

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

RAFAELA CARVALHO PAULA

**INFLUÊNCIA DA ORIGEM DO INÓCULO NO ENRIQUECIMENTO DE
COMUNIDADES MICROBIANAS ANAMMOX E SRAO**

Poços de Caldas/MG
2018

RAFAELA CARVALHO PAULA

**INFLUÊNCIA DA ORIGEM DO INÓCULO NO ENRIQUECIMENTO DE
COMUNIDADES MICROBIANAS ANAMMOX E SRAO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência da Engenharia Ambiental pela Universidade Federal de Alfenas - *campus* Poços de Caldas. Área de concentração: Tratamento de águas residuárias.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Piacentini Rodriguez.
Coorientador: Prof. Dr. Rafael Brito de Moura.

Poços de Caldas/MG
2018

Dados internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca campus Poços de Caldas

P281i Paula, Rafaela Carvalho.
Influência da origem do inóculo no enriquecimento de comunidades microbianas ANAMMOX e SRAO. / Rafaela Carvalho Paula – Poços de Caldas /MG, 2018 .
70 f.-

Orientador: Renata Piacentini Rodriguez.
Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) –
Universidade Federal de Alfenas– Campus de Poços de Caldas, 2018.
Bibliografia

1. Águas residuárias. 2. Oxidação anaeróbia.3. *Sulfate-reducing ammonium oxidation* .
I. Rodriguez, Renata Piacentini.. II. Título.

CDD - 628.1

RAFAELA CARVALHO PAULA

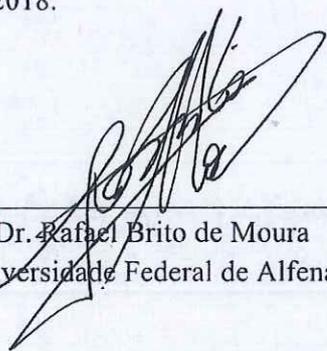
**INFLUÊNCIA DA ORIGEM DO INÓCULO NO ENRIQUECIMENTO DE
COMUNIDADES MICROBIANAS ANAMMOX E SRAO**

A banca examinadora abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia Ambiental, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Alfenas. Área de Concentração: Tratamento de águas residuárias.

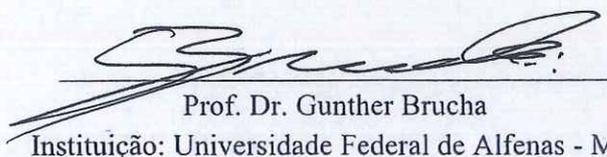
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Piacentini Rodriguez.

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Brito de Moura.

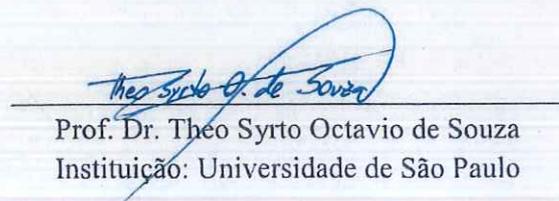
Aprovada em: 28 de fevereiro de 2018.



Prof. Dr. Rafael Brito de Moura
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - MG



Prof. Dr. Gunther Brucha
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - MG



Prof. Dr. Theo Syrto Octavio de Souza
Instituição: Universidade de São Paulo

Aos meus pais, Gilceu e Maria Inez.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer a Deus que me concedeu o dom da vida.

Agradeço infinitamente aos meus pais, Gilceu e Maria Inez, por todo amor e confiança depositados em mim e por ser meu exemplo de força, de caráter e trabalho.

À minha orientadora, Professora Renata Piacentini Rodriguez, pela orientação neste trabalho, pela confiança depositada em mim desde a graduação, por todo conhecimento transmitido, pela paciência e respeito durante o trabalho e principalmente, pelo incentivo, por sempre desejar e extrair o meu melhor.

Ao meu coorientador, Professor Rafael Brito de Moura, por todo conhecimento transmitido, por todo apoio e incentivo durante ao trabalho, pela simplicidade e dedicação em me ajudar em todos os momentos que precisei, por toda positividade e pela confiança depositada.

Às minhas irmãs Alessandra e Marcela, por todo apoio e serem a certeza de um abraço.

Aos membros da Banca Examinadora, Professor Theo Syrto e Professor Gunther Brucha, por toda a colaboração durante o trabalho e também pelas colocações durante a defesa.

À Professora Valéria Maia Merzel e a técnica Viviane Piccin dos Santos, pela colaboração e toda ajuda nas análises de biologia molecular.

Aos meus amigos de laboratório, Rafael Marçal Ferraz, Letícia Martins Braz, Mauro Fleury e Eduardo Paniguel, por tornarem a rotina mais agradável, com todos os risos e conhecimentos compartilhados. Valeu galera!

Aos técnicos da Universidade Federal de Alfenas, em especial ao Cochise Libano e a Eveline Ramos, por toda a colaboração durante o trabalho. A ajuda de vocês foi essencial para a concretização deste trabalho.

Agradeço a Capes pela concessão da bolsa, possibilitando a dedicação exclusiva ao projeto.

“Nunca te é concedido um desejo sem que te seja concedida também a facilidade de torná-lo realidade. Entretanto, é possível que tenhas que lutar por ele”.

Richard Bach

RESUMO

O tratamento biológico de águas residuárias ricas em nitrogênio tem alcançado maior espaço nos últimos anos. A remoção biológica anaeróbia da amônia se apresenta como um processo promissor nesta área. O processo de oxidação anaeróbia da amônia (ANAMMOX) é uma rota metabólica mediada por microrganismos, a qual se caracteriza pela oxidação anaeróbia da amônia utilizando o nitrito como acceptor final de elétrons com geração de nitrogênio gasoso. Outro processo biológico anaeróbio para remoção de amônia, recentemente descrito, denominado *sulfate-reducing ammonium oxidation* (SRAO), associa a oxidação da amônia à remoção de sulfato, com geração de nitrogênio gasoso e enxofre elementar. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de enriquecimento de microrganismos ANAMMOX em reatores em batelada, a partir de quatro inóculos anaeróbios (Experimento I), os quais foram: lodo termofílico utilizado no tratamento de vinhaça (I1), dois inóculos provindos de estações de tratamento de avícola: Pereiras (I2) e Dacar (I3), e um inóculo utilizado na biorremediação de drenagem ácida de mina (I4). Além disso, avaliar o potencial de adaptação de um inóculo aeróbio provindo de uma planta de lodos ativados utilizada no tratamento de águas residuárias municipais para adaptação ao processo ANAMMOX (reator R1) e SRAO (reator R2) em reatores em batelada (Experimento II). Em ambos os experimentos os reatores foram incubados a 35°C, mantidos sob agitação e monitorados quanto ao consumo de compostos nitrogenados, sulfato, DQO e pH durante 322 dias para o Experimento I e 154 dias para o Experimento II. No experimento I, observou um longo período de intensa atividade desnitrificante, a qual somente foi desfavorecida com o aumento da concentração de nitrito e amônia. No entanto, essa atividade permaneceu até o final da operação, provavelmente devido à condição em batelada dos reatores, em que células mortas ficam retidas no reator e podem ser utilizados como doador de elétrons na via desnitrificação heterotrófica. A presença de microrganismos ANAMMOX foi detectada por meio da técnica de PCR em tempo real no reator inoculado com lodo provindo de um UASB utilizado no tratamento de efluente da avícola DACAR, provavelmente devido ao fato de o inóculo utilizado já operar com compostos nitrogenados favorecendo a presença de microrganismos ANAMMOX. No Experimento II, não foi detectada atividade ANAMMOX no reator R1 e também não foi observada atividade de redução simultânea da amônia e sulfato no reator R2, provavelmente devido ao curto tempo de operação. A presença de bactérias ANAMMOX não foi detectada nestes reatores.

Palavras-Chave: Águas residuárias. Oxidação anaeróbia. *Sulfate-reducing ammonium oxidation*.

ABSTRACT

Biological treatment of nitrogen rich wastewater has a promising potential, specially when considering the biological anaerobic removal of. The ANAMMOX process is a metabolic route mediated by microorganisms characterized by anaerobic oxidation of ammonia using nitrite as final electron acceptor and generating nitrogen gas as final product. Since 2001, another recently discovered was the anaerobic biological process for ammonia removal called sulfate-reduction ammonium oxidation (SRAO) which associates ammonium oxidation and sulfate removal. This process is ruled by ammonia oxidation coupled to sulfate reduction, releasing gaseous nitrogen and elemental sulfur. The aim of this work was to evaluate the potential for ANAMMOX and SRAO enrichment of microorganisms using batch reactors. For the ANAMMOX enrichments, four anaerobic inoculum was evaluated (Experiment I), which were: thermophilic sludge used on the treatment of vinasse (I1), two inoculum from poultry wastewater treatment plants: Pereiras (I2) and Dacar (I3), and an inoculum from a reactor used to treat acid mine drainage (I4). In addition, it was also evaluated the adaptation potential of an aerobic inoculum from an activated sludge plant treating sewage for adaptation to the ANAMMOX (reactor R1) and SRAO (reactor R2) process in batch reactors (Experiment II). The consumption of nitrogen compounds, sulfate, COD and pH were monitored for 322 days for Experiment I and 154 days for Experiment II. In experiment I, it was observed a period of intense denitrifying activity, which was disadvantaged with the increase of nitrite and ammonia concentration. However, this activity remained until the end of the operation probably because dead cells were retained and could be used as an electron donor via heterotrophic denitrification. The presence of ANAMMOX microorganisms was detected by real-time PCR technique in the batch reactor with the inoculum from the UASB reactor treating poultry wastewater. This was only possible probably because the inoculum already treated nitrogen compounds, which favored the presence of these microorganisms. In Experiment II, neither ANAMMOX activity or SRAO activity were observed, probably due to the short operating time. The presence of ANAMMOX bacteria was not detected in these reactors.

Keywords: Wastewater. Anaerobic oxidation. *Sulfate-reducing ammonium oxidation*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 3.1- Ciclo do nitrogênio elucidando rotas metabólicas.	15
Figura 3.2- Modelo hipotético da oxidação anaeróbia dependente do NO ₂ por <i>Nitrossomonas</i>	19
Figura 3.3- Rota metabólica provável proposta para a oxidação anaeróbia da amônia.	21
Figura 3.4- Mecanismo da oxidação anaeróbia da amônia.	23
Figura 3.5- Ciclo biogeoquímico de compostos nitrogenados inorgânicos e sulfurosos.	27
Figura 4.1- Fluxograma com as fases de operação e suas respectivas características.	35
Figura 5.1- Variação das concentrações de nitrito afluente e efluente nos sistemas biológicos	41
Figura 5.2- Variação das concentrações de amônia afluente e efluente nos sistemas biológicos	43
Figura 5.3- Variação da porcentagem de remoção de compostos nitrogenados nos reatores I1 e I2.	47
Figura 5.4- Variação da porcentagem de remoção de compostos nitrogenados nos reatores I3 e I4.	47
Figura 5.5 - Variação do pH afluente e efluente nos sistemas biológicos.	49
Figura 5.6 - Concentração do íon sulfato nos sistemas biológicos.	51
Figura 5.7 - Concentração de DQO nos sistemas biológicos.	52
Figura 5.8- Concentrações afluente e efluente de nitrito e amônia no reator 1.	53
Figura 5.9- Concentrações afluente e efluente de sulfato e amônia no reator 2.	55
Figura 5.10 –Variação do pH durante o período de operação no reator 1 e 2.	58
Figura 5.11-Amplificação em PCR da amostra padrão com os primers (A) AMX818F e AMX1066R e (B) hzoc11F1 e hzoc11R2.	60
Figura 5.12- Gel de agarose 1% corado com Sybr Safe (Invitrogen) das amostras amplificadas em qPCR com os primers hzoc11F1 e hzoc11R2.	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1- Composição do meio sintético inorgânico	30
Tabela 4.2- Composição das soluções de elemento traço.	31
Tabela 4.3- Composição do meio sintético inorgânico para enriquecimento SRAO.	32
Tabela 4.4- Características das fases operadas no Experimento I.	34
Tabela 4.5- Concentrações afluentes de amônia, nitrito e sulfato no reator 1 e 2.	36
Tabela 5.1- Inóculos utilizados em cada experimento com respectiva sigla.	40
Tabela 5.2- Concentrações média de nitrito ($\text{mg N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$) no afluente e efluentes dos sistemas biológicos.	42
Tabela 5.3- Concentrações médias de amônia ($\text{mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$) no afluente e efluentes dos sistemas biológicos.	43
Tabela 5.4- Concentrações médias afluentes e efluentes para nitrito, amônia e sulfato no reator 1 e reator 2.	57
Tabela 5.5- Média do pH afluente e efluente em cada fase para o reator 1 e reator 2.	58
Tabela 5.6- Valores médios de DQO afluente e efluente no reator 1 e 2.	59
Tabela 5.7- Amostras corridas no gel de agarose e suas respectivas identificações.	62

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	OBJETIVO.....	14
2.1	OBJETIVO GERAL.....	14
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1	O CICLO DO NITROGÊNIO	15
3.2	PROCESSOS BIOLÓGICOS PARA REMOÇÃO DE NITROGÊNIO	16
3.2.1	<i>Processo Convencional: Nitrificação e Desnitrificação</i>	16
3.2.2	<i>Processo NO_x</i>	18
3.2.3	<i>Processo ANAMMOX</i>	20
3.2.4	<i>Reatores em batelada para enriquecimento ANAMMOX</i>	24
3.2.5	<i>SRAO: UM NOVO MECANISMO</i>	25
3.2.5.1	Mecanismo global SRAO	26
3.2.5.2	Processo SRAO em biorreatores: escala laboratorial	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1	INÓCULOS	29
4.1.1	<i>Experimento I</i>	29
4.1.2	<i>Experimento II</i>	30
4.2	MEIOS DE CULTURA PARA ENRIQUECIMENTO.....	30
4.2.1	<i>Experimento I</i>	30
4.2.2	<i>Experimento II</i>	31
4.3	OPERAÇÃO E MONITORAMENTO DOS REATORES.....	32
4.3.1	<i>Montagem e Operação dos Reatores no Experimento I</i>	32
4.3.1.1	Condições Operacionais no Experimento I	33
4.3.2	<i>Operação dos Reatores no Experimento II</i>	36
4.3.3	<i>Monitoramento Analítico dos Reatores</i>	37
4.4	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	37
4.4.1	<i>Extração do DNA genômico</i>	37
4.4.2	<i>Amplificação via PCR convencional</i>	38
4.4.3	<i>Construção da curva do qPCR</i>	38
4.4.4	<i>Análises de PCR quantitativa (qPCR)</i>	39
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1	EXPERIMENTO I	41
5.1.1	<i>Variação dos compostos nitrogenados (NH₄⁺, NO₂⁻ e NO₃⁻)</i>	41
5.1.2	<i>Variação do pH</i>	48
5.1.3	<i>Avaliação do íon SO₄²⁻ e DQO</i>	50
5.2	EXPERIMENTO II	53

5.2.1	<i>Variação dos íons NO_2^-, NH_4^+ e SO_4^{2-}</i>	53
5.2.2	<i>Variação do pH</i>	58
5.2.3	<i>Avaliação do íon NO_3^- e DQO</i>	59
5.3	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	60
5.3.1	<i>Amplificação em PCR convencional</i>	60
5.3.2	<i>Amplificação em qPCR</i>	61
6	CONCLUSÃO	65
7	RECOMENDAÇÕES	66
	REFERÊNCIAS	67

1 INTRODUÇÃO

Nitrogênio é um importante nutriente para os organismos vivos, no entanto, quando presente em excesso é um potencial poluidor e o descarte inapropriado deste composto em corpos d'água pode resultar em desequilíbrio no ecossistema aquático.

Dentre os principais problemas enfrentados pela presença de compostos nitrogenados no efluente, destaca-se a eutrofização de corpos d'água, podendo ocasionar mortandade de peixes, toxicidade das algas, elevação no custo do tratamento, dentre outros. A amônia pode provocar toxicidade aos peixes e aumentar a demanda biológica de oxigênio. Em águas subterrâneas, a preocupação se dá com a presença de nitrato, o qual pode contaminar águas para abastecimento e provocar doenças como metahemoglobinemia, causando problemas na saúde pública (MOTA; VON SPERLING, 2009).

A maneira efetiva de evitar a contaminação de corpos d'água é realizar a redução de compostos nitrogenados presentes nas águas residuárias por meio de tratamentos físico-químicos ou biológicos. No entanto, os processos biológicos de remoção de nitrogênio têm sido uma alternativa potencial para o tratamento de efluentes com alta concentração de compostos de nitrogênio, devido às limitações impostas pelos processos físico-químicos, como pH, condições do efluente e elevado custo de implantação (SCHEEREN et al., 2011).

O tratamento biológico convencional para compostos nitrogenados acontece por processos de nitrificação e desnitrificação. A primeira etapa, a nitrificação, ocorre em condições aeróbias em que o íon amônio é oxidado a nitrato via nitrito. Nesta etapa, encontram-se como principais representantes as bactérias pertencentes ao gênero *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*, as quais são responsáveis, respectivamente, pela oxidação do íon amônio à nitrito e posteriormente a nitrato. Na desnitrificação, a segunda etapa, o nitrito e nitrato são convertidos a nitrogênio gasoso, em condições anóxicas por bactérias desnitrificantes, as quais utilizam o nitrito ou nitrato como acceptor de elétrons utilizando matéria orgânica como doador de elétrons (SCHEEREN et al., 2011).

Além do processo de nitrificação e desnitrificação convencional, outro potencial processo para tratamento de águas residuárias ricas em amônia por via anaeróbia, é o processo conhecido como *anaerobic ammonium oxidation* (ANAMMOX). Esta rota metabólica promove a remoção simultânea de amônio e nitrito, sendo este último composto o acceptor de elétron o qual promove a oxidação do íon amônio a nitrogênio gasoso (AHN, 2006).

A aplicação do processo ANAMMOX para tratamento de águas residuárias com elevada carga de nitrogênio pode reduzir os custos operacionais em até 90%, por não haver necessidade

da utilização de uma fonte externa de carbono e também de aeração, além da baixa geração de lodo no sistema, reduzindo desta forma os custos operacionais (MOTA; VON SPERLING, 2009; JETTEN et al., 2001).

No entanto, a principal limitação para aplicação de processos ANAMMOX em tratamentos biológicos se destaca o tempo de partida de reatores, devido às taxas lentas de crescimento de microrganismos ANAMMOX (STROUS et al., 1998). Logo o principal desafio encontrado neste processo são as estratégias para a partida dos reatores biológicos de forma a reduzir o tempo de emergência de atividade e, ainda, alcançar a estabilidade da eficiência no processo (TERADA et al., 2011).

Um mecanismo adicional envolvendo a remoção de amônia foi postulado por Fdz-Polanco et al. (2001). Estes autores observaram a redução do sulfato com simultânea oxidação da amônia em um reator anaeróbio de leito fluidizado e propuseram um novo mecanismo biológico para explicar este comportamento anômalo. O mecanismo proposto foi denominado *sulfate-reducing ammonium oxidation* (SRAO).

No processo SRAO ocorre oxidação da amônia a nitrogênio molecular e, simultaneamente, redução do sulfato a enxofre elementar. Já se tem conhecimento que a rota metabólica anaeróbia de oxidação da amônia dependente da redução do sulfato é possível e praticável, no entanto pouco conhecimento se possui sobre os microrganismos envolvidos no processo, as melhores condições de operação e até mesma a via que esse mecanismo ocorre.

O foco deste trabalho consiste em avaliar e fornecer informações sobre o enriquecimento de microrganismos ANAMMOX em culturas em bateladas utilizando diferentes fontes de inóculos para partida do reator, contribuindo para buscar novas informações de possíveis inóculos para estabelecer o processo ANAMMOX, assim como, avaliar o potencial de um inóculo aeróbio operado em rota ANAMMOX e SRAO.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o potencial de enriquecimento de microrganismos ANAMMOX/SRAO a partir de diferentes inóculos.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Os objetivos específicos foram:

- a) Enriquecer biomassa ANAMMOX em reator em batelada a partir de inóculos oriundos de processos anaeróbios e aeróbio.
- b) Enriquecer microrganismos capazes de realizar a redução do sulfato com simultânea redução de amônia pelo processo *sulfate-reducing ammonium oxidation* (SRAO) em reator em batelada utilizando inóculo aeróbio.
- c) Avaliar a resposta de cada inóculo ao potencial de remoção de amônia, nitrito e sulfato.
- d) Identificar a presença de microrganismos ANAMMOX na biomassa enriquecida dos sistemas biológicos, por meio da técnica de quantificação PCR em tempo real.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O CICLO DO NITROGÊNIO

O nitrogênio é um elemento essencial para todos os seres vivos, fazendo parte de compostos como aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos. Este elemento pertencente ao grupo 15 da tabela periódica e possui a capacidade de assumir diversos números de oxidação (-3 a +5), possibilitando ser encontrado em várias formas (JETTEN et al., 2009).

A maior abundância deste composto é encontrada na forma de gás nitrogênio (N_2), constituindo 80% da atmosfera terrestre. No entanto, esta forma é inerte quimicamente e não pode ser utilizada como fonte direta de nitrogênio, exceto por grupos específicos de bactérias (VAN DE GRAFF, 1997).

Neste contexto, se destaca a atuação dos microrganismos, os quais são responsáveis por alterar o estado de oxidação do nitrogênio, atuando como catalisadores biológicos, realizando a decomposição biológica deste elemento, permitindo a obtenção na biota terrestre (CHAZAL; LENS, 2000).

Dentre os processos biológicos que fazem parte do ciclo do nitrogênio, têm-se: fixação de nitrogênio, nitrificação, desnitrificação, amonificação e ANAMMOX. Estas transformações biológicas no ciclo do nitrogênio estão ilustradas na Figura 3.1.

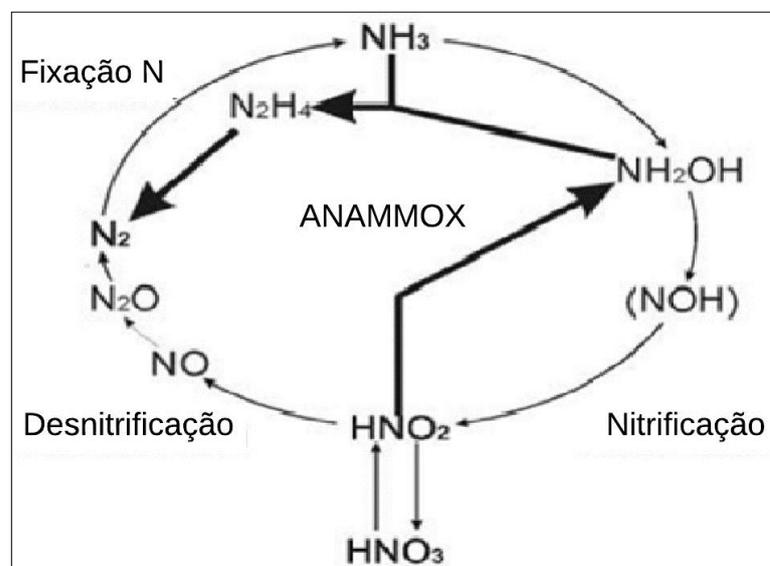


Figura 3.1- Ciclo do nitrogênio elucidando rotas metabólicas.
Fonte: Adaptado de AHN (2006).

3.2 PROCESSOS BIOLÓGICOS PARA REMOÇÃO DE NITROGÊNIO

3.2.1 *Processo Convencional: Nitrificação e Desnitrificação*

Os processos biológicos têm sido amplamente utilizados para tratamento de águas residuárias ricas em nitrogênio, por serem mais eficientes e relativamente mais baratos comparados a processos físico-químicos (ANH, 2006).

O processo convencional para remoção biológica de nitrogênio envolve as rotas metabólicas de nitrificação e desnitrificação. Na primeira etapa, a nitrificação, ocorre a oxidação do íon amônio a nitrato em condições aeróbias. Apesar de o produto final ser o nitrato, esta etapa é um processo de duplo estágio em qual, inicialmente, o íon amônio é oxidado a nitrito e posteriormente o nitrito é oxidado a nitrato.

Na nitrificação, ambos os estágios ocorrem por microrganismos aeróbios e de metabolismo quimiolitotróficos, os quais obtêm energia para atividade celular a partir da oxidação da amônia ou nitrito e utilizam o oxigênio como aceptor de elétrons enquanto a fonte de carbono para crescimento celular é provinda de uma fonte inorgânica, no caso dióxido de carbono (CO₂) (ANH, 2006).

Dentre os principais microrganismos envolvidos na oxidação da amônia a nitrito encontram-se as *Nitrosomonas*, entretanto, os *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosovibrio* e *Nitrosobulus* podem também realizar esta rota metabólica. Estas oxidadoras de amônia são diversas geneticamente, no entanto, pertencem a *beta* subdivisão de *Proteobacteria*. (ANH, 2006).

A estequiometria da reação para oxidação da amônia a nitrito por *Nitrosomonas* está elucidada na Equação (1) (EPA, 1975).



Por esta equação, infere-se que o processo de nitrificação gera íons H⁺, o qual pode provocar a diminuição do pH do sistema biológico.

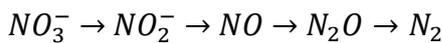
Já, entre os microrganismos envolvidos na oxidação do nitrito a nitrato encontram-se as *Nitrococcus*, *Nitrospira* e *Nitrocystis*. Todavia, a oxidadora de nitrito mais reconhecida é a *Nitrobacter*, a qual pertence a subdivisão *alfa* das *Proteobacterias*. A reação de oxidação do nitrito a nitrato por estes grupos está expressa na Equação (2) (AHN, 2006; EPA, 1975).



A estequiometria da reação global para oxidação do íon amônio a nitrato via nitrito pode ser obtida somando-se as Equações (1) e (2), como elucidado na Equação (3).



O processo de desnitrificação geralmente ocorre em condições heterotróficas e sob condições limitadas de O_2 ou até mesmo anóxicas. Este processo ocorre com a redução de compostos nitrogenados oxidados (NO_2^- ou NO_3^-) a nitrogênio gasoso (N_2) por microrganismos heterotróficos, sendo uma das principais fontes de emissão de NO (óxido nítrico) e N_2O na atmosfera. Estes microrganismos são capazes de utilizar nitrito ou nitrato como acceptor de elétrons e matéria orgânica como fonte de carbono e energia (ANH, 2006; JETTEN, 2008). Nesta síntese o nitrato é reduzido a nitrito, o qual é reduzido a óxido nítrico (NO), e este é reduzido a óxido nitroso (N_2O) e posteriormente a nitrogênio gasoso (N_2), conforme a sequência abaixo:



O principal produto da reação é nitrogênio gasoso, no entanto, gases como óxido nítrico e óxido nitroso podem ser encontrados como intermediários e em menores concentrações, quando a redução não é completa (SCHMIDT et al., 2002).

Os microrganismos envolvidos na desnitrificação são pertencentes à classe Gram-negativa *alfa* e *beta* dos *Proteobacteria*, como *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Paracoccus* e *Thiobacillus*. Algumas bactérias Gram-positivas como *Bacillus* e também alguns tipos de arqueias como *Halobacterium* também são capazes de realizar desnitrificação (ANH, 2006).

Variedades de doadores de elétron e fonte de carbono como: metanol, acetato, glicose, dentre outros têm sido utilizados para desnitrificação. No entanto, como metanol apresenta-se como uma fonte relativamente mais barata, tem sido amplamente empregado. A síntese utilizando metanol como fonte de carbono pode ser representada por dois passos como mostra as Equações (4) e (5) (EPA, 1975).

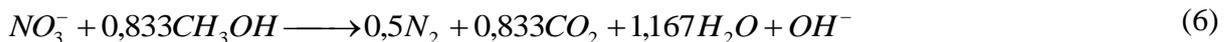
Primeira etapa



Segunda etapa



A equação global pode ser obtida somando as duas equações acima, conforme ilustra a Equação (6).



Como se pode observar pela equação geral da desnitrificação heterotrófica, existe liberação de íons OH^- ao final da reação, indicando que será gerado alcalinidade provocando consequentemente aumento no pH do sistema biológico.

Algumas bactérias desnitrificantes são quimiolitotróficas e são capazes de oxidar compostos reduzidos, tais como os íons amônio (NH_4^+), sulfeto (S^{2-}), enxofre elementar (S^0), tiosulfato ($S_2O_3^{2-}$), sulfito (SO_3^{2-}) (ANH, 2006; CARDOSO et al., 2006; KUENEN et al., 1992).

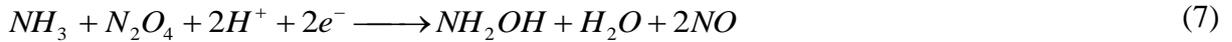
No tratamento de águas residuárias este sistema tem sido amplamente empregado com intuito de reduzir as cargas orgânicas de nitrito e/ou nitrato dos efluentes de forma a mitigar ou prevenir o crescimento de cianobactérias e consequentemente a eutrofização em corpos d'água.

3.2.2 Processo NO_x

Dentre as novas tecnologias biológicas para remoção de nitrogênio encontram-se os processos envolvendo os óxidos de nitrogênio (NO_x), em que a adição destes compostos estimula a atividade desnitrificante autotrófica de microrganismos do gênero *Nitrosomonas*.

Estudos demonstram a capacidade de microrganismos nitrificantes quimiolitotróficos atuarem em ambiente anóxico. Schmidt et al. (1997) relataram a capacidade de bactérias aeróbias oxidadoras de amônia, *Nitrosomonas eutropha*, de realizar a oxidação da amônia sob condições anóxicas, substituindo o gás oxigênio (O_2) por dióxido de nitrogênio (NO_2). Os resultados obtidos relatam um complexo e diferenciado papel dos óxidos de nitrogênio (NO e

NO₂) no metabolismo das oxidadoras de amônia. O balanço completo para oxidação anaeróbia da amônia, por estes microrganismos, está expresso nas Equações (7) a (9) (SCHMIDT et al., 2002).



De acordo com as Equações acima, há formação de hidroxilamina e óxido nítrico e, podem-se inferir que enquanto não for metabolizado óxido nítrico, a hidroxilamina não é oxidada a nitrito. O nitrito produzido é utilizado como acceptor de elétrons gerando nitrogênio gasoso, conforme ilustra a Equação (10) (SCHMIDT et al., 2002).



Schmid et al. (2002) propuseram uma rota metabólica hipotética de oxidação anaeróbia da amônia por *Nitrossomonas*, o qual está ilustrado na Figura 3.2.

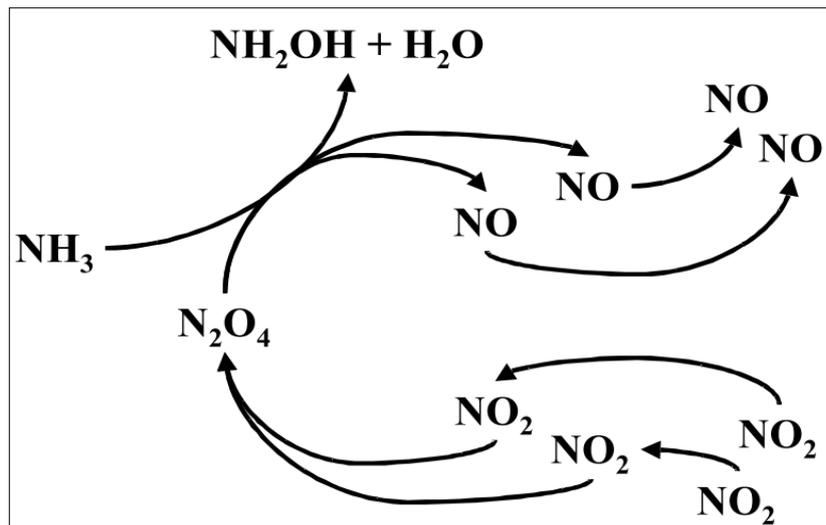


Figura 3.2- Modelo hipotético da oxidação anaeróbia dependente do NO₂ por *Nitrossomonas*.
Fonte: SCHMIDT et al. (2002).

Conforme a Figura acima, a oxidação anaeróbia da amônia é dependente do tetróxido de nitrogênio (N₂O₄ – dímero do NO₂), como agente oxidante. E, somente quando NO₂ está

disponível sob condições anóxicas, que a oxidação da amônia ocorrerá e o intermediário da reação, a hidroxilamina, será formada. O óxido nítrico (NO) é formado como produto final e a hidroxilamina é oxidada a nitrito (SCHMIDT et al., 2002).

3.2.3 *Processo ANAMMOX*

O processo ANAMMOX (*Anaerobic Ammonium Oxidation*) se caracteriza por ser uma via metabólica em que a oxidação da amônia a gás nitrogênio ocorre utilizando o nitrito como acceptor de elétrons. Para o crescimento celular, microrganismos ANAMMOX utilizam uma fonte de carbono inorgânica, no caso CO₂ e usam nitrito como doador de elétrons para produzir material celular (ANH, 2006; KUENEN, 2008).

Essa rota metabólica foi proposta como uma via termodinamicamente possível por Broda em 1977, no entanto este processo somente foi observado após 10 anos por Mulder et al. (1995). Estes autores tentaram realizar o enriquecimento e identificação dos microrganismos responsáveis pela rota metabólica ANAMMOX, no entanto não obtiveram sucesso. O enriquecimento dos microrganismos ANAMMOX foi realizado por Van de Graff et al. (1996) em um reator de leito fluidizado com meio autotrófico contendo amônia e nitrito e bicarbonato como fonte de carbono. Os autores obtiveram sucesso no enriquecimento e em 1997, Van de Graff et al. (1997) realizaram diversos estudos para provar a natureza biológica da reação ANAMMOX e descreveram a possível rota metabólica destacando os intermediários da reação, a hidroxilamina e a hidrazina, conforme ilustra a Figura 3.3.

De acordo com o mecanismo ilustrado na Figura 3.3 o íon amônio é oxidado pela hidroxilamina e forma hidrazina (etapa 1). Os compostos reduzidos derivados da hidrazina (N₂H₄) então reduzem nitrito para formar mais hidroxilamina e N₂ (etapa 2, 3 e 4). A formação de nitrato pode gerar equivalentes redutores para a produção de biomassa (etapa 5) (VAN DE GRAFF et al., 1997).

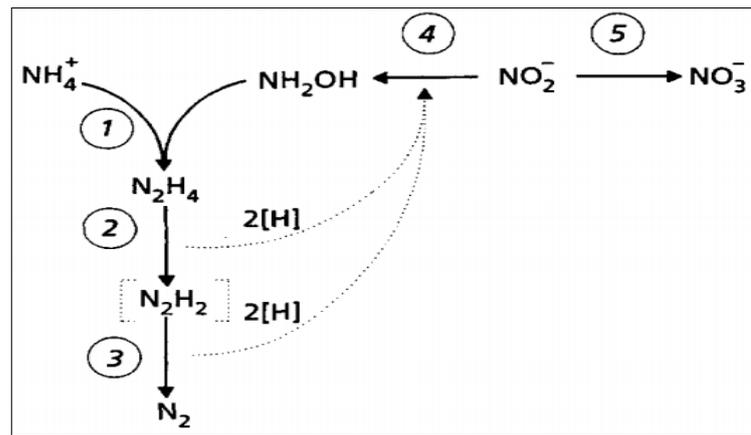
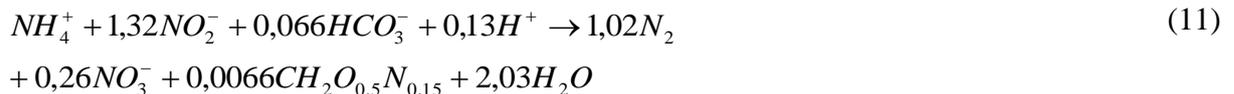


Figura 3.3- Rota metabólica provável proposta para a oxidação anaeróbica da amônia.

Fonte: Van de Graff et al. (1997).

Strous et al. (1998) propuseram a estequiometria da reação ANAMMOX e de acordo com esta, para cada mol de amônio a ser consumido são necessários 1,32 mols de nitrito e são gerados 0,26 mols de nitrato, conforme ilustra a Equação (11).



Os microrganismos envolvidos na oxidação anaeróbica da amônia são bactérias pertencentes ao filo *Planctomycetes* (ANH, 2006). Atualmente, muitos estudos vêm sendo realizados com intuito de identificar os microrganismos atuantes no processo ANAMMOX.

O primeiro microrganismo com atividade ANAMMOX foi relatado por Strous et al. (1999). Estes autores, por meio de uma biomassa enriquecida de um sistema operado em bateladas sequenciais, o qual realizava remoção de nitrogênio via ANAMMOX, purificaram uma cultura a 99,6% de pureza, utilizando centrifugação com gradiente *Percoll* e identificaram o microrganismo envolvido por meio da amplificação via PCR do gene 16S RNA com posterior sequenciamento como membro do grupo *Planctomycetes*, denominada *Candidatus Brocadia anammoxidans*.

Outros estudos na literatura identificaram bactérias ANAMMOX entre os *Planctomycetes*. *Candidatus Kuenia stuttgartiensis* foi identificado por Schmid et al. (2000) em seu estudo em reatores tipo biodiscos rotatórios em Stuttgart na Alemanha.

Egli et al. (2001) utilizaram biomassa de um reator já adaptado a tratar efluentes ricos em amônia para realizar o enriquecimento de microrganismos ANAMMOX. Ao final da

pesquisa, os autores identificaram microrganismos com alta similaridade com *Brocadia anammoxidans* e *Kuenia stuttgartiensis*, 90% e 98,9%, respectivamente.

Toh et al. (2002) utilizando lodo da estação de tratamento de esgoto municipal em Sydney-Austrália, enriqueceram um consórcio microbiano para oxidação anaeróbia da amônia. Através da técnica de biologia molecular FISH, o consórcio microbiano apresentou 50% de microrganismos ANAMMOX e afinidade com *B. anammoxidans*.

Schmid et al. (2003) relataram o descobrimento de duas novas espécies do gênero *Scalindua*, as quais foram *Candidatus S. brodae* e *S. wagneri*. Estes microrganismos foram encontrados no biofilme de um reator nitrificante com biodiscos rotativo localizado em Pitsea - Reino Unido, o qual operava sob condições anóxicas realizando o tratamento de chorume.

Os microrganismos ANAMMOX descritos na literatura encontram-se no filo *Planctomycetes*, na ordem *Brocadiales* e família *Brocadiaceae* compreendendo as espécies *Candidatus*. Incluindo as espécies “*Candidatus Brocadia anammoxidans*” e “*fulgida*”, “*Candidatus Anammoxoglobus propionicus*”, “*Candidatus Jettenia asiatica*”, “*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*”, e “*Candidatus Scalindua brodiae*”, “*sorokinii*”, e “*wagneri*” (LUDWING; EUZÉBY; WHITMAN, 2011).

O mecanismo envolvido na oxidação anaeróbia da amônia foi estudado por Jetten et al. (2001) utilizando experimentos de marcação ^{15}N em comunidades microbianas enriquecidas e com alta abundância da espécie *Candidatus Brocadia anammoxidans*. Segundo os autores, o nitrito (aceptor de elétrons) é reduzido a hidroxilamina, em seguida, esta reage com o doador de elétrons (íon amônio) levando a produção de gás nitrogênio (N_2). No entanto, os autores citam que observaram o acúmulo de hidrazina em reatores em batelada com excesso de hidroxilamina e amônia, indicando que a hidrazina é um intermediário da reação. Este mecanismo está ilustrado pela Figura 3.4.

A ocorrência de hidrazina no metabolismo do nitrogênio por microrganismos é tida como rara ou até mesmo única, diferenciando a rota metabólica das bactérias ANAMMOX. Os mecanismos atuantes nesta rota metabólica, ainda não estão completamente definidos (JETTEN et al. 2001; KARTAL et al., 2012).

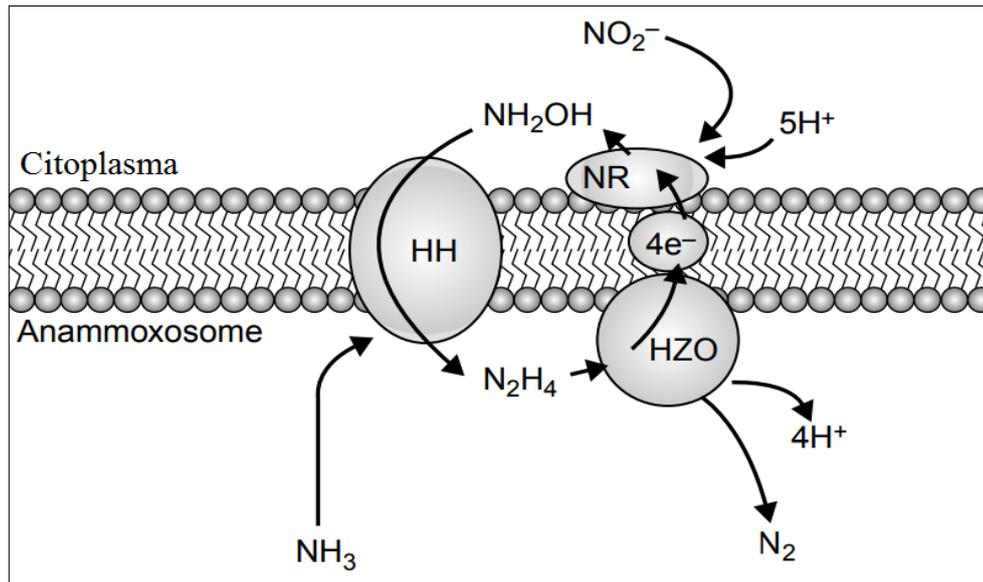


Figura 3.4- Mecanismo da oxidação anaeróbica da amônia. NR é a enzima de nitrito redutase; HH é a enzima hidrazina hidrolase; HZO é a enzima oxidante de hidrazina.

Fonte: JETTEN et al. (2001).

Jetten et al. (2001) detectaram a enzima hidroxilamina oxidoreductase (HAO) e que esta apresentou estar somente dentro de uma região limitada pela membrana citoplasmática, a qual compõe cerca de 30-60% do volume celular. E denominaram o nome desta “organela” como anammoxosomo. A qual supostamente está relacionada à reação ANAMMOX, devido à presença exclusiva da enzima hidroxilamina oxidoreductase.

A descoberta do metabolismo ANAMMOX é tida na literatura como um processo promissor para tratamentos de águas residuárias ricas em compostos nitrogenados devido à redução de 90% dos custos operacionais por não necessitar de aeração no sistema e também por não necessitar de uma fonte de carbono, além disso, por gerar menor produção de lodos provocada pela baixa velocidade de duplicação de microrganismos ANAMMOX e por não gerar gás carbônico (CO_2), gás relacionado ao efeito estufa (MOTA; VON SPERLING, 2009, JETTEN et al., 2009).

No entanto, o tempo de partida do reator devido ao baixo crescimento celular tem sido um entrave na estabilização do processo ANAMMOX. Os microrganismos responsáveis por este processo apresentam crescimento lento, sendo que a divisão celular ocorre a cada 10 a 14 dias (STROUS et al., 1998).

Diante do crescimento lento, estratégias para partida de reatores tem sido um grande desafio na área com intuito de promover a estabilização do processo no menor tempo possível. Segundo Terada et al. (2011) a atividade ANAMMOX está relacionada com a origem do

inóculo. Tsushima et al. (2007) demonstraram que a estabilização do processo ANAMMOX, assim como a remoção de nitrogênio por meio do processo é influenciada diretamente pela abundância de microrganismos ANAMMOX e pela relação carbono e nitrogênio (C/N_{total}) do inóculo. Sendo que, quanto maior a abundância de microrganismos ANAMMOX e, também, a menor relação C/N_{total} presente no inóculo, promoverá a estabilização do processo mais rapidamente. Neste contexto, a busca por inóculos para partida de reatores ANAMMOX se apresenta como um ponto chave na otimização do processo.

3.2.4 *Reatores em batelada para enriquecimento ANAMMOX*

Após a descoberta do processo ANAMMOX por Mulder et al. (1995) em reatores nitrificante/desnitrificante na Holanda, diversos estudos têm sido desenvolvidos com intuito de melhor compreender o mecanismo envolvido, buscando o enriquecimento e identificação dos microrganismos, assim as técnicas operacionais para obter um sistema eficaz e eficiente no enriquecimento dos microrganismos.

Diversos trabalhos foram relatados na literatura sobre o estudo do processo ANAMMOX em reatores em bateladas, principalmente, relacionados em identificar a rota metabólica, assim como o enriquecimento e identificação dos microrganismos envolvidos e avaliação do inóculo utilizado na partida do reator.

Egli et al. (2001) enriqueceram microrganismos ANAMMOX utilizando inóculo de um reator de biodiscos rotativos tratando águas residuárias ricas em amônia (em Kolliken, Suíça) em reatores batelada com adição de hidroxilamina e hidrazina nos reatores. Após seis meses de operação obtiveram uma cultura com aproximadamente 90% de microrganismos ANAMMOX e similaridades ao gênero *Candidatus Kuenia stuttgartiensis* e *Candidatus Brocadia anammoxidans*, com porcentagens de 98,9% e 90,9%, respectivamente.

Toh et al. (2002), utilizaram lodo mesofílico de tanque secundário anaeróbico de uma planta de tratamento de municipal em Sydney – Austrália e lodo ativado com 50% de lodo ativado de mesofílico de água residuária proveniente de uma indústria de forno de coque e 50% de biomassa de um reator enriquecido com atividade ANAMMOX, para inocular um reator em batelada e obtiveram a estabilização do reator em relação aos compostos nitrogenados com 10 semanas de operação. Estes autores iniciaram a operação com adição de cloranfenicol para inibir a atuação de microrganismos desnitrificantes, sendo que este composto não provoca inibição de microrganismos ANAMMOX. Ao final do experimento, o consórcio microbiano

enriquecido apresentou 50% de bactérias ANAMMOX, apresentando afinidade com *Candidatus B. anammoxidans*.

Tal et al. (2005) operaram frascos de antibiótico (150 mL) em batelada para estudar o enriquecimento de bactérias anaeróbias oxidadoras de amônia utilizando inóculo de sedimento coletado no porto de Harbor em Baltimore – Estados Unidos com marcação ^{15}N . Estes autores detectaram a presença de microrganismos ANAMMOX e também de *Nitrosomonas*.

Tsushima et al. (2007) estudaram o sucesso no enriquecimento de microrganismos ANAMMOX em 15 reatores operados em semi-batelada utilizando biomassa de um reator de discos rotativos em escala bancada que exibia 25% de perda do nitrogênio total. A estabilização dos compostos nitrogenados só foi obtida após o 340º dia. Depois deste período, determinaram o tempo de duplicação celular, o qual foi estimado entre 3,6 e 5,4 dias.

Sánchez et al. (2009) investigaram amostras de sedimentos e lodos de diferentes ambientes, totalizando 13 diferentes amostras para enriquecimento de culturas ANAMMOX em reatores em batelada. No entanto, somente tiveram sucesso em 6 inóculos, dos quais dois provenientes de reator em batelada sequencial (RBS) anóxicos, um de lagoa salobra, um de *wetland* construído e dois de digestores anaeróbios. Nos sistemas que obtiveram sucesso foi identificada a espécie *Candidatus Brocadia anammoxidans*. No entanto, a maioria dos sistemas apresentou início da atividade ANAMMOX com 365 dias de operação.

Dentre os principais desafios encontrados no processo ANAMMOX encontram-se o tempo de partida de reatores sendo este diretamente associado à composição do inóculo e consequentemente a origem do inóculo (TERADA et al., 2011).

Diante do levantamento na literatura, o reator em batelada apresenta, em sua maioria, sucesso para enriquecimento ANAMMOX, viabilizando o estudo neste projeto por meio deste reator.

3.2.5 SRAO: UM NOVO MECANISMO

O processo *sulfate-reducing ammonium oxidation* (SRAO) foi citado pela primeira vez na literatura por Fdz-Polanco (2001) para explicar as perdas anormais de nitrogênio e sulfato que aconteceram durante o tratamento de vinhaça provinda de uma destilaria de etanol que processava melaço de açúcar de beterraba em um reator de leito fluidizado com carvão ativado granular em condições anaeróbias.

Fdz-Polanco (2001) estudando a remoção de matéria orgânica e produção de metano em seu reator observou alta remoção de nitrogênio total no efluente e, esperava-se consumo de nitrogênio pela via amonificação, mas mesmo considerando a assimilação de nitrogênio pela biomassa para crescimento, a perda de nitrogênio não poderia ser explicada pelo processo de amonificação.

As perdas de nitrogênio na fase líquida de seu reator foram confirmadas mensurando a quantidade de nitrogênio coletado no biogás as quais foram superiores (8% N₂ v/v) ao valor esperado (0,3% N₂ v/v).

E ainda, Fdz-Polanco (2001) verificou, analisando a superfície do carvão ativado a presença de quantidades significativas de enxofre elementar (S⁰) e a remoção de 80% do sulfato no afluente. Estas observações sugerem uma ligação com as perdas de nitrogênio descritas e fez com que o autor sugerisse uma nova rota metabólica na qual o consumo de sulfato (SO₄²⁻) estaria vinculado a geração de nitrogênio molecular (N₂).

3.2.5.1 Mecanismo global SRAO

Com intuito de explicar o comportamento anômalo do reator, Fdz-Polanco (2001) sugere um novo processo de degradação em que ocorre oxidação de NTK/amônia produzindo nitrogênio molecular (N₂) e simultaneamente há redução de sulfato resultando na formação de enxofre elementar (S⁰). O novo mecanismo global de oxidação-redução postulado está expresso na Equação (12).



Esta equação global pode ser obtida combinando reações que envolvam formação de nitrito e a reação ANAMMOX, conforme ilustram as equações a seguir (FDZ-POLANCO, 2001).



A oxidação da amônia dependente da redução do sulfato é um novo mecanismo biológico em que amônia é oxidada utilizando sulfato como aceptor de elétrons sob condições inorgânicas.

Os ciclos biogeoquímicos de compostos nitrogenados e o de compostos sulfurosos, assim como a conexão entre esses ciclos estão expressos na Figura 3.5.

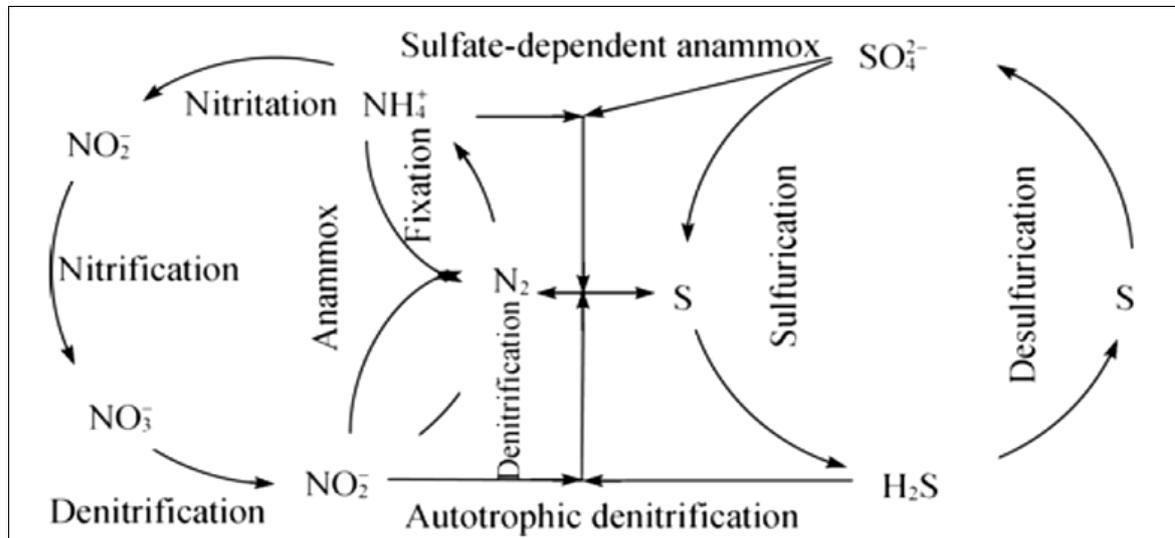


Figura 3.5- Ciclo biogeoquímico de compostos nitrogenados inorgânicos e sulfurosos.
Fonte: LEI et al. (2009).

Conforme ilustra a Figura 3.5, a conexão entre o ciclo do nitrogênio e do enxofre ocorre por duas vias. A primeira via se conecta na parte inferior dos ciclos, a qual é a desnitrificação autotrófica, apresentando muitos estudos na literatura. Já a segunda conexão ocorre na parte superior dos ciclos, sendo um dos processos de interesse neste estudo, o processo *sulfate-dependent anammox* (ou SRAO). Esta rota metabólica apresenta pouco estudos na literatura e, além disso, demonstra ser um processo com alta dificuldade de implantação.

3.2.5.2 Processo SRAO em biorreatores: escala laboratorial

Após ter sido proposto em 2001, o processo SRAO tem sido estudado em biorreatores em escala laboratorial e até mesmo a sua ocorrência na natureza. Porém, ainda se encontram poucos estudos na literatura e há necessidade de futuras pesquisas para encontrar os melhores parâmetros envolvidos neste processo.

Lei et al. (2009) estudaram a performance da oxidação anaeróbia da amônia com sulfato em um reator livre de matéria orgânica. Estes autores demonstraram que NH_4^+ e SO_4^{2-} são

quimicamente estáveis e não reagem sob condições anaeróbias, sem a presença de um catalisador. E, o reator de leito expandido com bolas de bambu inoculado com lodo de um digestor anaeróbio utilizado no tratamento de água residuária municipal foi capaz de oxidar a amônia utilizando o sulfato anaerobicamente com média de redução de 71,67 mg L⁻¹ e 56,82 mg L⁻¹, respectivamente para o sulfato e amônia, a partir do 67º dia de operação com concentrações altas (84–270 mg NH₄⁺ L⁻¹ e 450–740 mg SO₄²⁻ L⁻¹). Os autores, ainda citam que a reação foi difícil, no entanto, foi possível reproduzir.

Outro estudo de remoção anaeróbia simultânea de amônia e sulfato sob condições inorgânicas foi realizado por Yang, Zhou e Sun (2009). Os autores utilizaram um reator UASB preenchido com carvão ativado granular e o inóculo utilizado foi obtido de um lodo nitrificante empregado em uma planta de tratamento de esgoto. Inicialmente, foi conduzido o enriquecimento de microrganismos ANAMMOX e somente depois do processo estável que o mecanismo SRAO foi conduzido. As concentrações afluentes de amônio e sulfato foram 50–60 e 210–240 mg L⁻¹, respectivamente. Após 60 dias o processo se estabilizou e alcançou concentrações médias efluentes de 30 e 160 mg L⁻¹, respectivamente para amônia e sulfato.

Jing, Xiang e Ping (2009) isolaram uma cepa de bactérias de um reator com remoção de amônia e sulfato em estado estacionário e por estudos com microscopia eletrônica, testes fisiológicos e análise em sequência 16S rDNA relataram o microrganismo *Bacillus benzoovorans* na atuação da rota metabólica. Estes autores citaram que a máxima remoção obtida foi de 44,4% e 40,0%, respectivamente para amônia e sulfato.

Liu et al. (2008) isolaram e descreveram uma nova bactéria pertencente ao filo *Planctomycetes* capazes de oxidar o íon amônio (NH₄⁺) a nitrito (NO₂⁻) utilizando sulfato (SO₄²⁻) comoceptor de elétrons. A nova espécie foi denominada de *Anammoxoglobus sulfate*, exercendo um papel crítico no mecanismo SRAO, executando o primeiro estágio da reação, descrito pela Equação (13) e (14).

A descoberta por Liu et al. (2008) indica que os microrganismos ANAMMOX possuem maior versatilidade no metabolismo que presumido anteriormente e que, pelo menos, algumas espécies podem utilizar aceptores de elétrons alternativos ao nitrito (NO₂⁻).

O processo SRAO ainda não está consolidado na literatura e apresenta muitas lacunas, como os microrganismos envolvidos, o melhor sistema e parâmetros para enriquecimento e até mesmo a rota metabólica. No entanto, estudos na literatura indicam que a reação de redução do sulfato e oxidação simultânea da amônia é um mecanismo de difícil implantação, mas possível de ser detectado.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

No presente trabalho foram realizados dois experimentos em reatores operados em batelada alimentada. No primeiro experimento, denominado Experimento I, foi realizado o enriquecimento e cultivo de biomassa ANAMMOX a partir de quatro diferentes inóculos anaeróbios, durante 322 dias (janeiro de 2017 a novembro de 2017).

No segundo experimento, denominado Experimento II, realizou-se a comparação de dois reatores inoculados com lodo aeróbio a fim de enriquecer, no primeiro reator (R1), biomassa rica em microrganismos ANAMMOX e, no segundo reator (R2), microrganismos capazes de realizar a redução de sulfato com simultânea redução de amônia (*sulfate-reducing ammonium oxidation* - *SRAO*). Os reatores foram operados e monitorados durante 154 dias (junho de 2017 a novembro de 2017).

Ao final da operação dos reatores, realizaram-se análises microbiológicas de ampliação via PCR em tempo real com intuito de avaliar a presença de microrganismos ANAMMOX.

4.1 Inóculos

4.1.1 Experimento I

Foram escolhidos 4 diferentes inóculos anaeróbios para enriquecimento de biomassa ANAMMOX. O primeiro inóculo (I1) escolhido foi um inóculo termofílico oriundo de uma planta de tratamento de vinhaça de cana-de-açúcar localizada na cidade de Pradópolis, estado de São Paulo, com aproximadamente 113 g L⁻¹ de sólidos totais voláteis e 196 g L⁻¹ de sólidos totais.

O segundo inóculo (I2) foi retirado de um reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor* – UASB) utilizado para tratamento de efluentes de abatedouro de aves - Abatedouro Ideal - localizado na cidade de Pereiras - SP, com aproximadamente 23 g L⁻¹ de sólidos totais voláteis e 31g L⁻¹ de sólidos totais. O terceiro inóculo (I3) foi de um reator UASB utilizado na estação de tratamento de efluentes de abatedouro de aves da Avícola Dacar, na cidade Tietê-SP, com 40 g L⁻¹ de sólidos totais voláteis e 49 g L⁻¹ de sólidos totais.

O quarto inóculo (I4) estudado foi obtido de um reator UASB em escala laboratorial para estudo da biorremediação de drenagem ácida de minas, operado durante aproximadamente

900 dias com soro de leite como fonte exclusiva de carbono e energia, com 41 g L^{-1} de sólidos totais voláteis e 100 g L^{-1} de sólidos totais.

Aproximadamente 50 mL das amostras de todos os inóculos utilizados foram preservadas congeladas em temperatura de aproximadamente $(-6 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ para análises de amplificação via qPCR.

4.1.2 Experimento II

Neste experimento, utilizou-se inóculo obtido de um reator de lodos ativados convencional tratando efluente municipal da cidade de Campinas – SP, com 13 g L^{-1} de sólidos totais voláteis e 20 g L^{-1} de sólidos totais.

Uma amostra do inóculo, com aproximadamente 50 mL, foi preservada congelada em temperatura de aproximadamente $(-6 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$ para posteriores análises microbiológicas.

4.2 Meios de cultura para enriquecimento

4.2.1 Experimento I

Para cultivo e enriquecimento de bactérias ANAMMOX foi utilizado meio sintético inorgânico adaptado de Van de Graff et al. (1996), representado na Tabela 4.1. O meio sintético contém amônia e nitrito como doador de elétrons e como receptor de elétrons, respectivamente. Estes compostos foram adicionados em concentrações de acordo com a fase de operação como descrito na seção 4.3.1.1.

Tabela 4.1- Composição do meio sintético inorgânico para enriquecimento ANAMMOX.

Produtos Químicos	Concentração (mg L^{-1})
KHCO ₃	500,0
KH ₂ PO ₄	27,20
CaCl ₂ .2H ₂ O	180,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	300,0
NaNO ₂	variável
NH ₄ Cl	variável
Solução de elemento traço I	1 ml L ⁻¹
Solução de elemento traço II	1 ml L ⁻¹

Fonte: Adaptado de Van de Graff et al. (1996).

As soluções de elemento traço I e II foram preparadas de acordo com Van de Graff et al. (1996), e estão descritas na Tabela 4.2.

Tabela 4.2- Composição das soluções de elemento traço.

Reagentes	Concentração (g L ⁻¹)	
	Solução I	Solução II
EDTA	5	15
FeSO ₄ .7 H ₂ O	5	-
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
NaMoO ₄ .2 H ₂ O	-	0,22
NiCl ₂ . 6H ₂ O	-	0,19
NaSeO ₄ .10 H ₂ O	-	0,21
H ₃ BO ₄	-	0,014

Fonte: Van de Graff et al. (1996).

O meio sintético foi preparado em béquer adicionando os cinco primeiros componentes do meio em água destilada, de acordo com ordem expressa na Tabela 4.1 e, depois de completamente dissolvidos, adicionavam-se os elementos traços e, por fim, a fonte de amônia, pois este composto é bastante volátil. Ressalta-se que o volume de água destilada requerido foi aferido em balão volumétrico. Logo após a preparação do meio, uma amostra de aproximadamente 100 ml era retirada e congelada em frascos plásticos para análise de amônia.

4.2.2 Experimento II

No experimento II, dois meios sintéticos foram preparados: um para enriquecimento de microrganismos ANAMMOX e outro para enriquecimento de microrganismos SRAO. O meio para prover condições ANAMMOX foi preparado conforme descrito na seção 4.2.1 deste trabalho. Já o meio sintético inorgânico para enriquecimento SRAO foi semelhante ao utilizado para enriquecimento ANAMMOX com pequenas alterações, como a troca da fonte de nitrito pela de sulfato e a substituição do componente fornecedor de magnésio, o qual passou a ser cloreto de magnésio. No entanto, a concentração deste composto se manteve igual em ambos

os meios sintéticos. A composição do meio sintético utilizado para enriquecimento SRAO encontra-se expressa na Tabela 4.3.

Tabela 4.3- Composição do meio sintético inorgânico para enriquecimento SRAO.

Produtos Químicos	Concentração (mg L⁻¹)
KHCO ₃	500,0
KH ₂ PO ₄	27,20
CaCl ₂ .2H ₂ O	180,0
MgCl ₂	273,3
Na ₂ SO ₄	variável
NH ₄ Cl	variável
Solução de elemento traço I	1 ml L ⁻¹
Solução de elemento traço II	1 ml L ⁻¹

Fonte: adaptado de Van de Graff et al. (1996).

As soluções de elemento traço I e II utilizadas foram às mesmas descritas na secção 4.2.1. O preparo do meio também seguiu a mesma metodologia descrita no item anterior, em que a fonte de amônia somente é adicionada após completa solubilização dos outros compostos.

4.3 Operação e monitoramento dos reatores

4.3.1 Montagem e Operação dos Reatores no Experimento I

Foram montados quatro reatores em batelada em frascos de vidro borossilicato, tipo Duran, com volume total de 1,0 L e volume efetivo de 0,75 L. Um *headspace* de 0,25 L foi mantido para garantir espaço para os gases que poderiam se formar. As superfícies externas dos reatores foram cobertas com papel alumínio com a finalidade de proteger da luz solar e evitar o crescimento de algas.

Cada reator foi inoculado com um lodo anaeróbio diferente, conforme descrito na secção 4.1.1. Os reatores foram inoculados com concentração inicial de sólidos voláteis iguais a 12,8 g L⁻¹, 0,6 g L⁻¹, 1,7 g L⁻¹, 1,8 g L⁻¹, respectivamente para os inóculos I1, I2, I3 e I4.

Após alimentado, com intuito de garantir condições anaeróbias, os reatores com meio sintético e biomassa eram submetidos ao fluxo de N_2 durante 10 minutos. Em seguida, os frascos eram fechados com septo de butila e tampa de rosca e mantidos a (35 ± 2) °C de temperatura e agitação de 130 rpm com auxílio de um shaker (NT 712, Nova Técnica, Brasil).

O tempo de ciclo foi de 7 dias. No final do ciclo, cada reator era aberto e o sobrenadante centrifugado, utilizando-se uma centrífuga (SL – 700, SOLAB, Brasil) sob 3000 rpm de agitação durante 20 minutos. Após a centrifugação, amostras do sobrenadante foram coletadas e o restante descartado. A biomassa centrifugada era retornada ao reator e nova alimentação acontecia. O fluxo de N_2 nos reatores foi utilizado para eliminar o oxigênio do ar e do meio no interior destes todas às vezes que eram abertos.

As amostras coletadas do efluente foram filtradas em membranas de polipropileno de $0,45\mu\text{m}$ de diâmetro para análises físico-químicas.

4.3.1.1 Condições Operacionais no Experimento I

O Experimento I foi realizado em 6 fases sequenciais de acordo com a Tabela 4.4. Na primeira fase (I), o meio mineral foi preparado com baixa concentração de nitrito ($30\text{ mg N} - NO_2^- L^{-1}$) e sem ajuste do pH afluente. A concentração de amônia adicionada, em todas as fases, respeitou a relação NO_2^-/NH_4^+ de 1,32, conforme a estequiometria da reação ANAMMOX (STROUS et al., 1998). Após 95 dias de operação, o pH foi ajustado para 7,0 para evitar perdas na concentração de amônia por volatilização, caracterizando esta mudança como fase I-a.

Na fase II, após 109 dias de operação, a concentração de nitrito foi dobrada. Após 150 dias de operação, na fase (III), as quantidades de nitrito e amônia se mantiveram constante com relação à fase anterior (fase II), no entanto, 1 mL de hidroxilamina (com concentração final igual a $0,1\ \mu\text{M}$) foi injetado diariamente nos reatores com auxílio de uma seringa.

Durante os testes com hidroxilamina, optou-se por aumentar o tempo de ciclo para 25 dias (realizado apenas uma vez), na tentativa de que ocorresse completo consumo de nitrito ou amônia (fase III-a). Entretanto, após 25 dias de tempo de ciclo, decidiu-se por retornar o tempo de ciclo para 7 dias (fase III-b), sendo os reatores operados com as mesmas características de operação da fase III.

Na fase IV foram realizadas duas alterações. O aumento na concentração de nitrito para $72,5\text{ mg N} - NO_2^- L^{-1}$ foi conduzida e alteração na concentração de biomassa nos reatores, de

forma que todos permanecessem com a mesma concentração de sólidos voláteis no reator igual a 3 g L^{-1} . Na fase V e VI ocorreu incrementos de $12,5 \text{ mg N} - \text{NO}_2^- \text{ L}^{-1}$ na concentração do reator.

Tabela 4.4- Características das fases operadas no Experimento I.

Fase	N – NO₂⁻ (mg L⁻¹)	N – NH₄⁺ (mg L⁻¹)	pH	Tempo de Ciclo (d)	Hidroxilamina	Tempo de Operação (d)
I	30.0	22.73	7,8 - 8,2	7	Sem adição	95
I-a	30.0	22.73	7,0	7	Sem adição	14
II	60.0	45.45	7,0	7	Sem adição	42
III	60.0	45.45	7,0	7	Adição	28
III-a	60.0	45.45	7,0	25	Adição	25
III-b	60.0	45.45	7,0	7	Adição	13
IV	72,5	54,92	7,0	7	Adição	35
V	85,0	64,39	7,0	7	Adição	35
VI	97,5	73,86	7,0	7	Adição	35

Fonte: Da autora.

Para melhor visualização da estrutura do experimento, a Figura 4.1 ilustra uma visão geral de todas as etapas desenvolvidas no projeto.

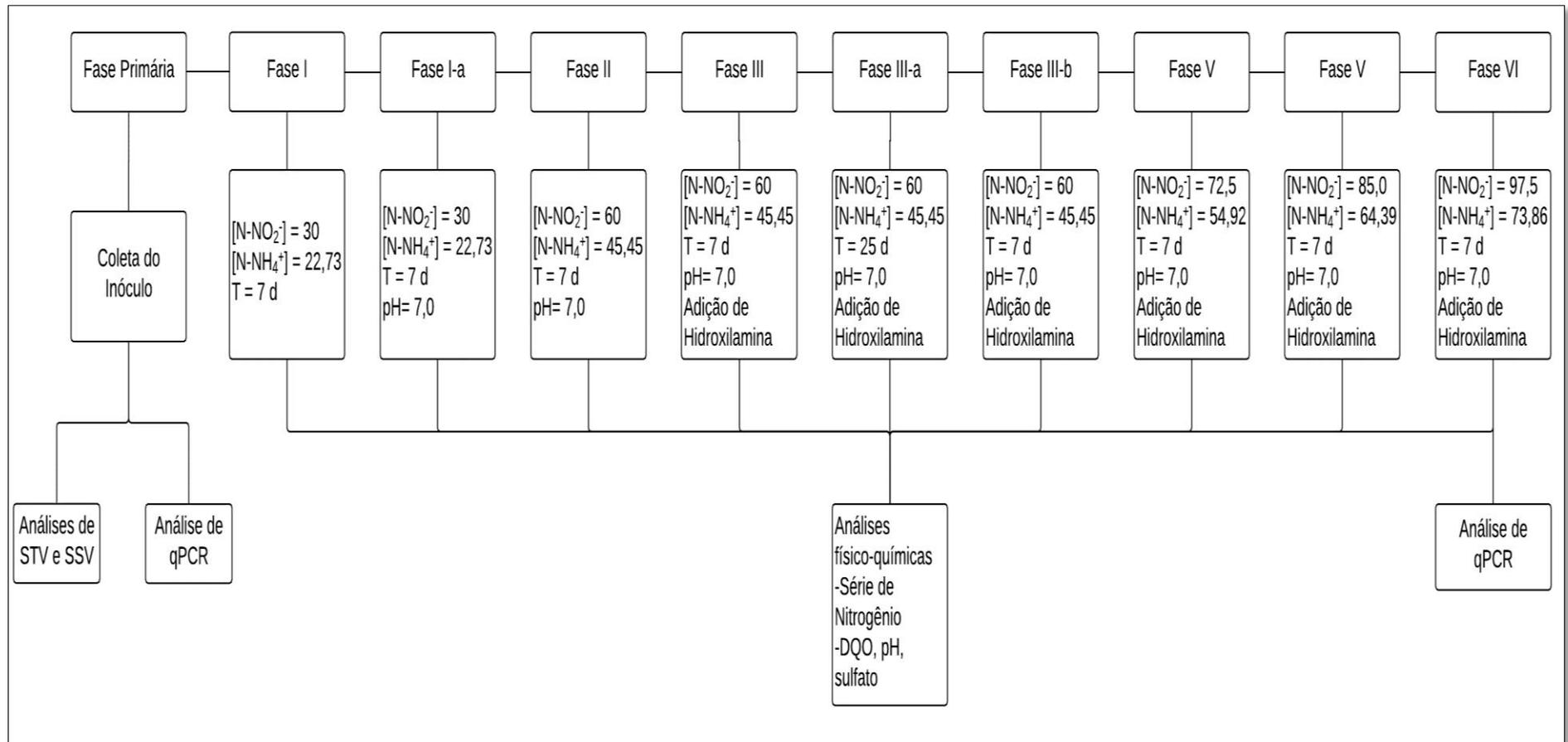


Figura 4.1- Fluxograma com as fases de operação e suas respectivas características. As concentrações de amônia e nitrito estão expressas em mg L⁻¹.

Fonte: Da autora.

4.3.2 Operação dos Reatores no Experimento II

Dois reatores operados em bateladas foram montados em frascos de vidro borossilicato, tipo Duran, com volume total de 0,5 L e volume efetivo de 0,35 L. As superfícies externas dos reatores foram cobertas com papel alumínio com objetivo de proteção da luz solar.

Ambos os reatores foram inoculados com o mesmo lodo conforme descrito na seção 4.1.2, e a concentração de sólidos voláteis inicialmente foi de 5 g L⁻¹. Os procedimentos para alimentação, centrifugação, seleção da amostra do efluente e, para garantir anaerobiose no meio (fluxo de nitrogênio) foram iguais ao Experimento I, como descrito na seção 4.3.1. Neste experimento, desde o início houve correção do pH do meio sintético para 7,0.

Três fases foram operadas nos reatores e, para comparação entre estes sistemas, a mesma quantidade de amônia foi inserida em ambos a cada fase operada. Para enriquecimento dos microrganismos ANAMMOX, a adição de nitrito respeitou a relação NO_2^-/NH_4^+ de 1,32. E para o enriquecimento de biomassa SRAO, a adição de sulfato respeitou a relação SO_4^{2-}/NH_4^+ de 0,5, de acordo com a estequiometria da reação de redução do sulfato com oxidação simultânea da amônia (FDZ-POLANCO et al., 2001). A primeira fase iniciou com baixas concentrações de amônia (22,7 mg N – NH_4^+ L⁻¹) e o tempo de ciclo foi de 2 dias. Na segunda e terceira fase houve incremento na concentração de amônia para 32,20 e 41,67 mg N – NH_4^+ L⁻¹, respectivamente. Nestas duas últimas fases o tempo de ciclo foi alterado para 7 dias. Na terceira fase de operação houve adição de hidroxilamina com concentração final de 0,1 µM no reator 1. Ressalta-se que não houve adição de hidroxilamina no reator 2, o qual objetivava prover enriquecimento de biomassa SRAO.

A Tabela 4.5 apresenta as concentrações em cada fase dos principais compostos de interesse, assim como o tempo de ciclo e o tempo de operação.

Tabela 4.5- Concentrações afluentes de amônia, nitrito e sulfato no reator 1 e 2.

Concentração (mg L ⁻¹)	Reator 1			Reator 2		
	Fase I	Fase II	Fase III	Fase I	Fase II	Fase III
$N - NH_4^+$	22,72	32,20	41,67	22,72	32,20	41,67
$N - NO_2^-$	30,00	42,5	55,0	-	-	-
SO_4^{2-}	117,0	117,0	117,0	77,90	110,4	142,9

Fonte: Da autora.

4.3.3 Monitoramento Analítico dos Reatores

Foram retiradas amostras (cerca de 150 mL) do efluente de cada reator para caracterização físico-química após o tempo de ciclo em cada fase. O monitoramento analítico foi realizado para determinação do pH, da concentração de nitrito, nitrato, amônia, sulfato e DQO.

O meio sintético, após preparação, também era monitorado de modo a confirmar as concentrações de amônia, nitrito, sulfato, DQO e determinação do pH.

Os métodos analíticos para determinação do pH, amônia, sulfato e DQO foram, respectivamente, o método potenciométrico (4500-H⁺ B), método titrimétrico (4500- NH₃ C), método turbidimétrico (4500- SO₄²⁻ E), e o método colorimétrico (5220 D) do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2012). Nitrito e nitrato foram analisados por método colorimétrico e foram mensurados com espectrofotômetro de acordo com a metodologia descrita por Cataldo et al. (1975) e Robledo (2014), respectivamente.

4.4 Análises microbiológicas

4.4.1 Extração do DNA genômico

Após a operação dos Experimentos I e II, com intuito de avaliar a presença e quantificação dos microrganismos ANAMMOX nos inóculos e nas biomassas enriquecidas nos sistemas biológicos, realizaram-se extrações de DNA dos organismos presentes em cada amostra de lodo. Além disso, realizou-se a extração de DNA de uma amostra padrão (AP) de um reator com alta abundância de microrganismos ANAMMOX.

Para realizar as extrações de DNA, as amostras foram homogeneizadas em agitador vórtex e, uma alíquota de 500 µL, incluindo efluente e biomassa, foi utilizada para a extração. O DNA genômico foi extraído utilizando-se o *kit* de extração *PowerSoil DNA Isolation Kit* (Mobio) de acordo com as instruções do fabricante.

4.4.2 Amplificação via PCR convencional

Para verificar a presença de microrganismos ANAMMOX foram feitas análises de PCR convencional com primers para trechos do RNAr 16S do grupo de microrganismos ANAMMOX com os *primers* AMX818F (5'-ATGGGCACTMRGTAGAGGGGTTT-3') e AMX1066F (5'-AACGTCTCACGACACGAGCTG-3') (WANG; Li, 2011) e dos *primers* para o gene HZO com os *primers* hzocl1F1 (5'-TGYYAAGACYTGYCAYTGG-3') e hzocl1R2 (5'-ACTCCAGATRTGCTGACC-3') (CONNAN et al., 2016) utilizando tampão de PCR (*Invitrogen*) 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 μM de dNTP Mix (*Invitrogen*), 20 μM de cada *primer*, 2,0 U de Taq DNA Polimerase (*Invitrogen*) e 5,0 μL (~50 ng) da amostra de DNA; em um volume final de 25 μL. A amplificação seguiu as seguintes condições: 1 ciclo inicial de 94 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto e uma extensão final de 72 °C por 10 minutos para os *primers* AMX818F e AMX1066F e 1 ciclo inicial de 95 °C por 5 minutos seguido de 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 51 °C por 1 minutos e 72 °C por 1 minuto e uma extensão final de 72 °C por 10 minutos para os *primers* hzocl1F1 e hzocl1R2.

Foram amplificadas todas as amostras dos inóculos e da biomassa enriquecida, assim como o controle positivo, utilizando a amostra padrão (AP) e os controles negativos.

4.4.3 Construção da curva do qPCR

Para obtenção da curva padrão, o DNA extraído da amostra padrão (AP) foi amplificado com os *primers* hzocl1 F1 e hzocl1 R2 do gene que codifica a enzima HZO (gene HZO) de acordo com as condições descritas acima. Após a clonagem, com kit *pGEM®-T Easy Vector System* (Promega), os plasmídeos foram extraídos com kit miniprep: *Hiyield Plasmid Mini Kit* (RBC), linearizados com a enzima *ecoRI fast digest* (*Thermo scientific*), purificados utilizando a coluna do kit *PowerSoil DNA Isolation Kit* (Mobio) e quantificados utilizando-se o quantificador *Qubit® 3.0 Fluorometer* (*Life Technologies*). Em cada reação de qPCR os plasmídeos foram adicionados nas quantidades de 10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴ e 10³ cópias para a quantificação absoluta.

4.4.4 Análises de PCR quantitativa (qPCR)

Para determinar o número de cópias do gene que codifica HZOCL presente em cada amostra, foi realizada a amplificação via PCR em tempo real.

Os *primers* utilizados foram hzocl1 F1 e hzocl1 R2 e a reação de PCR foi realizada com volume total de 20 μL contendo: 10 μL de *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems, USA*), 0,4 μM de cada *primer* (a 5 μM) e de 5 μL a 1/50 μL do DNA extraído da amostra. A reação de PCR foi realizada no equipamento *Step One Plus TM* (*Applied Biosystems, USA*), de acordo com as seguintes condições: 1 ciclo inicial de 95°C por 10 minutos seguido de 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 51°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto.

Após a amplificação foi realizada a curva de *melting* para verificação de possíveis dímeros de *primer* ou contaminações. A coleta de dados foi realizada durante o passo de extensão (72°C) (CONNAN et al., 2016).

Para a quantificação das amostras foi utilizada a curva padrão construída conforme descrito na secção 4.4.2.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos itens a seguir utilizam-se códigos de letras e números para referir aos sistemas biológicos conforme a origem dos inóculos inseridos no reator (Experimento I) e conforme o tipo de enriquecimento (Experimento II) com intuito de facilitar a melhor visualização dos resultados. Estas siglas estão ilustradas na Tabela 5.1.

Tabela 5.1- Inóculos utilizados em cada experimento com respectiva sigla.

Experimento	Inóculo utilizado	Local de coleta do inóculo	Sigla Utilizada
Experimento I	- Lodo termofílico aplicado no tratamento de vinhaça	Pradópolis/SP	I1
	- Lodo de reator UASB tratando efluente de abatedouro de aves	Pereiras/SP	I2
	- Lodo de reator UASB tratando efluente de abatedouro de aves	Tietê/SP	I3
	- Lodo de reator UASB utilizado na biorremediação de drenagem ácida de minas	Poços de Caldas/MG	I4
Experimento II	- Lodo de uma planta de lodos ativados tratando efluente municipal Enriquecimento ANAMMOX	Campinas/SP	R1
	- Lodo de uma planta de lodos ativados tratando efluente municipal Enriquecimento SRAO	Campinas/SP	R2

Fonte: Da autora.

5.1 Experimento I

5.1.1 Variação dos compostos nitrogenados (NH_4^+ , NO_2^- e NO_3^-)

Foi realizada variação dos compostos nitrogenados nos reatores biológicos utilizados neste experimento, com intuito de avaliar a redução nas concentrações de amônia e nitrito e o aumento na concentração de nitrato.

A Figura 5.1 ilustra a variação das concentrações afluentes e efluentes de nitrogênio na forma de nitrito ($N - NO_2^-$) para os sistemas biológicos estudados. As linhas tracejadas delimitam respectivamente as fases I, I-a, II, III, III-a, III-b, IV, V e VI.

De acordo com a Figura 5.1, na fase inicial (fase I) de operação ($30 \text{ mg } N - NO_2^- \text{ L}^{-1}$) os reatores I1, I2 e I4 apresentaram alto consumo de nitrito. Conforme expresso na Tabela 5.1 as concentrações médias efluentes obtidas na fase I foram $(1,66 \pm 2,81)$, $(26,65 \pm 5,99)$, $(8,85 \pm 6,69)$ e $(0,089 \pm 0,21) \text{ mg } N - NO_2^- \text{ L}^{-1}$, respectivamente, para os reatores I1, I2, I3 e I4.

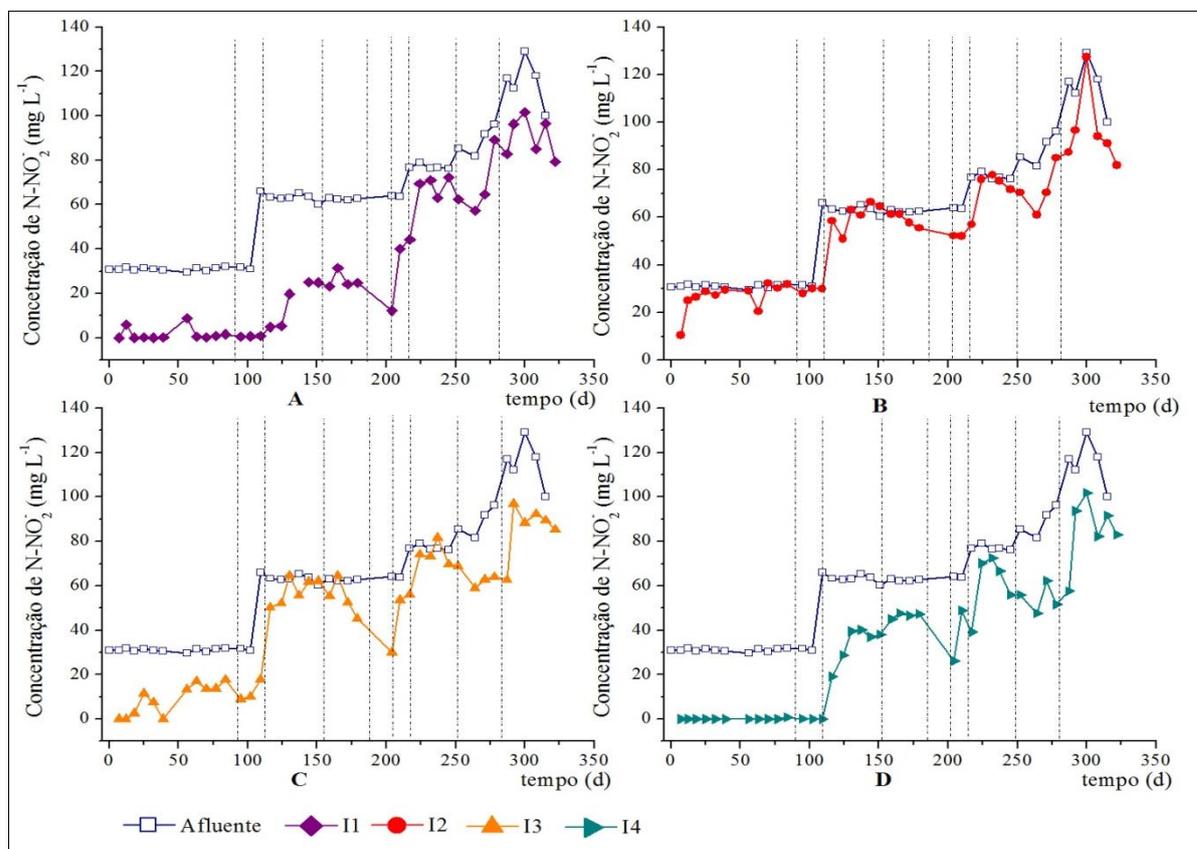


Figura 5.1- Variação das concentrações de nitrito afluente e efluente nos sistemas biológicos. A) I1- lodo termofílico aplicado no tratamento de vinhaça de cana-de-açúcar; B) I2- lodo de reator UASB tratando efluente de abatedouro de aves, Pereiras/SP; C) I3 - lodo de reator UASB tratando efluente de abatedouro de aves, Tietê/SP; D) I4 - lodo de reator UASB utilizado biorremediação de drenagem ácida de minas.

Fonte: Da autora.

Tabela 5.2- Concentrações média de nitrito ($\text{mg N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$) no afluente e efluentes dos sistemas biológicos.

Fases	Afluente	I1	I2	I3	I4
I	31,06 ± 0,72	1,66 ± 2,81	26,65 ± 5,99	8,85 ± 6,69	0,089 ± 0,21
I-a	31,37 ± 0,53	0,84 ± 0,20	30,07 ± 0,05	14,05 ± 5,51	0,014 ± 0,001
II	64,08 ± 1,34	13,35 ± 11,23	60,80 ± 5,58	57,82 ± 5,89	33,74 ± 8,23
III	62,01 ± 1,21	25,94 ± 3,83	58,98 ± 2,82	54,44 ± 7,96	46,58 ± 1,18
III-a	62,68	12,26	52,36	29,99	26,11
III-b	63,79 ± 0,23	42,16 ± 2,97	54,57 ± 3,42	54,75 ± 1,72	44,00 ± 6,94
IV	77,11 ± 1,12	67,58 ± 4,62	74,24 ± 3,13	73,48 ± 5,03	64,16 ± 7,85
V	88,76 ± 6,49	73,50 ± 14,95	75,99 ± 12,46	62,10 ± 2,18	54,76 ± 6,45
VI	117,69 ± 6,91	91,76 ± 9,22	98,20 ± 17,28	90,50 ± 4,35	90,45 ± 8,15

Fonte: Da autora.

Já o reator I2, apresentou alto consumo de nitrito somente nas três primeiras análises, em seguida estabilizou as concentrações efluentes muito próximas do valor afluente.

Analisando simultaneamente a remoção de nitrito (Figura 5.1) e a remoção de amônia (Figura 5.2) podemos inferir que, na fase I, houve intenso consumo de nitrito e não ocorreu redução de amônia e, alguns pontos apresentaram superiores aos valores afluentes. Os valores médios obtidos para concentração afluente e efluente de nitrogênio na forma do íon amônio ($\text{N} - \text{NH}_4^+$) em cada fase operada estão expressos na Tabela 5.3.

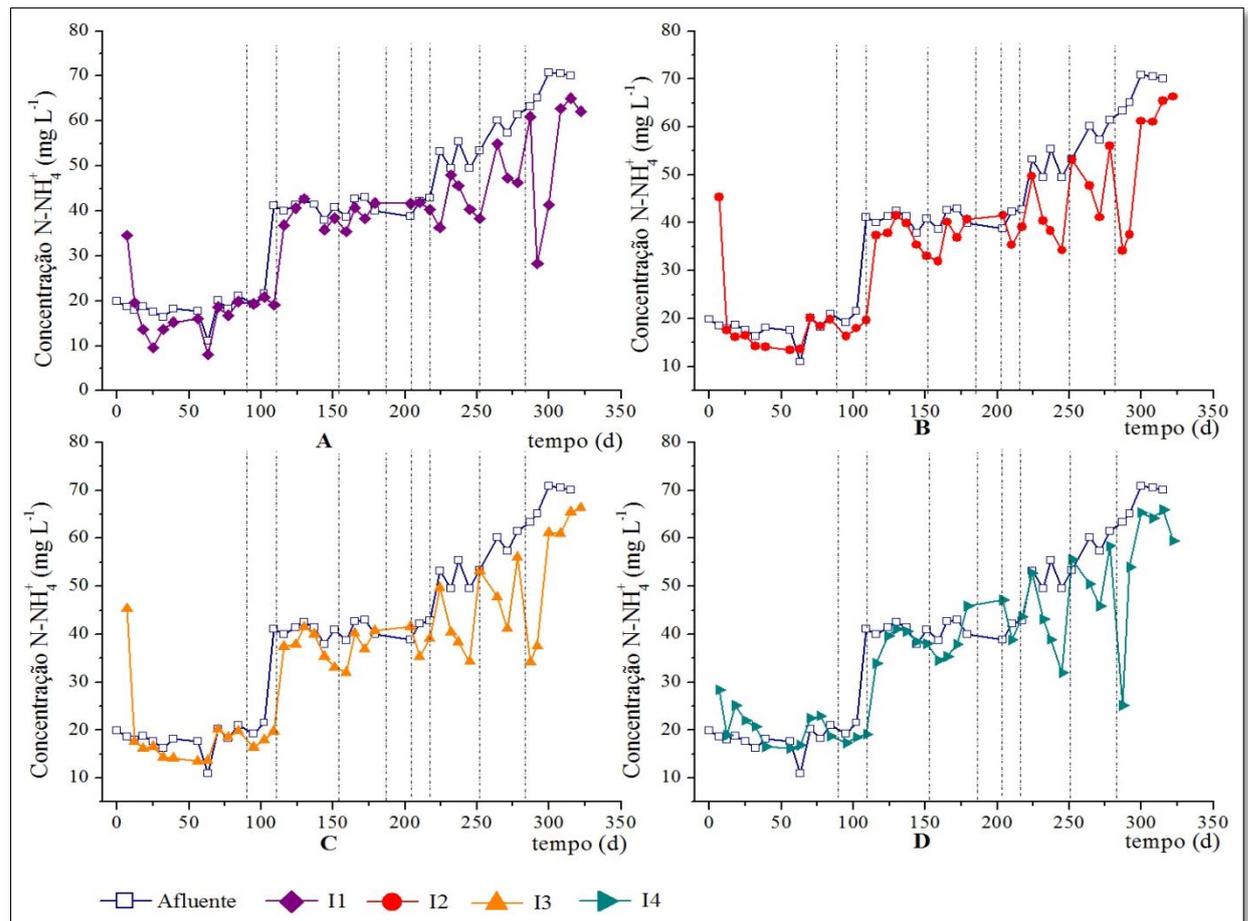


Figura 5.2- Variação das concentrações de amônia afluente e efluente nos sistemas biológicos. A) I1- lodo termofílico aplicado no tratamento de vinhaça de cana-de-açúcar; B) I2- lodo de reator UASB tratando efluente de abatedouro de aves, Pereiras/SP; C) I3 - lodo de reator UASB tratando efluente de abatedouro de aves, Tietê/SP; D) I4 - lodo de reator UASB utilizado biorremediação de drenagem ácida de minas.

Fonte: Da autora.

Tabela 5.3- Concentrações médias de amônia ($\text{mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$) no afluente e efluentes dos sistemas biológicos.

Fases	Afluente	I1	I2	I3	I4
I	$17,94 \pm 2,53$	$17,05 \pm 6,69$	$18,70 \pm 8,39$	$18,85 \pm 8,65$	$20,52 \pm 3,82$
I-a	$20,41 \pm 1,62$	$19,99 \pm 1,25$	$17,83 \pm 0,55$	$18,87 \pm 1,21$	$18,82 \pm 0,48$
II	$40,74 \pm 1,59$	$32,40 \pm 16,07$	$37,13 \pm 2,58$	$37,53 \pm 3,04$	$38,58 \pm 2,59$
III	$41,33 \pm 1,99$	$39,03 \pm 2,82$	$37,47 \pm 3,39$	$37,46 \pm 4,04$	$38,41 \pm 5,18$
III-a	39,97	41,63	41,42	41,58	47,10
III-b	$40,56 \pm 2,42$	$41,02 \pm 1,10$	$40,64 \pm 1,40$	$37,27 \pm 2,61$	$41,26 \pm 3,49$
IV	$50,11 \pm 4,77$	$41,71 \pm 4,95$	$43,92 \pm 8,02$	$43,20 \pm 7,96$	$44,42 \pm 9,74$
V	$58,06 \pm 3,56$	$52,36 \pm 6,90$	$45,18 \pm 9,13$	$44,77 \pm 9,32$	$44,97 \pm 14,18$
VI	$67,99 \pm 3,48$	$51,93 \pm 16,32$	$58,77 \pm 11,98$	$58,32 \pm 11,88$	$61,79 \pm 5,03$

Fonte: Da autora.

Na primeira fase, observou-se, principalmente, o aumento da concentração de amônia efluente, a qual pode estar associada à morte e lise celular de bactérias não adaptadas a compostos nitrogenados provocando a liberação de amônia e matéria orgânica no meio. A matéria orgânica proveniente deste processo de lise celular pode ter sido eliminada do meio via desnitrificação heterotrófica, mecanismo no qual o nitrito pode ter sido utilizado como aceptor final de elétrons, justificando, desta forma, o intenso consumo deste na fase inicial de operação.

Na fase I-a, a alteração do pH afluente para 7,0 com intuito de minimizar perdas na concentração afluente de amônia, não provocou alterações nas concentrações de amônia e nitrito efluentes.

O aumento das concentrações afluente de nitrito e amônia na fase II pode ter favorecido a redução da atividade de desnitrificação heterotrófica, uma vez que houve aumento da concentração de nitrito efluente. Somente o reator II continuou apresentando alta remoção de nitrito (aproximadamente 60% $N - NO_2^-$) provavelmente devido à alta concentração de sólidos voláteis presentes no reator ($12,8 \text{ g L}^{-1}$), sendo que a morte do consórcio microbiano pode ter atuado como doador de elétrons para redução do nitrito.

Araújo et al. (2010) e Connan et al. (2016) estudando o enriquecimento de microrganismos ANAMMOX em reatores operados em batelada sequencial e alimentada, respectivamente, descreveram comportamento semelhante ao descrito neste estudo, ou seja, uma fase de intenso consumo de nitrito devido a desnitrificação heterotrófica, em que a própria biomassa foi utilizada como doador de elétrons, seguida de uma fase com maior dificuldade na remoção do nitrito e apresentou consumo de amônia, comportamento este favorecido devido ao aumento das concentrações de amônia e nitrito afluentes diminuindo a atuação de microrganismos desnitrificantes.

Na tentativa de favorecer o processo ANAMMOX, realizou-se adição de hidroxilamina (fase III). Entretanto, esta alteração não apresentou efeito significativo nos sistemas biológicos estudados. Ainda operando nas condições da Fase III, porém com aumento do tempo de ciclo para 25 dias (fase III-a), verificou-se um distúrbio em todos os reatores, pois a concentração de amônia efluente obtida foi mais alta que a concentração afluente, apresentando valores iguais a 39,97; 41,63; 41,42; 41,58; 47,10 $\text{mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$, respectivamente, para o afluente, reator I1, I2, I3 e I4 (Tabela 5.3). Além disso, houve maior remoção de nitrito comparado à fase anterior (Tabela 5.2). Ambos os fatores observados descritos anteriormente, indicam que houve morte celular, com liberação de amônia e matéria orgânica no meio, favorecendo a atuação de bactérias desnitrificantes heterotróficas.

Este comportamento na fase III-a pode ter sido provocado devido a alguns fatores os quais foram formuladas hipóteses. Na primeira hipótese, o alto consumo de nitrito verificado está associado à morte celular provocada pelo acúmulo de substâncias tóxicas, como a hidrazina (N_2H_4) nos reatores.

A hidrazina é um intermediário da reação ANAMMOX que pode ser utilizado como fonte de energia para bactéria, mas é potencialmente tóxica (KUENEN, 2008). Em culturas com hidroxilamina, como este experimento, hidrazina pode ser obtida como descrito pela Equação (16).



Mas essa hipótese é pouco provável de ter ocorrido devido à baixa concentração injetada de hidroxilamina (concentração final de 0,1 μM no reator) e trabalhos na literatura, relatam que reatores inibidos devido à alta concentração de nitrito durante vários dias reestabeleceram o mecanismo com adição dos intermediários da reação ANAMMOX, sendo adicionado 1,4 mg N L⁻¹ de hidrazina e 0,7 mg N L⁻¹ de hidroxilamina.

A segunda hipótese seria em relação ao longo tempo de exposição do consórcio microbiano ao nitrito, o qual pode ser tóxico, dependendo da concentração a microrganismos ANAMMOX. Fux et al. (2002) encontraram que a exposição a longo prazo a uma concentração de 40 mg N- NO_2^- L⁻¹ durante vários dias provocou inativação irreversível de microrganismos ANAMMOX.

Devido à resposta negativa dos reatores ao alto tempo de ciclo, a operação foi retomada com o tempo de ciclo igual a 7 dias, iniciando a fase III-b. Esta fase, teve as mesmas características operacionais da fase III.

Na fase III-b, notou-se aumento da concentração efluente de nitrito (Figura 5.1), evidenciando, desta forma, a redução da atuação de bactérias desnitrificantes heterotróficas e pequena remoção de amônia no reator I3, cerca de 8% N - NH_4^+ (Tabela 5.3), indicando uma provável atividade ANAMMOX.

As concentrações de nitrito efluente nos reatores apresentaram valores próximos aos valores da concentração afluente na fase IV, Figura 5.1. Nesta fase, também ocorreu baixo consumo de amônia, apresentando concentração média de amônia efluente igual a ($41,71 \pm 4,95$), ($43,92 \pm 8,02$), ($43,20 \pm 7,96$), ($44,42 \pm 9,74$) mg N- NH_4^+ L⁻¹, respectivamente para os reatores I1, I2, I3 e I4, quando aplicado a carga média de ($50,11 \pm 4,77$) mg N- NH_4^+ L⁻¹. Nesta

fase, observou grande instabilidade no consumo de amônia, apresentando pontos de remoção de até 40% $\text{mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ (reator I2) e pontos que não apresentou nenhuma remoção (Figura 5.3).

Na fase V, aumentando a concentração afluyente para $85 \text{ mg N} - \text{NO}_2^- \text{ L}^{-1}$, houve maior consumo de nitrito comparado a fase anterior e a inconstância no consumo de amônia continuou sendo observada (Figura 5.2). O aumento da concentração de nitrito, provavelmente, provocou instabilidade nos sistemas biológicos e favoreceu microrganismos desnitrificantes.

Na última fase de operação, elevando a concentração de nitrito para $97,5 \text{ mg N} - \text{NO}_2^- \text{ L}^{-1}$, a concentração de nitrito efluente diminuiu e os valores de concentração efluente para amônia apresentou instabilidade, com pontos que apresentaram eficiência na remoção de amônia e outros não apresentaram. No início desta fase, com aproximadamente 280 dias de operação, os reatores apresentaram um ponto em que houve baixa concentração efluente de amônia, os quais provavelmente estão associados a erro analítico durante a análise de amônia pois houve repetição em todos os reatores.

As concentrações médias efluentes de amônia obtidas na fase VI foram $(51,93 \pm 16,32)$, $(58,77 \pm 11,98)$, $(58,32 \pm 11,88)$ e $(61,79 \pm 5,03) \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$, respectivamente para os reatores I1, I2, I3 e I4, quando aplicado a concentração média de $(67,99 \pm 3,48) \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$. Analisando a relação $\text{N-NO}_2^- / \text{N-NH}_4^+$ observou-se valores entre 0,6 a 5,5 para o reator I1, entre 0,7 a 6,3 para o reator I2, entre 5,35 e 40,78 para o reator I3 e entre -0,33 e 15,14 para o reator I4. Não foi mensurada uma razão entre nitrito e amônia constante nos reatores ou próxima ao valor inicialmente proposto de 1,32. A alta razão encontrada indica a atividade de microrganismos desnitrificantes durante todo o processo.

A Figura 5.3 e a Figura 5.4 elucidam a variação na eficiência de remoção de $\text{N} - \text{NO}_2^-$ e N-NH_4^+ de acordo com a concentração aplicada nos sistemas biológicos estudados durante o período de operação. Não foram mensuradas quantidades significativas de nitrato nos sistemas biológicos.

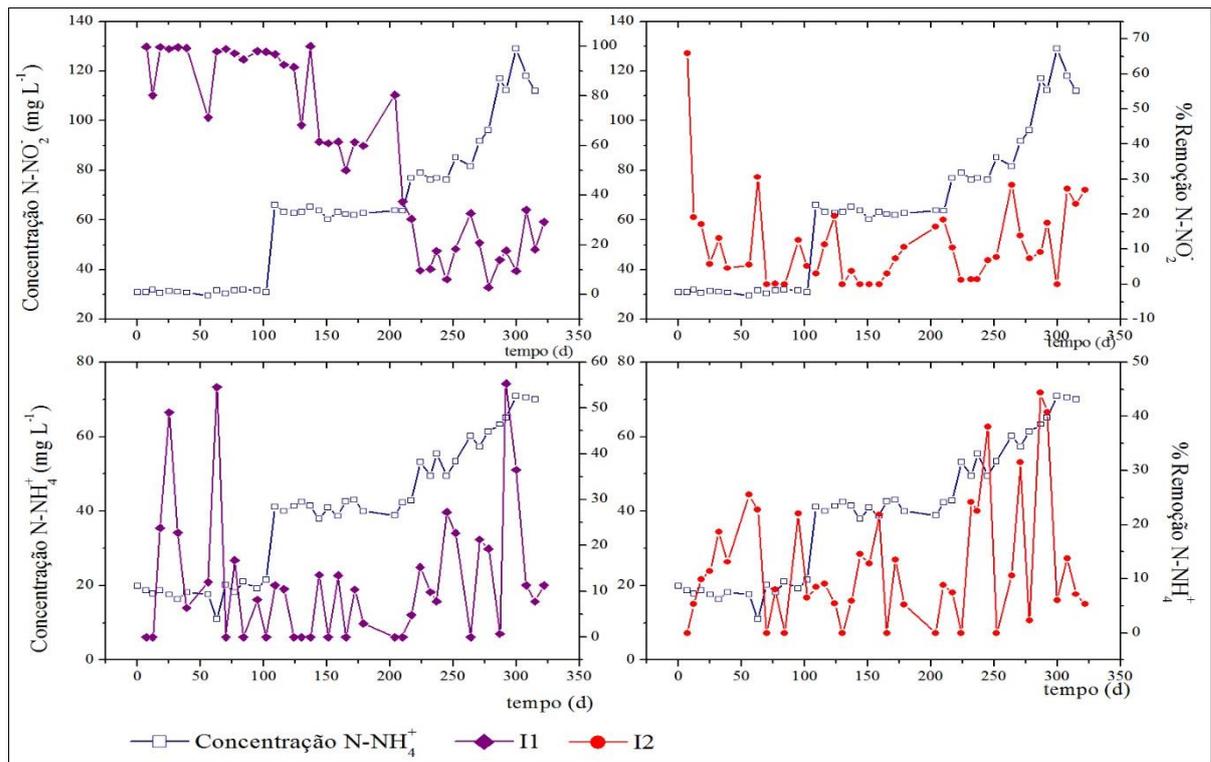


Figura 5.3- Variação da porcentagem de remoção de compostos nitrogenados nos reatores I1 e I2. I1- lodo termofílico aplicado no tratamento de vinhaça de cana-de-açúcar; I2- lodo de reator UASB tratando efluente de abatedouro de aves, Pereiras/SP.

Fonte: Da autora.

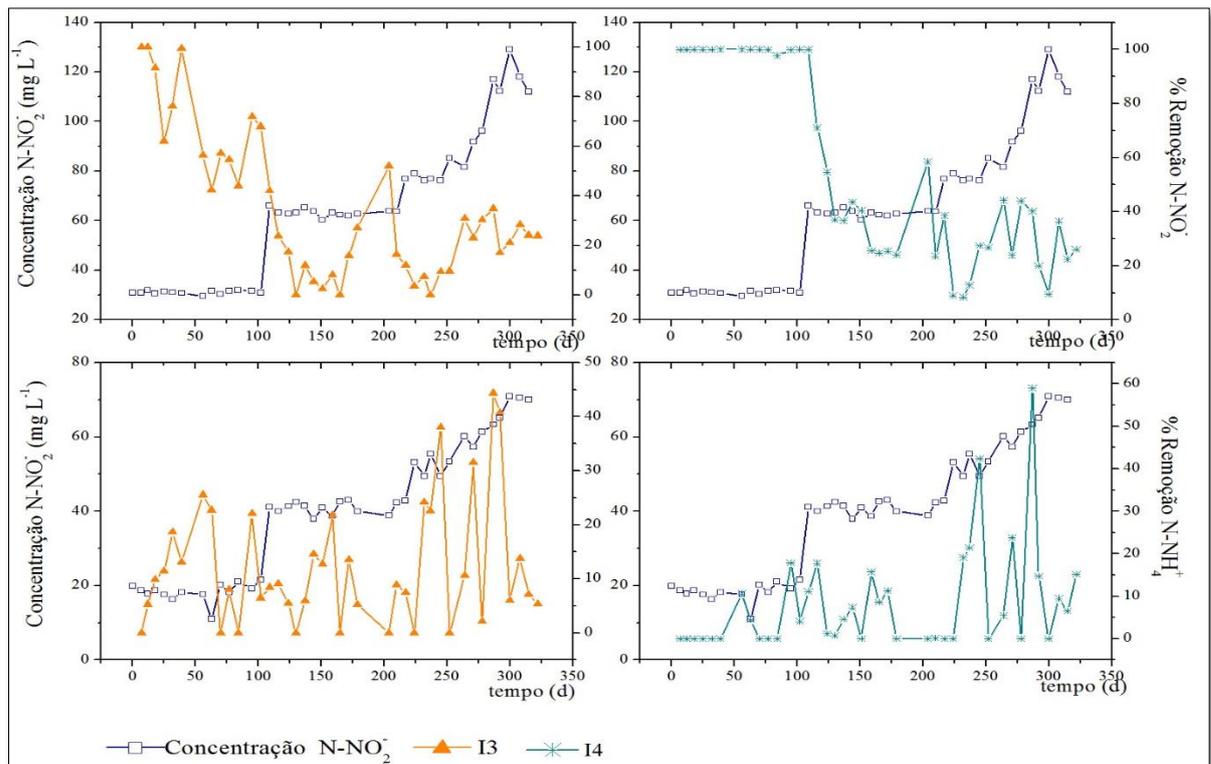


Figura 5.4- Variação da porcentagem de remoção de compostos nitrogenados nos reatores I3 e I4. I3 - lodo de reator UASB tratando efluente de abatedouro de aves, Tietê/SP; I4 - lodo de reator UASB utilizado biorremediação de drenagem ácida de minas.

Fonte: Da autora.

Estudos na literatura mostram que o inóculo utilizado e o tipo de reator operado possuem alta influência no tempo para obter biomassa com alta atividade ANAMMOX. Van de Graff et al. (1996), enriquecendo bactérias ANAMMOX utilizando meio autotrófico e reator de leito fluidizado obteve alta atividade destes microrganismos após 7 meses de operação. Chamcoi (2007) avaliando diferentes inóculos aeróbio e anaeróbios operados em reator em bateladas sequencial (RBS) obteve sucesso após 4 meses de operação. Araújo et al. (2010), também realizando o enriquecimento em reator RBS detectou alta atividade ANAMMOX com 3 meses de operação. Já, Wang et al. (2010) relataram que utilizando 3 diferentes inóculos para enriquecimento ANAMMOX em reator RBS obtiveram sucesso somente com um inóculo, o qual proveio um biorreator de membranas tratando água residuária sintética com baixa relação C/N. Sánchez-Melsió et al. (2009) utilizando reatores bateladas para o processo de enriquecimento, detectou a presença de "*Brocadia anammoxidans*" em cinco dos 12 diferentes inóculos estudados, enquanto que nos demais reatores o autor cita ter observado somente atividade de desnitrificação (quando houve consumo de nitrito e não houve consumo de amônia) e redução de sulfato (quando houve consumo de amônia e não houve consumo de nitrito) em até um ano de monitoramento.

Durante 11 meses de operação, os reatores neste experimento não apresentaram potencial para a atividade ANAMMOX, uma vez que os valores de conversão de amônia e nitrito observados nos sistemas foram bastante oscilatórios e não foi encontrada uma razão estável entre consumo de nitrito e amônia ($\text{NO}_2^- / \text{NH}_4^+$).

Ao final da operação, a biomassa presente nos reatores I2 e I3 apresentaram coloração marrom avermelhado, característica que antes não era do inóculo o qual apresentava coloração marrom escuro. E conforme descrito por Okamoto et al. (2013) biomassa com alta abundância de microrganismos capazes de realizar a oxidação anaeróbia da amônia possui coloração avermelhada.

5.1.2 Variação do pH

O acompanhamento da variação do pH em sistemas biológicos ajuda a promover o conhecimento sobre os processos metabólicos que podem estar ocorrendo.

O processo ANAMMOX se caracteriza pelo consumo de íons H^+ provocando o aumento da alcalinidade no meio. Outro processo biológico de remoção de nitrogênio que ocorre geração de alcalinidade é a desnitrificação heterotrófica (SUN et al., 2011; LI et al., 2012).

Já os processos de nitrificação e nitratação há geração de acidez no meio devido à geração de íons H^+ (SCHMIDEL et al., 2007, AHN, 2006).

Para o processo ANAMMOX a faixa de pH ótima varia de acordo com o tipo de microrganismo envolvido, sendo possível o crescimento na faixa de pH entre 6,7 a 8,3 com pH ótimo em 8,0 (STROUS et al., 1999).

A Figura 5.5 ilustra as variações dos dados obtidos para o pH durante o tempo de operação para os reatores I1, I2, I3 e I4. As linhas tracejadas delimitam respectivamente as fases I, Ia, II, III, IIIa, IIIb, IV, V e VI.

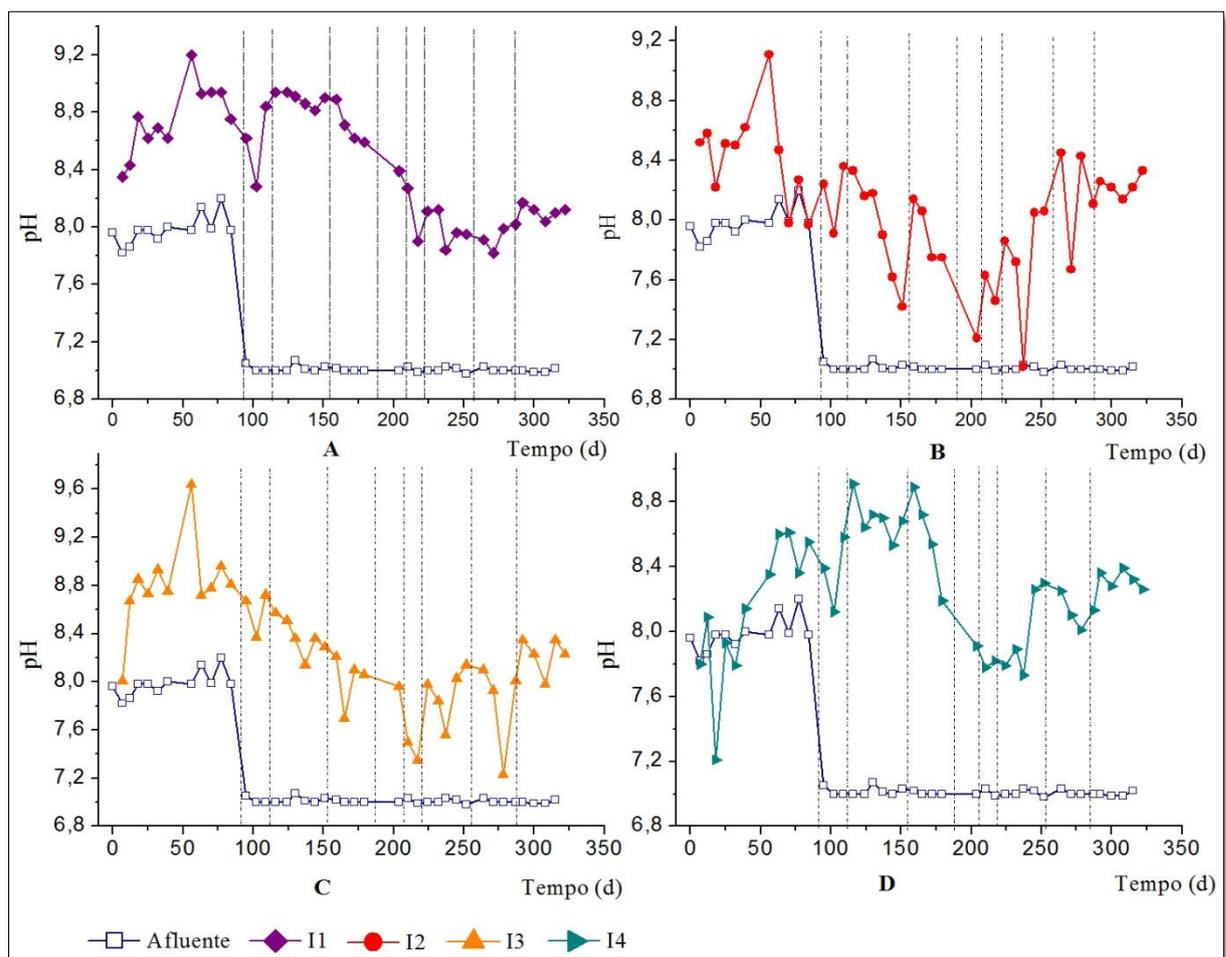


Figura 5.5 - Variação do pH afluente e efluente nos sistemas biológicos. A) I1- lodo termofílico aplicado no tratamento de vinhaça de cana-de-açúcar; B) I2- lodo de reator UASB tratando efluente de abatedouro de aves, Pereiras/SP; C) I3 - lodo de reator UASB tratando efluente de abatedouro de aves, Tietê/SP; D) I4 - lodo de reator UASB utilizado biorremediação de drenagem ácida de minas.

Fonte: Da autora.

Na maior parte dos reatores (I1, I2 e I3), nos primeiros cem dias de operação houve aumento relevante do pH efluente. Esse resultado indica a atuação de microrganismos

desnitrificantes heterotróficos, os quais utilizaram a matéria orgânica proveniente do lodo e/ou da lise celular para redução do nitrito gerando alcalinidade nos sistemas.

Já o reator I4, com lodo proveniente de UASB tratando drenagem ácida de mina e contendo alta abundância de bactérias redutoras de sulfato, nos primeiros 50 dias de operação o pH se manteve próximo ao afluente ou houve redução deste. Em seguida, até 150 dias de operação houve aumento significativo do pH neste reator indicando a atuação de microrganismos geradores de alcalinidade, como os sulfetogênicos ou desnitrificantes heterotróficos.

Os reatores I2 e I3 apresentaram uma pequena instabilidade no pH durante a maioria da operação, no entanto, na última fase de operação percebe-se uma menor oscilação nos valores de pH obtidos para estes reatores, assim como, para o reator I1 e I4.

5.1.3 Avaliação do íon SO_4^{2-} e DQO

A cada troca do meio sintético era inserido nos reatores 117 mg L^{-1} de sulfato. No início de operação dos reatores não foi realizada análise para determinação deste composto, o qual começou a ser determinado com aproximadamente 50 dias de operação.

A Figura 5.6 ilustra a variação dos dados obtidos para sulfato nos reatores estudados. Nesta figura, as linhas tracejadas delimitam respectivamente as fases I, I a, II, III, III-a, III-b, IV, V e VI.

Durante a operação ocorreu um comportamento anômalo relacionado ao sulfato durante as fases de operação. Conforme ilustra a Figura 5.6 o sulfato efluente apresentou maior concentração que a entrada, chegando a alcançar valores como $243,58 \text{ mg L}^{-1}$ no reator I2 e $274,93 \text{ mg L}^{-1}$ no reator I4. Ou seja, valores maiores que o dobro da concentração inserida.

Oliveira (2015) em seu estudo sobre enriquecimento ANAMMOX a partir diferentes inóculos em reator operados em bateladas sequenciais, também encontrou este comportamento relacionado ao sulfato, chegando a obter no efluente uma concentração de sulfato dez vezes maior que a concentração afluente.

Esta autora cita que a produção de sulfato pode ter influências positivas em sistemas ANAMMOX, uma vez que esta produção sugere oxidação de sulfetos que são compostos inibitórios ao processo ANAMMOX e também porque pode consumir o oxigênio presente nos reatores, minimizando as chances de bactérias aeróbias nitrificantes utilizarem o oxigênio para oxidação da amônia e nitrito (OLIVEIRA, 2015).

Uma hipótese do que pode ter ocasionado este aumento na concentração efluente de sulfato nos reatores em estudo é devido a lise celular liberar enxofre no meio reacional e por meio da via sulfetogênica este ser convertido em sulfeto, em seguida, o sulfeto pode ter sido oxidado via desnitrificação autotrófica a sulfato.

As variações obtidas para as concentrações de DQO afluente e efluente para este experimento estão apresentadas na Figura 5.7.

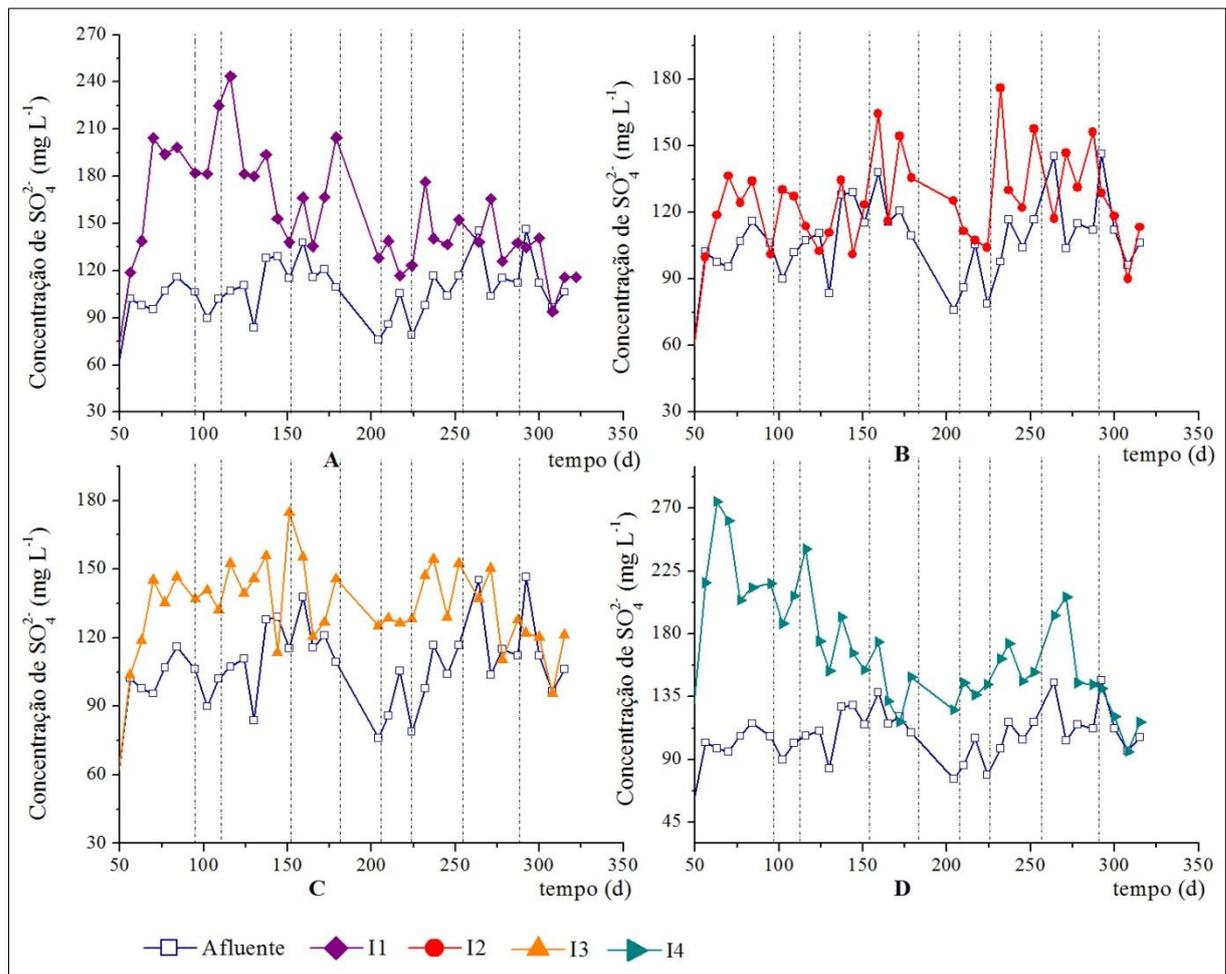


Figura 5.6 - Concentração do íon sulfato nos sistemas biológicos. A) I1- lodo termofílico aplicado no tratamento de vinhaça de cana-de-açúcar; B) I2- lodo de reator UASB tratando efluente de abatedouro de aves, Pereiras/SP; C) I3 - lodo de reator UASB tratando efluente de abatedouro de aves, Tietê/SP; D) I4 - lodo de reator UASB utilizado biorremediação de drenagem ácida de minas.

Fonte: Da autora.

Conforme ilustrado na Figura 5.7, no início de operação (fase I) foi quantificada alta concentração de DQO para todos os sistemas estudados. Este fator se deve a morte de microrganismos que não se adaptaram às condições submetidas, liberando matéria orgânica no meio. Após esta fase, as concentrações de DQO afluente e efluente se mantiveram próximas até

o 175º dia de operação, em que se verificou alta concentração deste parâmetro nos sistemas biológicos. Este comportamento, provavelmente, está associado à injeção de hidroxilamina nos reatores, provocando a morte de microrganismos que não são adaptados a este composto. Outra possibilidade é que neste ponto tenha ocorrido algum erro analítico, pois houve repetição próximas em todos os reatores. Após este ponto observado, as concentrações afluentes e efluentes de DQO permaneceram em valores próximos até o final da operação.

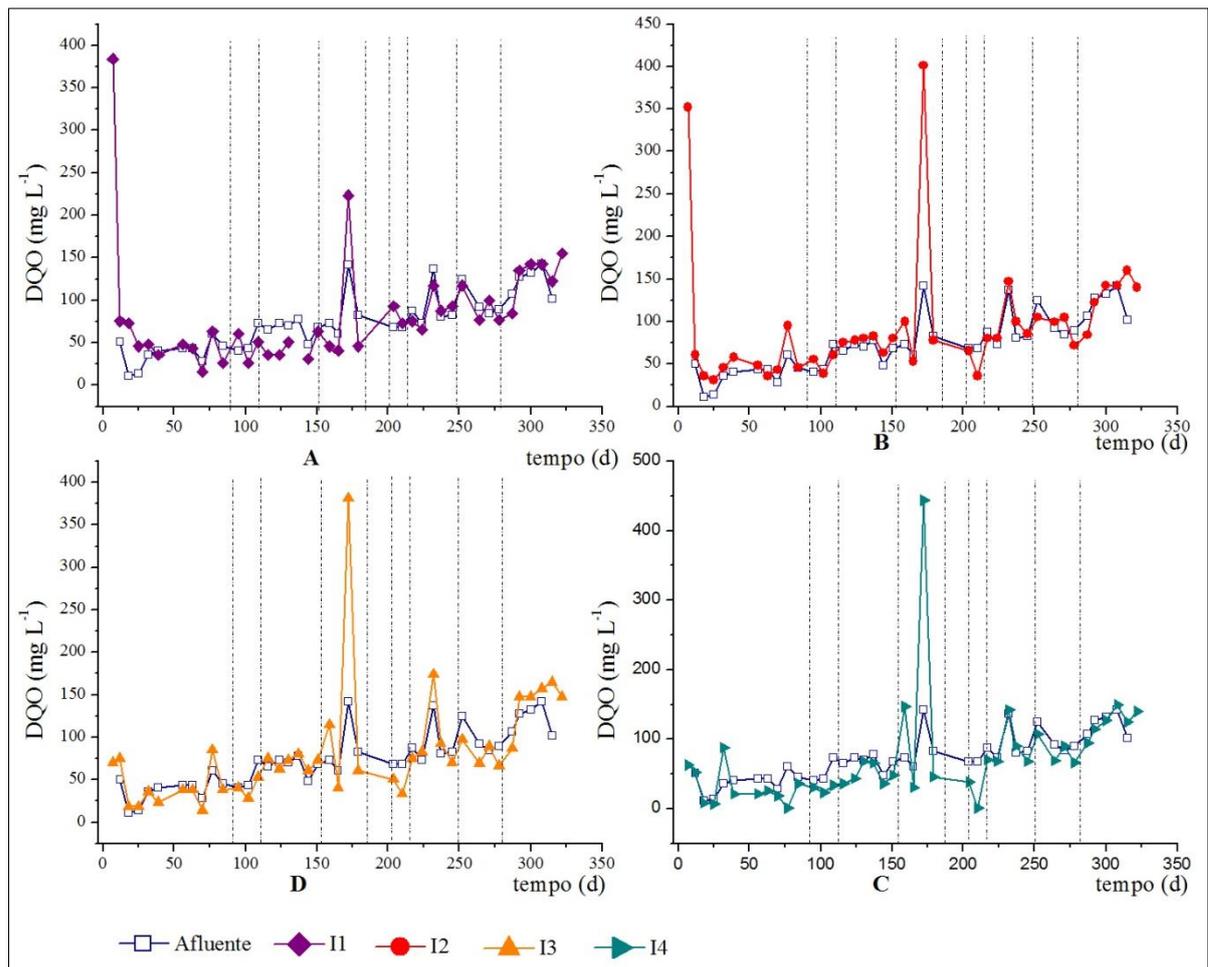


Figura 5.7 - Concentração de DQO nos sistemas biológicos. A) I1- lodo termofílico aplicado no tratamento de vinhaça de cana-de-açúcar; B) I2- lodo de reator UASB tratando efluente de abatedouro de aves, Pereiras/SP; C) I3 - lodo de reator UASB tratando efluente de abatedouro de aves, Tietê/SP; D) I4 - lodo de reator UASB utilizado biorremediação de drenagem ácida de minas.

Fonte: Da autora.

5.2 Experimento II

5.2.1 Variação dos íons NO_2^- , NH_4^+ e SO_4^{2-}

O reator R1 foi operado em condições para obter enriquecimento ANAMMOX, enquanto que o R2 o objetivo foi favorecer condições para enriquecer microrganismos capazes de realizar a redução de sulfato com oxidação simultânea da amônia, pelo processo *SRAO*.

Os principais compostos de interesse no reator 1 são o nitrito, o qual é utilizado como receptor de elétrons e a amônia, sendo utilizada como doador de elétrons. A variação da concentração destes compostos durante o período de operação está ilustrada na Figura 5.8.

Na fase inicial de operação (I) deste reator, foram observados comportamentos semelhantes ao descrito no Experimento I para o consumo de nitrito e amônia. Houve intenso consumo de nitrito e aumento da concentração de amônia efluente, indicando atividade desnitrificante heterotrófica como principal rota metabólica atuante nesta etapa.

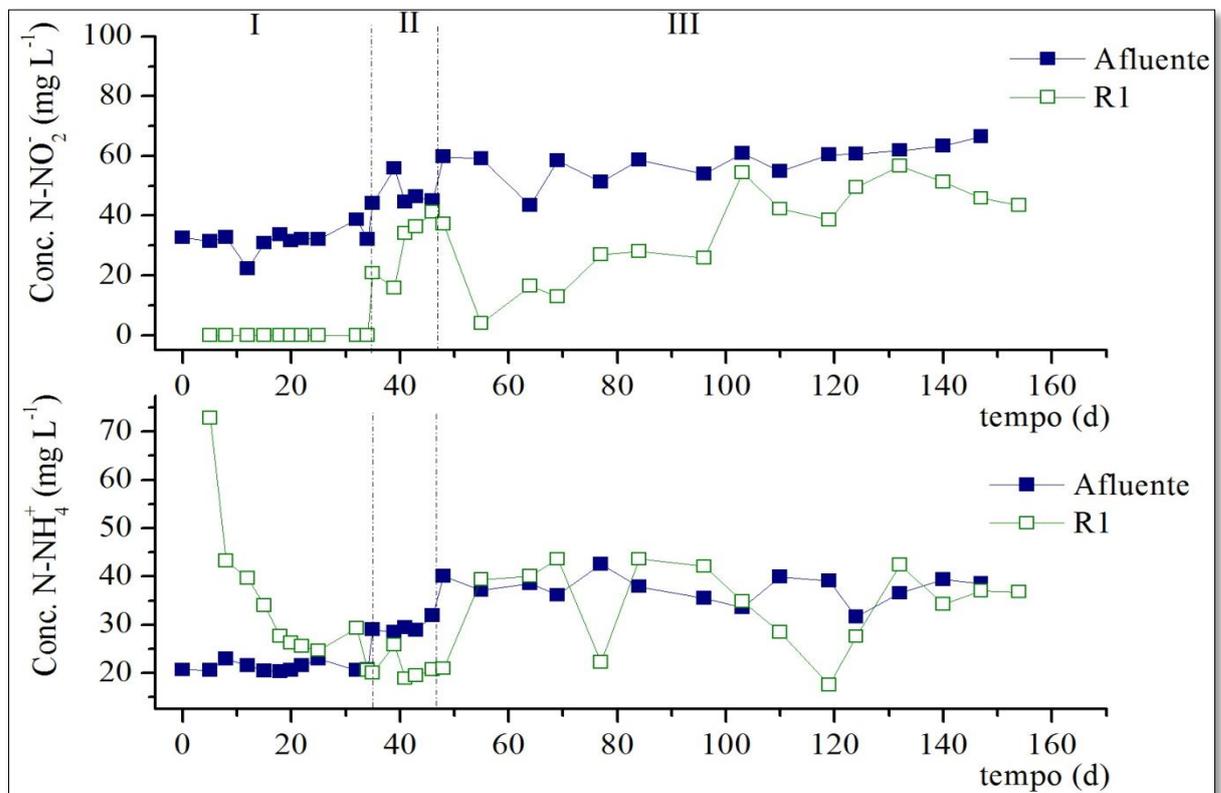


Figura 5.8- Concentrações afluentes e efluente de nitrito e amônia no reator 1. R1- lodo de planta de lodos ativados para tratamento de esgoto sanitário.

Fonte: Da autora.

Este comportamento pode estar associado ao fato da morte e lise celular de bactérias que não se adaptaram as condições submetidas, provavelmente bactérias aeróbias, liberando amônia e matéria orgânica no meio, favorecendo desta forma bactérias desnitrificantes heterotróficas.

As concentrações médias efluentes para nitrito e amônia obtidas foram respectivamente, $(1,92 \pm 6,27) \text{ mg } N - NO_2^- \text{ L}^{-1}$ e $(33,06 \pm 15,07) 42,5 \text{ mg } N - NH_4^+ \text{ L}^{-1}$ para a fase I (Tabela 5.4)

Na fase II, pode-se inferir que o aumento da concentração de nitrito para $42,5 \text{ mg } N - NO_2^- \text{ L}^{-1}$ favoreceu a redução da atividade de bactérias desnitrificantes heterotróficas, pois o consumo de nitrito foi reduzido e o consumo de amônia foi favorecido, chegando a ser observado concentração efluente igual a $19,0 \text{ mg } N - NH_4^+ \text{ L}^{-1}$, evidenciando uma possível atividade ANAMMOX. A redução do consumo de nitrito com aumento de sua concentração afluente foi um comportamento também observado no Experimento I (secção 4.3.1).

Como o reator respondia bem e pretendia-se estabilizar o reator em concentrações maiores de nitrito ($100 \text{ mg } N - NO_2^- \text{ L}^{-1}$), aumentou-se a concentração deste componente para $55 \text{ mg } N - NO_2^- \text{ L}^{-1}$ na fase III e iniciou a injeção do intermediário da reação ANAMMOX, hidroxilamina, para estimular este processo.

No entanto, percebe-se pela Figura 5.8, que no início de operação da fase III o consumo de nitrito aumentou, apresentando valor de $10 \text{ mg } N - NO_2^- \text{ L}^{-1}$ no efluente e, a remoção de amônia foi prejudicada, pois apresentou valores efluentes acima dos valores afluentes.

Esta condição foi mantida para avaliar se o reator apresentaria resposta positiva às condições submetidas. Com aproximadamente 80 dias de operação, o reator apresentou uma tentativa de recuperação indicando consumo de amônia (concentração efluente igual a $22,29 \text{ mg } N - NH_4^+ \text{ L}^{-1}$), entretanto, em seguida apresentou valores oscilatórios de consumo de amônia (Figura 5.8).

O comportamento observado durante a operação do reator e os resultados obtidos na seção 5.3, em que não foi obtida amplificação de microrganismos ANAMMOX, indica a atuação conjunta de diversos microrganismos, como os desnitrificantes heterotróficos, promovendo a redução do nitrito e, redutores de sulfato promovendo a oxidação da amônia.

Para o reator 2, os principais compostos de interesse são o sulfato, o qual é adicionado como receptor de elétrons e a amônia que é o doador de elétrons. A variação da concentração destes compostos durante o período de operação está ilustrada na Figura 5.9.

Na primeira fase de operação (I), houve aumento da concentração de amônia efluente, provavelmente, devido à morte e lise celular de bactérias aeróbias promovendo a liberação de

amônia no meio. As concentrações de sulfato nesta etapa ficaram próximas ao afluente ou houve baixo consumo (Figura 5.9). O consumo de sulfato possivelmente se deve à liberação de matéria orgânica, por meio da lise celular, que atua como doador de elétrons para a redução do sulfato (sulfetogênese), fato corroborado devido a fortes odores detectados de gás sulfídrico durante toda a operação.

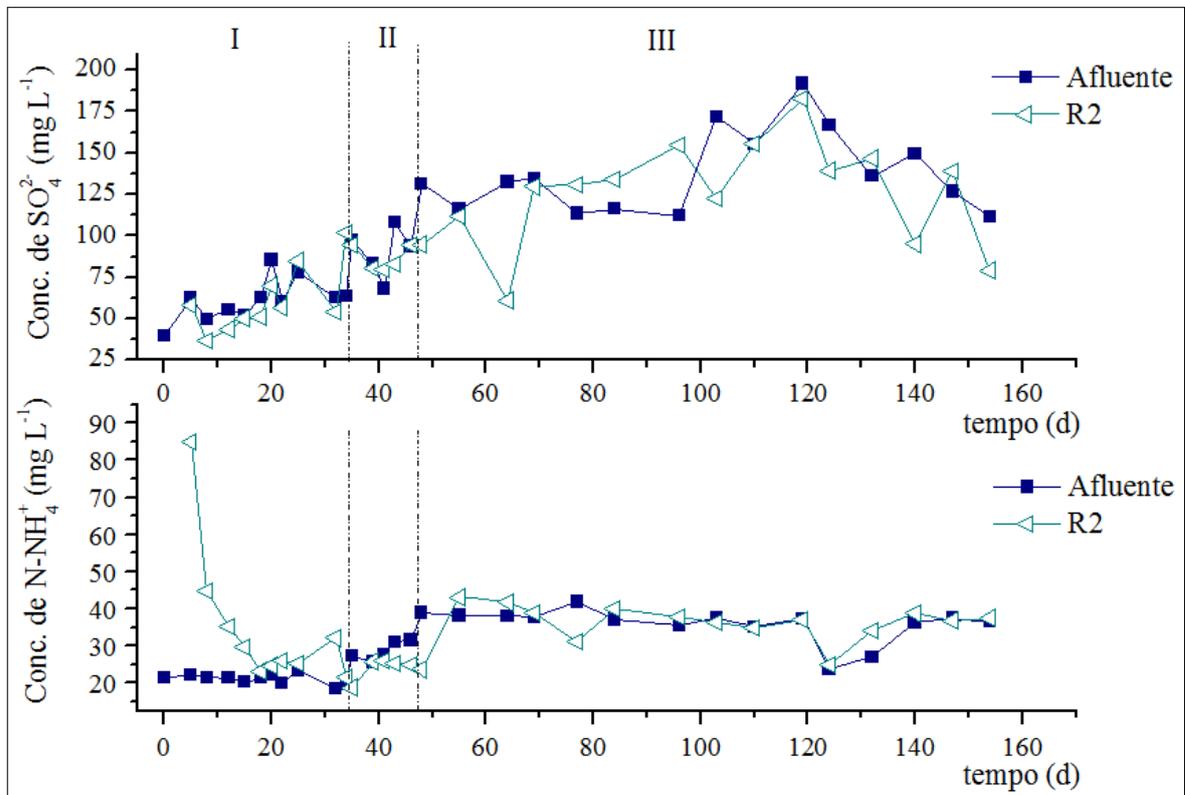


Figura 5.9- Concentrações afluente e efluente de sulfato e amônia no reator 2. R2- lodo de planta de lodos ativados para tratamento de esgoto sanitário.

Fonte: Da autora.

Na fase II houve um leve consumo de amônia, que não foi acompanhado pelo consumo de sulfato, então não se pode concluir que a atividade atuante foi de microrganismos capazes de realizar a redução do sulfato com oxidação simultânea de amônia (*SRAO*).

Rikmann et al. (2012) observou comportamento semelhante em seu reator, no qual houve remoção de amônia e não apresentou remoção de sulfato de acordo com a estequiometria *SRAO*. No entanto, os autores citam que o processo *SRAO* ocorreu e atribui o comportamento do sulfato devido à reoxidação do elemento enxofre ou sulfito a sulfato (SO_4^{2-}) via desnitrificação/nitritação utilizando o enxofre. Este comportamento de múltiplas rotas metabólicas atuando, provavelmente também ocorreu na fase II.

Na fase III, as concentrações de amônia afluente e efluente se coincidiram e os valores efluentes de sulfato apresentaram bastante variação entre valores acima ou abaixo do afluente. Os dados obtidos nesta fase sugerem que processos sulfetogênicos ainda poderiam estar ocorrendo, por apresentar alguns pontos de redução de sulfato e ainda, infere-se que a atividade SRAO não foi obtida, pois não houve remoção de amônia.

Yang, Zhou e Sun (2009) obtiveram com sucesso a atividade de redução do sulfato com simultânea oxidação da amônia durante o período de 120 dias de experimento em um reator em batelada a partir do inóculo estabilizado no processo ANAMMOX. A utilização de um inóculo adaptado para início da operação nas condições SRAO pode ter favorecido a estes autores a obter a rápida estabilização do processo, uma vez que, a reação ANAMMOX é tida como intermediária do processo e a seleção ou favorecimento desses microrganismos é mais criteriosa comparado a outros enriquecimentos.

A Tabela 5.4 expressa os valores das concentrações médias (mg L^{-1}) obtidos para os compostos $N - \text{NO}_2^-$, SO_4^{2-} e $N - \text{NH}_4^+$ durante o período de operação.

Tabela 5.4- Concentrações médias afluentes e efluentes para nitrito, amônia e sulfato no reator 1 e reator 2.

Concentrações	Reator 1			Reator 2		
	Fase I	Fase II	Fase III	Fase I	Fase II	Fase II
$N - NO_2^-$ (Afluente)	31,83 ± 3,81	47,15 ± 4,93	57,44 ± 5,37	-	-	-
$N - NO_2^-$ (Efluente)	1,92 ± 6,27	32,96 ± 9,91	34,82 ± 17,07	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,04	0,06 ± 0,07
% Remoção $N - NO_2^-$	94,00 ± 19,57	29,88 ± 21,80	22,62 ± 15,78	-	-	-
$N - NH_4^+$ (Afluente)	21,14 ± 0,96	29,50 ± 1,37	37,61 ± 2,84	21,09 ± 1,36	28,65 ± 2,60	35,90 ± 4,57
$N - NH_4^+$ (Efluente)	33,06 ± 15,07	21,18 ± 2,76	34,66 ± 8,83	33,30 ± 18,59	25,17 ± 0,94	36,60 ± 4,37
% Remoção $N - NH_4^+$	0,25 ± 0,85	28,11 ± 10,03	12,41 ± 18,85	0,42 ± 1,39	11,67 ± 10,44	4,28 ± 9,24
SO_4^{2-} (Afluente)	119,47 ± 20,80	92,43 ± 8,22	122,07 ± 16,89	61,11 ± 12,61	90,05 ± 15,04	137,78 ± 24,56
SO_4^{2-} (Efluente)	114,29 ± 48,33	117,79 ± 17,97	132,29 ± 24,85	63,89 ± 21,23	86,49 ± 7,66	127,53 ± 30,91

Fonte: Da autora.

5.2.2 Variação do pH

A Figura 5.10 expõe os dados obtidos de pH para o reator 1 e reator 2 durante o a realização do experimento.

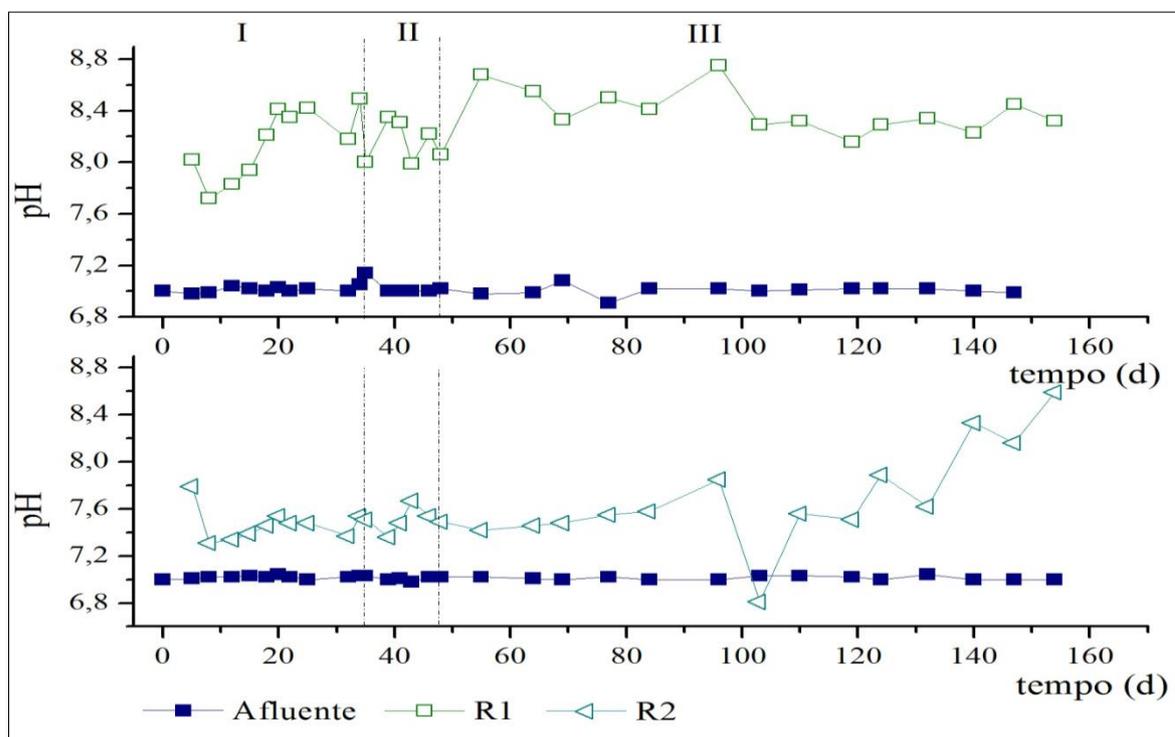


Figura 5.10 – Variação do pH durante o período de operação no reator 1 e 2. Reatores inoculados com lodo de planta de lodos ativados para tratamento de esgoto sanitário.

Fonte: Da autora.

O reator 1 apresentou valores de pH efluente superiores aos valores de entrada (entre 7,6 a 8,3) durante todo o experimento. Ou seja, processos que geram alcalinidade foram predominantes no sistema. As médias obtidas para este parâmetro em cada fase de operação estão expressas na Tabela 5.5.

Tabela 5.5- Média do pH afluente e efluente em cada fase para o reator 1 e reator 2.

		Fase I	Fase II	Fase III
Reator 1	Afluente	$7,01 \pm 0,02$	$7,03 \pm 0,06$	$7,01 \pm 0,04$
	Efluente	$8,14 \pm 0,26$	$8,19 \pm 0,16$	$8,41 \pm 0,17$
Reator 2	Afluente	$7,02 \pm 0,01$	$7,01 \pm 0,02$	$7,01 \pm 0,01$
	Efluente	$7,47 \pm 0,13$	$7,51 \pm 0,11$	$7,75 \pm 0,46$

Fonte: Da autora.

Conforme já descrito anteriormente (seção 5.1.2), a atividade ANAMMOX consome íons H^+ provocando o aumento da alcalinidade no meio. No entanto, sabe-se que esse processo não foi sucedido neste reator, pois não houve consumo de amônia e não detectou amplificação para microrganismos ANAMMOX na análise de qPCR (seção 5.3). Logo, outro processo possível que poderia estar atuando para provocar aumento da alcalinidade efluente seria a desnitrificação heterotrófica, corroborando com a conclusão obtida na seção 5.2.1.

O reator 2 apresentou valores de pH estáveis na primeira e segunda fase (Figura 5.10) com valores entre 7,2 e 8,6, ou seja, maiores que os valores afluentes. Os valores médios para o pH em cada fase estão representados na Tabela 5.5.

Liu et al. (2008) relataram aumento do pH no decorrer do processo *SRAO* em meio autotrófico. Yuan et al. (2015) e Rikmann et al. (2012) reportaram pH efluente menor que o pH afluente em processos de enriquecimento de microrganismos responsáveis pelo *SRAO* utilizando reatores bateladas e um sistema de reatores MBBR e UASBR, respectivamente. Estes últimos autores relatam o decaimento do pH pode ter sido devido a atuação de rotas metabólicas como a desnitrificação via oxidação do enxofre elementar.

Após 100 dias de operação, o reator 2 começou a apresentar valores muito elevados de pH, podendo indicar alteração no consórcio microbiano e favorecimento de rotas metabólicas que geram alcalinidade como, por exemplo, a sulfetogênese.

5.2.3 Avaliação do íon NO_3^- e DQO

A concentração média afluente e efluente obtida para DQO estão expressos na Tabela 5.6.

Por esta tabela, nota-se que o reator 1 obteve concentrações efluentes de DQO, semelhantes aos valores de entrada, ou seja, não apresentou variações nos valores de DQO.

Tabela 5.6- Valores médios de DQO afluente e efluente no reator 1 e 2.

		Fase I	Fase II	Fase III
Reator 1	DQO Afluente	52,56 ± 14,42	56,14 ± 4,28	97,90 ± 16,83
	DQO Efluente	50,23 ± 67,74	39,27 ± 10,45	85,19 ± 30,91
Reator 2	DQO Afluente	27,23 ± 17,36	21,37 ± 11,49	72,19 ± 22,59
	DQO Efluente	50,70 ± 73,97	30,57 ± 19,85	89,91 ± 58,77

Fonte: Da autora.

Analisando as concentrações de DQO obtidas para o reator 2, infere-se que houve liberação de matéria orgânica, provavelmente devido a morte celular, durante toda a operação deste experimento. Este fato favorece a atuação de microrganismos sulfetogênicos no sistema, sendo corroborado pela observação de odores de gases sulfídrico no reator.

Não foram mensurados valores para nitrato durante o período de operação dos reatores neste experimento.

5.3 Análises Microbiológicas

5.3.1 Amplificação em PCR convencional

Dois *primers* foram testados, AMX818F e AMX1066R e hzoc11F1 e hzoc11R2, para verificar a presença de microrganismos ANAMMOX na amostra padrão (amostra com alta abundância de microrganismos ANAMMOX e utilizada como controle positivo) e nas amostras dos sistemas biológicos estudados.

A Figura 5.11 apresenta a amplificação realizada em PCR para a amostra padrão com os *primers* AMX818F e AMX1066R e hzoc11F1 e hzoc11R2.

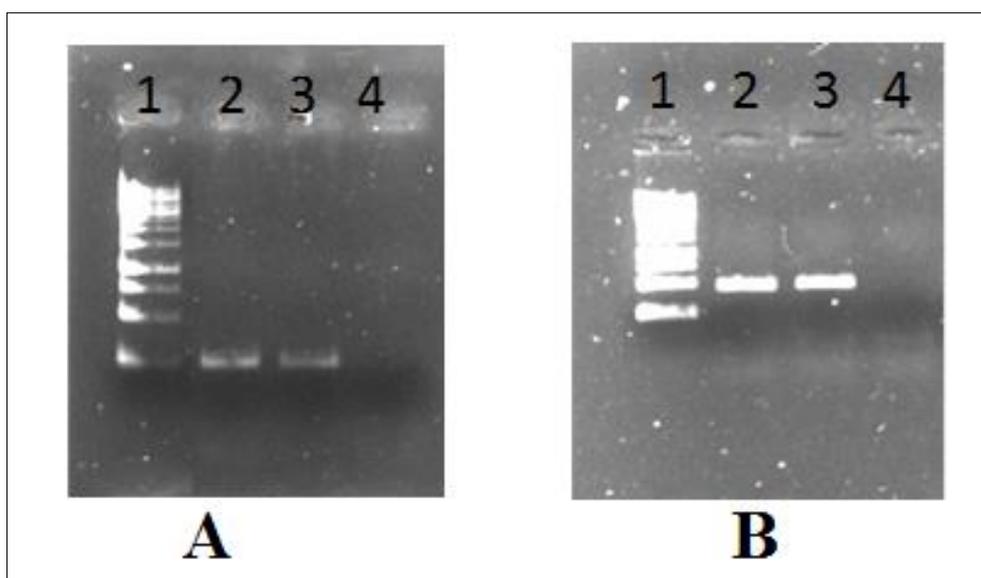


Figura 5.11- Amplificação em PCR da amostra padrão com os primers (A) AMX818F e AMX1066R e (B) hzoc11F1 e hzoc11R2. Gel de agarose 1% corado com Sybr Safe (Invitrogen) 1- Marcador Molelucar 1kb (promega). 2 Amostra Padrão 1:100 3 – Amostra Padrão 1:50. 4 – Controle negativo.

Fonte: Da autora.

Conforme perceptível pela figura acima, os *primers* hzoc11F1 e hzoc11R2 resultaram em melhores respostas de amplificação para a amostra padrão (AP) e foi escolhido para a construção da curva padrão e realização do tempo real. Ressaltando que para o primer AMX818F e AMX1066R não houve detecção de banda perceptível utilizando a amostra padrão.

As amostras do inóculo e da biomassa ao final de operação dos sistemas biológicos estudados não apresentaram amplificação em PCR convencional com nenhum dos *primers* analisados.

5.3.2 Amplificação em qPCR

A amplificação via PCR em tempo real foi realizada para as amostras da curva, amostras dos inóculos e das biomassas após operação dos enriquecimentos estudados. Ressaltando que as amostras dos inóculos e das biomassas após enriquecimento foram coletadas em triplicatas biológicas. E todas as amostras do DNA genômico foram aplicadas em triplicata (de análise) no qPCR.

Somente a triplicata referente à amostra da biomassa do reator I3 foram amplificadas na reação de PCR em tempo real, apresentando uma média de $1,75 \times 10^7$ cópias do gene HZO, relacionado ao microrganismo ANAMMOX.

No entanto, algumas amostras apresentaram ruídos na curva de amplificação e *melting* na PCR em tempo real. Então, para verificar a possibilidade de amplificação em outras amostras foi realizado um gel de agarose com as mesmas amostras da reação em tempo real. Ressalta-se que somente foi aplicado no gel de agarose amostras que apresentaram uma tendência a amplificar na qPCR.

A Tabela 5.7 informa as amostras biológicas com seu respectivo número de referência utilizado no gel de agarose.

Conforme observado na Figura 5.12, somente houve amplificação para o gene HZO nas amostras referentes a biomassa do reator I3. No entanto, a abundância dos microrganismos anammox neste reator estava muito baixa, pois foi amplificado, somente, em uma amostra das triplicatas biológicas realizadas.

Tabela 5.7- Amostras corridas no gel de agarose e suas respectivas identificações.

Amostras Biológicas	Identificação
Marcador Molecular 1kb (promega).	1
Amostra da curva padrão	2 (10^7 cópias de plasmídeos) , 3 (10^5)
Inóculo do reator I1	3, 4, 5
Inóculo do reator I2	6, 7, 8
Inóculo do reator I3	9, 10, 11
Inóculo do reator I4	12, 13, 14
Inóculo do reator R1 e R2	15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23
Biomassa reator I1	24, 25, 26
Biomassa reator I3	27, 28, 29, 30, 31, 32, 33
Biomassa reator I4	34, 35, 36
Biomassa reator R1	37, 38, 39
Biomassa reator R2	40, 41
Controle negativo	42

Fonte: Da autora.

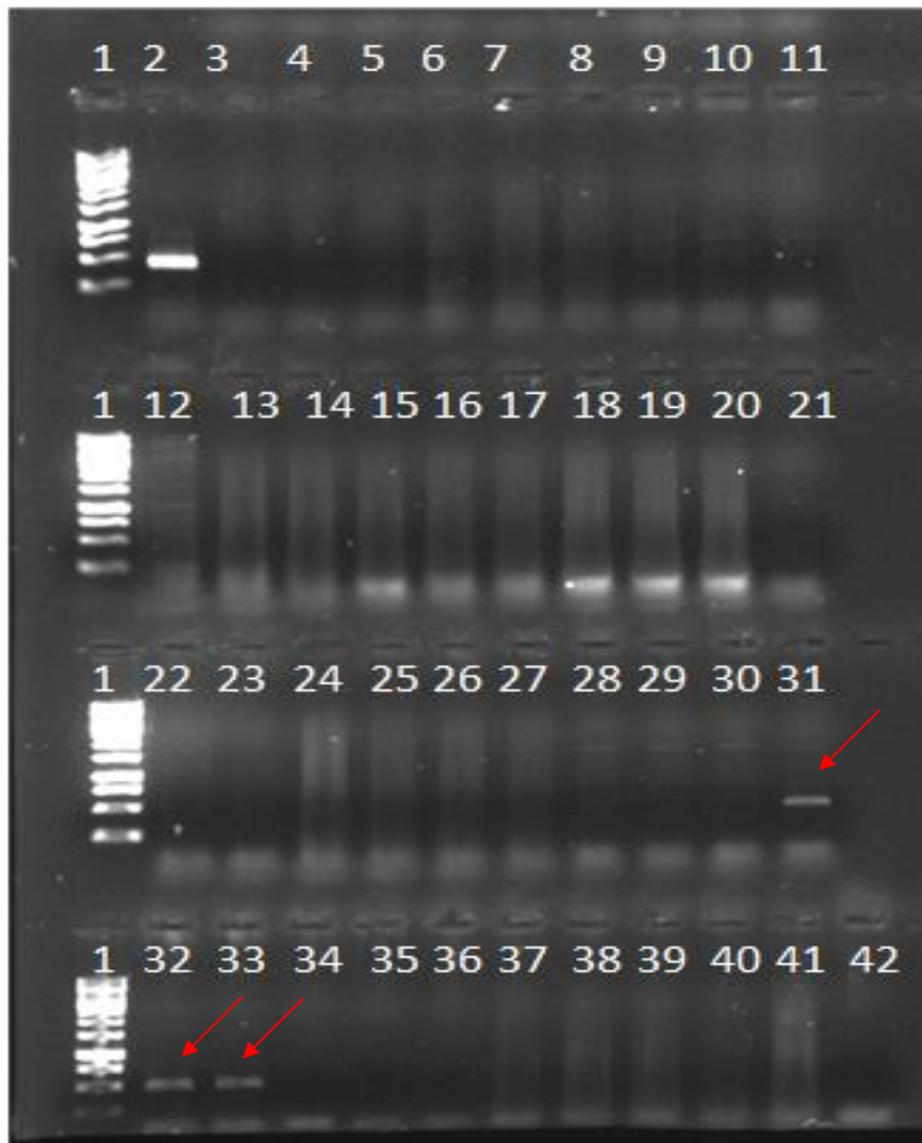


Figura 5.12- Gel de agarose 1% corado com Sybr Safe (Invitrogen) das amostras amplificadas em qPCR com os primers hzocl1F1 e hzocl1R2.

Fonte: Da autora.

Na biomassa enriquecida dos reatores I1, I2 e I4 (Experimento I) e dos reatores R1 e R2 (Experimento II) não foi possível detectar a amplificação de microrganismos ANAMMOX, provavelmente devido à baixa presença destes microrganismos no reator ou até mesmo a não presença destes.

Como as amostras de todos os inóculos utilizados para enriquecimento, tanto no Experimento I quanto no Experimento II, apresentaram resultados negativos para a amplificação de microrganismos ANAMMOX, infere-se a baixa abundância destes microrganismos presente nos inóculos ou até mesmo a não presença destes. Desta forma,

pode-se justificar o longo tempo de operação gasto para começar a verificar a presença de microrganismos capazes de realizar a oxidação anaeróbia da amônia.

A detecção de microrganismos ANAMMOX na biomassa após enriquecimento do reator I3, pode estar associada à origem do inóculo utilizado, o qual proveio de um reator UASB utilizado no tratamento de efluentes da avícola DACAR (Tietê/SP). Efluentes de avícolas caracterizam-se por apresentar considerável concentração de amônia e ainda baixas concentrações de carbono. Estas condições de operação do reator UASB tratamento do efluente de avícolas pode ter favorecido a presença de bactérias ANAMMOX no inóculo coletado.

No entanto, o reator I2, no qual foi utilizado inóculo semelhante ao do reator I3, recolhido também de um reator UASB para tratamento de efluentes de avícola, não apresentou a presença de bactérias anaeróbias oxidadoras de amônia.

O reator I1 foi inoculado com lodo termofílico utilizado no tratamento de vinhaça de cana-de-açúcar, o qual era adaptado à remoção de altas cargas orgânicas dificultando a presença de bactérias ANAMMOX neste sistema, pois a presença de matéria orgânica favorece outros tipos de microrganismos competidores as bactérias ANAMMOX.

Já o inóculo I4, de um reator UASB utilizado na biorremediação da drenagem ácida de mina, é um inóculo com alta abundância de bactérias redutoras de sulfato. Estes microrganismos podem ter atuado na redução do sulfato com formação de sulfeto e interferido no metabolismo ANAMMOX, sendo que sulfetos são considerados substâncias inibidoras aos microrganismos responsáveis pela oxidação anaeróbia da amônia.

O inóculo aeróbio de um sistema de lodos ativados utilizado no tratamento de esgoto doméstico pode ter favorecido, inicialmente, a atividade desnitrificante devido à morte de bactérias aeróbias submetidas a uma atmosfera anaeróbia e provocado competição com microrganismos capazes de realizar a atividade ANAMMOX.

6 CONCLUSÃO

O enriquecimento de microrganismos ANAMMOX a partir de inóculos de reatores anaeróbios mostrou que o estabelecimento de parâmetros operacionais controlados é imprescindível para se obter sucesso neste processo. Principalmente, promover condições para que ocorra inibição das bactérias desnitrificantes, com menor competição com as bactérias ANAMMOX.

Os reatores apresentaram um longo período de intensa atividade desnitrificante no início da operação, provavelmente devido ao tempo de ciclo utilizado. Com o aumento a concentração de nitrito e amônia, a atividade desnitrificante heterotrófica foi desfavorecida, no entanto, observou-se a atuação de microrganismos desnitrificantes até o final da operação.

O modo de operação em batelada pode ter desfavorecido o enriquecimento de microrganismos ANAMMOX, uma vez que a cada nova alimentação o reator era aberto e exposto a entrada de oxigênio.

Dentre os distintos inóculos avaliados, apenas aquele oriundo de um reator UASB utilizado no tratamento de efluentes avícolas apresentou pequena abundância de microrganismos ANAMMOX. Os demais inóculos apresentaram resultado negativo, ou não amplificaram, indicando que as bactérias ANAMMOX não estavam presentes na amostra ou que presentes em baixíssima abundância.

A utilização de um inóculo aeróbio para enriquecimento de microrganismos ANMMOX também resultou em intensa atividade de desnitrificação heterotrófica, porém esta foi minimizada com o aumento das cargas aplicadas de nitrito e amônia. Entretanto, assim como para os inóculos anaeróbios, a atividade ANAMMOX não foi detectada após 154 dias de operação. No entanto, o tempo de operação foi relativamente curto comparado a trabalho de enriquecimento ANAMMOX. As análises para quantificação de microrganismos ANAMMOX apresentaram resultados negativos para a amostra ao final da operação.

No reator 2, utilizando inóculo aeróbio para prover condições para o processo SRAO, não foram observadas a remoção simultânea de amônia e sulfato, sendo que o consumo de sulfato e amônia se apresentaram instáveis durante o período de operação. Logo, não foi possível observar o processo SRAO diante das condições operadas e no tempo de estudo. Além disso, não foi detectada a presença de microrganismos ANAMMOX neste reator.

7 RECOMENDAÇÕES

As recomendações a partir das observações neste trabalho são:

- a) Identificar a presença de microrganismos desnitrificantes nos reatores por meio da técnica de biologia molecular.
- b) Identificar a presença de microrganismos nitrificantes nos reatores por meio da técnica de biologia molecular.
- c) Identificar a presença de microrganismos redutores de sulfato nos reatores por meio da técnica de biologia molecular.
- d) Utilizar reatores contínuos com menor tempo de ciclo durante a operação para enriquecimento de microrganismos ANAMMOX, de forma que a atuação de bactérias desnitrificantes seja desfavorecida.
- e) Avaliar outros tipos de reatores (batelada sequencial, leito fluidizado ou reatores de biofilme por exemplo) para enriquecimento dos microrganismos ANAMMOX.

REFERÊNCIAS

- AHN, Y. H. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: a review. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1709-1721, 2006.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Washington, 2012.
- ARAÚJO, J.C. et al. Enrichment of anaerobic ammonium oxidizing bacteria – Anammox. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v.15, n. 2, p. 205-212, 2010.
- MOTA, F. S. B.; VON SPERLING, M. **Nutrientes de esgoto sanitário: utilização e remoção**. Desenvolvimento e aperfeiçoamento de tecnologias de acondicionamento e de reúso de águas residuárias. p. 428. Rio de Janeiro: ABES, 2009.
- BRODA, E. Two kinds of lithotrophs missing in nature. **Z. Allg. Mikrobiol.**, v. 17, p. 491-493, 1997.
- CARDOSO, R. B. et al. Sulfide oxidation under chemolithoautotrophic denitrifying conditions. **Wiley InterScience**, v. 95, p. 1148-1157, 2006.
- CATALDO, D. A.; SCHRANDER, L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant-tissue by nitration of salicylic-acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, 71-80, 1975.
- CHAMCHOI, N.; NITISORAVUT, S. Anammox enrichment from different conventional sludges. **Chemosphere**, v. 66, n. 11, 2225-2232, 2007.
- CONNAN, R. et al. Batch enrichment of anammox bacteria and study of the underlying microbial community dynamics. **Chemical Engineering Journal**, p. 217-228, 2016.
- EGLI, K. et al. Enrichment and characterization of an Anammox bacterium from a rotating biological contator treating ammonium-rich leachate. **Arch Microbiol.**, v. 175, p. 198-207, 2001.
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Process design manual for nitrogen control**. Washigton, 1975.
- FDZ-POLANCO, F. et al. New process for simultaneous removal of nitrogen and sulphur under anaerobic conditions. **Pergamon**, v. 35, p. 1111-1114, 2001.
- FUX, C. et al. Biological treatment of ammonium-rich wastewater by partial nitritation and subsequent anerobic ammoniumoxidation (anammox) in a pilot plant. **Journal of Biotechnology**, v. 99, p. 295-306, 2002.
- JETTEN, M.S.M. et al. Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation (Anammox) process. **Curr. Opin. Biotech.**, v. 12, n 3, p. 283-288, 2001.

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

JING, C.; XIANG, J.X.; PING, Z. Isolation and identification of bacteria responsible for simultaneous anaerobic ammonium and sulfate removal. **Science China Chemistry**, p. 645-650, 2009.

KARTAL, B. et al. Anammox-Growth Physiology, Cell Biology, and Metabolism. **Advances in Microbial Physiology**, Burlington: Academic Press. v. 60, p. 211-262, 2012.

KUENEN, J. G. Anammox bacteria: from discovery to application. **Nature Publishing group.**, v. 6, p. 320-326, 2008.

KUENEN, J. G.; ROBERTSON, L. A.; TUOVINEN, O. H. The genera thiobacillus, thiomicrospira, and thiosphaera. **The Prokaryotes**, v. 3, p 2638–2657, 1992.

LEI, Z. et al. Performance of sulfate-dependent anaerobic ammonium oxidation. **Sci China Ser B Chem.**, p. 86–92, 2009.

LI, H. et al. “Fast start-up of anammox reactor: operational strategy some characteristics as indicators of reactor performance”. **Desalination**, v. 286, p. 436-441, 2012.

LIU, S. et al. “Application of anaerobic ammonium-oxidizing consortium to achieve completely autotrophic ammonium and sulfate removal”. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 6817-6825, 2008.

LUDWIG, W. et al. Road “Map of the bacteroidetes, spirochaetes, tenericutes (mollicutes), acidobacteria, fibrobacteres, fusobacteria, dictyoglomi, gemmatimonadetes, lentisphaerae, verrucomicrobia, chlamydiae, and planctomycetes”. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 4**, p. 1-24, 2011.

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

OKAMOTO, H. et al. Development of a fixed-bed anammox reactor with high treatment potential. **Biodegradation**, v. 24, p. 99-110, 2013.

OLIVEIRA, M. G. **Processo ANAMMOX na remoção de nitrogênio de águas residuárias – avaliação de sistemas em escala bancada**. 2015. 208f. Tese (Doutorado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos) – Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Universidade de Brasília, Brasília/DF, 2015.

RIKMANN, E. et al. Sulfate-reducing anaerobic ammonium oxidation as a potential treatment method for high nitrogen-content wastewater. **Biodegradation**, v. 23, p. 509 – 524, 2012.

ROBLEDO, E.G.; CORZO, A.; PAPASPYROU, S. A fast and direct spectrophotometric method for the sequential determination of nitrate and nitrite at low concentrations in small volumes. **Marine Chemistry**, v. 162, p. 30-36, 2014.

SÀNCHEZ-MELSIÓ, A. et al. “Development of batch-culture enrichment coupled to molecular detection for screening of natural and man-made environments in search of anammox bacteria for N-removal bioreactors systems”. **Chemosphere**, v. 75, p. 169-179, 2009.

SCHMIDELL, W. et al. **Tratamento biológico de águas residuárias**. Florianópolis, 2007.

SCHMID, M. et al. Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 23, p. 93-106, 2000.

SCHMID, M. et al. *Candidatus* “*Scalindua brodae*,” sp. nov., *Candidatus* “*Scalindua wagneri*,” sp. nov.: two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 26, p. 529-538, 2003.

SCHMIDT, I.; BOCK, E. Anaerobic ammonia oxidation with nitrogen dioxide by *Nitrosomonas eutropha*. **Archives of Microbiology**, v. 167, n. 2-3, 1997.

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

SCHMIDT, I. et al. Aerobic and anaerobic ammonia oxidizing bacteria competitors or natural partners?. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 39, p. 175–181, 2002.

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

STROUS, M.; KUENEN, J. G.; JETTEN, M. S. M. Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.3248-3250, 1999.

SUN, W. et al. “Stoichiometric and molecular evidence for the enrichment of anaerobic ammonium oxidizing bacteria from wastewater treatment plant sludge samples”. **Chemosphere**, v. 84, p. 1262-1269, 2011.

TAL, Y.; WATTS, J. E. M.; SCHREIER, H. J. Anaerobic ammonia-oxidizing bacteria and related activity in Baltimore inner Harbor sediment. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, n. 4, p. 1816-1821, 2005.

TERADA, A.; ZHOU, S.; HOSOMI, M. Presence and detection of anaerobic ammonium oxidizing (anammox) bacteria and appraisal of anammox process for high-strength nitrogenous wastewater treatment: a review. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 13, p. 759-781, 2011.

TOH, S.K.; ASHBOLT, N.J. Adaptation of anaerobic ammonium oxidising consortium to synthetic coke-ovens wastewater. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 59, p. 344 -352, 2002.

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

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

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

VAN DE GRAAF, A.A. et al. Metabolic pathway of anaerobic ammonium oxidation on the basis of ¹⁵N studies in a fluidized bed reactor. **Microbiology**, v. 143, p. 2415-2421, 1997.

WANG, C-C. et al. “Simultaneous partial nitrification, anaerobic ammonium oxidation and denitrification (SNAD) in a full-scale landfill-leachate treatment plant”. **Journal of Hazardous Materials**, v. 175, p. 622-628, 2010.

WANG, L.; LI, T. Anaerobic ammonium oxidation in constructed wetlands with bio-contact oxidation as pretreatment. **Ecological Engineering**, v. 37, p. 1225-1230, 2011.

YANG, Z.; ZHOU, S.; SUN, Y. Start-up of simultaneous removal of ammonium and sulfate from an anaerobic ammonium oxidation (anammox) process in an anaerobic up-flow bioreactor. **Journal of Hazardous Materials**, v. 169, p. 113 – 118, 2009.

YUAN, Y. et al. Characteristics of sulfate reduction-ammonia oxidation under anaerobic conditions. **Journal of Residuals Science & Technology**, v. 12, p. 115-121, 2015.