insustentáveis (CHEN et al., 2019a). Na etapa de nitrificação, por exemplo, a aeração demanda cerca de $0,45 \text{ kWh.m}^{-3}$, o que pode corresponder a cerca de 22% da energia elétrica utilizada na ETE (WAN et al., 2016). Além disso, na etapa de desnitrificação, pode ser requerida a adição de carbono externo biodegradável (HOW et al., 2020), por exemplo, 1,90 a 3,30 kg de metanol para cada 1,00 kg de nitrato a ser reduzido (PENG et al., 2007). Além disso, o excesso de lodo produzido devido à elevada taxa de crescimento de microrganismos heterotróficos desnitrificantes requer destino e tratamento específicos como a secagem e transporte para aterros sanitários (MCCARTY et al., 2011). Tais aspectos representam investimentos financeiros significativos que, muitas vezes, inviabilizam a remoção de nitrogênio em ETEs.

O processo de oxidação anaeróbia de amônia ou anammox (*anaerobic ammonium oxidation*), descoberto há pouco mais de 30 anos (MULDER et al., 1995), é uma alternativa sustentável que detém potencial para equilibrar os custos dispendiosos intrínsecos às ETEs (CAO et al., 2017). As vantagens do processo anammox sob a ND são notáveis, podendo-se destacar as reduções de 63% na aeração, visto que não é preciso que a nitrificação ocorra por completo, 100% no consumo de carbono orgânico (CO), por se tratar de um processo autotrófico, e 90% na produção de lodo (CAO et al., 2017), uma vez que as bactérias anammox possuem lento crescimento em relação aos microrganismos nitrificantes (LAURENI et al., 2019) e heterotróficos desnitrificantes (CAO et al., 2021).

A estabilidade do processo anammox está diretamente atrelada a outros bioprocessos que podem ser colaborativos ou concorrentes. As bactérias anammox (AMX) dispensam o uso de oxigênio dissolvido (OD) e de matéria orgânica (MO) para consumir, de forma concomitante, amônio (NH_4^+) e nitrito (NO_2^-), produzindo gás dinitrogênio (N_2) e nitrato (NO_3^-) (STROUS et al., 1998). Como NH_4^+ corresponde à fração nitrogenada majoritária em águas residuárias, a falta de NO_2^- é um obstáculo para a remoção de nitrogênio via processo

anammox. Sendo assim, é imprescindível a disponibilidade de NO_2^- para atuar como receptor de elétrons na oxidação autotrófica de NH_4^+ . Além disso, a produção equilibrada de $\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$ deve ser próxima de 1,32 (STROUS et al., 1998), podendo ser realizada via nitrificação parcial (*partial nitrification*, PN) na qual as bactérias oxidadoras de amônia (BOA), em meio aeróbio, oxidam parcialmente NH_4^+ a NO_2^- . Contudo, as bactérias oxidadoras de nitrito (BON), também em meio aeróbio, podem oxidar NO_2^- a NO_3^- , fazendo com que ocorra a nitrificação completa ($\text{NH}_4^+ \xrightarrow{\text{BOA}} \text{NO}_2^- \xrightarrow{\text{BON}} \text{NO}_3^-$) ao invés da PN, o que resulta no desequilíbrio da relação $\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$. Desta forma, a remoção de nitrogênio está diretamente vinculada à estabilidade do processo de nitrificação parcial-anammox (*partial nitrification-anammox*, PNA), deteriorada, principalmente pela dificuldade de se inibir a atividade de NOB (CAO et al., 2017; HOEKSTRA, 2017; LACKNER et al., 2014; QIU et al., 2021).

Recentemente, identificou-se um total de 142 ETEs que aplicam, com sucesso, unidades baseadas no processo anammox (LIU et al., 2020). Nestas estações, os reatores anammox recebem efluentes ricos em nitrogênio (~ 2.000 a $4.000 \text{ mg.N-NH}_4^+.\text{L}^{-1}$, YAMAMOTO et al., 2008), pobres em carbono orgânico ($\text{CO/N} \sim 0,5$, JENNI et al., 2014), e em temperaturas elevadas (37°C , ALI; OKABE, 2015). Estas características estão presentes em fluxos laterais (*sidestream*) de ETEs e favorecem a aplicação do processo denominado *sidestream* anammox (KUMWIMBA et al., 2020).

No fluxo principal (*mainstream*), as barreiras mais relevantes para implementação de sistemas *mainstream* PNA estão relacionadas à elevada relação CO/N (MA et al., 2016), nitrificação instável (AGRAWAL et al., 2018) e baixas temperaturas (LOTTI et al., 2015). A oscilação sazonal destas características, em especial no que diz respeito à redução da temperatura em países de clima frio, faz com que a aplicação do processo *mainstream* anammox em escala plena ainda seja um desafio (CAO et al., 2017). Até o presente momento, apenas 3 ETEs, localizadas na Áustria, Singapura e China, reportaram a operação estável de reatores *mainstream* anammox nestas condições (WETT et al., 2015; YESHI et al., 2016; YUAN et al., 2021).

Em países de clima quente, como Brasil, Colômbia e Índia, as temperaturas mais elevadas facilitaram a ampla adoção dos reatores de manta de lodo e fluxo ascendente (*up-flow anaerobic sludge blanket*, UASB) para tratamento de esgoto sanitário (VON SPERLING; CHERNICHARO, 2005). Em 2012, os reatores UASB correspondiam a 493 (17%) das ETEs latino-americanas (NOYOLA et al., 2012). No Brasil, os reatores UASB compreendem em 37% das ETEs em operação (ANA, 2020), demonstrando que essa tecnologia está consolidada, em

especial em países de clima quente (VAN LIER et al., 2010). Os reatores UASB tratando esgotos domésticos em países de clima quente geram efluentes anaeróbios pobres em CO (100 – 200 mgO₂.L⁻¹), com temperatura mesofílica (~ 25°C), pH neutro (6,8 – 7,5), reduzida concentração de sólidos (50 – 100 mgSST.L⁻¹) e praticamente não alteram a parcela de nitrogênio amoniacal (20 – 70 mgN-NH₄⁺.L⁻¹) (VON SPERLING; CHERNICHARO, 2005; AZEVEDO et al., 2021). Estas características são indicativos de que a adoção de sistemas *mainstream* UASB-PNA é promissora para as regiões tropicais e subtropicais.

A complexidade dos efluentes anaeróbios deve ser levada em consideração para a adoção do sistema *mainstream* UASB-PNA. Os efluentes anaeróbios apresentam uma parcela de MO rapidamente biodegradável (DQOrb), geralmente composta por ácidos graxos voláteis (AGVs) de fácil degradação, e uma parcela de MO lentamente biodegradável (DQOlB), composta por materiais particulados de difícil degradação (SHENG et al., 2020). A preocupação acerca da composição da MO refere-se à possibilidade de HB competirem com AMX por NO₂⁻, prejudicando a estabilidade do processo *mainstream* PNA. Em contrapartida, a maior disponibilidade de MO promove a desnitrificação de NO₃⁻, subproduto obrigatório do processo PNA, podendo aumentar a eficiência de remoção de nitrogênio. Além do mais, a MO aumenta a competição entre HB aeróbias e NOB, o que pode favorecer a nitrificação e conseqüentemente o processo PNA (AGRAWAL et al., 2018). Temperaturas mais elevadas (30°C) também são benéficas, pois podem aumentar em 2,5 vezes a hidrólise do material particulado em relação às temperaturas baixas (20°C), fornecendo DQOlB (HOW et al., 2019).

Diante deste contexto, esta tese de doutorado tem como principal objetivo avaliar quais os efeitos da matéria orgânica (MO) complexa composta por DQOlB e DQOrb no desempenho do processo *mainstream* PNA, visando tratar esgotos sanitários provenientes de reatores anaeróbios em países de clima quente.

2 Revisão da Literatura

2.1 Ciclo do nitrogênio e os compostos nitrogenados

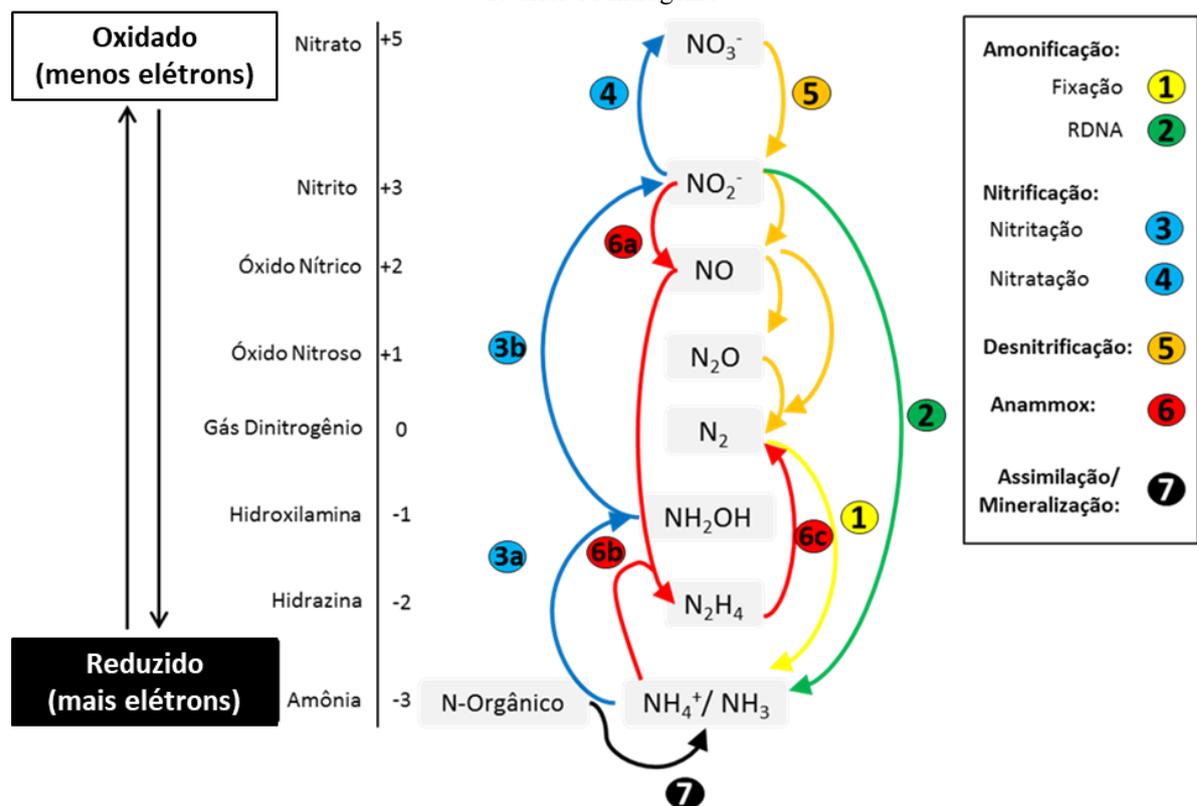
Nitrogênio é um dos elementos químicos mais importantes na Terra. O nitrogênio compõe as bases nitrogenadas do ácido desoxirribonucleico (DNA), é o segundo elemento mais presente nas células, representa 78,1% do ar atmosférico na forma de gás dinitrogênio (N₂), e é a principal fonte de nutriente para diversos animais e plantas (MADIGAN et al., 2015; KUYPERS et al., 2018). Sem nitrogênio, a produção agrícola seria reduzida drasticamente e

50% da humanidade poderia sofrer com escassez alimentar, uma vez que a fabricação de fertilizantes utiliza compostos nitrogenados (ERISMAN et al., 2008)

Embora o nitrogênio seja essencial à vida, as ações antrópicas têm alterado significativamente seu ciclo (STEVENS, 2019), afetando a qualidade do solo, da atmosfera e dos recursos hídricos (AUSTIN et al., 2013). As principais causas deste desequilíbrio são o crescimento industrial acelerado, o mal uso de fertilizantes nas práticas agrícolas, a queima de combustíveis fósseis e o aumento populacional vertiginoso (CANFIELD et al., 2010).

Na natureza, os compostos nitrogenados podem ser encontrados em até nove estados de oxidação (-3 ↔ +5), e as diferentes rotas bioquímicas, quando interligadas, formam o ciclo do nitrogênio (Figura 1).

Figura 1 – Compostos nitrogenados com seus respectivos estados de oxidação e interligação das principais rotas do ciclo do nitrogênio.



Notas – RDNA: redução dissimilatória de nitrato à amônia; Anammox: oxidação anaeróbia de amônia.
 Fonte - Adaptado de Kuypers et al. (2018) e Stein; Klotz (2016).

Apesar da abundância de N_2 na atmosfera, ele é quimicamente estável e praticamente inacessível à grande maioria dos organismos (MADIGAN et al., 2015; BERNHARD, 2010). Contudo, na amonificação (rotas 1 e 2, Figura 1) e na mineralização ou assimilação (rota 7, Figura 1) o íon amônio (NH_4^+) é formado, viabilizando o acesso de nitrogênio às bactérias,

arqueias e fungos, microrganismos detentores de enzimas específicas que promovem, sob condições adequadas, o transporte de elétrons e reduzem ou oxidam as espécies nitrogenadas (KUYPERS et al., 2018; BERNHARD, 2010). As formas nitrogenadas, a depender da concentração e do tempo de exposição, podem ser deletérias ao meio ambiente, incluindo os próprios microrganismos e o homem (Tabela 1).

Tabela 1 – Espécies reativas de nitrogênio e seus efeitos.

Estado de oxidação	Espécie nitrogenada	Fórmula química	Toxicidade aos microrganismos	Impacto ao homem ou ao meio ambiente
+5	Nitrato	NO_3^-	Precursor do tóxico ácido nítrico (HNO_3).	Depleção de OD (eutrofização); Atribui sabor e odor à água; Causa a síndrome do bebê azul (metahemoglobinemia).
+4	Dióxido de nitrogênio	$\text{NO}_2(\text{g})$	Gás tóxico, proveniente da oxidação de HNO_3 .	-
+3	Nitrito	NO_2^-	Tóxico. Liga-se a átomos de ferro, como a hemoglobina.	Eutrofização; Atribui sabor e odor à água; Metahemoglobinemia; Carcinogênico e mutagênico.
+2	Óxido nítrico	$\text{NO}(\text{g})$	Tóxico e altamente reativo.	Gás de efeito estufa e destruidor da camada de ozônio.
+1	Óxido nitroso	N_2O	Não tóxico.	Gás de efeito estufa e destruidor da camada de ozônio.
0	Gás dinitrogênio	$\text{N}_2(\text{g})$	Não tóxico e quimicamente inerte.	Não tóxico e quimicamente inerte.
-1	Hidroxilamina	NH_2OH	Mutagênico.	-
-2	Hidrazina	N_2H_4	Altamente tóxico.	-
-3	Amônia livre	NH_3	Altamente tóxico.	Tóxico aos peixes e outros organismos.
	Amônio	NH_4^+	Não tóxico.	Precursor da eutrofização.

Fontes - Adaptado de Simon; Klotz (2013) e Bortoli et al. (2019).

2.2 Remoção biológica de nitrogênio em ETEs

Diante da comprovação dos riscos associados aos diferentes compostos nitrogenados, as estações de tratamento de esgoto (ETEs) têm papel fundamental neste contexto, pois podem minimizar, de forma significativa, o aporte de nitrogênio em corpos hídricos e reduzir os impactos causados ao meio ambiente e ao homem (VON SPERLING, 2007). As ETEs podem, inclusive, promover a recuperação dos compostos de nitrogênio e reintroduzi-los no mercado financeiro na forma de produtos valiosos, como fertilizantes e combustíveis (DENG et al.,

2021). Entretanto, a recuperação de nitrogênio em ETEs está atrelada a viabilidade técnico-financeira, à redução da parcela carbonácea, baixa relação C/N, elevado pH, redução de sólidos, e concentração de nitrogênio, em geral, superior a 500 mgN.L⁻¹ (DENG et al., 2021).

Tradicionalmente, o nitrogênio é removido em ETEs pela via biológica, e ocorre por meio dos processos de nitrificação autotrófica e desnitrificação heterotrófica (ND), em unidades subsequentes. A nitrificação autotrófica ocorre em duas etapas sequenciais denominadas de nitrificação e nitratação. A desnitrificação heterotrófica também ocorre em duas etapas denominadas de desnitratação e desnitrificação. As especificidades de cada um destes processos estão apresentadas nos tópicos seguintes.

2.2.1 Nitrificação autotrófica (nitrificação e nitratação)

A nitrificação é um processo quimioautotrófico aeróbio que ocorre em duas etapas denominadas de nitrificação e nitratação. Como os nomes sugerem, a nitrificação corresponde a formação de nitrito (NO₂⁻), enquanto a nitratação corresponde a formação de nitrato (NO₃⁻). Na nitrificação, as bactérias oxidadoras de amônio (AOB) ou as arqueias oxidadoras de amônio (AOA), consomem oxigênio para oxidar íon amônio a hidroxilamina e a nitrito (NH₄⁺ $\xrightarrow{O_2}$ NH₂OH $\xrightarrow{O_2}$ NO₂⁻). Na nitratação, as bactérias oxidadoras de nitrito (NOB), que também são consumidoras de oxigênio, oxidam nitrito a nitrato (NO₂⁻ $\xrightarrow{O_2}$ NO₃⁻) (STEIN & KLOTZ, 2016).

Os microrganismos do gênero *Nitrosomonas* (AOB) e *Nitrobacter* (NOB) são responsáveis por realizar a nitrificação e nitratação, respectivamente. As AOA como *Nitrosopumilus maritimus*, pertencentes ao filo *Thaumarchaeota* (KUYPERS et al., 2018), também são microrganismos nitrificantes, mas em ETEs, a abundância de AOA é relativamente menor do que AOB, e contribuem menos à oxidação de amônia (GAO et al., 2013). Embora a nitrificação ocorra quase que exclusivamente por vias autotróficas, bactérias heterotróficas (HB), como *Arlhrobacer* e *Thiosfera*, também são capazes de realizar a nitrificação, mas com uso de carbono orgânico (MADIGAN et al., 2015).

A Tabela 2 exibe as reações simplificadas dos processos envolvidos na nitrificação. Em 2015, descobriu-se que os microrganismos do gênero *Nitrospira* podem realizar, em uma só etapa, a oxidação completa de amônia ou comammox (*complete ammonia oxidation*) (VAN KESSEL et al., 2015). O descobrimento do processo comammox refuta o dogma de que a nitrificação deva ocorrer em duas etapas (KUYPERS et al., 2018), mas os estudos sobre a

interação das bactérias comammox em sistema de tratamento de águas residuárias ainda são insipientes (YANG et al., 2023).

Tabela 2 – Processos Nitritaço, Nitrataço e Comammox com respectivas reações e energia livre de Gibbs.

Processo	Reação	Energia de Gibbs (kJ.mol ⁻¹)
Nitritaço	$\text{NH}_4^+ + 1,5 \text{ O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O} + 2 \text{ H}^+$	-274,7
Nitrataço	$\text{NO}_2^- + 0,5 \text{ O}_2 \rightarrow \text{NO}_3^-$	-74,1
Nitrificação/Comammox	$\text{NH}_4^+ + 2,0 \text{ O}_2 \rightarrow \text{NO}_3^- + \text{H}_2\text{O} + 2 \text{ H}^+$	-348,9

Fonte - Adaptado de Van Kessel et al. (2015).

O processo de nitrificação é influenciado por diversos parâmetros, tais como DO, temperatura, pH e ácido nitroso (HNO) (ZOPPAS et al., 2016). A oxigenação insuficiente, por exemplo, pode fazer com que AOB produzam óxidos de nitrogênio (CERVANTES-CARRILLO et al., 2000), como o óxido nitroso (N₂O), gás de efeito estufa e destruidor da camada de ozônio com potencial de poluição 300 vezes superior ao CO₂ (MADIGAN et al., 2015; IPCC, 2014).

A aeração, requerida na etapa de nitrificação, pode demandar, em média, 22% do consumo da energia de ETEs (WAN et al., 2016). Nos Estados Unidos, por exemplo, cerca de 3% da energia elétrica de todo o país é consumida por ETEs, onde a aeração contribui significativamente para este consumo (GAO et al., 2014). Apesar do consumo energético, a nitrificação por si só, não remove nitrogênio do meio aquoso, uma vez que o NH₄⁺ é convertido a NO₃⁻. Desta forma, após a realização da nitrificação, a remoção de nitrogênio do meio líquido depende do processo de desnitrificação heterotrófica.

2.2.2 Desnitrificação heterotrófica (desnitrataço e desnitrítaço)

A desnitrificação é realizada por bactérias heterotróficas (HB) que consomem carbono orgânico (CO) e reduzem nitrato a gás dinitrogênio (N₂) em meio anóxico (NO₃⁻ → NO₂⁻ → NO → N₂O → N₂) (MADIGAN et al., 2015). A desnitrataço (redução de nitrato a nitrito) ocorre em apenas uma reação química, enquanto a desnitrítaço (redução de nitrito a gás dinitrogênio) ocorre em três reações químicas (Tabela 3).

Tabela 3 – Reações e energia livre de Gibbs dos processos desnitrificação e desnitrificação.

Processo	Reação	Energia de Gibbs (kJ.mol ⁻¹)
Desnitrificação	$\text{NO}_3^- + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^- \rightarrow 2\text{NO}_2^- + 2\text{H}_2\text{O}$	-163,2
Desnitrificação	$2\text{NO}_2^- + 4\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow 2\text{NO} + 2\text{H}_2\text{O}$	-147,0
	$2\text{NO} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{N}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$	-306,1
	$\text{N}_2\text{O} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{N}_2 + \text{H}_2\text{O}$	-341,4

Fonte - Adaptado de Metcalf e Eddy (2013) e Thauer et al. (1977).

Os principais microrganismos desnitrificantes pertencem ao filo *Proteobacteria* e aos gêneros *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Paracoccus* e *Thiobacillus*. Assim como na etapa de nitrificação autotrófica, as condições ambientais e operacionais podem limitar a desnitrificação. A presença de OD, por exemplo, faz com que as bactérias desnitrificantes utilizem oxigênio como aceptores de elétrons ao invés de NO_2^- e NO_3^- , limitando a desnitrificação (ZOPPAS et al., 2016). A relação carbono orgânico/nitrogênio (CO/N) também influencia diretamente na desnitrificação (ZOPPAS et al., 2016). Segundo Helmer-Madhok et al. (2002), $\text{CO/N} > 4,0$ favorece a desnitrificação, enquanto $\text{CO/N} < 2,5$ fazem com que a desnitrificação seja insatisfatória. A desnitrificação incompleta pode resultar na emissão do óxido nítrico (NO) e do óxido nitroso (N_2O), gases de efeito estufa danosos a camada atmosférica (MADIGAN et al., 2015).

A desnitrificação pode requerer a adição de fonte externa de carbono, como metanol, etanol ou acetato, aumentando significativamente os custos de tratamento das águas residuárias (PENG et al., 2007). Caso a adição de fonte de carbono externa seja necessária, a desnitrificação de 1,0 kg de nitrato pode demandar 1,9 a 3,3 kg de metanol (PENG et al., 2007) ou 3,5 kg de acetato (3,7 kg DQO) (MATĚJŮ et al., 1992). O lodo gerado de forma excessiva na desnitrificação requer unidade de tratamento de resíduos sólidos e aterramento adequado do lodo desidratado, o que pode representar cerca de 25 a 65% do custo total de operação da ETE (WAN et al., 2016). Reduzir os custos operacionais no tratamento de esgotos é almejado pelas companhias de saneamento, e o processo anammox é uma alternativa para tornar as ETES mais sustentáveis e alcançar a autarquia energética (LOTTI et al., 2014a).

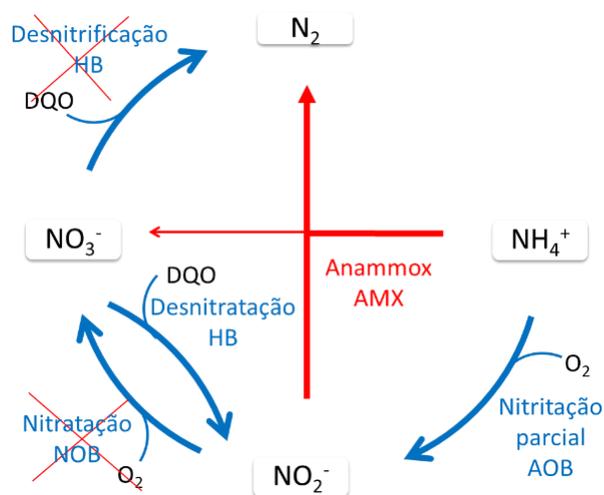
2.2.3 Oxidação anaeróbia de amônia (anammox)

No ano de 1995, a descoberta do processo de oxidação anaeróbia da amônia ou simplesmente anammox (*anaerobic ammonium oxidation*) alterou o ciclo biogeoquímico do nitrogênio (MULDER et al., 1995) despertando o interesse da comunidade científica e fazendo com que novas rotas do ciclo do nitrogênio, até então inconcebíveis, passassem a ser reavaliadas

(KARTAL et al., 2010; PEETERS & VAN NIFTRIK, 2019). Até 2020, 3174 trabalhos científicos envolvendo a reação anammox haviam sido publicados, e o tema é uma tendência no mundo científico (KUMWIMBA et al., 2020). Para se ter uma ideia da sua relevância, estima-se que o processo anammox seja responsável por pelo menos 50% da produção de N_2 em ambientes marinhos (KARTAL et al., 2010).

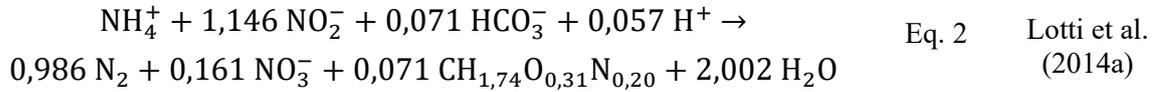
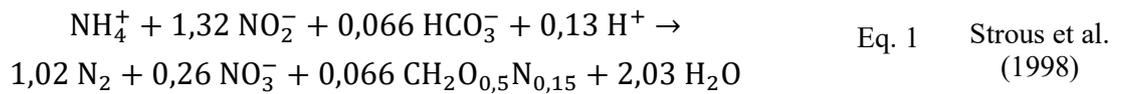
As bactérias anammox (AMX) são microrganismos anaeróbios quimiolitotróficos, ou seja, dispensam o uso de oxigênio (O_2) e carbono orgânico (CO) (KUENEN, 2008; STROUS et al., 1998), transformando dióxido de carbono (CO_2) em biomassa, o que impacta na diminuição da emissão de gases de efeito estufa (SHENG et al., 2020). Sob a ótica do ciclo do nitrogênio, o processo anammox, em relação à ND, encurta a conversão de NH_4^+ a N_2 (Figura 2), pois de forma concomitante oxida NH_4^+ e reduz NO_2^- , gerando N_2 e uma parcela de NO_3^- (KARTAL et al., 2010).

Figura 2 – Via curta do processo anammox para remoção de nitrogênio.



Notas - DQO: demanda química de oxigênio; AOB: bactérias oxidadoras de amônia; NOB: bactérias oxidadoras de nitrito; HB: bactérias heterotróficas; AMX: bactérias anammox. Fonte - Adaptado de Driessen et al. (2012).

Mesmo que a cinética e a estequiometria do processo anammox ainda estejam sob investigação, a Eq. 1, primeiramente descrita por Strous et al. (1998), e a Eq. 2, posteriormente proposta por Lotti et al. (2014a), são as principais referências literárias das reações estequiométricas do processo anammox. Contudo, vale ressaltar que os coeficientes estequiométricos do processo anammox podem alterar conforme a biomassa utilizada, unidade operacional, cargas nitrogenadas aplicadas, tipo de água residuária a ser tratada e condições operacionais específicas ao tratamento (GUO et al., 2020).



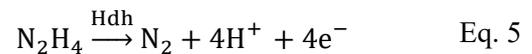
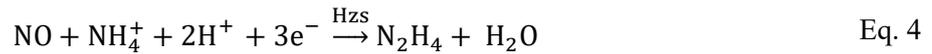
Comparando-se as Eq. 1 e Eq. 2, pode-se notar que cada mol de NH_4^+ necessita de 1,32 ou 1,14 mol de NO_2^- como acceptor de elétrons, e produz 0,26 ou 0,16 mol de NO_3^- , respectivamente. Portanto, a relação $\text{NH}_4^+_{\text{consumido}}:\text{NO}_2^-_{\text{consumido}}:\text{NO}_3^-_{\text{produzido}}$ pode ser de 1,00:1,32:0,26 conforme Strous et al. (1998) e 1,00:1,14:0,16 conforme Lotti et al. (2014a).

Apesar das AMX dispensarem o uso de OD e de MO, ambos são parâmetros em ETEs fundamentais à remoção biológica de nitrogênio via anammox. Em primeiro lugar, OD é utilizado por AOB ou AOA para oxidar, de forma parcial, NH_4^+ a NO_2^- (nitritação parcial ou PN), uma vez que as AMX necessitam de NO_2^- como acceptor de elétrons para oxidar NH_4^+ (Eq. 1 e Eq. 2). Em segundo lugar, MO é imprescindível para que HB possam reduzir NO_3^- via desnitrificação (NO_3^- a N_2) ou desnitratação (NO_3^- a NO_2^-), sendo que NO_3^- é obrigatoriamente produto da reação anammox (Eq. 1 e Eq. 2). A desnitratação, por sinal, é benéfica tanto ao processo anammox, pois disponibiliza NO_2^- à atuação das AMX, como ao tratamento de forma geral, pois reduz a necessidade de suplementação de fonte de carbono externa (CAO et al., 2021).

Apesar do avanço da biologia molecular, ainda não foi possível isolar as AMX e cultivá-las por meio de técnicas convencionais, como o cultivo em ágar. Desta maneira, a taxonomia *Candidatus* (*Ca.*) é regra tradicional comumente utilizada na denominação de bactérias AMX (PEETERS & VAN NIFTRIK, 2019). Até o presente momento foram detectados nove gêneros *Candidatus* e mais de 23 espécies de AMX pertencentes a ordem *Brocadiales*, filo *Planctomycetes* e domínio *Bacteria* (LITTI et al., 2023). Recentemente, um estudo evidenciou a possibilidade de novas famílias de AMX (SUAREZ et al., 2022). Além disso, novas técnicas biomoleculares são promissoras no avanço de descobertas relacionadas à fisiologia e ecologia das AMX (CHEN et al., 2023).

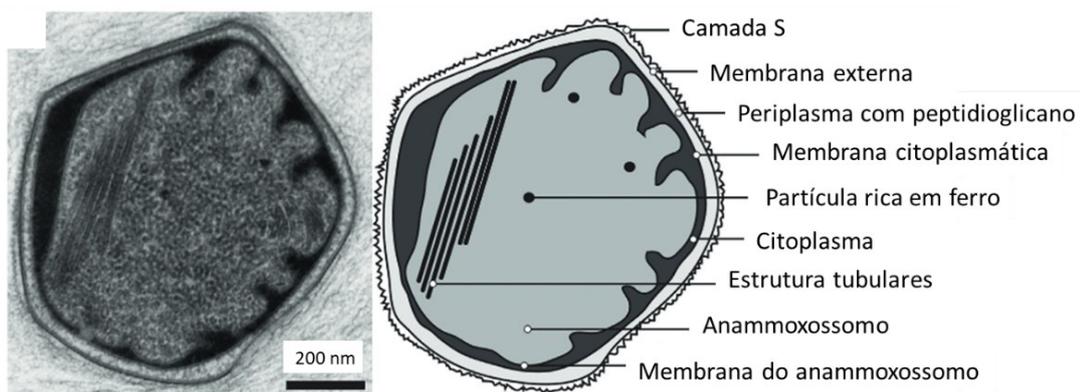
De forma intracelular, as AMX iniciam a conversão dos compostos nitrogenados através da redução de NO_2^- a óxido nítrico (NO) através da enzima nitrito redutase (Nir). Posteriormente, NO e NH_4^+ são catalisados a hidrazina (N_2H_2) por meio da enzima hidrazina sintase (Hzs). E por fim, N_2H_2 é convertido a N_2 pela enzima hidrazina dehidrogenase (Hdh). Além disso, uma parcela de NO_2^- é oxidada a NO_3^- através da enzima nitrito oxidoreductase

(Nxr). Mesmo que NO seja considerado composto intermediário nestas reações (Eq. 3, Eq. 4 e Eq. 5), a presença de hidroxilamina (NH₂OH) parece ter papel chave no metabolismo das AMX (SOLER-JOFRA et al., 2020). A enzima hidroxilamina oxidase (Hao), capaz de oxidar NH₂OH a NO, pode ser encontrada no anammoxossomo, compartimento intracelular peculiar às AMX no qual ocorrem as catálises enzimáticas (JETTEN et al., 2001).



As AMX têm diâmetro médio de 1,0 µm e possuem estrutura celular que consiste basicamente em três compartimentos principais: anammoxossomo, citoplasma e periplasma (Figura 3). As AMX produzem substâncias poliméricas extracelulares (EPS) que contém quantidades de proteínas e apresenta maior hidrofobicidade do que o EPS gerado por outras bactérias, o que faz com que as AMX possuam alta habilidade agregadora (PEETERS; VAN NIFTRIK, 2019). O EPS produzido por AMX possibilita a formação de flocos, grânulos e biofilmes (LI et al., 2015; NI et al., 2015; SETHI et al., 2023) protegendo as AMX de efeitos deletérios, como OD e MO.

Figura 3 – Estrutura celular das bactérias anammox.



Fonte - Adaptado de Peeters; van Niftrik (2019).

Outra característica ímpar das AMX é em relação a sua coloração. A presença eminente da proteína heme c faz com que elas exibam cor laranja-avermelhada (KARTAL; KELTJENS, 2016). A proteína heme c é crucial para a catálise e transferência de elétrons (SHENG et al., 2020), sendo que a escala de vermelhidão pode ser utilizada como indicativo visual do

enriquecimento ou empobrecimento da cultura anammox (LI et al., 2012; VAN DE GRAAF et al., 1996). Quando se utiliza outros processos vinculados ao processo anammox ou com alimentação de efluente contendo MO, a coloração da biomassa pode se tornar amarronzada (REINO et al., 2018), e no caso de grânulos, o diâmetro pode ser aumentado de 1 para 6 mm (DRIESSEN; HENDRICKX, 2021).

O tempo de duplicação ou a taxa máxima de crescimento (μ_{\max}) das bactérias anammox é considerado lento, para a grande maioria dos trabalhos, sendo de 11 dias (STROUS et al., 1998) a 32 dias (KHRAMENKOV et al., 2013). Entretanto, alguns trabalhos mais recentes detectaram tempo de duplicação mais curtos, sendo de 7 dias (LAURENI et al., 2015), 3,3 dias (LOTTI et al., 2015) e 2,1 dias (ZHANG et al., 2017), o que tem feito com que as AMX não sejam mais consideradas bactérias de crescimento lento (ZHANG et al., 2017). Vale ressaltar, que a presença de matéria orgânica em concentrações relativamente elevadas, por exemplo, de 300 mgO₂.L⁻¹ com CO/N > 5, promovem o crescimento de HB em relação às autotróficas, limitando a ocorrência do processo anammox (LEAL et al., 2016).

O crescimento máximo das bactérias *Ca. Brocadia* e *Ca. Jettenia* ocorre na temperatura ótima de 37°C, e para as bactérias *Ca. Scalindua* ocorre a 25°C (ALI; OKABE, 2015). Segundo Gao; Tao (2011), as AMX têm crescimento favorecido a temperatura entre 20 e 43°C e pH entre 6,7 e 8,3. Além das condições ambientais, ecossistemas complexos, como àqueles contendo MO, aumentam a vulnerabilidade das AMX, e em temperaturas mais amenas, por exemplo, a 20°C, NOB passa a ter μ_{\max} superior, sendo de 1,26 e 1,24 dia, respectivamente (HELLINGA et al., 1998).

Algumas bactérias AMX também podem utilizar sua capacidade organotrófica para degradar compostos AGVs, como acetato por *Ca. Brocadia fulgida*, propionato por *Ca. Anammoxoglobus propionicus* (WINKLER et al., 2012), e formiato por *Ca. Brocadia anammoxidans*, *Ca. Kuenenia stuttgartiensis* e *Ca. Anammoxoglobus propionicus* (KARTAL et al., 2007).

Com base no conhecimento adquirido à cerca do tema até o presente momento, pode-se dizer que a implementação do processo anammox pode permitir que as STPs equilibrem os custos relacionados à aeração e aproveitem melhor a disponibilidade de MO, como na produção de metano por meio da digestão anaeróbia (CAO et al., 2017; KARTAL et al., 2010; QIU et al., 2021). Contudo, deve-se levar em consideração os aspectos intrínsecos às bactérias AMX sem dispensar as condições necessárias à interrelação entre às AMX e as principais populações microbianas (AOB, NOB e HB).

2.3 Tecnologias baseadas no processo anammox

A remoção de nitrogênio via processo anammox está presente em 142 ETEs (LIU et al., 2020). Estas unidades tem a função de remover nitrogênio presente em uma ampla variedade de águas residuárias geradas na indústria alimentícia, cervejeira, farmacêutica, agropecuária (suinocultura e avícola) e no tratamento de esgoto sanitário doméstico, sobretudo para efluentes de biodigestores anaeróbios (digestatos) (DRIESSEN; HENDRICKX, 2021). A capacidade de tratamento dos reatores anammox em escala plena varia de 25,0 a 11.000,0 kgN.d⁻¹ (DRIESSEN; HENDRICKX, 2021). Segundo Lackner et al. (2014), os reatores de batelada sequencial (RBS) são mais utilizados (50%), seguido dos reatores com lodo granular e dos reatores de biofilme de leito móvel (MBBR), sendo que 77% das 114 unidades avaliadas por Lackner et al. (2014) tratam digestatos de águas residuárias municipais.

Reatores *gas-lift* (GLR) também têm sido utilizados para aprimorar a transferência de massa e oxigênio em reatores de fluxo ascendente (UASB, por exemplo), podendo remover 9,5 kgN.m⁻³.d⁻¹ (VAN DER STAR et al., 2007). A flotação da biomassa é uma das principais desvantagens reportadas em GLR, uma vez que o próprio gás N₂ produzido no sistema, pode ficar aprisionado no meio líquido, fazendo com que o lodo flote e seja lavado do sistema de forma indesejada (DAPENA-MORA et al., 2004). As forças de cisalhamento e padrões de mistura no reator podem promover o desprendimento do gás N₂, e são influenciados pelo regime de aeração, taxas de fluxo de ar aplicada, tamanho das bolhas, posição dos sopradores e formato do reator (VLAEMINCK et al., 2012).

Reatores de biofilme aerado por membrana (MABR) também são utilizados para promover o processo anammox (BUNSE et al., 2020; STAMATOPOULOU, 2019). Em Bunse et al. (2020), por exemplo, um reator MABR foi alimentado com esgoto real com 31 a 120 mgN-NH₄⁺.L⁻¹ (média de 57 mgN-NH₄⁺.L⁻¹), 7 e 230 mgO₂.L⁻¹ (média de 82 mgO₂.L⁻¹) e CO/N de 0,13 a 5,50 (média de 1,44). A supressão de NOB foi obtida com aeração intermitente (tempos de aeração e sem aeração em função da alimentação). A eficiência de remoção de nitrogênio (ERN) foi, em média, de 60 a 80% com aproximadamente remoção de 1,2 gN.m⁻².d⁻¹. O desprendimento de biomassa da membrana resultou em decaimento da população das AMX, que foi aumentada após recirculação do efluente.

A vibração mecânica pode ser uma alternativa para melhorar o processo anammox por melhorar a transferência de massa, uma vez que promove a expulsão dos gases de N₂ aderidos

à biomassa. No trabalho de Zhang et al. (2019), três reatores foram operados, sendo que um foi aplicada a vibração com recirculação interna, outro apenas com recirculação interna, e outro reator sem vibração ou recirculação. Eles concluíram que a vibração melhorou a atividade específica das AMX, reduzindo o consumo de energia em comparação à recirculação interna testada. Além disso, a vibração juntamente com a recirculação interna fortaleceu a adesão da biomassa ao biofilme, como demonstrado em um vídeo do material suplementar do trabalho citado.

A retenção das AMX é primordial na operação do reator que almeja realizar o processo anammox. Em geral, as bactérias anammox ficam retidas em biomassa granular, floculenta e aderida em biofilmes (LI et al., 2018), como demonstrado na Figura 4. No caso do uso de biofilmes móveis, a instalação de telas, por exemplo, com orifícios de 1 cm de diâmetro, é recomendada para evitar a perda do material suporte entre as unidades de escala plena (WANG et al., 2021). No caso de perda de biomassa, a recirculação do efluente permite a reinserção da biomassa no sistema, podendo melhorar a ERN. Bunse et al. (2020) verificaram que a ERN foi de 45% para o reator MABR com recirculação de biomassa desprendida da membrana, enquanto para o reator MABR sem recirculação foi de apenas 33%. Os flocos e grânulos, que abrigam majoritariamente AOB e AMX, respectivamente (LAURENI et al., 2019), podem ser recuperados em escala plena com o uso de hidrociclones, por exemplo (WETT et al., 2015).

Figura 4 – Retenção de biomassa anammox (AMX) e bactérias oxidadoras de amônia (AOB) em grânulos e biofilmes para condução do processo PNA.



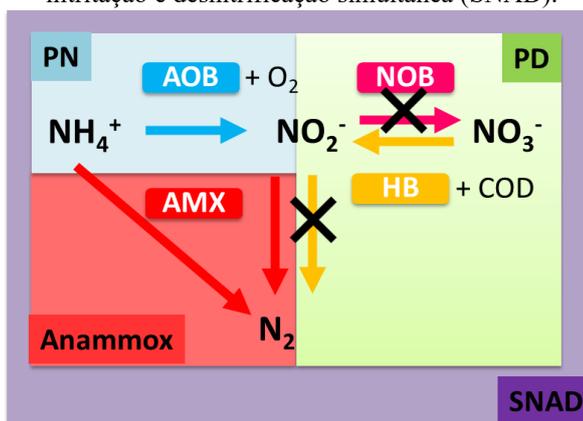
Fonte - Adaptado de Li et al. (2018).

O uso de reatores híbridos, como o reator de lodo ativado com biofilme integrado (IFAS), opera com biomassa floculenta e aderida, também tem sido aplicado para condução do processo anammox (LAURENI et al., 2016, 2019; MALOVANYY et al., 2015b). Em Malovanyy et al. (2015b), a introdução da biomassa floculenta em um sistema MBBR fez com que a ERN dobrasse e a CNVR triplicasse no sistema IFAS, aumentando de $36 \pm 3\%$ para $70 \pm$

4%, e de 0,018 para 0,055 kg.N.m⁻³.d⁻¹. O uso de reatores IFAS parecem ser uma alternativa interessante para a produção de biomassa PNA em larga escala, onde as AOB crescem particularmente na biomassa floculenta, enquanto as AMX crescem aderidas ao biofilme (ZHANG et al., 2015).

As tecnologias baseadas no processo anammox podem ser feitas em estágio único ou duplo, por meio, principalmente, dos processos de nitrificação parcial-anammox (PNA), desnitrificação parcial-anammox (PDA), e nitrificação e desnitrificação simultânea (SNAD), neste último caso, apenas para estágio único (REN et al., 2022). A representação esquemática da Figura 5 demonstra, de forma simplificada, como pode se dar o direcionamento dos compostos nitrogenados, a atuação dos principais grupos microbianos e como tais processos podem ser combinados para promover a remoção biológica sustentável de nitrogênio com foco no processo anammox.

Figura 5 – Simplificação esquemática da remoção de nitrogênio com aplicação de processos baseados na reação anammox, podendo ser nitrificação parcial – anammox (PNA), desnitrificação parcial – anammox (PDA) e nitrificação e desnitrificação simultânea (SNAD).



Fonte - Adaptado de Ren et al. (2022).

Diferentes denominações foram dadas às tecnologias anammox em função do tipo de biomassa utilizada e se a remoção de nitrogênio ocorre em estágio único ou duplo (HU et al., 2013). A Tabela 4 abriga as principais tecnologias que utilizam o processo anammox.

Apesar das opções tecnológicas e ERN relativamente elevadas (>75%), o processo anammox demanda atenção operacional. Segundo Lackner et al. (2014), ao menos 45% dos reatores anammox de escala plena apresentaram acúmulo de NO₃⁻, acúmulo de NO₂⁻ e problemas relacionados à retenção de lodo anammox e ao regime de sólidos. Ainda segundo o autor, as tecnologias conseguem atingir a eficiência almejada, mas todas apresentam problemas. Neste contexto, diversas pesquisas têm investigado os motivos pelos quais ocorre a inibição das

bactérias anammox sob diferentes condições ambientais e operacionais (CHO et al., 2019; JIN et al., 2012; KUMWIMBA et al., 2020; MADEIRA; DE ARAÚJO, 2021; ZUO et al., 2023).

Tabela 4 – Tecnologias baseadas no processo anammox.

Estágio	Biomassa	Sigla	Nome completo da tecnologia	Reator	Tipo de afluente	T (°C)	N afluente (mgN.L ⁻¹)	DQO (mgO ₂ .L ⁻¹)	CNVR (KgN.m ⁻³ .d ⁻¹)	ERN (%)	Referência
1	Suspensa	RBS	<i>Sequencial batch reactor</i>	RBS	Digestato de esgoto sanitário	30 ± 3 ^a	650 ± 50	300 ± 50	0,5	95 ^c	Joss et al. (2009)
						18 – 30 ^a	890 ± 70	770 ± 100 ^b	ni	82 ^c	
						29 ± 1 ^a	760 ± 75	150 ± 20	ni	91 ^c	
	Lodo ativado			RBS	Efluente suíno	26,6 ± 4,3	214	131 ± 40	0,17 – 0,70	10,5 – 51,6	Zuo et al. (2020)
	Granular	CANON [*]	<i>Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite</i>	UASB	Processamento de batata combinado com água de rejeito de esgoto sanitário	10 – 35 ^d	300	1635	1,20	73	Abma et al. (2010)
	Híbrido	DEMON ^{®*}	<i>Deammonification</i>	RBS	Esgoto sanitário sidestream	27,8 ± 1,7	~1000	614 ± 27	0,60	85,8 ± 4,93	Wett (2007)
	Biofilme	ANITA [™] Mox	Nome comercial utilizado pela companhia Veolia [®]	MBBR	Água de rejeito de esgoto sanitário	22 – 33	855	257	1,10	~ 75 ^c	Christensson et al. (2013)
22 – 33						1043	ni	ni	~ 85 ^c		
		OLAND ^{®*}	<i>Oxygen limited autotrophic nitrification and denitrification</i>	RBC	Água negra concentrada	25,8 ± 0,4	1110 ± 58	597 ± 49	0,7	76	Vlaeminck et al. (2009)

(continua)

(continuação)

Estágio	Biomassa	Sigla	Nome completo da tecnologia	Reator	Tipo de água residuária	T (°C)	N afluente (mgN.L ⁻¹)	DQO (mgO ₂ .L ⁻¹)	CNVR (KgN.m ⁻³ .d ⁻¹)	ERN (%)	Referência
1		SNAP*	<i>Single-stage nitrogen with anammox and partial nitritation</i>	MABR	Meio sintético	31,3 ± 0,7	50 – 100**	0,0	0,04 – 0,06 ^c	61 – 78	Augusto et al. (2018)
		SNAD	<i>Simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification</i>		Efluente suíno	22,8 ± 6,7	457 ± 128	3.984 ± 1.484	0,09 – 0,13 ± 0,03	75 ± 14	Ishimoto et al. (2020)
2	Granular	SHARON-Anammox®	<i>Single reactor for high ammonium removal over nitrite</i>		Esgoto sanitário sidestream	30 – 40	~ 1000**	ni	6,0 – 10,0	95 ^c	van der Star et al. (2007); Driessen et al. (2012)
	Suspensa	NAS®	<i>New activated sludge</i>	LA	Processamento de batata	32 – 36	193 ± 39*	1154 ± 110	0,18 – 0,26	95	Desloover et al. (2011)

Notas – CNVR: taxa de remoção de nitrogênio; ni: não informado; T: temperatura; ERN: eficiência de remoção de nitrogênio total; MBBR: reator de leito móvel com biofilme; RBC: reator biológico rotativo de contato; MABR: reator de biofilme aerado por membrana; LA: lodo ativado; *As siglas CANON, DEMON®, OLAND® e SNAP representam o processo PNA; **mgN-NH₄⁺.L⁻¹; ^a temperatura efluente; ^b DQO total; ^c valor calculado com base nos dados apresentados no artigo; ^d valores extremos obtidos no artigo; ^e valor observado em gráfico. Fonte - adaptado de Hu et al., (2013) e Ren et al. (2022).

2.3.1 Nitritação parcial - anammox (PNA)

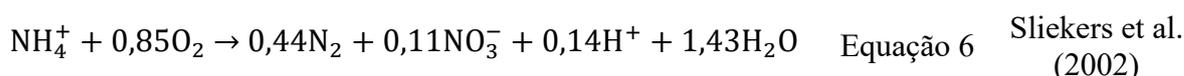
O processo nitritação parcial - anammox (PNA) detém vantagens significativas se comparado ao processo convencional de nitrificação - desnitrificação (ND), podendo representar uma economia de 1-3 € por kg de nitrogênio removido (Tabela 5; (VAN DONGEN et al., 2001)).

Tabela 5 – Comparação entre o processo nitritação parcial-anammox (PNA) e o sistema convencional de nitrificação-desnitrificação (ND) na remoção de 1,0 kg de nitrogênio.

Item	ND	PNA	Unidade
Energia	2,8	1,0	kWh
Doador de elétrons (metanol)	3,0	0,0	kg
Produção de lodo	0,5-1,0	0,1	kg-SSV ^a
Emissão de CO ₂	> 4,7	0,7	kg
Custos totais ^b	3,0-5,0	1,0-2,0	€ ^c

Notas – ^a SSV: sólidos suspensos voláteis; ^b incluem os custos operacionais e os custos de investimento; ^c € : símbolo do euro. Fonte - Adaptado de Van Dongen, 2001.

O processo PNA ocorre devido a oxidação de NH₄⁺ a NO₂⁻, como demonstrado na Figura 2. Portanto, a remoção de nitrogênio via processo PNA depende, necessariamente, da atuação mútua entre AOB e AMX. Contudo, as NOB devem ser inibidas ou lavadas (*washout*) do sistema, uma vez que as NOB oxidam NO₂⁻ a NO₃⁻, alterando a relação ideal de NO₂⁻/NH₄⁺, e competem com AOB por oxigênio e com AMX por NO₂⁻ (VLAEMINCK et al., 2012). A Equação 6 demonstra o processo PNA de forma simplificada.

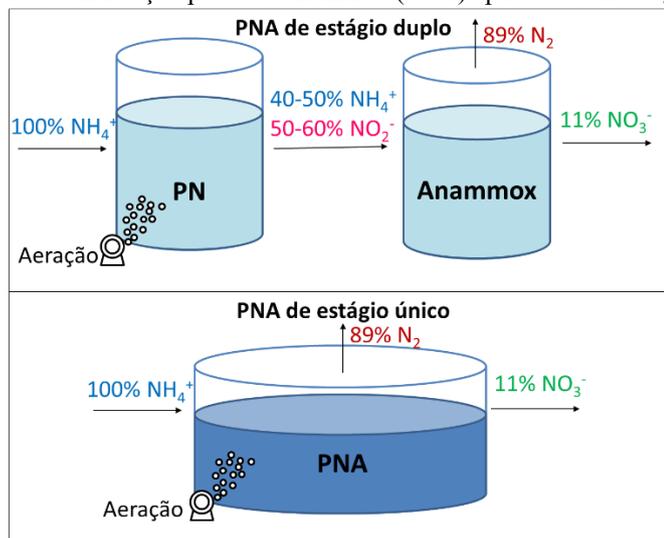


Ao invés do uso de bactérias oxidadoras de amônia (AOB), o uso de arqueias oxidadoras de amônia (AOA) pode contribuir na remoção autotrófica de nitrogênio, pois a constante de meia saturação para amônia (K_{sNH4+}) pode ser menor para AOA (0,81 μM para *Nitrososphaera viennensis*) do que para AOB (20-20.000 μM) (BO LI et al., 2023). A constante de meia saturação (K_s) é um parâmetro cinético no qual expressa o valor necessário de determinado substrato para limitar ou reduzir em 50% a taxa máxima de crescimento, sendo que valores mais próximos de zero representam maiores taxas de consumo do substrato alvo (SILVA FILHO et al., 2015). No trabalho realizado por Bo Li et al., (2023), a cultura pura de AOA (*Nitrososphaera viennensis*) foi inoculada juntamente com as bactérias AMX para realizar o processo PNA em estágio único para redução da temperatura de 25, 16 e 10°C. A abundância

relativa para AOA, AOB e AMX foram diminuídas após redução da temperatura de 25 para 10°C, mas foram recuperadas em curto período (20 dias), permitindo remover nitrogênio (ERN = $78,9 \pm 13,2\%$), amônia (ARE = $95,8 \pm 5,0\%$) e DQO ($76,2 \pm 15,5\%$) de forma eficiente utilizando apenas um reator.

O processo PNA pode ser implementado em estágio duplo ou único (Figura 6). A adoção de PNA em estágio duplo exige que dois reatores sejam construídos e operacionalizados, o que representa maior custo de implantação (CAPEX) e operação (OPEX) em comparação a operação em estágio único (CAO et al., 2023; LI et al., 2018). Em escala plena, 88% de unidades PNA são de estágio único, corroborando o motivo desta escolha diante da vantagem econômica e operacional (LACKNER et al., 2014). Em contrapartida, PNA de estágio duplo permite a otimização do processo PN e anammox separadamente, reduz o risco de inibição das bactérias AMX na presença MO (considerando seu abatimento no reator PN), diminui o volume de biomassa anammox a ser inoculado, evita a exposição das AMX ao oxigênio (VLAEMINCK et al., 2012), e previne que ocorra o cisalhamento da biomassa granular, floculenta ou o do biofilme provocado pelas bolhas de ar (LAURENI et al., 2016).

Figura 6 – Processos de nitrificação parcial - anammox (PNA) aplicados em estágio duplo e único.



O principal gargalo da aplicação do processo PNA corresponde à estabilidade do processo PN (LACKNER et al., 2014; LAURENI et al., 2016; MIAO et al., 2018), que por sua vez, está vinculado a necessidade de inibição ou *washout* de NOB (CHEN et al., 2019; HUANG et al., 2021; MA et al., 2015). A aeração tem papel fundamental no controle do processo PNA. A aeração excessiva pode promover a nitrificação ($100\% \text{NH}_4^+ \rightarrow 100\% \text{NO}_3^-$) ao invés da nitrificação parcial ($100\% \text{NH}_4^+ \rightarrow 50\% \text{NH}_4^+ + 50\% \text{NO}_2^-$) e, assim, inibir o processo anammox.

A definição da concentração adequada de OD, fornecido pela aeração, para atingir a relação $\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$ adequada ao processo anammox é um requisito necessário, porém não suficiente. Por exemplo, as concentrações de OD de 1,5 – 2,0 $\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ (CHINI et al., 2016), 0,87 $\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ (XU et al., 2015) e $0,17 \pm 0,08 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ (MIAO et al., 2016) foram ineficazes na supressão de NOB e a desestabilização do processo PNA foi observada.

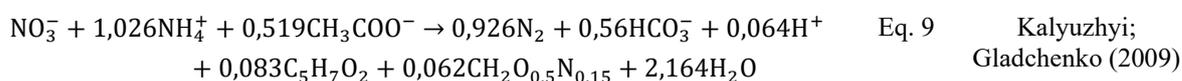
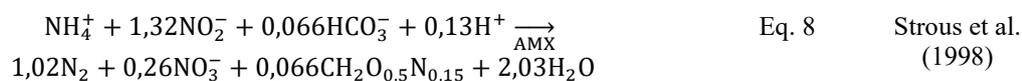
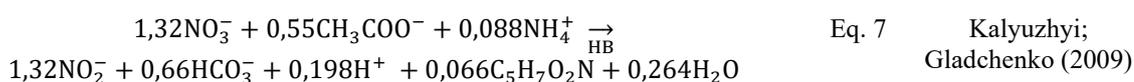
Além da remoção de NOB, é preciso promover a retenção de AOB. As condições de aeração, analisadas em um modelo matemático, mostraram que 70% das AOB alocam-se na biomassa em suspensão ao invés de grânulos (CORBALÁ-ROBLES et al., 2016). Isso realça a importância da fração de AOB aderidas aos grânulos, pois impede que o oxigênio dissolvido impacte as AMX, além disso, desvincular a remoção de biomassa floclulenta para realizar o *washout* apenas de NOB e reter AOB é um desafio (CORBALÁ-ROBLES et al., 2016). Segundo Qiu et al. (2021), a utilização de reatores híbridos com meio suporte pode ser uma solução para favorecer a retenção de bactérias anammox no biofilme e desvincular as NOB (via *washout*) do sistema reacional.

As AMX, que dispensam o uso de oxigênio em seu metabolismo, detém oxidação anaeróbia específica de amônia e nitrito superior às AOB e NOB, com valores de K_s para NH_4^+ e NO_2^- inferiores a 0,07 $\text{mg N}\cdot\text{L}^{-1}$ (SLIEKERS et al., 2005), o que as coloca em posição vantajosa em relação às bactérias nitrificantes. Contudo, na presença de oxigênio, é preciso avaliar o comportamento metabólico de AOB e NOB. Em temperaturas mais elevadas ($> 25^\circ\text{C}$) e baixa concentração de OD, a afinidade por oxigênio (constante de meia saturação - K_{O_2}) para AOB pode ser maior do que para NOB. No trabalho realizado por Blackburne et al. (2008), foi demonstrado que AOB tem ligeira vantagem sobre NOB para consumir oxigênio ($\text{DO} = 0,4 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$) entre 19 e 23°C (temperatura não controlada), onde K_{O_2} foram de $0,033 \pm 0,003 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ e $0,43 \pm 0,08 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Teoricamente, quando a concentração de OD é de apenas $0,06 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$, a taxa de crescimento de AOB é 81% maior do que para NOB (WETT et al., 2013). Entretanto, a capacidade de adaptação de NOB às condições micro aeróbias, dificulta sua supressão, fazendo com que ocorra acúmulo de NO_3^- (WETT et al., 2013). Para aliviar o acúmulo de NO_3^- , a adição de hidroxilamina (NH_2OH) e o redução do tempo de retenção de sólidos (TRS) estão entre as práticas utilizadas com potencial para reverter a instabilidade do processo PNA (WANG et al., 2020), uma vez que as NOB proliferam-se preferencialmente nos flocos ao invés de grânulos (LAURENI et al., 2019). Contudo, a viabilidade técnica de ambas ainda precisa ser melhor investigada (ZUO et al., 2023).

2.3.2 *Desnitrificação parcial - anammox (PDA)*

Ao invés de se disponibilizar NO_2^- a partir da oxidação aeróbia de NH_4^+ , como acontece na nitrificação parcial, pode-se produzir NO_2^- por meio da desnitrificação parcial de nitrato (DPN). As bactérias heterotróficas (HB) utilizam MO como doador de elétrons para reduzir NO_3^- a NO_2^- , e posteriormente, as bactérias anammox (AMX) utilizam NO_2^- como acceptor de elétrons para oxidar NH_4^+ . Este mecanismo de remoção de nitrogênio é conhecido como desnitrificação parcial - anammox (PDA) (DU et al., 2019). Como os processos DPN e anammox são anóxicos, dispensa-se o uso de oxigênio, mas o controle de MO é necessário para regular a razão $\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$ de 1,32, importante à atuação das AMX. A remoção de MO pode ser intensificada no processo PDA, mas o excesso de MO beneficia as HB frente as autotróficas (AOB, NOB e AMX), podendo favorecer a ocorrência da desnitrificação completa ($\text{NO}_3^- \xrightarrow{\text{HB}} \text{N}_2$) ou então provocar o acúmulo de NO_2^- (ZUO et al., 2023). Em comparação ao processo nitrificação/desnitrificação, o processo PDA reduz o consumo de oxigênio em 45%, o requerimento de MO em 79% e o volume de lodo (MA et al., 2016).

Considerando o uso de acetato e a reação anammox baseada em Strous et al. (1998), pode-se estabelecer o balanço estequiométrico dos processos de desnitrificação parcial, anammox e PDA, conforme apresentado nas Equações Eq. 7, Eq. 8 e Eq. 9, respectivamente. Neste caso, o requerimento mínimo da relação DQO/N- NO_3^- é de 1,91.



Os principais gargalos do processo PDA correspondem ao acúmulo de NO_2^- , tipo de CO, relação DQO/N- NO_3^- , pH e estrutura da comunidade microbiana (DU et al., 2019). O valor de pH de 9,0, por exemplo, beneficia mais o processo PDA do que o pH de 7,0 ou de 5,0, pois promove maior taxa de acúmulo de nitrito de 57, 38 e 21%, respectivamente (QIAN et al., 2019). Entretanto, o pH entre 6,7 e 8,3 favorece o metabolismo das AMX (GAO; TAO, 2011).

A relação CO/N é um dos principais parâmetros utilizados no controle do processo PDA (CHEN et al., 2021c). Em baixas relações de CO/N, a oxidação de AGVs pode ser feita por bactérias AMX para realizar a redução dissimilatória de nitrato para amônia (RDNA), que pode ocorrer de forma completa para formar NH_4^+ , ou de forma parcial para formar NO_2^- , ou seja, aumenta-se a disponibilidade de ambos os substratos para as AMX via RDNA (CASTRO-BARROS et al., 2017; ZHUANG et al., 2022). O trabalho de revisão feito por Cao et al. (2021) reportou que o processo PDA pode ocasionar ERN acima de 80% alimentando reatores RBS e UASB com relações DQO/N oscilando entre 2,0 e 3,4, tanto para baixas como para altas concentrações de amônia e nitrato entre 25 - 800 $\text{mgN-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ e 30 - 830 $\text{mgN-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$. Contudo, vale ressaltar que a eficiência do processo PDA está atrelada ao tipo de matéria orgânica, condições operacionais, atividade das bactérias anammox, tipo do reator, etc. (CAO et al., 2021).

Em Zhuang et al. (2022), a integração de biomassa granular na parte inferior do reator, com biofilme na parte superior, fez com que 50% e 25% da remoção de NO_3^- ocorresse via PD e RDNA, respectivamente. Neste trabalho, o processo PDA atingiu alta remoção de nitrogênio ($0,8 \pm 0,1 \text{ kgN} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$) com efluente de excelente qualidade ($3 \text{ mgN} \cdot \text{L}^{-1}$). Estes resultados foram obtidos a temperatura de 20-25°C, com operação de reator UASB alimentado com meio sintético contendo amônia ($25 \text{ mgN-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$), nitrito ($30 \text{ mgN-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$) e acetato ($60 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$), onde a relação C/N foi de 1,1 e DBO/ NO_3^- pode ter sido influenciada pela RDNA podendo ser de até 10,0.

Em relação à população microbiana envolvida no processo PDA, Xu et al. (2020) reportaram que aproximadamente 90% da remoção de nitrogênio total afluente ($42,5 \text{ mgN} \cdot \text{L}^{-1}$) foi realizada pelas bactérias anammox *Ca. Brocadia* (6,24%), com auxílio das bactérias heterotróficas *Thauera* (17,46%) com DQO/NIT de 1,52. Du et al. (2016) detectaram que as *Ca. Jettenia* (2,7%) contribuíram para que 70% do nitrogênio presente em amostras de esgoto doméstico fosse removido via anammox, onde o processo PDA em estágio duplo a temperatura de 18,3 a 10,6°C promoveu a remoção de NO_3^- , NH_4^+ e DQO de 96,7%, 99,5% e 69,6%, respectivamente. Entretanto, no trabalho citado, foi preciso alimentar o reator PD com $50 \text{ mgN-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$ e acetato (DQO/N- NO_3^- de 3,0) para fornecer NO_2^- ao reator anammox, alimentado com esgoto doméstico e suplementado amônio ($165,8$ a $60,6 \text{ mgN-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$), para amenizar o impacto da relação C/N (0,54 a 1,33).

Em escala plena, o processo *sidestream* PDA foi observado no tratamento de efluente suíno. A limitação de carbono orgânico e a aeração intermitente fizeram com que a

desnitrificação completa fosse limitada e as AMX utilizassem nitrito reduzido a partir da desnitrificação parcial. Como resultado, a energia consumida na ETE foi reduzida de 1,93 para 0,9 kWh.m⁻³ (4,18 para 2,57 kWh.kgN⁻¹) e a ERN aumentada de 65,5 ± 6,0% para 83,5 ± 6,7% (CHEN et al., 2021c).

A primeira ETE que reportou o processo *mainstream* PDA está localizada na cidade de Xi'an, China. O uso de reator anóxico MBBR promoveu a retenção das AMX, que foram encontradas com abundância relativa 8,9 vezes maior do que no reator anaeróbio-anóxico-óxico. A abundância relativa de HB foi 5,9 vezes maior do que AOB, fato que reitera a ocorrência do processo PDA no tratamento de esgoto doméstico municipal (WANG et al., 2021).

Desta forma, o processo PDA tem potencial para abater a produção de NO₃⁻, maximizando a eficiência de remoção de nitrogênio, além de auxiliar na remoção de CO (CAO et al., 2023). Assim como o processo PNA, o processo PDA apresenta limitações e dificuldades que precisam ser melhor elucidadas (CAO et al., 2021). Contudo, a reação anammox está presente em ambos os processos, fazendo com que a produção de NO₃⁻ seja inevitável (Eq. 1 e Eq. 2), independentemente se os processos PNA ou PDA forem implementados em estágio único ou duplo (Figura 6).

2.4 Sistemas PNA

2.4.1 *Sidestream PNA*

Em 2002, a estação de tratamento de esgotos (ETE) em Sluisjesdijk, Rotterdam, Holanda, foi a primeira ETE a aplicar o processo PNA para tratar efluentes de fluxo lateral (*sidestream*) (VAN DER STAR et al., 2007). Desde então, 142 reatores baseados no processo anammox foram identificados em escala plena (LIU et al., 2020), fazendo com que o processo *sidestream* PNA seja considerado uma tecnologia consolidada (LACKNER et al., 2014). A viabilidade técnica para a expansão de sistemas *sidestream* PNA está atrelada a três fatores essenciais: alta concentração de amônia, deficiência em MO e temperaturas mesofílicas (WANG et al., 2022). Em geral, os efluentes que mais assemelham-se à estas características são provenientes de lixiviados de aterros sanitários, digestatos de dejetos de animais, águas residuárias de indústrias têxteis e digestatos de ETE provenientes ou não da hidrólise térmica de lodo (ABMA et al., 2010; WETT et al., 2015).

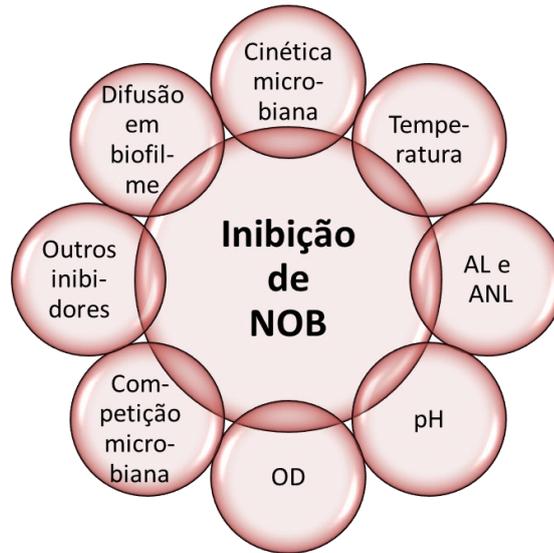
Os reatores *sidestream* PNA, geralmente são implementados para tratar efluentes que contém elevada concentração de amônia geralmente superior a 300 mgN-NH₄⁺.L⁻¹ (WETT et al., 2015) resultando em elevadas NLR (0,5 – 2,5 kgN.m⁻³.d⁻¹), temperaturas mesofílicas (25 - 35°C, (MALOVANYY et al., 2015), e deficientes em MO, fazendo com que a relação CO/N seja relativamente baixa (0,5 – 3,5) (TRINH et al., 2021). Tais condições diferem das condições encontradas em fluxos principais (*mainstream*) de ETEs tratando esgotos sanitários. Desta forma, os diversos parâmetros que podem interferir no processo anammox foram abordados no tópico 2.5, que diz respeito a aplicação do processo *mainstream* PNA para efluentes anaeróbios.

Vale ressaltar que o sucesso da aplicação do processo *sidestream* PNA não extingue a ocorrência de certos desafios, como longos períodos de inicialização (*start-up*), dificuldade de inibição NOB sem comprometer a ERN causando acúmulo de nitrato, arraste de biomassa e baixa qualidade do efluente final (ALI & OKABE, 2015; ZUO et al., 2023).

2.4.2 *Mainstream PNA*

Apesar da maturidade e robustez da aplicação do processo *sidestream* PNA, a aplicação do processo *mainstream* PNA, ou seja, para tratar esgoto doméstico, ainda representa um desafio (LI et al., 2018; QIU et al., 2021; XU et al., 2015; YANG et al., 2023). Os esgotos domésticos possuem reduzida concentração de nitrogênio amoniacal (30 – 100 mgN-NH₄⁺.L⁻¹), alta relação CO/N (4 – 12), flutuação das cargas nitrogenadas e orgânicas, e as temperaturas são relativamente baixas em climas temperados (10 a 20°C) que também oscilam de forma sazonal (REN et al., 2022; CAO et al., 2017). Estas características, em conjunto com a grande variabilidade dos esgotos domésticos, são barreiras ao processo *mainstream* PNA (TRINH et al., 2021). O principal gargalo corresponde à dificuldade de se disponibilizar NO₂⁻ às AMX (AZEVEDO et al., 2021). A presença de CO também configura problemas que resultam no crescimento de HB que competem por nitrito e espaço, e por fim, ressalta-se a dificuldade de aplicar a estratégia de amônia residual para favorecer a atividade AMX (via consumo de NH₄⁺ e NO₂⁻) ao invés de favorecer a atividade NOB (via consumo de NO₂⁻, na ausência de NH₄⁺) (CAO et al., 2023). A supressão de NOB pode estar relacionada a uma série de fatores, como demonstrado na Figura 7.

Figura 7 – Fatores inibidores das bactérias oxidadoras de nitrito (NOB).



Notas – AL: amônia livre; ANL: ácido nitroso livre; OD: oxigênio dissolvido.
Fonte - Adaptado de Liu et al. (2020).

Até o presente momento, apenas duas unidades de escala plena foram operadas, com estabilidade, o processo *mainstream* PNA: Strass, Áustria e Changi, Singapura (WETT et al., 2015; YESHI et al., 2016). Recentemente, a ETE municipal de Xi'an, China, também promoveu estabilidade do processo *mainstream* anammox, entretanto por meio do processo PDA (WANG et al., 2021; YUAN et al., 2021). Em Strass, a transferência de biomassa (bioaumento) da unidade *sidestream* PNA para o reator *mainstream* PNA foi uma das principais estratégias adotadas (WETT et al., 2015). A produção suficiente de biomassa ativa em reatores *sidestream* anammox, inclusive, é vital para realização do inóculo em reatores *mainstream* PNA (ZUO et al., 2023), prevenindo longos *delays* da estabilidade e remoção de nitrogênio. O *startup* do primeiro sistema *sidestream* anammox, implementado em Dokhaven-Sluisjesdijk, Rotterdam, Holanda, demorou cerca de 3 anos para atingir a estabilidade do processo PNA de estágio duplo (DRIESSEN; HENDRICKX, 2021). O longo período de partida (*startup*) foi atribuído à necessidade de produzir biomassa enriquecida em escala piloto, introduzida no reator de escala plena ao longo do tempo (VAN DER STAR et al., 2007).

Os principais gargalos da aplicação do processo *mainstream* PNA incluem obter estabilidade duradoura na produção de NO_2^- , reter as AMX com atividade relativamente alta, prevenir o acúmulo de NO_3^- , controlar a retenção de lodo (promovendo, se possível, o *washout* de NOB), adaptar o processo à flutuação da temperatura (principalmente a valores $< 15^\circ\text{C}$) e aliviar o impacto de DQO (geralmente com a adoção de pré-tratamento para captura de carbono orgânico) (ZUO et al., 2023).

A reduzida concentração de NH_4^+ , a alta relação CO/N e a baixa temperatura são as principais características dos efluentes *mainstream* que limitam o processo *mainstream* PNA (ZUO et al., 2023; CAO et al., 2017; LI et al., 2018; LIU et al., 2020). Estes e outros parâmetros considerados limitantes ao processo *mainstream* PNA foram abordados no tópico 2.5.

Recentemente, o processo *mainstream* PNA em estágio único tem sido dado como limitado em comparação ao estágio duplo (CHEN et al., 2020). Contudo, no trabalho de Lotti et al. (2014c) um reator PNA de estágio único de escala de bancada foi operado por 10 meses na temperatura de 10 – 20 °C, com estabilidade do processo anammox e taxa de remoção de nitrogênio de 0,4 kgN.m⁻³.d⁻¹. No trabalho citado, o esgoto doméstico foi pré-tratado aerobiamente, reduzindo o impacto da matéria orgânica, que apresentou residual de 57 ± 7 mg O₂.L⁻¹ e relação DQO/N de 1,9. Além disso, nitrito foi suplementado, ou seja, a aeração não foi implementada, o que poderia causar instabilidade do processo anammox.

Juan-Díaz et al. (2021), alimentaram um reator anammox com esgoto doméstico pré-tratado aerobiamente e com efluente parcialmente nitrificado na linha *sidestream* (60 ± 14 mg DQO.L⁻¹, DQO/N de 1,0 ± 0,1 e razão afluente NO₂⁻/NH₄⁺ de 1,3 – 1,4), e verificaram que o abatimento da temperatura de 20 para 10°C não reduziu a taxa de remoção de nitrogênio no processo anammox (CNVR = 0,10 kgN.m⁻³.d⁻¹). Além disso, testes *ex situ* demonstraram que a atividade heterotrófica desnitrificante foi 3 a 5 vezes inferior do que a atividade das AMX, mesmo a temperatura de 10°C.

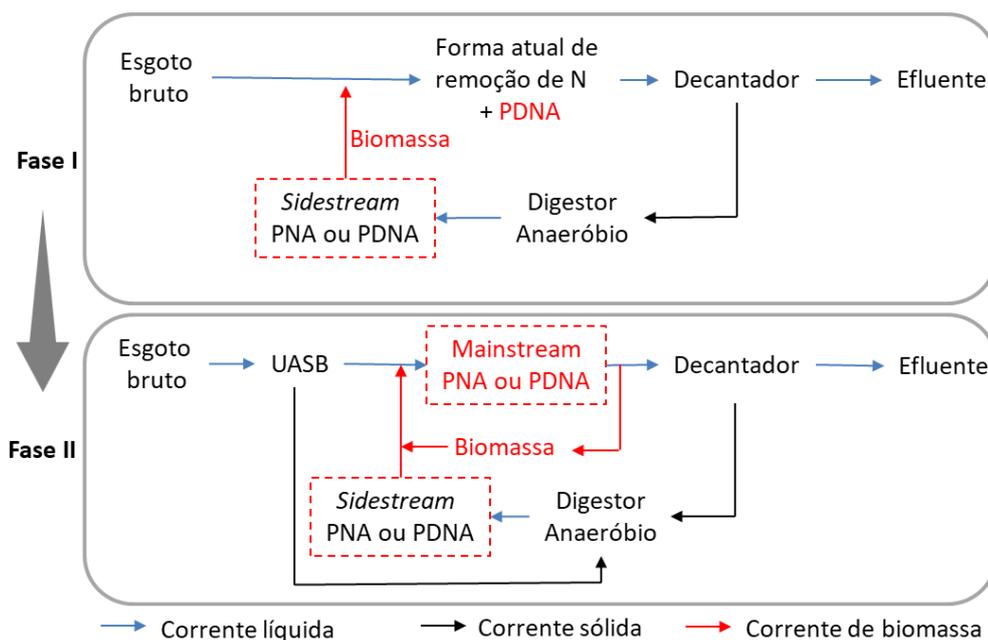
A supressão de NOB é uma das principais barreiras da aplicação do processo *mainstream* PNA. Segundo Qiu et al. (2021), é preciso que diferentes estratégias sejam combinadas para promover o *washout* ou limitar o crescimento de NOB em sistemas PNA. Laurení et al. (2016), por exemplo, conseguiram suprimir a atividade NOB à temperatura de 15°C em reator MBBR de escala de laboratório operado como RBS com controle automatizado de baixa concentração de OD (0,18 mgO₂.L⁻¹). Durante 5 meses, a ERN foi de 70%, com CNVR de 0,03 kgN.m⁻³.d⁻¹. Vale ressaltar que o esgoto sanitário utilizado no estudo de Laurení et al. (2016) havia sido pré-tratado aerobiamente.

A presença de amônio residual acima de 5,0 mgN-NH₄⁺.L⁻¹ (MALOVANYY et al., 2015a; YANG et al., 2023) ou de pelo menos 2,0 mgN-NH₄⁺.L⁻¹ (LAURENÍ et al., 2016) foi considerado fator importante na estabilização do processo *mainstream* PNA. Sem residual de amônio, a atividade AMX pode ser reduzida, facilitando a ativação de NOB mesmo com baixa concentração de OD (0,15 - 0,35 mgO₂.L⁻¹) (YANG et al., 2023). A robustez do processo *mainstream* PNA foi observada em reator de escala piloto em Brisbane, Austrália, em que ao

longo de 1 ano foi feito controle de amônia residual de $8,0 \text{ mgN-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$, acumulando apenas $1,0 \text{ mgN-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$ e $1,0 \text{ mgN-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$ (ZHENG et al., 2023). Contudo, o uso desta estratégia pode requerer polimento do efluente, de forma a atender aos padrões de lançamento de efluentes, cada vez mais restritivos (DANTAS et al., 2022).

A produção de biomassa anammox ativa é outro fator importante na realização do *start-up* de reatores *mainstream* anammox. Em escala plena aconselha-se realizar tal implementação de forma progressiva e em duas fases (WETT et al., 2013). Na Fase I, recomenda-se realizar o bioaumento da biomassa anammox em reatores *sidestream* anammox em estágio único. E posteriormente, na Fase II, realizar o inóculo com biomassa ativa com implementação do processo *mainstream* anammox via PNA ou PDA em estágio único ou duplo (Figura 8). O uso de hidrociclones, quando a biomassa é granular (WETT et al., 2013), ou telas/grades quando a utilizam-se biofilmes móveis, podem auxiliar o bioaumento de bactérias AMX e AOB (YUAN et al., 2021).

Figura 8 – Implementação do processo *mainstream* anammox sendo implementadas em dois períodos distintos de operação denominados de Fase I e Fase II.



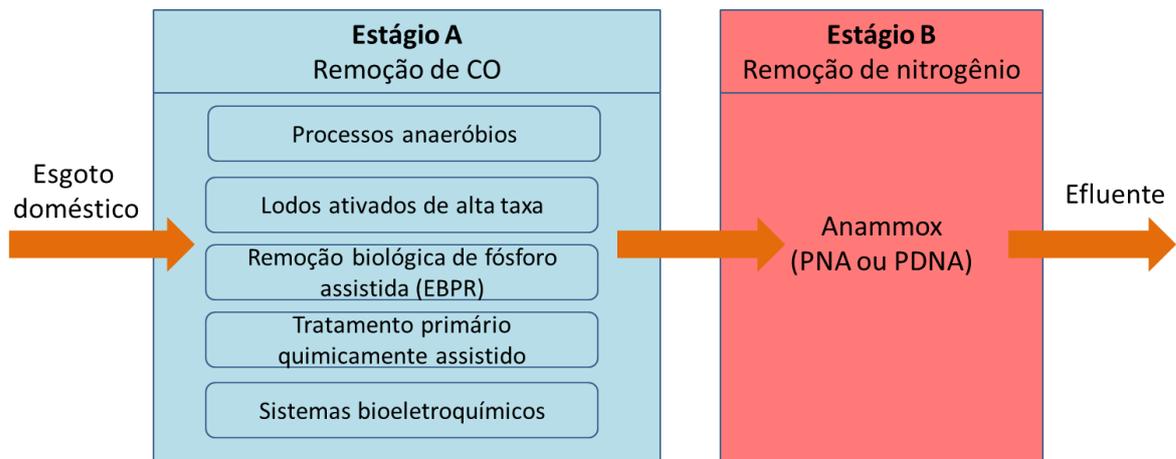
Notas: PNA - Nitritação parcial-anammox; PDA: desnitrificação parcial-anammox; UASB: reator anaeróbico de fluxo ascendente e manta de lodo. Fonte - Adaptado de Qiu et al.(2021).

Além da configuração estabelecida para a transferência do processo *sidestream* para *mainstream* anammox, é preciso avaliar a tecnologia para remoção de CO antes de alimentar os reatores anammox. Recentemente, as ETEs têm empregado a configuração de Estágios AB. No Estágio A, promove-se a remoção da parcela orgânica carbonácea do meio líquido, e no

Estágio B, promove-se a remoção de nutrientes. No Estágio A, os reatores anaeróbios UASB, configuram uma das principais tecnologias adotadas em países de clima quente (CHERNICHARO et al., 2015; VON SPERLING; CHERNICHARO, 2005). Segundo Cao et al. (2020), no Estágio A, o processo anaeróbio em comparação ao processo aeróbio remove menos CO na forma de DQO total (54,3% contra 63,5% com aeração), mas pode recuperar maior fração de CO na forma de biogás (53,82% contra 40,94% com aeração), o que permite produzir energia e equilibrar os custos de tratamento da ETE.

Além do processo anaeróbio, a remoção de CO no Estágio A pode ser feita por meio de sistemas de lodos ativados de alta taxa (CAO et al., 2021), remoção biológica de fósforo melhorada (IZADI; ANDALIB, 2023), tratamento primário quimicamente assistido (DIAMANTIS et al., 2013) ou por sistemas bioeletroquímicos (GHANGREKAR; CHATTERJEE, 2018). A Figura 9 exibe um esquema adaptado de Li et al. (2018) no qual engloba tais alternativas com foco no processo anammox.

Figura 9 – Representação dos Estágios A-B para captura de carbono orgânico (CO) para aplicação do processo *mainstream* anammox em estações de tratamento de esgoto doméstico.



Fonte - Adaptado de Li et al. (2018). Notas - PNA: nitrificação-parcial e anammox; PDNA: desnitrificação-parcial e anammox; CO: carbono orgânico.

O sucesso do processo *mainstream* PNA representa um paradigma importante que pode desvincular o consumo de carbono orgânico que seria destinado à remoção de nitrogênio, de forma a maximizar a produção de biogás via digestores anaeróbios, e tornar as ETEs em unidades neutras ou até mesmo exportadoras de energia (CHO et al., 2019; WANG et al., 2022).

2.5 Mainstream PNA para esgoto doméstico pré-tratado anaerobiamente

2.5.1 *Digestão anaeróbia como remoção de CO e características dos efluentes anaeróbios*

Esgotos domésticos contêm elevada relação carbono orgânico/nitrogênio (CO/N) oscilando de 7 a 12, que podem favorecer o crescimento de HB e restringir o crescimento de AMX (AGRAWAL et al., 2018; CAO et al., 2017). Em países de clima quente, como Brasil, Colômbia e Índia, os reatores anaeróbios são comumente utilizados na linha principal para o tratamento de esgoto doméstico em ETEs municipais (CHERNICHARO et al., 2015; VON SPERLING, 2007). Os reatores UASB, por exemplo, apresentam design simples, apesar dos separadores trifásicos, e demandam baixo investimento financeiro para serem operados. Tais características primordiais fizeram com que os reatores UASB fossem disseminados em países em desenvolvimento para tratar esgoto sanitário (CHERNICHARO et al., 2015). Os reatores UASB comumente reduzem a parcela orgânica carbonácea entre 40 – 75% (CHERNICHARO et al., 2015), sendo assim, a relação CO/N pode ser reduzida para valores relativamente baixos, tais como 1,0 a 3,5 (LI et al., 2017) ou de 1,14 (valor calculado com base nos dados descritos por Lille et al., 2015), e assim, facilitar a implementação de reatores baseados no processo anammox (CAO et al., 2017), subsequentemente. Recentemente, foi constatado na ETE de Campinas (SP, Brasil) que esgotos sanitários pré-tratados anaerobiamente em reatores UASB produziram, ao longo de um ano, efluentes com relação DQO/N variando entre 2,2 a 3,1 e DQO inferior a $160 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ (SACHETTO et al., 2022). Este fato reitera o potencial da aplicação do processo anammox em regiões de clima quente que utilizam processos anaeróbios na linha principal.

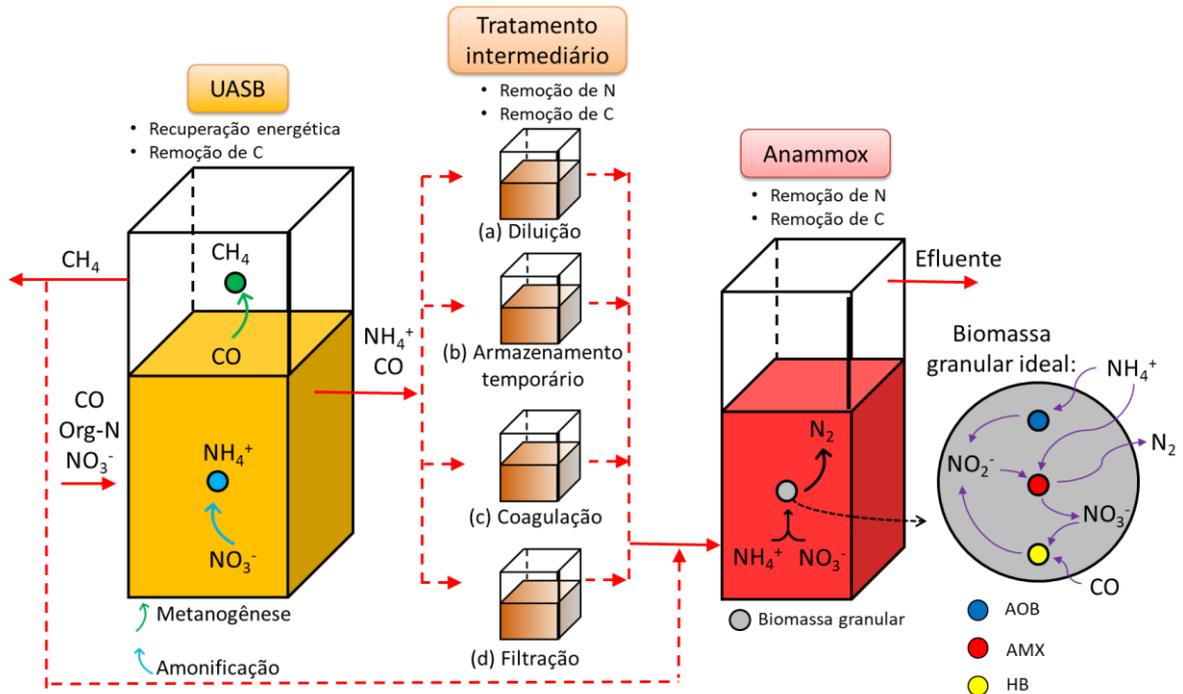
Algumas alternativas intermediárias de tratamento que podem ser implementadas entre o reator de digestão anaeróbia e o reator baseado nos processos anammox (Figura 10), melhorando a qualidade do afluente para a remoção autotrófica de nitrogênio (SHENG et al., 2020).

As principais dificuldades da aplicação do processo *mainstream* PNA para tratar efluentes anaeróbios de ETEs municipais são:

- Temperatura reduzida ($< 25^\circ\text{C}$) (AZEVEDO et al., 2021);
- Necessidade de inibição de NOB (AZEVEDO et al., 2021);
- Possibilidade da emissão de poluentes atmosféricos, como metano dissolvido presente em efluentes anaeróbios (CRONE et al., 2016);

- Elevado controle operacional automatizado demandando investimentos pontuais específicos (CAPEX) e corpo técnico especializado (PALATSI et al., 2021).

Figura 10 – Esquema demonstrativo para acoplar reatores anaeróbios aos reatores anammox com tratamento intermediário.



Fonte – Adaptado de Sheng et al. (2020).

Um estudo recente realizado por Dantas et al. (2022), demonstrou que diversas ETEs que empregam o processo de tratamento anaeróbico por meio de reatores UASB, demonstraram o pior desempenho na remoção a nitrogênio amoniacal em comparação às outras ETEs que adotam sistemas de aeração, uma vez que tais sistemas anaeróbios não visam remover nitrogênio. Desta forma, reitera-se a necessidade de unidades que tem como propósito remover nitrogênio na linha principal de tratamento de esgoto quando sistemas anaeróbios são adotados preliminarmente. Além disso, o nitrato produzido via processo anammox pode servir de aceptor de elétrons para reduzir compostos naturalmente presentes em efluentes anaeróbios como metano dissolvido, sulfeto e DQO residual (AZEVEDO et al., 2021).

As características de efluentes anaeróbios de reatores UASB tratando esgoto doméstico em países de clima quente foram apresentadas por Leal et al. (2016). Algumas destas características e seus respectivos valores podem ser observadas na sequência:

- Temperatura amena ($25,7 \pm 2,3^\circ\text{C}$);
- pH próximo da neutralidade ($7,2 \pm 0,1$);

- Reduzida concentração de sólidos, com SST e SSV de 71 ± 43 e 51 ± 31 mg.L⁻¹, respectivamente;
- Reduzida presença de MO, com valores médios de DQO total e DQO solúvel de 150 ± 92 e 80 ± 35 mgO₂.L⁻¹, respectivamente;
- Baixa concentração de nitrogênio, sendo NTK e NH₄⁺ de 46 ± 8 e 27 ± 4 mg.L⁻¹, respectivamente;
- Baixa relação CO/N ~ 3,0, calculado a partir dos valores médios de DQO solúvel e NH₄⁺;
- Presença de compostos sulfurosos ($14,2 \pm 4,5$ mgSO₄²⁻.L⁻¹) e fosfatados ($6,9 \pm 4,0$ mgPO₄³⁻.L⁻¹);
- Presença de metano dissolvido ($13,0$ a $25,0$ mgCH₄ dissolvido.L⁻¹).

A alcalinidade não foi relatada por Leal et al. (2016), mas seus efeitos foram apresentados mais adiante no tópico 2.5.4. Os tópicos seguintes realçam os principais fatores que podem dificultar ou favorecer à estabilidade do processo *mainstream* PNA visando o tratamento de esgoto sanitário, não apenas em relação à supressão de NOB, mas também em relação ao sintrofismo entre AOB, AMX e HB.

2.5.2 Concentrações de N e DQO, e a relação CO/N

A matéria orgânica (MO) aplicada, expressada na forma de DQO, muitas vezes contribuem com o aumento da remoção de nitrogênio total (ERN) por meio da desnitrificação heterotrófica, contudo, a atividade das bactérias anammox (AMX) e a contribuição do processo PNA pode ser deteriorado ao longo da operação, como comentado na Tabela 6.

Os efluentes anaeróbios são pobres em MO ($100-200$ mg O₂.L⁻¹) (TORRES; FORESTI, 2001) e pobres em nitrogênio ($20-50$ mgN-NH₄⁺.L⁻¹), o que pode fazer com que a relação CO/N ainda possa apresentar valores entre 2.0 e 10.0, que podem contribuir à desnitrificação heterotrófica ao invés do processo anammox.

Concentrações muito reduzidas de amônia podem dificultar o controle do processo *mainstream* PNA (MALOVANYYY et al., 2015a). Nessa linha, Kuypers et al. (2018) levantaram a hipótese da ocorrência do acúmulo de nitrato via comammox. Yang et al. (2023) puderam confirmar tal hipótese, pois verificaram a desestabilização do processo PNA com amônia residual de apenas $2,0$ a $5,0$ mgN-NH₄⁺.L⁻¹. Estes autores observaram que não foi possível impedir o crescimento de NOB (*Nitrobacter*) e comammox (*Nitrospira spp.*) via processo PNA recebendo esgoto doméstico pré-tratado aeróbia e anaerobiamente com $44,9 \pm 0,9$ mgNH₄⁺.L⁻¹

e $56,9 \pm 14,1 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$. Apesar da reduzida concentração de OD ($0,15\text{-}0,35 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$) e do controle da temperatura ($24\text{-}26^\circ\text{C}$), elevada relação $\text{NO}_3^- \text{ produzido} / \text{NH}_4^+ \text{ consumido}$ de $0,87 \pm 0,06$ foi observada.

Zhang et al. (2018), em contrapartida, obtiveram elevada ERN de $88,2\% \pm 3,6$ mesmo com amônia residual de apenas $0,8 \pm 0,3 \text{ mgN-NH}_4^+\cdot\text{L}^{-1}$, concentração OD de $0,8 \pm 0,3 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ com ajuste da vazão de ar (não mencionada), e sem controle da temperatura, oscilando de $12,8$ a $27,0^\circ\text{C}$. O reator em batelada sequencial com biofilme (SBBR) foi alimentado com esgoto doméstico real (sem pré-tratamento) com diluições de água da torneira de 40, 20 e 0% (sem diluição), e com concentrações de MO ($118,6 - 221,5 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$) e de amônia ($43,2 - 72,3 \text{ mgN-NH}_4^+\cdot\text{L}^{-1}$) que resultaram na relação CO/N oscilando entre 2,1 e 3,6.

A remoção da parcela orgânica carbonácea, previamente ao processo PNA, é fundamental para o sucesso da aplicação, uma vez que HB apresenta crescimento em relação aos microrganismos autotróficos de interesse (AOB e AMX) (CAO et al., 2020). Além disso, a presença de CO faz com que ocorra maior consumo de oxigênio em reatores PNA, neste caso de estágio único, levando a um aumento do consumo de energia elétrica por aeradores (CAO et al., 2023). Em contrapartida, remover toda a parcela carbonácea, inviabiliza a desnitrificação de NO_3^- produzido por AMX. No trabalho de Reino et al. (2018), que foi feita a suplementação de nitrito, o NO_3^- produzido por AMX foi removido via desnitrificação heterotrófica ($45 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$ removido) e contribuiu para obter elevada taxa de remoção de nitrogênio (CVNR) de $1,200 \pm 500 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ à temperatura de 11°C .

A presença de baixa concentração de MO pode maximizar a eficiência de remoção de nitrogênio (ERN). A relação CO/N $< 1,5$ é dita como benéfica ao processo PNA (CAO et al., 2017; MIAO et al., 2018), assim como a concentração adequada de MO, por exemplo, inferior a $100 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$, que pode produzir o polímero extracelular (EPS), favorecendo a granulação e melhorando a ERN devido a competição benigna entre HB e AMX (LI et al., 2015).

Até o presente momento, não foi definida qual é a relação CO/N ideal ao processo PNA (CHEN et al., 2021a). Entretanto, vale dar destaque para o limite da concentração de MO para evitar a inibição das AMX. Leal et al. (2016) verificaram que a concentração de $300 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$ (CO/N de 5) não afetou o processo anammox, mas acima de $487 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$ (CO/N de 3,5) houve inibição. Qin et al. (2017) consideraram que $56,4 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$ (na forma de glicose) foi a concentração ótima para remover amônia ($96,0\text{-}105,8 \text{ mgN-NH}_4^+\cdot\text{L}^{-1}$) e nitrito ($129,2\text{-}141,3 \text{ mgN-NO}_2^-\cdot\text{L}^{-1}$), mas DQO na concentração de $375 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$ observou-se prejuízo à atividade anammox e a eficiência de remoção de amônia (ERA) foi reduzida de 97% para apenas 10%.

Tabela 6 – Efeitos da matéria orgânica na remoção autotrófica de nitrogênio.

Ref.	Processo	Tipo de água residuária	Tipo de MO	DQO (mgO ₂ .L ⁻¹)	NH ₄ ⁺ afluente (mgN.L ⁻¹)	NO ₂ ⁻ afluente (mgN.L ⁻¹)	DQO/N*	OD (mgO ₂ .L ⁻¹)	T (°C)	ERN (%)	Comentários
Reino et al., (2018)	Amx	Esgoto doméstico real suplementado com nitrito	NI	90 ± 20	30 ± 7	40 ± 7	1,3	0,0	11	82,0 ± 4,0	Elevada CNVR (1500 ± 500 kgN.m ⁻³ .d ⁻¹)
Pijuan et al., (2020)	Amx	Efluente real (suplemento de amônia e nitrito, NO ₂ ⁻ /NH ₄ ⁺ = 1,32)	Matéria orgânica complexa	60 – 225 (adicionado ao efluente real)	15 – 30	20 – 40	1,8 – 4,9	0,0	26		Deterioração progressiva da atividade anammox (4,37 < CO/N ≤ 4,90)
Sheng et al., (2018)	SAD	Sintética	Acetato	70 – 280	150	200	0,2 – 0,8	-	35,0 ± 1,0	88,3	Comparação entre acetato e glicose
Sheng et al., (2018)	SAD	Sintética	Glicose	70 – 420	150	200	0,2 – 1,2	-	35,0 ± 1,0	87,0	
Yang et al., (2023)	PNA	Esgoto real (pré-tratado aerobiamente)	NI	56,9 ± 14,1	44,9 ± 0,9 manualmente adicionado	-	1,3	0,15 – 0,35	24,0 – 26,0	NI	NOB suprimiu AMX
Zhang et al. (2021b)	PNA	Esgoto doméstico real	NI	97,3 – 220,1	40,1 – 72,5	-	1,9 – 5,5	0,7 ± 0,3	16,5 – 26,8	86,0	Inóculo de lodo ativado sem atividade anammox
Chen et al., (2020)	PNA de estágio duplo	Esgoto bruto (misturado com efluente de reator PN)	NI	63	20 – 25	25 – 30	1,1 – 1,4	1,45 – 2,57	25,0 ± 3,0 (PN) e 30,0 ± 2,0 (Amx)	96,0 (PNA) e 60,0 (Amx)	PN (30 min óxico e 10 min anóxico)

Notas – NI: não informado; Amx: processo anammox; SAD: processo anammox e desnitrificação simultâneos; MO: matéria orgânica; OD: oxigênio dissolvido; DQO: demanda química de oxigênio; ERN: eficiência total de remoção de nitrogênio (%); * DQO/N: Valores calculados considerando a adição de nitrito.

2.5.3 Composição de MO (DQOrb e DQOlb)

A composição de MO influencia diretamente na biodisponibilidade de CO para o processo de digestão anaeróbia (CHERNICHARO et al., 2015). A matéria orgânica rapidamente biodegradável (DQOrb), proveniente da digestão anaeróbia, e a hidrólise da matéria orgânica lentamente biodegradável (DQOlb), que ocorre principalmente em temperaturas mesofílicas (HOW et al., 2020), podem favorecer a desnitrificação heterotrófica e o crescimento de HB no reator PNA.

Efluentes anaeróbios podem conter parcela considerável de MO que permanece na forma de DQOrb, geralmente na forma de AGVs, por exemplo, acetato e propionato, e DQOlb, também descrita na literatura como material particulado (SHENG et al., 2020). A presença de compostos orgânicos pode, inclusive, favorecer o enriquecimento de bactérias anammox, como acetato para *Ca. Brocadia Fulgida* (JENNI et al., 2014; KARTAL et al., 2008), propionato para *Ca. Anammoxoglobus propionicus*, e formiato para *Ca. Brocadia anammoxidans*, *Ca. Kuenenia stuttgartiensis* e *Ca. Anammoxoglobus propionicus* (KARTAL et al., 2007). Jenni et al. (2014) realizaram a substituição de acetato por glucose e não detectaram alteração da atividade de *Ca. Brocadia Fulgida*, sugerindo que este tipo de AMX pode competir com HB na presença de outros tipos de MO, desde que não sejam compostos tóxicos.

A fração de DQOlb pode ser dividida em substrato coloidal e substrato granular, sendo que ambas são biodegradáveis (ZHANG et al., 2021c). Entretanto, DQOlb geralmente corresponde a moléculas orgânicas complexas e precisam ser decompostas por enzimas extracelulares antes de serem utilizadas pelas células (ZHANG et al., 2021c), o que limita a desnitrificação heterotrófica. Bunse et al. (2020), por exemplo aferiram que a fração DQOrb correspondeu a 60% da matéria orgânica por meio da comparação da DQO solúvel afluente e efluente à ETE tratando esgoto sanitário. How et al. (2019) verificaram que DQOlb pode representar $51 \pm 10\%$ da concentração de DQO total em esgotos sanitários.

Para avaliar o potencial de desnitrificação de DQOlb, pode-se realizar testes para avaliar a velocidade de remoção dos compostos. Peng et al., (2007) fizeram testes de batelada em ambiente anóxico para identificar a taxa de desnitrificação para DQOlb na forma de amido, e para DQOrb na forma de etanol, acetato e metanol. Eles verificaram que a taxa de desnitrificação para DQOlb foi de apenas $0,74 \text{ mgN.gSSV}^{-1}.\text{h}^{-1}$ enquanto para os testes com etanol, acetato e metanol foi de 9,6; 12,0; e 3,2 $\text{mgN.gSSV}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente. Sendo assim, o processo anammox poderá ser mais ou menos impactado pela composição do efluente

anaeróbio e da capacidade das heterotróficas em competir com anammox por substrato, no caso, nitrito.

A presença de MO nem sempre causa instabilidade do processo PNA. Em Malovanny et al. (2015), esgoto sanitário real da ETE de Estocolmo, Finlândia, foi tratado previamente em reator UASB (DQO total = 49 - 106 mg O₂.L⁻¹, DQO solúvel = 44 - 88 mg O₂.L⁻¹ e 35 - 50 mgN-NH₄⁺.L⁻¹) para condução do processo *mainstream* PNA em reator IFAS com controle de temperatura a 25°C. Os autores relataram que a redução de DQO solúvel/N de 1,8 ± 0,2 para 1,3 ± 0,1 diminuiu a ERN de 70 ± 4% para 52 ± 4%. Assim, eles concluíram que a presença de DQO solúvel era benéfica à remoção de nitrogênio em sistema PNA tratando efluente anaeróbio de esgoto sanitário.

A concentração da grande maioria dos compostos orgânicos presente em água residuárias não inibe a atividade das AMX, mas alguns álcoois, aldeídos, fenóis e antibióticos podem inibir a atividade enzimática e proteica, em alguns casos, de forma irreversível. O metanol, por exemplo, na concentração de 0,5 mmol (~0,16 mg.L⁻¹) inibe completamente as AMX. Em contrapartida, propionato na concentração de 4,0 mmol (~0,18 mg.L⁻¹) favorece a desnitratação heterotrófica em reator anammox (GÜVEN et al., 2005).

Aquino et al. (2009) utilizaram dois reatores UASB para tratar esgoto doméstico bruto com concentrações médias de DQO oscilando de 323 a 467 mgO₂.L⁻¹. Cerca de 30 a 70 mgO₂.L⁻¹ permaneceu nos efluentes UASBs como fração DQO solúvel inerte. Surfactantes, que são compostos recalcitrantes à degradação anaeróbia, estão entre as substâncias orgânicas que podem ter contribuído para a DQO solúvel inerte (6 a 12 mg O₂.L⁻¹). Os autores citados ainda relataram que a maioria do DQO solúvel de ambos os reatores não é devido aos AGVs, mas sim aos compostos orgânicos do afluente não degradados no reator (DQO inerte) e aos compostos produzidos pela biomassa (DQO produzido).

Ruscalleda et al. (2008), utilizaram biomassa granular anammox para tratar lixiviados provenientes do processo PN e observaram que a predominância de DQO_{lb} ao invés de DQO_{rb} limitaram o crescimento de HB. Os pesquisadores constataram que 85% da remoção de nitrogênio ocorreu via anammox e apenas 15% via desnitrificação heterotrófica.

2.5.4 Temperatura, pH e alcalinidade

A temperatura é considerada um dos principais fatores que inviabilizam a aplicação do processo *mainstream* anammox para tratamento de águas residuárias, reduzindo não só a atividade das AMX, mas também a estabilidade do processo PN (ZUO et al., 2023). Em

ambientes naturais, as bactérias anammox (AMX) já foram detectadas no intervalo de temperatura de -30°C a até 80°C (KOUBA et al., 2022; ZHU et al., 2015), mas o metabolismo das AMX apresenta ótima atividade a temperatura de 37°C (GAO; TAO, 2011) e entre 30 e 37°C (LOTTI et al., 2015). Os trabalhos avaliados em Qiu et al., (2021), indicam que temperaturas inferiores a 20°C , e especialmente inferiores a 15°C , dificultam a estabilização do processo PNA, com alta variação da ERN (4-82%) e da CNVR ($5-700 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), gerando efluentes de má qualidade ($20-50 \text{ mgN-NH}_4^+\cdot\text{L}^{-1}$). Abaixo de 10°C , a aplicação do processo *mainstream* PNA parece ser um obstáculo intransponível, e assim, inviável para muitas regiões (LI et al., 2018).

Fernandes et al. (2018) suplementaram nitrito para observar os efeitos da temperatura na aplicação do processo anammox recebendo esgoto sanitário doméstico pré-tratado anaerobiamente. Eles observaram diferença estatística significativa da remoção de amônia e nitrito na condução do processo anammox a temperatura de 20°C em comparação a realização do processo anammox a 35 e 25°C . Além disso, a temperatura de 20°C , houve maior remoção de nitrito via desnitrificação heterotrófica do que a 35 e 25°C , sendo de $15,9$; $12,5$; e $9,4 \text{ mgN-NO}_2^-\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. A redução de 25 para 20°C também aumentou a razão $\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$ de $1,70$ para $1,96$, respectivamente, e reduziu a abundância relativa do principal grupo de bactérias anammox encontrado (*Ca. Anammoximicrobium*) de $2,3\%$ para $0,4\%$.

A aclimação da biomassa pode amenizar os problemas da redução da temperatura. Em Cheng et al. (2020), a alteração direta da temperatura de 35°C para 15°C fez com que a taxa de remoção de nitrogênio via processo anammox fosse reduzida de $9,5$ para $3,6 \pm 0,2 \text{ kgN}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ (62% de queda), enquanto a redução gradativa de 35 para 25 e finalmente para 15°C fez com que a taxa de remoção de N fosse de $7,0 \pm 0,3 \text{ kgN}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ (26% de queda). A alteração também foi feita em relação à condição *sidestream* (35°C) para *mainstream* (15°C), onde as concentrações de amônia e nitrito foram reduzidas de $280 \text{ mgN-NH}_4^+\cdot\text{L}^{-1}$ e $280 \text{ mgN-NO}_2^-\cdot\text{L}^{-1}$ para $30 \text{ mgN-NH}_4^+\cdot\text{L}^{-1}$ e $40 \text{ mgN-NO}_2^-\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente.

Segundo How et al. (2019), as temperaturas elevadas das águas residuárias em regiões tropicais favorece a hidrólise de partículas sólidas sedimentáveis (PSS) em DQO_{1b}, que por sua vez, contribui na desnitrificação. Ainda segundo os autores, a taxa de conversão de PSS em DQO_{1b} é $2,5$ vezes maior quando a temperatura de 30°C do que a 20°C .

Os valores de pH influenciam diretamente nas reações enzimáticas ou indiretamente por deslocar o equilíbrio de compostos nitrogenados formando amônia livre (AL) e ácido nitroso livre (ANL) (LIU et al., 2020). Stamatopoulou (2019) verificou que o uso de gás N_2 (100%),

ao invés da mistura de gases N_2 e CO_2 (95/5%) para controle anóxico de dois reatores MABR, provocou a expulsão do carbono inorgânico dissolvido e aumentou o pH de 7,5 para 8,5. Picos de AL de 17,1 e 11,3 $mgNH_3.L^{-1}$ e a exposição de ambos os reatores a valores de 4,7 $mgNH_3.L^{-1}$ por 40 dias, foram considerados fortes indícios da instabilidade do processo PNA, pois as anammox podem ser inibidas com apenas 2 $mgNH_3.L^{-1}$. Contudo, um estudo realizado por Puyol et al. (2014) observou que o processo anammox é mais prejudicado por valores de pH elevados do que propriamente pela composição de AL. No trabalho citado, o valor de pH de $6,97 \pm 0,13$ é ótimo às anammox. Valores de 7,6 podem ser praticados com possível redução da atividade AMX em 10%, mas acima de 8,45 podem ser extremamente prejudiciais. O controle de pH em escala plena a partir do uso de produtos químicos deve ser evitado, pois é considerado economicamente inviável (XU et al., 2015).

A alcalinidade na forma de carbono inorgânico (CI) é indispensável aos processos quimiolitotróficos do sistema PNA, em especial no processo PN em que há consumo de alcalinidade e conseqüente redução de pH. Yeshe et al. (2016), por exemplo, demonstraram que a fase aeróbia seguida da fase anóxica reduz a alcalinidade e pH de 80 para 20 $mgCaCO_3.L^{-1}$ e de 7,0 para 6,0, respectivamente. Essa redução pode impactar o processo PNA uma vez que a alcalinidade teórica da água residuária deve ser na ordem de 3,6 $mgCaCO_3.(mgN-NH_4^+)^{-1}$ (SLIEKERS et al., 2002). Além disso, a falta de alcalinidade pode aumentar a produção de N_2O via AOB (PENG et al., 2015). Sendo assim, a adição de carbonatos, como $NaHCO_3$, pode ser necessária para controlar a alteração da alcalinidade, evitando quedas abruptas de pH (SALMISTRARO et al., 2017) reduzindo a probabilidade de emissão de N_2O .

A presença de alcalinidade a bicarbonato em efluentes anaeróbios tratando esgoto sanitário foi apresentada por alguns estudos, sendo reportados valores de 170 $mgCaCO_3.L^{-1}$ (FERNANDES et al., 2018), 156,8 – 221,3 $mgCaCO_3.L^{-1}$ (SILVA et al., 2018) e 237 $mgCaCO_3.L^{-1}$ (BRESSANI-RIBEIRO et al., 2021). O consumo de alcalinidade a bicarbonato em relação ao consumo de amônia ($CaCO_3/N-NH_4^+$) para sistemas PNA tem sido observado em valores mais reduzidos de 4,1 (VENTURINI, 2022) do que para a ND de 7,1 (BRESSANI-RIBEIRO et al., 2021). Considerando a concentração de 25 $mgN-NH_4^+.L^{-1}$ reportada para o cenário brasileiro e a relação de 4,1 $CaCO_3^3/N-NH_4^+$, os valores de alcalinidade reportados seriam suficientes para a ocorrência do processo *mainstream* PNA para tratar esgotos sanitários pré-tratados em reatores anaeróbios.

2.5.5 Concentração de OD e tempo de aeração

O controle da aeração e das concentrações de oxigênio dissolvido (OD) parecem ser as estratégias mais viáveis para estabilizar o processo *mainstream* PNA sequencialmente ao reator UASB em regiões de clima quente (AZEVEDO et al., 2021). Praticamente todos os trabalhos que obtiveram estabilidade do processo *mainstream* PNA foram com concentração de OD inferior a $0,50 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ (CAO et al., 2023). Contudo, manter reduzida concentração de OD não garante a estabilidade do processo *mainstream* PNA, uma vez que alguns trabalhos fracassaram mesmo com reduzidos valores de OD, por exemplo, Miao et al. (2016) operando o processo PNA com OD de $0,17 \pm 0,08 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$.

Simulando a ETE de Singapura, Yeshi et al. (2016) implementaram a aeração intermitente com OD controlado entre $1,5$ e $2,0 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ e temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, semelhante à condição em escala plena. Mesmo com alta relação DQO/N de $11,0$ ($23,4 \text{ mgN-NH}_4^+\cdot\text{L}^{-1}$ e $330 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$), os autores obtiveram elevada ERN de 82% , sendo que o processo anammox contribuiu com 62% da remoção de nitrogênio.

Wett et al. (2013) demonstraram experimentalmente que a atividade de AOB foi 15% superior as NOB quando a concentração de OD foi de $1,5 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$. Além de aumentar a fase *lag* de atuação de NOB, observou-se que a aeração intermitente pode formar compostos intermediários inibidores às NOB, como o óxido nítrico. Retomar a aeração após ser cessada, faz com que AOB recuperem-se mais rapidamente do que as NOB (GILBERT et al., 2014). Além disso, as NOB não podem competir por nitrito com AMX na ausência de oxigênio (JUAN-DÍAZ et al., 2021). Sendo assim, a aeração intermitente, em comparação a aeração constante, além de reduzir a atividade NOB, evita a inibição da atividade AMX e reduz o consumo energético.

As bactérias anammox são estritamente anaeróbias, mas podem recuperar sua atividade de forma reversível pela presença de oxigênio, uma vez que oxigênio atua como agente bacteriostático, mas não como agente bactericida. Yan et al. (2020) expuseram as bactérias anammox à concentração de OD de $2,00 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ por 90 min , e após reduzirem a concentração de OD para $< 0,05 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ com purga de N_2 , verificaram que 40% da atividade das bactérias anammox não pode ser recuperada ao longo de 120 min , estipulados no estudo para promover a recuperação da atividade microbiana.

A aeração limitada com reduzidas concentrações de OD ($< 0,50 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$) pode fazer com que ocorra a proliferação de bactérias comammox (HOW et al., 2019; ROOTS et al., 2019; YANG et al., 2023). Yang et al. (2023), por exemplo, identificaram que as comammox

contribuíram para a elevada produção de nitrato em relação à amônia consumida ($87 \pm 6\%$) mesmo com aeração controlada ($OD = 0,15-0,35 \text{ mgO}_2.L^{-1}$). A afinidade por amônio ($K_{NH_4^+}$) em bactérias comammox ($K_{NH_4^+} = 0,012 \text{ mgN.L}^{-1}$) é superior às AOB ($K_{NH_4^+} = 0,48-1,62 \text{ mgN.L}^{-1}$) e AMX ($K_{NH_4^+} = 0,07-0,39 \text{ mgN.L}^{-1}$), o que favorece a ocorrência da oxidação completa de amônia ao invés da nitrificação parcial-anammox.

A importância da aeração atrelada à longa fase *lag* para NOB em comparação às AOB foi demonstrada no trabalho de Gilbert et al. (2014). Eles comprovaram que em curtos períodos anóxicos de apenas 13 min, combinado com curta fase óxica de 5 a 15 min (dependendo da espécie de *Nitrospira spp.*), parece ser suficiente para produzir nitrito ao invés de nitrato.

Zhang et al. (2021b) identificaram que a aeração intermitente com controle de DO em $0,7 \pm 0,3 \text{ mgO}_2.L^{-1}$ durante a fase aerada (4 a 7 h) e fase anóxica (3 h) tiveram papel fundamental para promover a estabilidade do processo *mainstream* PNA tratando esgoto sanitário (diluído em 50, 25 e 0%) para obter alta ERN de 86%. Além disso, eles destacam o inóculo de biomassas com elevada atividade específica de AOB e sem atividade anammox, para promover o enriquecimento da biomassa anammox (*Ca. Brocadia*) em biofilme.

Uma desvantagem importante do processo PNA com aeração intermitente diz respeito a produção de N_2O . A mudança repentina de aeração reduz a atividade de AOB, aumentando a fase *lag* da enzima óxido nitroso redutase, resultando no acúmulo e emissão de N_2O (QIU et al., 2020a).

2.5.6 Amônia livre (AL) e ácido nitroso livre (ANL)

Considerando que os esgotos sanitários pré-tratados em reatores anaeróbios contêm baixa concentração de amônio ($30 - 70 \text{ mgN-NH}_4^+.L^{-1}$) e apresentam valores de pH próximo a neutralidade, as concentrações de amônia livre (AL) na forma de NH_3 e ácido nitroso livre (ANL) na forma de HNO_2 são mínimas, e, neste caso, a supressão de NOB é inviável. A inibição de NOB quando na presença de AL e ANL pode configurar estratégia para promover a estabilidade em reatores *sidestream* PNA, mas não para as condições *mainstream* tratando esgoto sanitário. Feng et al. (2022), tratando esgoto sanitário com concentrações entre 46,6 e 51,7 $\text{mgN-NH}_4^+.L^{-1}$, calcularam valores máximos de 0,11 $\text{mgNH}_3.L^{-1}$ para AL e 0,015 $\text{mgHNO}_2.L^{-1}$ para ANL, os quais não foram atribuídos à inibição de NOB (ANTHONISEN et al., 1976; DUAN et al., 2020). As NOB podem ser inibidas com concentrações de 0,1 – 3,3 $\text{mgNH}_3.L^{-1}$ para AL e 0,22 – 2,8 mgHNO_2 para ANL, enquanto AOB podem ser inibidas com

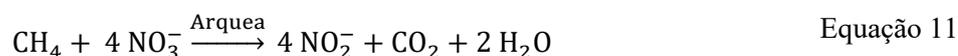
10 – 150 mgNH₃.L⁻¹ e 0,16 mgHNO₂⁻, respectivamente (ANTHONISEN et al., 1976; DUAN et al., 2019). Portanto, a AL configura melhor inibidor às NOB do que ANL.

Uma alternativa para aplicar a estratégia de inibição de NOB a partir da exposição de AL e ANL pode ser feita *ex situ* ao reator, no qual parte considerável da biomassa é drenada e exposta às concentrações inibitórias de ambos compostos de forma alternada (DUAN et al., 2019). A alternância de exposição de AL e ANL também configura estratégia para supressão de NOB adaptadas as concentrações elevadas de ambos inibidores alternada (DUAN et al., 2019), como ocorrido no estudo avaliado por Ma et al. (2017).

2.5.7 Metano dissolvido

Efluentes de digestores anaeróbios comumente contêm metano dissolvido (CH₄ dis) na ordem de 45% de todo metano gerado (LIU et al., 2014). Contudo, este valor apresenta ampla variedade, podendo oscilar entre 11 e 100% (CRONE et al., 2016). Para efluentes de UASB tratando esgoto sanitário doméstico, por exemplo, o CH₄ dis pode representar cerca de 36 a 41% com concentrações de 13 a 25 mgCH₄ dis.L⁻¹ (AZEVEDO et al., 2021; SOUZA et al., 2011). A porcentagem de CH₄ dis é inversamente proporcional à temperatura, sendo que temperaturas mais frias contribuem para o aumento de CH₄ dis. A emissão de CH₄ em ETEs corresponde a 5% de todas as fontes de metano (CRONE et al., 2016), podendo ocorrer por meio do *stripping* de CH₄ dis em sistemas aerados (LIU et al., 2019), o que contribui para a poluição atmosférica, uma vez que o gás CH₄ é considerado de 25 a 34 vezes mais poluente do que o CO₂ e pode permanecer na atmosfera por 100 anos.

A remoção de CH₄ dis pode ser efetuada por culturas desnitrificantes que realizam o processo de oxidação anaeróbia de metano dependente de nitrito ou nitrato (N-Damo, *nitrite/nitrate-dependent anaerobic methane oxidation*) (HARB et al., 2021). Bactérias ou arqueias N-Damo podem utilizar NO₂⁻ ou NO₃⁻, respectivamente, e CH₄ dis corresponde ao doador de elétrons (Equação 10 e Equação 11) (LIU et al., 2019). No caso das arqueias metanotróficas, pode-se destacar a espécie *Ca. Methanoperedens nitroreducens*, que atua sob condições anaeróbias (HARB et al., 2021).



Conforme apresentado na Equação 11, as arqueias N-Damo podem aumentar a disponibilidade de NO_2^- , favorecendo a atuação das AMX. Em contrapartida, as bactérias N-Damo, podem disputar com AMX por NO_2^- . O uso de reatores de biofilme de membrana (MBfR) é uma alternativa para cultivo de N-Damo, no qual pode-se reaproveitar o CH_4 gasoso no reator MBfR (LIU et al., 2019; XIE et al., 2018), ao invés de ser queimado em *flare*, como normalmente ocorre em ETEs brasileiras para reduzir seu potencial poluidor (CHERNICHARO et al., 2015).

No trabalho realizado por Xie et al. (2018), esgoto sintético, contendo $25,0 \text{ mgN-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ e $26,5 \text{ N-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$, foi tratado em reator MBfR, submetido a CNVR de $0,2 \text{ kgN} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ e TDH de 6,0 a 9,0 h. O reator apresentou bom desempenho, produzindo efluente com $\text{TN} < 5,0 \text{ mgN} \cdot \text{L}^{-1}$, associado à atividade de AMX e Damo arqueia, que contribuíram para remover 90% e 10% de nitrogênio, respectivamente.

Apesar da possibilidade de se combinar as culturas AMX e N-Damo, mais esforços são necessários para demonstrar a viabilidade da aplicação de sistemas que removam nitrogênio de forma autotrófica a partir do uso de metano dissolvido (LIU et al., 2019).

2.5.8 Sulfeto

O sulfato (SO_4^{2-}), presente em esgotos sanitários, quando submetido a ambiente anaeróbio, é reduzido a sulfetos (S^{2-} e HS^-) ou hidrogeno sulfeto (H_2S), gás de odor indesejado, altamente tóxico e precursor do ácido sulfúrico (H_2SO_4), sendo altamente corrosivo às instalações das ETEs (CHERNICHARO et al., 2015; VELA et al., 2015). A concentração de sulfetos em efluente anaeróbios tratando esgoto sanitário varia muito, sendo reportado valores entre 3 e $184 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ (expresso como equivalente de DQO) (VELA et al., 2015) e sulfeto dissolvido com concentração de 5 a $22 \text{ mgS}^{2-} \cdot \text{L}^{-1}$ (AZEVEDO et al., 2021). Manter o pH alcalino previne a formação de H_2S ($\text{pK}_a = 7,04$), que é mais tóxico às bactérias do que S^{2-} (O'NEIL, 2006). No reator PNA, sulfeto e nitrato podem ser concomitantemente removidos por meio da desnitrificação parcial, o que aumenta a disponibilidade de nitrito para o processo anammox (LIU et al., 2015).

Os testes de atividade específica realizados por Carvajal-Arroyo et al. (2013) demonstraram que baixas concentrações de H_2S de 0,32 mM ou 0,90 mM podem causar completa inibição na biomassa anammox suspensa ou reduzir a atividade em 24% na biomassa granular, respectivamente. No trabalho realizado por Liu et al. (2015), por exemplo, um reator anaeróbio alimentado com efluente sintético contendo amônio, nitrato e sulfeto, com razão de

S-H₂S/N-NO₃⁻ de 1,31, promoveu a remoção de 99% de sulfeto e de nitrato, e 97% de amônio. Baseado nos exemplos supracitados, pode-se afirmar que mais estudos precisam elucidar o papel de sulfetos no desempenho do processo PNA.

2.5.9 Fosfato

Reatores anaeróbios não promovem a remoção de fosfato (PO₄³⁻), inclusive, podem aumentar sua biodisponibilidade nos efluentes anaeróbios a partir do desprendimento biótico ou abiótico de fosfato, resultando em concentrações que variam de 1 a 20 mgP.L⁻¹ (VELA et al., 2015). Entretanto, a presença de fosfato (P-PO₄³⁻ < 3,09 mg.L⁻¹) causa pouca inibição às bactérias anammox, sendo que a inibição é mais proeminente na biomassa suspensa do que na granular (CARVAJAL-ARROYO et al., 2013). A remoção de fósforo e nitrogênio em um reator *mainstream* PNA foram avaliadas recentemente por Guo et al. (2023), onde as eficiências máximas de remoção de nitrogênio e fósforo foram obtidas nas temperaturas de 25 e 15°C, sendo de ERN = 67,9 ± 8,5% e PRE = 62,7 ± 13,9%, respectivamente. Apesar da adição de compostos de ferro e cálcio, foi possível obter 5,8% de pentóxido de fósforo (P₂O₅) na composição do lodo formado, sendo considerado suficiente para o uso como fertilizantes em terras agricultáveis.

2.5.10 Salinidade

Apesar das anammox serem responsáveis por até 50% da produção de nitrogênio em ambientes marinhos (KARTAL et al., 2010), a salinidade pode influenciar no processo anammox (CHO et al., 2019; LIU et al., 2023). Zhang et al. (2022) verificaram a viabilidade de se tratar esgoto doméstico (~50 mgN-NH₄⁺.L⁻¹), em meio contendo amônia e nitrito, com diferentes concentrações salinas (NaCl) para avaliar o potencial uso do processo anammox para tratar esgoto de cidades costeiras, onde a salinidade é maior do que em cidades interioranas. A salinidade de 1-5 g.L⁻¹ pouco interferiu na atividade específica das anammox (SAA), mas 10-40 g.L⁻¹ reduziu a SAA em 38%, apesar da abundância relativa de *Ca. Kuenenia* ter aumentado de 30,1 para 52,3%. Em elevadas concentrações salinas, de 50-60 g.L⁻¹, os autores citados observaram que as AMX foram severamente inibidas (zero de atividade), e a abundância relativa de *Ca. Kuenenia* foi de 11,9%.

Cho et al. (2019) reuniram diversas pesquisas para investigar o desempenho do processo anammox sob diferentes concentrações salinas até 75 gNaCl.L⁻¹, e na grande maioria dos casos

reportados houve inibição do processo anammox. Contudo, alguns trabalhos reportaram que a salinidade entre 5 e 15 g.L⁻¹ pode cooperar na agregação da biomassa, formando biofilmes densos e até mesmo aumentando a ERN.

As pesquisas avaliando o processo anammox para o tratamento de esgoto doméstico com águas salinas são escassas (ZHANG et al., 2022). Entretanto, em um recente estudo de Huang et al. (2023) obtiveram ótimos resultados com a adoção do processo *mainstream* PNA para tratar esgoto doméstico salino CEPT pré-tratado contendo $1,1 \pm 0,1\%$ de salinidade, $21,5 \pm 5,1$ mgN.L⁻¹ de amônia e $142,3 \pm 35,5$ mgO₂.L⁻¹ de matéria orgânica. Sem inocular biomassa anammox enriquecida e sem controle de temperatura (14,5 - 34,5°C), mas com rígido controle de aeração (OD = $0,08 \pm 0,03$) e de pH (adição automática de carbonato de sódio quando pH = 7,2), o reator apresentou, por 180 dias de operação contínua, ERN de $66,8 \pm 11,4 \%$ e ERDQO superior a 90%. O efluente apresentou alta qualidade com DBO < 10 mgO₂.L⁻¹, DQO < 20 mg O₂.L⁻¹, SST < 30 mg.L⁻¹, amônia < 5 mgN-NH₄⁺.L⁻¹ e NIT < 10 mgN.L⁻¹. Os autores destacaram que as NOB não foram lavadas do sistema, mas sim inibidas, pois apesar de serem detectadas, não interferiram na estabilidade do processo PNA.

2.5.11 Outros interferentes

Alguns metais, na forma de micronutrientes, contribuem para as funções metabólicas das AMX favorecendo seu crescimento (VAN DE GRAAF et al., 1996), contudo, dependendo da concentração, a exposição a determinados metais faz com que sejam tóxicos. Segundo Cho et al. (2019), os principais metais tóxicos investigados são cádmio, chumbo, cobre, mercúrio, prata e zinco. Os autores também destacam que a importância de avaliar se a água residuária a ser tratada possui compostos orgânicos que podem ser tóxicos às AMX, como álcoois, fenóis e antibióticos. Além dos parâmetros mencionados, surfactantes, microplásticos, substâncias húmicas e nanopartículas também podem inibir as AMX (MADEIRA; DE ARAÚJO, 2021).

2.6 Aspectos técnico-operacionais para otimização do processo *mainstream* PNA

O monitoramento da temperatura, pH, OD, carga orgânica e fonte de carbono podem auxiliar a promover a estabilidade do processo *mainstream* PNA em escala plena (CHO et al., 2019). O fornecimento de oxigênio deve ser feito preferencialmente de forma automatizada (LI et al., 2018), e se possível com controle online em tempo real (WEN et al., 2017).

O sistema de controle inteligente com foco na aeração e controle das concentrações de OD e amônio, representa uma alternativa que permite atender às barreiras do processo *mainstream* PNA. Nesta alternativa, a aeração mantém o valor de OD alvo, e é interrompida assim que o valor de amônia começa a ser reduzido (QIU et al., 2020a). Entretanto, deve-se atentar a alteração da alcalinidade como sistema tampão ao processo PNA. Além disso, tal estratégia demanda extensiva medição online, pessoal altamente qualificado para calibração de sondas (QIU et al., 2020a).

As principais soluções e aspectos técnico-operacionais propostas para a estabilização do processo *mainstream* PNA para efluentes anaeróbios em ETEs municipais são:

- Medição online e constante da temperatura, pH e OD, com controle flexível da aeração intermitente e concentração de OD (QIU et al., 2020a), por exemplo, com controle automatizado da aeração com controlador de fluxo de massa, baseado no sistema controle de programação lógica (PLC) ou de redes neurais (WEN et al., 2017);
- Controle do tempo de retenção dos sólidos (TRS) com retenção de grânulos e descarte de flocos, por exemplo, com uso de hidrociclones e/ou peneiras (LAURENI et al., 2019; WETT et al., 2015);
- Inóculo de biomassa PNA com alta atividade específica de AOB (ZHANG et al., 2021b) e AMX, de forma a acelerar o *startup*, promovendo bioaumento e aclimação da biomassa (MADEIRA; DE ARAÚJO, 2021; WETT et al., 2013);
- Avaliação periódica da atividade específica das bactérias AMX, AOB e NOB (CHEN et al., 2019a; LAURENI et al., 2019).

Diante das informações apresentadas, pode-se inferir que o processo *mainstream* PNA tem potencial para ser aplicado em regiões de clima quente onde reatores anaeróbios são utilizados para tratar esgoto sanitário e removem, consideravelmente, a parcela orgânica carbonácea. Contudo, é preciso que uma série de estratégias sejam adotadas de forma conjunta para inibir a atividade NOB, e concomitantemente não prejudicar ou minimizar o prejuízo do sintrofismo entre AMX, AOB e HB, e assim, obter a estabilidade do processo *mainstream* PNA. Neste contexto, a presente pesquisa teve como principal objetivo avaliar o desempenho dos processos de nitrificação parcial – anammox (PNA) visando sua aplicação para condições *mainstream* presentes em esgoto doméstico anaerobiamente pré-tratado em regiões de clima quente. Além disso, avaliou-se o efeito da adição de matéria orgânica complexa (rapidamente e lentamente biodegradável) presente em efluentes anaeróbios na remoção de nitrogênio via

PNA e na atividade específica das bactérias anammox. Para os estudos propostos, foi utilizada água residuária sintética simulando efluente de reator anaeróbio tratando esgoto doméstico. Essa estratégia permitiu flexibilizar as concentrações dos compostos, permitindo contemplar uma gama de efluentes anaeróbios e avaliar sua influência na biodinâmica dos processos PNA. Foram utilizados três reatores de alimentação contínua de fluxo ascendente com inóculo de biomassa granular anammox, um reator de batelada sequencial com inóculo de biomassa granular PNA, além de diversos reatores do tipo batelada com inóculo de biomassa anammox.

3 Hipóteses e Objetivos

As hipóteses e objetivos almejados nesta pesquisa foram reunidos na Tabela 7.

Tabela 7 – Hipóteses e objetivos da presente pesquisa.

Item	Hipótese	Objetivo
Objetivo Geral	O processo de nitrificação parcial – anammox (PNA), em fluxo principal (<i>mainstream</i>), é eficiente e estável quando aplicado a efluente de reator anaeróbio tratando esgoto doméstico em regiões de clima quente.	Avaliar se o processo <i>mainstream</i> PNA em reator de estágio único apresenta desempenho eficiente e estável no tratamento de efluente anaeróbio de esgoto doméstico em temperatura mesofílica.
Objetivo Específico 1	As relações carbono orgânico e nitrogênio (CO/N), passíveis de serem encontradas em efluentes anaeróbios tratando esgoto sanitário doméstico, não prejudicam o processo anammox.	Identificar, por meio de testes em batelada, qual intervalo CO/N passível de ser encontrado em efluentes anaeróbios tratando esgoto sanitário doméstico, permite a ocorrência do processo anammox.
Objetivo Específico 2	A diminuição gradativa da concentração de nitrogênio e da temperatura não comprometem a eficiência de remoção de nitrogênio (ERN), via processo anammox, quando se mantém elevada carga aplicada nitrogenada volumétrica (CNVA).	Obter elevada ERN via processo anammox por meio de reduções gradativas das concentrações de nitrogênio (230 → 50 mgN.L ⁻¹) e da temperatura (37 → 25°C), mantendo-se elevada CNVA (> 1,0 kgN.m ⁻³ .d ⁻¹).
Objetivo Específico 3	A biomassa anammox, enriquecida e adaptada às condições <i>mainstream</i> tratando esgoto doméstico, pode realizar, de forma eficiente, o processo PNA em reator de estágio único sem inocular lodo nitrificante.	Promover a estabilidade do processo PNA utilizando-se de biomassa anammox adaptada às condições <i>mainstream</i> tratando esgoto sanitário doméstico (25 mgN.L ⁻¹ e 25°C) sem uso de biomassa nitrificante.
Objetivo Específico 4	A aeração intermitente automatizada (AIA) e a baixa concentração de oxigênio dissolvido (OD) promovem a estabilidade do processo PNA em reator de estágio único quando o influente contém baixas concentrações de nitrogênio, na ausência de matéria orgânica (MO) e a temperatura mesofílica.	Promover a estabilidade do processo <i>mainstream</i> PNA operado com AIA, baixo teor de OD (0,01 – 0,20 mgO ₂ .L ⁻¹), reduzida concentração de nitrogênio (25 mgN.L ⁻¹), sem MO e na temperatura de 25°C.
Objetivo Específico 5	A MO complexa, presente em efluentes de reatores anaeróbios tratando esgoto doméstico em países de clima quente, não prejudica o processo <i>mainstream</i> PNA.	Avaliar se a MO complexa influencia no desempenho do processo <i>mainstream</i> PNA em função da ERN e da eficiência de remoção de MO.

4 Material e Métodos

A pesquisa foi dividida em quatro fases operacionais. O processo de oxidação anaeróbia de amônia (Anammox) foi realizado nas Fases I e II, e o processo de nitrificação parcial-anammox (PNA) foi realizado nas Fases III e IV (Tabela 8). A Fase I foi dividida em Fase I_A e Fase I_B, com operação de reator contínuo e reatores em batelada, respectivamente.

Tabela 8 – Principais características das fases operacionais para condução desta pesquisa.

Fase	Processo alvo	Tipo de reator	T	N	CO	CO/N	Tipo de MO	Vol. útil	TDH	Tempo
Uni.	-	-	°C	mgN. L ⁻¹	mgO ₂ . L ⁻¹	-	-	L	h	d
I _A	Amx	Contínuo (R1)	37	232	-	-	-	6,5	4	671
I _B	Amx	Batelada	37	9↔51	0↔206	0↔11,7	Acetato	0,3	*	*
II	Amx	Contínuo (R2)	37→25	232→50	-	-	-	1,0	4→1	82
III	PNA	Contínuo (R3)	25	50	-	-	-	2,5	1	26
IV	PNA	RBS (R4)	25	25	0→50 →100	0→2 →4	Complexa ^a	3,5	12	169

Notas - * A depender do ensaio em batelada; Amx: oxidação anaeróbia de amônia; PNA: nitrificação parcial-anammox; RBS: reator em batelada sequencial; T: temperatura; N: nitrogênio; CO: carbono orgânico; MO: matéria orgânica; TDH: tempo de detenção hidráulica; ^a Complexa: matéria orgânica lentamente biodegradável (DQO_{lb}) e rapidamente biodegradável (DQO_{rb}).

As Fases I, II e III foram realizadas no Laboratório de Processos Biológicos (LPB) da Universidade de São Paulo (USP), São Carlos, Brasil. A Fase IV foi realizada no Laboratório de Águas da Universidade de Tecnologia de Delft (TUD), Delft, Holanda. Todos os reatores utilizados nesta pesquisa eram de escala de bancada e foram alimentados com efluentes sintéticos, de forma a poder limitar a interferência causada pela variabilidade dos esgotos sanitários, e assim, melhor identificar os bioprocessos alvos deste estudo. As dimensões e detalhes técnicos dos reatores, bem como as equações utilizadas para realização de cálculos específicos (TDH, CNVR, ERN, etc.) podem ser observados no Apêndice A. Os métodos analíticos foram apresentados no tópico 4.5.

4.1 Fase I

O principal objetivo da Fase I foi o de identificar o desempenho do processo anammox sob diferentes relações carbono orgânico/nitrogênio (CO/N) estas passíveis de serem

encontradas em efluentes de reatores anaeróbios tratando esgoto doméstico sanitário. Para tanto, foi preciso realizar o cultivo de biomassa granular anammox ativa. Sendo assim, a Fase I foi dividida em Fases I_A e I_B. Na Fase I_A, um reator anaeróbio de fluxo ascendente contínuo e manta de lodo (*upflow anaerobic sludge blanket*), denominado de R1, promovia o cultivo de biomassa granular anammox ativa. Posteriormente, na Fase I_B, vários reatores do tipo batelada foram inoculados com biomassa granular anammox ativa (proveniente da operação de R1), para avaliar os efeitos das diferentes relações CO/N e das baixas concentrações de nitrogênio, conforme apresentado na Tabela 8.

4.1.1 Fase I_A – Produção de biomassa granular anammox ativa

O *start-up* do reator (R1) foi previamente realizada por Pereira (2018). Ele inoculou lodo granular anammox originário do banco de microrganismos BRMSA 0323 alocado na Embrapa Suínos e Aves do município de Concórdia, Santa Catarina, Brasil. O reator R1 foi mantido sob operação antes mesmo do início da presente pesquisa nos âmbitos do LPB/USP. Na presente pesquisa, R₁ foi mantido sob operação para fornecer biomassa anammox ativa para a realização dos experimentos conduzidos no Brasil (Fases I, II e III).

R1, confeccionado com material acrílico transparente, foi operado com volume útil de 6,5 L, e mantido a 37°C, temperatura ótima às bactérias anammox (GAO; TAO, 2011). Uma câmara com aquecimento termostático (New Ethics, Brasil) permitia o controle da temperatura.

A alimentação foi feita com meio sintético baseado em van de Graaf et al. (1996). O meio sintético era preparado para que a relação nitrito/amônio afluente ($\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$) fosse próxima a relação estequiométrica do processo anammox de 1,32, primeiramente definida por Strous et al. (1998). As concentrações de amônio e de nitrito afluente deveriam ser próximas de 100 mgN-NH₄⁺.L⁻¹ e 132 mgN-NO₂⁻.L⁻¹, respectivamente, ou seja, a concentração de nitrogênio inorgânico total afluente (NIT) deveria ser próxima de 232 mgN.L⁻¹. Os produtos químicos e as respectivas concentrações aplicadas no preparo do meio sintético estão na Tabela 9. R1 foi operado com 4,0 h de TDH, 1,38 kgN.m⁻³.d⁻¹ de CNVA e 0,17 m.h⁻¹ de velocidade ascensional (V_a). As equações utilizadas para efetuar os cálculos foram apresentadas no Apêndice A (consultar Tabela A1).

Tabela 9 – Meio sintético para alimentar R1 e obter 100 mgN-NH₄⁺.L⁻¹ e 132 mgN-NO₂⁻.L⁻¹.

Composto a ser preparado	Produto químico	Concentração (g.L ⁻¹)
Meio sintético	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2958
	CaCl ₂ *	0,1332
	NaHCO ₃	0,8400
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,4714
	NaNO ₂	0,6506
	KH ₂ PO ₄	0,0272
	Micronutrientes I	1,00 **
	Micronutrientes II	1,25 **
Micronutrientes I	EDTA (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈)	5,00
	FeSO ₄	5,00
Micronutrientes II	EDTA (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈)	15,00
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,43
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,24
	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,99
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,25
	Na ₂ MoO ₄ .5H ₂ O	0,22
	NiCl ₂ .6H ₂ O	0,19
	Na ₂ SeO ₄ .10H ₂ O	0,21
	H ₃ Bo ₃	0,014

Notas - * CaCl₂ pode ser substituído por CaCl₂.2H₂O (0,1764 g.L⁻¹); ** unidade utilizada era mL.L⁻¹.
O meio sintético baseado em van de Graaf et al. (1996).

Após a diluição dos produtos químicos em água da torneira, o meio sintético era purgado com a mistura de argônio e gás carbônico (Ar/CO₂ = 95/5%) por cerca de 30 minutos ou até que a concentração de oxigênio dissolvido (OD) fosse igual ou inferior a 0,50 mgO₂.L⁻¹. A medição de OD era feita utilizando-se um medidor portátil acoplado a sonda (Hach®, Multi HQ40d, LDO101 – Alemanha). O meio sintético era preparado rotineiramente entre 15 e 30 dias. A cada dois preparos consecutivos, realizava-se o descarte do meio sintético remanescente, uma vez que o tanque de alimentação foi mantido a temperatura ambiente. O tanque de alimentação era cuidadosamente higienizado com auxílio de esfregões, água e sabão, e enxaguado antes do início do preparo de um novo meio sintético. Inicialmente foi utilizado uma caixa d'água de 1000 L como tanque de alimentação. Para reduzir o efeito de difusão de ar e aumento de OD, passou-se a utilizar uma bombona de 220 L e uma cortina de ar perfurada para homogeneizar a distribuição da mistura de gás argônio e carbônico (consultar Figura A1, Apêndice A).

Após o preparo do meio sintético, ligava-se a bomba de alimentação (Grundfos, DDC) era ligada ao final da purga, evitando que as bolhas de Ar/CO₂ prejudicassem o funcionamento da bomba e fossem inseridas no reator. O líquido remanescente nas mangueiras era descartado por cerca de 5 minutos. As mangueiras e os registros eram substituídos rotineiramente,

evitando, assim, problemas advindos do entupimento dos dispositivos. Um ímã do tipo de aquário foi colocado na parede interna do reator, e semanalmente era movimentado ao longo do reator para remover as bolhas, evitando a colmatação das grades de separação e a existência de caminhos preferenciais. Desta forma, o reator não era aberto e a biomassa não era exposta ao ar atmosférico.

As amostras afluente e efluente ao R1 eram coletadas de uma a três vezes por semana. Todas as amostras eram filtradas (0.45 μm) e analisadas após a coleta. As medidas de N-amônio, N-nitrito, N-nitrato, OD e pH eram realizadas conforme APHA (2017). A alcalinidade era realizada conforme Ripley et al. (2016). Os métodos analíticos foram detalhadamente descritos na tópico 4.5.

4.1.2 Fase I_B – Ensaios em batelada: efeito conjunto da relação CO/N e da baixa concentração de N

A biomassa granular anammox, enriquecida na Fase I_A, foi utilizada como inóculo aos reatores do tipo batelada para condução da Fase I_B. A biomassa granular anammox, era removida do reator contínuo (R1) e gentilmente enxaguada por três vezes com meio sintético (Tabela 9), porém, livre de amônia e nitrito. Este procedimento foi padronizado para evitar que as concentrações elevadas de amônia (100 mgN-NH₄⁺.L⁻¹) e nitrito (132 mgN-NH₄⁺.L⁻¹), aplicadas ao R1, interferissem na condução aplicada aos reatores do tipo batelada.

A Fase I_B foi conduzida em duas etapas denominadas de testes em batelada e ensaios em batelada. Na primeira etapa da Fase I_B, 5 testes em batelada foram realizados em duplicata contendo apenas nitrogênio com concentrações de 21,5 mgN-NH₄⁺.L⁻¹ e 28,5 mgN-NO₂⁻.L⁻¹ (NO₂⁻/NH₄⁺ afluente de 1,32) e sem MO. O intuito era avaliar se a biomassa granular anammox, adaptada a tratar 100 mgN-NH₄⁺.L⁻¹ e 132 mgN-NO₂⁻.L⁻¹, seria capaz de promover o processo anammox.

A biomassa úmida era pesada em balança analítica (Shimadzu, Japão), para melhor aferição da concentração desejada no inóculo. A análise de sólidos suspensos voláteis (SSV) era realizada em triplicata. A concentração de biomassa foi de 6,0 gSSV.L⁻¹ apenas para o teste 1, e posteriormente, definiu-se a concentração de 1,0 gSSV.L⁻¹, conforme executado por Sánchez Guillén, (2017). Após finalização dos testes e dos ensaios em batelada, a biomassa granular era enxaguada com meio sintético sem substrato e reintroduzida ao reator contínuo R1.

Na segunda etapa da Fase I_B, realizaram-se os ensaios em batelada, em triplicata. As concentrações adotadas foram estabelecidas conforme planejamento fatorial estatístico do tipo

delineamento do composto central rotacional (DCCR), descrito em Rodrigues e Iemma (2014). Dois fatores (2^k) foram utilizados, sendo eles, nitrogênio (N) e demanda química de oxigênio (DQO) na forma de acetato, com concentrações oscilando entre 9 e 51 mgN.L⁻¹, e entre 0 e 206 mgO₂.L⁻¹, respectivamente. Conforme planejamento experimental estatístico, onze ensaios em batelada com relações CO/N de 0,0 - 0,7 - 2,0 - 3,4 - 3,9 - 6,9 - 11,4 - 11,7 (Tabela 10).

Tabela 10 – Planejamento experimental DCCR com 2 fatores (2^k) para execução dos ensaios em batelada.

Ensaio	Valores codificados			Valores decodificados		CO/N		
	Pontos cúbicos (triplicata)	Pontos axiais (triplicata)	Pontos centrais (quintuplicata)	N (mgN.L ⁻¹)	CO (mgO ₂ .L ⁻¹)			
1	-1	-1			15	30	2,0	
2	-1	+1			15	176	11,7	
3	+1	-1			45	30	0,7	
4	+1	+1			45	176	3,9	
5		-1,41	0		9	103	11,4	
6		+1,41	0		51	103	2,0	
7		0	-1,41		30	0	-	
8		0	+1,41		30	206	6,9	
9				0	0	30	103	3,4
10				0	0	30	103	3,4
11				0	0	30	103	3,4

Notas – N: nitrogênio, CO: carbono orgânico.

Os 11 ensaios foram realizados em triplicada, com exceção dos testes relacionados aos pontos centrais (ensaios 9, 10 e 11), realizados em quintuplicata. O planejamento fatorial DCCR permite avaliar, estatisticamente, a interrelação de N e de DQO na em função da eficiência de remoção de nitrogênio total (ERN) e da eficiência de remoção de matéria orgânica (ERDQO). Além disso, os parâmetros cinéticos dos modelos de Monod, Andrews e Edwards foram comparados aos dados observados. As equações e os respectivo parâmetros cinéticos de cada modelo foram apresentados no Apêndice A (Tabela A2).

Os testes foram realizados em duplicata e os ensaios em batelada em triplicada. Os reatores em batelada correspondiam ao uso de frascos Erlenmeyer de 1,0 L, e volume útil de 0,3 L. Os reatores, contendo meio sintético (ainda sem substrato) e com biomassa granular anammox, eram vedados com tampas de butila e silicone líquido. Duas mangueiras de 6 mm de diâmetro, conectadas às válvulas de seringa, permitiam que o meio líquido fosse purgado com argônio (Ar)/gás carbônico (CO₂) na proporção de 95:5% por cerca de 30 min, ou até que a concentração de OD fosse reduzida (< 0,5 mgO₂.L⁻¹). A Figura 11A exibe a foto do frasco Erlenmeyer com 0,3 L de volume útil contendo meio sintético (ainda sem substrato) e grânulos

anammox. A Figura 11B exibe a foto do *shaker* (Infors HT, Multitron Pro - Suíça) utilizado para os reatores sob agitação (150 rpm) e a temperatura (37°C) constante.

Figura 11 – (A) Reator do tipo batelada inoculado com biomassa granular anammox e meio sintético; (B) *Shaker* utilizado para promover a agitação e o controle da temperatura.



Após o volume reacional atingir o equilíbrio térmico a 37°C, os reatores em batelada eram rapidamente removidos do shaker, e as soluções concentradas de sulfato de amônio ($\text{NH}_4(2)\text{SO}_4$), nitrito de sódio (NaNO_2), e acetato de sódio ($\text{NaO}_2\text{C}_2\text{H}_3$) (este último somente para os testes realizados com matéria orgânica), eram adicionadas na forma de pulsos. O volume reacional (0,3 L) era praticamente mantido. As soluções de amônia e nitrito sempre eram adicionadas para obter relação inicial de $\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$ afluyente próxima de 1,32.

Após a inserção dos pulsos, dava-se início aos testes em batelada. As amostragens eram realizadas em intervalos de tempo igualmente espaçados (~20 min) com o uso de seringas plásticas rosqueáveis. O volume de coleta total durante o teste não ultrapassava 10% do volume reacional, evitando, assim, alterações das concentrações de substrato (nitrito, amônia e DQO) e da relação alimento/microrganismo. Para evitar coletas excessivas ou insuficientes para medição analítica, uma planilha auxiliava na condução do experimento (Apêndice A). As amostras coletadas eram rapidamente filtradas a 0,45 μm (Macherey-Nagel™ Chromafil™ Xtra PVDF, Reino Unido) e conduzidas para análise de nitrito. As medições de nitrito, obtidas em apenas 20 min, eram extremamente importantes, pois permitiam aferir quais eram as taxas de consumo de amônia e de produção de nitrato, conforme estequiometria do processo Anammox (STROUS et al., 1998). Consequentemente, podia-se avaliar o volume amostral a ser coletada e balisar as diluições para realização das demais análises. As análises eram feitas logo após a condução dos experimentos, entretanto, em alguns episódios, foi necessário refrigerar as amostras a 4°C para posterior realização das análises nitrogenadas e de DQO.

Os cuidados ao realizar as coletas durante os testes em batelada eram determinantes na condução do experimento. As válvulas eram mantidas fechadas antes e depois de serem conectadas às seringas, garantindo, assim, a anoxia no meio reacional, além de evitar a perda de meio líquido, caso o sistema estivesse pressurizado. A mangueira também era ‘lavada’ com o próprio meio líquido do reator por três vezes com a própria seringa, evitando, assim, a contaminação de amostras. Os métodos e equipamentos analíticos estão descritos na tópico 4.5.

4.2 Fase II – Adaptação da biomassa granular anammox enriquecida às condições mainstream

Na Fase II, o processo Anammox continuou a ser alvo da presente pesquisa. O objetivo específico foi o de avaliar se a biomassa granular anammox, enriquecida no R1 (232 mgN.L⁻¹ e a 37°C) seria capaz de realizar o processo Anammox a baixas concentrações de nitrogênio (50 mgN.L⁻¹) e a temperatura amena (25°). Parte da biomassa granular anammox foi transferida de R1 para R2 e iniciou-se a operação com concentração de 8,1 gSSV.L⁻¹. A Fase II foi conduzida em sete estágios, conforme apresentado na Tabela 11. Efetuou-se a redução gradativa da concentração de nitrogênio (232 → 50 mgN.L⁻¹) e posteriormente da temperatura (37 → 25 °C). O meio sintético continuou a ser preparado conforme apresentado anteriormente (tópico 4.1.1; Tabela 9), ou seja, com meio sintético contendo relação nitrito/amônia de 1,32, mas com concentrações de N-amônia e N-nitrito correspondente a cada estágio (Tabela 11). Durante estas reduções, procurou-se manter a carga nitrogenada volumétrica aplicada (CNVA) em 1,38 kgN.m⁻³.d⁻¹.

Tabela 11 – Estágios aplicados à Fase II para adaptação da biomassa granular anammox.

Estágios	Temperatura (°C)	Nitrogênio (mgN.L⁻¹)	TDH	CNVA (kgN.m⁻³.d⁻¹)	Va (m.h⁻¹)
1	37	232	4 h 00 min	1,38	0,07
2	37	200	3 h 30 min	1,38	0,08
3	37	150	2 h 35 min	1,38	0,11
4	37	100	1 h 45 min	1,38	0,16
5	37	50	1 h 00 min	1,38	0,33
6	30	50	1 h 00 min	1,38	0,33
7	25	50	1 h 00 min	1,38	0,33

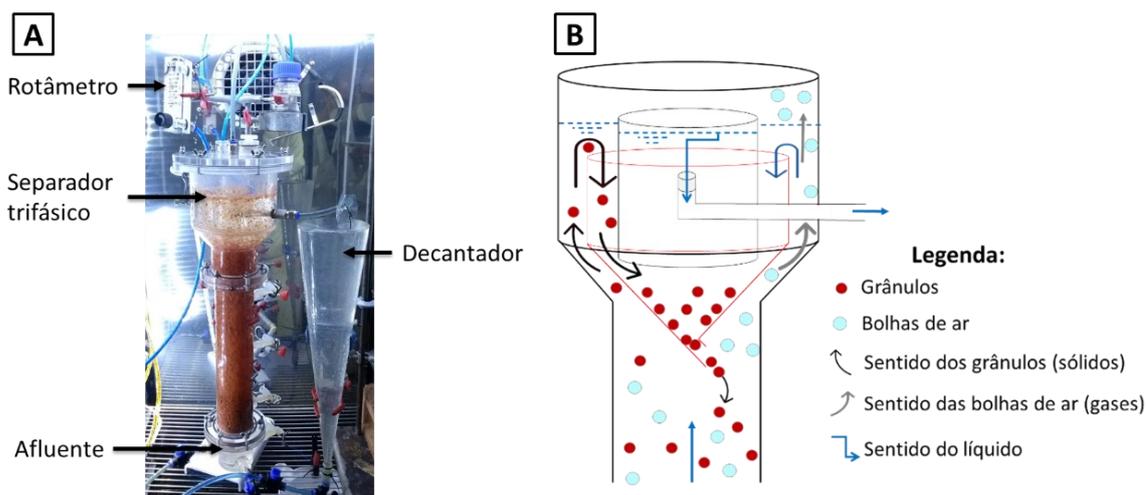
Notas – TDH: tempo de detenção hidráulico; CNVA: carga nitrogenada volumétrica aplicada; Va: velocidade ascensional.

4.3 Fase III – Utilização de biomassa granular anammox adaptada para realização do processo mainstream PNA

Na Fase III, o objetivo específico foi o de verificar se o processo de nitrificação parcial-anammox (PNA) poderia ser realizado, em reator de estágio único, utilizando a biomassa granular anammox adaptada (50 mgN.L^{-1} e 25°C) e sem inóculo de biomassa nitritante. O meio sintético baseado em van de Graaf et al. (1996) continuou sendo preparado, entretanto, a adição de nitrito (NO_2^-) foi cessada. Desta forma, NO_2^- deveria ser produzido no reator a partir da oxidação parcial de amônio, ou seja, para efetuar a remoção de nitrogênio seria preciso que ocorresse a nitrificação parcial (PN) seguido do processo da oxidação anaeróbia de amônio (Anammox) ($100\% \text{ NH}_4^+ \xrightarrow{\text{AOB}} 57\% \text{ NO}_2^- + 43\% \text{ NH}_4^+ \xrightarrow{\text{AMX}} 11\% \text{ NO}_3^- + 89\% \text{ N}_2$).

Para que ocorresse a produção de nitrito a partir de amônio, seria preciso realizar a aeração no sistema, uma vez que as bactérias oxidadoras de amônio (AOB) são microrganismos aeróbios. Nesta Fase III, utilizou-se o mesmo reator utilizado na Fase II (R2), porém, o *headspace* do reator foi alterado para conter um separador trifásico, conforme apresentado em Zhang et al. (2021), e o reator foi denominado de R3. O separador trifásico tinha a função de evitar a perda de grânulos no efluente, devido ao arraste dos grânulos provocado pelas bolhas de ar durante a aeração (Figura 12).

Figura 12 – (A) Foto do reator R3 durante a aeração (período óxico); (B) representação esquemática da separação trifásica entre sólido (grânulos), líquido (efluente) e gás (ar).



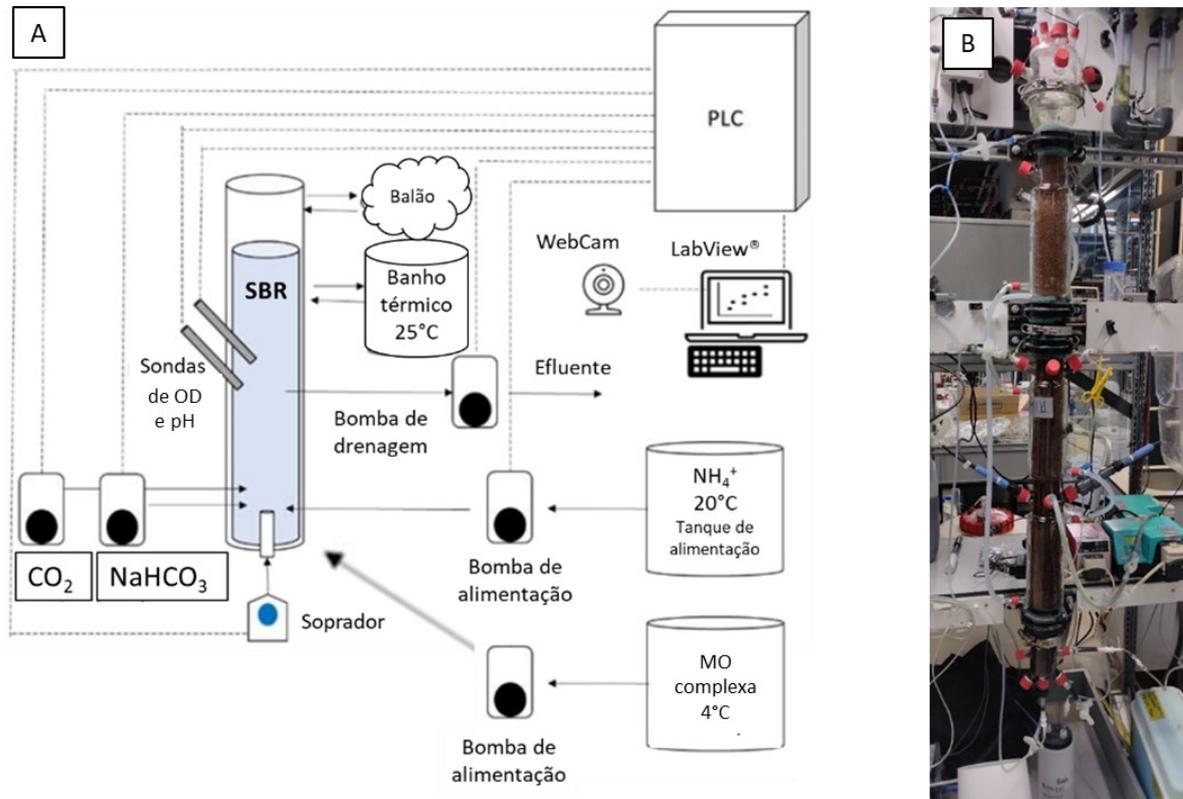
Definiu-se que a aeração intermitente seria adotada ao invés da aeração contínua, evitando, assim, a proliferação de bactérias oxidadoras de nitrito (NOB) e a inibição das bactérias anammox (AMX) (MIAO et al., 2018). A aeração intermitente automatizada (AIA)

foi implementada devido às funções programadas no sistema do tipo Arduino® conectado ao compressor de ar (Big Air A420). A princípio, o compressor de ar era mantido ligado por 7 min (período óxico) e desligado por 21 min (período anóxico), conforme realizado por (MIAO et al., 2016). Posteriormente, os períodos óxico e anóxico foram ajustados para 15 e 45 min, respectivamente. A vazão de ar foi regulada por um rotâmetro de ajuste fino (TTVXO), sendo de $10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, semelhante ao valor utilizado por De Prá et al. (2021), que realizou o *start-up* de um reator de desamonificação com $2,5 - 5,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ a temperatura de 25°C , porém, com aeração contínua, $102,7 \pm 4,70 \text{ mgN-NH}_4^+\cdot\text{L}^{-1}$ e TDH de 6,0 h. Uma cortina de ar perfurada de aproximadamente 10 cm de comprimento, auxiliava a produção de pequenas bolhas na base do reator para reduzir episódios de cisalhamento dos grânulos devido à aeração (VLAEMINCK et al., 2012). A separação trifásica entre os grânulos, bolhas de ar e a fração líquida ocorria conforme esquematizado na Figura 12B. A sonda de OD apresentava mal funcionamento durante esta Fase III, sendo assim, não foi possível realizar medições confiáveis da concentração de OD.

4.4 **Fase IV – Processo *mainstream* PNA sem e com adição de matéria orgânica complexa**

Um reator de batelada sequencial (RBS), denominado de R4, de 3,5 L de volume útil e confeccionado com dupla camada de vidro, foi continuamente operado por 169 dias. O objetivo foi o de conduzir o processo nitrificação parcial-anammox (PNA) em estágio único para condições *mainstream* simulando esgoto doméstico pré-tratado anaerobiamente em países de clima quente. A sonda de OD (Endress and Hauser®, Memosens COS81D - Suíça) e a sonda de pH (Endress and Hauser®, Memosens E518C6 - Suíça) foram acopladas ao R4 para medir constantemente os valores de OD, pH e temperatura, visualizados em painel digital em um transmissor (Endress and Hauser®, Liquiline CM448 3QW3/0 - Alemanha). Tais medidas eram coletadas a cada 10s e automaticamente registradas em uma planilha diária em um computador portátil. A temperatura do meio líquido foi mantida em $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante toda a operação devido ao banho termostático (VWR, 1136-1D - EUA) realizado devido a passagem contínua de água deionizada pela dupla camada de vidro do R4. A configuração do sistema PNA-SBR está exibida na Figura 13. Os detalhes do R4 foram apresentados no Apêndice A.

Figura 13 – (A) Representação esquemática do reator batelada sequencial (RBS) ou R4, para realização do processo PNA em estágio único, com atuação do controlador lógico programável (PLC); (B) foto do R4 durante a fase reacional.



O R4 foi operacionalizado de forma automatizada. Por meio do software LabView, podia-se verificar o momento em que as bombas eram acionadas (coloração verde) ou desligadas (coloração vermelha) de forma automática em função da programação e das medições online de OD e pH (Figura 14). Os ciclos foram programados para ocorrer em 6 h, divididos em quatro fases denominadas de alimentação (10 min), reacional (300 min), sedimentação (30 min) e descarte (20 min). O processo PNA ocorria na fase reacional, onde a aeração intermitente automatizada (AIA) promovia a alternância entre os períodos óxico (15 min) e anóxico (15 min), repetidos por 10 vezes, totalizando 300 min. A AIA foi utilizada durante toda a operação, pois permite limitar o crescimento das bactérias oxidadoras de nitrito (NOB) em comparação à aeração contínua (MIAO et al., 2018). Previamente às condições acima definidas, diversos testes foram realizados com diferentes períodos óxicos/anóxicos de, por exemplo, 10/20 min, 20/10 min, 30/30 min, 20/35 min, e com diferente valor de OD de 0,40 mgO₂.L⁻¹, contudo, não foi observada estabilidade do processo PNA.

Figura 14 – (A) Parâmetros de controle para a operação do sistema SBR-PNA no reator R4; (B) Exemplo do monitoramento da operação do R4 durante a fase anóxica com controle de OD e pH.



Os parâmetros de OD e pH eram autorreguláveis por meio do controlador lógico programável (PLC) regido pelo mecanismo proporcional-integral-derivativo (PID) (WEBB; REIS, 2002). Os coeficientes de OD e pH foram calibrados previamente à operação, conforme método de ajuste de Ziegler-Nichols (ELLIS, 2012). A vazão de gases (N₂ e ar) eram controlados por controlador de fluxo de massas (National Instruments - EUA). Durante os períodos óxico e anóxico, os valores de OD foram definidos em 0,20 e 0,01 mgO₂.L⁻¹, respectivamente, e o pH em 7,50 ± 0,03, independentemente dos períodos. Durante a fase reacional, o valor de pH poderia ser reduzido devido à adição de dióxido de carbono (CO_{2(g)}) ou aumentado devido à adição da solução básica de carbonato de sódio (Na₂CO₃ a 1,0 M). Ambas as adições eram fundamentais, pois garantiam a prevalência das condições inorgânicas e ligeiramente alcalinas, importantes à ocorrência do processo autotrófico PNA. Durante a fase

reacional, a agitação era intensa promovia a mistura completa da biomassa e o meio líquido devido a bomba de recirculação, que succionava os gases do *headspace* do reator e retornavam-nos à base do reator. A vazão total de gases era de 1,60 L.min⁻¹. O controlador de fluxo de massas permitia oscilar a vazão de ar e de nitrogênio, sendo as vazões máximas definidas em 1,55 L.min⁻¹. Durante o período anóxico, e durante a fase de alimentação, a vazão de nitrogênio era de 1,55 L.min⁻¹, assim, podia-se rapidamente obter concentrações de OD ≤ 0,01 mgO₂.L⁻¹ (Figura 14B).

Ao final de cada ciclo de 6,0 h, cerca de 50% do volume útil era drenado do reator, desta forma, o tempo de retenção hidráulica (TDH) era próximo de 12,0 h. Um balão plástico de 20,0 L foi conectado à parte superior do R4. Desta maneira, era possível otimizar a fase de drenagem e evitar a entrada de ar no reator. As bombas peristálticas de alimentação (Watson Marlow, 120U/DV 200 rpm - Reino Unido) e de descarga (Watson Marlow, 3238/U 400 rpm - Reino Unido) foram conectadas na parte inferior e central do R4, respectivamente.

A biomassa utilizada na Fase IV corresponde ao lodo granular PNA proveniente da ETE municipal de Olburgen, Holanda. A ETE de Olburgen detém um reator *sidestream* PNA de estágio único, que foi implementado e operado com sucesso pela empresa Paques (ABMA et al., 2010; DRIESSEN; HENDRICKX, 2021). O lodo PNA, coletado nesta ETE, foi cuidadosamente enxaguado pelo método de peneiramento úmido (200 μm), de forma a reter e preservar os grânulos (Figura 15). O enxágue foi feito por três vezes com meio sintético baseado em van de Graaf et al. (1996), porém, livre de nitrogênio e matéria orgânica. O lodo PNA foi conservado a 4,0°C em solução de nitrato de sódio (300,0 mgN-NO₃⁻.L⁻¹) para evitar anaerobiose ou deterioração do lodo PNA, e a solução de nitrato de sódio era trocada periodicamente (2 a 4 semanas). O *start-up* do R4 foi feito com 1,12 gSSV.L⁻¹. No entanto, uma segunda inoculação o teor de sólidos foi aumentado para 5,03 ± 0,52 gSSV.L⁻¹.

O reator R4 foi alimentado com meio sintético, baseado em van de Graaf et al (1996), mas a parcela nitrogenada era representada apenas por amônio (~25 mgN-NH₄⁺.L⁻¹), refletindo a linha principal de efluente de reator anaeróbio tratando esgoto doméstico no Brasil (CHERNICHARO et al., 2015; VON SPERLING, 2007). A primeira alimentação sintética (F₁) foi preparada em um grande tanque de alimentação de 120 L a 20°C. Nos primeiros 125 dias de operação do R4 não foi feita adição de matéria orgânica (MO) à F₁. Portanto, a via de desnitrificação heterotrófica foi desconsiderada e o processo de PNA pôde ser melhor avaliado.

Figura 15 – Fotos do dia de coleta do lodo granular de nitrificação parcial - anammox (PNA). (A) Reator PNA, ETE municipal de Olburgen, Holanda; (B) Lodo granular PNA continuamente coletado e reintroduzido no reator PNA; (C) Separação dos grânulos PNA (porosidade de 200 μm) para preservação em geladeira (4°C) e futura inoculação no reator R4 em escala de laboratório.



A adição de MO complexa foi realizada entre os dias 126 e 169. Além da adição de F_1 , um segundo meio sintético (F_2) foi preparado com a parcela de MO com base no efluente de reator UASB da linha principal da ETE municipal de São Carlos, SP, Brasil (GRANATTO et al., 2019). O meio sintético F_2 foi preparado com compostos contendo matéria orgânica lentamente biodegradável (DQO_{lb}) e rapidamente biodegradável (DQO_{rb}) (Tabela 12). O meio sintético F_2 era mantido sob refrigeração (4 °C) para evitar a proliferação de microrganismos heterotróficos, além de ficar sob constante homogeneização com auxílio de um agitador magnético (Labinco, L23 - Holanda). Antes de alimentar o R4, os meios F_1 e F_2 eram purgados com $\text{N}_2(\text{g})$ até que condição anaeróbia fosse obtida ($\text{OD} < 0,05 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$).

Tabela 12 – Composição do segundo meio sintético (F_2) de forma a simular os efluentes de esgoto doméstico pré-tratados anaerobiamente na ETE Monjolinho, São Carlos, SP, Brasil.

Produto químico	Produto (mg.L ⁻¹)	DQO (mgO ₂ .L ⁻¹)	DQO (%)
Celulose microcristalina	21,12	50,0	12,4
Caseína hidrolisada	43,23	17,6	24,8
Óleo de soja *	13,40	50,0	8,7
Detergente líquido *	23,44	25,0	24,8
Acetato de sódio trihidratado	49,77	20,0	9,9
Butirato de sódio	4,89	6,6	3,3
Propionato de sódio	30,64	32,4	16,1
	Total:	201,6	100,0

Notas - * Pipetas plásticas número 5 eram utilizadas para gotejar o volume correspondente ao peso de óleo e detergente para atingir à concentração desejada. Além disso, a adição somente era realizada após a purga de $\text{N}_2(\text{g})$ evitando, assim, a formação de bolhas e extravasamento do meio sintético.

A concentração de nitrogênio amoniacal afluente (N-NH_4^+) foi mantida próxima de 25,0 $\text{mgN} \cdot \text{L}^{-1}$ ao longo de toda a operação do R4, e a MO, correspondente ao meio sintético F_2 foi

aumentada de zero (ausência de MO) para 50, e finalmente para 100,0 mg O₂.L⁻¹. Sendo assim, o sistema PNA-SBR foi operado com CO/N próximas a 0,0; 2,0; e 4,0. A eficiência de remoção de nitrogênio total (ERN) e a eficiência de remoção de DQO (ERDQO) foram calculadas conforme as concentrações afluente e efluente (consultar Apêndice A).

4.4.1 Testes de atividade específica do processo anammox (*in situ*)

Testes da atividade específica do processo anammox foram realizados *in situ* ao R4 uma vez por semana. Os testes permitiam aferir a capacidade máxima da biomassa granular PNA na realização do processo anammox. Durante os testes, a aeração intermitente era interrompida, sendo assim, a fase reacional compreendia exclusivamente na ocorrência do período anóxico, garantindo condições anóxicas (OD < 0,01 mgO₂.L⁻¹) às bactérias AMX, além de limitar a atividade das bactérias oxidadoras de amônia e nitrito, AOB e NOB, respectivamente. As bactérias heterotróficas (HB) já estavam com atividade limitada devido à ausência de OM durante os primeiros 125 dias de operação do R4. Quando o sistema PNA-SBR foi operado com a alimentação de F2 contendo matéria orgânica complexa (126 – 169 dias), os testes de atividade específica *in situ* foram realizados sem adição de MO e iniciados após redução significativa da MO presente no reator SBR.

Os testes anammox *in situ* ao R4 eram iniciados com pulsos de amônia (10 gN-NH₄⁺.L⁻¹) e nitrito (10 gN-NO₂⁻.L⁻¹) para obter concentrações de 40-50 mgN-NH₄⁺.L⁻¹ (NH₄(SO₄)₂) e 50-60 mgN-NO₂⁻.L⁻¹ (NaNO₂). Cada teste foi conduzido por cerca de 6 h ou até que a concentração de N-NO₂⁻ fosse indetectável. Amostras da biomassa granular PNA eram coletadas logo no início do teste durante a agitação intensa provocada pela recirculação dos gases, e a medição dos sólidos suspensos voláteis (SSV) da biomassa PNA era feita em triplicata (APHA, 2017).

Para avaliar a atividade específica do processo anammox, foram calculadas as taxas máximas específicas (r_{\max}), expressa em mgN_{-(NH₄⁺, NO₂⁻, NO₃⁻).gSSV⁻¹.d⁻¹, para consumo de amônia ou nitrito, e produção de nitrato. A partir da regressão linear gerada nos perfis temporais de consumo de N-amônia ou de N-nitrito, e produção de N-nitrato, podia-se obter os respectivos coeficientes angulares ($\alpha_{\text{NH}_4^+, \text{NO}_2^-, \text{NO}_3^-}$), em mgN_{-(NH₄⁺, NO₂⁻, NO₃⁻).L⁻¹.d⁻¹. Por fim, o cálculo de r_{\max} era obtida através da divisão dos coeficientes angulares (α) pela concentração de biomassa (X), em gSSV.L⁻¹.}}

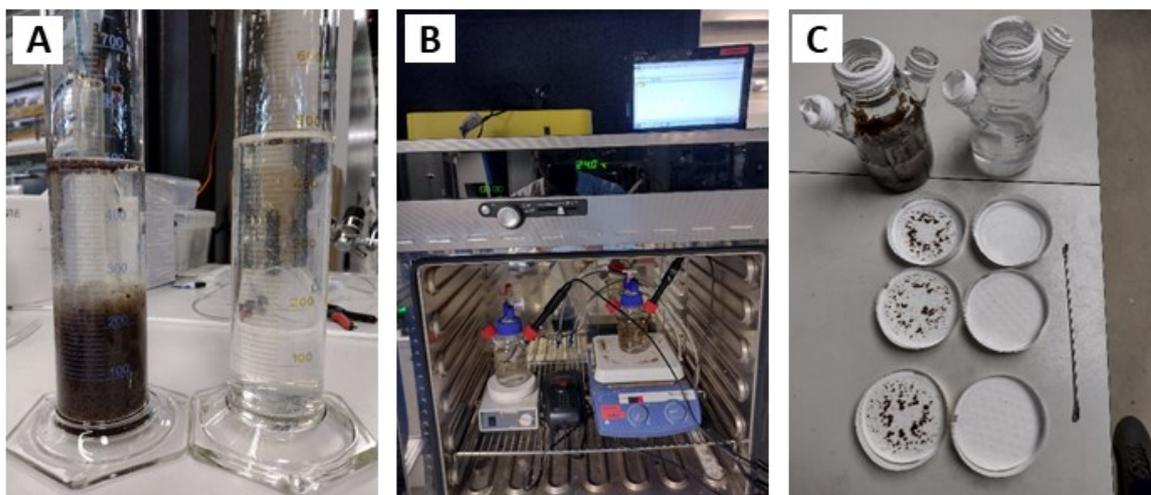
4.4.2 Testes de atividade específica dos processos de nitrificação (AOB) e nitratação (NOB) (*ex situ*)

Os processos de nitrificação e nitratação, mediados por AOB e NOB, respectivamente, foram conduzidos em testes de atividade específica *ex situ* ao R4. Nestes testes, os flocos foram separados dos grânulos com o objetivo de avaliar se a atividade específica dos grupos microbianos presentes nos flocos eram superiores aos dos grânulos, conforme reportado por Laurení et al. (2019). Para realizar tal separação, 1,0 L foi drenado do R4 durante a agitação intensa e vertido em uma proveta. Após cerca de 3 min de sedimentação dos grânulos, 0,5 L do sobrenadante era sifonado em outra proveta. Sequencialmente, ambas as provetas, uma com grânulos e outra com flocos, eram preenchidas com 0,5 L de meio sintético (VAN DE GRAAF et al., 1996), sem amônia e nitrito. Sob agitação magnética, novo sifonamento era realizado em ambas as provetas para transferência de 250 mL para cada frasco Duran, utilizados como reator em batelada (Figura 16). O pH era corrigido para valores entre 7,45 e 7,55 com a adição de ácido clorídrico (1,0M) ou hidróxido de sódio (1,0M).

Para os testes com AOB e NOB, adicionavam-se, na forma de pulsos soluções concentradas de sulfato de amônia ($10 \text{ gN-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$) e nitrito de sódio ($10 \text{ gN-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$) para resultar em concentrações de $20 \text{ mgN-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ e $10 \text{ mgN-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$. Os pulsos eram adicionados com o uso de pipetas automáticas (Eppendorf, Alemanha). A temperatura foi mantida a $25,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ em câmara termostática (Memmert, UFB 400 - Alemanha) e a condição aeróbia ($\text{OD} > 6,0 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$) foi mantida pela aeração constante por com o uso de um compressor de ar (EcoPlus 06404). Um medidor portátil conectado a sonda de OD (WTW, Multi 3620 IDS, Alemanha) registrava os valores de OD e temperatura a cada 10 s. Amostras líquidas eram coletadas a cada 20 min para avaliação do consumo de amônia (realizado por AOB) e produção de nitrato (realizado por NOB).

Para medir a distribuição do tamanho das partículas (10,7 nm até 2000 μm), foi utilizada a tecnologia de dispersão de luz (Bluewave, Microtac, EUA). O diâmetro dos grânulos ($\geq 200 \mu\text{m}$) e dos flocos ($< 200 \mu\text{m}$), e a distribuição relativa das partículas era realizada regularmente em para as amostras de biomassa PNA (contendo grânulos e flocos) e flocos. As imagens dos grânulos e flocos presentes na biomassa PNA foram capturadas por meio de microscópio digital (Mechelen, Keyence VHX-700F – Bélgica).

Figura 16 – Fotografias demonstrando a separação dos flocos da biomassa granular para realização dos testes de atividade específica (*ex situ*) de nitrificação, nitratação e desnitrificação heterotrófica. (A) Flocos separados da biomassa granular; (B) Reatores em batelada, dentro da câmara termostática e acoplados às respectivas sondas de OD; (C) Diferença visual entre grânulos e flocos antes da calcinação em mufla.



4.5 Métodos analíticos

Como as Fases I, II e III foram realizadas no Brasil, os métodos analíticos foram os mesmos para estas fases. A temperatura era medida nas câmaras que abrigavam os reatores contínuos (New Ethics 411D, Brasil) e nos reatores em batelada a temperatura era controlada pelo *shaker* (Infors HT, Multitron Pro - Suíça). As amostras líquidas afluente e efluente aos reatores contínuos, e aquelas coletadas ao longo dos ensaios em batelada, eram filtradas ($0,45\mu\text{m}$) para determinação da concentração das espécies nitrogenadas (N-NH_4^+ , N-NO_2^- e N-NO_3^-) e da concentração da demanda química de oxigênio (DQO). As determinações das concentrações de amônia, nitrito, nitrato e DQO eram realizadas via espectrofotometria, conforme APHA (2017).

As análises de nitrato e de DQO podem sofrer interferência quando na presença de elevado teor de nitrito ($> 40 \text{ mgN-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$). Nestes casos, realizava-se a adição da solução de ácido sulfâmico concentrado (4%) na proporção volumétrica de 10% (v/v) juntamente com ácido clorídrico (1M) na proporção de 2% (v/v) (GRANGER; SIGMAN, 2009). O ácido sulfâmico reage com nitrito, sem interferir na parcela de nitrato e de DQO. Logo após a adição de ácido sulfâmico, a amostra era homogeneizada em vórtex. A formação de pequenas bolhas de nitrogênio gasoso (N_2) era um indicio visual da remoção de nitrito. Devido à diluição às adições de ácido sulfâmico e ácido clorídrico, as medições de nitrato e de DQO eram multiplicados pelo fator de correção de 1,12.

As medidas de pH e alcalinidade eram realizadas via método potenciométrico (DigiMed) e titulométrico, respectivamente. Para determinação da alcalinidade total, titulava-se ácido sulfúrico (0,4522 M) até redução do pH ser de 4,30. A equação utilizada para o cálculo da alcalinidade total foi apresentada no Apêndice A.

Na Fase IV, realizada na Holanda, temperatura, pH e OD foram monitorados continuamente pelas sondas de pH e de OD (Endress and Hauser, Suíça), ambas conectadas ao R4. Os dados eram armazenados de forma online e compilados em planilhas diárias. As amostras líquidas afluente e efluente ao R4 eram filtradas em membrana de porosidade de 0,20 µm (Macherey-Nagel™ Chromafil™ Xtra PVDF, Alemanha). N-amônia, N-nitrito, N-nitrato e DQO foram medidos usando kits Hach-Lange (DR3900, Hach® - Alemanha), no entanto, para os testes anammox, os dispositivos de cromatografia iônica (IC) (919 auto-sampler, 818 anion e 883 cation systems, Metrohm TM - Suíça) também foram utilizados para medição das espécies nitrogenadas. O software MagIC NET foi utilizado para tratar os dados gerados via IC. A medição de alcalinidade total foi feita a partir da titulação de HCl (0,1 M) com auxílio do equipamento de titulação automática (Metrohm 785 DMP Titrino - Suíça).

A concentração de biomassa granular PNA era analisada conforme sólidos suspensos voláteis (SSV) em triplicada (APHA, 2017), para as amostras coletadas em R1, R2, R3 e R4. Devido à rápida sedimentação dos grânulos, a biomassa PNA era mantida sob agitação magnética (Heidolph MR 1000 - Alemanha) enquanto as coletas eram feitas. Utilizava-se uma pipeta automática de 10 mL e a ponta da ponteira era cortada para facilitar a passagem dos grânulos. Essa metodologia de coleta de biomassa foi padronizada durante a Fase IV.

4.6 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas para as amostras de biomassa granular coletadas nas Fases I_A, II e IV. Na Fase I_A, durante o enriquecimento de biomassa granular anammox, amostras foram extraídas da parte inferior do reator R1 nos dias 431, 607 (coincidindo com o dia de inóculo no reator R2, dando-se início à Fase II), 640 e 706 de operação. No dia 640 também foi feita coleta de biomassa que estava flotando para avaliar se havia diferença significativa entre a biomassa de fácil sedimentação e a de difícil sedimentação. Na Fase II, análises microbiológicas foram realizadas nos dias 1, 35 e 51 de operação do reator R2. No dia 35, também foi feita coleta da biomassa flotante. Na Fase IV, amostras foram

coletadas do R4 nos dias 24, 90 e 169. Além disso, uma amostra contendo apenas grânulos foi analisada no dia 163 de operação.

Todas as amostras biológicas foram lavadas duas vezes em solução salina tampão de fosfato (PBS) contendo 8,0% NaCl, 0,2% KCl, 1,4% Na₂HPO₄ e 0,2% KH₂PO₄ (Green & Sambrook, 2012), centrifugadas a 5000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e a biomassa úmida foi preservada a temperatura de -20°C. A extração do DNA genômico foi realizado conforme protocolo descrito em Silveira et al. (2021). A concentração e pureza do DNA foram avaliadas utilizando-se espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA). O sequenciamento genético 16S rRNA foi realizado por empresa especializada (NGS Soluções Genômicas, Piracicaba, SP). A amplificação do DNA foi realizada com primers para região de interesse (16S rRNA V4), com inclusão dos barcodes, pool das amostras, quantificação do *pool* sequenciamento (2x150pb ou 2x250pb) média de cobertura de 50.000 *paired-end reads* por amostra. Por fim, foi feita análise de bioinformática básica para identificação taxonômica por meio da plataforma Illumina HiSeq 2000. A abundância relativa para gêneros foi avaliada considerando apenas os microrganismos nos quais houve uma proporção de cópias do gene 16S superior a 3% do total de cópias, em conformidade com a metodologia empregada por Juan-Díaz et al. (2021).

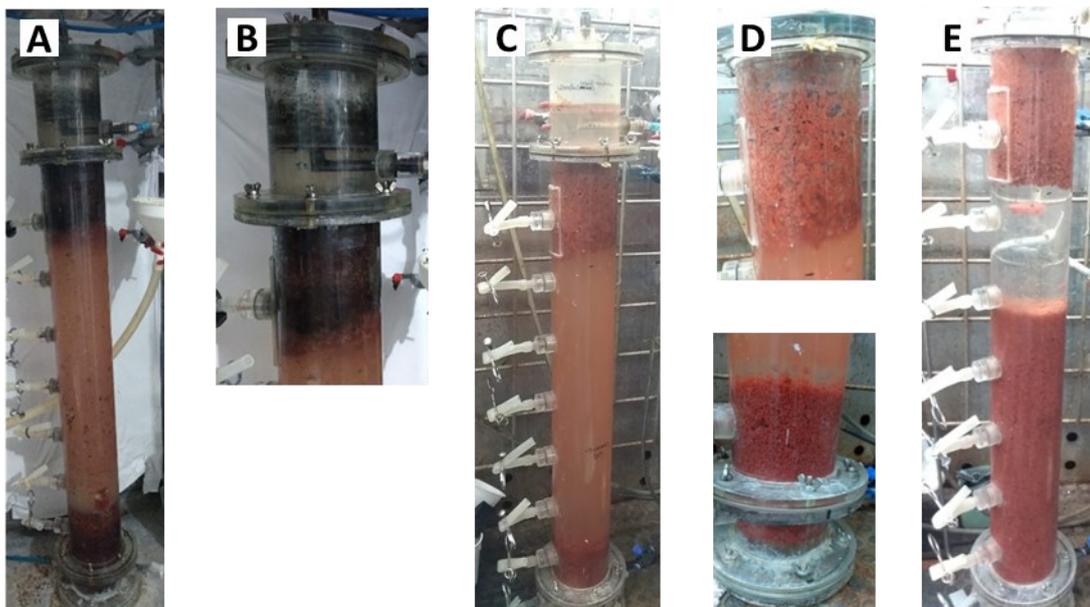
5 Resultados e Discussão

5.1 Fase IA – Enriquecimento de biomassa granular anammox

Logo no início da operação do R1, uma falha na bomba de alimentação comprometeu o desempenho do processo anammox. As fotos tiradas no 1º dia de operação (Figura 17AB), pode-se observar a coloração preta da biomassa granular anammox sedimentada e flotada, indicando a ocorrência de anaerobiose e morte celular, uma vez que bactérias anammox saudáveis exibem coloração laranja-avermelhada (JETTEN et al., 1997; KARTAL; KELTJENS, 2016). É importante ressaltar que o escurecimento da biomassa geralmente ocorre quando o reator é alimentado com águas residuárias contendo matéria orgânica (REINO et al., 2018), o que não foi o caso durante a operação do R1. A coloração característica das bactérias anammox foi sendo reestabelecida ao longo da operação, como pode ser observado nas fotos tiradas no dia 305 de operação (Figura 17CD). Para tanto, foi preciso realizar descartes de biomassa visivelmente deteriorada e inoculação de biomassa granular anammox provenientes

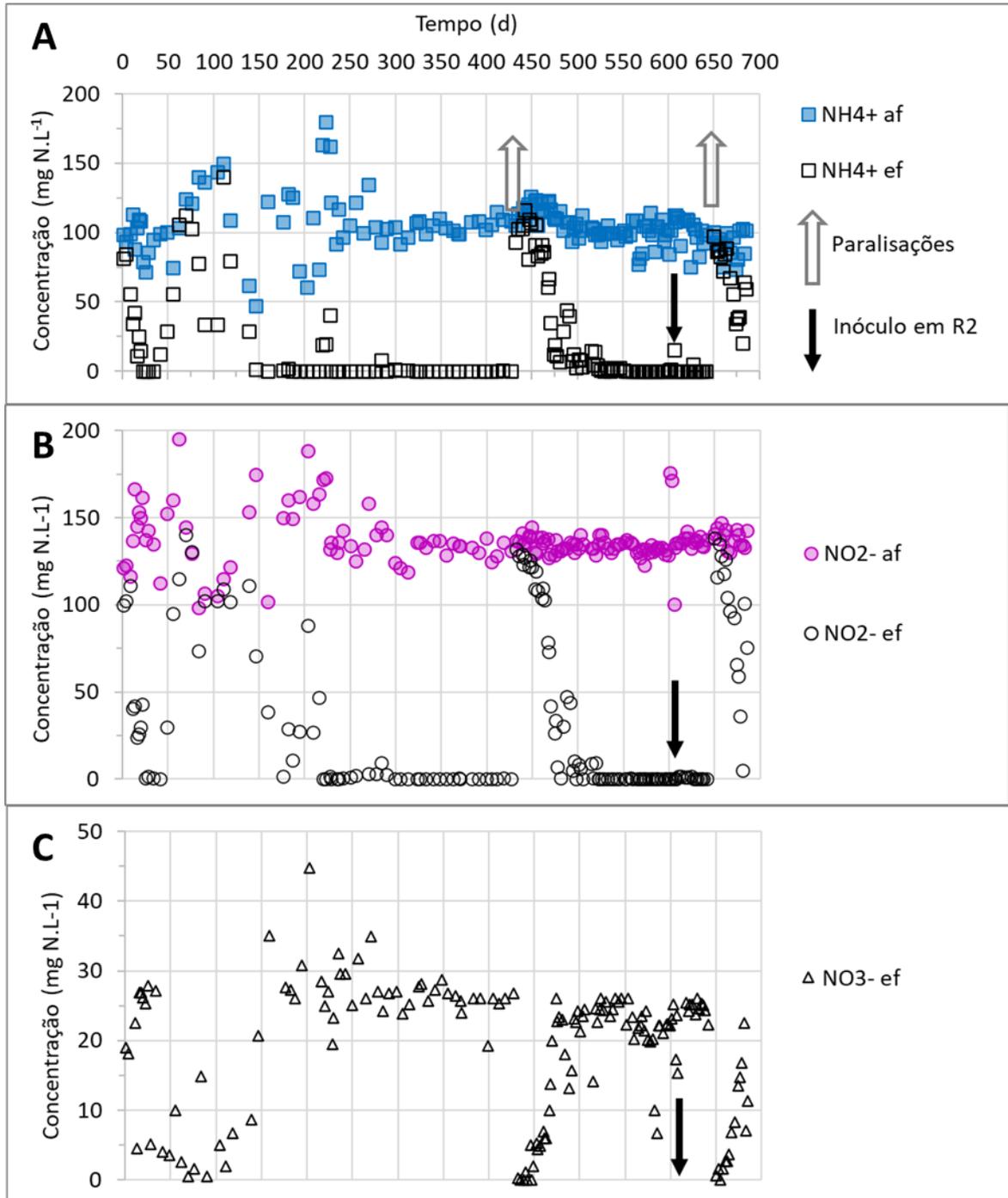
de outro reator anammox, o qual também era alimentado com efluente sintético baseado em Van de Graaf et al. (1996).

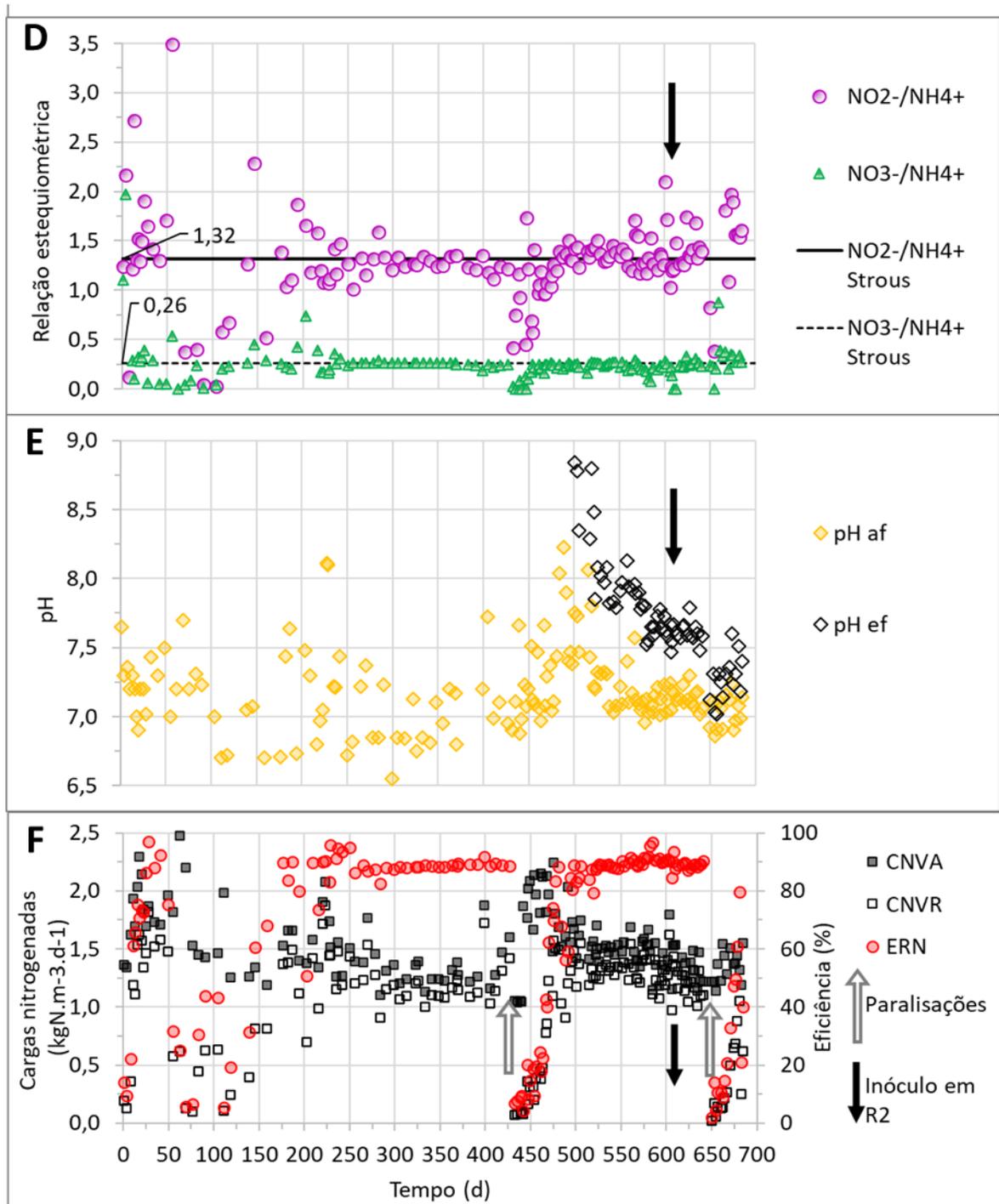
Figura 17 – Fotos exibindo o aspecto da biomassa granular anammox ao longo da operação do reator R1. (A) Dia 1 de operação exibindo todo o reator e (B) a biomassa flotada. (C) Dia 305 de operação exibindo todo o reator e (D) biomassas flotada (foto superior) e sedimentada (foto inferior). (E) Dia 607 de operação (dia de inóculo ao R2).



Os resultados obtidos com a operação do R1 estão apresentados na Figura 18. R1 foi operado por 685 dias, mas as limitações impostas pela pandemia de Covid 19, fizeram com que o reator fosse desligado duas vezes. As paralisações de 155 e 55 dias ocorreram próximas aos dias de operação 425 e 650, respectivamente. Os períodos em que o reator foi desligado não foram apresentados nos gráficos, mas foram devidamente indicados com setas apontadas para cima (Figura 18AF). As alterações abruptas nas medições de amônia, nitrito, nitrato e eficiência podem ser facilmente observadas (Figura 18ABCF) e ocorreram em decorrência destas paralisações.

Figura 18 – Resultados obtidos com o monitoramento do reator R1 (Fase IA). Os gráficos apresentam os seguintes dados: concentrações afluente e efluente de (A) amônia ($N-NH_4^+$), (B) nitrito ($N-NO_2^-$) e (C) nitrato ($N-NO_3^-$), (D) relações estequiométricas comparadas com Strous et al. (1998), (E) medições afluente e efluente de pH, e (F) carga nitrogenada volumétrica aplicada (CNVA) e removida (CNVR), e eficiência total de remoção de nitrogênio (ERN).





Notas - A seta preta apontada para baixo representa o dia em que foi feita a transferência de biomassa granular anammox do R1 para oR2. As setas apontadas para cima representam o momento em que foram feitas duas paralisações, a primeira sendo de 155 dias e segunda de 55 dias.

Entre os dias 1 e 228 de operação, o processo anammox apresentou elevada instabilidade (Figura 18). Além da falha na bomba de alimentação, outros problemas provocaram tal instabilidade, como a falta de cilindro de argônio (entre os dias 104 e 111) onde a alimentação foi interrompida, oscilação da vazão da bomba de alimentação alterando o tempo de detenção

hidráulico (TDH = 4,0 h) e as cargas aplicadas de nitrogênio (CNVA = 1,38 kgN.m⁻³.d⁻¹), quedas de energia que desligaram a câmara termostática prejudicando o controle da temperatura (37°C), a dificuldade do controle da concentração de oxigênio dissolvido (OD < 0,5 mgO₂.L⁻¹) no tanque de alimentação que podem ter alterado o meio sintético afluyente, principalmente no que diz respeito às concentrações de substrato (amônio e nitrito) afluyente.

Diante das adversidades supramencionadas, o processo anammox, conduzido durante a operação do reator R1, foi considerado estável quando as eficiências de remoção de nitrogênio total (ERN), amônia (ERA) e nitrito (ERNi) foram iguais ou superiores a 70, 80 e 80%, respectivamente (Apêndice A). Desta forma, os períodos estáveis ocorreram entre os dias 228 e 427, e entre os dias 494 e 641 de operação. Nestes dois períodos estáveis, as médias de ERN, ERA e ERNi foram de 89,30 ± 2,9%, 98,5 ± 3,3% e 99,1 ± 1,9%, respectivamente. Estes valores aproximam-se da máxima eficiência de remoção possível na condução do processo anammox, uma vez que 11% do nitrogênio afluyente permanece no efluyente na forma de nitrato (STROUS et al., 1998).

As relações estequiométricas do processo anammox foram semelhantes às apontadas na literatura, ou seja, o consumo de nitrito e a produção de nitrato em relação ao consumo de amônio foram de $N\text{-NO}_2^-/N\text{-NH}_4^+ = 1,33 \pm 0,16$ e $N\text{-NO}_3^-/N\text{-NH}_4^+ = 0,22 \pm 0,06$, semelhante aos valores descritos por Strous et al. (1998) de 1,32 e 0,26, respectivamente. A estabilidade do preparo do meio sintético com 100 mgN-NH₄⁺.L⁻¹ e 132 mgN-NO₂⁻.L⁻¹ facilitaram a estabilidade do processo anammox. Silveira et al. (2021), por exemplo, conduziram o processo PNA em estágio duplo, e atestaram a importância de se manter adequada relação nitrito/amônio afluyente ao reator anammox. Segundo os autores citados, quando nitrito não foi adicionado ao reator anammox (NO₂⁻/NH₄⁺ afluyente = 0,50), a ERN foi de apenas 44,8%, mas a adição de nitrito (NO₂⁻/NH₄⁺ afluyente = 1,10 – 1,80) permitiu equilibrar a relação nitrito/amônia fazendo com que a ERN oscilasse entre 80-90%.

Os valores de pH afluyente e efluyente foram de 7,17 ± 0,28 e 7,86 ± 0,37, respectivamente. A estabilidade dos valores de pH previnem a inibição do processo anammox (TOMASZEWSKI et al., 2017). Os valores observados na presente pesquisa (7,17 – 7,86), aproximam-se da faixa ótima de 7,20 e 7,60 recomendada pela pesquisa de Carvajal-Arroyo et al. (2014), na qual foi estudado os efeitos de pH na biomassa granular anammox.

Os valores de pH próximo da neutralidade fizeram com que a concentração de amônia livre (AL) fosse inferior a 0,09 mgN-NH₃.L⁻¹ e não houvesse produção de ácido nitroso livre

(ANL), conforme apresentado no Apêndice A (Figura A2). Os valores de AL e ANL foram calculados conforme apresentado nas equações apresentadas na Tabela A1.

A alcalinidade média afluente e efluente foram de $539 \pm 84 \text{ mgCaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ e $543 \pm 80 \text{ mgCaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$, sendo suficientes para a realização do processo anammox no reator R1. Contudo, não houve diferença estatística significativa para avaliar a influência dos valores de alcalinidade nos períodos estáveis e instáveis para obtenção do processo anammox (Figura A3).

A média das cargas nitrogenadas volumétricas aplicada (CNVA) e removida (CNVR) foram de $1,42 \pm 0,17$ e $1,27 \pm 0,16 \text{ kgN} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$. Estas cargas são mais condizentes com os valores aplicados no processo *sidestream* PNA, em que as concentrações de nitrogênio são elevadas ($\sim 2,000$ a $4,000 \text{ mg} \cdot \text{N} \cdot \text{NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$, YAMAMOTO et al., 2008). Utilizando um reator do tipo UASB, Tang et al. (2011) obtiveram a maior CNVR reportada até o momento entre $74,3$ a $76,7 \text{ kgN} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ com a temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$. Por outro lado, o processo *mainstream* anammox conduzido no trabalho de Ma et al. (2011) obteve estável CNVR de $0,40 \text{ kgN} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ com apenas $44,3 \text{ mgN} \cdot \text{L}^{-1}$ e temperaturas entre 27 e 30°C . Estes valores demonstram a versatilidade de aplicação de unidades baseadas na reação anammox.

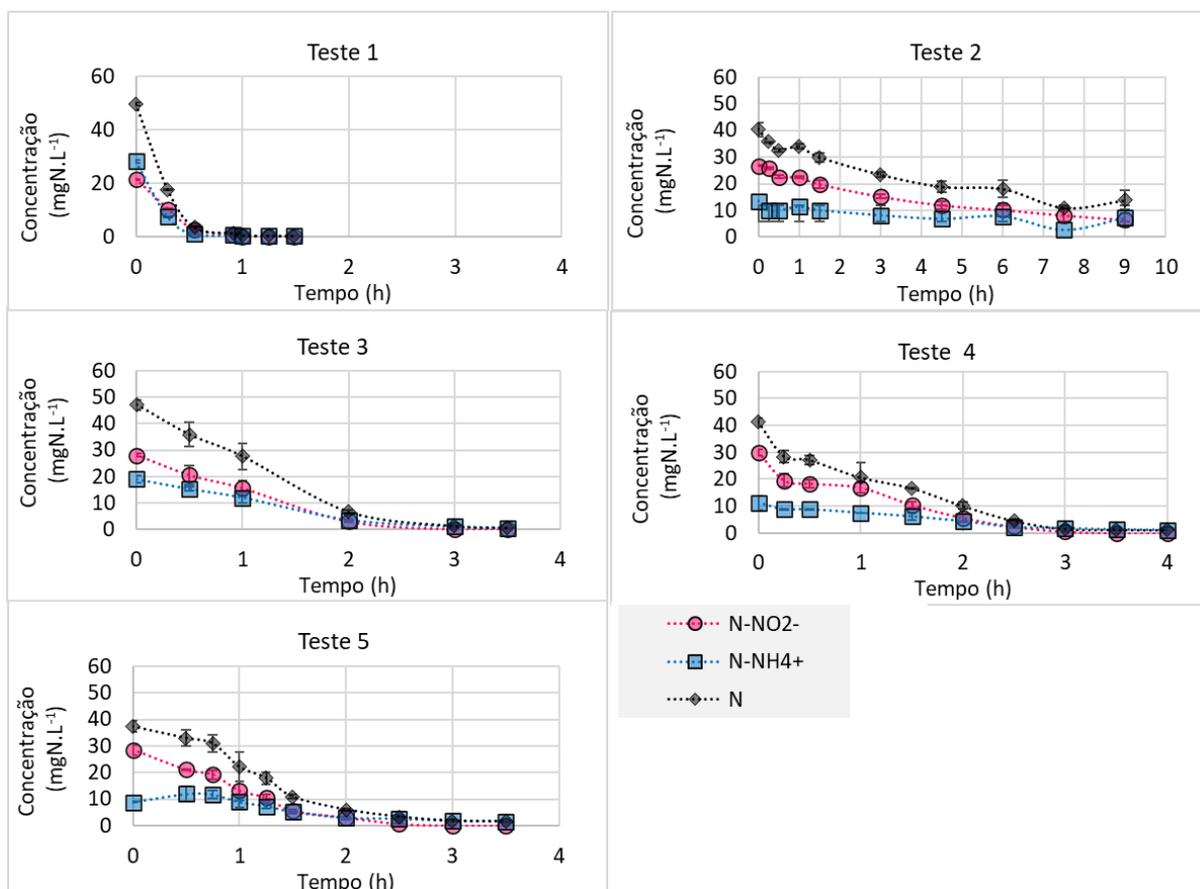
A disponibilidade de biomassa anammox enriquecida é considerado fator chave para a aplicação do processo *mainstream* PNA. (LI et al., 2018; WETT et al., 2013; ZUO et al., 2023). Diante dos resultados apresentados, pode-se atestar, categoricamente, que foi possível manter a biomassa granular anammox de forma enriquecida. Assim, tal biomassa foi utilizada nas Fases IB, II e III, conduzidas no Brasil. Entretanto, vale ressaltar que este enriquecimento foi feito com meio sintético livre de matéria orgânica. A complexidade de águas residuárias reais obviamente aumentaria a diversidade microbiana aumentando a dificuldade de se atingir a estabilidade do processo anammox ou PNA (LIU et al., 2018).

5.2 Fase IB – Processo anammox e as relações CO/N em testes de curta duração

Reatores em batelada foram utilizados para avaliar os efeitos da exposição da biomassa granular anammox, adaptada às concentrações elevadas de nitrogênio ($100 \text{ mgN} \cdot \text{NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ e $132 \text{ mgN} \cdot \text{NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$). Os testes de curta duração foram realizados com concentrações de nitrogênio e matéria orgânica (MO) passíveis de serem encontradas em efluentes de reatores anaeróbios tratando esgoto sanitário doméstico. A princípio, 5 testes em batelada foram realizados em duplicata, apenas com $50,0 \text{ mgN} \cdot \text{L}^{-1}$ ($\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$ afluente = 1,32) e sem matéria orgânica. Tais testes foram realizados com a biomassa granular anammox enriquecida no reator

R1, durante o período de estabilidade do processo anammox entre os dias 278 e 291 de operação (consultar Figura 18). Os resultados destes testes foram apresentados na Figura 19.

Figura 19 – Perfil temporal do consumo de amônia (N-NH_4^+), nitrito (N-NO_2^-) e nitrogênio ($\text{N-NH}_4^+ + \text{N-NO}_2^-$) nos cinco testes de batelada.



Nota - Barras verticais representam o desvio padrão.

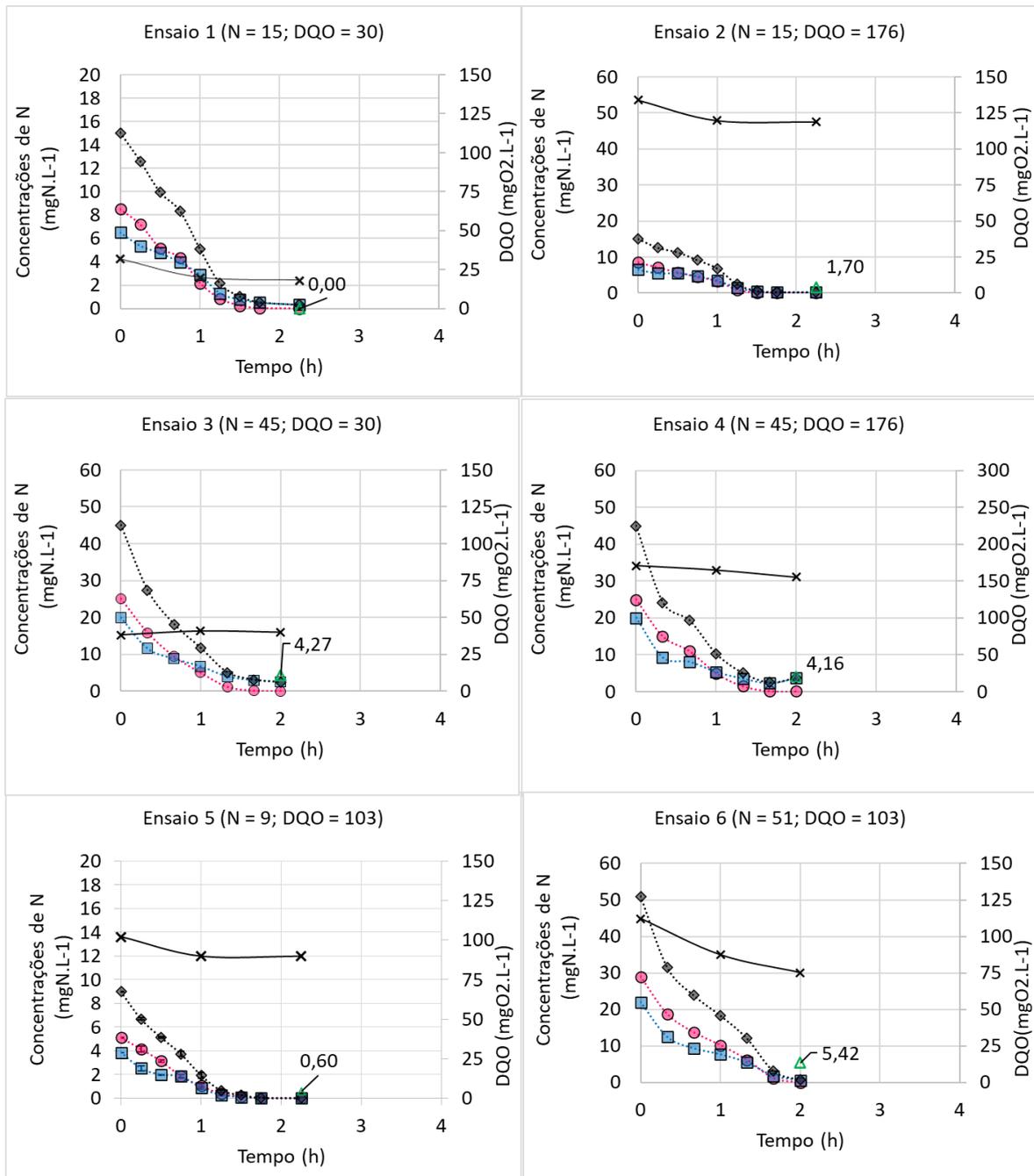
O primeiro teste, realizado com $6,0 \text{ g SSV.L}^{-1}$, mostrou que amônia e nitrito foram rapidamente consumidos ($< 1,0 \text{ h}$), o que inviabilizou a análise cinética do processo anammox devido à limitação de coleta em intervalos de tempo inferiores a 15 min. Desta forma, os quatro testes remanescentes foram realizados com $1,0 \text{ g SSV.L}^{-1}$, mais próximo do valor de $1,5 \text{ g SSV.L}^{-1}$ utilizado em outros trabalhos que avaliaram a atividade anammox em testes de curta duração (SÁNCHEZ GUILLÉN et al., 2014; SOBOTKA et al., 2016). Como pode ser observado nos gráficos apresentados na Figura 19, a remoção concomitante de nitrito e amônia na ausência de OD, condiz com o processo anammox. A taxa máxima específica média de remoção de nitrogênio (nitrito + amônia) dos testes em batelada foi de $0,36 \pm 0,17 \text{ gN.gSSV.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. O resultado ficou abaixo dos valores reportados por Sobotka et al. (2016), que reportaram

atividades específicas do processo anammox de 1,3 e 0,9 gN.gSSV.L⁻¹.d⁻¹ nas temperaturas de 40 e 35°C, respectivamente, para remoção de 30 mgN-NH₄⁺.L⁻¹ e 40 mgN-NO₂⁻.L⁻¹. Apesar da diferença de atividade específica, pode-se dizer que a biomassa granular anammox, adaptada a concentrações de 232 mgN.L⁻¹ poderia realizar o processo anammox com concentrações próximas de 50 mgN.L⁻¹, passíveis de serem encontradas em esgotos sanitários.

A realização dos 11 ensaios em batelada, em triplicata, permitiu avaliar os perfis temporais médios para nitrito (N-NO₂⁻), amônia (N-NH₄⁺), nitrogênio (N-NO₂⁻ + N-NH₄⁺) matéria orgânica (na forma de DQO), e a produção final de nitrato (N-NO₃⁻), conforme apresentado na Figura 20. Através da regressão linear foi calculada a taxa máxima de consumo de nitrogênio (N-NO₂⁻ + N-NH₄⁺) média de 332,4 ± 135,2 mgN.gSSV⁻¹.d⁻¹ (Figura 21A). A relação N-NO₃⁻_{produzido}/N-NH₄⁺_{consumido} foi, em média, 0,08 ± 0,03, ou seja, inferior ao valor teórico de 0,26 (STROUS et al., 1998) e a medição de nitrato foi ligeiramente inferior à produção teórica esperada para cada ensaio (Figura 21B). A presença de MO (acetato) pode ter influenciado a remoção de nitrito e de nitrato via desnitrificação heterotrófica, pois a redução de 0,27 mgNO₃⁻ requer 1,00 mgO₂ (MATĚJŮ et al., 1992). A eficiência de remoção de matéria orgânica (ERDQO) foi de apenas 19,2 ± 3,2%. A reduzida ERDQO era esperada, uma vez que a biomassa granular anammox não estava adaptada a consumir MO.

Pijuan et al. (2020) investigaram os efeitos de CO/N para baixas concentrações de N (< 60 mgN-NO₂⁻.L⁻¹ e < 40 mgN-NH₄⁺.L⁻¹) para testes de curta e longa duração com a adição de acetato e de matriz complexa de DQO (acetato, peptona de sólidos de leite, amido, leite em pó desnatado, extrato de levedura e óleo de soja). Os testes em batelada realizados com acetato fizeram com que toda a parcela de nitrato e de DQO fosse consumida, o que indica alta atividade de bactérias heterotróficas (HB). Contudo, o uso de matriz complexa de DQO promoveu apenas metade de remoção de DQO, demonstrando que a presença de matéria orgânica facilmente biodegradável (DQOrb), como acetato, pode favorecer a atividade de HB. Nos testes de longa duração, eles observaram que a remoção de amônia foi reduzida de valores acima de 80% para valores próximos de 60% e 45% quando a relação CO/N foi aumentada de 1,78 - 4,37 para 4,7 e 4,9, respectivamente. Em contrapartida, a remoção de nitrito manteve-se elevada (>90%), indicando que as HB estavam ganhando a competição com as AMX.

Figura 20 – Ensaio em batelada e os respectivos perfis temporais para amônia ($N-NH_4^+$), nitrito ($N-NO_2^-$), nitrogênio ($N-NH_4^+ + N-NO_2^-$), matéria orgânica (na forma de DQO) e produção final de nitrato ($N-NO_3^-$).



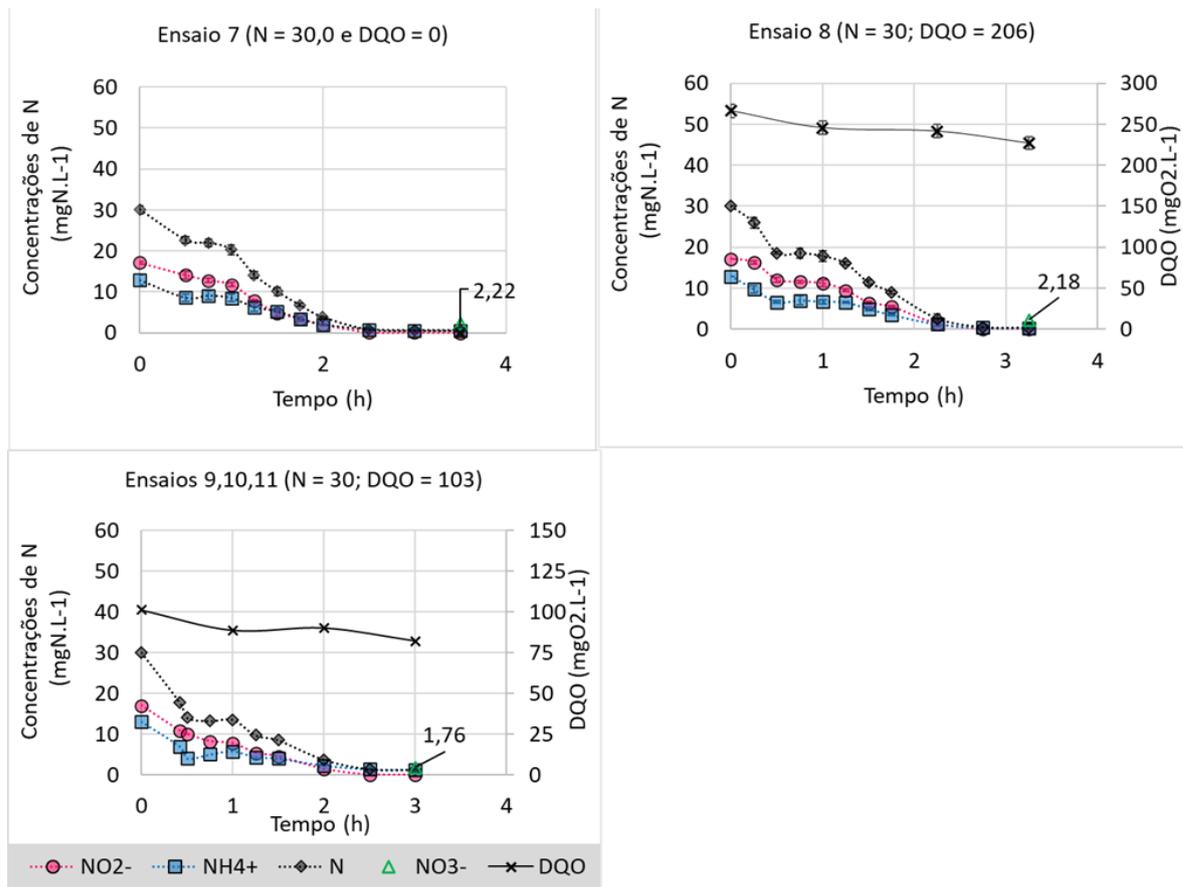
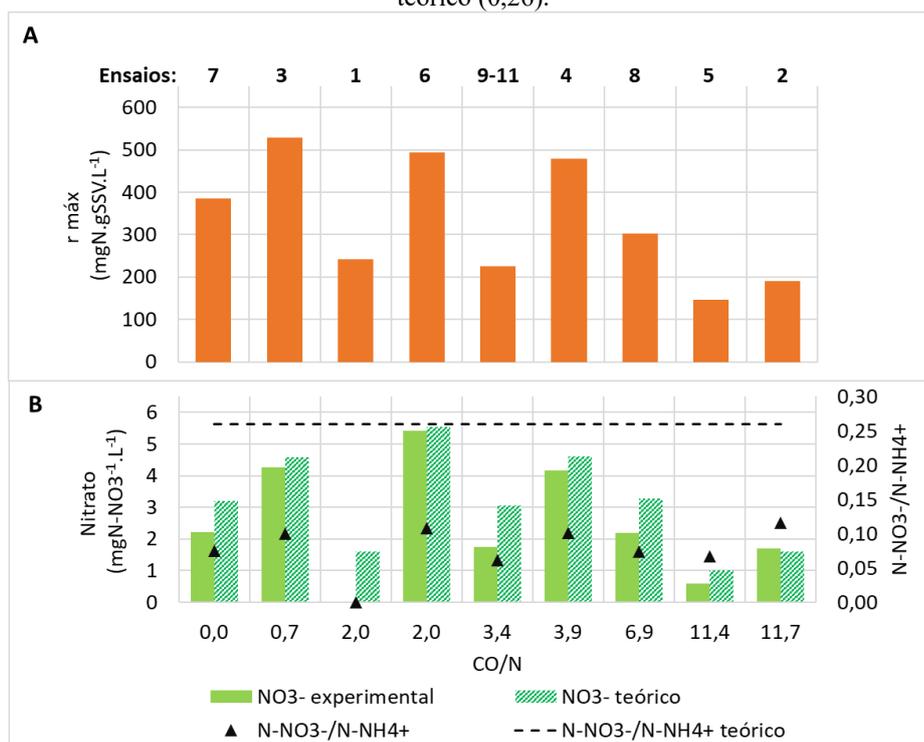


Figura 21 – Ensaio em batelada ordenados em função da relação CO/N para avaliação (A) da taxa máxima de remoção de nitrogênio ($r_{\text{máx}}$), e (B) da produção de nitrato e a relação $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ em comparação ao valor teórico (0,26).



A partir dos 11 ensaios em batelada, realizados em triplicata, pode-se avaliar as eficiências para remoção de nitrogênio (ERN) e matéria orgânica (ERDQO), conforme apresentado na Tabela 13. Devido a primeira paralisação provocada pela pandemia, alguns ensaios foram realizados antes da pandemia e outros após a pandemia. Entretanto, todos os ensaios foram realizados com biomassa granular anammox ativa em período de estabilidade de operação do reator R1, primeiramente entre os dias 369 e 427, e posteriormente entre os dias 523 e 551 (consultar Figura 18).

Por meio do software estatístico Protimiza, o delineamento do composto central rotacional (DCCR) para os resultados obtidos com os 11 ensaios, não permitiu avaliar, estatisticamente, a interrelação das concentrações de N e CO para ERN e ERDQO. Desta forma, efetuou-se a avaliação do delineamento do composto central (DCC), em que não são utilizados os pontos axiais (consultar Tabela 10). Sendo assim, os ensaios 5, 6, 7 e 8 tiveram de ser excluídos para que fosse realizada a avaliação estatística da interrelação entre N e MO considerando os resultados obtidos com nitrogênio oscilando entre 15 e 45 mgN.L⁻¹ e MO entre 30 e 176 mgO₂.L⁻¹.

Tabela 13 – Eficiências médias de remoção de nitrogênio (ERN) e de matéria orgânica (ERDQO) para os 11 ensaios em batelada.

Ensaio		Concentração afluente			Eficiências médias (%)			
Antes* Jan-Mar 2020	Após** Nov-Dez 2021	N (mgN.L ⁻¹)	CO (mgO ₂ .L ⁻¹)	CO/N	ERN	Desvio padrão	ERDQO	Desvio padrão
1		15	30	2,0	97,7	0,2	43,3	1,3
2		15	176	11,7	86,7	1,4	11,4	4,5
	3	45	30	0,7	85,1	0,4	13,9	2,9
	4	45	176	3,9	82,4	0,0	9,0	5,4
5		9	103	11,4	93,1	0,0	11,8	0,0
	6	51	103	2,0	87,9	0,2	32,8	3,8
7		30	0	-	90,6	0,7	-	-
8		30	206	6,9	91,6	0,1	14,7	3,8
	9	30	103	3,4	90,6	0,2	14,6	3,4
	10	30	103	3,4	90,7	0,2	21,5	3,4
	11	30	103	3,4	89,9	0,2	19,0	3,4
Média:					89,7	0,3	19,2	3,1

Notas - * Ensaio 1, 2, 5, 7 e 8 foram realizados antes da primeira paralisação provocada pela pandemia.

** Ensaio 3, 4, 6, 9, 10 e 11 foram realizados após a primeira paralisação.

Primeiramente foi feita avaliação apenas para a primeira resposta (y1 = ERN). Com nível de significância de 10%, pode-se notar que as variáveis N (x1), DQO (x2) e a interrelação N.DQO (x1.x2) são significativas para a resposta ERN (Figura 22). O coeficiente de correlação

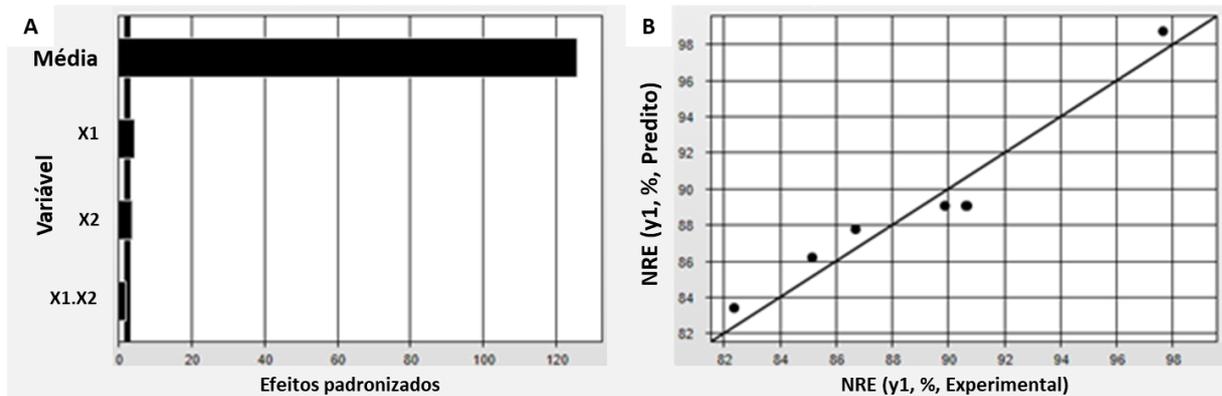
foi de $R^2 = 92,79\%$ sendo considerado suficiente para gerar a Eq. 12, que representa o modelo parametrizado para a ERN (y_1) em função das concentrações de N (x_1) e DQO (x_2). As Eq. 13 e Eq. 14 descrevem a decodificação para x_1 e x_2 , respectivamente.

$$y_1 = 89,01 - 4,21 \cdot x_1 - 3,44 \cdot x_2 + 2,05 \cdot x_1 \cdot x_2 \quad \text{Eq. 12}$$

$$x_1 = \frac{N - 30}{15} \quad \text{Condição: } 15 \leq N \leq 45 \quad \text{Eq. 13}$$

$$x_2 = \frac{DQO - 103}{73} \quad \text{Condição: } 30 \leq DQO \leq 176 \quad \text{Eq. 14}$$

Figura 22 – Concentração de nitrogênio (N, x_1), concentração de matéria orgânica (DQO, x_2) e a interrelação entre N e DQO para a eficiência total de remoção de nitrogênio (ERN, y_1) para nível de significância de 10%. (A) Gráfico de Pareto e (B) correlação entre os valores experimentais e preditos.



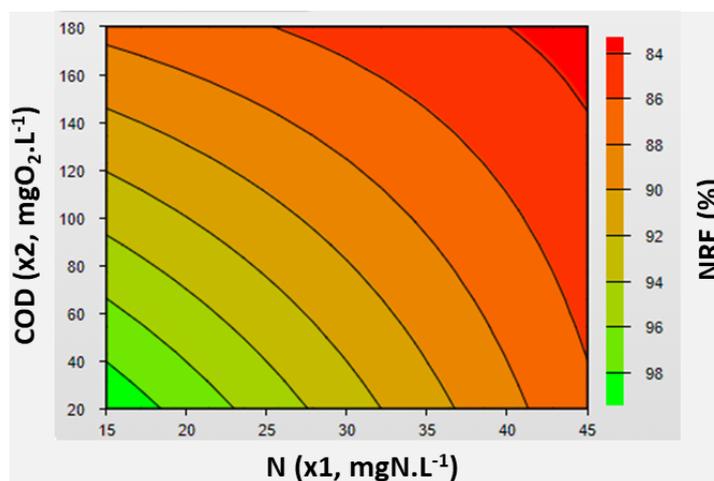
Segundo Rodrigues e Iemma (2014) , para avaliar se o modelo é estatisticamente significativo, é preciso atender as seguintes condições: (i) $R^2 > 90\%$; (ii) $F_{\text{regressão/resíduos}} \geq F_{\text{tabelado}}$; e (iii) $F_{\text{falta de ajuste/erro puro}} \leq F_{\text{tabela}}$. A primeira condição foi atendida, uma vez que $R^2 = 92,79\%$. As outras condições foram avaliadas com base no teste de ANOVA (Tabela 14) e do p-valor. A segunda condição atende ao requisito, uma vez que o p-valor de regressão (0,03214) deve ser inferior ao nível de significância (10% ou 0,10). Contudo, a terceira condição não foi atendida, pois o p-valor (0,01932) deve ser superior ao nível de significância (0,10). Conforme Rodrigues e Iemma (2014), isso ocorre quando a falta de ajuste é baixa, mas o erro puro tende a zero. Neste caso, o modelo não pode ser validado a partir dos dados utilizados.

Tabela 14 – Teste de ANOVA para avaliação do modelo obtido para ERN (y1).

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado	p-valor
Regressão	135,1	3	45	12,9	0,03214
Resíduos	10,5	3	3,5		
Falta de ajuste	10,1	1	10,1	50,3	0,01932
Erro puro	0,4	2	0,2		
Total	145,6	6			

Apesar da necessidade de ajustes ao modelo, foi gerada a superfície de resposta para ERN (Figura 23), onde pode-se prever que valores reduzidos de N e DQO ($N < 37 \text{ mg.L}^{-1}$ e $DQO < 145 \text{ mg.L}^{-1}$) promovem maiores ERN ($> 90\%$).

Figura 23 – Superfície de resposta para a eficiência de remoção de nitrogênio (ERN).

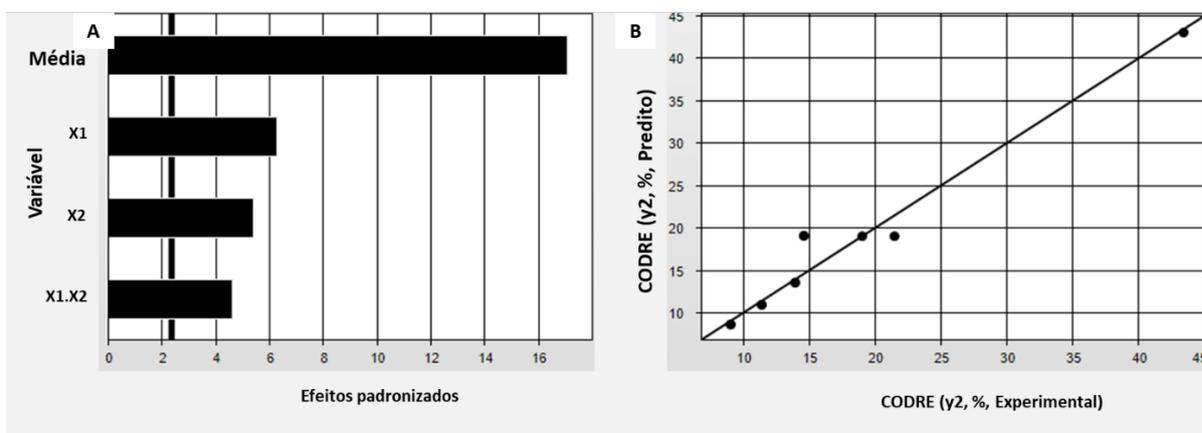


De forma semelhante à análise para a primeira resposta (ERN, y1), realizou-se a análise estatística para a resposta da eficiência de remoção de matéria orgânica (ERDQO, y2). Com nível de significância de 10%, as concentrações de N (x1), DQO (x2) e a interrelação N.DQO (x1.x2) também demonstraram ser significativas para ERDQO (Figura 24). Os valores experimentais estão em conformidade com os valores preditos ($R^2 = 96,78\%$), atendendo ao primeiro requisito apresentado anteriormente, o que permitiu gerar o modelo parametrizado para a ERDQO (y2, %), apresentado na Equação 15. As Eq. 13 e Eq. 14 também devem ser utilizadas para a decodificação de x1 (N, mgN.L^{-1}) e x2 (DQO, $\text{mgO}_2.\text{L}^{-1}$), respectivamente.

$$y2 = 18,98 - 7,96.x1 - 9,23.x2 + 6,78.x1.x2$$

Equação 15

Figura 24 – Efeito da concentração de nitrogênio (N, x1), concentração de matéria orgânica (DQO, x2) e a interrelação entre N e DQO para a eficiência total de remoção de nitrogênio (ERDQO, y2) para nível de significância de 10%. (A) Gráfico de Pareto e (B) correlação entre os valores experimentais e preditos.



Um novo teste de ANOVA (Tabela 15) e comparações do p-valor com o nível de significância foram realizados. A segunda condição atende ao requisito, uma vez que o p-valor de regressão (0,00970) deve ser inferior ao nível de significância (10% ou 0,10). A terceira condição também foi atendida, pois o p-valor (0,72727) deve ser superior ao nível de significância (0,10). Neste caso, o modelo pôde ser validado a partir dos resultados obtidos.

Tabela 15 – Teste de ANOVA para avaliação do modelo obtido para ERDQO (y2).

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado	p-valor
Regressão	777,9	3	259,3	30,1	0,00970
Resíduos	25,9	3	8,6		
Falta de ajuste	1,9	1	1,9	0,2	0,72727
Erro puro	23,9	2	12,0		
Total	803,7	6			

A ERDQO foi significativa (> 30%) quando os valores de N e DQO foram baixos ($N < 29 \text{ mgN.L}^{-1}$ e $DQO < 89 \text{ mgO}_2\text{.L}^{-1}$). A remoção de DQO pode ter ocorrido pela desnitrificação heterotrófica, devido a condição anóxica estabelecida na realização dos ensaios em batelada e pela presença de nitrito antes do ensaio. Além disso, é possível inferir que os elétrons disponíveis no meio devido a presença de DQO, podem ter favorecido a desnitrificação heterotrófica de NO_3^- , uma vez que foram observados valores de nitrato abaixo da estequiometria do processo anammox (STROUS et al., 1998).

A avaliação dos modelos cinéticos de Andrews, Edwards e Monod foi realizada para cada um dos 11 ensaios em batelada. O coeficiente de correlação (R^2 , %) de cada modelo para

a remoção de amônia e de nitrito foi comparado com a cinética dos dados obtidos para cada ensaio. Devido a primeira paralisação (155 dias), a avaliação foi feita primeiramente entre os ensaios realizados antes a paralisação e posteriormente para os ensaios realizados após a paralisação (Tabela 16). Os parâmetros cinéticos, respectivos a cada modelo, foram comparados com os dados experimentais obtidos (consultar Figura A4).

Tabela 16 – Coeficiente de correlação (R^2) para comparação cinética dos resultados obtidos com o consumo de amônio e nitrito para os modelos de Andrews, Edwards e Monod.

Ensaio		Concentração afluente		R^2 (%)					
				Amônio			Nitrito		
Antes*	Após**	N (mgN.L ⁻¹)	CO (mgO ₂ .L ⁻¹)	Andrews	Edwards	Monod	Andrews	Edwards	Monod
		15	30	na	67,77	62,90	na	94,73	91,90
		15	176	na	69,79	62,89	90,51	93,64	90,51
		9	103	na	85,11	87,07	96,49	97,99	96,49
		30	0	na	86,39	86,61	na	na	67,16
		30	206	na	91,92	91,94	na	90,72	94,20
	3	45	30	na	na	98,22	na	na	97,31
	4	45	176	na	na	na	na	na	94,72
	6	51	103	na	na	91,80	na	na	91,80
	9, 10 e 11	30	103	na	na	31,88	84,67	84,62	84,67

Notas – na: não ajustado ao modelo. * Ensaio 1, 2, 5, 7 e 8 foram realizados antes da primeira paralisação provocada pela pandemia. ** Ensaio 3, 4, 6, 9, 10 e 11 foram realizados após a primeira paralisação.

O modelo cinético de Monod mais se ajustou aos dados experimentais obtidos, com R^2 médio para amônia e nitrito de 76,66% e 89,86%, respectivamente. A aproximação dos dados experimentais ao modelo de Monod remete a entender que não houve inibição ao processo anammox provocada pela presença de matéria orgânica nos testes realizados. O modelo cinético de Monod depende apenas da taxa de consumo de substrato específica (q_s máx), concentração de substrato (C_s) e constante de meia saturação (K_s). Em contrapartida, os modelos de Andrews e Edwards, que apresentam parâmetros cinéticos de inibição (K_i), não puderam ser bem ajustados aos dados experimentais obtidos.

No trabalho de De Prá et al. (2016), o modelo cinético de Edwards foi melhor ajustado para o processo anammox do que os modelos de Andrews, Monod e Teissier, com R^2 iguais a 96,20% e 91,90% para amônia e nitrito, respectivamente. Contudo, no trabalho citado, as concentrações de amônia e nitrito testadas foram relativamente altas (20 a 800 mgN.L⁻¹ com NO_2^- / NH_4^+ afluente = 1,0) e com temperatura amena de 25°C, os quais podem aumentar a possibilidade de inibição ao processo anammox, em especial, para nitrito (LOTTI et al., 2014b; LOTTI et al., 2014a).

Os parâmetros cinéticos obtidos a cada ensaio (Tabela 17) apresentaram alta variabilidade, não sendo possível definir valores confiáveis para $q_{\text{máx}}$ e K_s tanto para amônia como para nitrito. Acredita-se que a preservação da biomassa ao longo de 155 dias possa ter inviabilizado a comparação entre os ensaios em batelada antes e após a paralisação. Além disso, a presença de diferentes concentrações de matéria orgânica e de relações CO/N podem ter alterado os parâmetros cinéticos. Os testes de atividade específicos ao processo anammox são realizados com a adição de nitrito e amônia, mas livres de matéria orgânica (CHEN et al., 2011; DAPENA-MORA et al., 2007; DE PRÁ et al., 2016; LOTTI et al., 2014b) Os valores mais condizentes com a literatura foram obtidos para os testes realizados antes da paralisação, onde $q_{\text{máx}}$, para amônia e nitrito, oscilaram entre 119,04 - 241,68 $\text{mgN-NH}_4^+ \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ e entre 116,16 - 252,72 $\text{mgN-NO}_2^- \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, respectivamente. Tais valores são ligeiramente inferiores aos valores reportados por Chen et al (2011), que avaliaram o processo anammox com 1,0 $\text{gSSV} \cdot \text{L}^{-1}$ em testes de batelada na temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$, e obtiveram valores de $q_{\text{máx}}$ para amônia e nitrito oscilando entre 297,12 - 381,12 $\text{mgN-NH}_4^+ \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ e entre 201,60 - 304,8 $\text{mgN-NO}_2^- \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, respectivamente. De Prá et al., (2016) reportaram $q_{\text{máx}}$ relativamente mais baixos, sendo de 139,2 $\text{mg NH}_4^+ \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ e de 171,36 $\text{mgN-NO}_2^- \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, contudo, neste último trabalho citado, a temperatura utilizada foi de 25°C , o que pode explicar a redução da taxa máxima de conversão dos substratos.

Em Yuan et al. (2022), testes específicos de batelada com 30 e 50 $\text{mgN} \cdot \text{L}^{-1}$ de amônia e nitrito, respectivamente, permitiram obter, a 30°C , r_{MAX} de 75,12 $\text{mgN} \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. Considerando que o consumo de nitrogênio foi proporcional a estequiometria anammox, ou seja, $\text{NH}_4^+:\text{NO}_2^-$ igual a 1,00:1,32, a taxa máxima de remoção para amônia e nitrito seria próxima de 32,38 $\text{mg NH}_4^+ \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ e de 42,74 $\text{mgN-NO}_2^- \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, respectivamente. Tais valores obtidos por Yuan et al. (2022) consideravelmente inferiores aos obtidos valores obtidos no presente trabalho (119,04 - 241,68 $\text{mgN-NH}_4^+ \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ e 116,16 - 252,72 $\text{mgN-NO}_2^- \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$).

Em relação a constante de meia saturação de substrato (K_s), também se optou por avaliar os valores obtidos antes da paralisação, por serem mais condizentes com a literatura. O valor de K_s , para amônia e nitrito, oscilou entre 1,12 - 3,44 $\text{mgN-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ e 0,16 - 1,73 $\text{mgN-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente. Tais valores são inferiores aos reportados por De Prá et al. (2016), em que os valores de K_s para amônia e nitrito foram de 96,4 $\text{mgN-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ e 56,4 $\text{mgN-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente. Novamente, acredita-se que o efeito da temperatura amena de 25°C pode

ter feito com que a constante de meia saturação seja maior no trabalho citado em relação ao presente estudo, onde a temperatura foi de 37°C, ótima às anammox.

Tabela 17 – Parâmetros cinéticos dos ensaios em batelada obtidos para o modelo de Monod.

Ensaio		Concentração afluente		Monod			
				q máx (mgN.gSSV ⁻¹ .d ⁻¹)		Ks (mgN.L ⁻¹)	
Antes*	Após**	N (mgN.L ⁻¹)	OC (mgO ₂ .L ⁻¹)	Amônia	Nitrito	Amônia	Nitrito
1		15	30	119,04	144,48	1,12	0,52
2		15	176	119,04	144,48	1,12	0,16
5		9	103	146,40	116,16	1,30	0,60
7		30	0	241,68	219,12	3,44	0,90
8		30	206	1.151,04	252,72	33,66	1,73
	3	45	30	54.504,00	903,60	1.821,09	10,01
	4	45	176	na	2.060,16	na	42,07
	6	51	103	2.070,96	2.070,96	28,93	28,93
	9, 10 e 11	30	103	1.023,36	1014,24	29,11	26,83

Notas – na: não ajustado ao modelo. * Ensaio 1, 2, 5, 7 e 8 foram realizados antes da primeira paralisação provocada pela pandemia. ** Ensaio 3, 4, 6, 9, 10 e 11 foram realizados após a primeira paralisação.

Pode-se concluir que a atividade da biomassa granular anammox, adaptada a remover 232 mgN.L⁻¹ na ausência de matéria orgânica, não foi limitada devido à baixa concentração de nitrogênio (9 – 51 mgN.L⁻¹) e pela presença matéria orgânica na forma de acetato (0-206 mgO₂.L⁻¹). A eficiência de remoção de nitrogênio manteve-se elevada (ERN > 80%) para todos os testes realizados durante o curto período de 4,0 h. Além disso, a taxa máxima de remoção de nitrogênio média foi relativamente alta, oscilando entre 150 e 530 mgN.gSSV⁻¹.d⁻¹. Os resultados em batelada podem ter afetado a avaliação estatística dos efeitos das concentrações de nitrogênio, DQO e da interrelação destas variáveis no processo anammox, sendo que os modelos gerados para estimar as eficiências de remoção de nitrogênio (ERN) e de matéria orgânica (ERDQO) não puderam ser validados via DCCE.

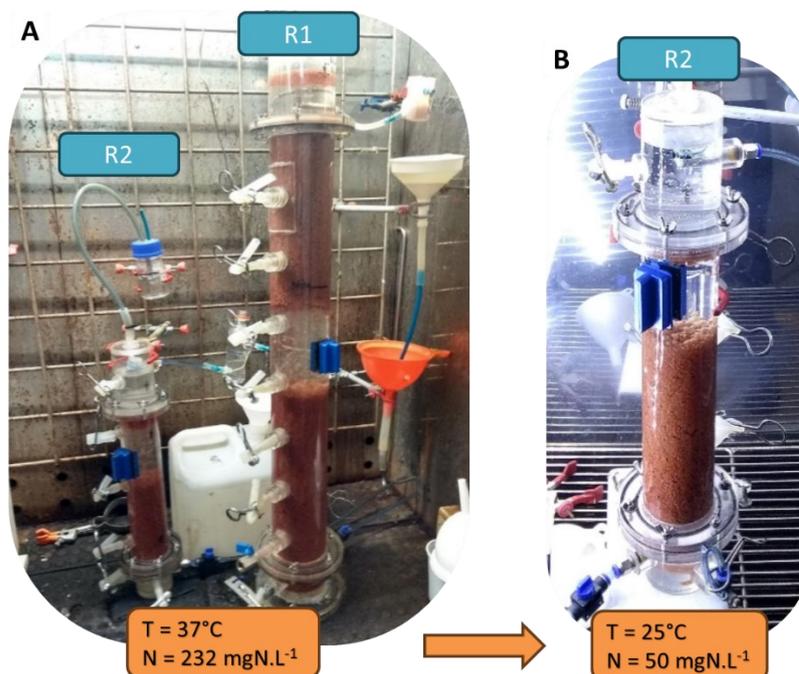
Os parâmetros cinéticos, obtidos pela similaridade com o modelo de Monod, podem não refletir o processo anammox devido à alta variabilidade dos valores de q_{máx} e K_s relatados anteriormente. Contudo, a complexidade da matéria orgânica reduz a atividade heterotrófica em comparação a compostos facilmente biodegradados (acetato) (PIJUAN et al., 2020), o que pode favorecer a adoção do processo anammox em efluentes anaeróbios, que inevitavelmente contém compostos orgânicos lentamente biodegradáveis (DQO_{lb}). Apesar dos resultados indicarem potencial de uso da biomassa granular anammox para condições *mainstream*, o monitoramento de reator contínuo em condições similares deve ser realizado, para que seja

possível avaliar os efeitos a longo prazo da adição de matéria orgânica no processo anammox e na remoção de nitrogênio.

5.3 Fase II – Adaptação da biomassa granular anammox para condições *mainstream*

No dia 607 de operação do R1, parte da biomassa granular anammox enriquecida foi inoculada no R2, realizando-se o *startup* com $8,1 \text{ gSSV.L}^{-1}$ (Figura 25). O principal objetivo era avaliar se a biomassa granular anammox, adaptada às elevadas concentrações de nitrogênio (232 mgN.L^{-1}) e de temperatura (37°C), seria capaz, em termos de ERN, de tratar baixas concentrações de nitrogênio (50 mgN.L^{-1}) e de temperatura (25°C). Com esse propósito, realizou-se o monitoramento do R2, em que os principais resultados obtidos com a operação foram apresentados na Figura 26.

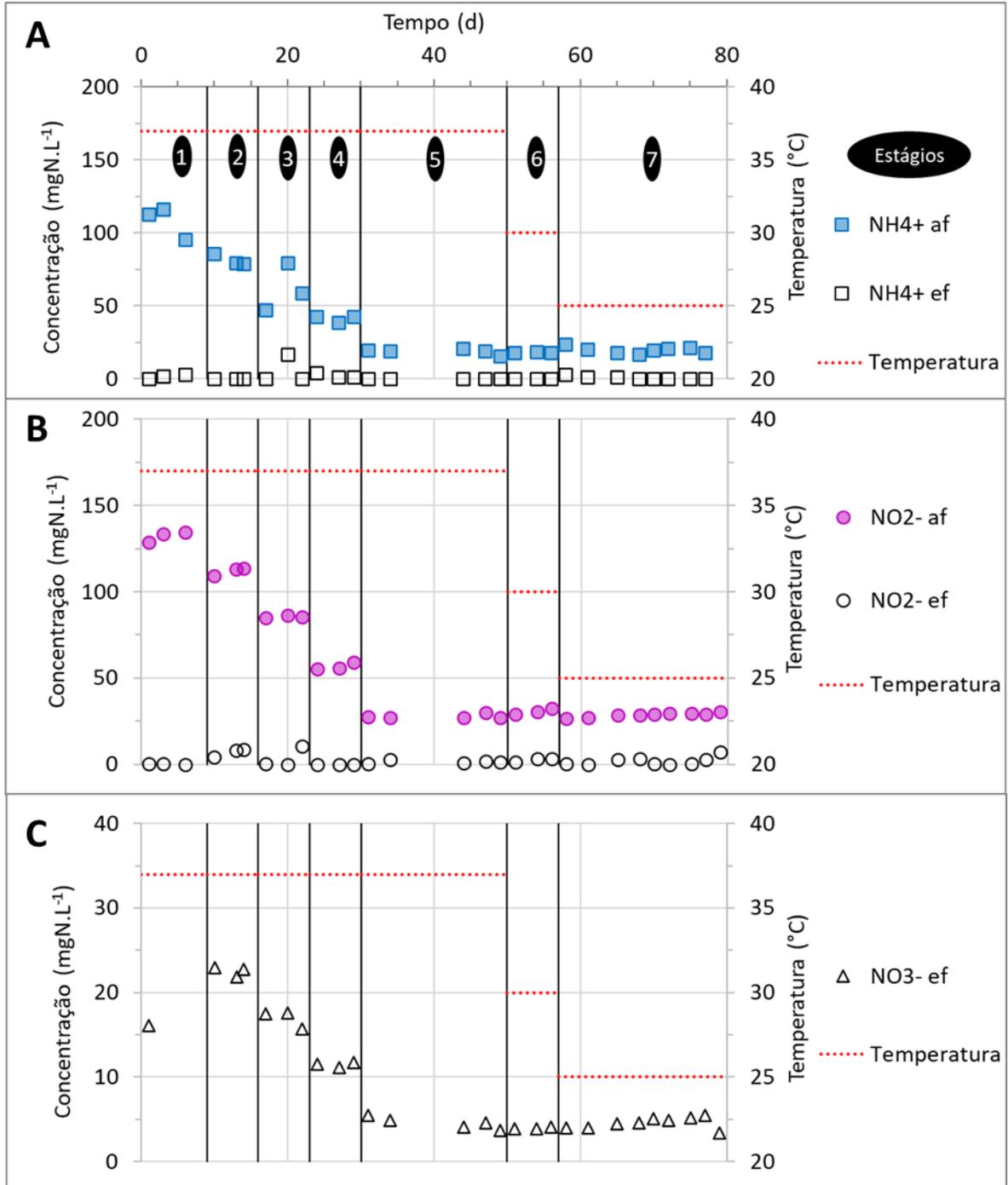
Figura 25 – (A) Foto dos reatores R1 e R2 mantidos a temperatura de 37°C e alimentados com 232 mgN.L^{-1} .
(B) Foto do reator R2 mantido a temperatura de 25°C e alimentado com 50 mgN.L^{-1} .

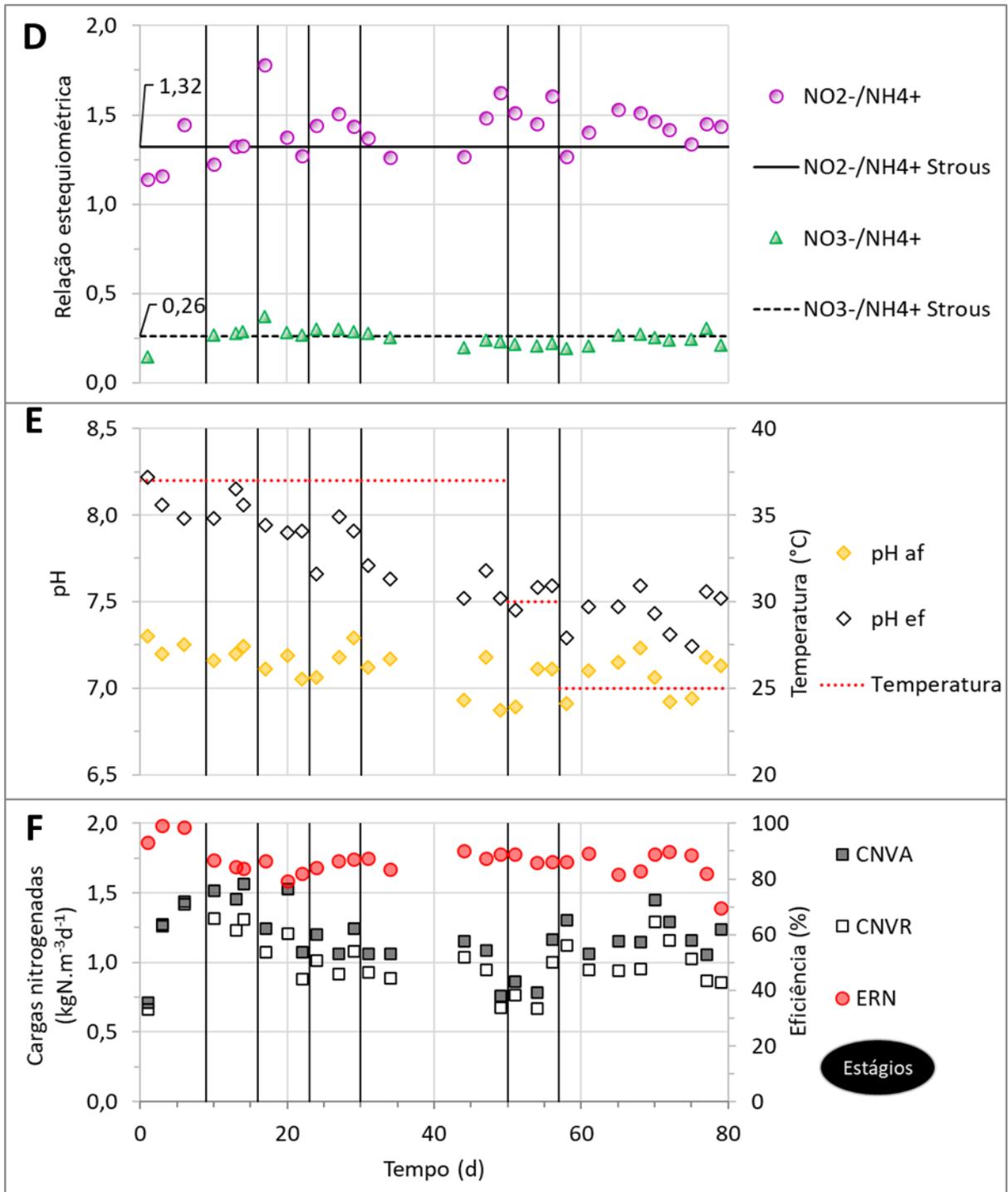


As reduções das concentrações de nitrogênio de 232 para 50 mgN.L^{-1} e da temperatura de 37 para 25°C foram realizadas gradativamente ao longo de 65 dias (Figura 26AB), sem prejudicar a ERN, que se manteve estável e elevada em $87,3 \pm 4,8\%$ (Figura 26F). Durante este período, as relações estequiométricas obtidas foram de $1,40 \pm 0,16$ para $\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$ e $0,25 \pm$

0,05 para $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ (Figura 26D), as quais foram ligeiramente superiores e inferiores aos valores teóricos de 1,32 e 0,26, respectivamente, reportados por Strous et al. (1998).

Figura 26 – Resultados obtidos com o monitoramento do reator R2 (Fase II). Os gráficos apresentam os seguintes dados: concentrações afluente e efluente de (A) amônia (N-NH_4^+), (B) nitrito (N-NO_2^-) e (C) nitrato (N-NO_3^-), (D) relações estequiométricas comparadas com Strous et al. (1998), (E) medições afluente e efluente de pH, e (F) carga nitrogenada volumétrica aplicada (CNVA) e removida (CNVR), e eficiência de remoção de nitrogênio total (ERN).





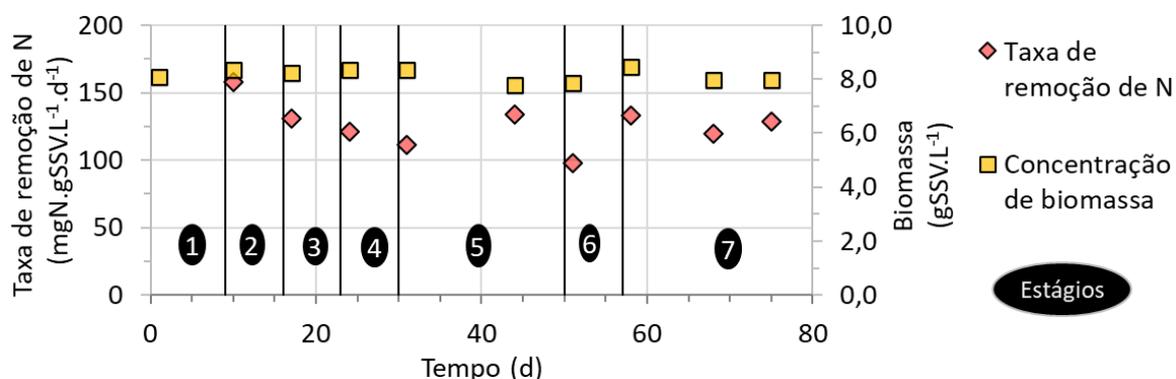
Notas - Os estágios representam a redução gradual da concentração de nitrogênio de 232,0 para 50,0 mgN.L⁻¹, e posteriormente da temperatura de 37 para 25°C.

Juan-Díaz et al. (2021), operando um reator anammox por 325 dias, também observaram que as relações estequiométricas de 1,30 – 1,50 para N-NO₂⁻/N-NH₄⁺ e de 0,10 – 0,23 para N-NO₃⁻/N-NH₄⁺ foram, respectivamente, superiores e inferiores aos valores teóricos reportados

na literatura. Além disso, o efluente apresentou elevada qualidade em termos de concentração de nitrogênio inorgânico total (NIT) de $6,6 \pm 1,4 \text{ mgN.L}^{-1}$.

A atividade específica anammox *in-situ* (μ_{AMX}) média (consultar Tabela A1) de $123,16 \pm 17,31 \text{ mgN.gSSV}^{-1}.\text{d}^{-1}$ (Figura 27) e a média de ERN ($87,3 \pm 4,8\%$) foram semelhantes aos valores descritos em Lotti et al. (2014b). Os autores citados operaram um sistema PNA a temperatura de 20°C e 15°C , e calcularam os valores para μ_{AMX} de 150-130 e 130-110 $\text{mgN.gSSV}^{-1}.\text{d}^{-1}$ com ERN de 95-85% e 89-73%, respectivamente.

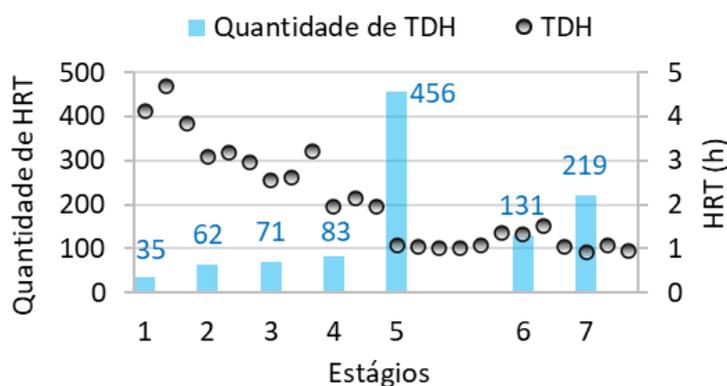
Figura 27 – Taxa de remoção de nitrogênio do processo anammox (μ_{AMX}) e concentração de biomassa durante a adaptação da biomassa granular anammox no R2.



Notas - As condições aplicadas aos 7 estágios foram apresentadas na metodologia (consultar Tabela 11).

Apesar da redução da temperatura e da concentração de N, o R2 comparado com o R1, obteve valores de CNVR semelhantes, sendo de $1,30 \pm 0,14$ e $1,02 \pm 0,21 \text{ kgN.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, respectivamente. Além disso, o TDH foi de apenas 1,0 h para o R2, enquanto no R1 foi de 4,0 h. Apesar desses resultados do terem sido obtidos em um curto período (65 dias), cada etapa operacional no R2 foi mantida por no mínimo 35 TDHs (estágio 1) e máximo de 456 (estágio 5), como pode ser observado na Figura 28. Estratégia semelhante foi adotada por Cheng et al. (2020), que tinham como objetivo transferir a biomassa anammox adaptada às condições *sidestream* ($280 \text{ mgN-NH}_4^+.\text{L}^{-1}$, $280 \text{ mgN-NO}_2^-.\text{L}^{-1}$ e 35°C) para *mainstream* ($30 \text{ mgN-NH}_4^+.\text{L}^{-1}$, $40 \text{ mgN-NO}_2^-.\text{L}^{-1}$ e 15°C). Eles observaram que a redução gradativa da temperatura de 35 para 25 e finalmente para 15°C fez com que a CNVR fosse praticamente o dobro ($7,0 \text{ kgN.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$) em comparação a alteração abrupta da temperatura de 35 para 15°C ($3,6 \text{ kgN.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$). Tais cargas elevadas também foram obtidas com a redução gradativa de TDH, entretanto, de 1,37 para 0,23 h.

Figura 28 – Tempo de detenção hidráulico (TDH) e quantidade de TDHs aplicados aos sete estágios para realização da adaptação da biomassa granular anammox na operação do R2.



Reino e Carrera, (2017) obtiveram elevada CNVR de $1,7 \pm 0,1 \text{ kgN.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ a 26°C alimentando um reator UASB com uma água residuária sintética contendo $33,0 \text{ mgNH}_4^+ \cdot \text{N.L}^{-1}$ e $38,0 \text{ mgNO}_2^- \cdot \text{N.L}^{-1}$. Ao invés de diminuir a concentração de nitrogênio, eles aumentaram a vazão de alimentação, conseqüentemente aumentando a carga de nitrogênio e, de forma concomitante, reduziram a temperatura de 32 para 26°C . Contudo, a aclimatação da biomassa granular anammox às condições *mainstream* foi realizada em 325 dias, enquanto nossa pesquisa alcançou resultados semelhantes em apenas 65 dias, mantendo ERN média de $87,3 \pm 4,8\%$.

Recentemente, Yuan et al. (2022) utilizaram biomassa granular anammox adaptada a tratar $270 \text{ mgN-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ e $300 \text{ mgN-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$ em escala piloto com TDH de $24,0 \text{ h}$, para tratar $31 \text{ mgN-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ e $35 \text{ mgN-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$ em escala de bancada com TDH de $2,0 \text{ h}$. Ambos os reatores foram alimentados com efluente sintético, mas a temperatura não foi reduzida, e sim mantida a 35°C . Nos primeiros 10 dias a ERN foi de apenas 30-50%, mas rapidamente atingiu patamar elevado e estável em $85 \pm 4\%$. Demonstrando que o efeito da redução abrupta da concentração de N proporcionou curto impacto (<10 dias) no processo anammox quando a temperatura é mantida elevada (35°C).

Em Fernandes et al. (2018), a redução de temperatura ($35 \rightarrow 25 \rightarrow 20^\circ\text{C}$) também teve pouco impacto nas eficiências combinadas de remoção de amônia e nitrito ($96 \rightarrow 96 \rightarrow 90\%$). Embora o estudo citado tenha sido conduzido com efluentes de reatores UASB tratando esgoto doméstico (com suplementação de nitrito), não foram relatados efeitos adversos à biomassa. Desta forma, os resultados obtidos com a presente pesquisa são similares aos resultados obtidos nos trabalhos citados, e pode-se afirmar, que a biomassa granular anammox, enriquecida em condições *sidestream*, tem potencial para ser utilizada em condições *mainstream*. Para efeitos

de comparação, a análise microbiológica foi apresentada em tópico à parte (5.5 - Análise microbiológica – Fases IA, II e III).

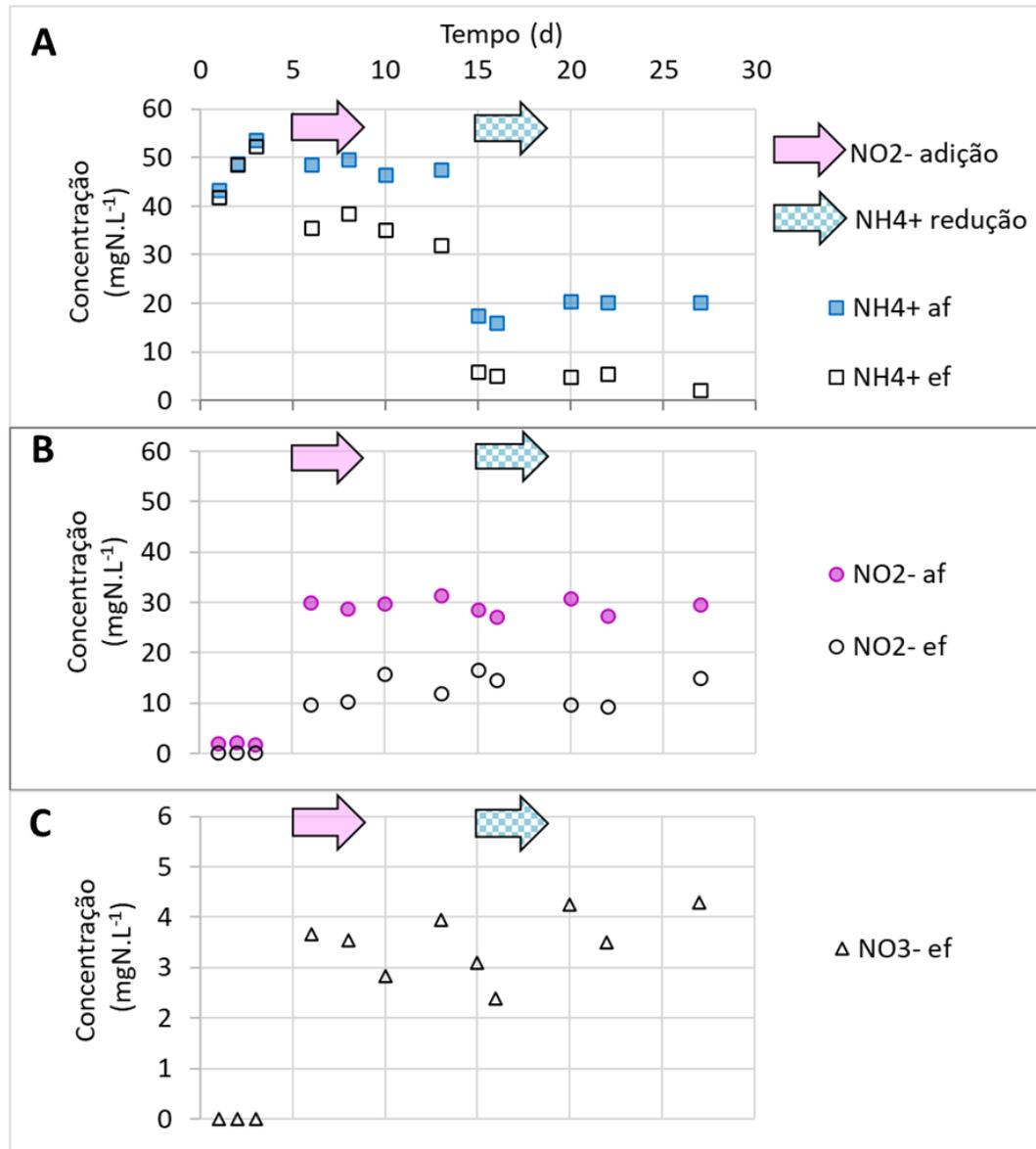
5.4 Fase III – Utilização de biomassa granular anammox para condução do processo PNA

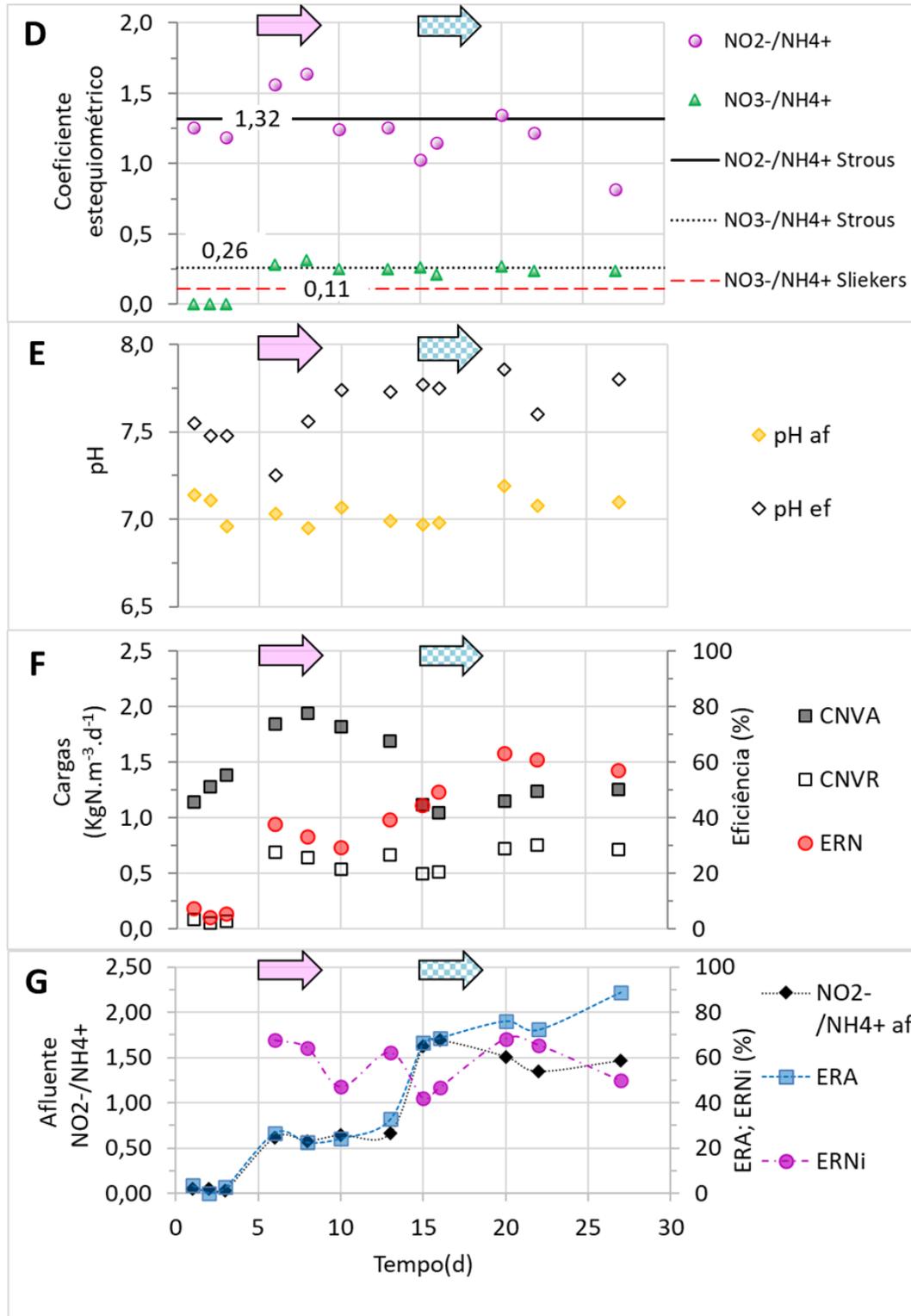
Nos primeiros dias de operação do reator R3, a ERN foi drasticamente reduzida de ~80% (R2) para valores inferiores a 10%. O consumo de amônio, o acúmulo de nitrito, e a produção de nitrato foram praticamente nulos (Figura 29ABC), indicando que o processo anammox havia sido abruptamente cessado e o processo de nitrificação parcial (PN) não estava ocorrendo com implementação da aeração intermitente automatizada (AIA).

Para evitar redução drástica na atividade das bactérias anammox, a suplementação de nitrito (~30 mgN-NO₂⁻.L⁻¹) foi iniciada a partir do dia 6 (seta rosa, Figura 29), e a concentração de amônio foi reduzida de 50 para 20 mgNH₄⁺.L⁻¹ a partir do dia 15 (seta azul quadriculada, Figura 29). A prática da AIA foi mantida para avaliar se a aeração impactaria na remoção de nitrogênio. A partir do dia 6 em diante, a relação estequiométrica média para NO₃⁻/NH₄⁺ passou a ser de 0,26 ± 0,04, demonstrando que o processo anammox estava ocorrendo em conformidade com a teoria, de 0,26 (Strous et al., 1998), mas acima da estequiometria para o processo PNA de 0,11 (Sliemers et al., 2002) (Figura 29D). Apesar da falta de nitrito no início da operação, a razão N-NO₂⁻/N-NH₄⁺ média foi de 1,22 ± 0,25, aproximando-se do valor teórico para o processo anammox (1,32) (Figura 29D).

Além dos ajustes de nitrito e amônia, a partir do dia 16, um cone *Imhoff* foi utilizado como dispositivo de decantação do efluente do R3, com o intuito de capturar os possíveis flocos que não estavam sendo retidos no separador trifásico e estavam sendo lavados do reator durante a aeração (Figura 30). Os flocos retidos eram então reintroduzidos diariamente no reator para promover o enriquecimento de AOB, pois crescem preferencialmente em flocos ao invés de grânulos (LAURENI et al., 2019; QIAN et al., 2021; YANG et al., 2018). Uma abordagem semelhante, utilizando hidrociclones, foi implementada com sucesso em Strass, ETE austríaca (WETT et al., 2015). Apesar das medidas adotadas (ajuste de amônia e nitrito reintrodução da

Figura 29 – Resultados obtidos com o monitoramento do R3 (Fase III). Os gráficos apresentam os seguintes dados: concentrações afluente e efluente de (A) amônia ($N-NH_4^+$), (B) nitrito ($N-NO_2^-$) e (C) nitrato ($N-NO_3^-$), (D) relações estequiométricas comparadas com Strous et al. (1998) e Sliemers et al. (2002), (E) medições afluente e efluente de pH, (F) carga nitrogenada volumétrica aplicada (CNVA) e removida (CNVR), e eficiência de remoção de nitrogênio total (ERN), e (G) eficiências de remoção de amônia (ARR) e nitrito (ERNi), e relação afluente de nitrito/amônio ($N-NO_2^-/N-NH_4^+$ af).



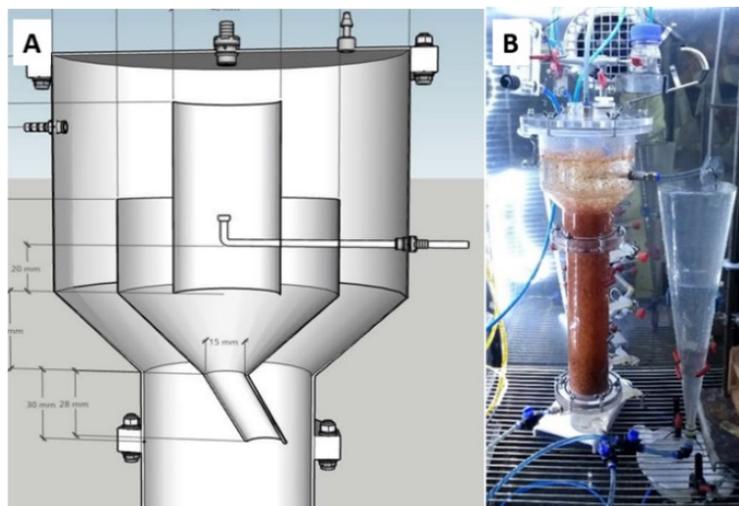


Notas - A seta rosa representa o dia em que foi iniciada a suplementação de 30 mgN-NO₂⁻.L⁻¹; a seta azul quadriculada representa o dia em que foi reduzida a concentração de amônia de 50 para 20 mgN-NH₄⁺.L⁻¹.

biomassa floculenta no R3) a ERN máxima foi de apenas 60-65% (Figura 29F). Analisando a Figura 29G, pode-se notar alta similaridade da curva de eficiência de remoção de amônia (ERA) com a curva para a relação afluente de nitrito/amônia (NO₂⁻/NH₄⁺ afluente). Sendo assim, a

remoção de nitrogênio ocorria via anammox, com ajuste de substrato, ou seja, não houve indício da ocorrência do processo PN.

Figura 30 – (A) Desenho técnico do *headspace* de separador trifásico do R3 (Fase III); (B) Foto do R3 durante o período de aeração e uso de cone *Imhoff* para captura de flocos.



As condições estabelecidas para AIA (óxico/anóxico = 15/45 min) e TDH (1,0 h) não permitiram conduzir o processo PNA, provavelmente devido a ausência de bactérias oxidadoras de amônia (AOB), como demonstrado nas análises microbiológicas apresentadas no tópico 4.6. A aeração foi baseada na duração das fases óxica e anóxica, e na taxa de fluxo de ar. O período anóxico de 45 minutos, para induzir a fase *lag* às NOB, foi consistente com o período anóxico mínimo recomendado de 15-20 minutos mencionado por Gilbert et al. (2014). No entanto, a taxa de fluxo de ar definida em $10 \text{ mL}_{\text{ar}} \cdot \text{min}^{-1}$ (equivalente a $4 \text{ mL}_{\text{ar}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}_{\text{reator}}^{-1}$) pode não ter sido suficiente para promover oxidação parcial de amônio a nitrito durante o período aeróbio de 15 minutos.

Em um estudo realizado por Chini et al. (2016), a taxa de fluxo de ar de $20 \text{ mL}_{\text{ar}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}_{\text{reator}}^{-1}$ com AIA (oxic/anóxico = 15/15 min) foi aplicada em um reator PNA mantido a uma temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e resultou em CNVA de $0,49 \pm 0,03 \text{ kgN} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ com ERN de $62,20 \pm 2,71\%$. No entanto, tais valores de CNVR e ERN foram obtidos alimentando o reator PNA com $300 \text{ mgNH}_4^+ \cdot \text{N} \cdot \text{L}^{-1}$, o que representa em 6 vezes a concentração de nitrogênio afluente ($50 \text{ mgN} \cdot \text{L}^{-1}$) almejada neste estudo. Além disso, o TDH de 9,0 h utilizado por Chini et al. (2016) pode ter contribuído para o bom desempenho do processo de PNA. Em contraste, o presente estudo utilizou um TDH curto, de apenas 1 hora, o que pode ter limitado o tempo disponível para a oxidação do amônio. Aumentar o TDH sem aumentar as baixas concentrações de

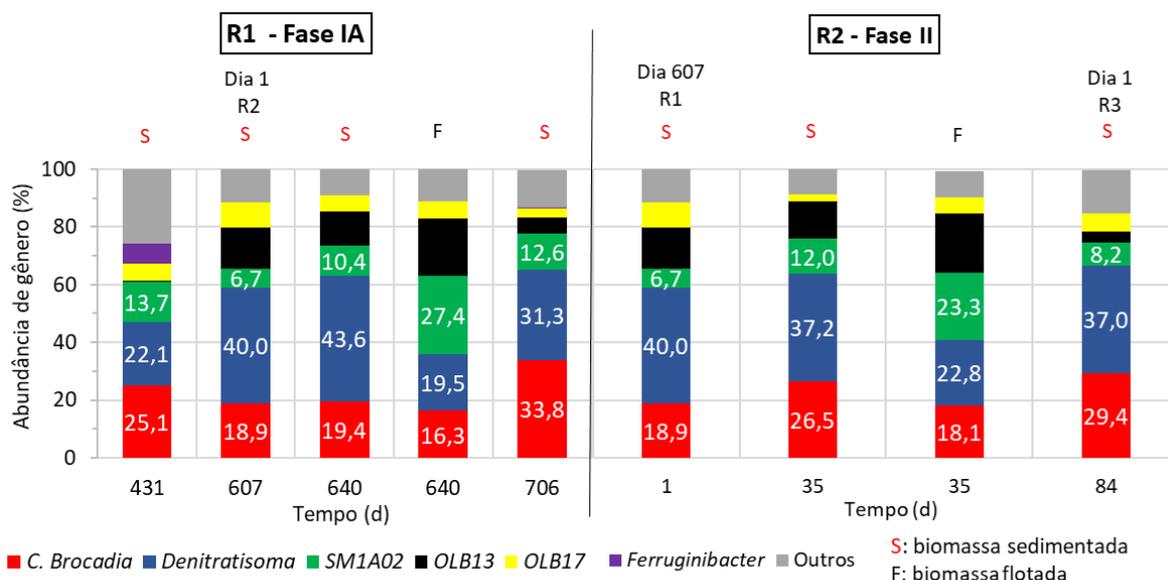
nitrogênio do influente ($\sim 50 \text{ mgN.L}^{-1}$) reduziria a alta CNVA ($> 1,0 \text{ kgN.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$), limitando a disponibilidade do substrato e afetando potencialmente o desempenho na remoção de nitrogênio. Essa observação pôde ser confirmada por Zhang et al. (2021), pois um choque de baixa CNVA, de 0,80 para $0,48 \text{ kgN.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, provocado pelo aumento do TDH de 12 para 20 h, prejudicou o processo de PNA e levou a uma redução na ERN de 80,11 para 38,66%.

No trabalho realizado por Qian et al. (2021), 40 min de TDH foram suficientes para promover a estabilidade do processo *mainstream* PNA no tratamento de $60 \text{ mgN-NH}_4^+.\text{L}^{-1}$ com alta carga CNVA ($2,0 \text{ kgN.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$) e a temperatura de $23 \pm 3^\circ\text{C}$. Elevadas eficiências puderam ser obtidas nestas condições ($\text{ERN} \geq 80\%$ e $\text{ARE} \geq 95\%$), apesar de não ter sido utilizada matéria orgânica. Em Du et al. (2022), 1 h de TDH também permitiu obter elevada ERN de 94,1% com elevada CNVA ($1,35 \text{ kgN.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$) e em temperaturas entre $13,5$ e $29,4^\circ\text{C}$. Entretanto, o trabalho citado realizou a desnitrificação parcial-anammox (PDA), ou seja, não foi implementada a aeração para tratar $53,4 \text{ mgN-NH}_4^+.\text{L}^{-1}$, $58,3 \text{ mgN-NO}_3^-.\text{L}^{-1}$ e $128,3 \text{ mg O}_2.\text{L}^{-1}$ (na forma de acetato de sódio). Estes trabalhos sugerem a possibilidade de realizar a remoção de nitrogênio em condições *mainstream*, seja via PNA ou PDA, mantendo-se reduzido TDH e altas CNVA.

5.5 Análise microbiológica – Fases IA, II e III

Mesmo utilizando meio sintético livre de matéria orgânica, um total de 102 microrganismos (a nível de gênero) foram identificados nas amostras de biomassa coletadas das seções inferior (biomassa sedimentada) e superior (biomassa flutuante) dos reatores R1 (Fase IA) e R2 (Fase II). É importante destacar que a última amostra de biomassa coletada do R2 foi utilizada para realizar o start-up do R3 (Fase III). Os filos bacterianos identificados com maior abundância relativa foram *Proteobacteria*, *Planctomicetos* e *Chloroflexi* (Figura A5, Apêndice A), o que corrobora com outros estudos que operaram sistemas baseados no processo anammox (AKABOCI et al., 2018; GAO et al., 2021; YANG et al., 2018). Os gêneros relativamente mais abundantes ($\geq 3\%$) foram Denitratisoma, Candidatus Brocadia, SM1A02, OBL13, OBL17 e Ferruginibacter (Figura 31).

Figura 31 – Abundância relativa de gêneros durante a operação dos reatores R1 e R2.



Notas - As abundâncias relativas referentes ao dia 640 no R1 e ao dia 1 no R2 foram obtidas a partir da mesma amostra. O mesmo ocorreu para o dia 84 no R2 e o dia 1 no R3.

O gênero *Denitratisoma* foi identificado como o mais abundante nas amostras coletadas, variando de 22,1 a 43,6% em R1 e de 22,8 a 40,0% em R2. Este microrganismo é conhecido por seu metabolismo heterotrófico desnitrificante, sugerindo que sua presença em reatores autotróficos provavelmente se deve ao uso de fontes internas de carbono provenientes da lise celular e da decomposição (XIE et al., 2021; ZHANG et al., 2021a). Além disso, as bactérias *Denitratisoma* utilizam diferentes ácidos graxos como fonte de carbono e nitrato como aceptor de elétrons (FAHRBACH et al., 2006), demonstrando ter potencial para melhorar a qualidade do efluente por meio da desnitrificação ou da desnitrificação parcial, e ainda podendo fornecer nitrito para as bactérias anammox (AMX) pela via da desnitrificação parcial (SILVEIRA et al., 2021).

O gênero anammox dominante, *Candidatus Brocadia*, apresentou a segunda maior abundância relativa de gênero, variando de 18,9 a 33,4% no R1 e de 18,9 a 29,4% no R2. Apesar da *Ca. Brocadia* também ter sido detectada nas biomassas flotas, sua abundância relativa é inferior se comparada à biomassa sedimentada, sendo de 16,3 e 19,4% para o R1 (dia 640) e de 18,1 e 26,5% no R2 (dia 35), respectivamente. Outro microrganismo anammox, *Ca. Jettenia*, também foi identificado, embora sua presença seja relativamente insignificante (<0,008%). Li et al. (2017) observaram um cenário diferente em um sistema PNA operado na temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, em que a bactéria *Ca. Jettenia*, tanto no início como no final da operação, foi

identificada com maior abundância relativa (40,2 → 29,0%) em comparação às bactérias *Ca. Brocadia* (0,5 → 2%) e *Ca. Kuenenia* (19,0 → 1,0%). Contudo, no trabalho citado, o reator PNA foi alimentado com esgoto doméstico real, pré-tratado anaerobiamente contendo ~62 mgO₂.L⁻¹ e ~34 mgN-NH₄⁺.L⁻¹.

O gênero *SMIA02*, também pertencente ao filo *Planctomicetos*, foi identificado em ambos os reatores R1 e R2, e se destacou como a terceira bactéria mais abundante. A bactéria *SMIA02* apresentou presença relativa maior nas biomassas flotadas, representando 27,4% em R1 e 23,3% em R2, enquanto as biomassas sedimentadas apresentaram percentuais de 10,4% e 12,0%, respectivamente. Xie et al. (2021), operando um reator baseado no processo anammox, enfatizaram que as *SMIA02* como uma nova cepa de bactérias com potencial para contribuir ao processo anammox. Os autores citados identificaram que a abundância relativa de *SMIA02* (4,39%) foi o microrganismo a nível de gênero pertencente ao filo *Planctomicetos* mais detectado, superando a abundância relativa de *Ca. Kuenenia* (3,61%). No estudo de Akaboci et al. (2018), a redução de temperatura de 25 para 15°C fez com que a abundância de *SMIA02* aumentasse cerca de duas vezes, demonstrando flexibilidade e resistência dessa bactéria em sistemas baseados no processo anammox.

A bactéria *OLB13*, pertencente ao filo *Chloroflexi*, possui a capacidade de reduzir nitrito e nitrato (MA et al., 2023) o que justifica o porquê de ser o quarto gênero mais abundante na presente pesquisa. Assim como a *SMIA02*, a abundância relativa de *OLB13*, para ambos os reatores, foi superior na biomassa flotada em comparação à biomassa sedimentada. Além disso, a biomassa flotada abriga uma menor diversidade filogenética em comparação a biomassa sedimentada, e essa característica também foi constatada por Tao et al. (2020). Segundo Ma et al. (2023), *OLB13* foi o grupo desnitrificante de maior predomínio em um reator anammox e desnitrificação simultânea (SAD). O estudo citado demonstrou que a abundância relativa de *OLB13* aumentou gradualmente de 6,43% para 31,05% à medida que a razão CO/N foi aumentada 0,0 (sem CO) para 2,0. Assim como na presente pesquisa, Xu et al. (2021) também identificaram que o nível significativo de *OLB13* (5,3 a 26,9%) interage positivamente com as bactérias anammox. Os autores ainda destacam que as bactérias *OLB13* são capazes de degradar peptídeos extracelulares e detritos celulares excretados pelas bactérias anammox, reduzindo o nitrato para nitrito, podendo contribuir com a disponibilidade de nitrito às AMX.

As bactérias *OLB17* estavam presentes em todas as amostras de lodo analisadas. Segundo Chen et al. (2021b), *OBL17* pertencem ao filo *Acidobacteria*, o qual tem forte e positiva interação com *Ca. Brocadia*. Por outro lado, as bactérias *Ferruginibacter* foram

detectadas apenas na primeira amostra coletada do R1, com abundância relativa de 7,1%, que foi sendo reduzida ao longo da operação. No trabalho realizado por Akaboci et al. (2018), foi observada redução de *Ferruginibacter*, entretanto, tal redução foi correlacionada à redução da suplementação de oxigênio em um reator PNA e da temperatura de 25 para 15°C.

Speth et al. (2016) desenvolveram um modelo ecológico baseado em genomas para observar a comunidade microbiana proveniente do reator de PNA em escala real de Olburgen, Holanda, que permitiu promover a disseminação de lodo granular anammox para muitos reatores ao redor do mundo. Como esperado, eles identificaram os três microrganismos mais significativos em reatores PNA: AMX (*Ca. Brocadia sinica*), AOB (*Nitrosomonas europaea*) e NOB (*Nitrospira sp.*). No presente estudo, a ausência de AOB e NOB em todas as amostras coletadas, em especial na amostra coletada no 85º dia de operação do R2 que serviu para realizar o *startup* do R3 (Fase III), pode ter sido causada por vários fatores. Em primeiro lugar, a ausência de aeração devido à suplementação de nitrito (razão N-NO₂⁻/N-NH₄⁺ de 1,32) foi mantida durante todo o período operacional de R1 e R2, totalizando 690 dias antes da Fase III ser iniciada. Em segundo lugar, o processo anammox foi operado continuamente em condições ótimas por períodos prolongados, com a temperatura de 37°C por 607 dias no R1 e por 50 dias durante as etapas 1 a 5 no reator R2. Consequentemente, quando a aeração intermitente automatizada (AIA) foi implementada no R3, esta biomassa granular anammox não foi capaz de promover a oxidação parcial de amônio, ou seja, a nitrificação parcial (PN) não ocorreu e inviabilizou a ocorrência do processo PNA. A dificuldade em alcançar estabilidade no processo de PNA é frequentemente relatada na literatura. Zhang et al. (2021), por exemplo, inocularam lodo enriquecido de AMX e AOB na proporção de 1:4, mantendo a temperatura em 30°C, entretanto, foram necessários 95 dias para estabilizar o processo de PNA. Desta forma, pode-se concluir com a presente pesquisa, que a biomassa granular anammox, enriquecida em condições ótimas, não pôde realizar o processo PNA. Contudo, a suplementação de nitrito combinada com AIA fez com que a ERN atingisse 65%, mas não foi observada contribuição do processo PN.

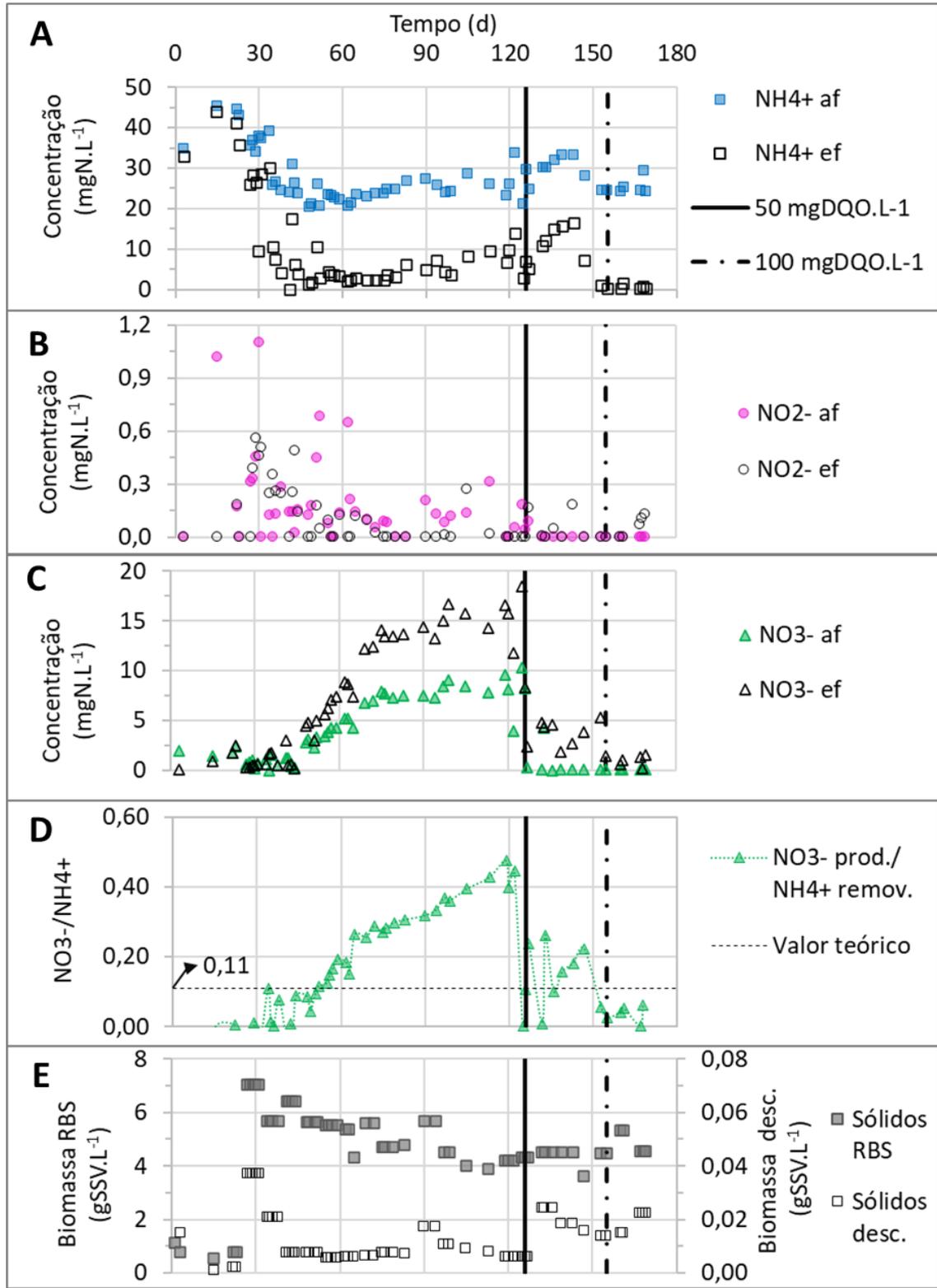
5.6 Fase IV – Efeito da adição de matéria orgânica complexa no processo *mainstream* PNA

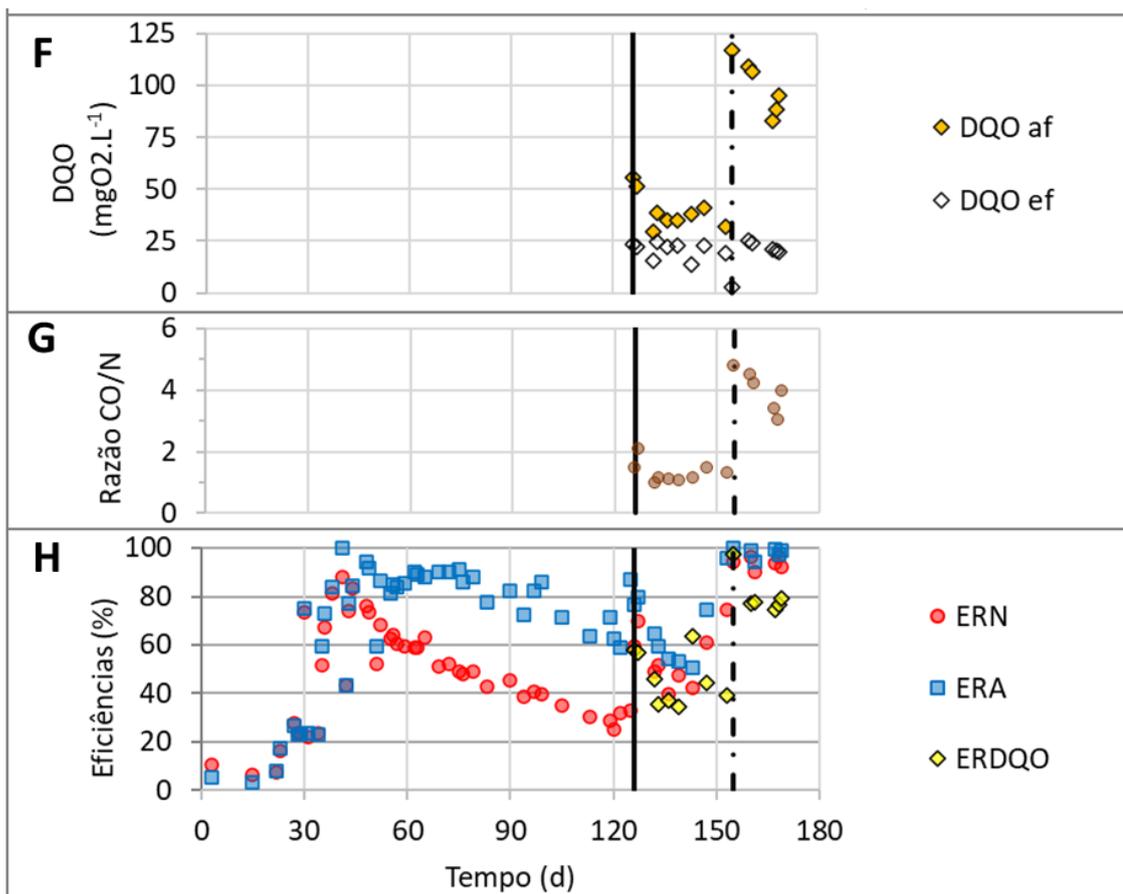
A condução do processo *mainstream* PNA com a operação do R4 permitiu gerar os resultados apresentados na Figura 32. O desempenho do processo PNA no R4 foi avaliado

primeiramente na ausência de OM e posteriormente com a adição de OM. As concentrações afluente e efluente de N-(NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^-) e DQO foram utilizadas para calcular as eficiências de remoção de amônio (ERA), nitrogênio (ERN) e DQO (ERDQO). Os valores correspondentes à alcalinidade podem ser observados no Apêndice A (ver Figura A6). Em média, alcalinidade à bicarbonato afluente e efluente ao RBS foi de $1,33 \pm 0,29 \text{ gCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ e $1,92 \pm 0,29 \text{ gCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente, sendo considerada suficiente para a realização do processo autotrófico PNA.

Nos primeiros 30 dias, a remoção de amônia (Figura 32A) e a produção de nitrato (Figura 32C) foram discrepantes em comparação à relação $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ estequiométrica para o processo PNA, de 0,11 (SLIEKERS et al., 2002) (Figura 32D). A conversão de nitrito, em contrapartida, ocorreu durante todo o período operacional (Figura 32B). Pode-se inferir que o nitrito produzido por AOB estava sendo rapidamente consumido por NOB nos períodos óxicos ($\text{OD} = 0,20 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$) ou por AMX e HB nos períodos anóxicos ($\text{OD} < 0,01 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$). A dificuldade de medição de N- NO_2^- é padrão para reatores PNA de etapa única, especialmente quando as concentrações de nitrogênio são reduzidas (AKABOCI et al., 2018; CUI et al., 2021; GAO et al., 2021). A dificuldade operacional de se estabilizar o processo PNA foi relatada em várias pesquisas (CHEN et al., 2019; ABMA et al., 2010; MIAO et al., 2018; PATHAK et al., 2022; WETT et al., 2015). Wett et al. (2015), por exemplo, relataram picos de nitrato oscilando entre 25 e 10 $\text{mgN-NO}_3^-\cdot\text{L}^{-1}$ no reator *mainstream* PNA na ETE austríaca, Strass. No entanto, quando a aeração intermitente com controle de OD ($0,00\text{-}0,55 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$) foi realizada em conjunto com a inoculação de biomassa granular PNA *sidestream*, as concentrações de nitrato foram reduzidas para valores abaixo de $5,0 \text{ mgN-NO}_3^-\cdot\text{L}^{-1}$.

Figura 32 – Resultados obtidos com o monitoramento do reator R4 (Fase IV). Concentrações afluente e efluente de (A) amônia (N-NH_4^+), (B) nitrito (N-NO_2^-) e (C) nitrato (N-NO_3^-), (D) relação estequiométrica $\text{N-NO}_3^-/\text{N-NH}_4^+$, (E) concentração de biomassa no R4 e descartada, (F) demanda química de oxigênio (DQO) afluente e efluente, (G) relação matéria orgânica e nitrogênio (CO/N), (H) eficiências de remoção de amônio (ERA), nitrogênio (ERN) e demanda química de oxigênio (ERDQO).





Notas - Linha vertical preta: início de adição de MO (50 mgO₂.L⁻¹);
 Linha vertical preta e pontilhada: aumento da adição de MO (100 mgO₂.L⁻¹).

No presente estudo, a ERN nos primeiros 25 dias de operação do sistema PNA-SBR foi de apenas $10,1 \pm 3,8\%$. A preservação da biomassa granular PNA a 4°C em uma solução de nitrato (300 mgN-NO₃⁻.N.L⁻¹), pode ter afetado o processo PNA no início da operação. Segundo Vlaeminck et al. (2007), a preservação da biomassa PNA a 4°C e 80 mgNO₃⁻.L⁻¹ demonstrou influenciar maior retardo na reativação do processo anammox do que a preservação sem nitrato. Além disso, Ali e Okabe (2015) relataram que a reativação do processo anammox pode variar bastante. Os autores compilaram dados de 38 técnicas de preservação em quatro estudos diferentes, e eles observaram que ERN inicial foi de 1,5 a 65,0%.

A baixa concentração de lodo pode ser outro indicativo da dificultado na ocorrência do processo PNA no início da operação. Visando encurtar o *startup* do R4, no dia 26, foi realizado um novo inóculo de biomassa PNA preservada por 265 dias em solução de nitrato (~ 300 mgNaNO₃.L⁻¹, fazendo com que a concentração de sólidos fosse aumentada de 1,0 para 7,0 gSSV.L⁻¹ (Figura 32E). A concentração de sólidos descartados após período de sedimentação continuou sendo negligenciável, sempre inferior a 0,03 gSSV.L⁻¹ (Figura 32E)

com descarte predominante de flocos (Figura A7, Apêndice A). O aumento da concentração de biomassa aparenta ter surtido efeito ao processo PNA, fazendo com que a ERN atingisse 88,1% no dia 44 (Figura 32H). Contudo, ao longo do período sem MO, a AIA implementada com rígido controle de OD com $0,20 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ (15 min em período óxico), e com $< 0,01 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ (15 min em período anóxico), não foi suficiente para remover, de forma eficiente, a parcela de nitrogênio, e o processo *mainstream* PNA foi sendo deteriorado. Entre os dias 26 e 125, a instabilidade do processo PNA pode ser facilmente observada nos gráficos da Figura 32.

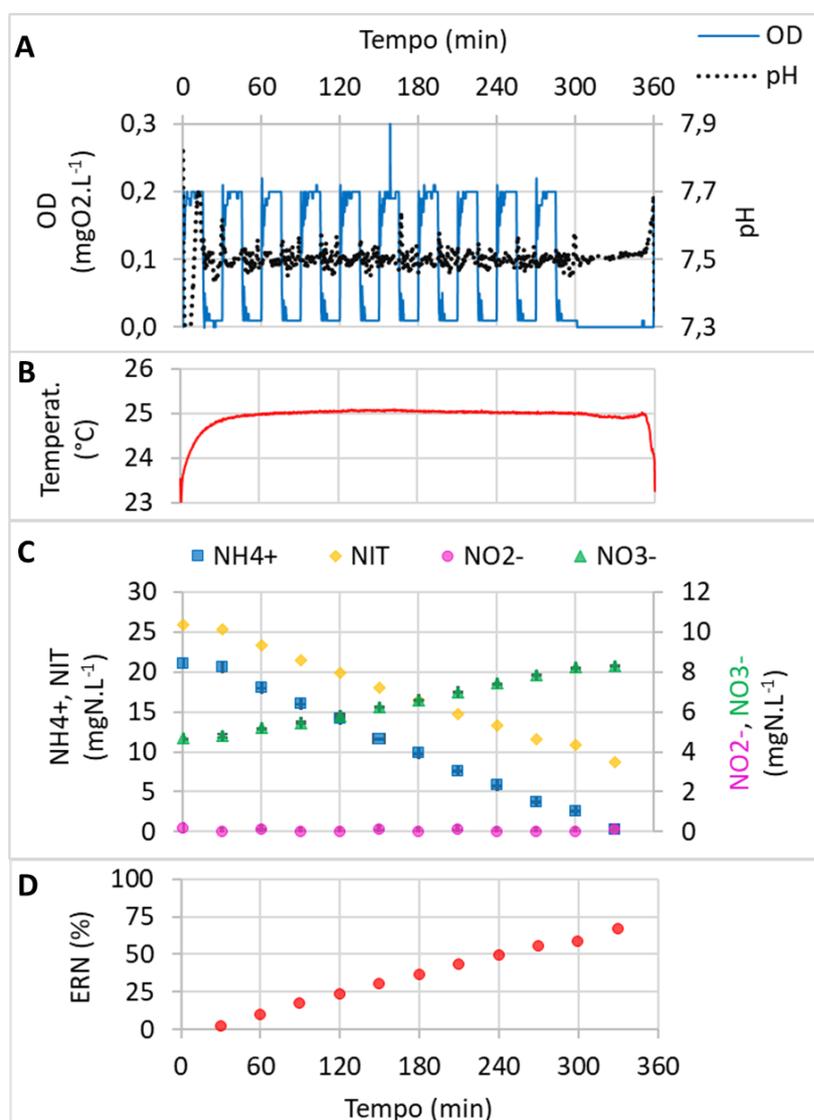
Pode-se inferir que as bactérias NOB estavam ganhando vantagem na competição por nitrito em relação as bactérias AMX e HB, uma vez que a parcela de nitrato estava sendo acumulada (Figura 32C). No dia 125, a concentração de nitrato no efluente atingiu $18,5 \text{ mgN-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$ e a relação $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ foi de 0,44 (Figura 32D), distanciando do valor estequiométrico teórico de 0,11, definido por Sliemers et al. (2002). A ERN foi reduzida de 88,1% no dia 41 para valores próximos de 30,0% no dia 120 (Figura 32D).

Em Laurenzi et al. (2016), as condições microaeróbias ($0,15 - 0,18 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$) para tratar $21,2 \pm 5,2 \text{ mgN-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ repercutiu na supressão da atividade de NOB, mesmo na temperatura de 15°C . Contudo, foram utilizados dois reatores de biofilme em leito móvel (MBBRs) com água residuária pré-tratada aerobiamente. Além disso, a presença de matéria orgânica no afluente ($46,0 \pm 7,0 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$) contribuiu para a via de desnitrificação heterotrófica, fazendo com que o efluente de ambos os reatores apresentasse baixas concentrações de nitrogênio ($5,7 \pm 1,3 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ e $8,0 \pm 2,6 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$).

5.6.1 Análise da AIA no processo *mainstream* PNA sem MO

A Figura 33 demonstra que a AIA estava sendo conduzida conforme a programação PLC. Estes resultados foram obtidos durante um ciclo de 6 horas no 63º dia de operação do PNA-SBR. O pH e a temperatura foram mantidos em 7,50 e 25°C , respectivamente. A redução da temperatura para valores próximos de 22°C ocorria apenas durante a fase de alimentação, mas era reestabelecida a 25°C em aproximadamente 30 minutos (Figura 33B). Pode-se confirmar que, na ocorrência dos intervalos de 15 minutos, os níveis de OD oscilavam entre de $0,20 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ (período óxico) e $< 0,01 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ (período anóxico).

Figura 33 – Avaliação do desempenho do sistema PNA-SBR no dia 63 de operação. (A) Perfis temporais de oxigênio dissolvido (OD) e pH, (B) temperatura, (C) concentrações de amônio (N-NH_4^+), nitrito (N-NO_2^-), nitrato (N-NO_3^-) e nitrogênio inorgânico total (NIT), e (D) eficiência de remoção de nitrogênio total (ERN).



Nota - As cruzes nos símbolos de amônio, nitrito e nitrato representam o desvio padrão da medição em triplicata.

Como mencionado anteriormente, para o sistema SBR-PNA, a medição de nitrito muitas vezes ficou abaixo do limite de detecção ($0,2 \text{ mgN-NO}_2^-$), mas amônio e nitrato puderam ser medidos (Figura 33C). A remoção de amônio no sistema provavelmente foi facilitada por AOB ou AMX, enquanto a produção de nitrato pode ter sido realizada por NOB ou AMX. A remoção completa de amônio sugere que o ciclo de 6,0 horas era suficiente para o processo PNA. Apesar da ERN ter sido de 66,4% (Figura 33D), a acumulação de nitrato também foi confirmada com concentrações de nitrato aumentando de 4,67 para $8,31 \text{ mgN-NO}_3^-\cdot\text{L}^{-1}$. A proporção $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ de 0,19 excedeu o valor teórico de 0,11 para o processo PNA (SLIEKERS et al., 2002), sugerindo a atuação de NOB na acumulação de nitrato. A ausência de MO limitava a capacidade

de HB de assimilar N-NO_3^- , fazendo com que este composto nitrogenado estivesse presente no efluente.

Chen et al. (2019) também enfrentaram dificuldades no controle da atividade de NOB sem a adição de MO para o processo *mainstream* PNA em condições semelhantes de temperatura e pH (25°C e $7,6 \pm 0,3$). Apesar do afluente conter $50 \text{ mgN-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$, o efluente apresentava níveis de nitrato próximos de $30 \text{ mgN-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$. Os autores citados reportaram que o curto TDH de 1,0 h foi insuficiente para realizar o processo PNA, havendo aumento de OD de 0,15 para $0,60 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$. Em contrapartida, para TDH de 6, 3 e 2 h, não houve acúmulo de nitrato. Para obter estabilidade no processo PNA, os pesquisadores aumentaram o TDH de 1,0 para 2,0 h e mantiveram a taxa de aeração em $0,35 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$. Esses ajustes fizeram com que a concentração de OD fosse reduzida para $0,13 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$, e foi observada a ERN de 72%. No presente estudo, a concentração de OD de $0,20 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$, fornecida com a AIA, promoveu a oxidação de amônia no sistema PNA-SBR, mas não impediu a atividade NOB, como relatado anteriormente devido ao acúmulo de nitrato.

Devido à baixa concentração de amônio ($25 \text{ mgN-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$) e pH próximo da neutralidade ($7,50 \pm 0,03$), a concentração de amônia livre (AL) foi calculada em apenas $2,5-1,0 \text{ mg N-NH}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ durante os primeiros 35 dias de operação, e inferior a $1,0 \text{ mg N-NH}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ no período remanescente da operação. Esses valores de FA não exercem uma pressão de inibição seletiva para NOB em comparação com AOB, AMX e HB, uma vez que as concentrações inibitórias de AL para estes grupos de bactérias são de 6, 16, 10-17 e $50 \text{ mgN-NH}_3 \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente (ANTHONISEN et al., 1976). Portanto, as concentrações de AL era insuficiente para contribuir com a supressão de NOB neste estudo. A concentração de ácido nitroso livre (ANL) foi sempre nula, devido às baixas concentrações de nitrito ao longo de toda a operação.

A razão entre o período de tempo anóxico e o óxico ($t_{\text{ano}}/t_{\text{ox}}$) utilizada no presente estudo de 1,0 (15 min/15 min), foi inferior à razão $t_{\text{ano}}/t_{\text{ox}}$ de 2,28 e 2,50 utilizadas por Feng et al. (2022) e Miao et al. (2018), respectivamente, em que estabilidade do processo PNA foi reportada. Contudo, o período anóxico de 15 minutos, adotado na presente pesquisa, condiz com o período anóxico mínimo de 15 a 20 minutos recomendado por Gilbert et al., (2014) para induzir a fase *lag* às NOB.

5.6.2 Efeito da MO complexa no processo mainstream PNA

A partir do dia 126, a adição de matéria orgânica (MO) complexa marcou um ponto de virada no desempenho do sistema SBR-PNA. A MO complexa simulou a composição de esgoto doméstico pré-tratado anaerobiamente na forma de DQO lentamente biodegradável (DQOlb, 71%) e rapidamente biodegradável (DQOrb, 29%). A concentração média de $39,7 \pm 8,3 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ (CO/N = $1,3 \pm 0,3$) promoveu a desnitrificação heterotrófica de nitrato (Figura 32C). Contudo, entre os dias 154 e 169, a concentração de DQO foi aumentada para $100,0 \pm 11,8 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ (CO/N de $4,0 \pm 0,6$), fazendo com que o meio sintético fosse mais semelhante à composição de efluentes de esgoto doméstico pré-tratados anaerobiamente encontrados em ETEs (CHERNICHARO, 2007; METCALF e EDDY, 2013). Durante esse último período, o sistema PNA-SBR apresentou o melhor desempenho, alcançando altas eficiências de remoção de amônio, nitrogênio e DQO, com valores de $98,2 \pm 1,9\%$ (ERA), $93,9 \pm 2,2\%$ (ERN) e $80,5 \pm 7,5\%$ (ERDQO), respectivamente. Miao et al. (2018) também descreveram que o aumento das relações CO/N de 1,1 - 2,5, utilizado esgoto pré-tratado aerobiamente, aumentou a ERN de 30,8 para 77,3%. Entretanto, a atividade e a abundância relativa de AMX foram limitados com CO/N de 2,5, indicando favorecimento de HB nesta condição.

Na presente pesquisa, 29% dos AGVs foram observados na segunda alimentação (F2, Tabela 12). Isso levanta a hipótese sobre a possibilidade de redução dissimilatória de nitrato para amônio (RDNA) como uma via potencial. Na presença de AGVs, a RDNA pode produzir amônio, que pode ser utilizado posteriormente por AMX e AOB Castro-Barros et al. (2017). Contudo, uma recente pesquisa realizada por Izadi e Andalib (2023) ressalta que a conversão de matéria orgânica lentamente biodegradável (DQOlb) para AGVs é improvável, o que dificulta compreender como a presença de DQOlb influencia no processo PNA.

Huang et al. (2014) demonstraram que acetato ($\leq 30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e propionato ($\leq 50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) não têm impacto significativo na oxidação de amônio. No entanto, concentrações mais elevadas de acetato ($240 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e propionato ($400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) podem interferir na oxidação de amônio. No presente estudo, as concentrações de acetato ($5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e propionato ($3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) foram muito mais baixas do que os valores relatados por Huang et al. (2014). Portanto, é improvável que essas baixas concentrações de AGVs deteriore o processo PNA.

O processo de desnitrificação parcial-anammox (PDA) também pode ter ocorrido no R4, durante os períodos anóxicos na presença de MO complexa, favorecendo a desnitrificação

parcial de nitrato a nitrito. Conforme Du et al. (2019), relações de CO/N entre 0,5 e 3,5 aumentam a taxa de produção de nitrito a partir de nitrato (PD), contudo, composições complexas de MO presente em águas residuárias brutas ao invés de carbono simples externo, como metanol, parecem reduzir a taxa de produção de nitrito, limitando o processo PDA.

Segundo Pijuan et al., (2020), a adição de MO complexa (acetato, peptona de sólidos de leite, amido, leite em pó desnatado, extrato de levedura e óleo de soja) com concentrações de $125 - 225 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ ($1,78 \leq \text{CO/N} \leq 4,90$), provocou gradual redução da atividade das bactérias anammox ao longo de 102 dias de operação com controle da temperatura de 26°C . Contudo, não foi realizado o processo PNA, ou seja, a aeração não foi implementada, sendo necessário adicionar nitrito e amônia com razão estequiométrica ideal (1,32). Apesar da redução da atividade das AMX, os autores citados mencionaram que a atividade anammox foi retomada assim que a adição de MO foi cessada, demonstrando flexibilidade do processo anammox.

Neste estudo, quando as razões CO/N do influente foram mantidas em aproximadamente $4,0 \pm 0,6$, a qualidade do efluente melhorou com concentrações de amônio, nitrito e nitrato de $0,47 \pm 0,47 \text{ mgN-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$, $0,13 \text{ mgN-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$ e $1,01 \pm 0,46 \text{ mgN-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente. Sendo assim, a concentração de NIT $< 2,0 \text{ mgN} \cdot \text{L}^{-1}$ está em conformidade com os regulamentos de limite de descarga de nitrogênio em vários países, como Brasil ($20,0 \text{ mgN} \cdot \text{L}^{-1}$, Brasil, 2011), Índia ($10,0 \text{ mgN} \cdot \text{L}^{-1}$, Nitin Shankar Deshpande vs. Union of India and others, 2019) e Suíça ($2,0 \text{ mgN-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ e $0,3 \text{ mgN-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$, WPO, 1998). Entretanto, vale ressaltar a necessidade de se avaliar a manutenção da qualidade do corpo receptor.

Infelizmente, em países em desenvolvimento, o cumprimento dos limites de descarga de nitrogênio em estações de tratamento de esgoto (ETEs) é raro (VON SPERLING; CHERNICHARO, 2005). Um estudo recente examinou dados de 49 ETEs no estado de Minas Gerais, e revelou que todas as ETEs violavam a legislação federal referente à descarga de nitrogênio em corpos d'água (DANTAS et al., 2022). Isso destaca os desafios significativos enfrentados pelas ETEs para alcançar e manter a remoção adequada de nitrogênio, a fim de atender às normas regulatórias atuais.

Apesar da qualidade de efluente ter sido obtida no sistema SBR-PNA com valores de amônia inferiores a $1,0 \text{ mgN-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$, a concentração residual de amônio de pelo menos $5,0 \text{ mgN-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ têm sido relatada como um importante fator para estabilizar sistemas *mainstream* PNA (POOT et al., 2016; YANG et al., 2023). Essa concentração residual de amônio favorece o crescimento de AMX e AOB, permitindo que ambos superem a atividade NOB na disputa por nitrito e oxigênio, respectivamente (POOT et al., 2016). Portanto, a fim de

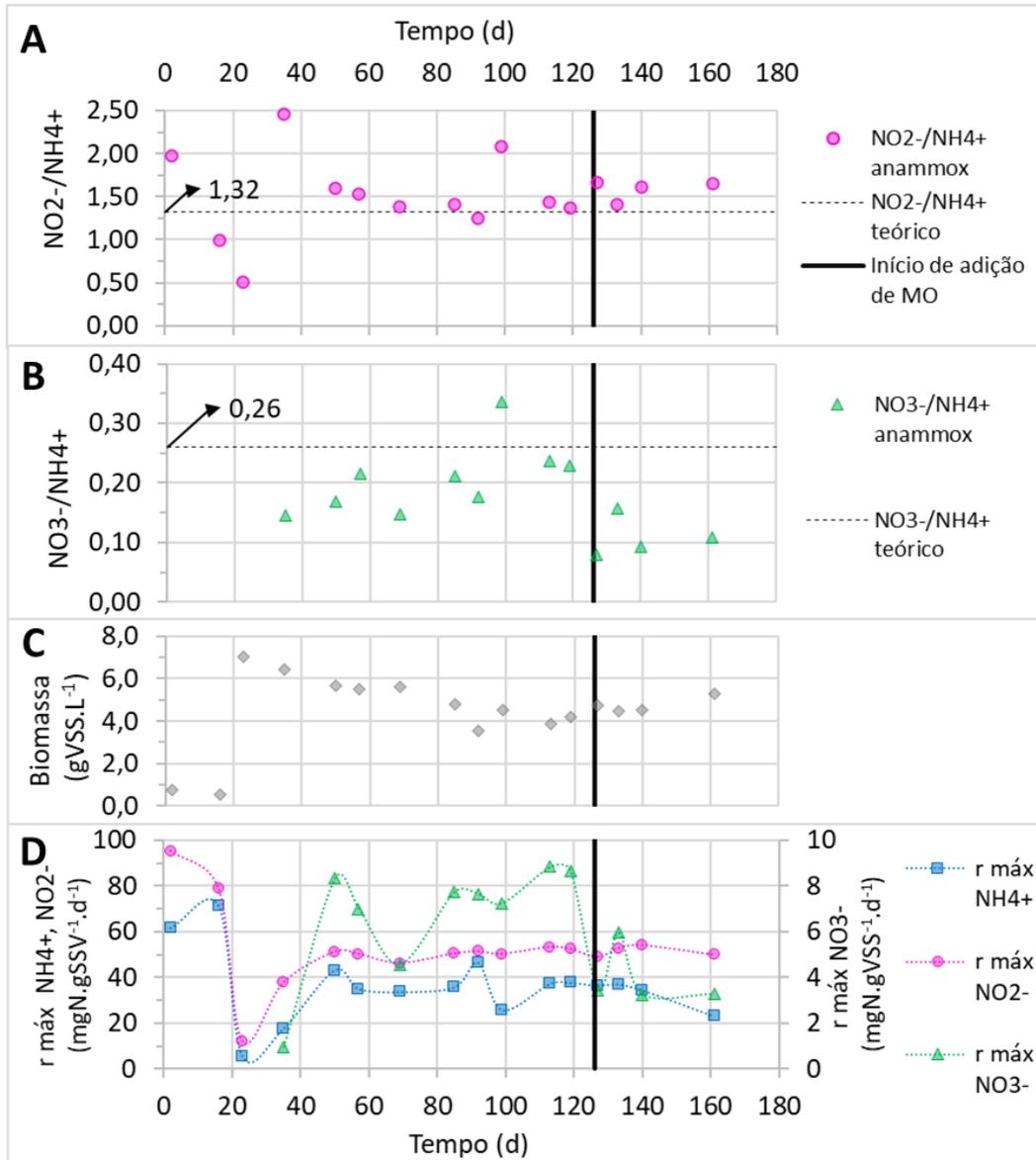
promover a estabilidade do processo *mainstream* PNA a longo prazo, a inclusão de uma unidade de polimento deve ser levada em consideração na implementação de reatores *mainstream* PNA para remover a parcela de amônio residual (CAO et al., 2017).

5.6.3 Testes de atividade específica do processo anammox (*in situ*)

A capacidade da biomassa granular PNA para realizar o processo de anammox foi testada *in situ* ao R4 e os resultados obtidos foram apresentados na Figura 34. Como mencionado anteriormente, o processo PNA apresentou instabilidade nos primeiros 40 dias de operação do R4, sendo assim, os testes foram influenciados por este período, principalmente pela reduzida concentração de biomassa ($\sim 1,0 \text{ gSSV.L}^{-1}$). No entanto, entre o 50º e o 161º dia, pode-se observar que as taxas máximas específicas de consumo de amônio e nitrito ($r_{\text{max N-(NH}_4^+ + \text{NO}_2^-)$) não foram afetadas pela AIA com baixa concentração de OD ($0,20 - 0,01 \text{ mgO}_2.\text{L}^{-1}$), baixa concentração de nitrogênio afluente ($25 \text{ mgNH}_4^+.\text{L}^{-1}$) e pela adição de MO complexa ($50-100 \text{ mgO}_2.\text{L}^{-1}$). A estabilidade da atividade específica anammox foi observada durante toda a operação e a média de $r_{\text{max N-(NH}_4^+ + \text{NO}_2^-)$ foi de $86,5 \pm 8,1 \text{ mgN.gSSV}^{-1}.\text{d}^{-1}$ (Figura 34). Esse valor foi comparado às atividades anammox observadas em outros sistemas *mainstream* PNA operados a 25°C . Laurení et al. (2016), por exemplo, obtiveram atividades menores em dois reatores MBBR sendo de $54,2 \pm 9,5$ e $51,1 \pm 14,1 \text{ mgN.gSST}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Por outro lado, Chen et al., (2019) e Akaboci et al. (2018) obtiveram atividades máximas de anammox mais altas sendo de $310,0 \pm 70,0$ e $238,4 \pm 37,4 \text{ mgN.gSSV}^{-1}.\text{d}^{-1}$, respectivamente.

Os testes realizados entre os dias 50 e 161 de operação do R4, a relação $\text{N-NO}_2^-/\text{N-NH}_4^+$ foi de $1,53 \pm 0,21$, ligeiramente superior à relação teórica de 1,32 (STROUS et al., 1998) (ver Figura 34A). Fernandes et al. (2018) adicionaram nitrito ao esgoto doméstico pré-tratado anaerobiamente para avaliar a condução do processo de anammox em temperaturas de $25, 30$ e 35°C , e observaram altas razões $\text{N-NO}_2^-/\text{N-NH}_4^+$ de 1,77, 1,70 e 1,96, respectivamente. Eles levantaram a hipótese de que mais íons de nitrito estavam sendo desnitrificados por HB, pois não foi implementada a aeração e o afluente continha MO.

Figura 34 – Perfis temporais dos testes de atividade de anammox in-situ no R4. (A) Relação nitrato consumido por amônio consumido ($N\text{-NO}_2^-/N\text{-NH}_4^+$), (B) relação nitrato produzido por amônio consumido ($\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$), (C) concentração da biomassa granular de PNA e (D) taxas máximas específicas de consumo e produção de espécies nitrogenadas (r_{max}) para amônio, nitrato e nitrato.



Nota - Valores teóricos das razões nitrogenadas conforme Strous et al. (1998).

A relação $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ apresentou mudanças significativas entre os períodos sem a adição de MO (dias 50-125) e com adição de MO complexa (dias 126-169), diminuindo de $0,22 \pm 0,05$ para $0,11 \pm 0,03$, respectivamente (Figura 34B). Essa diminuição foi atribuída ao possível aumento da atividade e crescimento de HB durante o período com MO adicionada ao reator, o que levou a uma maior absorção de nitrato durante os testes dedicados de anammox *in situ* (mesmo sendo realizados sem adicionar MO). Independentemente da presença ou ausência de MO, as relações observadas de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ foram menores do que a relação teórica de 0,26

(STROUS et al., 1998). Em contraste, Fernandes et al. (2018) relataram relações $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ mais elevadas, obtendo valores de 0,35, 0,37, 0,44 e 0,38 em diferentes condições experimentais com concentrações de DQO de zero, 130, 100 e 97 $\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente.

Em Yang et al. (2023), a baixa concentração de OD (0,15 a 0,35 $\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$) para operar um PNA-SBR fez com que a $r_{\text{máx}}$ diminuísse de 448,8 para 168,0 $\text{mg N}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ quando a concentração residual de amônio foi menor do que 5,0 $\text{mgNH}_4^+\cdot\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$. No presente estudo, as concentrações residuais de amônio foram de $4,97 \pm 3,09$, $9,95 \pm 5,58$ e $0,47 \pm 0,48$ $\text{mgNH}_4^+\cdot\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$. Estas concentrações foram obtidas em três períodos distintos: antes da adição de MO, com adição de 50 $\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ e com adição de 100 $\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Apesar das concentrações de amônia residual observadas serem bem distintas, não foi detectada instabilidade da atividade máxima de anammox.

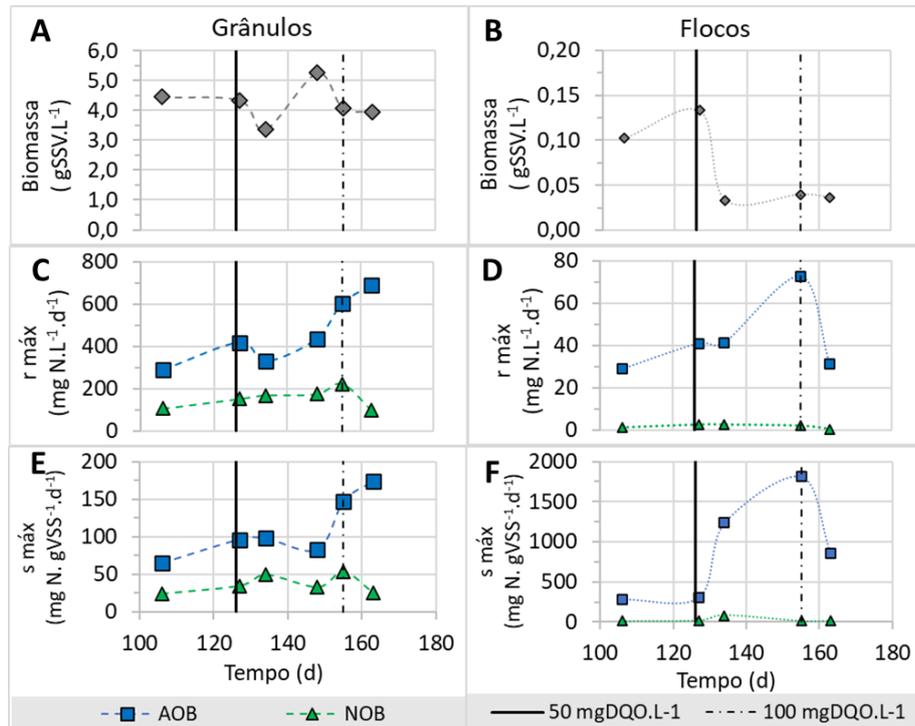
Os testes de anammox dedicados *in situ* destacaram a robustez da biomassa granular de PNA na realização do processo de anammox, independentemente do desempenho do sistema SBR-PNA com ou sem adição de MO. Os dados obtidos dos testes específicos demonstraram a capacidade das bactérias AMX em manter atividade no tratamento de efluentes de esgotos domésticos pré-tratados anaerobiamente nas condições *mainstream* em países de clima quente.

5.6.4 Testes de atividade específica para AOB e NOB (ex situ)

Os resultados obtidos com os testes de atividade específica para avaliar os processos de nitrificação e nitratação realizados por AOB e NOB, respectivamente, foram realizados *ex situ* ao R4, tanto para grânulos como flocos (Figura 35). A atividade das AOB foi correlacionada ao consumo de NH_4^+ (quadrados azuis), enquanto a atividade das NOB foi correlacionada à produção de NO_3^- (triângulos verdes).

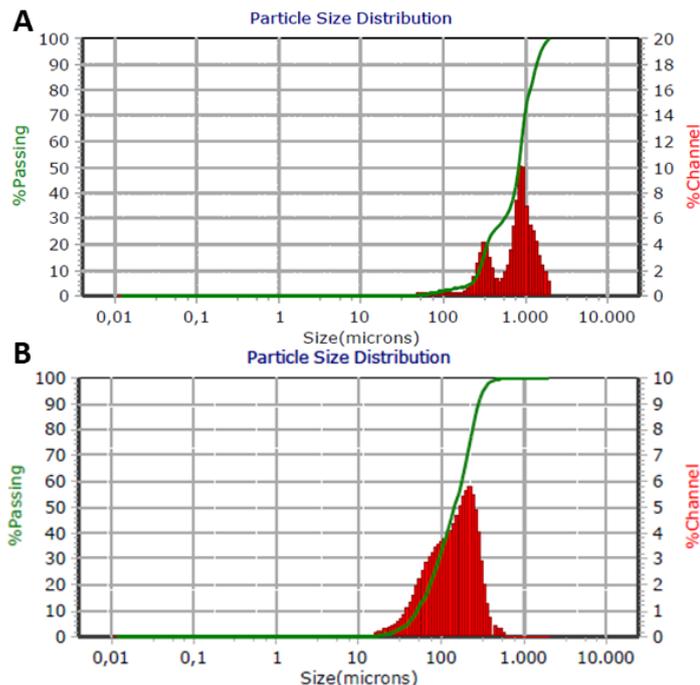
A separação dos flocos da biomassa, realizada conforme metodologia descrita no tópico 4.4.2, pôde ser confirmada através dos resultados obtidos com a distribuição do tamanho das partículas (PSD), exemplificada na Figura 36, que corresponde 106º dia de operação do R4. A distribuição do tamanho das partículas (PSD) demonstrou que os grânulos ($\geq 200 \mu\text{m}$) representavam mais de 95% das partículas com diâmetro médio de 792 μm e os flocos ($< 200 \mu\text{m}$) foram representados por mais de 94% das partículas com diâmetro médio de 154 μm .

Figura 35 – Resultados obtidos com os testes específicos de nitrificação (AOB) e nitratação (NOB) para grânulos e flocos. Concentração de biomassa em (A) grânulos e (B) flocos. Taxa máxima ($r_{\text{máx}}$) de consumo de amônia e produção de nitrato para (C) grânulos e (D) flocos. Taxa específica máxima ($s_{\text{máx}}$) de consumo de amônia e produção de nitrato para (E) grânulos e (F) flocos.



Notas - As linhas pretas verticais correspondem ao início da adição de matéria orgânica no R4 com concentrações aproximadas de 50 mgO₂.L⁻¹ (linha contínua) e 100 mgO₂.L⁻¹ (linha pontilhada). AOB: bactérias oxidadoras de amônia; NOB: bactérias oxidadoras de nitrito.

Figura 36 – Distribuição do tamanho das partículas (PSD) para (A) grânulos e (B) flocos para realização de teste de atividade *ex situ* ao R4.

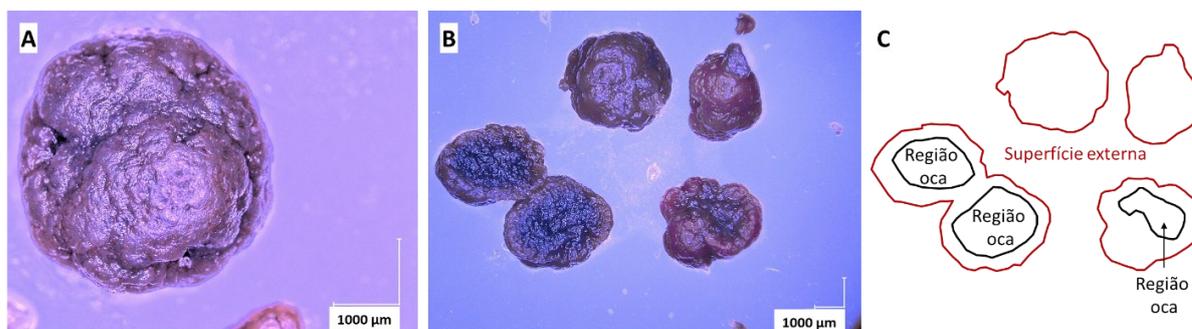


Nota - Resultados obtidos para o dia 106 de operação do R4.

Os testes específicos demonstraram que atividade de AOB superou a atividade de NOB para consumo de amônia e produção de nitrato, respectivamente, e independentemente de ser grânulos ou flocos (Figura 35). A concentração de flocos ($0,07 \pm 0,04 \text{ gSSV.L}^{-1}$) foi muito reduzida em relação à concentração de grânulos ($4,46 \pm 0,74 \text{ gSSV.L}^{-1}$) (Figura 35AB) fazendo com que o cálculo para a atividade específica (que depende da concentração de sólidos) resultasse em valores muito elevados e pouco representativos para as amostras com flocos (Figura 35F). Desta forma, realizou-se a comparação das atividades de AOB e NOB apenas para as taxas máximas de consumo de amônia e de produção de nitrato, respectivamente. A atividade máxima para AOB (consumo de amônia, informações em azul da Figura 35CD) foi muito superior nos testes realizados com flocos ($280 - 1800 \text{ mgN-NH}_4^+.\text{gSSV}^{-1}.\text{d}^{-1}$) em comparação aos testes realizados com grânulos ($83 - 147 \text{ mgN-NH}_4^+.\text{gSSV}^{-1}.\text{d}^{-1}$), evidenciando que as AOB presente nos flocos possuíam alta capacidade para realizar a oxidação de amônia. Em contrapartida, a atividade específica máxima para NOB (produção de nitrato, informações em verde da Figura 35), desconsiderando o *outlier* do dia 134, foi inferior nos testes realizados com flocos ($15,8 \pm 2,9 \text{ mgN-NO}_3^-.gSSV^{-1}.\text{d}^{-1}$) em comparação aos testes realizados com grânulos ($35 - 25 \text{ mgN-NO}_3^-.gSSV^{-1}.\text{d}^{-1}$), demonstrando que as NOB possuíam atividade específica superior nos grânulos. Sendo assim, a estratégia de se realizar o *washout* de flocos no R4 não seria suficiente para minimizar o acúmulo de nitrato no sistema PNA-SBR, pois a atividade AOB nos flocos era superior do que em grânulos, e a atividade NOB nos grânulos era superior do que nos flocos.

A visualização dos grânulos PNAs pôde ser feita a partir das imagens microscópicas referentes ao 171º dia de operação do R4 (Figura 37). Apesar da AIA e adição de MO complexa, o formato esférico e região suavemente oca foi constatada nos grânulos PNA.

Figura 37 – Imagens microscópicas da biomassa granular PNA extraída do R4, demonstrando (A) o formato esférico de um grânulo (B) e região interna suavemente oca de grânulos cortados. (C) Representação da superfície externa e região oca dos grânulos da imagem microscópica B.



6 Conclusões

Tabela 18 - Conclusões com base nas hipóteses e nos objetivos.

Item	Hipótese	Objetivo	Hipótese sustentada ou refutada?	Objetivo atingido?
Objetivo Geral	O processo de nitrificação parcial – anammox (PNA), em fluxo principal (<i>mainstream</i>), é eficiente e estável quando aplicado a efluente de reator anaeróbio tratando esgoto doméstico em regiões de clima quente.	Avaliar se o processo <i>mainstream</i> PNA em reator de estágio único apresenta desempenho eficiente e estável no tratamento de efluente anaeróbio de esgoto doméstico em temperatura mesofílica.	Sustentada	Sim
Objetivo Específico 1	As relações carbono orgânico e nitrogênio (CO/N), passíveis de serem encontradas em efluentes anaeróbios tratando esgoto sanitário doméstico, não prejudicam o processo anammox.	Identificar, por meio de testes em batelada, qual intervalo CO/N passível de ser encontrado em efluentes anaeróbios tratando esgoto sanitário doméstico, permite a ocorrência do processo anammox.	Sustentada	Não
Objetivo Específico 2	A diminuição gradativa da concentração de nitrogênio e da temperatura não comprometem a eficiência de remoção de nitrogênio (ERN), via processo anammox, quando se mantém elevada carga aplicada nitrogenada volumétrica (CNVA).	Obter elevada ERN via processo anammox por meio de reduções gradativas das concentrações de nitrogênio (230 → 50 mgN.L ⁻¹) e da temperatura (37 → 25°C), mantendo-se elevada CNVA (> 1,0 kgN.m ⁻³ .d ⁻¹).	Sustentada	Sim
Objetivo Específico 3	A biomassa anammox, enriquecida e adaptada às condições <i>mainstream</i> tratando esgoto doméstico, pode realizar, de forma eficiente, o processo PNA em reator de estágio único sem inocular lodo nitrificante.	Promover a estabilidade do processo PNA utilizando-se de biomassa anammox adaptada às condições <i>mainstream</i> tratando esgoto sanitário doméstico (25 mgN.L ⁻¹ e 25°C) sem uso de biomassa nitrificante.	Refutada	Não
Objetivo Específico 4	A aeração intermitente automatizada (AIA) e a baixa concentração de oxigênio dissolvido (OD) promovem a estabilidade do processo PNA em reator de estágio único quando o influente contém baixas concentrações de nitrogênio, na ausência de matéria orgânica (MO) e a temperatura mesofílica.	Promover a estabilidade do processo <i>mainstream</i> PNA operado com AIA, baixo teor de OD (0,01 – 0,20 mgO ₂ .L ⁻¹), reduzida concentração de nitrogênio (25 mgN.L ⁻¹), sem MO e na temperatura de 25°C.	Refutada	Não
Objetivo Específico 5	A MO complexa, presente em efluentes de reatores anaeróbios tratando esgoto doméstico em países de clima quente, não prejudica o processo <i>mainstream</i> PNA.	Avaliar se a MO complexa influencia no desempenho do processo <i>mainstream</i> PNA em função da ERN e da eficiência de remoção de MO.	Sustentada	Sim

Em relação ao objetivo específico 1, foi constatado que a biomassa granular anammox, enriquecida com 232 mgN.L⁻¹ e na ausência de MO em R1, realizou o processo anammox em ensaios de batelada com reduzidas concentrações de nitrogênio entre 9 e 51 mgN.L⁻¹ e de MO entre 0 e 206 mgO₂.L⁻¹. O modelo cinético de Monod foi mais compatível aos dados observados do que Andrews e Edwards. Porém, devido à alta variabilidade dos resultados obtidos, não foi possível definir os parâmetros cinéticos. Apesar da hipótese 1 ter sido sustentada, o objetivo específico 1 não pôde ser conclusivo, uma vez que não foi possível identificar qual relação CO/N (0,0 – 11,7) foi menos prejudicial ao processo anammox.

O objetivo específico 2 foi conclusivo, pois a biomassa granular anammox enriquecida em R1 pôde ser adaptada em curto período (65 dias) em R2 por meio de reduções gradativas das concentrações de nitrogênio (232 → 50 mgN.L⁻¹) e da temperatura (37 → 25°C), com manutenção de elevada CNVA acima de 1,0 kgN.m⁻³.d⁻¹, resultando em elevada ERN de 87,3 ± 4,8%. O gênero anammox dominante, *Candidatus Brocadia*, foi identificado como a segunda maior abundância relativa de gênero, variando de 18,9 a 29,4%. Desta forma, a hipótese 2 foi sustentada e o objetivo específico 2 foi atingido.

No que diz respeito ao objetivo específico 3, a biomassa granular anammox enriquecida e adaptada em R2, não foi capaz de realizar o processo PNA em reator de estágio único (R3) com auxílio da AIA sem controle de OD. Quando a suplementação de nitrito foi realizada em conjunto com a AIA, a porcentagem máxima ERN foi de 65%, porém não foi observada contribuição do processo de PN. Portanto, a hipótese 3 foi refutada e o objetivo 3 não pôde ser alcançado.

Em relação ao objetivo específico 4, pôde-se concluir que a aplicação da AIA em conjunto com o controle de OD (0,01 - 0,20 mgO₂.L⁻¹) não foi capaz de atingir a estabilidade do processo *mainstream* PNA em RBS (R4) com baixa concentração de nitrogênio (25,0 mgN-NH₄⁺.L⁻¹), sem MO e a temperatura mesofílica (25°C). A ERN foi gradativamente reduzida de 88,1% para 25,1%, com acúmulo de nitrato efluente atingindo uma concentração de 18,5 mgN-NO₃⁻.L⁻¹ e elevada relação N-NO₃⁻/N-NH₄⁺ de 0,44. Portanto, a afirmação da hipótese 4 foi refutada e o objetivo específico 4 não foi atingido.

Em que se refere ao objetivo específico 5, é possível concluir que a MO complexa (50 e 100 mgO₂.L⁻¹) influencia na remoção de nitrogênio via desnitrificação heterotrófica aprimorando o processo *mainstream* PNA no R4. Quando a relação CO/N foi de 4,0 ± 0,6, o efluente apresentou qualidade satisfatória, com NIT inferior a 2,0 mgN.L⁻¹. O sistema SBR-PNA de estágio único demonstrou elevada ERN de 94,0 ± 2,0% e ERDQO de 81,0 ± 8,0%.

Além disso, a atividade específica máxima do processo anammox ($86,5 \pm 8,1 \text{ mgN.gSSV}^{-1}.\text{d}^{-1}$) não foi afetada ao longo de toda a operação do R4. Sendo assim, a hipótese 5 de foi sustentada e o objetivo 5 foi atingido.

O objetivo geral pôde ser atingido e a hipótese geral foi sustentada. Os resultados obtidos com a realização desta pesquisa enfatizam o potencial de aplicação do processo *mainstream* PNA para remoção de nitrogênio em esgoto doméstico pré-tratado em reatores anaeróbios em países de clima quente.

7 Recomendações

Com base nos resultados obtidos nesta pesquisa, são sugeridas as seguintes recomendações para a realização de futuras pesquisas que tem como foco o processo anammox:

- Avaliar os efeitos causados por diferentes concentrações de MO lentamente biodegradável (DQO_{lb}) no desempenho do processo *mainstream* PNA;
- Investigar os efeitos do controle de sólidos (*washout* de flocos) com intuito de limitar o crescimento de NOB em reator PNA;
- Ao longo da operação do reator PNA, realizar testes *in-situ* para comparar a atividade específica entre as bactérias AOB, NOB, AMX e HB;
- Avaliar os efeitos da MO complexa presente em efluente real de reator anaeróbio em países de clima quente para realização do processo *mainstream* PNA;
- Realizar o processo *mainstream* desnitrificação parcial – anammox (PDA) para esgotos sanitários pré-tratados em reatores anaeróbios.

Referências

- ABMA, W. R. et al. Upgrading of sewage treatment plant by sustainable and cost-effective separate treatment of industrial wastewater. **Water Science and Technology**, v. 61, n. 7, p. 1715–1722, 2010.
- 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.
- ANA. **ATLAS Esgotos: Despoluição de Bacias Hidrográficas**, 2020 [s.l: s.n.].
- AKABOCI, T. R. V. et al. Assessment of operational conditions towards mainstream partial nitrification-anammox stability at moderate to low temperature: Reactor performance and bacterial community. **Chemical Engineering Journal**, v. 350, n. March, p. 192–200, 2018.
- ALI, M.; OKABE, S. Anammox-based technologies for nitrogen removal: Advances in process start-up and remaining issues. **Chemosphere**, v. 141, p. 144–153, 2015.
- APHA; 2017. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater - 23rd Edition, American Public Health, American Water Works Association, Water Environment Federation. Washington, DC, USA.
- ARDERN, E., LOCKETT, W.T., 1914. Experiments on the oxidation of sewage without the aid of filters. **Journal of the society of chemical industry**, 33(10), 523-539.
- ANTHONISEN, A. C. et al. Inhibition of nitrification and nitrous acid compounds. **Journal of the Water Pollution Control Federation**, v. 48, n. 5, p. 835–852, 1976.
- AQUINO, S. F. et al. Quantification of the Inert Chemical Oxygen Demand of Raw Wastewater and Evaluation of Soluble Microbial Product Production in Demo-Scale Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactors under Different Operational Conditions. **Water Environment Research**, v. 81, n. 6, p. 608–616, 2009.
- AUGUSTO, M. R. et al. Bioresource Technology 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. April, p. 151–157, 2018.
- AUSTIN, A. T. et al. Latin America's Nitrogen Challenge. p. 8, 2013.
- AZEVEDO, L. S. et al. Mainstream partial nitrification-anammox as post-treatment of anaerobic effluents under warm climate regions: a critical review of the reported drawbacks. **Environmental Technology Reviews**, v. 10, n. 1, p. 143–160, 2021.
- BERNHARD, A. The nitrogen cycle: processes. **Nature Education Knowledge**, v. 2, n. 2, p. 1–8, 2010.
- 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.
- BO LI et al. Simultaneous anaerobic carbon and nitrogen removal from primary municipal wastewater with hydrogel encapsulated anaerobic digestion sludge and AOA-anammox coated hollow fiber membrane. **Science of The Total Environment**, n. Ii, p. 109181, 2023.
- BORTOLI, M., DE PRÁ, M. C.; KUNZ, A. Tratamento do digestato: remoção de nitrogênio. Embrapa Suínos e Aves, Capítulo VI, 2019.
- BRESSANI-RIBEIRO, T. et al. Inorganic carbon limitation during nitrogen conversions in sponge-bed trickling filters for mainstream treatment of anaerobic effluent. **Water Research**, v. 201, n. May, p. 117337, 2021.
- BUNSE, P. et al. Membrane aerated biofilm reactors for mainstream partial nitrification/anammox: Experiences

- using real municipal wastewater. **Water Research X**, v. 9, p. 100066, 2020.
- CANFIELD, D. E.; GLAZER, A. N.; FALKOWSKI, P. G. The evolution and future of earth's nitrogen cycle. **Science**, v. 330, n. 6001, p. 192–196, 2010.
- CAO, S. et al. Organics transformation and energy production potential in a high rate A-stage system: A demo-scale study. **Bioresource Technology**, v. 295, n. October 2019, p. 122300, 2020.
- CAO, S. et al. In a quest for high-efficiency mainstream partial nitritation-anammox (PN/A) implementation: One-stage or two-stage? **Science of the Total Environment**, v. 883, n. April, p. 163540, 2023.
- CAO, S.; DU, R.; ZHOU, Y. Coupling anammox with heterotrophic denitrification for enhanced nitrogen removal: A review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 51, n. 19, p. 2260–2293, 2021.
- CAO, Y.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; DAIGGER, G. T. Mainstream partial nitritation–anammox in municipal wastewater treatment: status, bottlenecks, and further studies. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 4, p. 1365–1383, 2017.
- CAREY, R. O.; MIGLIACCIO, K. W. Contribution of wastewater treatment plant effluents to nutrient dynamics in aquatic systems. **Environmental Management**, v. 44, n. 2, p. 205–217, 2009.
- CARVAJAL-ARROYO, J. M. et al. Inhibition of anaerobic ammonium oxidizing (anammox) enrichment cultures by substrates, metabolites and common wastewater constituents. **Chemosphere**, v. 91, n. 1, p. 22–27, 2013.
- CARVAJAL-ARROYO, J. M. et al. The role of pH on the resistance of resting- and active anammox bacteria to NO₂- inhibition. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, n. 10, p. 1949–1956, 2014.
- CASTRO-BARROS, C. M. et al. Evaluating the potential for dissimilatory nitrate reduction by anammox bacteria for municipal wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v. 233, p. 363–372, 2017.
- CERVANTES-CARRILLO, F.; PÉREZ, J.; GÓMEZ, J. Avances en la eliminación biológica del nitrógeno de las aguas residuales. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v. 42, n. 2, p. 73–82, 2000.
- CHEN, C. et al. The structure of anammox granular sludge under varying long-term organic matter stress: Performance, physiochemical and microbial community. **Journal of Cleaner Production**, v. 323, n. September, p. 129117, 2021a.
- CHEN, R. et al. Successful operation performance and syntrophic micro-granule in partial nitritation and anammox reactor treating low-strength ammonia wastewater. **Water Research**, v. 155, p. 288–299, 2019.
- 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, W. et al. Deciphering the mechanism of medium size anammox granular sludge driving better nitrogen removal performance. **Bioresource Technology**, v. 336, n. April, p. 125317, 2021b.
- CHEN, X. et al. A review of anammox metabolic response to environmental factors: Characteristics and mechanisms. **Environmental Research**, v. 223, n. November 2022, p. 115464, 2023.
- CHEN, Y. et al. Achieving stable two-stage mainstream partial-nitrification/anammox (PN/A) operation via intermittent aeration. **Chemosphere**, v. 245, p. 125650, 2020.
- CHEN, Y. et al. Coupling anammox with denitrification in a full-scale combined biological nitrogen removal process for swine wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v. 329, n. December 2020, p. 124906, 2021c.
- CHENG, Y. F. et al. Anammox Granules Acclimatized to Mainstream Conditions Can Achieve a Volumetric Nitrogen Removal Rate Comparable to Sidestream Systems. **Environmental Science and Technology**, v. 54,

- n. 20, p. 12959–12966, 2020.
- CHERNICHARO, C. A. L. **Anaerobic Reactors**. [s.l.: s.n.]. v. 6
- CHERNICHARO, C. A. L. et al. Anaerobic sewage treatment: state of the art, constraints and challenges. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 649–679, 2015.
- CHINI, A. et al. Recirculation and Aeration Effects on Deammonification Activity. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 227, n. 2, p. 1–10, 2016.
- CHO, S.; KAMBEY, C.; NGUYEN, V. K. Performance of anammox processes for wastewater treatment: A critical review on effects of operational conditions and environmental stresses. **Water (Switzerland)**, v. 12, n. 1, 2019.
- CHRISTENSSON, M. et al. Experience from start-ups of the first ANITA Mox Plants. p. 2677–2684, 2013.
- CORBALÁ-ROBLES, L. et al. Analysing the effects of the aeration pattern and residual ammonium concentration in a partial nitrification-anammox process. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 37, n. 6, p. 694–702, 2016.
- CRONE, B. C. et al. Significance of dissolved methane in effluents of anaerobically treated low strength wastewater and potential for recovery as an energy product: A review. **Water Research**, v. 104, p. 520–531, 2016.
- CUI, H. et al. Advanced nitrogen removal from low C/N municipal wastewater by combining partial nitrification-anammox and endogenous partial denitrification-anammox (PN/A-EPD/A) process in a single-stage reactor. **Bioresource Technology**, v. 339, n. July, p. 125501, 2021.
- DANTAS, M. S. et al. Municipal wastewater discharge standards for ammonia nitrogen in Brazil: Technical elements to guide decisions. **Water Science and Technology**, v. 85, n. 12, p. 3479–3492, 2022.
- 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.
- DAPENA-MORA, A.; CAMPOS, J. L.; MOSQUERA-CORRAL, A. Stability of the ANAMMOX process in a gas-lift reactor and a SBR. v. 110, p. 159–170, 2004.
- DE PRÁ, M. C. et al. Kinetic models for nitrogen inhibition in ANAMMOX and nitrification process on deammonification system at room temperature. **Bioresource Technology**, v. 202, p. 33–41, 2016.
- DENG, Z. et al. Recovery and applications of ammoniacal nitrogen from nitrogen-loaded residual streams: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 295, p. 113096, 2021.
- DESLOOVER, J. et al. Floc-based sequential partial nitrification and anammox at full scale with contrasting N₂O emissions. v. 5, 2011.
- DIAMANTIS, V. et al. Sewage pre-concentration for maximum recovery and reuse at decentralized level. **Water Science and Technology**, v. 67, n. 6, p. 1188–1193, 2013.
- DRIESSEN, W. et al. The ANAMMOX® process - Design considerations and operational experience. **17th European Biosolids and Organic Resources Conference**, n. January 2012, 2012.
- DRIESSEN, W.; HENDRICKX, T. Two decades of experience with the granular sludge-based anammox® process treating municipal and industrial effluents. **Processes**, v. 9, n. 7, p. 1–15, 2021.
- DU, R. et al. Bioresource Technology Performance of partial denitrification (PD) -ANAMMOX process in simultaneously treating nitrate and low C / N domestic wastewater at low temperature. **Bioresource Technology**, v. 219, n. 3, p. 420–429, 2016.

- DU, R. et al. Partial denitrification providing nitrite: Opportunities of extending application for anammox. **Environment International**, v. 131, n. July, 2019.
- DU, R. et al. Beyond an Applicable Rate in Low-Strength Wastewater Treatment by Anammox: Motivated Labor at an Extremely Short Hydraulic Retention Time. **Environmental Science and Technology**, v. 56, n. 12, p. 8650–8662, 2022.
- DUAN, H. et al. Overcoming Nitrite Oxidizing Bacteria Adaptation through Alternating Sludge Treatment with Free Nitrous Acid and Free Ammonia. **Environmental Science and Technology**, v. 53, p. 1937–1946, 2019.
- DUAN, H. et al. Improving wastewater management using free nitrous acid (FNA). **Water Research**, v. 171, 2020.
- ELLIS, G. Four Types of Controllers. **Control System Design Guide**, p. 97–119, 2012.
- ERISMAN, J. W. et al. How a century of ammonia synthesis changed the world. **Nature Geoscience**, v. 1, n. 10, p. 636–639, 2008.
- FAHRBACH, M. et al. *Denitratisoma oestradiolicum* gen. nov., sp. nov., a 17 β -oestradiol-degrading, denitrifying betaproteobacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 7, p. 1547–1552, 2006.
- FENG, Y. et al. Enhanced nitrogen removal from low COD/TIN mainstream wastewater in a continuous plug-flow reactor via partial nitrification, simultaneous anammox and endogenous denitrification (PN-SAED) process. **Bioresource Technology**, v. 345, n. December 2021, p. 126539, 2022.
- FERNANDES, L. DE A. 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. December 2017, p. 208–219, 2018.
- GAO, D. W.; TAO, Y. Versatility and application of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 4, p. 887–894, 2011.
- GAO, H.; SCHERSON, Y. D.; WELLS, G. F. Towards energy neutral wastewater treatment: Methodology and state of the art. **Environmental Sciences: Processes and Impacts**, v. 16, n. 6, p. 1223–1246, 2014.
- GAO, J. F. et al. Quantitative analyses of the composition and abundance of ammonia-oxidizing archaea and ammonia-oxidizing bacteria in eight full-scale biological wastewater treatment plants. **Bioresource Technology**, v. 138, p. 285–296, 2013.
- GAO, R. et al. Nutrients removal from low C/N actual municipal wastewater by partial nitrification/anammox (PN/A) coupling with a step-feed anaerobic-anoxic-oxic (A/A/O) system. **Science of the Total Environment**, v. 799, p. 149293, 2021.
- GHANGREKAR, M. M.; CHATTERJEE, P. New Age of Wastewater Treatment Employing Bio-electrochemical Systems. **Energy, Environment, and Sustainability**, p. 155–170, 2018.
- GILBERT, E. M. et al. Response of different *Nitrospira* Species to anoxic periods depends on operational DO. **Environmental Science and Technology**, v. 48, n. 5, p. 2934–2941, 2014.
- GRANATTO, C. F. et al. Scale-up evaluation of anaerobic degradation of linear alkylbenzene sulfonate from sanitary sewage in expanded granular sludge bed reactor. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 138, n. August 2018, p. 23–32, 2019.
- GRANGER, J.; SIGMAN, D. M. Removal of nitrite with sulfamic acid for nitrate N and O isotope analysis with the denitrifier method. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 24, p. 3753–3762, 2009.

- GREEN M. R., SAMBROOK, J. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 4th ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012. doi:10.3724/SP.J.1141.2012.01075.
- GUO, Y. et al. Towards more efficient nitrogen removal and phosphorus recovery from digestion effluent: Latest developments in the anammox-based process from the application perspective. **Bioresource Technology**, v. 299, n. December 2019, p. 122560, 2020.
- GUO, Y. et al. The phosphorus harvest from low-temperature mainstream wastewater through iron phosphate crystallization in a pilot-scale partial nitrification/anammox reactor. **Science of the Total Environment**, v. 862, n. August 2022, p. 160750, 2023.
- 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.
- HARB, R. et al. Denitrifying anaerobic methane oxidation (DAMO) cultures: Factors affecting their enrichment, performance and integration with anammox bacteria. **Journal of Environmental Management**, v. 295, n. February, 2021.
- 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.
- HELMER-MADHOK, C. et al. Deammonification in biofilm systems: Population structure and function. **Water Science and Technology**, v. 46, n. 1–2, p. 223–231, 2002.
- HOEKSTRA, M. **Mainstream anammox, potential & feasibility of autotrophic nitrogen removal**. [s.l.: s.n.].
- HOW, S. W. et al. Enhanced nitrogen removal in an anoxic-oxic-anoxic process treating low COD/N tropical wastewater: Low-dissolved oxygen nitrification and utilization of slowly-biodegradable COD for denitrification. **Science of the Total Environment**, v. 693, p. 133526, 2019.
- HOW, S. W. et al. Characterization of slowly-biodegradable organic compounds and hydrolysis kinetics in tropical wastewater for biological nitrogen removal. **Water Science and Technology**, v. 81, n. 1, p. 71–80, 2020.
- HU, Z.; LOTTI, T.; LOOSDRECHT, M. VAN. Nitrogen removal with the anaerobic ammonium oxidation process. p. 1145–1154, 2013.
- HUANG, T. et al. Fast start-up and enhancement of partial nitrification and anammox process for treating synthetic wastewater in a sequencing batch biofilm reactor: Strategy and function of nitric oxide. **Bioresource Technology**, v. 335, n. March, p. 125225, 2021.
- HUANG, X. et al. C-N-S synergy in a pilot-scale mainstream anammox fluidized-bed membrane bioreactor for treating chemically enhanced primary treatment saline sewage. **Water Research**, v. 229, n. November 2022, p. 119475, 2023.
- IPCC, *Climate Change 2014 Synthesis Report, Topic 3: Future Pathways for Adaptation, Mitigation and Sustainable Development*, 2014. www.ipcc.ch/site/assets/uploads/2018/05/SYR_AR5_FINAL_full_wcover.pdf
- ISHIMOTO, C. et al. Full-scale simultaneous partial nitrification, anammox, and denitrification process for treating swine wastewater Chikako Ishimoto, Tsukasa Sugiyama, Toshimi Matsumoto, p. 456–465, 2020.
- IZADI, P.; ANDALIB, M. Anaerobic zone Functionality, Design and Configurations for a Sustainable EBPR process: A Critical Review. **Science of the Total Environment**, v. 870, n. January, p. 162018, 2023.
- JENNI, S. et al. Successful application of nitrification/anammox to wastewater with elevated organic carbon to ammonia ratios. **Water Research**, v. 49, p. 316–326, 2014.

- JETTEN, M. S. M. et al. Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation ('anammox') process. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, n. 3, p. 283–288, 2001.
- JETTEN, M. S. M.; HORN, S. J.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Towards a more sustainable municipal wastewater treatment system. **Water Science and Technology**, v. 35, n. 9, p. 171–180, 1997.
- JIN, R. C. et al. The inhibition of the Anammox process: A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 197, p. 67–79, 2012.
- JOSS, A. et al. Full-Scale Nitrogen Removal from Digester Liquid with Partial Nitritation and Anammox in One SBR. p. 5301–5306, 2009.
- JUAN-DÍAZ, X.; PÉREZ, J.; CARRERA, J. Effective dampening of temperature effects in an anammox reactor treating real mainstream wastewater. **Journal of Water Process Engineering**, v. 40, n. December 2020, 2021.
- KALYUZHNYI, S.; GLADCHENKO, M. DEAMOX – New microbiological process of nitrogen removal from strong nitrogenous wastewater. **DES**, v. 248, n. 1–3, p. 783–793, 2009.
- KARTAL, B. et al. Candidatus “Anammoxoglobus propionicus” a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 39–49, 2007.
- KARTAL, B. et al. Candidatus “Brocadia fulgida”: An autofluorescent anaerobic ammonium oxidizing bacterium. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 63, n. 1, p. 46–55, 2008.
- KARTAL, B.; KELTJENS, J. T. Anammox Biochemistry: a Tale of Heme c Proteins. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 12, p. 998–1011, 2016.
- KARTAL, B.; KUENEN, J. G.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Sewage treatment with anammox. **Science**, v. 328, n. 5979, p. 702–703, 2010.
- KHRAMENKOV, S. V. et al. A novel bacterium carrying out anaerobic ammonium oxidation in a reactor for biological treatment of the filtrate of wastewater fermented sludge. **Microbiology (Russian Federation)**, v. 82, n. 5, p. 628–636, 2013.
- KOUBA, V. et al. Physiology of anammox adaptation to low temperatures and promising biomarkers: A review. **Bioresource Technology**, v. 349, n. February, 2022.
- KUENEN, J. G. Anammox bacteria: From discovery to application. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 320–326, 2008.
- KUMWIMBA, M. N. et al. Anammox-based processes: How far have we come and what work remains? A review by bibliometric analysis. **Chemosphere**, v. 238, 2020.
- KUYPERS, M. M. M.; MARCHANT, H. K.; KARTAL, B. The microbial nitrogen-cycling network. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 5, p. 263–276, 2018.
- LACKNER, S. et al. Full-scale partial nitritation/anammox experiences - An application survey. **Water Research**, v. 55, n. 0, p. 292–303, 2014.
- 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.
- LAURENI, M. et al. Biomass segregation between biofilm and flocs improves the control of nitrite-oxidizing bacteria in mainstream partial nitritation and anammox processes. **Water Research**, v. 154, p. 104–116, 2019.
- 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.
- LI, H. et al. Fast start-up of ANAMMOX reactor: Operational strategy and some characteristics as indicators of reactor performance. **Desalination**, v. 286, p. 436–441, 2012.
- LI, X. et al. Mainstream upflow nitrification-anammox system with hybrid anaerobic pretreatment: Long-term performance and microbial community dynamics. **Water Research**, v. 125, p. 298–308, 2017.
- LI, X. et al. Status, Challenges, and Perspectives of Mainstream Nitrification–Anammox for Wastewater Treatment. **Water Environment Research**, v. 90, n. 7, p. 634–649, 2018.
- LI, Y. et al. ANAMMOX performance, granulation, and microbial response under COD disturbance. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 90, n. 1, p. 139–148, 2015.
- LITTI, Y. et al. Metagenomic Evidence of a Novel Anammox Community in Cold Aquifer with Extreme Nitrogen Pollution. **SRRN**, 2023.
- LIU, C. et al. Elemental sulfur formation and nitrogen removal from wastewaters by autotrophic denitrifiers and anammox bacteria. **Bioresource Technology**, v. 191, p. 332–336, 2015.
- LIU, H. et al. Bioaugmentation reconstructed nitrogen metabolism in full-scale simultaneous partial nitrification-denitrification, anammox and sulfur-dependent nitrite/nitrate reduction (SPAS). **Bioresource Technology**, v. 367, n. October 2022, 2023.
- LIU, T.; HU, S.; GUO, J. Enhancing mainstream nitrogen removal by employing nitrate/nitrite-dependent anaerobic methane oxidation processes. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 39, n. 5, p. 732–745, 2019.
- LIU, W. et al. Microbial community response to influent shift and lowering temperature in a two-stage mainstream deammonification process. **Bioresource Technology**, v. 262, n. April, p. 132–140, 2018.
- LIU, X. et al. Partial nitrification-reactor configurations, and operational conditions: Performance analysis. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, n. 4, p. 103984, 2020.
- LIU, Z. H. et al. Dissolved methane: A hurdle for anaerobic treatment of municipal wastewater. **Environmental Science and Technology**, v. 48, n. 2, p. 889–890, 2014.
- LOTTI, T. et al. Simultaneous partial nitrification and anammox at low temperature with granular sludge. **Water Research**, v. 66, p. 111–121, 2014a.
- LOTTI, T. et al. Physiological and kinetic characterization of a suspended cell anammox culture. **Water Research**, v. 60, p. 1–14, 2014b.
- LOTTI, T. et al. Anammox growth on pretreated municipal wastewater. **Environmental Science and Technology**, v. 48, n. 14, p. 7874–7880, 2014c.
- LOTTI, T. et al. Physiological and kinetic characterization of a suspended cell anammox culture. **Water Research**, v. 60, p. 1–14, 2014d.
- LOTTI, T. et al. Faster through training: The anammox case. **Water Research**, v. 81, p. 261–268, 2015.
- LOTTI, T.; KLEEREBEZEM, R.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Effect of temperature change on anammox activity. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 112, n. 1, p. 98–103, 2014.
- MA, B. et al. Suppressing nitrite-oxidizing bacteria growth to achieve nitrogen removal from domestic wastewater via anammox using intermittent aeration with low dissolved oxygen. **Scientific Reports**, v. 5, n. April, p. 1–9, 2015.
- MA, B. et al. *Bioresource Technology Biological nitrogen removal from sewage via anammox : Recent advances.*

- Bioresource Technology**, v. 200, p. 981–990, 2016.
- MA, B. et al. Inactivation and adaptation of ammonia-oxidizing bacteria and nitrite-oxidizing bacteria when exposed to free nitrous acid. **Bioresource Technology**, v. 245, n. August, p. 1266–1270, 2017.
- MA, J. et al. Microbial community dynamics and performance of simultaneous anammox and denitrification (SAD) process at varying substrate loadings during long-term operation. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, p. 110225, 2023.
- MADEIRA, C. L.; DE ARAÚJO, J. C. Inhibition of anammox activity by municipal and industrial wastewater pollutants: A review. **Science of the Total Environment**, v. 799, 2021.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. *Microbiologia de Brock*. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 960p, 2015.
- MALOVANYYY, A. et al. Combination of upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor and partial nitrification/anammox moving bed biofilm reactor (MBBR) for municipal wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v. 180, p. 144–153, 2015.
- MALOVANYYY, A.; TRELA, J.; PLAZA, E. Mainstream wastewater treatment in integrated fixed film activated sludge (IFAS) reactor by partial nitrification/anammox process. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 478–487, 2015.
- MATEJŮ, V. et al. Biological water denitrification-A review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, n. 3, p. 170–183, 1992.
- MCCARTY, P. L.; BAE, J.; KIM, J. Domestic wastewater treatment as a net energy producer-can this be achieved? **Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 17, p. 7100–7106, 2011.
- 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. July 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.
- NI, S. Q. et al. Distribution of extracellular polymeric substances in anammox granules and their important roles during anammox granulation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 101, p. 126–133, 2015.
- NOYOLA, A. et al. Typology of Municipal Wastewater Treatment Technologies in Latin America. **Clean - Soil, Air, Water**, v. 40, n. 9, p. 926–932, 2012.
- O'NEIL M. J. *The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*. Whitehouse Station: Merck; 2006.
- PALATSI, J. et al. Enhancement of biological nutrient removal process with advanced process control tools in full-scale wastewater treatment plant. **Water Research**, v. 200, p. 117212, 2021.
- PATHAK, S.; WANG, S.; JANKA, E. Achieving Partial Nitrification in Anammox Start-Up Environment. **Water (Switzerland)**, v. 14, n. 2, 2022.
- PEETERS, S. H.; VAN NIFTRIK, L. Trending topics and open questions in anaerobic ammonium oxidation. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 49, p. 45–52, 2019.
- PENG, L. et al. N₂O production by ammonia oxidizing bacteria in an enriched nitrifying sludge linearly depends on inorganic carbon concentration. **Water Research**, v. 74, n. i, p. 58–66, 2015.

- PENG, Y. ZHEN; MA, Y.; WANG, S. YING. Denitrification potential enhancement by addition of external carbon sources in a pre-denitrification process. **Journal of Environmental Sciences**, v. 19, n. 3, p. 284–289, 2007.
- PEREIRA, T. D. S. **Dinâmica e mecanismos da produção de óxido nitroso durante a remoção de nitrogênio em reatores biológicos contendo biomassa anammox enriquecida**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2018.
- PIJUAN, M. et al. Effect of COD on mainstream anammox: Evaluation of process performance, granule morphology and nitrous oxide production. **Science of the Total Environment**, v. 712, p. 136372, 2020.
- POOT, V. et al. Effects of the residual ammonium concentration on NOB repression during partial nitrification with granular sludge. **Water Research**, v. 106, p. 518–530, 2016.
- PUYOL, D. et al. High pH (and not free ammonia) is responsible for Anammox inhibition in mildly alkaline solutions with excess of ammonium. **Biotechnology Letters**, v. 36, n. 10, p. 1981–1986, 2014.
- QIAN, F. et al. Effect of hydraulic selection pressure on the characteristics of partial nitrification/anammox granular sludge in a continuous-flow reactor. **Environmental Technology and Innovation**, v. 24, n. 1, p. 102042, 2021.
- QIAN, W. et al. Long-term effect of pH on denitrification: High pH benefits achieving partial-denitrification. **Bioresource Technology**, v. 278, n. November 2018, p. 444–449, 2019.
- QIN, Y. et al. Effect of glucose on nitrogen removal and microbial community in anammox-denitrification system. **Bioresource Technology**, v. 244, n. May, p. 33–39, 2017.
- QIU, S. et al. What's the best way to achieve successful mainstream partial nitrification-anammox application? **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 51, n. 10, p. 1045–1077, 2020a.
- QIU, S. et al. Technology What ' s the best way to achieve successful mainstream partial nitrification-anammox application ? **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 0, n. 0, p. 1–33, 2020b.
- REINO, C. et al. Stable long-term operation of an upflow anammox sludge bed reactor at mainstream conditions. **Water Research**, v. 128, p. 331–340, 2018.
- REINO, C.; CARRERA, J. Low-strength wastewater treatment in an anammox UASB reactor: Effect of the liquid upflow velocity. **Chemical Engineering Journal**, v. 313, p. 217–225, 2017.
- REN, Z. et al. Bioresource Technology A review of anammox-based nitrogen removal technology : From microbial diversity to engineering applications. **Bioresource Technology**, v. 363, n. September, p. 127896, 2022.
- RIPLEY, L. E.; BOYLE, W. C.; CONVERSE, J. C. Improved Alkalimetric Monitoring for Anaerobic Digestion of High-Strength Wastes. **Water Pollution Control Federation**, v. 58, n. 5, p. 406–411, 2016.
- RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A. F. Experimental design and process optimization. 2014.
- ROOTS, P. et al. Comammox Nitrospira are the dominant ammonia oxidizers in a mainstream low dissolved oxygen nitrification reactor. **Water Research**, v. 157, n. 2, p. 396–405, 2019.
- RUSCALLEDA, M. et al. Heterotrophic denitrification on granular anammox SBR treating urban landfill leachate. **Water Science and Technology**, v. 58, n. 9, p. 1749–1755, 2008.
- SACHETTO, P. A. et al. Characterization of Anaerobic Effluent: Seasonal Influence and Use of Anammox Process as Post-treatment. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 233, n. 5, p. 1–8, 2022.
- SALMISTRARO, M. et al. Mainstream Deammonification: Preliminary Experience Employing Granular AOB-Enriched Biomass at Low DO Values. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 228, n. 5, 2017.
- SÁNCHEZ GUILLÉN, J. A. et al. Effects of organic carbon source, chemical oxygen demand/N ratio and

- temperature on autotrophic nitrogen removal. **Water Science and Technology**, v. 69, n. 10, p. 2079–2084, 2014.
- SÁNCHEZ GUILLÉN, J. A. Autotrophic nitrogen removal from low concentrated effluents: Study of system configurations and operational features for post-treatment of anaerobic effluents. **Autotrophic Nitrogen Removal from Low Concentrated Effluents: Study of System Configurations and Operational Features for Post-Treatment of Anaerobic Effluents**, p. 1–174, 2017.
- SETHI, S. et al. Celebrating 50 years of microbial granulation technologies: From canonical wastewater management to bio-product recovery. **Science of the Total Environment**, v. 872, n. January, p. 162213, 2023.
- SHENG, L. et al. Application of the anammox-based process for nitrogen removal from anaerobic digestion effluent: A review of treatment performance, biochemical reactions, and impact factors. **Journal of Water Process Engineering**, v. 38, n. 13, p. 101595, 2020.
- SHENG, S. et al. Effects of different carbon sources and C/N ratios on the simultaneous anammox and denitrification process. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 127, n. 163, p. 26–34, 2018.
- SILVA, B. G.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; FORESTI, E. Effects of intermittent aeration periods on a structured-bed reactor continuously fed on the post-treatment of sewage anaerobic effluent. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 41, n. 8, p. 1115–1120, 2018.
- SILVA FILHO, H. A.; BARROS, A. R. M.; SANTOS, E. V. M. D.; SOUSA, J. T. D., VAN HAANDEL, A. C. Seleção de substratos padrões para ensaios respirométricos aeróbios com biomassa de sistemas de lodo ativado. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 20, p. 141-150, 2015.
- 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. June, p. 1–10, 2021.
- SIMON, J.; KLOTZ, M. G. Diversity and evolution of bioenergetic systems involved in microbial nitrogen compound transformations. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1827, n. 2, p. 114–135, 2013.
- 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. Competition and coexistence of aerobic ammonium- and nitrite-oxidizing bacteria at low oxygen concentrations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 6, p. 808–817, 2005.
- SOBOTKA, D.; CZERWIONKA, K.; MAKINIA, J. Influence of temperature on the activity of anammox granular biomass. **Water Science and Technology**, v. 73, n. 10, p. 2518–2525, 2016.
- SOLER-JOFRA, A. et al. Hydroxylamine metabolism of *Ca. Kuenenia stuttgartiensis*. **Water Research**, v. 184, 2020.
- SOUZA, C. L.; CHERNICHARO, C. A. L.; AQUINO, S. F. Quantification of dissolved methane in UASB reactors treating domestic wastewater under different operating conditions. **Water Science and Technology**, v. 64, n. 11, p. 2259–2264, 2011.
- STAMATOPOULOU, P. **Partial Nitrification Anammox Process for Sidestream Wastewater Treatment in MABR Technology**. [s.l.] The University of Western Ontario, 2019.
- STEIN, L. Y.; KLOTZ, M. G. The nitrogen cycle. **Current Biology**, v. 26, n. 3, p. R94–R98, 2016.
- STEVENS, C. J. Nitrogen in the environment. **Science**, v. 363, n. 6427, p. 578–580, 2019.
- 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.
- SUAREZ, C. et al. Metagenomic evidence of a novel family of anammox bacteria in a subsea environment. **Environmental Microbiology**, v. 24, n. 5, p. 2348–2360, 2022.
- TANG, C. et al. Performance of high-loaded ANAMMOX UASB reactors containing granular sludge. **Water Research**, v. 45, n. 1, p. 135–144, 2011.
- THAUER, R. K.; JUNGERMANN, K.; DECKER, K. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. **Bacteriological Reviews**, v. 41, n. 1, p. 100–180, 1977.
- 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.
- TORRES, P.; FORESTI, E. Domestic sewage treatment in a pilot system composed of UASB and SBR reactors. **Water Science and Technology**, v. 44, n. 4, p. 247–253, 2001.
- TRINH, H. P. et al. Recent developments of the mainstream anammox processes: Challenges and opportunities. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 4, p. 105583, 2021.
- VAN DE GRAAF, A. A. et al. Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor. **Microbiology**, v. 142, n. 8, 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 KESSEL, M. A. H. J. et al. Complete nitrification by a single microorganism. **Nature**, v. 528, n. 7583, p. 555–559, 2015.
- VAN LIER, J. B. et al. Anaerobic sewage treatment using UASB reactors: Engineering and operational aspects. **Environmental Anaerobic Technology: Applications and New Developments**, p. 59–89, 2010.
- VEGA DE LILLE, M. et al. Ammonium estimation in an ANAMMOX SBR treating anaerobically digested domestic wastewater. **Chemical Engineering Science**, v. 130, p. 109–119, 2015.
- VELA, J. D. et al. Prospects for biological nitrogen removal from anaerobic effluents during mainstream wastewater treatment. **Environmental Science and Technology Letters**, v. 2, n. 9, p. 234–244, 2015.
- VENTURINI, B. **Tratamento do digestato oriundo da Digestão anaeróbia de efluente da suniicultura em uma unidade piloto do reator NITRAMMOX**. [s.l.] Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Cascavel (UNIOESTE), 2022.
- VLAEMINCK, S. E. et al. Reactivation of aerobic and anaerobic ammonium oxidizers in OLAND biomass after long-term storage. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 6, p. 1376–1384, 2007.
- VLAEMINCK, S. E. et al. Nitrogen Removal from Digested Black Water by One-Stage Partial Nitritation and Anammox. v. 43, n. 13, p. 5035–5041, 2009.
- VLAEMINCK, S. E.; DE CLIPPELEIR, H.; VERSTRAETE, W. Microbial resource management of one-stage partial nitritation/anammox. **Microbial Biotechnology**, v. 5, n. 3, p. 433–448, 2012.
- VON SPERLING, M. **Wastewater Characteristics, Treatment and Disposal**. [s.l.] IWA, 2007.
- VON SPERLING, M.; CHERNICHARO, C. A. DE L. **Biological Wastewater Treatment in Warm Climate Regions**. [s.l.] IWA, 2005.

- WAN, J. et al. COD capture: A feasible option towards energy self-sufficient domestic wastewater treatment. **Scientific Reports**, v. 6, n. April, p. 1–9, 2016.
- WANG, Z. BIN et al. Microbial diversity reveals the partial denitrification-anammox process serves as a new pathway in the first mainstream anammox plant. **Science of the Total Environment**, v. 764, p. 142917, 2021.
- WANG, H. et al. Is Anoxic Operation Effective to Control Nitrate Build-Up and Sludge Loss for the Combined. **Processes**, v. 8, p. 1053, 2020.
- WANG, Z. et al. A 20-Year Journey of Partial Nitritation and Anammox (PN/A): From Sidestream toward Mainstream. **Environmental Science and Technology**, v. 56, n. 12, p. 7522–7531, 2022.
- WEBB, J. W., REIS, R. A. Programmable logic controllers: principles and applications, 2002. Prentice Hall PTR.
- 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.
- WETT, B. Development and implementation of a robust deammonification process. p. 81–88, 2007.
- WETT, B. et al. Going for mainstream deammonification from bench to full scale for maximized resource efficiency. **Water Science and Technology**, v. 68, n. 2, p. 283–289, 2013.
- WETT, B. et al. Expanding DEMON Sidestream Deammonification Technology Towards Mainstream Application. **Water Environment Research**, v. 87, n. 12, p. 2084–2089, 2015.
- WINKLER, M. K. H. et al. Nitrate reduction by organotrophic Anammox bacteria in a nitritation/anammox granular sludge and a moving bed biofilm reactor. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 217–223, 2012.
- XIE, F. et al. Enhancing nitrogen removal performance of anammox process after short-term pH and temperature shocks by coupling with iron-carbon micro-electrolysis. **Journal of Cleaner Production**, v. 289, p. 125753, 2021.
- XIE, G. J. et al. Achieving high-level nitrogen removal in mainstream by coupling anammox with denitrifying anaerobic methane oxidation in a membrane biofilm reactor. **Water Research**, v. 131, p. 196–204, 2018.
- XU, G. et al. The challenges of mainstream deammonification process for municipal used water treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 6, p. 2485–2490, 2015.
- XU, J. et al. Particle size-dependent behavior of redox-active biochar to promote anaerobic ammonium oxidation (anammox). **Chemical Engineering Journal**, v. 410, n. November 2020, 2021.
- XU, X. et al. Effective nitrogen removal in a granule-based partial-denitrification/anammox reactor treating low C/N sewage. **Bioresource Technology**, v. 297, n. November 2019, p. 122467, 2020.
- 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.
- YAN, Y. et al. Transcriptomics Uncovers the Response of Anammox Bacteria to Dissolved Oxygen Inhibition and the Subsequent Recovery Mechanism. **Environmental Science and Technology**, v. 54, n. 22, p. 14674–14685, 2020.
- YANG, Y. et al. Microbial community evolution in partial nitritation/anammox process: From sidestream to mainstream. **Bioresource Technology**, v. 251, p. 327–333, 1 mar. 2018.
- YANG, Y. et al. Insights into the mechanism of the deterioration of mainstream partial nitritation/anammox under low residual ammonium. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 126, p. 29–39, 2023.
- YESHI, C. et al. Mainstream partial nitritation and anammox in a 200,000 m³/day activated sludge process in

- Singapore: Scale-down by using laboratory fed-batch reactor. **Water Science and Technology**, v. 74, n. 1, p. 48–56, 2016.
- YUAN, Q. et al. Spontaneous mainstream anammox in a full-scale wastewater treatment plant with hybrid sludge retention time in a temperate zone of China. **Water Environment Research**, v. 93, n. 6, p. 854–864, 2021.
- YUAN, Q. et al. Morphological, kinetic, and microbial community characterization of anammox bacteria with different inoculations and biofilm types for low-ammonium wastewater treatment. **Journal of Water Process Engineering**, v. 47, n. April, p. 102748, 2022.
- ZHANG, G. et al. Start-up of PN-anammox system under low inoculation quantity and its restoration after low-loading rate shock. **Frontiers of Environmental Science and Engineering**, v. 15, n. 2, 2021a.
- ZHANG, J. et al. Feasibility of in situ enriching anammox bacteria in a sequencing batch biofilm reactor (SBBR) for enhancing nitrogen removal of real domestic wastewater. **Chemical Engineering Journal**, v. 352, n. April, p. 847–854, 2018.
- ZHANG, J. et al. An effective strategy for in situ start-up of mainstream anammox process treating domestic sewage. **Bioresource Technology**, v. 339, n. July, p. 125525, 2021b.
- ZHANG, J. et al. Wastewater COD characterization: RBCOD and SBCOD characterization analysis methods. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 2021c.
- ZHANG, K. et al. Effects of vibration on anammox-enriched biofilm in a high-loaded upflow reactor. **Science of the Total Environment**, v. 685, p. 1284–1293, 2019.
- ZHANG, L. et al. Integrated fixed-biofilm activated sludge reactor as a powerful tool to enrich anammox biofilm and granular sludge. **Chemosphere**, v. 140, p. 114–118, 2015.
- ZHANG, L. et al. Maximum specific growth rate of anammox bacteria revisited. **Water Research**, v. 116, p. 296–303, 2017.
- ZHANG, X. et al. Can anammox process be adopted for treating wastewater with high salinity exposure risk? **Chemosphere**, v. 293, n. December 2021, p. 133660, 2022.
- ZHENG, M. et al. One-year stable pilot-scale operation demonstrates high flexibility of mainstream anammox application. **Water Research X**, v. 19, n. January, p. 100166, 2023.
- ZHU, G. et al. Occurrence, activity and contribution of anammox in some freshwater extreme environments. **Environmental Microbiology Reports**, v. 7, n. 6, p. 961–969, 2015.
- ZHUANG, J. L. et al. The anammox coupled partial-denitrification process in an integrated granular sludge and fixed-biofilm reactor developed for mainstream wastewater treatment: Performance and community structure. **Water Research**, v. 210, n. November 2021, p. 117964, 2022.
- ZOPPAS, F. M.; BERNARDES, A. M.; MENEGUZZI, Á. Parâmetros operacionais na remoção biológica de nitrogênio de águas por nitrificação e desnitrificação simultânea. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 21, n. 1, p. 29–42, 2016.
- ZUO, F. et al. Bioresource Technology In situ startup of a full-scale combined partial nitrification and anammox process treating swine digestate by regulation of nitrite and dissolved oxygen. **Bioresource Technology**, v. 315, n. July, p. 123837, 2020.
- ZUO, F. et al. Resilience of anammox application from sidestream to mainstream: A combined system coupling denitrification, partial nitrification and partial denitrification with anammox. **Bioresource Technology**, v. 374, n. January, p. 128783, 2023.

Apêndice A

Tabela A1 – Equações utilizadas nos cálculos do monitoramento dos reatores utilizados nas Fases I, II, III e IV.

Equação	Variável	Descrição	Unidade
$Q = \frac{V}{t}$	Q	Vazão	$m^3 \cdot d^{-1}$
	V	Volume de efluente tratado	m^3
	t	Tempo de tratamento	d
$TDH = \frac{Vu}{Q}$	TDH	Tempo de detenção hidráulico	h
	Vu	Volume útil	L
	Q	Vazão	$L \cdot h^{-1}$
$NIT_{a,e} = NH_4^+_{4i} + NO_2^-_{2i} + NO_3^-_{3i}$	$NIT_{a,e}$	Nitrogênio inorgânico total, afluente (a) ou efluente (e)	mgN
	$NH_4^+_{4a,e}$	Concentração de N-amônio, afluente (a) ou efluente (e)	$mgN-NH_4^+ \cdot L^{-1}$
	$NO_2^-_{2a,e}$	Concentração de N-nitrito, afluente (a) ou efluente (e)	$mgN-NO_2^- \cdot L^{-1}$
	$NO_3^-_{3a,e}$	Concentração de N-nitrato, afluente (a) ou efluente (e)	$mgN-NO_3^- \cdot L^{-1}$
$CNVA = \frac{NITa \cdot Q}{Vu}$	CNVA	Carga nitrogenada volumétrica aplicada	$kgN \cdot m^{-3} \cdot d^{-1}$
	NITa	Nitrogênio inorgânico total afluente	kgN
	Q	Vazão	$m^3 \cdot d^{-1}$
	Vu	Volume útil	m^3
$CNVR = \frac{NITE \cdot Q}{Vu}$	CNVR	Carga nitrogenada volumétrica removida	$kgN \cdot m^{-3} \cdot d^{-1}$
	NITE	Nitrogênio inorgânico total efluente	kgN
	F	Vazão	$m^3 \cdot d^{-1}$
	Wv	Volume útil	m^3
$ERN = \frac{(NITa - NITE) \cdot 100\%}{NITa}$	ERN	Eficiência de remoção de nitrogênio	%
	NITa	Nitrogênio inorgânico total afluente (a)	kgN
	NITE	Nitrogênio inorgânico total efluente (e)	kgN
	ARE	Eficiência de remoção de amônio	%
$ERA = \frac{(NH_4^+_{4a} - NH_4^+_{4e}) \cdot 100\%}{NH_4^+_{4a}}$	$NH_4^+_{4a,e}$	Concentração de N-amônio afluente (a) ou efluente (e)	$mgN-NH_4^+ \cdot L^{-1}$
	ERNi	Eficiência de remoção de nitrito	%
$ERDQO = \frac{(DQOa - DQOe) \cdot 100\%}{DQOa}$	$NO_2^-_{2a,e}$	Concentração de N-nitrito, afluente (a) ou efluente (e)	$mgN-NO_2^- \cdot L^{-1}$
	DQOa	Demanda química de oxigênio afluente	$mgO_2 \cdot L^{-1}$
$Va = \frac{Q}{A}$	DQOe	Demanda química de oxigênio efluente	$mgO_2 \cdot L^{-1}$
	Va	Velocidade ascensional	$m \cdot h^{-1}$
	Q	Vazão	$m^3 \cdot h^{-1}$
$A = \frac{\pi \cdot \emptyset^2}{4}$	A	Área da seção transversal do reator	m^2
	\emptyset	Diâmetro interno do reator	m

(continua)

(continuação)

Equação	Variável	Descrição	Unidade
$\text{Alc}_{a,e} = \frac{V_{\text{HCL } a,e} \cdot C_{\text{HCL } a,e} \cdot 50}{V_{\text{amostra } a,e}}$	$\text{Alc}_{a,e}$	Alcalinidade total a bicarbonato, afluente (a) ou efluente (e)	$\text{mgCaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$
	$V_{\text{HCL } a,e}$	Volume de ácido clorídrico (HCL), afluente (a) ou efluente (e)	mL
	$C_{\text{HCL } a,e}$	Concentração de ácido clorídrico (HCL), afluente (a) ou efluente (e)	mol
	$V_{\text{amostra } a,e}$	Volume de amostra, afluente (a) ou efluente (e)	mL
$\frac{\text{NO}_2^-}{\text{NH}_4^+} = \frac{\text{NO}_2^- a - \text{NO}_2^- e}{\text{NH}_4^+ a - \text{NH}_4^+ e}$	$\frac{\text{NO}_2^-}{\text{NH}_4^+}$	Relação nitrito/amônio	-
	$\text{NO}_2^-_{i,e}$	Concentração de N-nitrito, afluente (a) ou efluente (e)	$\text{mgN-NO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$
	$\text{NH}_4^+_{i,e}$	Concentração de N-amônio, afluente (a) ou efluente (e)	$\text{mgN-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$
$\frac{\text{NO}_3^-}{\text{NH}_4^+} = \frac{\text{NO}_3^- e - \text{NO}_3^- a}{\text{NH}_4^+ a - \text{NH}_4^+ e}$	$\frac{\text{NO}_3^-}{\text{NH}_4^+}$	Relação nitrato/amônio	-
	$\text{NO}_3^-_{i,e}$	Concentração de N-nitrato, afluente (a) ou efluente (e)	$\text{mgN-NO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$
	$\text{NH}_4^+_{i,e}$	Concentração de N-amônio, afluente (a) ou efluente (e)	$\text{mgN-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$
$\frac{17}{14} \cdot \frac{\text{AL} = \text{NH}_4^+ e \cdot 10^{\text{pH}}}{e^{\left[\frac{6334}{(273+T)}\right] + 10^{\text{pH}}}}$	AL	Amônia livre	$\text{mgN-NH}_3 \cdot \text{L}^{-1}$
	$\text{NH}_4^+ e$	Concentração de N-amônio efluente	$\text{mgN-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$
	pH	Potencial hidrogeniônico efluente	-
	T	Temperatura	$^{\circ}\text{C}$
$\frac{\text{ANL} = \text{NO}_2^- e}{e^{\left[\frac{-2300}{(273+T)}\right] \cdot 10^{\text{pH}}}}$	ANL	Ácido nitroso livre	$\text{mgHNO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$
	$\text{NO}_2^- e$	Concentração de N-nitrito efluente	$\text{mgN-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$
	pH	Potencial hidrogeniônico efluente	-
	T	Temperatura	$^{\circ}\text{C}$
$r_{\text{AMX}} = \frac{\text{CNVR}}{X}$	r_{AMX}	Taxa específica de remoção de nitrogênio via processo anammox	$\text{mgN} \cdot \text{gSSV}^{-1}$
	CNVR	Carga nitrogenada volumétrica removida	$\text{mgN} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$
	X	Concentração de biomassa	$\text{gSSV}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$
$r_{\text{max}} = \frac{\alpha}{X}$	r_{max}	Taxa máxima específica de remoção de amônia, remoção de nitrito ou produção de nitrato	$\text{mgN}-(\text{NH}_4^+, \text{NO}_2^-, \text{NO}_3^-) \cdot \text{d}^{-1}$
	α	Coefficiente angular da curva de regressão linear para consumo de amônia, remoção de nitrito ou produção de nitrato	$\text{mgN}-(\text{NH}_4^+, \text{NO}_2^-, \text{NO}_3^-) \cdot \text{d}^{-1}$
	X	Concentração de biomassa	$\text{gSSV}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$

Tabela A2 – Modelos cinéticos utilizados para avaliação dos ensaios em batelada na Fase Ib.

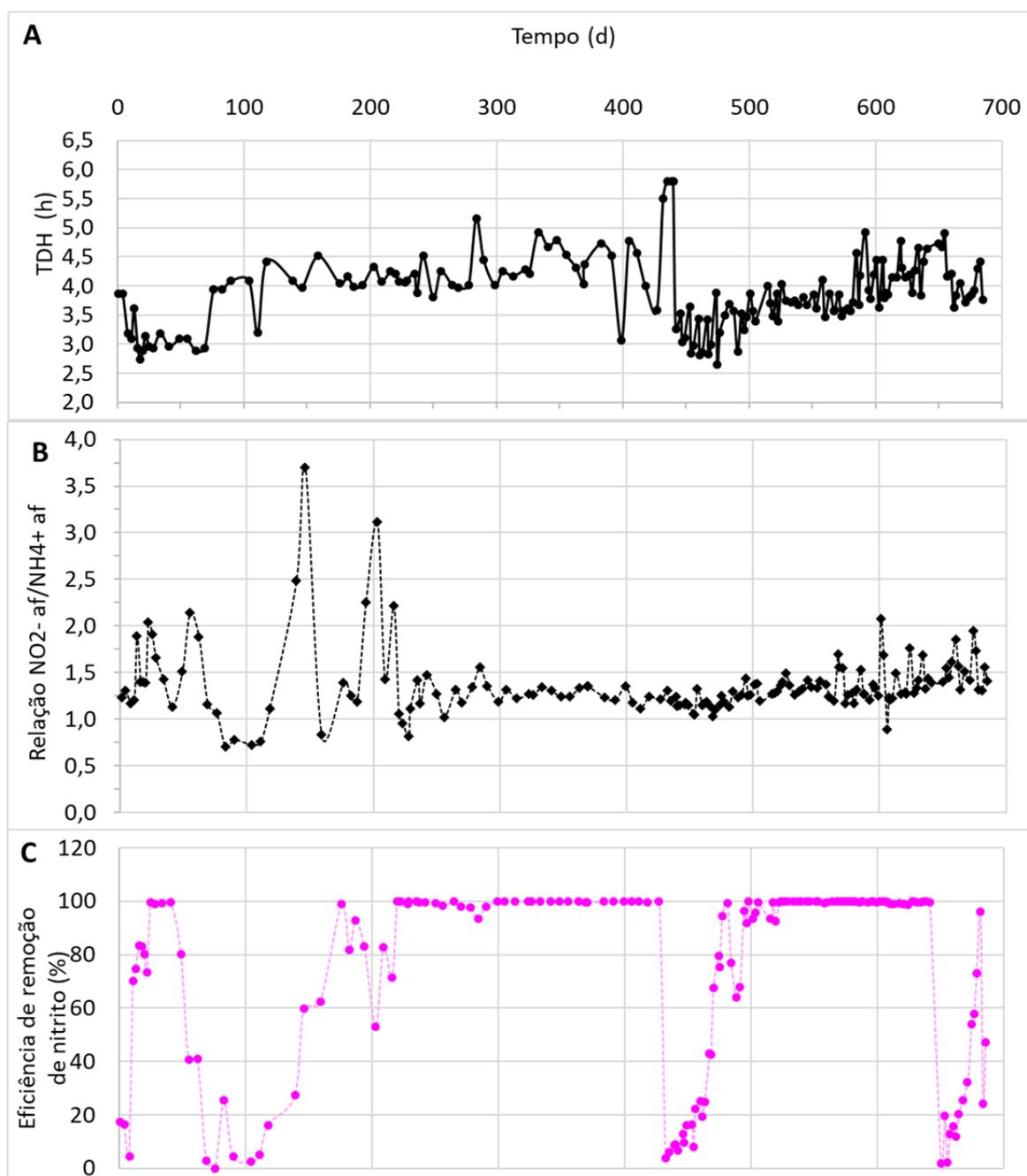
Modelo cinético	Equação
Monod	$q = q_{\text{max}} \cdot \frac{Cs}{K_s + Cs}$
Andrews	$q = q_{\text{max}} \cdot \frac{Cs}{K_s + Cs + \frac{Cs^2}{K_i}}$
Edwards	$q = q_{\text{max}} \cdot \left[e^{\left(\frac{-Cs}{K_i}\right)} - e^{\left(\frac{-Cs}{K_s}\right)} \right]$

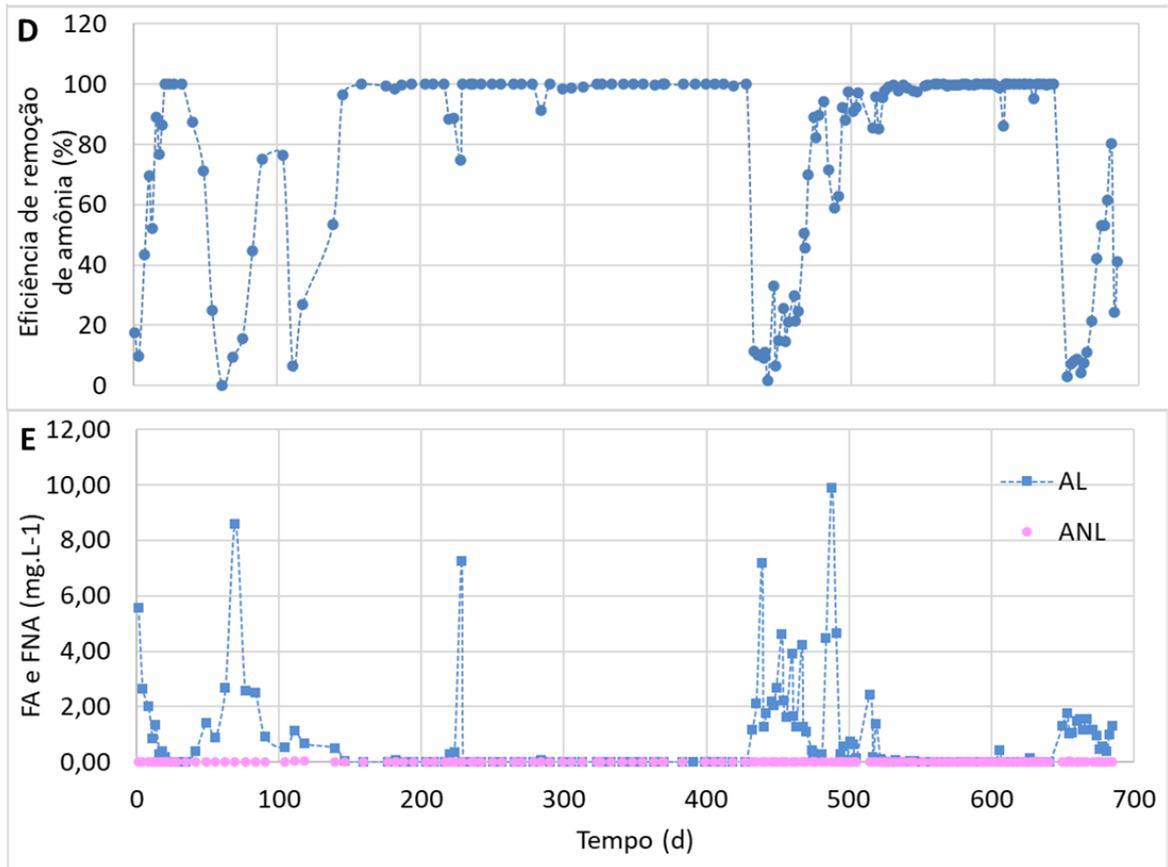
Notas - q: taxa de conversão de substrato ($\text{mgN} \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$); q_{max} : máxima taxa de conversão de substrato específico ($\text{mgN} \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$); Cs: concentração de substrato ($\text{mgN} \cdot \text{L}^{-1}$); Ks: constante de meia saturação ($\text{mgN} \cdot \text{L}^{-1}$); Ki: constante de inibição ($\text{mgN} \cdot \text{L}^{-1}$).

Figura A1 – Fotos da bombona utilizada como tanque de alimentação do reator R1 na Fase 1A.



Figura A2 – Parâmetros adicionais do monitoramento do reator R1 para enriquecimento de biomassa granular anammox. Os dados apresentados correspondem ao (A) tempo de detenção hidráulico (TDH), (B) relação afluente de nitrito e amônio ($\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$ afluente), eficiências de remoção de (C) nitrito (NO_2^-) e (D) amônio (NH_4^+), e (E) concentrações de amônia livre (AL) e ácido nitroso livre (ANL).





Nota - As paralisações de 155 e 55 dias ocorreram próximo aos dias de operação 425 e 650, respectivamente.

Figura A3 – Alcalinidade total ao longo da operação do reator R1. (A) Alcalinidade afluyente e alcalinidade efluente; (B) Variação da alcalinidade; (C) alcalinidade média afluyente e efluente nos períodos estáveis (2 e 4) e nos períodos instáveis (1, 3 e 5).

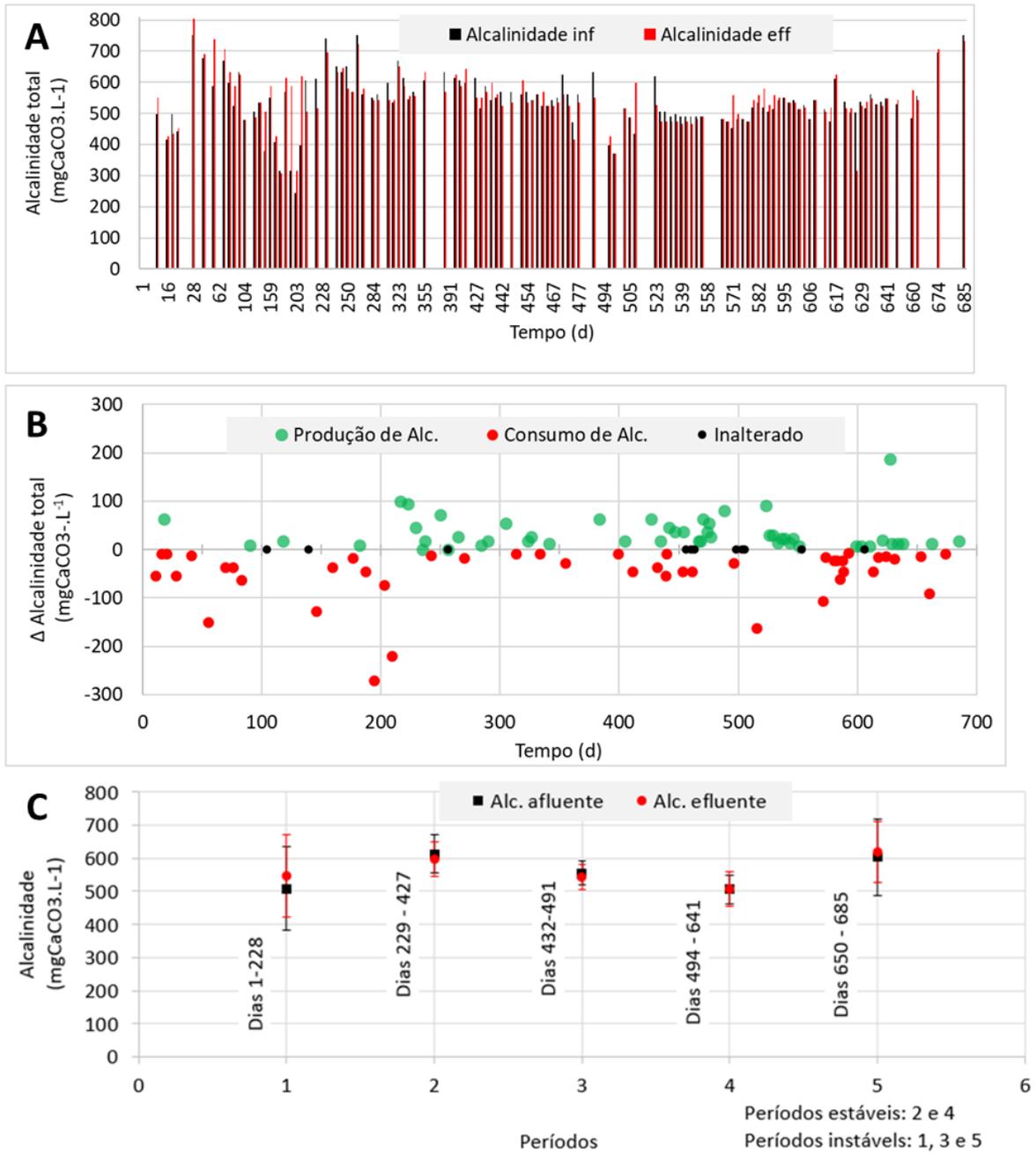
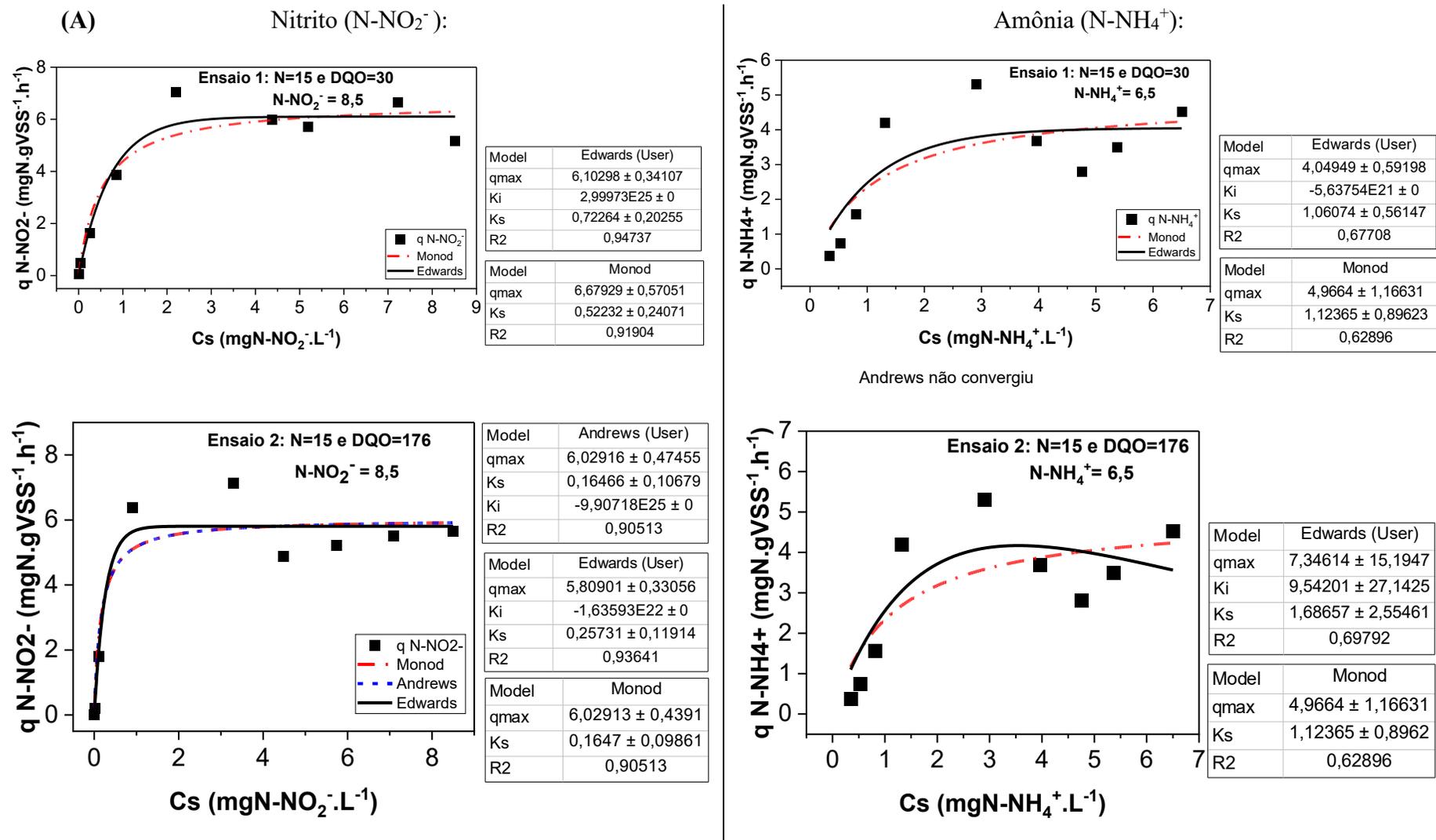
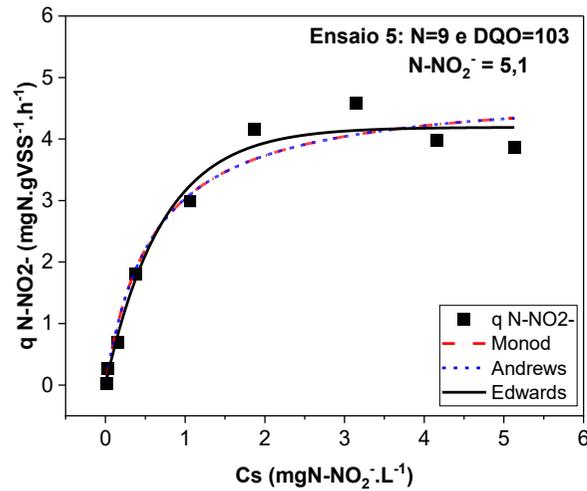


Figura A4 – Avaliação cinética para os modelos de Andrews, Edwards e Monod a partir dos resultados obtidos com os ensaios em batelada realizados (A) antes e (B) após a primeira paralisação.

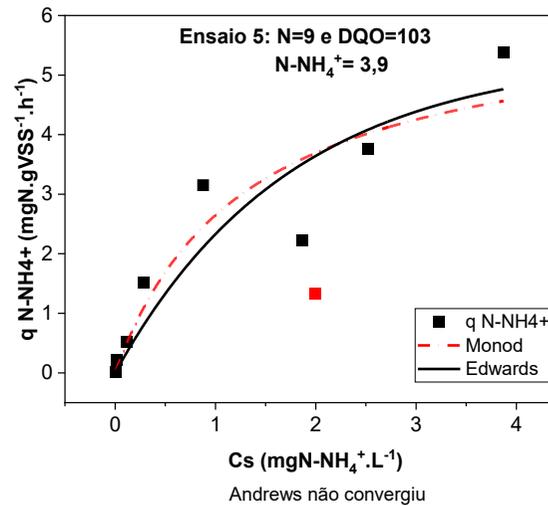




Model	Andrews
qmax	4,84753 ± 0,3773
Ks	0,59892 ± 0,18893
Ki	1,107E19 ± 0
R2	0,96494

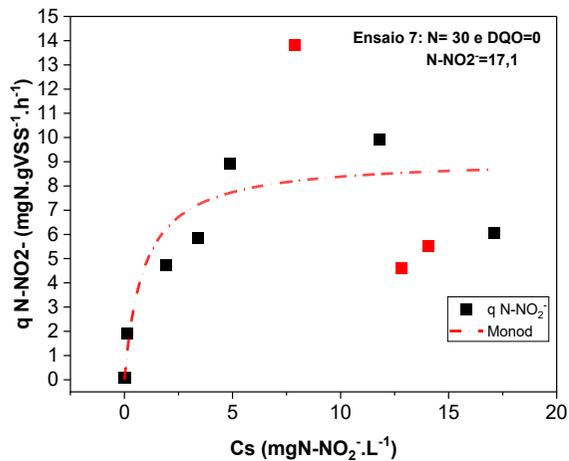
Model	Edwards
qmax	4,19157 ± 0,17092
Ki	6,01428E19 ± 0
Ks	0,71444 ± 0,11837
R2	0,9799

Model	Monod
qmax	4,84787 ± 0,348
Ks	0,59912 ± 0,174
R2	0,96494



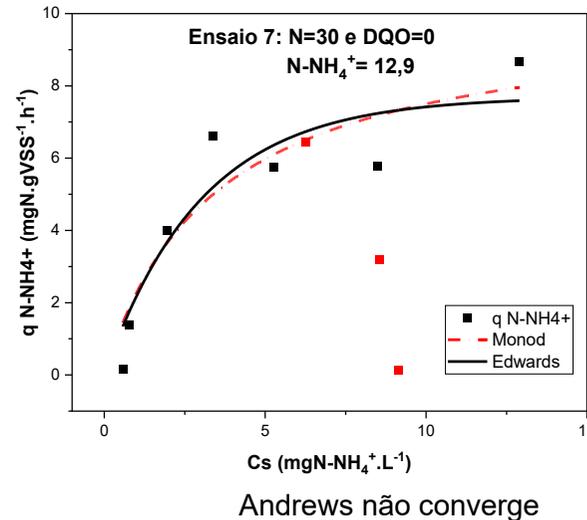
Model	Edwards
qmax	5,34876 ± 1,77053
Ki	6,01428E19 ± 0
Ks	1,75023 ± 1,25525
R2	0,85108

Model	Monod
qmax	6,10167 ± 1,77893
Ks	1,30485 ± 0,98416
R2	0,87074



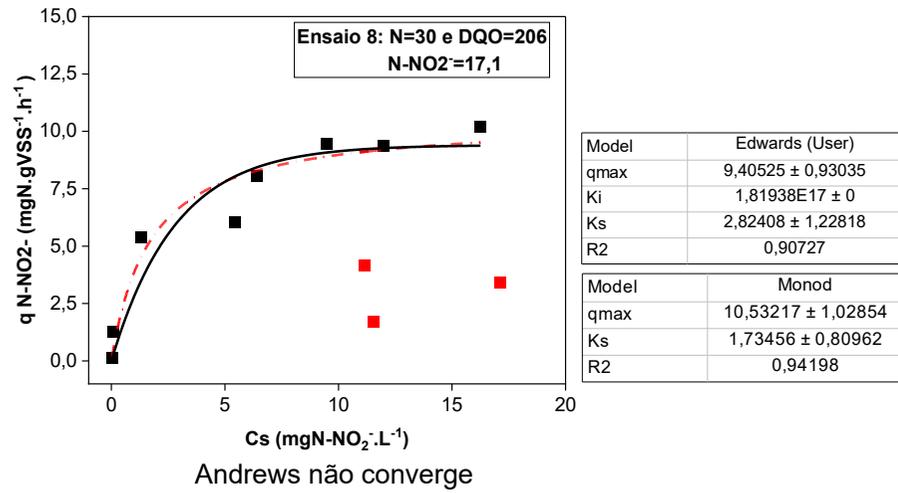
Model	Monod
qmax	9,13886 ± 1,9742
Ks	0,89995 ± 1,28899
R2	0,67163

Edwards não converge
Monod R2 abaixo de 0,9
Andrews melhor se adequa, mas parâmetros cinéticos são absurdos

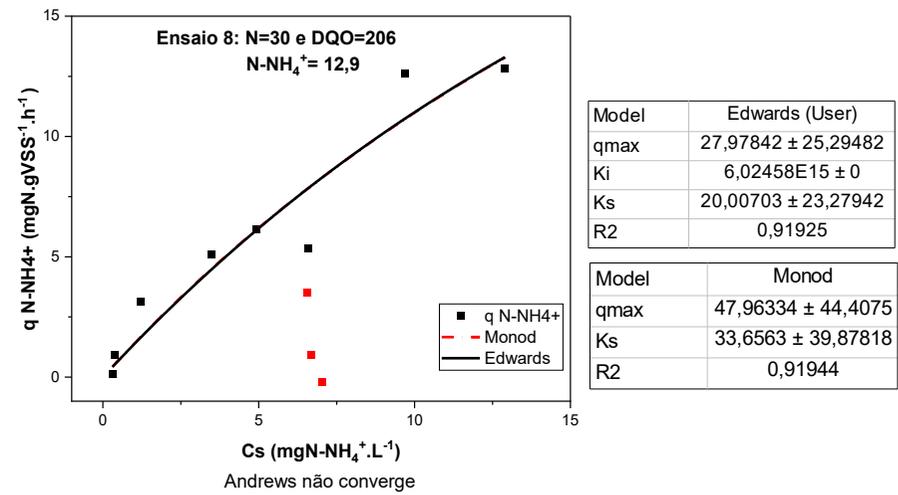


Model	Edwards (User)
qmax	7,69442 ± 1,20952
Ki	2,10953E21 ± 0
Ks	3,00756 ± 1,30203
R2	0,86397

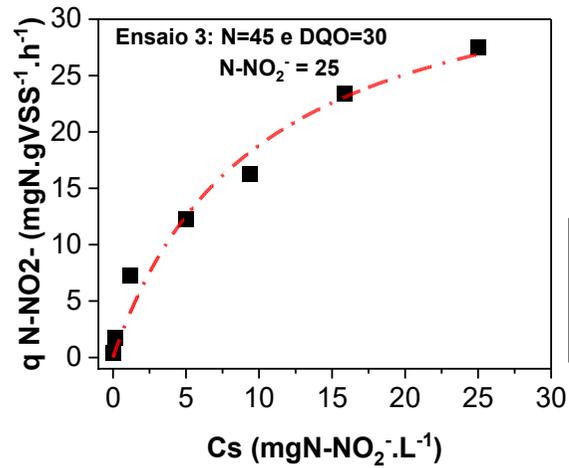
Model	Monod
qmax	10,07894 ± 2,171
Ks	3,43707 ± 1,9409
R2	0,86617



(B) Nitrito (N-NO₂⁻):

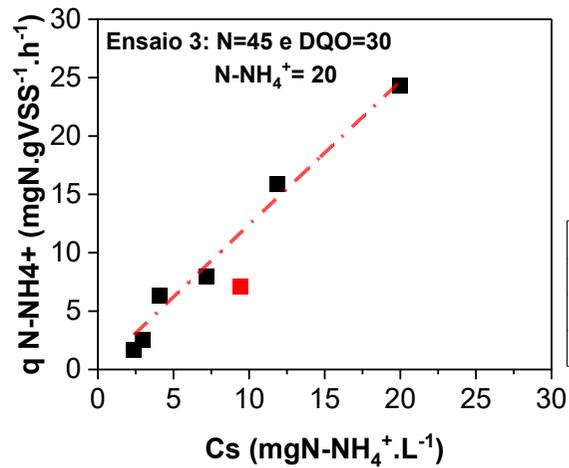


Amônia (N-NH₄⁺):



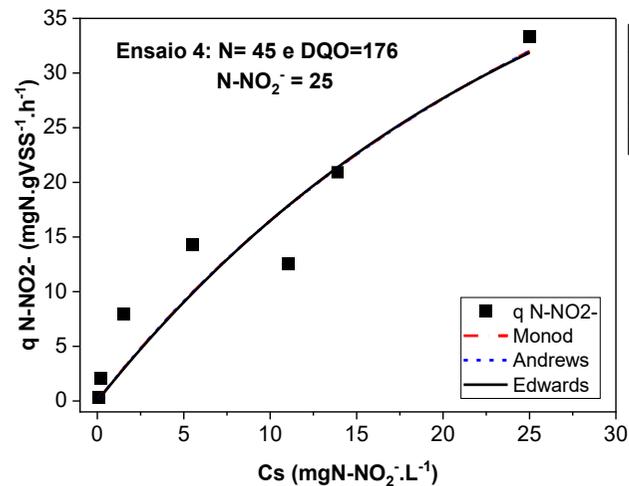
Model	Monod
qmax	37,65252 ± 5,46
Ks	10,00611 ± 3,45
R2	0,97315

Andrews não converge
Edwards não converge



Model	Monod
qmax	2271,78936 ± 3
Km	1821,09646 ± 2
R2	0,98229

Andrews e Edwards não convergiu

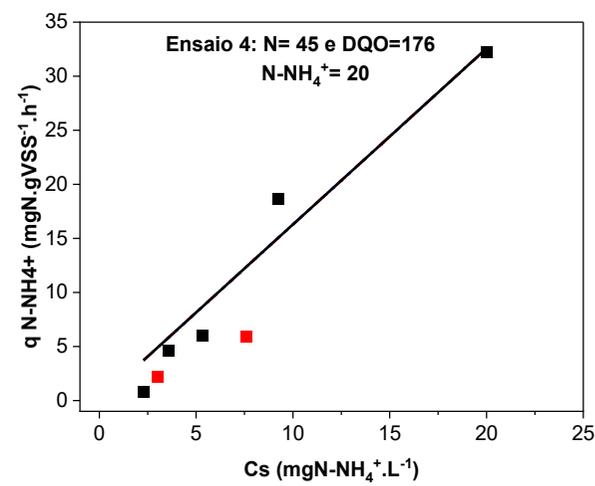


Model	Andrews
qmax	85,84734 ± 2,53136E-1
Ks	42,07273 ± 1,75197E-1
Ki	2,17444E19 ± 0
R2	1

Model	Edwards
qmax	51,45513 ± 0,0406
Ki	6,54366E18 ± 0
Ks	25,89081 ± 0,0292
R2	0,99996

Model	Monod
qmax	85,84734 ± 65,04879
Ks	42,07273 ± 45,25654
R2	0,90163

Todos os modelos se adequaram, mas todos estão sobrepostos!
Desta forma, acredita-se que não houve inibição nem por substrato (N-NO₂-), nem por DQO.



Não convergiu

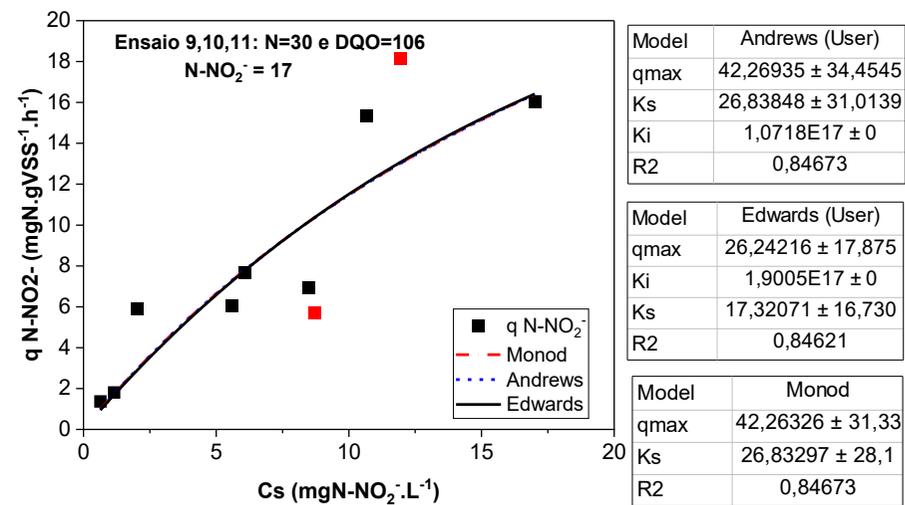
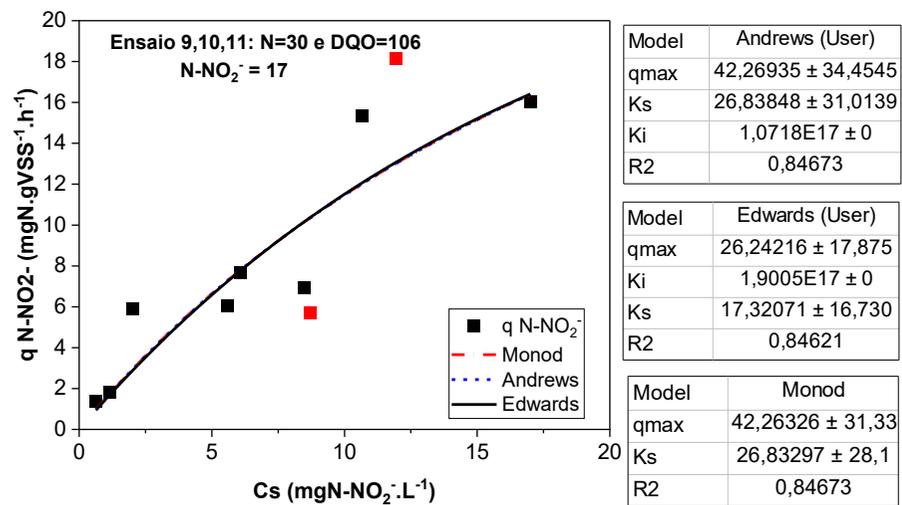
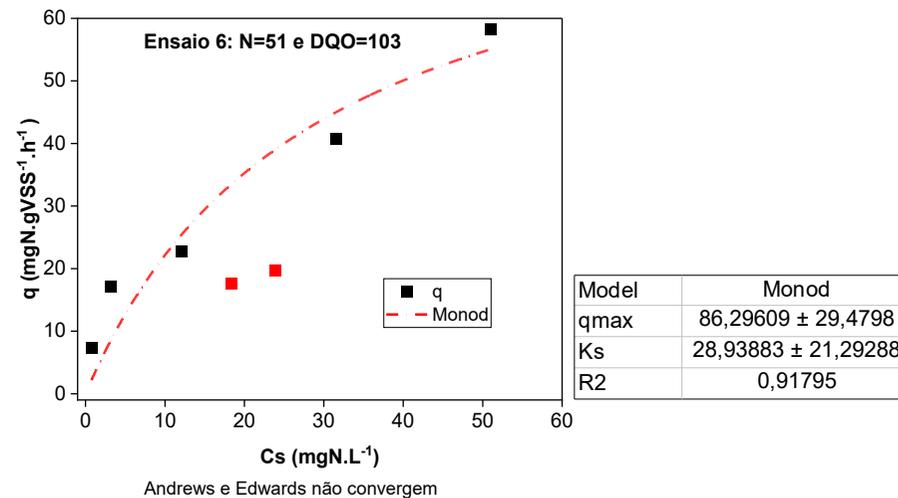
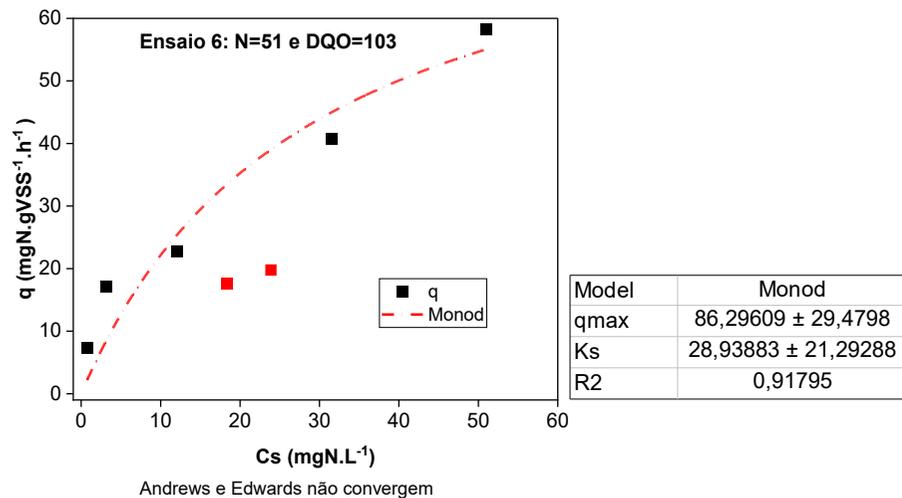


Figura A5 – Abundância relativa de filos para os reatores R1 (Fase IA) e R2 (Fase II).

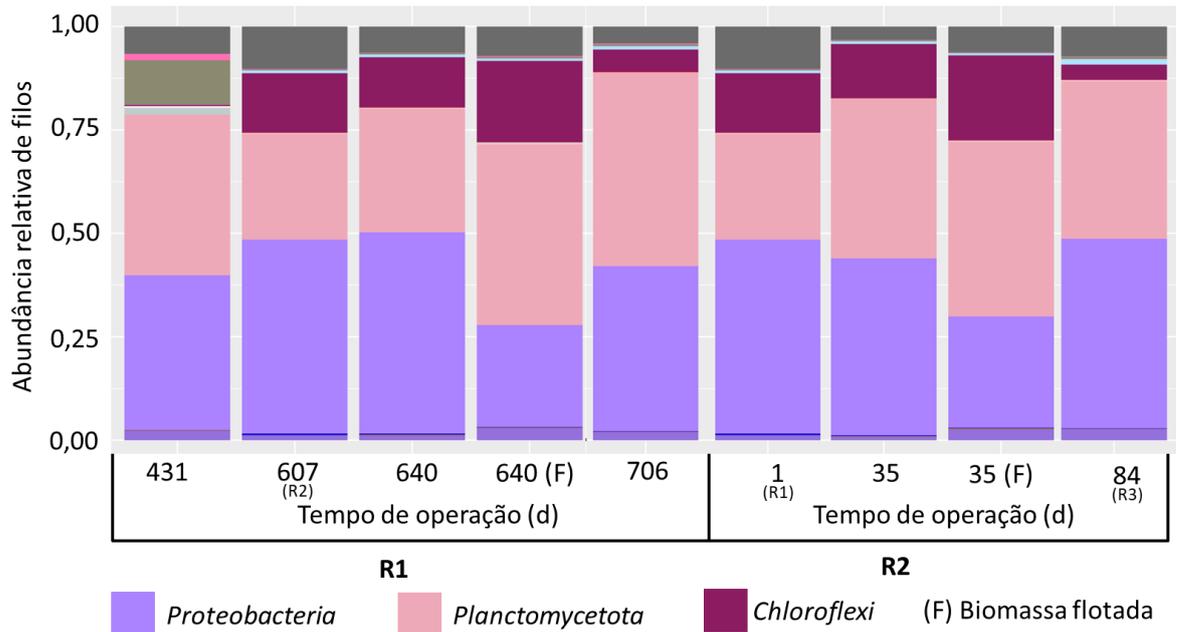


Figura A6 – Alcalinidade afluente e efluente durante a condução do processo PNA no R4 (Fase IV).

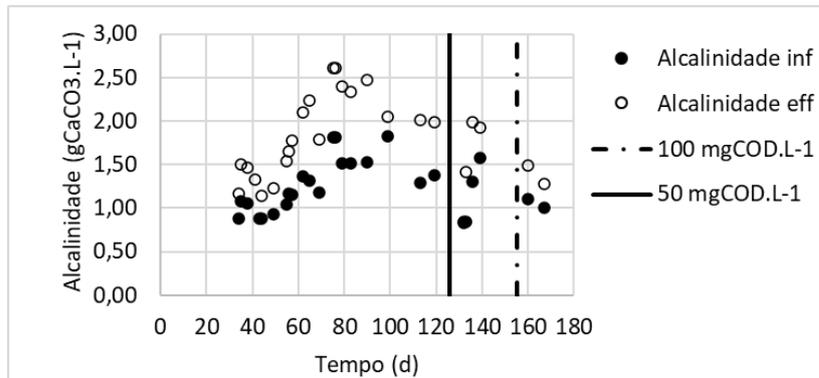
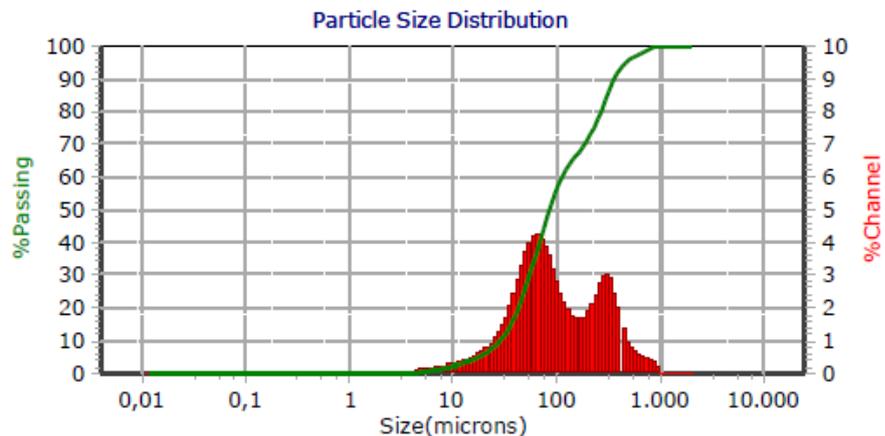


Figura A7 – Distribuição do tamanho das partículas (PSD) descartadas do R4 (dia 143 de operação).





EESC • USP