

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE HIDRAÚLICA E SANEAMENTO
LABORATÓRIO DE PROCESSOS BIOLÓGICOS

TÚLIO DA SILVA SIQUEIRA

**Enriquecimento de biomassa anammox e ensaios de inibição por metais e
lixiviado de aterro sanitário**

SÃO CARLOS
NOVEMBRO 2014

TÚLIO DA SILVA SIQUEIRA

**Enriquecimento de biomassa anammox e ensaios de inibição por metais e lixiviado de aterro
sanitário**

Monografia apresentada ao curso
de graduação em Engenharia
Ambiental da Escola de
Engenharia de São Carlos da
Universidade de São Paulo

Área de concentração:

Saneamento ambiental

Orientador: Dr. Tiago Henrique Martins

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

S618e Siqueira, Túlio da Silva
Enriquecimento de biomassa anammox e ensaios de inibição por metais e lixiviado de aterro sanitário / Túlio da Silva Siqueira; orientador Tiago Henrique Martins. São Carlos, 2014.

Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental) -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2014.

1. Anammox. 2. Remoção de nitrogênio. 3. Tratamento Biológico. 4. Enriquecimento. 5. Inibição. 6. Lixiviado. 7. Metais. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato(a): **Tulio da Silva Siqueira**

Data da Defesa: 05/11/2014

Comissão Julgadora:

Resultado:

Tiago Henrique Martins (Orientador(a))


Aprovado

Eugenio Foresti

Aprovado

Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic

Aprovado



Prof. Dr. Marcelo Zaiat

Coordenador da Disciplina 1800091 - Trabalho de Graduação

Agradecimentos

Aos meus pais, Joaquim e Lenice, por todo amor, pela ajuda e incentivo em todos os momentos. Por sempre acreditarem em mim e, principalmente, por serem exemplos de caráter e dignidade.

Ao Tiago Henrique Martins, pela oportunidade de desenvolvimento tanto da pesquisa quanto pessoal, mas também pela paciência nos ensinamentos, pelo crescimento acadêmico e apoio durante todo o projeto.

A todos o pessoal do LPB e de Santiago de Compostela pela ajuda no laboratório e pela grande contribuição no resultado deste trabalho.

À Tamires Koga, pelo carinho, incentivo, companheirismo, compreensão e apoio incondicional.

A todos os professores do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP, pelos quais tive o privilégio de ser ensinado, por todo conhecimento e por despertar ainda mais meu interesse na área.

Aos meus amigos da Ambiental 09, pelos momentos inesquecíveis e pelo suporte e amparo ao se tornarem minha família durante o período de faculdade.

À república Póropópó e seus integrantes, pelos grandes momentos de alegria vividos durante os quatro anos de convivência.

Aos amigos de São José e familiares, pelo convívio durante todos estes anos por serem pessoas com as quais sempre pude contar nas horas mais importantes.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelas bolsas de iniciação científica concedidas sem as quais este trabalho não seria possível.

E a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram com o projeto.

RESUMO

SIQUEIRA, T. S. **Enriquecimento de biomassa anammox e ensaios de inibição por metais e lixiviado de aterro sanitário.** São Carlos, 2014. 89p. Monografia de Trabalho de Graduação. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2014.

A *anaerobic ammonium oxidation* (anammox) tem se apresentado recentemente como uma boa perspectiva no tratamento de águas residuárias contendo nitrogênio em altas concentrações. O processo mais utilizado no tratamento destes efluentes é o de nitrificação-desnitrificação. Um sistema de nitrificação necessita de elevadas concentrações de oxigênio e a desnitrificação de matéria orgânica como doadora de elétrons. Entretanto, em muitas águas residuárias, após a nitrificação, esses recursos podem não existir ou serem escassos. O processo anammox necessita apenas de nitrito e amônio em ambiente anóxico, tornando este um processo menos custoso. Porém, a biomassa anammox apresenta alto tempo de crescimento celular e grande sensibilidade a agentes inibidores. Sendo assim, o principal objetivo deste trabalho foi obter uma cultura anammox enriquecida e verificar a influência de alguns compostos inibidores sobre o metabolismo da biomassa anammox. Durante este projeto, foram operados dois principais reatores, um em bateladas sequenciais (RBS) e outro de leito fixo (RLF), dentro dos quais a biomassa foi enriquecida. O primeiro, apresentou os primeiros sinais da atividade anammox em seu 88º dia de operação. Já o segundo, inoculado com a mesma biomassa presente no RBS, desenvolveu o processo logo nos primeiros dias. O resultado do trabalho mostrou que em um reator descontínuo como o RBS onde, teoricamente, as condições do ambiente seriam mais facilmente mantidas apresentou resultado pior do que o desempenhado pelo RLF onde há mais interferências do ambiente. O reator contínuo (RLF) apesar de aberto (ou seja, com presença de oxigênio, porém sob constante injeção de mistura Ar/CO₂) conseguiu apresentar taxa de remoção de nitrogênio superior à do RBS. Além disso o RLF foi capaz de operar em cargas mais altas. Os ensaios de atividade anammox específica foram realizados para se avaliar a influência de lixiviado e de metais presentes no lixiviado. Nos ensaios com lixiviado, notou-se que a inibição se torna considerável quando a concentração deste componente foi de 50% do volume do meio e que foi dependente do diâmetro dos grânulos utilizados no teste. Já os resultados dos ensaios com metais sugeriram que alguns metais são muito mais tóxicos do que outros, caso do cobre e cromo. A ordem de toxicidade obtida foi Cu > Cr > Pb > Zn > Cd > Ni > Mn > Fe.

Palavras chave: anammox, remoção de nitrogênio, tratamento biológico, enriquecimento, inibição, lixiviado, metais

ABSTRACT

SIQUEIRA, T. S. **Enriquecimento de biomassa anammox e ensaios de inibição por metais e lixiviado de aterro sanitário.** São Carlos, 2014. 89p. Monografia de Trabalho de Graduação. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2014.

Recently, the anaerobic ammonium oxidation (anammox) has become a good alternative for the treatment of high nitrogen concentrations wastewater. The most common process to treat this kind of wastewater is the nitrification-denitrification. A nitrification system requires high oxygen concentrations and the denitrification demands on organic matter as electron donor, however, this resource may lack or not be available after the nitrification process. The anammox process requires only nitrite and ammonium in an oxygen free atmosphere and for this reason has less operational costs. However, the anammox bacteria has a low growth rate and presents high sensibility to inhibitor agents. For this reason, the main goal of this work was to obtain an enriched anammox culture by also verifying inhibitory compounds over the process. Two main reactors were operated where the anammox bacteria were enriched, a sequencing batch reactor (SBR) and a fixed bed reactor. The SBR showed its first anammox signal by the 88th day of operation. Meanwhile the FBR, inoculated with the SBR biomass, developed the anammox at the beginning of its operation. The results showed that a discontinuous reactor (SBR), on which the environment conditions are easier to maintain, developed lower nitrogen removal rates than the continuous reactor (FBR). The FBR was capable to treat higher nitrogen loads in comparison with SBR. Furthermore, the environment conditions in a continuous reactor suffers more variations than in a continuous reactor. This is a surprising result once the continuous reactor is open to the atmosphere and for this reason presents higher concentration of oxygen (however Ar/CO₂ gas was always injected inside the reactor). The specific anammox activity assays were performed to evaluate the leachate and the metals influence over the anammox biomass. From the leachate assays, it was observed that leachate concentration of 50% could strongly inhibit the anammox according to the granular size of the biomass. The metals inhibition assays suggested that copper and chrome have greater inhibitory potential. The toxicity results suggested that the metals inhibitory potential grows according the following sequence Cu > Cr > Pb > Zn > Cd > Ni > Mn > Fe.

Key words: anammox, nitrogen removal, biological treatment, enrichment, inhibition, leachate, metals

SUMÁRIO

Lista de Tabelas	XIV
Lista de Figuras	XVI
1 Introdução	1
2 Objetivos	3
3 Revisão Bibliográfica	4
3.1 Anammox	4
3.1.1 Fatores que influenciam a atividade anammox	4
3.1.2 Bioquímica	9
3.1.3 Enriquecimento	10
3.1.4 Bactérias responsáveis pelo processo	11
3.1.5 Atividade anammox específica (AAE)	11
4 Materiais e Métodos	13
4.1 Enriquecimento	13
4.2 Inoculação e operação dos reatores	14
4.2.1 Reator de bateladas sequenciais (RBS)	14
4.2.2 Reator de leito fixo (RLF)	20
4.2.3 Teste com lixiviado de aterro sanitário	21
4.2.4 Teste com metais	25
4.3 Técnicas de biologia molecular	25
4.3.1 Extração de DNA e Sequenciamento gene rRNA 16S – Plataforma PGM da Ion Torrentt	25
4.3.2 Normalização dos dados e análises	26
5 Análises físico-químicas	28
6 Resultados	32

6.1	Caracterização do Inóculo	32
6.2	Resultados Experimentais	33
6.2.1	Reator de bateladas sequenciais	33
6.2.2	Reator de leito fixo.....	42
6.3	Análise da composição da biomassa	47
6.4	Ensaio de atividade anammox específica	50
6.4.1	Caracterização da biomassa	50
6.4.2	Ensaio com lixiviado	55
6.4.3	Ensaio com metais.....	69
7	Conclusões.....	81
	Referências Bibliográficas	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Etapas e duração de cada batelada	15
Tabela 2 - Composição do meio basal de cultivo	16
Tabela 3 - Composição da Solução Traço I	16
Tabela 4 - Composição da Solução Traço de metais II.....	16
Tabela 5 - Detalhamento da entrada de substratos no reator	19
Tabela 6 - Frequência de variáveis analisadas e métodos utilizados	29
Tabela 7 - Concentrações iniciais de sólidos no reator.....	32
Tabela 8. Número de leituras (sequências) por filos e classes encontradas na amostra da biomassa anammox.....	48
Tabela 9. Microrganismos representativos de cada classe na amostra da biomassa anammox.....	49
Tabela 10. Organismos representativos das classes de <i>Proteobacteria</i> presentes na biomassa anammox.....	50
Tabela 11 - Caracterização da Biomassa	53
Tabela 12 - Caracterização do lixiviado do aterro sanitário da cidade de Lousame/Espanha	55
Tabela 13 - Resultados do primeiro ensaio com lixiviado.....	59
Tabela 14 - Resultados do segundo ensaio com lixiviado	62
Tabela 15 - Resultados do segundo ensaio com lixiviado	68
Tabela 16 - Visão geral dos ensaios com lixiviado.....	69
Tabela 17 - Caracterização do lixiviado da cidade de São Carlos	69
Tabela 18 – IC ₅₀ dos ensaios de inibição realizados com metais.....	79
Tabela 19 - Resultado de todos os ensaios de inibição da atividade anammox.....	80
Tabela 20 - Panorama de máxima remoção de nitrogênio dos reatores.....	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma das Etapas de Trabalho	13
Figura 2 - Esquema do Reator operado em Bateladas Sequenciais	15
Figura 3 - Esquema do reator de leito fixo.....	21
Figura 4 - Transdutor de pressão.....	30
Figura 5 - Esquema de sistema de calibração do transdutor de pressão	30
Figura 6 - Composição final do ensaio de inibição por lixiviado com concentração crescente da direita para a esquerda.....	31
Figura 7 - Concentração de sólidos no reator de bateladas sequenciais	33
Figura 8 - Concentrações de nitrogênio ao longo do tempo de operação	34
Figura 9 - Concentrações de nitrogênio no primeiro período	35
Figura 10 - Concentrações de nitrogênio no segundo período.....	36
Figura 11 - Flotação da biomassa presente no frasco, evidência da atividade anammox.....	38
Figura 12 - Concentrações de nitrogênio no terceiro período.....	39
Figura 13 - Eficiência de remoção da carga de nitrogênio ao longo do tempo.....	41
Figura 14 - Concentrações de nitrogênio ao longo do tempo de operação	43
Figura 15 - Concentrações de nitrogênio ao longo do tempo de operação - Primeira parte.....	43
Figura 16 - Concentrações de nitrogênio ao longo do tempo de operação - Segunda parte.....	44
Figura 17 – Eficiência de remoção de nitrogênio do RLF.....	45
Figura 18- Concentrações de amônio e variação de pH ao longo do tempo de operação	46
Figura 19 - Exemplos de grânulos presentes na Biomassa 1 – Sem escala	51
Figura 20 - Exemplos de grânulos presentes na Biomassa 2 – Sem escala	52
Figura 21 - Exemplos de grânulos presentes na Biomassa 3 – Sem escala	53
Figura 22 - Ensaio para verificação da manutenção da AAE de uma biomassa resfriada.....	54
Figura 24 - Primeiro ensaio de inibição por lixiviado utilizando Biomassa 2.....	56
Figura 25 - Curva de inibição do primeiro ensaio utilizando Biomassa 2.....	57
Figura 26 - Primeiro ensaio de inibição por lixiviado utilizando Biomassa 3.....	57
Figura 27 - Curva de inibição do primeiro ensaio utilizando Biomassa 3.....	58
Figura 28- Segundo ensaio de inibição por lixiviado utilizando Biomassa 2.....	60

Figura 29 - Curva de inibição do segundo ensaio utilizando Biomassa 2	60
Figura 30 - Segundo ensaio de inibição por lixiviado utilizando Biomassa 3	61
Figura 31 - Curva de inibição do segundo ensaio utilizando Biomassa 3	61
Figura 32 - Terceiro ensaio de inibição por lixiviado utilizando Biomassa 2	63
Figura 33 - Curva de inibição do terceiro ensaio utilizando Biomassa 2	64
Figura 34 - Terceiro ensaio de inibição por lixiviado utilizando Biomassa 3	64
Figura 35 - Curva de inibição do terceiro ensaio utilizando Biomassa 3	65
Figura 36 - Curva de produção de gases sem a adição de lixiviado	66
Figura 37 - Comparação da biomassa no frasco controle (esq.) e com 100% de lixiviado (dir.)	67
Figura 38 - Curva de inibição do cádmio com biomassa triturada	70
Figura 39 – Curvas de inibição da atividade anammox por a) cádmio, b) chumbo, c) ferro e d) zinco	72
Figura 40 - Curva de Pressão x Tempo do ensaio de inibição com níquel	73
Figura 41 - Curva de Pressão x Tempo do ensaio de inibição com manganês	74
Figura 42 - Curva de Pressão x Tempo do ensaio de inibição com cobre	75
Figura 43 - Curva de Pressão x Tempo do ensaio de inibição com cromo	76
Figura 44 - Curvas de inibição da atividade anammox por a) níquel, b) manganês, c) cobre e d) cromo	78

1 INTRODUÇÃO

A poluição por compostos nitrogenados tem se tornado objeto de preocupação, principalmente pelas emissões por compostos utilizados na agricultura, indústria farmacêutica e efluentes industriais.

O método mais utilizado no tratamento de compostos desta natureza hoje em dia é a nitrificação com posterior desnitrificação, considerados processos consolidados e muito utilizados em estações de tratamento de esgoto e águas residuárias (SCHMIDT *et al.*, 2003). Porém, a nitrificação é realizada em ambiente com oxigênio e, requerem aeração do sistema, tornando o tratamento mais dispendioso. Além disso, a desnitrificação necessita de matéria orgânica como doadora de elétrons, a qual não está presente na quantidade necessária no efluente nitrificado. Portanto, o sistema de nitrificação-desnitrificação pode possuir custos adicionais e se faz necessária, então, uma alternativa de tratamento menos onerosa. Neste contexto surge a oxidação anóxica do amônio (*anaerobic ammonium oxidation* – anammox), em que o íon amônio é oxidado em ambiente ausente de oxigênio tornando este um processo vantajoso economicamente.

O processo anammox pode ser considerado com uma descoberta recente. Até a década de 90, as bactérias responsáveis pelo processo ainda eram desconhecidas, consideradas como “litotróficas perdidas na natureza” por Broda (1979), o qual classificou a reação como termodinamicamente possível mas os microrganismos responsáveis por ela ainda eram desconhecidos.

A atividade anammox foi detectada pela primeira vez por Mulder *et al.* (1995), em que os autores, em reator desnitrificante, evidenciaram consumo de nitrato e amônio paralelamente à produção de nitrogênio gasoso. Hoje, são conhecidos quatro principais gêneros de bactérias *Brocadia anammoxidans*, *Kuenenia stuttgartiensis*, *Jettenia asiática* e *Scalindua sorokini*; este último encontrado, recentemente, no Mar Negro.

O processo anammox é simples e por este fato é uma opção considerável no tratamento biológico de águas residuárias (ABMA *et al.*, 2007; VAN DER STAR *et al.*, 2007) e, por esta razão, já vem sendo tratado com maior relevância relação ao processo

convencional. Isso porque dentre as vantagens deste processo, estão a redução de até 90% dos custos operacionais (SHALINI E JOSEPH, 2012 e PILCHER, 2005), pois além das reduções dos custos de aeração e adição de matéria orgânica citados, há também a redução dos custos com manejo e disposição de lodo uma vez que a geração deste resíduo é menor no processo. Gao e Tao (2011) revelam que além da redução de até 90% dos custos operacionais, há ainda uma diminuição de 50% do espaço requerido para o tratamento se comparado aos processos convencionais. A anammox aparece como uma etapa adicional no ciclo biogeoquímico do nitrogênio e sua importância foi constatada por Thamdrup & Dalsgaard (2002) em estudo no qual a anammox é citada como produtora de até 67% do nitrogênio gasoso nos oceanos.

Por todas suas vantagens, o emprego do processo anammox no tratamento de compostos nitrogenados está se tornando cada vez mais comum assim como trabalhos relacionados a este processo. Hoje a perspectiva é muito promissora em relação a este tipo de tratamento, visto que é notável o crescimento de publicações científicas relacionadas ao processo anammox. Dados recentes sugerem que, hoje em dia, já existam cerca de 30 reatores anammox em escala plena no mundo (A. MAGRÍ *et al.*, 2013 e VLAEMINK *et al.*, 2012).

Entretanto, apesar de ser capaz de tratar elevadas concentrações de nitrogênio amoniacal, o processo anammox é visto como um processo instável do ponto de vista de operação. Mínimas interferências são capazes de provocar oscilações em sua eficiência. Portanto, estudo mais detalhado de inibidores e agentes que influenciam o processo são necessários.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi aprofundar os estudos sobre o processo anammox, qualificando a comunidade microbiana e aspectos fisiológicos relacionados ao processo. Tem-se a perspectiva de reduzir os tempos de partidas de reatores e também introduzir ainda mais a atividade anammox como alternativa ao tratamento relacionado a águas residuárias, sendo um dos pilares deste trabalho, utilizar a biomassa enriquecida para verificar a influência do lixiviado de aterro sanitário na atividade anammox.

2 OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho foi o enriquecimento de biomassa sob condições anammox em duas diferentes configurações de reator, contínuo e descontínuo. Além disso, avaliou-se a inibição causada sobre a atividade anammox por metais e lixiviado de aterro sanitário.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Anammox

Os primeiros autores a constatar o consumo de amônio em reator anóxico foram Mulder *et al.* (1995), em que, num reator de leito fluidificado, após 420 dias de operação, observaram numa taxa de remoção de 0,4 Kg N/m³/dia, uma vez que, através da nitrificação aeróbia seria necessária uma taxa de 1,8 Kg O₂/m³/dia para obtenção desta mesma taxa de remoção. Além disso, em ensaios posteriores, não foi encontrado oxigênio gasoso no reator, levantado a hipótese da rota anammox.

A fisiologia de culturas anammox foi estudada por Strous *et al.* (1999b) em reatores em batelada. O consumo médio de amônia foi determinado e obteve-se uma taxa máxima de consumo de 1,1 mg NH₄⁺ (g_{proteína}.d)⁻¹. A atividade anammox não foi inibida por concentrações de até 1 g-N L⁻¹ de nitrato ou amônia. Entretanto, concentrações de 100 mg-N L⁻¹ de nitrito, por um longo período de tempo em sequência, inibiu o processo. Porém, este foi reestabelecido quando se adicionou 1,4mg-N L⁻¹ de hidrazina e 0,7mg-N L⁻¹ de hidroxilamina (intermediários da anammox) no reator. Segundo Strous *et al.* (1999a), em estudos filogenéticos utilizando sequências do RNA ribossomal 16S identificaram os microrganismos autotróficos como sendo relacionados aos membros da Divisão *Planctomycetes* (Ordem *Planctomycetales*) do Domínio *Bacteria*. Anteriormente, acreditava-se que os *Planctomycetes* eram de limitada relevância ambiental, mas recentes estudos em ecologia microbiana mostraram que essas bactérias são ubíquas

O uso de lodo ativado na atividade anammox foi testado por Dapena-Mora *et al.* (2004), quando, após 60 dias de operação de um reator em bateladas sequenciais com agitação a 50 rpm, observou-se consumo estequiométrico de amônio e nitrito e obtiveram eficiência de remoção de 82% da carga nitrogenada aplicada ao reator, equivalente a 1,4 g-N/m³, a partir do 180º dia de operação.

3.1.1 Fatores que influenciam a atividade anammox

3.1.1.1 Nitrito

A inibição por nitrito foi verificada por van der Graaf *et al.* (1996) e Strous *et al.* (1997), em que os autores verificaram uma inibição irreversível de uma cultura de *Brocadia anammoxidans* quando a concentração de nitrito e fosfato foram determinadas acima de 70 e 60 mg L⁻¹, respectivamente, ressalta-se que estas foram testadas separadamente.

Scaglione *et al.* (2012) verificaram que a inibição por nitrito depende de dois principais fatores: concentração de nitrito e tempo de exposição. Neste estudo, foram operados dois reatores em batelada sequenciais, um tratando água residuária sintética e outro com lixiviado de aterro sanitário, sendo que os dois desenvolveram taxa de remoção de nitrogênio em torno de 85 a 90%. Neste estudo, variaram a concentração de nitrito de 100 a 500 mg N L⁻¹ e o tempo de exposição em 3 até 24 horas. Como resultado, constaram que, por curto período de tempo (três a quatro horas), a biomassa se manteve tolerante a concentrações média a altas, perdendo menos de 40% da atividade anammox específica com concentração de 500 mg N L⁻¹, porém, ao estenderem o tempo de exposição verificaram perda de atividade substancial. A atividade retornou de 60 a 80% depois que foi retirado o excesso de nitrito do sistema.

Puyol *et al.* (2014), testaram a influência do nitrito ionizado e ácido nitroso livre. Os resultados obtidos sugeriram que, em condições normais de pH (acima de 7,1), o íon nitrito é o principal inibidor da atividade anammox. Em concentrações acima de 400mg N-NO₂ L⁻¹ o nitrito ionizado causou inibição, provavelmente, causada pelo excesso de substrato. O ácido nitroso livre foi capaz de inibir a biomassa anammox, entretanto normalmente a inibição por este composto é causada em valores de pH menores do que 7,1.

3.1.1.2 Amônio

Carvajal-Arroyo *et al.* (2013) testaram diversos compostos normalmente encontrados em águas residuárias, como substratos (NO₂⁻ e NH₄⁺), metabólitos (NO₃⁻ e N₂H₄) e H₂S, O₂, NaCl e PO₄⁺², e suas influências sobre a atividade anammox. Segundo os autores, a inibição por estes tipos de compostos é extremamente relevante uma vez que, devido à baixa capacidade de recomposição da biomassa anammox, o tratamento destas águas residuárias poderia ser condenado através deste processo. Para tal, utilizaram

duas biomassas distintas, granulada e em suspensão, e realizaram testes em reatores em batelada quantificando a produção de N_2 . Os autores notaram uma inibição de baixa a moderada testando amônio, em que os resultados mostraram inibição de, respectivamente, 16 e 34% para cultura granulares e em suspensão quando a concentração deste substrato foi de $616 \text{ mg NH}_4^+-\text{N L}^{-1}$, sendo que a máxima concentração de amônia livre encontrada no reator foi de $6,5 \text{ mg L}^{-1}$.

3.1.1.3 Oxigênio

Strous *et al.* (1997) verificaram a influência do oxigênio na anammox, para tal, utilizaram-se dois diferentes reatores, um de leito fluidizado e outro em batelada. O primeiro, foi operado por 20 dias alternando ciclos de anaerobiose, o qual consiste na injeção de argônio no sistema, e ciclos de aeração, ou seja, injeção de oxigênio. A atividade anammox foi observada somente nos períodos em que não havia aeração no sistema sendo que, nos períodos aerados, observou-se decréscimo da amônia por meio da nitrificação. Já nos reatores em batelada, após testes com concentrações de 2,0; 1,0 e 0,5% de oxigênio não verificou-se anammox em microaerofilia porém, notou-se que o processo foi reestabelecido durante a anaerobiose, concluindo-se então, que a inibição pelo oxigênio não foi irreversível.

3.1.1.4 Crescimento celular

Strous *et al.* (1998) observaram 90% de retenção da biomassa em reator anaeróbio em batelada sequencial (ASBR). Essa retenção foi importante para a anammox devido ao longo tempo de geração celular. Os autores verificaram, também, outras características favoráveis ao processo, e relacionadas com: (1) distribuição homogênea dos substratos, (2) operação segura por mais de um ano e, (3) estabilidade sob condições limitantes de substrato.

Schmidt *et al.* (2003), revelaram que reatores anammox em escala de bancada são compactos e possuem alta taxa de remoção, cerca de $15 \text{ kg N/m}^3\cdot\text{dia}$. A baixa velocidade de crescimentos das bactérias responsáveis pelo processo torna o tempo de retenção do lodo um aspecto extremamente importante neste processo uma vez que, o tempo de

partida dos reatores é muito longo, em torno de 100 a 150 dias, a perda de biomassa é algo não desejado na operação de reatores anammox.

3.1.1.5 Carbono Orgânico

Tang *et al.* (2013) estudaram a carga orgânica de carbono e sua influência sobre a atividade anammox. Os autores notaram que, quando alimentado sequencialmente com grande carga orgânica, variando a DQO de 100 a 800 mg L⁻¹, o reator perdeu grande capacidade de remoção de amônio, sendo esta suprimida após 100 ciclos com concentração de DQO. Na operação de dois reatores de bateladas sequenciais (RBS), um alimentado com carga orgânica (RBS2) e o outro com carga inorgânica (RBS1), para fins comparativos, notaram que depois da adição de matéria orgânica no RBS2, a desnitrificação e a redução do sulfato foram substancialmente aumentadas, concomitante com redução de 75% da atividade anammox específica se comparada a atividade no RBS1, que demonstrou atividade anammox estável.

Chamchoi *et al.* (2008) testaram anammox ocorrendo juntamente a desnitrificação em reator UASB. Os autores confirmaram que os dois processos estavam ocorrendo por meio de várias análises. Neste estudo, após alimentação estequiométrica no sistema, notou-se que houve queda na atividade anammox devido ao aumento das concentrações de demanda bioquímica de oxigênio (DQO) numa relação que variou de 0,9 a 2,0 DQO/N. A partir desta análise os autores afirmaram que o DQO é o agente regulador entre a desnitrificação e a anammox e comprovaram isto suprimindo a atividade anammox por inibição completa ao aumentarem a concentração de DQO até 300 mg L⁻¹ ou relação DQO/N igual a 2 e também comprovaram reduzindo a concentração de DQO e verificando que houve grande queda na desnitrificação, verificando aumento na atividade anammox pela constatação da produção de hidrazina.

3.1.1.6 Carbono Inorgânico

Yang *et al.* (2011), estudaram alta taxa de remoção de nitrogênio utilizando bicarbonato de potássio em concentrações de 125 a 2000 mg L⁻¹ em um reator de coluna ascendente alimentado por água residuária sintética. Os autores chegaram à conclusão de que a matéria inorgânica é positiva para o processo anammox, obtendo, em 32 dias de operação, remoção de 11,8 kg-N/m³ com bicarbonato e 5,2 kg/m³.dia sem bicarbonato.

Constaram ainda, que conforme se aumenta a concentração de bicarbonato, maior é a remoção de nitrogênio.

Kimura *et al.* (2011), testaram o efeito do carbono inorgânico (CI) aplicando alimentações contínuas em bactérias fixadas em gel de suporte, observando, claramente, menor desempenho das bactérias com a diminuição do CI afluente, obtendo remoção de 4,3 kg-N/m³ com concentração inicial de carbono inorgânico 60,0 mg-C L⁻¹ e remoção de 2,4kg-N/m³ com 2,0 mg-C L⁻¹. Em outro estudo, relacionando a concentração de carbono inorgânico e amônio no afluente, determinaram que a relação de CI/N-NH₄ deve ser superior a 0,2, porém após este valor não se apresentam melhoras significativas no desempenho, constataram também, que valores menores do que 0,1 não são adequados ao processo.

3.1.1.7 Potencial Hidrogeniônico (pH)

Segundo Carvajal-Arroyo *et al.*(2013), a atividade anammox é muito dependente das variações do pH e apresentou valores ótimos em torno de 7,3 e 7,5 para as culturas em suspensão e granulares, respectivamente, chegando a apresentar valores de inibição de 20% da produção de gás nitrogênio quando os valores de pH estiveram até 0,3 unidades fora destes valores ótimos de pH.

Outros autores a constatarem a influência do pH foram Dapena-Mora *et al.* (2007) que, em testes de atividade anammox específica (AAE), também analisaram as influências de compostos comumente encontrados em efluentes industriais. Realizaram testes em reatores de bateladas e constaram que as maiores medições da AAE se deram na temperatura de 30°C, pH ótimo de 7,8 e agitação de 150 rpm.

3.1.1.8 Temperatura

Dosta *et al.* (2008), verificaram os efeitos a curto e longo prazos causados pela variação de temperatura, estudando os efeitos de curto prazo em reatores em batelada e os efeitos a longo prazo em reator de bateladas sequenciais. Observaram máxima atividade anammox específica entre 35 e 40 °C e inibição irreversível do sistema devido à lise da biomassa a 45 °C. No RBS operado a longo prazo, com retenção de 75% da biomassa ao longo do tempo, decresceram gradativamente a temperatura de 30 para 15 °C, e obtiveram bons resultados de AAE até 18 °C, observando acúmulo de nitrito a 15

°C, tornando o sistema instável devido à inibição causada pelo mesmo. Os autores concluíram que a eficiência do processo a baixas temperaturas depende da adaptação gradual da biomassa, sendo essa adaptação a chave para operação de um reator anammox nesta faixa de temperatura.

3.1.1.9 Metais

Lotti (2011) utilizou o sistema OxiTop para testar a inibição causada por cobre e zinco provenientes de água residuária de suinocultura sobre a atividade anammox. O autor concluiu que ambos, cobre e zinco, tiveram o mesmo potencial inibidor sobre as bactérias anammox. Entretanto, o cobre demonstrou efeitos mais agressivos a longo termo. Os resultados dos testes indicaram inibição de 25 e 15% para cobre e zinco, respectivamente, quando a concentração destes metais foi de 1 g L^{-1} e num período de exposição de 24 horas.

Bi *et al.* (2014) encontraram valores de IC_{50} de $11.16 \pm 0.42 \text{ mg L}^{-1}$ para cádmio; $11.52 \pm 0.49 \text{ mg L}^{-1}$ para prata; $60.35 \pm 2.47 \text{ mg L}^{-1}$ para o mercúrio. Os autores também relataram inibição de 7,19% da taxa de remoção de nitrogênio em concentração de 40 mg L^{-1} de chumbo. A biomassa utilizada no experimento foi obtida em um reator anammox de coluna com fluxo ascendente em escala de laboratório. A inibição da atividade anammox só foi notada após 24 horas de ensaio e também foi verificado que após 96 horas de recuperação da biomassa, somente cádmio e mercúrio causaram toxicidade substancial da biomassa, enquanto que chumbo e mercúrio permitiram grande recuperação da biomassa.

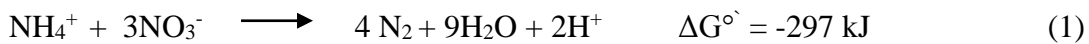
Li *et al.* (2014) testaram diversos metais pesados utilizando biomassa granular advinda de um reator de leito expandido em escala de laboratório. Os resultados do estudo indicaram inibição de 80% da atividade anammox com $5 \text{ mg Cd}^{+2} \text{ L}^{-1}$ e 40% com $40 \text{ mg Ni}^{+2} \text{ L}^{-1}$. O estudo apresentou uma escala de potencial inibitório, seguindo a ordem de toxicidade: $\text{Cu}^{+2} > \text{Zn}^{+2} \geq \text{Pb}^{+2} > \text{Cd}^{+2} > \text{Ni}^{+2}$.

3.1.2 Bioquímica

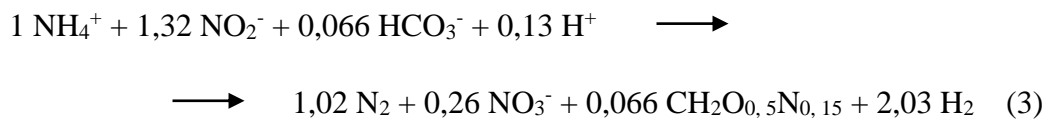
Jetten *et al.* (1998) observaram a produção exclusiva de $^{14-15}\text{N}_2$ em experimentos com amônia ($^{15}\text{NH}_4^+$) e nitrato ($^{14}\text{NO}_3^-$) em reatores em batelada. Esses resultados não

concordaram com a reação postulada por Mulder *et al.* (1995) (Equação 1), pois cada N-amoniaco requer 0,6 N-nitrato produzindo 0,8 N₂, portanto, 75% do gás deveria ser na forma ¹⁴⁻¹⁵N₂ e 25% ¹⁵⁻¹⁵N₂. No entanto, se o nitrito fosse o aceptor de elétrons, no lugar do nitrato, os resultados observados e calculados estariam em acordo.

A anammox envolve a oxidação da amônia, utilizando o nitrito como aceptor de elétrons, para produzir nitrogênio gasoso (Equação 2).



Baseado no balanço de massa, experimentos com culturas anammox enriquecidas indicaram às reações estequiométricas descritas na Equação 3 (STROUS *et al.*, 1998). A proporção de nitrito e amônia não foi exatamente 1:1, considerando que parte do nitrito participa da rota de redução do CO₂ (DEGRAAF *et al.*, 1996).



Jetten *et al.* (1998) utilizaram como inóculo a biomassa do reator desnitrificante em escala piloto, e obtiveram culturas enriquecidas em 4 meses. Essa cultura enriquecida foi inoculada em reator de leito fluidizado alimentado com meio sintético composto de sulfato de amônia, nitrito de sódio, bicarbonato de sódio e elementos traço. Durante 27 meses foram monitoradas as concentrações de amônia, nitrito e as respectivas remoções foram de 84,6% e 99,5%. A velocidade máxima de crescimento (μ) foi de 0,001 h⁻¹ e tempo de geração (T_g) de 29 dias sob tais condições.

3.1.3 Enriquecimento

Uma cultura anammox foi enriquecida por Lopez *et al.* (2008), quando estes utilizaram uma mistura de lodos ativados de estação de tratamento de esgoto e lixiviado

de aterro sanitário em reator de bateladas sequenciais. A presença das bactérias responsáveis pela anammox foi notada após 60 dias de operação, porém, a atividade anammox em si só foi detectada após 78 dias, quando foram consumidos 53% de amônio e 56% de nitrito relativas a concentrações afluentes dos mesmos. Os autores utilizaram a técnica de hibridização com sonda fluorescente específica (FISH) e o resultado foi positivo somente após 152 dias do início do enriquecimento.

Outro método de enriquecimento de biomassa anammox foi utilizado por Third *et al.* (2005), em que os autores utilizaram hidrazina e hidroxilamina, intermediários conhecidos do processo anammox, alimentando reator de bateladas sequenciais com estas substâncias além de amônio e nitrato, o nitrito não foi adicionado para se evitar a inibição pelo mesmo. A amônia teve seu consumo detectado dentro de 47 dias. A partir de então, retiraram-se os intermediários do processo, verificando atividade anammox após 105 dias.

3.1.4 Bactérias responsáveis pelo processo

Diversas bactérias distintas foram apontadas como responsáveis pela atividade anammox. Dentre elas, talvez as mais conhecidas são: *Brocadia anammoxidans* (STROUS *et al.*, 1998) e as *Kuenenia stuttgartiensis*, apontadas como dominantes dentre as comunidades anammox (Schmidt *et al.*, 2000; Strous *et al.*, 2002). Contudo, outras bactérias foram encontradas durante estes 20 anos em que se conhece o processo anammox.

Além das descritas anteriormente, temos as, *Brocadia fulgida*, *Scalindua brodae*, *Scalindua wagneri*, *Scalindua sorokinii*, *Scalindua Arabica*, *Jettenia asiatica* e *Anammoxglobus propionicus* (Zhang *et al.*, 2008; Kumar and Lin, 2010). Algumas bactérias amônio oxidantes também são capazes de oxidar amônio anoxicamente utilizando dióxido de nitrogênio como acceptor de elétrons, como as *Nitrosomonas eutropha* e *Nitrosomonas europaea* (Güven *et al.*, 2004; Jin *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009).

3.1.5 Atividade anammox específica (AAE)

A metodologia para obtenção da AAE foi desenvolvida por Dapena-Mora *et al.* (2004b) através de algumas mudanças na metodologia para determinação da atividade

desnitrificante criada por Buys *et al.* (2000). Para a análise da eficiência desta metodologia, os autores testaram a precisão do método utilizando três diferentes concentrações de nitrito e amônio com 1 g SSV L⁻¹. Os erros relativos encontrados foram abaixo de $7 \pm 4\%$, indicando a eficácia do método através da medição da produção de nitrogênio gasoso para a determinação da máxima AAE.

Entretanto, outras metodologias são utilizadas para a quantificação da atividade anammox. Outra bastante utilizada é a quantificação da produção de nitrogênio através da utilização de um OxiTop[®], o qual é sensível a pequenas alterações na pressão ao longo do tempo. A quantidade de gás produzido ao longo do tempo indica a atividade anammox, assim como no método descrito por Dapena-Mora *et al.* (2004b).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Enriquecimento

O enriquecimento é etapa fundamental no processo de adaptação dos inóculo à nova condição. Essa adaptação foi feita submetendo os inóculo a meio basal descrito por van de Graaf *et al.*(1996), contendo amônio, nitrito, bicarbonato, minerais e elementos traço. Os reatores foram submetidos à atmosfera de Argônio/CO₂ (98/2%) visando garantir condições anóxicas.

A Figura 1 destaca fluxograma das etapas a serem realizadas neste trabalho.

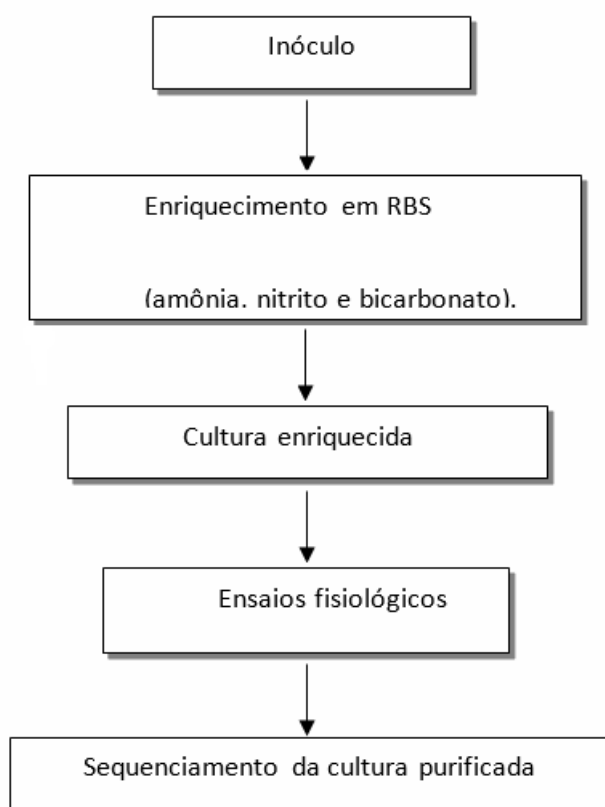


Figura 1 - Fluxograma das Etapas de Trabalho

O fluxograma apresenta as etapas do enriquecimento em RBS. Não se apresenta um fluxograma para a operação do RLF uma vez que este só foi operado para se analisar o enriquecimento no mesmo, não havendo ensaios anteriores ou posteriores neste reator.

4.2 Inoculação e operação dos reatores

4.2.1 Reator de bateladas sequenciais (RBS)

Utilizou-se biomassa do sistema de lodos ativados indústria Volkswagen-Brasil (São Carlos-SP) para tratamento de esgoto sanitário para inocular o reator operado em bateladas sequenciais (RBS).

Previamente à inoculação realizou-se a caracterização do lodo, o qual foi colocado dentro do reator, junto ao meio de alimentação.

A configuração de reator de bateladas sequenciais foi inicialmente escolhida para o enriquecimento devido à sua eficiência em retenção de biomassa, que é condição fundamental nesta etapa, uma vez que microrganismos anammox têm elevado tempo de geração.

O reator foi inoculado com 3 litros de biomassa de sistema de lodos ativados para tratamento de esgoto sanitário da indústria Volkswagen-Brasil (São Carlos-SP), o volume final do reator foi de 5L e a cada batelada foi descartado 3 litros de efluente (Figura 2). A temperatura foi de $30 \pm 2^\circ\text{C}$ e as concentrações iniciais foram $50\text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$, $50 \text{ mg N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$ e $50 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$. O nitrato foi adicionado inicialmente para inibir a atividade de microrganismos redutores de sulfato, uma vez que seu subproduto, o sulfeto, é conhecido inibidor do processo anammox (DAPENA-MORA *et al.*, 2007). A estratégia de alimentar durante 2 horas foi adotada para se evitar o possível acúmulo de nitrito no reator, que pode causar inibição do processo anammox. Os ciclos foram realizados como mostra Tabela 1.

O reator foi alimentado com meio basal descrito na Tabela 2, 3 e 4. A solução traço de metais foi feita com Vanádio, desenvolvida por Martins e Foresti (2012).

Tabela 1 - Etapas e duração de cada batelada

Etapa	Tempo
Enchimento (alimentação)	0-2h
Agitação	0-55,5h
Fluxo de mistura gasosa (Ar/CO ₂) (98%/2%)	0-55,5h
Decantação	55,5-55,83h
Descarte	55,83-56h

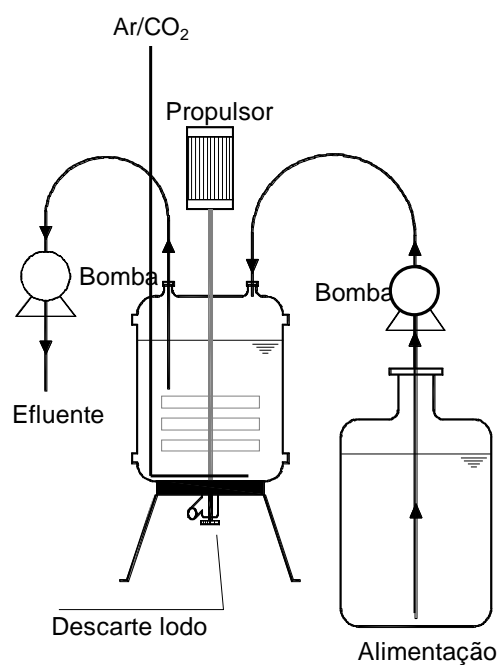


Figura 2 - Esquema do Reator operado em Bateladas Sequenciais

Tabela 2 - Composição do meio basal de cultivo

Componentes	Quantidades – q.s.p. 1000mL de água
NH ₄ Cl	191 mg
NaNO ₂	246mg
NaNO ₃	303,5mg
NaHCO ₃	1000 mg
KH ₂ PO ₄	27,2mg
MgSO ₄ . 7H ₂ O	300mg
CaCl ₂ . 2H ₂ O	180mg
Solução traço I	1ml
Solução traço II	1ml

Fonte: Adaptado de VAN DE GRAAF *et al.*, (1996)

Tabela 3 - Composição da Solução Traço I

Componentes	Quantidades – q.s.p. 1000mL de água
EDTA	5g
FeSO ₄ 7H ₂ O	9,17g

Fonte: Adaptado de VAN DE GRAAF *et al.*, (1996)

Tabela 4 - Composição da Solução Traço de metais II

Componentes	Quantidades – q.s.p. 1000mL de água
EDTA	15g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,45g
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,25g
MnCl ₂ . 4H ₂ O	1,0g
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,25g
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,22g
NiCl ₂ . 6H ₂ O	0,2g
Na ₂ SeO ₃ .6H ₂ O	0,09g
H ₃ BO ₃	0,02g
NH ₄ VO ₃	0,025g

Fonte: Martins e Foresti (2012)

4.2.1.1 Etapas de operação do reator

Devido a complicações na operação do reator em bateladas sequenciais ao longo do tempo, optou-se por algumas mudanças na operação do mesmo. No total, três principais mudanças na operação ocorreram no reator, classificando-as em três períodos de operação.

Primeiro período

Este período se iniciou com a introdução do inóculo no reator e se estendeu até o dia 88 de operação. Foi marcado pela grande instabilidade do sistema como um todo. As bactérias anammox necessitam de grande período de geração celular (SCHMIDT *et al.*, 2003 e STROUS *et al.*, 1998) e adaptação as condições do reator.

A forma de operação deste período foi manual, com alimentações todas as segundas, quartas e sextas-feiras e análise dos dados de efluentes dos mesmos dias. A alimentação neste período foi conforme a necessidade do sistema, uma vez que neste período a biomassa anammox não estava ativa, os substratos adicionados demoravam certo tempo para serem consumidos ou até se acumulavam, portanto, trocou-se o meio quando julgou-se necessário diminuir as concentrações de nitrito, por exemplo, visando diminuir a inibição da biomassa. A alimentação neste período foi efetuada com a troca de 3 litros do meio, mantendo-se 2 litros da biomassa do reator neste processo, tem-se que a concentração no reator é um balanço de massa entre as concentrações do efluente e as concentrações do novo afluente. Para a coleta do efluente, adotou-se um período de 10 a 15 minutos de sedimentação da biomassa (com válvula solenoide ativa, para se interromper o fluxo de Argônio/CO₂ no sistema) para posterior descarte do efluente, visando diminuir a quantidade de biomassa perdida neste processo. Após o descarte, o reator era preenchido manualmente com 3 litros de meio.

A alimentação se desenvolveu nos dias 3, 17, 33, 41, 47, 56, 63, 69 e 84 de operação.

Segundo período

Este período se iniciou no dia 88 e terminou no dia 110. Tem como principal característica a operação em reator de batelada descontínua, quando se transferiu a

biomassa presente no RBS para um frasco completamente vedado para se evitar a contaminação por oxigênio.

Após a transferência da biomassa para o frasco apropriado de dois litros, borbulhou-se Argônio/CO₂ por cerca de 15 minutos, para eliminar completamente o oxigênio do sistema, tornando-o completamente anóxico. A alimentação neste período foi realizada por meio de injeções (*spike*) de solução de alimentação (*feed*) contendo nitrito e amônio e outra solução contendo apenas nitrato injetados dentro do frasco quando notava-se o consumo dos substratos.

As injeções de solução *feed* foram realizadas nos dias 88 e 101, a injeção de nitrato foi realizada no dia 104.

Terceiro período

Este período se inicia no dia 110 e termina no dia 189. A principal característica deste período foi a relativa estabilidade da biomassa anammox no sistema. Iniciou-se após a retirada da biomassa do reator em batelada descontínua e a transferiu para o reator de bateladas sequenciais novamente, isto porque, uma biomassa anammox mais apta é mais resistente a efeitos inibitórios.

A forma de operação deste período foi, ora automática, ora manual, resultando numa operação mais estável do que a do primeiro período. A alimentação neste período foi realizada de duas maneiras distintas, uma por meio de um único meio produzido em um recipiente de 10 litros, suficiente para alimentar três bateladas sequenciais, outra por meio de injeções *spike* dos substratos. O processo de descarte e coleta do efluente foi idêntico ao descrito na primeira etapa.

As trocas de meio foram realizadas nos dias 110, 112, 123, 132, 173, 187 e 189. Já as injeções de solução *feed* foram realizadas nos dias 115, 138, 150, 159 e 161 e as de nitrato nos dias 115, 159 e 161. Também foi injetado certa quantidade de Hidrazina e Hidroxilamina no dia 175 com a finalidade de aumentar a atividade anammox, como descrito por Bettazzi *et al.* (2010).

Na Tabela 5 a seguir estão apresentados os dados detalhados de cada troca/injeção de substratos no reator.

Tabela 5 - Detalhamento da entrada de substratos no reator

Dias	Meio afluente
3	Troca de 3 litros de meio
17	Troca de 3 litros de meio
33	Troca de 3 litros de meio
41	Troca de 3 litros de meio
47	Troca de 3 litros de meio
56	Troca de 3 litros de meio
63	Troca de 3 litros de meio
69	Troca de 3 litros de meio
84	Troca de 3 litros de meio
88	Injeção de 50 mg-N L ⁻¹ de NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ e NH ₄ ⁺
101	Injeção de 50 mg-N L ⁻¹ de NO ₂ ⁻ e NH ₄ ⁺
104	Injeção de 50 mg-N L ⁻¹ de NO ₃ ⁻
110	Troca de 3 litros de meio
112	Troca de 3 litros de meio
115	Injeção de 50 mg-N L ⁻¹ de NO ₂ ⁻ e NH ₄ ⁺
123	Troca de 3 litros de meio
132	Troca de 1,5 litros de meio
138	Injeção de 20 mg-N L ⁻¹ de NO ₂ ⁻ e NH ₄ ⁺
150	Injeção de 20 mg-N L ⁻¹ de NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ e NH ₄ ⁺
159	Injeção de 50 mg-N L ⁻¹ de NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ e NH ₄ ⁺
161	Injeção de 30 mg-N L ⁻¹ de NH ₄ ⁺
173	Troca de 3 litros de meio
175	Injeção de 3 mg-N L ⁻¹ de Hidrazina e 14 mg-N L ⁻¹ de Hidroxilamina
185	Troca de 3 litros de meio
187	Troca de 3 litros de meio

4.2.2 Reator de leito fixo (RLF)

A mesma biomassa presente no RBS foi utilizada para se inocular o Reator de Leito Fixo que deu sequência ao trabalho. Isto porque a utilização de um reator desta configuração facilita o controle de algumas condições do meio, como a contaminação de oxigênio no interior do reator, problema sistemático durante a operação do RBS. Além disso o RLF possibilitaria maior retenção celular.

O RLF utilizado possuía 60 cm de altura e diâmetro de 10 cm e escolheu-se por fixar os suportes em uma disposição simétrica radial contanto com 15 hastes de iguais dimensões, de forma a tornar o escoamento o mais distribuído possível.

A biomassa presente no RBS foi inoculada no RLF sob recirculação durante 7 dias seguidos (sob recirculação) para que se fixasse ao meio suporte do novo reator. Esse processo garantiu que quase toda a biomassa presente no RBS fosse transportada ao RLF.

O volume total do reator foi de 5,5 litros. Inicialmente, alimentou-se o reator com o mesmo meio utilizado no RBS a uma vazão de 0,180 L/h de forma a se manter um tempo de detenção hidráulica de 30 horas. As condições do ambiente foram as mesmas fixadas para o RBS, temperatura foi de $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ e as concentrações iniciais foram $50\text{mg N-NH}_4^+ \text{L}^{-1}$, $50 \text{mg N-NO}_2^- \text{L}^{-1}$ e $50 \text{mg N-NO}_3^- \text{L}^{-1}$. O nitrato foi adicionado inicialmente para inibir a atividade de microrganismos redutores de sulfato, uma vez que seu subproduto, o sulfeto, é conhecido inibidor do processo anammox (DAPENA-MORA *et al.*, 2007). A Figura 3 apresenta um esquema de montagem e operação do RLF.

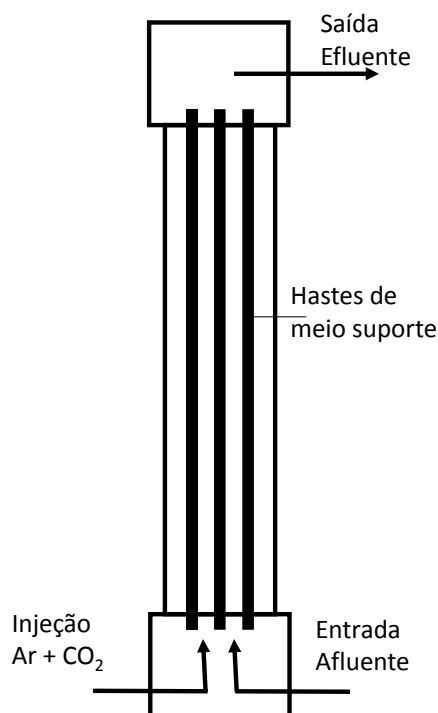


Figura 3 - Esquema do reator de leito fixo

O meio afluente ao reator está descrito na Tabela 2. Sendo que as soluções traço são as mesmas apresentadas nas Tabelas 3 e 4. Contudo, o meio de alimentação do RLF sofreu uma alteração nos valores de nitrogênio adicionados ao afluente a partir do dia 186 de operação, quando aumentou-se as concentrações de nitrito e amônio para 739 mg L^{-1} e 573 mg L^{-1} , respectivamente, mantendo-se todos os outros valores descritos na tabela. Isto porque, a princípio, o reator foi alimentado com concentrações iguais de amônio, nitrito e nitrato. Entretanto, durante os últimos meses de operação decidiu-se por aumentar as concentrações de nitrito e amônio de forma a aumentar a carga de nitrogênio no reator, e também suprimiu-se a adição de nitrato ao meio uma vez que o sistema já estava estável o suficiente.

4.2.3 Teste com lixiviado de aterro sanitário

Os testes de atividade anammox específica foram realizados em frascos de 38 mL preenchidos com 14 mL de meio. Também foram adicionados 10 mL de biomassa e 1 mL de substratos, totalizando 25 mL e reservando espaço para um *headspace* de 13 mL.

O meio utilizado foi uma combinação do meio utilizado no RBS, descrito no item 4.3.1, com diferentes concentrações de lixiviado diluído em água de torneira contendo 1 g L⁻¹ de bicarbonato de sódio, utilizado como fonte de carbono inorgânico.

É importante ressaltar que nos resultados, quando se lê, por exemplo, 50% de lixiviado, significa que o meio do ensaio em questão contém 50% de lixiviado e 50% de água bicarbonatada. Sendo assim, a concentração final dentro do frasco não é, de fato, de 50% de lixiviado. Isto ocorre pois, como o frasco é composto de meio, biomassa e substratos tomou-se como concentração de teste a concentração do meio e não a real.

O primeiro passo na preparação do ensaio foi adicionar 10 mL de biomassa no interior dos frascos onde foram realizados os ensaios. Após a adição da biomassa, esta deve ser lavada para a remoção de quaisquer substratos presentes no lodo. A biomassa foi lavada com solução de fosfato contendo 1.43 g L⁻¹ de KH₂PO₄ e 7.4 g L⁻¹ K₂HPO₄. O procedimento de lavagem foi repetido de 3 a 5 vezes.

Após a lavagem da biomassa, cada frasco foi preenchido com a solução de meio contendo diferentes concentrações de lixiviado. O pH inicial foi definido como 7,8 e utilizou-se solução de HCl (1 mol L⁻¹) ou NaOH (1 mol L⁻¹) para garantia dessa condição.

Os frascos então foram completamente vedados (utilizou-se Parafilm[®] para garantir que não houvesse escape de gás). Após vedados, borbulhou-se hélio no *headspace* dos frascos para se remover quaisquer gases que pudessem estar presentes na atmosfera, o que poderia causar interferência nos resultados. Utilizou-se o gás hélio para se manter condição anóxica nos frascos. A sobrepressão causada pela injeção de gás foi controlada quando se descarregou a quantidade excedente em um frasco com água, garantindo, assim, que o interior dos frascos possuíssem valores semelhantes ao da atmosfera. Após o despejo da pressão excedente, os frascos foram deixados em período de aclimação, quando foram movidos a um *shaker* onde foram mantidos a 30 °C e 150 rpm por, no mínimo, duas horas (DAPENA-MORA *et al.*, 2004b).

Após o período de aclimação, os substratos foram adicionados (70 mg L⁻¹ de N-NO₂⁻ e N-NH₄⁺). Os substratos foram injetados diretamente no interior dos frascos com auxílio de uma seringa após a estabilização do equilíbrio líquido/gasoso. É importante utilizar uma agulha como válvula de escape para se evitar que a adição dos substratos eleve a pressão no interior dos frascos e deve ser retirada imediatamente após este procedimento para se evitar contaminação.

Assim que se termina a adição de substratos, deve ser iniciada a cronometragem e também a medição da pressão interna nos frascos, a qual deve ser realizada a cada 15 ou 20 minutos com a ajuda de um transdutor de pressão. Este equipamento mede a corrente elétrica causada pela diferença de pressão, mensurável através de uma membrana que transmite o sinal elétrico.

Logo após a adição dos substratos, as bactérias anammox começam sua atividade. A produção de nitrogênio gasoso é maior no início do ensaio e diminui consideravelmente após certo período de tempo. Este ponto é facilmente notado e indica quando a produção gasosa não está mais relacionada ao processo anammox, sendo assim, a medição de pressão pode ser finalizada.

Após o fim da medição de pressão, deve ser realizado o ensaio de sólidos suspensos voláteis no interior dos frascos para a obtenção da concentração de biomassa.

A concentração de nitrato foi monitorada e mantida entre 20 e 70 mg L⁻¹ para evitar a redução do sulfato a sulfeto em condições anaeróbicas. Esta precaução se deve ao fato de que, normalmente, os lixiviados contêm grandes concentrações de sulfato e em caso de redução a sulfeto pode representar um grande risco ao ensaio, uma vez que este composto é grande inibidor das bactérias anammox (DAPENA-MORA *et al.* 2004b).

Os ensaios foram realizados em duplicata e a máxima atividade anammox específica foi obtida através do resultado da velocidade de produção de nitrogênio gasoso, produzido de acordo com a metodologia de Buys *et al.* (2000) com as modificações de Dapena-Mora *et al.* (2004b). Além disso, todos os ensaios foram realizados utilizando-se as Biomassas 2 e 3.

O resultado da máxima AAE é obtido através do cálculo da máxima produção de nitrogênio gasoso. O cálculo utiliza a inclinação da reta de pressão x tempo em cada frasco e a máxima atividade é resultado da média de cada um dos frascos da duplicata. A AAE é calculada através da seguinte equação:

$$AAE = \frac{N_{taxa} \times 60 \times 24}{V_{liquido} \times X} \quad (6)$$

Onde:

AAE: Atividade anammox específica, g N-N₂ . (g SSV d)⁻¹

N_{taxa}: Taxa de produção de nitrogênio gasoso, g N-N₂ min⁻¹

V_{liquido}: Volume da fase líquida, L

X: Concentração de biomassa no frasco, g SSV L⁻¹

$$N_{taxa} = Im \times 28 \times \left(\frac{V_{gas}}{R \times T} \right) \quad (7)$$

Onde:

Im: Inclinação máxima da equação de produção de nitrogênio gasoso; atm min⁻¹

V_{gas}: Volume da fase gasosa, L

R: Coeficiente dos gases ideais, atm L . (mol K)⁻¹

T: Temperatura, K.

Com a máxima AAE para cada concentração de lixiviado, a inibição é calculada utilizando-se a porcentagem da atividade que foi mantida com a adição de inibidores em relação à atividade do frasco controle. O resultado deste cálculo provém da equação a seguir:

$$AAE (\%) = \frac{AAE}{AAE_0} \times 100 \quad (8)$$

A IC₅₀ é obtida quando a concentração utilizada no ensaio corresponde à inibição de metade da atividade anammox no frasco controle.

4.2.4 Teste com metais

Os ensaios de atividade anammox com metais seguem estritamente a metodologia descrita por Dapena-Mora *et al.* (2004b). O processo é semelhante ao descrito para o ensaio com lixiviado, diferenciando-se pelo fato de que o meio onde o ensaio é carregado é a mesma solução de fosfato utilizada para a lavagem da biomassa, enquanto que o lixiviado utiliza meio combinado com diferentes concentrações de lixiviado.

Para a adição dos compostos inibitórios, preparou-se uma solução estoque de um metal específico a qual foi injetada de forma com que a concentração final em cada frasco fosse a desejada (levando-se em consideração as diluições). Após esta adição, completou-se o volume até 24 mL com a solução de fosfato. Os compostos inibitórios foram adicionados antes do período de aclimatação para que se alcançassem melhores resultados.

Os ensaios foram realizados em duas etapas. Primeiramente, estudou-se uma variedade maior de concentrações (de 0 a 400 mg L⁻¹, por exemplo). Feito isso, ao analisarem-se os resultados, nos casos em que a IC₅₀ não foi precisamente encontrada, executou-se outro ensaio com uma variação menor entre as concentrações de teste. Neste ensaio de precisão executou-se, por exemplo, ensaios de 30 a 40 mg L⁻¹ a fim de se encontrar o ponto exato da IC₅₀, sempre realizando os ensaios com um frasco controle (com concentração de inibidores igual a zero).

4.3 Técnicas de biologia molecular

4.3.1 Extração de DNA e Sequenciamento gene rRNA 16S – Plataforma PGM da Ion Torrent

Previamente à extração de DNA as amostras foram lavadas (3x) com tampão fosfato, seguida pela centrifugação a 4° C por 3000 rpm durante 10 minutos. Após a lavagem os *pellets* eram imediatamente utilizados para a extração de DNA ou armazenados a - 20°C. O DNA genômico foi extraído baseado na metodologia descrita por Griffiths *et al.* (2000) modificada. Para tanto foi utilizado fenol tamponado com Tris e clorofórmio.

O sequenciamento foi realizado na empresa de biotecnologia GenOne Biotechnologies com sede na cidade do Rio de Janeiro. Para tanto, as amostras foram enviadas com concentração mínima de 10 ng/μL e pureza OD_{260/280} de no mínimo 1,8. O sequenciamento foi realizado em CHIP 318 V2 modo 400 bp. Os primers utilizados foram: 577F (5'- AYTGGGYDTAAAGNG-3') e 924R (5'- CCGTCAATTCMTTTRAGT-3') que amplificam para a região V4, gerando um fragmento de tamanho médio de 347 bp (RDP's Pyrosequencing Pipeline: <http://pyro.cme.msu.edu/pyro/help.jsp>).

4.3.2 Normalização dos dados e análises

A leituras reunidas foram analisadas usando o pacote de MG-RAST software (MEYER *et al.*, 2008), que é uma versão modificada do RAST (Rapid Annotations based on Sub-system Technology). O servidor MG-RAST inicialmente executa um teste de controle de qualidade. Se os dados se apresentarem confiáveis, o sistema filtra automaticamente sequências de regiões de codificação do gene RNAr 16S através de uma busca BLASTX (ALTSCHUL *et al.*, 1997) contra o abrangente banco de dados não redundante SEED compilado a partir de vários centros de sequenciamento disponíveis publicamente e outras fontes (OVERBEEK *et al.*, 2014). Estas bases de dados incluem vários conjuntos de dados de RNAr, por exemplo, GreenGenes (DESANTIS *et al.*, 2006), RDP II (COLE *et al.*, 2014), e base de dados europeia de RNAr 16 S (WUYTS *et al.*, 2002).

As reconstruções filogenéticas dos conjuntos de leituras (das biomassas nitrificante e anammox) foram realizadas utilizando tanto a informação filogenética contida na base de dados SEED e as semelhanças com a base de dados de RNA ribossomal.

A interface de usuário do MG-RAST forneceu um meio de alterar alguns dos parâmetros utilizados para o cálculo reconstrução funcional (MEYER *et al.*, 2008). O percentagem aceitável de identidade foi definido para ser > 85%, o comprimento mínimo de leitura foi > 35 nucleotídeos e o e-valor de ponto de corte foi <10⁻⁶. As leituras que deram origem à sequências foram comparados com o Banco de dados M5RNA disponível no servidor MG-RAST, incluindo um banco de dados não redundante de genes ribossomais de SILVA, GreenGenes e RDP para análises filogenéticas (WILKE *et al.*, 2012). O M5RNA

integra os bancos de dados anteriormente mencionados em um único banco de dados pesquisáveis e oferecido pelo MG-RAST.

5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Foram coletadas amostras afluentes e efluentes dos reatores, analisando concentrações de nitrito, nitrato e amônio a cada batelada subsequente além da análise do pH.

Uma vez que os dados obtidos através da cromatografia iônica vêm relacionados à concentração dos íons determinados (amônio e principalmente, nitrito e nitrato), é necessário aplicar uma fórmula de conversão pois os valores encontrados neste trabalho, bem como na bibliografia, sempre devem estar relacionados a porcentagem de nitrogênio presente no íon em questão, os valores foram calculados seguindo as seguintes equações:

Nitrito

$$N - NO_2^- = X \times \frac{14 \text{ g} - N}{46 \text{ g} - NO_2^-}$$

Nitrato

$$N - NO_3^- = X \times \frac{14 \text{ g} - N}{62 \text{ g} - NO_3^-}$$

Amônio

$$N - NH_4^+ = X \times \frac{14 \text{ g} - N}{18 \text{ g} - NO_2^-}$$

Onde X é a concentração dos íons observada nos métodos analíticos utilizados, na Tabela 6 a seguir estão apresentadas as frequências de análises por semana:

Tabela 6 - Frequência de variáveis analisadas e métodos utilizados

Análise	Método Utilizado	Frequência
Nitrito	Cromatografia de Íons	3/semana
Nitrato	Cromatografia de Íons	3/semana
Amônio	Cromatografia de Íons	3/semana
Amônio	Análise por injeção em fluxo (FIA)	3/semana
SST	Gravimétrico	1/semana
SSV	Gravimétrico	1/semana
SSF	Gravimétrico	1/semana
pH	Potenciométrico	3/semana

As análises de SST, SSV e SSF e pH seguem o método descrito em Standard Methods of the Examination of Water and Wastewater (1998), além disso, ressalta-se que análise por dois métodos do amônio deve-se a mudança do método utilizado partir de certo tempo de operação do sistema, portanto, a partir do 77 de operação, os dados são provenientes da cromatografia de íons, anteriormente a essa data, provenientes da análise por injeção em fluxo (FIA).

As análises de amônio foram feitas pelo método FIA (Análise por injeção em fluxo) segundo APHA (2005) e por meio de cromatografia iônica, bem como as análises de nitrito e nitrato.

O pH foi medido utilizando aparelho Digimed modelo DM-21. Foi utilizado o eletrodo combinado de platina Pt4805 da Mettler-Toledo.

O transdutor de pressão (Figura 4) utilizado nos ensaios de atividade anammox utiliza uma membrana sensível à diferença de pressão para medir a mesma no interior de cada frasco do ensaio. O transdutor é capaz de medir a diferença de pressão e transformar este dado em um valor de potencial elétrico. A calibração do transdutor é simples, sendo esta realizada como na Figura 5.

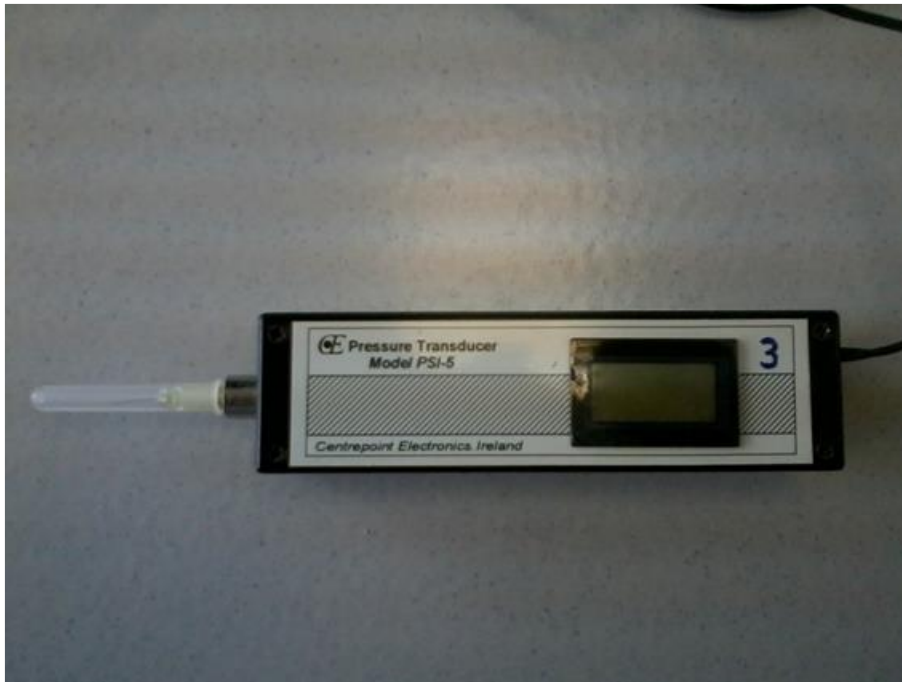


Figura 4 - Transdutor de pressão

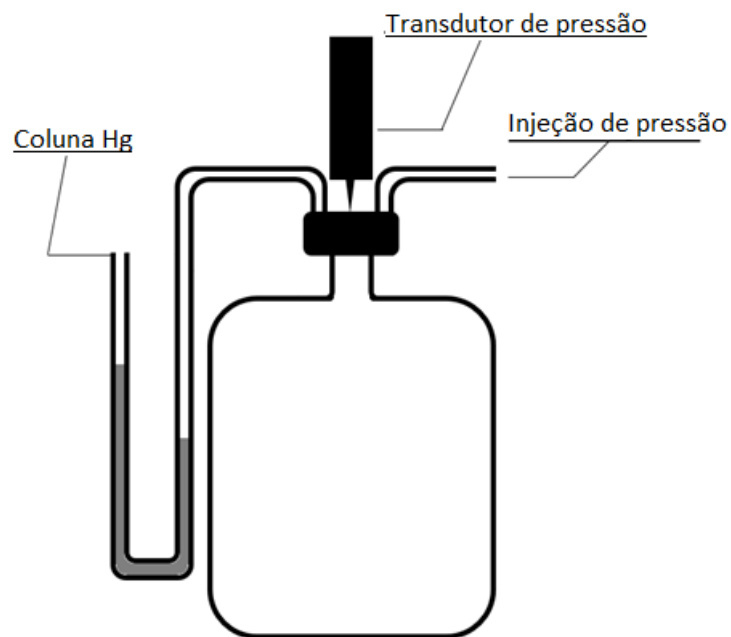


Figura 5 - Esquema de sistema de calibração do transdutor de pressão

O sistema de calibração é simples. Diferentes pressões são introduzidas no interior de um frasco indicando dois valores. Um deles é a corrente elétrica mostrada pelo transdutor, outro é a diferença da coluna de mercúrio (é sabido que 760 mm Hg equivalem a 1 atm). Após repetir o procedimento com diversas pressões distintas, é obtido um

conjunto de valores relacionados de potencial elétrico e pressão é possível construir um gráfico de relação. Com a curva de Pressão (atm) x Potencial Elétrico (mV) é possível retornar o valor da equação para se efetuar a conversão entre as duas unidades.

A análise de sólidos suspensos voláteis ao final de cada medição de pressão segue o mesmo procedimento dito anteriormente.

A Figura 6 a seguir apresenta a composição final dos ensaios de inibição da atividade anammox com diferentes concentrações de lixiviado.



Figura 6 - Composição final do ensaio de inibição por lixiviado com concentração crescente da direita para a esquerda

6 RESULTADOS

6.1 Caracterização do Inóculo

O lodo utilizado no sistema, proveniente do sistema de Lodos Ativados presente na fábrica da Volkswagen-Brasil (São Carlos-SP), foi primeiramente caracterizado quanto a concentração de sólidos em sua composição, analisou-se a concentração do lodo isoladamente, e posteriormente analisou-se a composição final de sólidos no reator. As análises foram realizadas em duplicatas. Os dados são apresentados na Tabela 7 a seguir.

Tabela 7 - Concentrações iniciais de sólidos no reator

	ST (g L ⁻¹)	STV (g L ⁻¹)	STF (g L ⁻¹)	SST (g L ⁻¹)	SSV (g L ⁻¹)	SSF (g L ⁻¹)
Lodo bruto	7,652	7,084	0,568	8,02	7,415	0,605
Composição final no reator	4,5912	4,2504	0,3408	4,812	4,449	0,363

Pode-se observar que o efeito da diluição do meio de alimentação sobre a quantidade de sólidos presente no lodo aeróbio, isto porque foram adicionados 2 litros de meio (sem sólidos) para 3 litros de inóculo. Esta, portanto, é a concentração inicial de sólidos presente no reator a qual sofre um efeito de diminuição ao longo do tempo devido às perdas no sistema na coleta diária do efluente, fora esta manual ou automática.

6.2 Resultados Experimentais

6.2.1 Reator de bateladas sequenciais

6.2.1.1 Concentração de sólidos no reator

Na Figura 7 a seguir, apresenta-se o gráfico da concentração de sólidos no reator ao longo do tempo, até que este foi transferido para o frasco vedado de 2 litros, ou seja, um reator de batelada descontínua, realizado com 88 dias de operação.

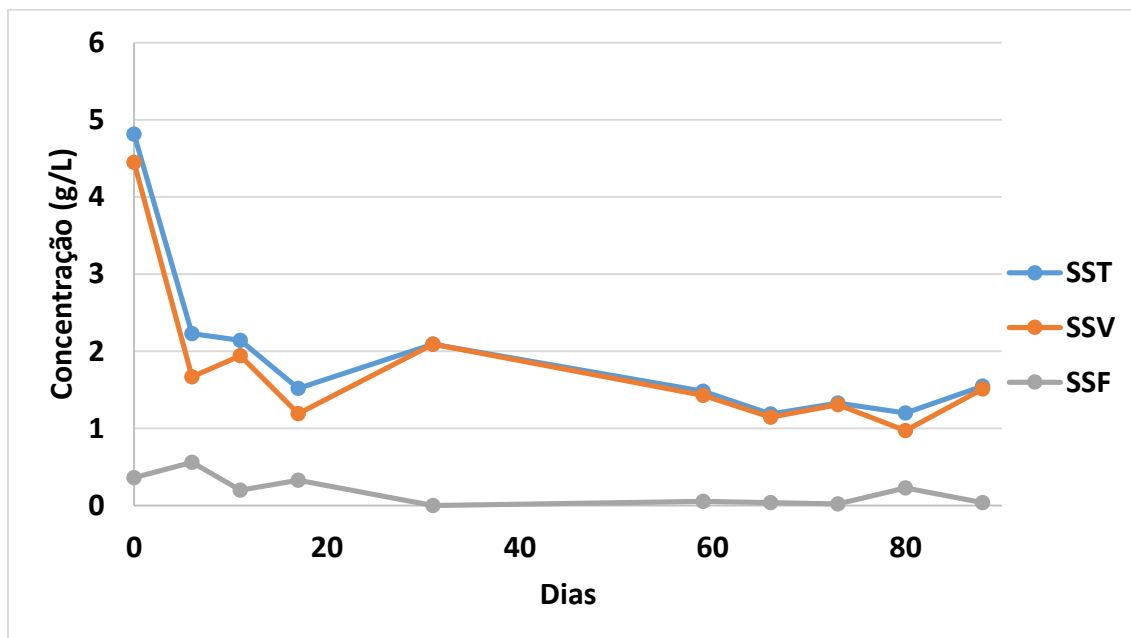


Figura 7 - Concentração de sólidos no reator de bateladas sequenciais

A partir da análise do gráfico é possível notar uma grande queda da concentração inicial de sólidos, presente no inóculo diluído, para a concentração logo antes de se mover o reator para o reator de batelada descontínua (dia 88). Isto ocorre devido a perdas de sólidos pelo efluente e devido à endogenia da biomassa originalmente heterotrófica em meio autotrófico.

A partir do dia 66 a concentração de sólidos no interior do reator tornou-se estável, apresentando reduzida variação até o dia 88. A concentração de sólidos no reator oscilou

em torno de uma concentração de $1,31 \pm 0,17$; $1,23 \pm 0,23$ e $0,08 \pm 0,10$ g L⁻¹ para SST, SSV e SSF, respectivamente.

6.2.1.2 Concentrações de nitrogênio

Na Figura 8 são apresentados os dados de concentrações de amônio, nitrato e nitrito em relação aos dias de operação.

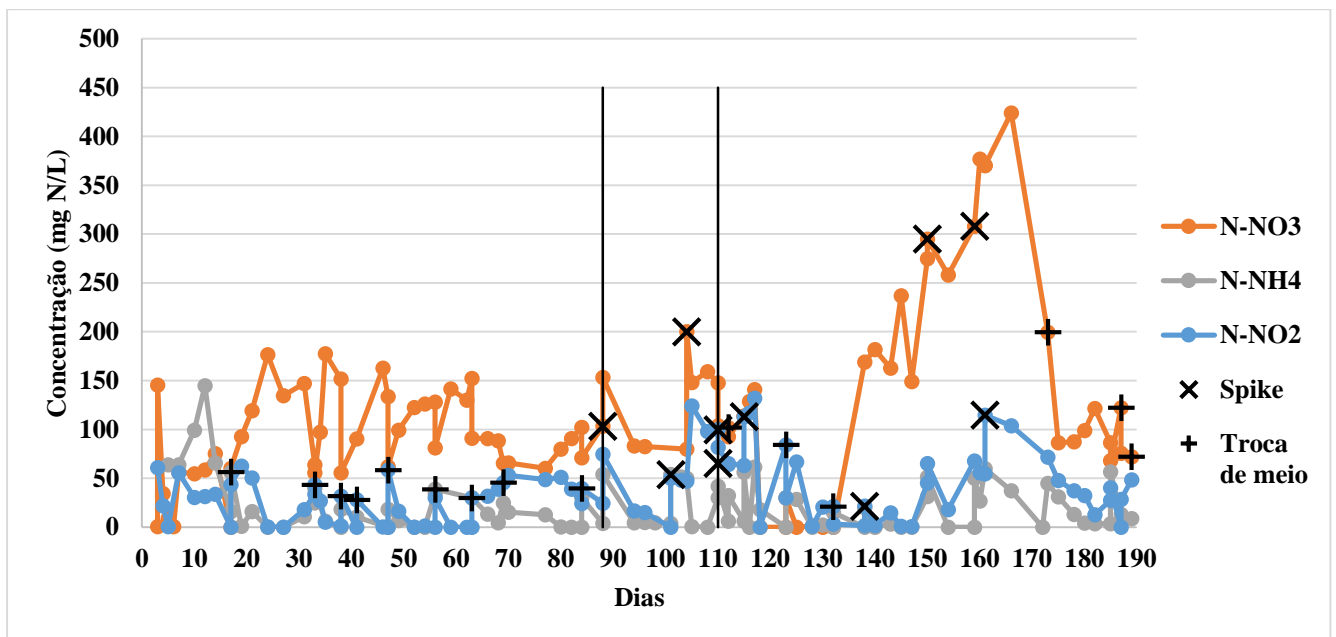


Figura 8 - Concentrações de nitrogênio ao longo do tempo de operação

Neste gráfico, são demonstrados os 3 períodos de operação do sistema. No primeiro, marcado pela instabilidade do sistema, o reator foi operado manualmente, trocando-se o meio conforme os nutrientes fossem acabando, uma vez que, no início da operação, o consumo dos substratos era muito lento, e portanto, este período serviu para estabilização da biomassa ao reator. A segunda etapa, é resultado da mudança do reator para o frasco Duran de 2 litros, completamente vedado, visando diminuir efeitos indesejáveis do exterior na biomassa. A terceira etapa representa o período mais estável da biomassa no sistema e também é relativo à semi-automatização do reator, ora promovendo a troca automática do meio através de um afluyente de alimentação, ora por meio de injeções em *spike*, tanto de nitrato quando de *feed*.

Para melhor entendimento do sistema, é melhor focar no estudo de cada etapa individualmente, visto que estas estão muito bem delimitadas e com resultados bem diferentes, abrindo precedentes para este tipo de análise.

Primeiramente, na Figura 9, é analisado o primeiro cenário do enriquecimento da biomassa.

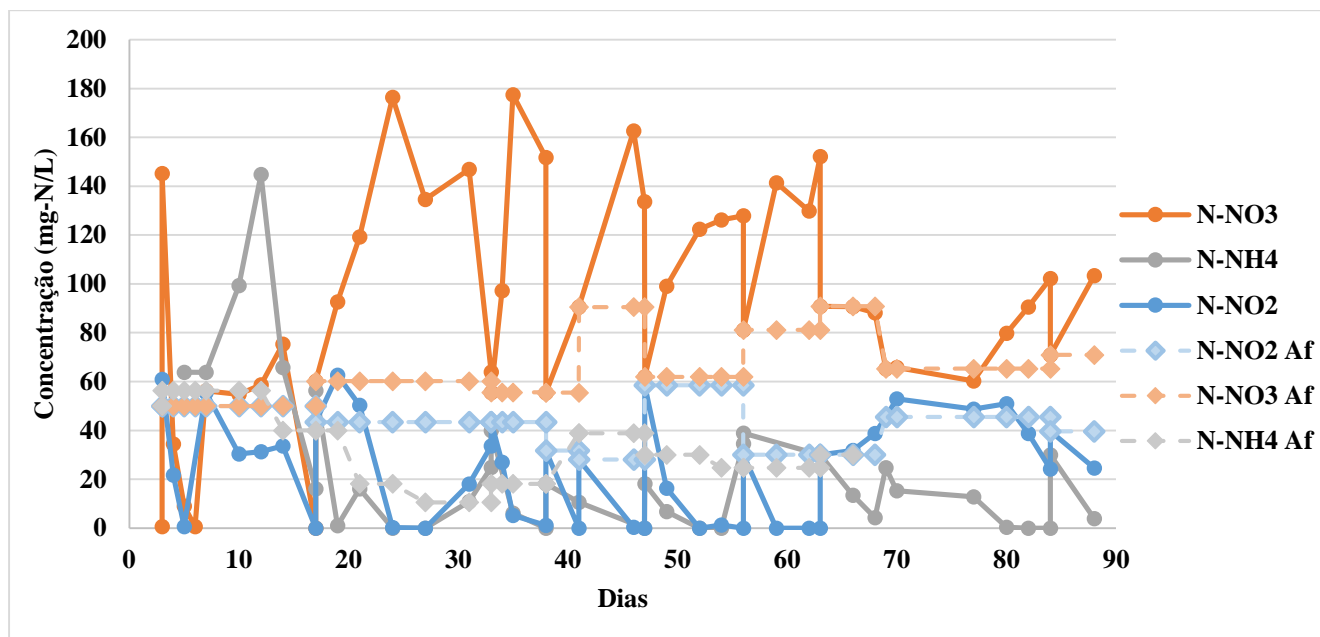


Figura 9 - Concentrações de nitrogênio no primeiro período

Como dito anteriormente, o primeiro período é marcado pela oscilação do sistema. Isto ocorre porque é o período em que a biomassa está se adaptando às condições do ambiente, no caso, o reator.

O maior problema encontrado neste período, além da adaptação da biomassa, foi a contaminação por oxigênio, o que possibilitou nitrificação em alguns períodos, obtendo-se concentração de nitrato na ordem de 150 mg-N L^{-1} no sistema.

No início das análises, as oscilações das concentrações são resultado da adaptação da biomassa ao sistema, neste período, é possível observar consumo de nitrito e amônio, concomitantes (como nos dias 14, 21, 33, 38, 41, 47 e 84), porém não é possível associar este consumo à atividade anammox pois é muito difícil conseguir este processo em tão pouco tempo de operação. Nota-se que em grande parte do tempo a nitrificação foi predominante à desnitrificação, que também ocorreu durante este primeiro período. A

nitrificação necessita do oxigênio para ocorrer. Em análises adicionais realizadas no reator de bateladas sequenciais constatou-se concentrações de oxigênio dissolvido no meio menores do que 1 mg L^{-1} o que explicaria a elevada concentração de nitrato produzida no reator por meio da nitrificação. Esta nitrificação pode ser notada em vários períodos, como do dia 20 ao dia 33; do dia 38 ao dia 46 e 47 ao dia 56.

No período referente ao dia 70 até o dia 88 nota-se os processos de nitrito-oxidação e também amônio-oxidação

Neste período, os valores máximos de concentração foram de $62,56 \text{ mg N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$; $177,46 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$ e $144,83 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$. Segundo Scaglione *et al.* (2012), estas concentrações, principalmente a de nitrito, conhecido inibidor do processo anammox, não apresentam possível ameaça de inibição ao sistema e portanto são consideradas normais.

A seguir, na Figura 10 estão apresentados os dados relativos ao segundo período do RBS onde a biomassa ficou em um frasco vedado.

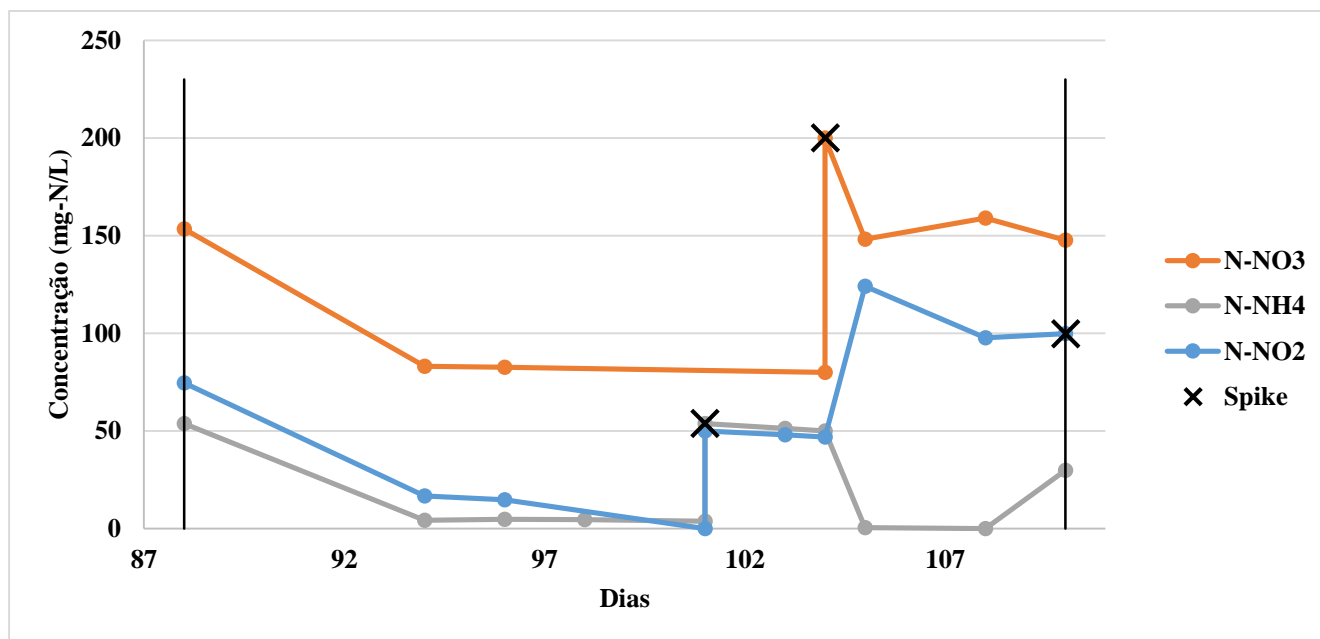


Figura 10 - Concentrações de nitrogênio no segundo período

Devido à contaminação indesejável por oxigênio no RBS, a biomassa foi transferida do reator para um frasco Duran de 2 litros, onde a biomassa foi submetida a anaerobiose, em que se borbulhou mistura de argônio e gás carbônico visando manter a

condição do sistema como totalmente anóxica, e depois vedou-se completamente o frasco.

A maior constatação deste período foi a verificação dos primeiros sinais de atividade anammox no sistema, mostrando que a biomassa anammox já estava ativa porém, inibida. A constatação do processo anammox se deu a partir do 88º de operação até o dia 94, em que notou-se constante depleção do nitrito em conjunto com amônio e inclusive, do nitrato. O tempo necessário para se obter a biomassa enriquecida condiz com o resultado obtido por Martins (2010), em que se obteve a primeira constatação de atividade anammox com 89 dias de operação. A partir de então, pode se dizer que as bactérias responsáveis pela atividade anammox foram enriquecidas.

A partir do dia 94, até o dia 101, a concentração de amônio e de nitrito diminuíram lentamente, assim como a de nitrato, podendo-se atribuir este consumo a uma lenta atividade anammox. O mesmo processo ocorreu do dia 101, após injeção de solução *feed*, até o dia 104, quando se injetou grande quantidade de nitrato no sistema (120 mg-N L⁻¹, chegando à 200 mg-N L⁻¹). A partir deste dia, nota-se o consumo total de amônio com aumento de nitrito. O aumento da concentração de nitrito nestes dias pode ser explicado pela atividade anammox e, com o aumento da atividade anammox, aumentou-se a demanda por substratos, fazendo com que houvesse reposição do nitrito por meio da redução do nitrato a nitrito, como descrito por Kartal *et al.*(2007). Como a velocidade de reposição foi maior do que a de consumo, houve aumento da concentração de nitrito ao longo do tempo. Além disso, observa-se que o consumo de nitrato cessa a partir do dia 105 pois observa-se que a concentração de amônio foi nula, impossibilitando o processo anammox.

Além da análise dos dados, também constatou-se o início da atividade anammox por meio da grande produção de gás no reator, possivelmente devida à atividade anammox. A flotação da biomassa pode ser notada na Figura 11.



Figura 11 - Flotação da biomassa presente no frasco, evidência da atividade anammox

Neste período, as concentrações máximas foram $124,12 \text{ mg N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$; $200,00 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$ e $53,87 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$, respectivamente. Nota-se que o maior valor de nitrito foi atingido no período de redução do nitrato a nitrito, explicado por Kartal *et al.*(2007). O valor de amônio encontrado é mais baixo se comparados com o valor alcançados na etapa anterior, isto porque, com a atividade anammox, o amônio é consumido rapidamente, resultando em valores menores. Porém, os maiores valores de nitrito observados, provavelmente, ainda não são inibitórios.

A terceira etapa representa a consolidação da atividade anammox no sistema e a semi-automatização do sistema. Neste período, tinha-se a ideia de automatizar completamente o sistema de alimentação afluyente e retirada do efluente. Entretanto, em alguns dias viu-se necessário a injeção em *spike* de substratos no reator e portanto não obteve-se a automação completa que se almejava. Um sistema automatizado torna a operação mais padronizada, evitando interferências advindas da operação manual.

Os dados referentes a esta etapa são apresentados na Figura 12 a seguir:

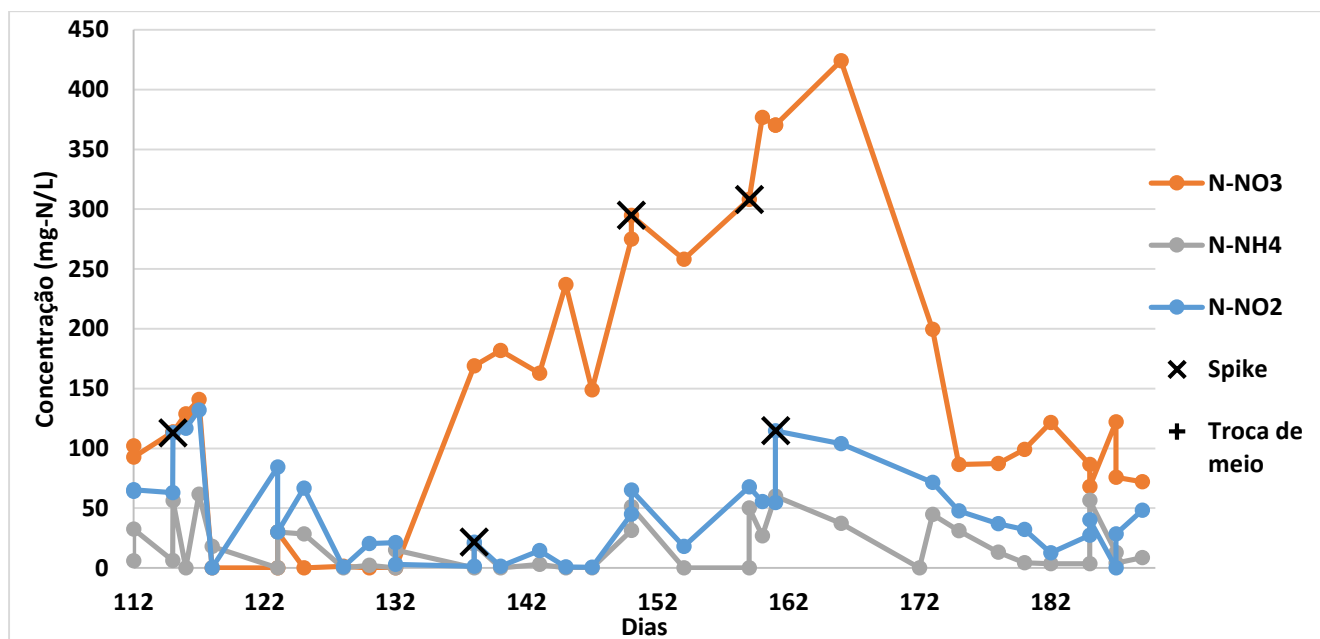


Figura 12 - Concentrações de nitrogênio no terceiro período

Este foi o período mais importante para o enriquecimento da biomassa anammox. Neste intervalo de tempo a biomassa demonstrou atividade no reator, consumindo seus substratos rapidamente, como pode ser visto pelas baixas concentrações de nitrito e amônio ao longo do tempo.

O período que melhor demonstrou a atividade anammox no reator estudado foi o do dia 162 ao dia 182, em que foi possível visualizar um consumo quase que constante dos substratos da atividade anammox, bem como do nitrato, no sistema. Outro período com atividade anammox é o relativo aos dias 117 ao dia 132, em que, se observa quedas sucessivas nas concentrações de amônio e nitrito.

Nota-se ao visualizar o gráfico a grande quantidade acumulada de nitrato após certo tempo, variando de 168,92 mg N-NO₃⁻ L⁻¹ ao dia 138 de operação a 423,96 com 166 dias. Isto ocorreu pela redução do bicarbonato na manutenção celular, e esse nitrato ficou acumulado no reator pois não houve troca do meio. A troca do meio somente ocorreu no dia 172.

Neste período, as maiores concentrações observadas foram de 103,84 mg N-NO₂⁻ L⁻¹; 423,96 mg N-NO₃⁻ L⁻¹ e 61,62 mg N-NH₄⁺ L⁻¹, respectivamente. Mais uma vez, a

concentração de nitrito relatada aqui não apresentou inibição para a biomassa, já que a exposição por curto tempo a esta concentração não provoca efeito sobre a biomassa anammox, como estudado por Bettazzi *et al.* (2010), em que foi relatado inibição de 25% da máxima atividade anammox em concentrações acima de 60 mg N L^{-1} por curto período de tempo. Contudo, nota-se que a atividade anammox foi mais intensa partindo-se desta concentração como inicial e consumindo todo o nitrito do sistema em alguns dias.

Outro dado importante de se salientar foi a adição dos dois compostos tidos como intermediário da atividade anammox, hidrazina e hidroxilamina, em concentrações de 3 mg N L^{-1} e 14 mg N L^{-1} , respectivamente, no 175º dia de operação. É a partir desta data que a atividade anammox foi claramente detectada no reator, como descrito anteriormente, isto porque a presença dos intermediários da atividade anammox facilita o processo, pois estes funcionam como catalisadores, como descrito por Bettazzi *et al.* (2009).

6.2.1.3 Eficiência de remoção de nitrogênio

Como descrito neste trabalho, a atividade anammox é um processo com grande potencial para tratamento de águas residuárias com elevada concentração de amônio. Sendo assim, um parâmetro muito interessante de se analisar é a eficiência de remoção de nitrogênio do sistema. Na Figura 13 estão apresentados os dados de remoção ao longo do tempo de operação do sistema.

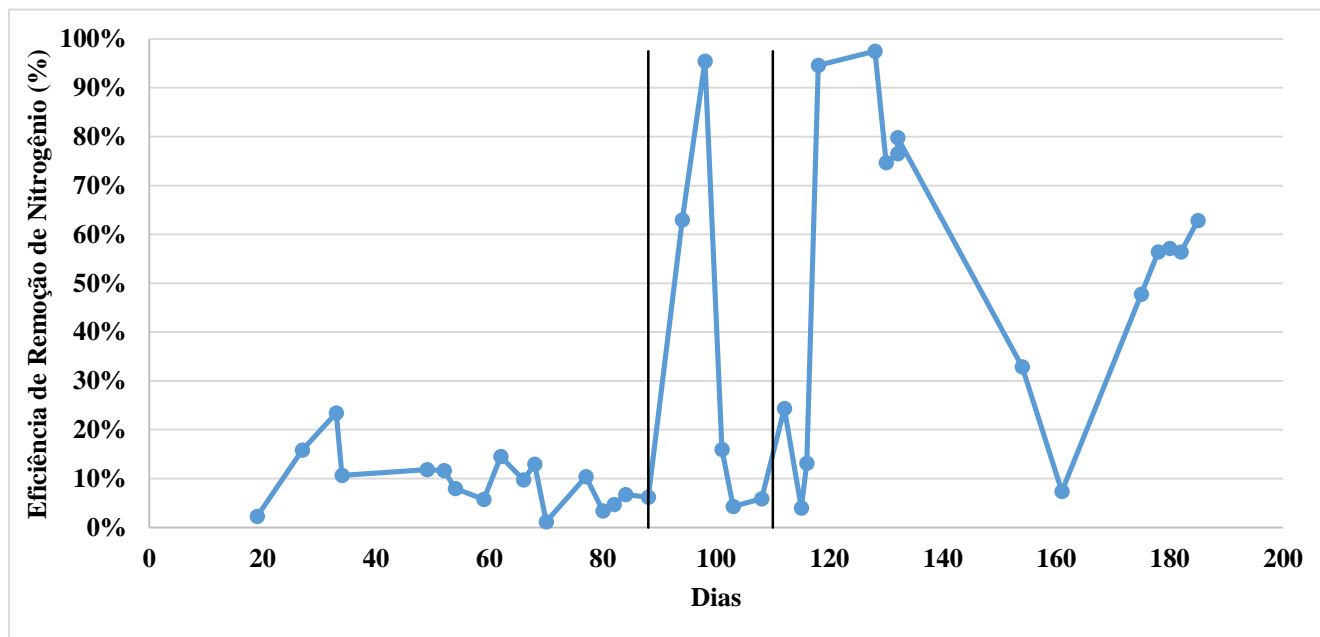


Figura 13 - Eficiência de remoção da carga de nitrogênio ao longo do tempo

Novamente é possível verificar claramente os 3 cenários pelos quais o reator foi operado. Na primeira, como descrito anteriormente, na adaptação da biomassa ao sistema obteve-se uma remoção média de apenas 9,56% da carga total de nitrogênio que entrou no sistema e esta remoção não pode ser relacionada a atividade anammox mas à assimilação de nitrogênio para o crescimento da biomassa

Já na segunda parte da operação, enquanto em reator de batelada descontínua, a eficiência de remoção da carga de nitrogênio aumentou gradativamente, atingindo a média, ainda baixa, de 31,80% de remoção. Ao final deste período, apesar da comprovada atividade anammox, descrita anteriormente, não houve total consumo de nitrito devido à falta de amônio para ocorrência do processo, resultando em baixa eficiência de remoção.

Já no terceiro período, a remoção média da carga total de nitrogênio entre os dias 118 a 132 chegou a 85,84% e de 49,75% nos dias 175 a 187, os quais são os períodos com maior remoção de nitrogênio no sistema devido à atividade anammox presente. No dia 128 obteve-se a maior eficiência de remoção de nitrogênio no sistema, entretanto o dia com maior taxa de remoção de nitrogênio foi o dia 118, chegando a uma taxa de 0,320 kg/m³.dia.

6.2.2 Reator de leito fixo

O metabolismo das bactérias responsáveis pelo processo anammox é altamente sensível. Qualquer alteração nas condições do meio implica em instabilidade para o sistema. Como um dos maiores problemas verificados no RBS onde se deu o enriquecimento da biomassa anammox foi a impossibilidade de se evitar contaminação com oxigênio dissolvido no reator, a solução deste problema foi transferir a biomassa para um reator com estrutura física mais preparada para evitar a entrada de oxigênio no interior do reator e para isto optou-se por um RLF. Isto porque, além desta vantagem, um reator desta configuração tem como vantagem permitir, através de um meio suporte inerte, a imobilização da biomassa, tornando o tempo de retenção celular muito pequeno além de maior concentração celular (Zaiat et al, 1997).

Existem duas possíveis configurações para a construção de um reator de leito fixo, podendo estar ser de leito “empacotado” ou “ordenado”. No primeiro, os suportes para a biomassa são distribuídos randomicamente no volume do reator onde se acomodam. Já no segundo tipo, os suportes são fixados de forma ordenada, sendo, então, dispostos de forma a se manter uma geometria previamente estabelecida. Dentre as duas possibilidades existem vantagens e desvantagens.

No leito “empacotado”, há a possibilidade de se obter uma maior concentração de biomassa em seu volume, uma vez que a distribuição aleatória é capaz de abrigar maior quantidade de suportes inertes no leito do reator. Apesar desta vantagem, a possibilidade de grande acumulação de sólidos entre o material suporte pode criar caminhos preferenciais de escoamento, criando zonas mortas no interior do reator. Já a outra configuração, leito “ordenado”, não possui uma capacidade de retenção de sólidos tão grande, porém, é capaz de melhorar substancialmente a hidrodinâmica do reator, uma vez que, devido a sua geometria definida, evita o entupimento de seu leito e, desta forma, melhora o fluxo no interior do reator.

Na Figura 14 são apresentados os dados de concentrações de amônio, nitrato e nitrito em relação aos dias de operação.

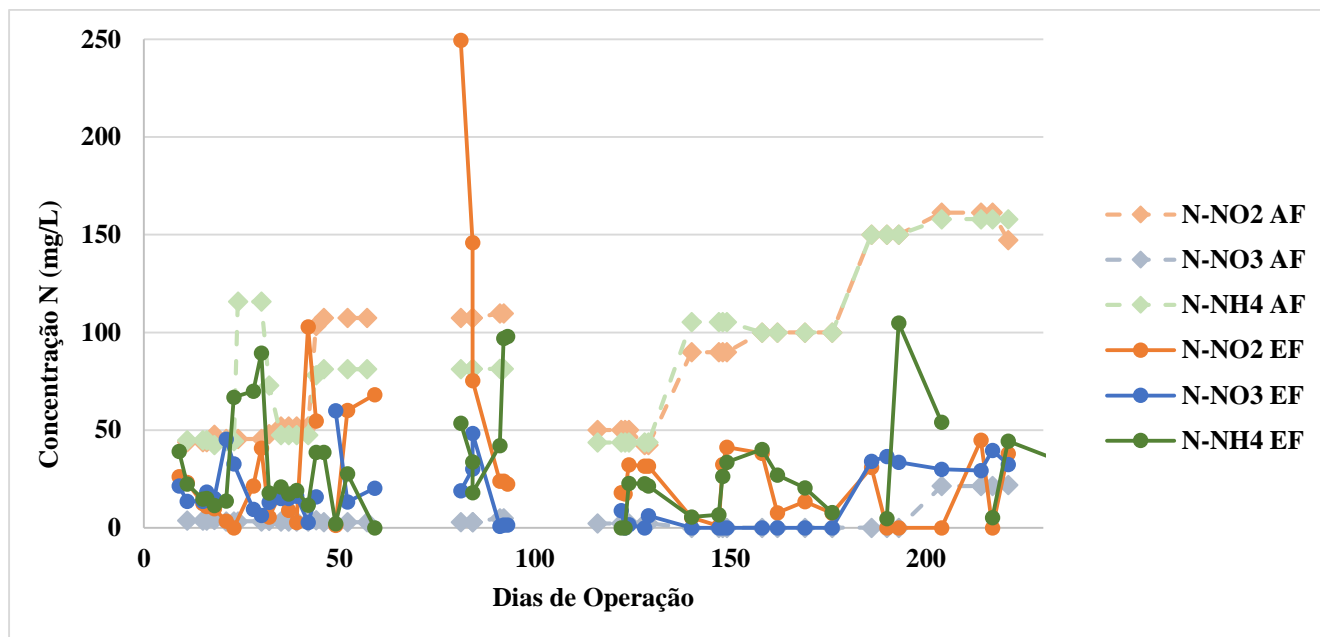


Figura 14 - Concentrações de nitrogênio ao longo do tempo de operação

Para uma melhor visualização deste gráfico, dividiu-se o mesmo em duas partes. As Figuras 15 e 16 apresentam as duas partes do gráfico geral de operação do RLF (Figura 14), numa visão mais detalhada.

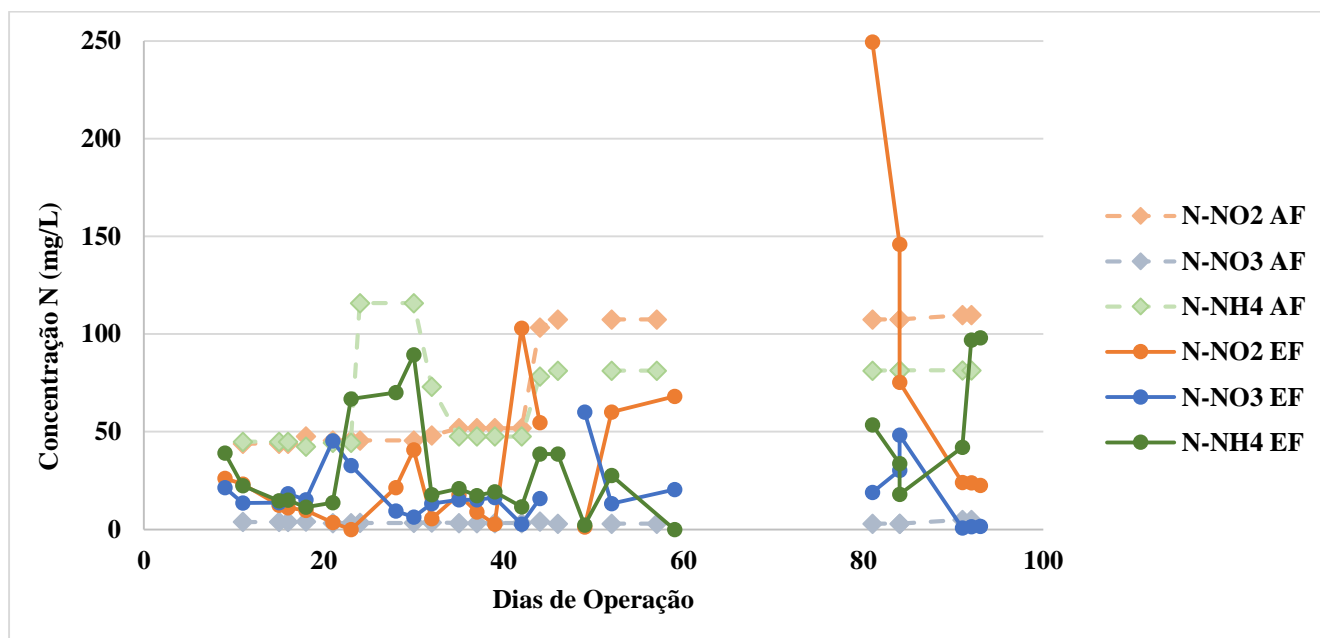


Figura 15 - Concentrações de nitrogênio ao longo do tempo de operação - Primeira parte

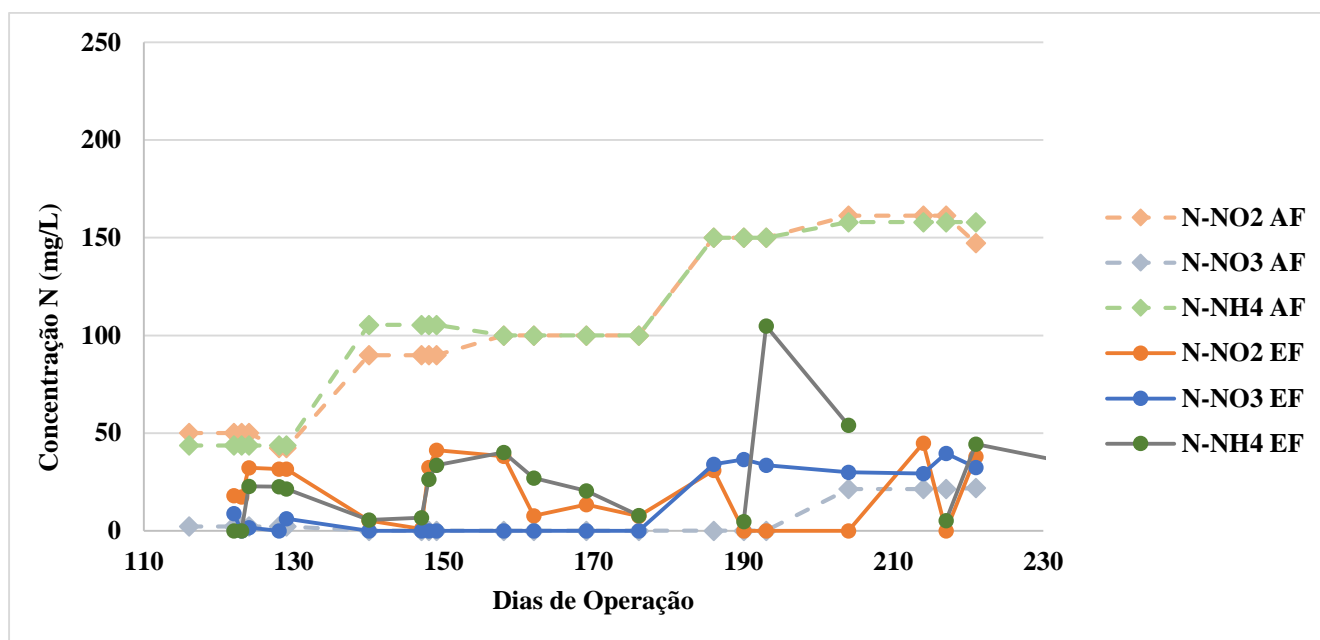


Figura 16 - Concentrações de nitrogênio ao longo do tempo de operação - Segunda parte

Nota-se na Figura 15 que, no início de operação do reator, as remoções de nitrito e amônio foram baixas, entretanto recorrentes, até que no 21º dia houve um acúmulo de amônio no sistema conjuntamente a um acúmulo de nitrato e consumo total do nitrito. Isto ocorreu, possivelmente, porque o consumo total do nitrito fez com que o processo anammox não ocorresse devido à falta de substratos. Pelos próximos 7 dias, observou-se que a concentração de amônio e de nitrito (que sofreu ligeiro aumento até que no dia 30 a remoção deste componente foi próxima de zero) permaneceram constantes.

Até o 40º dia de operação, o processo anammox ocorreu normalmente até que no dia 42 houve um grande acúmulo de nitrito, entretanto a concentração alcançada (103 mg N-NO₂⁻) não é inibitória. Observou-se também neste período um aumento na concentração de nitrato, o que é natural, visto que o processo anammox produz pequena quantidade deste composto.

A partir do dia 60, houve um período de recesso no laboratório, quando acabou o volume do cilindro da mistura Ar/CO₂ provocando um grande aumento na concentração de nitrito, visível no dia 81 de operação. A partir deste dia o reator não apresentou desempenho satisfatório. Sendo assim, decidiu-se por esvaziar o reator e iniciar novamente a alimentação com o intuito de se retirar do reator produtos inibitórios. Essa nova alimentação foi com alimentação com concentração reduzida de nitrito.

Na Figura 16, estão os dados do reator depois de efetuado este processo de partida. No reinício desta operação, nota-se que quase não houve remoção dos compostos nitrogenados, porém, a partir do dia 129, quando decidiu-se por aumentar a carga do reator, houve uma grande remoção de nitrogênio no reator. O desempenho satisfatório implicou em um novo aumento na carga de compostos nitrogenados. Mais uma vez o reator se mostrou capaz de suportar a carga implicada, resultando em altas eficiência de remoção de nitrogênio, como demonstra a Figura 17.

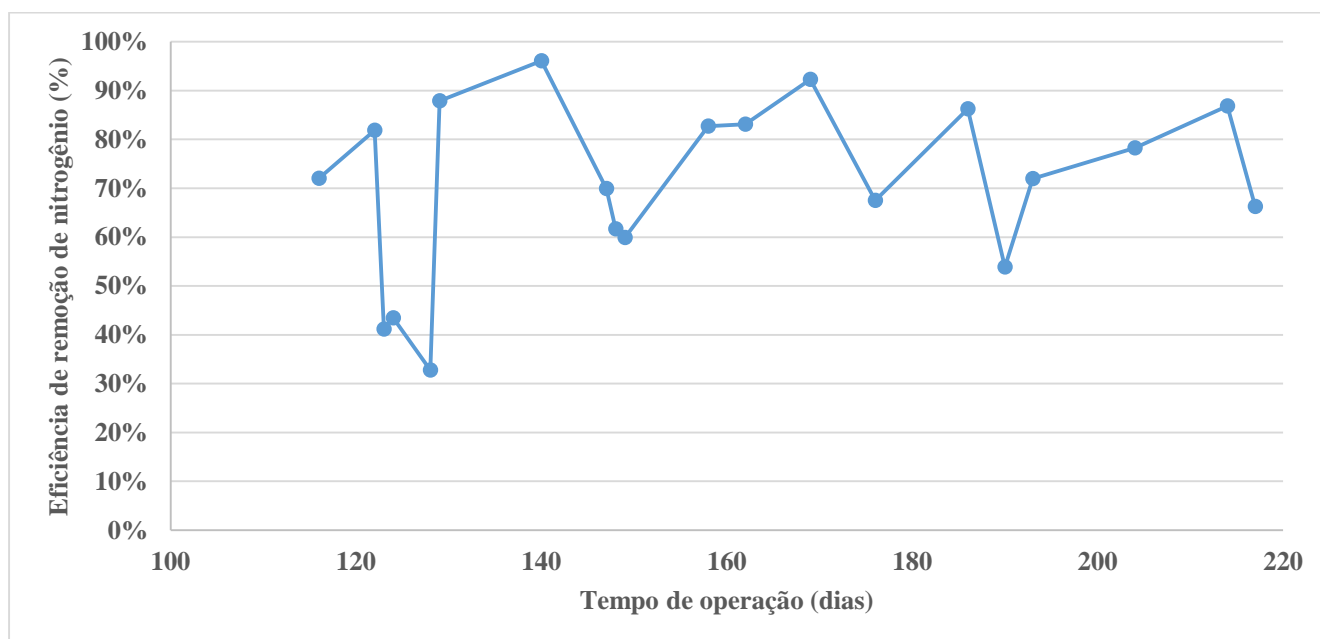


Figura 17 – Eficiência de remoção de nitrogênio do RLF

Observa-se, a partir do primeiro aumento da carga de nitrogênio (dia 128), houve grande aumento da eficiência de remoção de nitrogênio no reator, mantendo uma variação em torno de 75% de remoção. Vale lembrar que estes valores de remoção consistem no cálculo da remoção total de nitrogênio (soma de amônio, nitrito e nitrato), sendo que o processo anammox consome nitrito e amônio produzindo pequena quantidade de nitrato. Se descartado o nitrato do cálculo, as eficiências encontradas no sistema seriam maiores.

A maior taxa de remoção de nitrogênio se deu no dia 140, em que se obteve uma taxa de 0,357 kg/m³.d, referente a uma eficiência de remoção de 96,06%.

A operação do reator continuou após o dia 221, seguindo até o dia 330. Entretanto, problemas com o cromatógrafo de íons impossibilitaram as análises de nitrato e nitrito

durante este período. Apesar disso, os dados de amônio sugerem que o sistema continuou removendo este composto, apontando que o processo anammox continuou ocorrendo. Além disso, houve um acompanhamento do pH tanto do efluente quanto do afluente. A Figura 18 apresenta os dados de amônio e pH no reator.

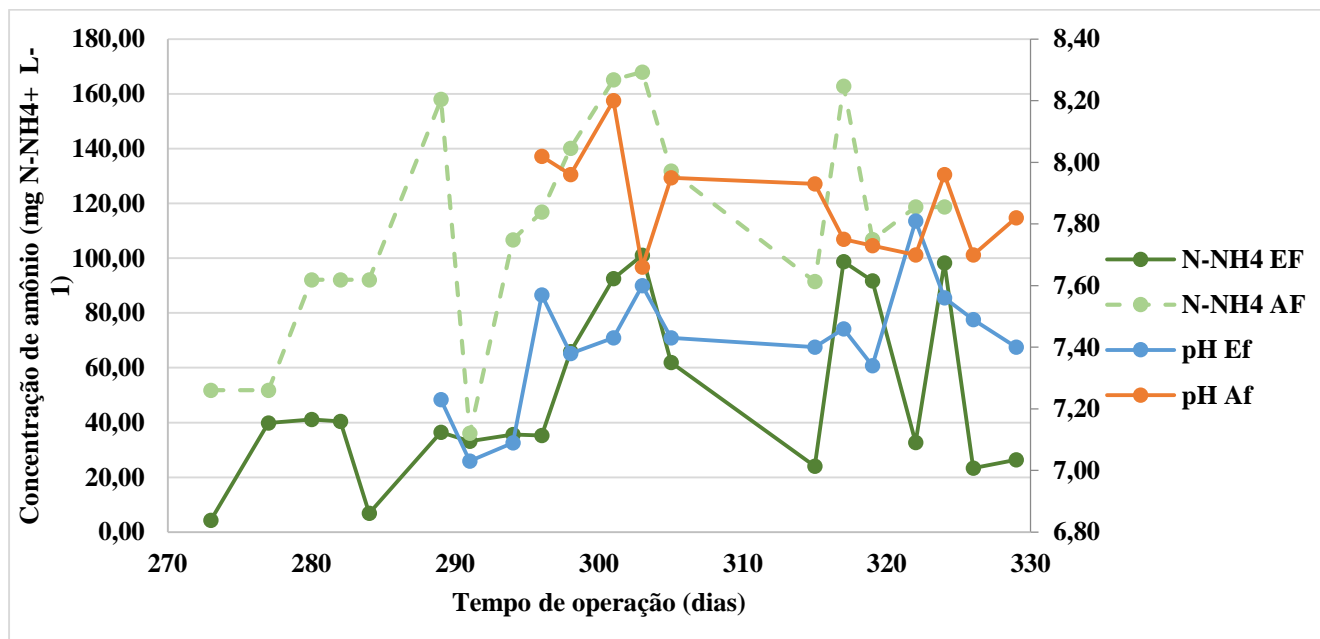


Figura 18- Concentrações de amônio e variação de pH ao longo do tempo de operação

Nota-se que os valores de pH variaram pouco, sendo que os valores de afluente estiveram entre 7,37 e 8,20 e os de efluente entre 7,03 e 7,81, sendo que os valores médios foram de 7,81 e 7,43, respectivamente.

Ao se analisar os dados deste reator, pode-se levantar duas hipóteses. Uma destas é a de que o desempenho da biomassa foi maior pois esta estava mais adaptada ao processo e também a inibidores. Entretanto, a rápida melhora no desempenho do processo quando se inoculou o RLF indica que um dos maiores problemas da operação do RBS foi a contaminação do meio com oxigênio.

Sendo assim, uma outra hipótese é de que o reator de leito fixo é mais estável para se aplicar o tratamento via anammox devido a questões de operacionalidade e portanto mais recomendável quando se utiliza este tipo de tratamento.

Comparando-se os resultados obtidos no RBS e no RLF foi possível perceber que o RLF apresentou melhores resultados do que o RBS. Este fato é surpreendente uma vez

que, teoricamente, um reator de bateladas sequenciais foi utilizado para que se mantivessem as condições do ambiente estritamente dentro das especificadas (condições anóxicas, temperatura de 30°C e rotação de 150 rpm) permitindo assim, menores interferências do meio. Entretanto, o que se verificou neste estudo foi que o reator contínuo (ou seja, com alimentação e descarte de efluente constantes) apresentou maior controle das condições do meio apesar de ser aberto à atmosfera. Este resultado pôde ser notado pela maior eficiência de remoção de nitrogênio e também por não se notar períodos de nitrificação neste reator (exceto no período de recesso, quando se desligou a injeção de mistura Argônio/CO₂ e não houve troca do afluente).

6.3 Análise da composição da biomassa

As Tabelas 8, 9 e 10 a seguir apresentam os resultados da análise de DNA realizada com a biomassa presente no RBS.

O resultado mostrou porcentagem de 0,72% de bactérias relacionadas ao filo *Planctomycetes*, capazes de executar o processo anammox relatado por Strous *et al* (1999a). O resultado mostrou um predomínio de bactérias filamentosas relacionadas ao filo *Chloroflexi*, as quais representaram 32,47% de todas as bactérias encontradas.

Tabela 8. Número de leituras (sequências) por filos e classes encontradas na amostra da biomassa anammox

Filo	Classe	Abundância	Porcentagem
Acidobacteria	Solibacteres	4	1,4
	Não classificadas	235	
Actinobacteria	Actinobacteria	50	0,29
Bacteroidetes	Sphingobacteria	28	2,63
	Cytophagia	420	
Chlorobi	Chlorobia	1	0,005
	Dehalococcoidetes	2	
Chloroflexi	Ktedonobacteria	3	32,47
	Thermomicrobia	6	
	Chloroflexi	5512	
Cyanobacteria	Não classificadas	2	0,01
Fibrobacteres	Fibrobacteria	7	0,04
	Bacilli	54	
Firmicutes	Negativicutes	106	2,31
	Clostridia	233	
Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	1	0,005
Nitrospirae	Nitrospira	239	1,4
Planctomycetes	Planctomycetia	123	0,72
	Alphaproteobacteria	60	
	Deltaproteobacteria	201	
	Betaproteobacteria	361	33,14
	Gammaproteobacteria	4988	
	Epsilonproteobacteria	9	
	Não classificadas	18	
Spirochaetes	Spirochaetia	5	0,02
Thermotogae	Thermotogae	5	0,02
	Verrucomicrobiae	1	0,21
Verrucomicrobia	Spartobacteria	2	
	Opitutae	33	
Não classificadas (<i>Bacteria</i>)	Não classificadas	4295	25,25
Número total de leituras		17006	100

Tabela 9. Microrganismos representativos de cada classe na amostra da biomassa anammox

Filo	Classe	Espécie mais frequente	Abundância	
Acidobacteria	Não classificadas	Candidatus Chloracidobacterium thermophilum	233	
	Solibacteres	Candidatus Solibacter usitatus	4	
Actinobacteria	Actinobacteria	Acidimicrobium ferrooxidans	16	
Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Terrimonas ferruginea	12	
	Cytophagia	Flexibacter flexilis	357	
		Flexithrix dorotheae	53	
Chlorobi	Chlorobia	Chlorobaculum parvum	1	
Chloroflexi	Dehalococcoidetes	Dehalococcoides ethenogenes	2	
	Ktedonobacteria	bacterium SOSPI-142	3	
	Thermomicrobia	Thermomicrobium roseum	6	
	Chloroflexi	Herpetosiphon aurantiacus	5512	
Cyanobacteria	Não classificadas	Pleurocapsa sp. PCC 7314	1	
Fibrobacteres	Fibrobacteria	Fibrobacter intestinalis	7	
	Firmicutes	Bacilli	Bacillus licheniformis	17
		Negativicutes	Megasphaera elsdenii	82
		Clostridia	Veillonella atypica	22
			Peptoniphilus asaccharolyticus	108
Caldicellulosiruptor lactoaceticus	60			
Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	Gemmatimonas aurantiaca	1	
Nitrospirae	Nitrospira	Candidatus Nitrospira defluvii	217	
Planctomycetes	Planctomycetia	Pirellula staleyi	68	
Spirochaetes	Spirochaetia	Leptospira interrogans	5	
Thermotogae	Thermotogae	Kosmotoga olearia	5	
Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Pedosphaera parvula	1	
	Spartobacteria	Chthoniobacter flavus	2	
	Opitutae	Opitutus terrae	21	

Tabela 10. Organismos representativos das classes de *Proteobacteria* presentes na biomassa anammox

Classe	Família	Espécie mais frequente	Abundância
Alphaproteobacteria	Rhodospirillaceae	Rhodospirillum rubrum	8
Betaproteobacteria	Burkholderiaceae	Burkholderia sp. Br3469	31
	Nitrosomonadaceae	Nitrosomonas europaea	46 ¹
	Rhodocyclaceae	Azoarcus toluityticus	10
Gammaproteobacteria	Ectothiorhodospiraceae	Thiohalospira halophila	2322
	Salinisphaeraceae	Salinisphaera sp. S8-3	144
	Ectothiorhodospiraceae	Nitrococcus mobilis	1 ²
Deltaproteobacteria ³	Desulfovibrionaceae	Desulfovibrio sp. LS1101/00	6
Epsilonproteobacteria ⁴	Não classificada	Nitratiruptor sp. SB155-2	1

¹ O gênero *Nitrosomonas* sp. apareceu em 62 sequências e o gênero *Nitrosospira* sp. em 10 sequências

² Esse número de sequência não é representativo e a espécie foi adicionada à tabela somente por seu metabolismo de oxidação do nitrito.

³ A maioria das sequências encontradas foi relacionada a bactérias não cultivadas (190).

⁴ As outras oito sequências foram relacionadas a bactérias não cultivadas.

6.4 Ensaios de atividade anammox específica

6.4.1 Caracterização da biomassa

Como foram utilizadas três distintas biomassas para os ensaios de inibição, se viu necessária a caracterização para se analisar as características destas biomassas.

O processo de obtenção do diâmetro médio dos grânulos utiliza fotografias obtidas por meio de uma câmera acoplada a um microscópio e o auxílio de um software (RSImage). Após a captura das imagens, estas são enviadas a um software de cálculo (Image-Pro Plus) onde são processadas e retornam o valor do diâmetro médio dos grânulos. É importante ressaltar que, para melhores resultados, são necessárias fotografias de pelo menos 200 grânulos, para confiar representatividade à amostra. Além disso, para o cálculo, são considerados grânulos aqueles com mais do que 0,30 mm de diâmetro.

6.4.1.1 Biomassa 1

Em comparação às outras biomassas, esta biomassa apresentou a menor atividade específica e diâmetro médio. Uma das hipóteses da atividade ser menor é devido ao fato de que esta amostra estava guardada sob refrigeração por dez dias antes de se iniciarem os testes de inibição. Isto ocorreu pois o *shaker* necessário para o ensaio de atividade estava em uso durante este tempo. Sendo assim, para confirmar esta hipótese, realizou-se um estudo de manutenção da atividade anammox ao longo do tempo em que a biomassa esteve presente no refrigerador (item 7.4.1.4).

A Figura 19 mostra exemplo de imagem capturada para o cálculo do tamanho dos grânulos bem como exemplos dos grânulos presentes na amostra 1.

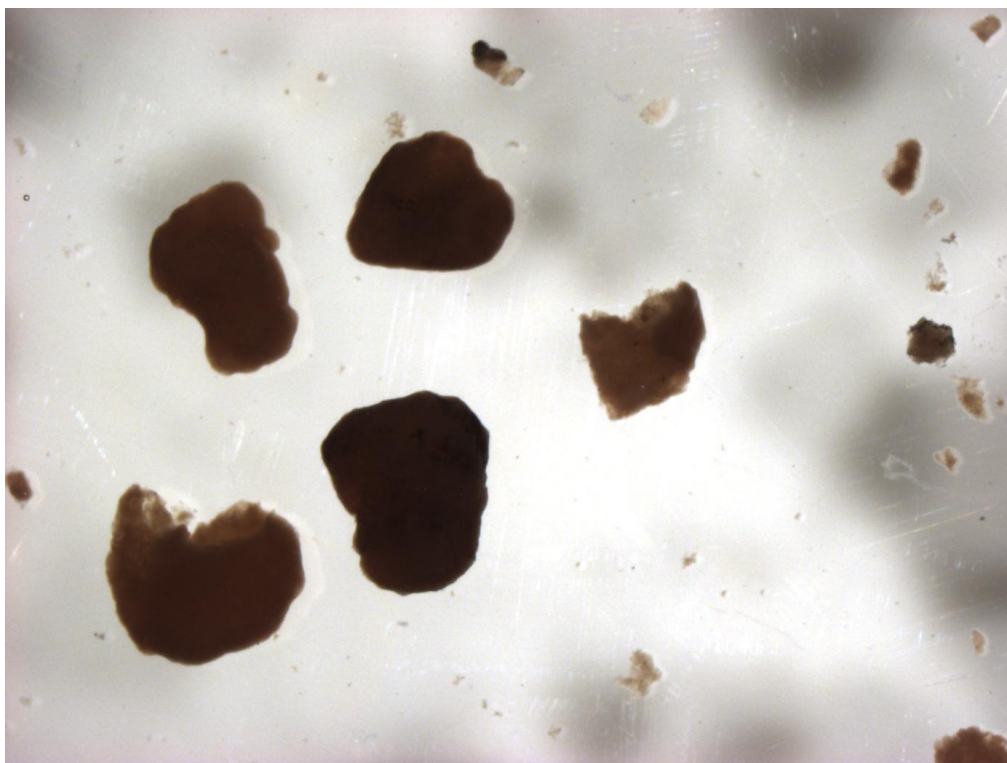


Figura 19 - Exemplos de grânulos presentes na Biomassa 1 – Sem escala

O cálculo do diâmetro médio dos grânulos desta amostra resultou num valor de 2,51 mm enquanto que o maior grânulo encontrado possuía diâmetro de 5,91 mm.

6.4.1.2 Biomassa 2

Dentre as três biomassas, esta foi a que desenvolveu atividade anammox específica mediana apesar de possuir o maior valor de diâmetro médio dos grânulos.

A Figura 20 mostra exemplos de grânulos presentes na Biomassa 2.

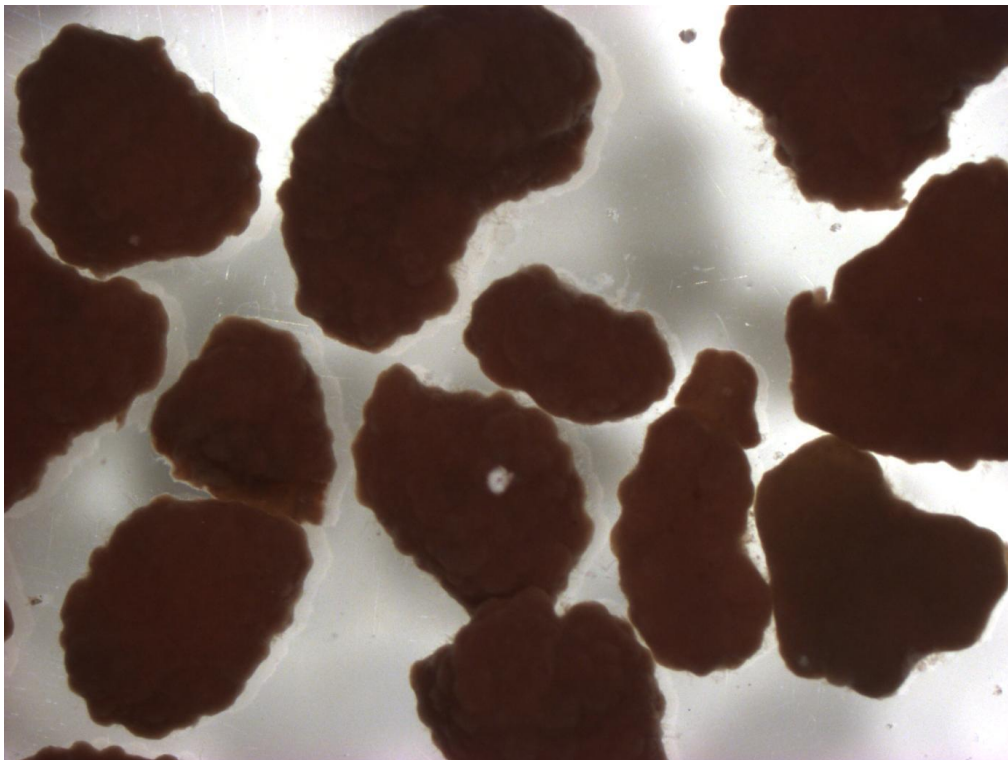


Figura 20 - Exemplos de grânulos presentes na Biomassa 2 – Sem escala

O diâmetro médio resultante do cálculo foi de 3,36 mm. O maior grânulo encontrado foi de 5,85 mm.

6.4.1.3 Biomassa 3

Esta biomassa possuía a maior atividade dentre as três biomassas apesar de ser a com menor diâmetro médio dos grânulos.

A Figura 21 apresenta exemplos dos grânulos presentes na Biomassa 2.

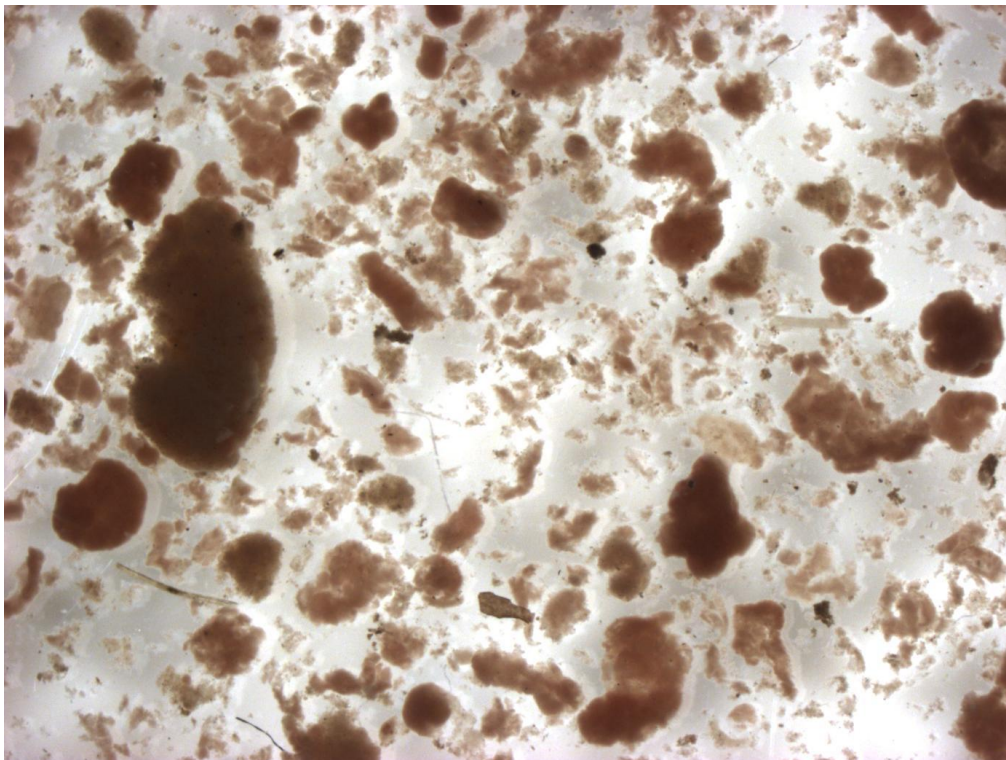


Figura 21 - Exemplos de grânulos presentes na Biomassa 3 – Sem escala

O diâmetro médio dos grânulos desta amostra foi de 1,24 mm. O maior grânulo encontrado possuía 4,05 mm de diâmetro.

A Tabela 11 a seguir apresenta um resumo da caracterização das três biomassas utilizadas nos ensaios.

Tabela 11 - Caracterização da Biomassa

Parâmetro	Biomassa 1	Biomassa 2	Biomassa 3
Diâmetro médio (mm)	2,51	3,36	1,25
Atividade média (g N-N ₂ (g SSV·d) ⁻¹)	0,26	0,34	0,41

6.4.1.4 Manutenção da atividade no refrigerador

Como dito anteriormente, viu-se necessário realizar um estudo para verificar o comportamento do desempenho de uma biomassa que passou um longo período estocada em refrigerador a 4 °C.

O estudo foi realizado com a Biomassa 1 e consistiu na comparação da atividade desta biomassa com outra que estava guardada em refrigerador por um período de tempo considerável. Os resultados estão apresentados na Figura 22.

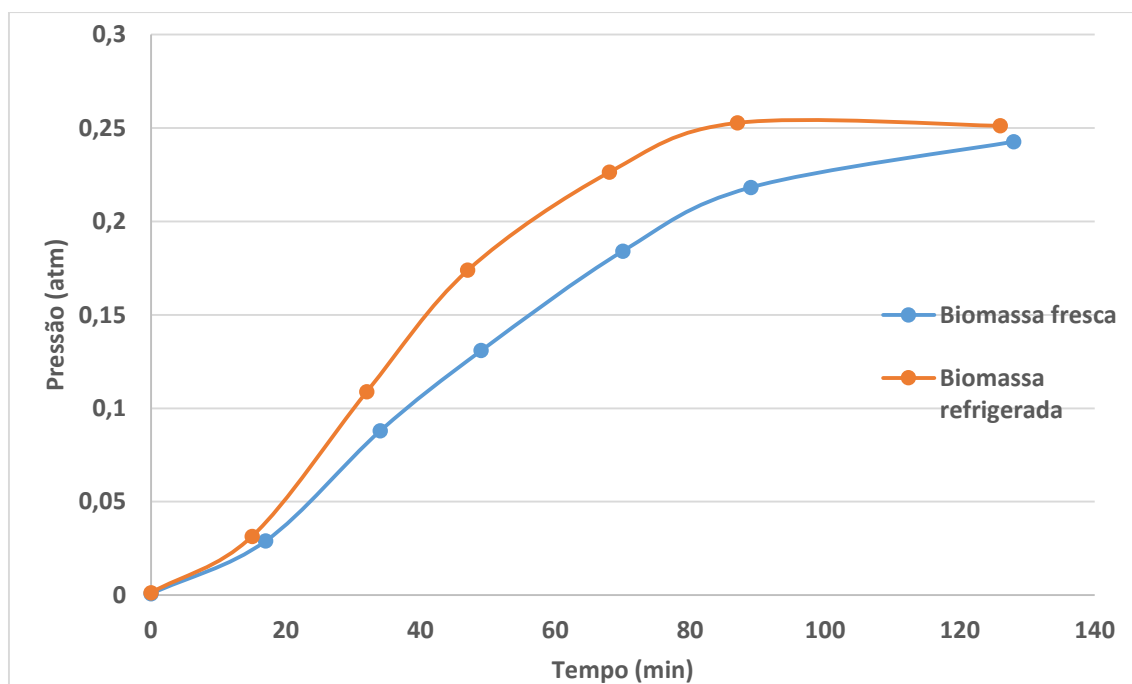


Figura 22 - Ensaio para verificação da manutenção da AAE de uma biomassa resfriada

A partir do gráfico é possível notar que a atividade foi maior com a biomassa refrigerada. Enquanto a biomassa fresca apresentou uma atividade de $0,28 \text{ g N-N}_2 (\text{g SSV} \cdot \text{d})^{-1}$ a refrigerada produziu $0,39 \text{ g N-N}_2 (\text{g SSV} \cdot \text{d})^{-1}$.

A biomassas utilizadas neste ensaio foram diferentes. Uma possível explicação para maior atividade da biomassa refrigerada é que ela estava mais ativa quando foi refrigerada e, mesmo após a redução da atividade pela refrigeração, ela se mostrou com maior atividade do que a biomassa fresca. Indicando que foi possível estocar a biomassa anammox.

6.4.2 Ensaios com lixiviado

Três ensaios diferentes foram realizados para testar a inibição da atividade anammox causada por lixiviado. O primeiro foi realizado sem a adição de nitrato para evitar a redução do sulfato. O segundo foi realizado conforme o procedimento padrão enquanto que o terceiro foi realizando mantendo a biomassa em contato com o lixiviado por 72 horas (com adição de nitrato) antes de se iniciar o ensaio.

A Tabela 12 apresenta a caracterização do lixiviado da cidade de Lousame/Espanha, o qual foi utilizado nos ensaios de inibição com lixiviado de aterro sanitário.

Tabela 12 - Caracterização do lixiviado do aterro sanitário da cidade de Lousame/Espanha

Parâmetros	Valores	Parâmetros	Valores
pH	5,31	Fe	4,000 mg L ⁻¹
DQO	6.373 mg L ⁻¹	Zn	0,320 mg L ⁻¹
Amônio	889 mg N-NH ₄ ⁺ L ⁻¹	Pb	0,035 mg L ⁻¹
Nitrito e Nitrato	Nd	Cd	<0,005 mg L ⁻¹
Sulfatos	301 mg L ⁻¹	Ni	0,210 mg L ⁻¹
Fosfato (Ptotal)	26 mg L ⁻¹	Mn	1,200 mg L ⁻¹
Alcalinidade total	6.890 mg L ⁻¹ mg CaCO ₃ L ⁻¹	Cu	<0,100 mg L ⁻¹
Alcalinidade Intermediária		Cr	<0,005 mg L ⁻¹

Sobre os lixiviados, é importante ressaltar que o tempo de operação do aterro sanitário tem grande influência na composição do lixiviado. Aterros mais novos tendem a possuir maior quantidade de matéria orgânica facilmente degradável enquanto que aterros maduros também possuem grande concentração de matéria orgânica entretanto não facilmente degradável. Este fator é importante pois como já citado, a matéria orgânica é inibidora da atividade anammox (TANG *et al.*, 2013 e CHAMCHOI *et al.*, 2008)

O lixiviado utilizado nos ensaios de inibição é considerado novo, com cerca de 10 anos de operação do aterro sanitário e por este motivo possui alta concentração de matéria orgânica facilmente degradável. Outro fator notável nesta caracterização foi, principalmente, a baixa concentração de amônio no dia da coleta (889 mg N-NH₄⁺ L⁻¹), entretanto, a concentração deste composto normalmente variava em torno de 3000 mg N-

$\text{NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$. Isto aconteceu pois a coleta deste lixiviado se deu em um período muito chuvoso na região, o que acabou diluindo as concentrações de todos seus componentes.

Todos os ensaios foram realizados em duplicata e também com a utilização das Biomassas 1 e 2 para se realizar a comparação dos resultados.

6.4.2.1 Primeiro ensaio

A seguir apresentam os resultados do ensaio de inibição por lixiviado sem a adição de nitrato. As Figuras 23 e 24 apresentam o resultado quando utilizou-se a Biomassa 2 enquanto que as Figuras 25 e 26 apresentam os resultados para a Biomassa 3.

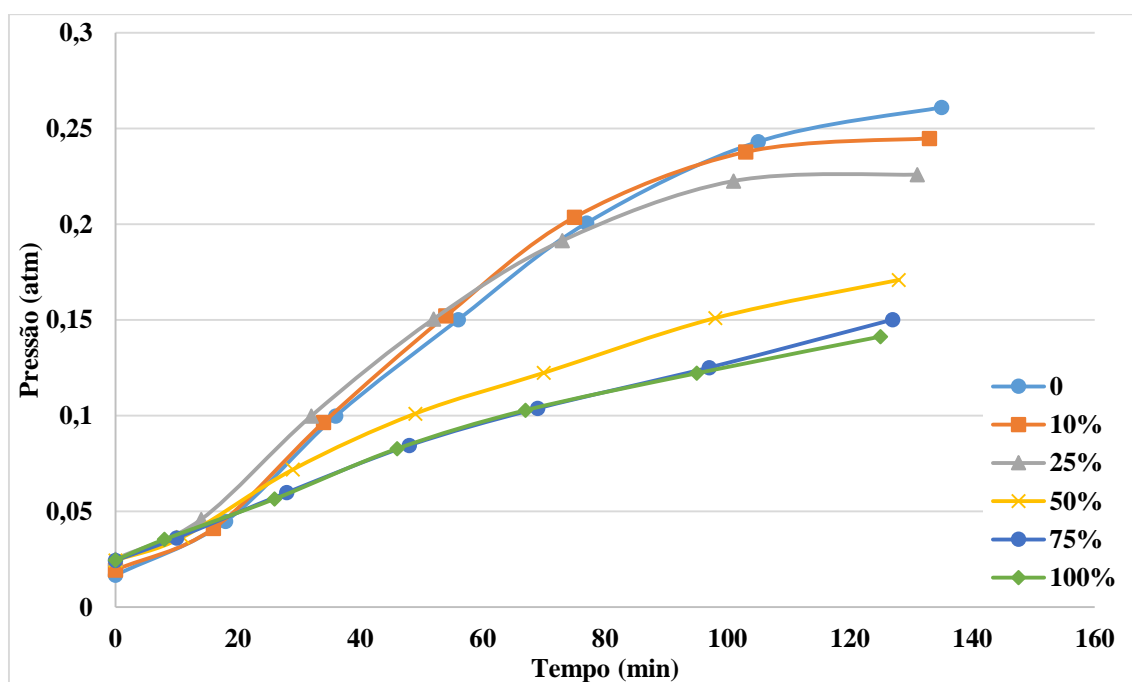


Figura 23 - Primeiro ensaio de inibição por lixiviado utilizando Biomassa 2

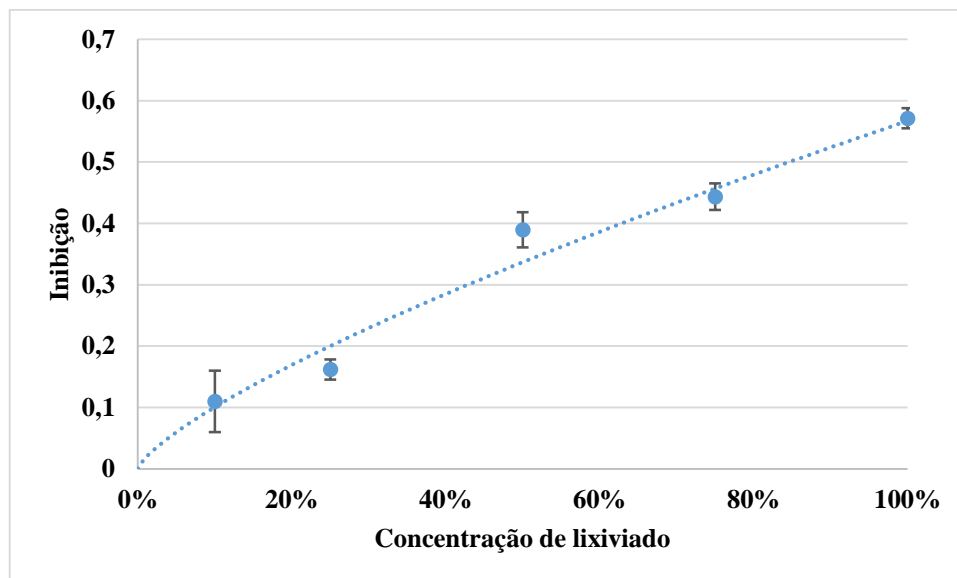


Figura 24 - Curva de inibição do primeiro ensaio utilizando Biomassa 2

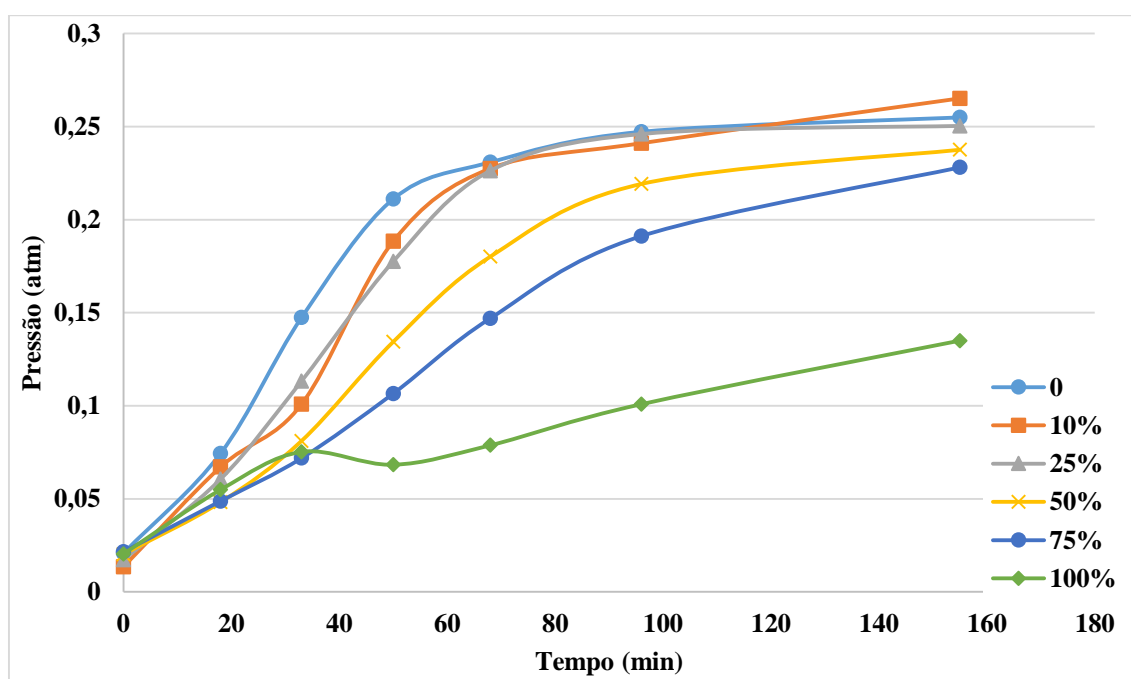


Figura 25 - Primeiro ensaio de inibição por lixiviado utilizando Biomassa 3

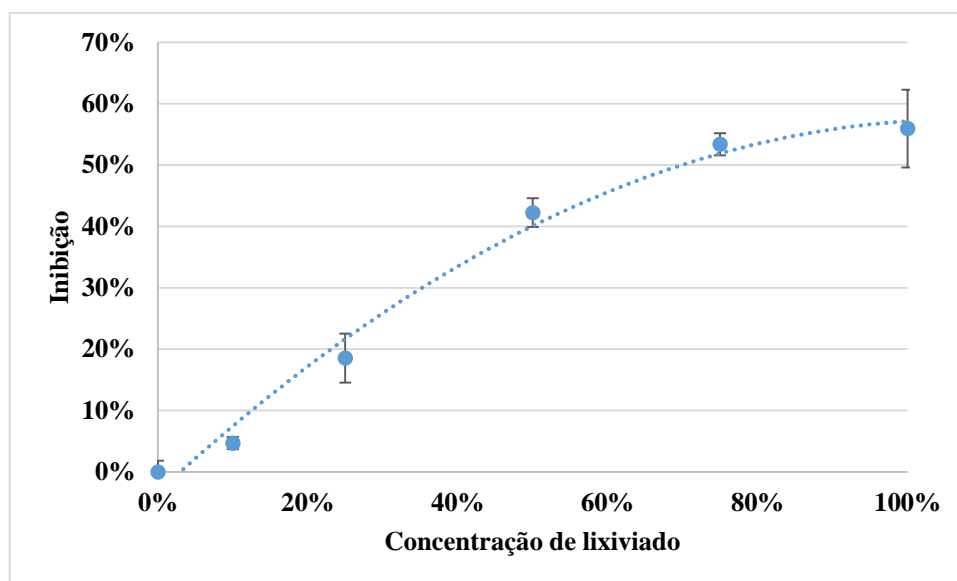


Figura 26 - Curva de inibição do primeiro ensaio utilizando Biomassa 3

Neste ensaio, a Biomassa 3 apresentou atividade máxima de $0,55 \text{ g N-N}_2 (\text{g SSV} \cdot \text{d})^{-1}$ enquanto a Biomassa 2 desempenhou $0,41 \text{ g N-N}_2 (\text{g SSV} \cdot \text{d})^{-1}$. A IC_{50} para estes ensaios não foi precisamente encontrada, porém, 100% de lixiviado resultou em 57% de inibição para a Biomassa 2 e 75% resultou em 53% da inibição da Biomassa 3. Esta maior inibição quando se utilizou a Biomassa 3 pode ser explicada pois grânulos menores são mais suscetíveis a agentes inibidores pois estes agentes conseguem penetrar mais profundamente nos grânulos, enquanto que em grânulos grandes há uma maior proteção.

Cho et al. (2010), usando biomassa granular, obteve valores de 50% de inibição utilizando $400 \text{ mg N-NO}_2 \text{ L}^{-1}$. Os autores também observaram uma maior tolerância à inibição quando testaram a inibição em cultura homogênea, isto porque provavelmente a difusão do inibidor foi menor no interior dos grânulos.

A Tabela 13 abaixo apresenta os resultados deste ensaio.

Tabela 13 - Resultados do primeiro ensaio com lixiviado

Concentração do lixiviado (%)	Atividade anammox (g N-N ₂ (g SSV . d) ⁻¹)	
	Biomassa 2	Biomassa 3
Controle	0,4149	0,5547
10%	0,3694	0,5288
25%	0,3477	0,4519
50%	0,2533	0,3204
75%	0,2309	0,2585
100%	0,1778	0,2443

6.4.2.2 Segundo ensaio

A seguir apresentam os resultados do ensaio de inibição por lixiviado sem a adição de nitrato. As Figuras 27 e 28 apresentam o resultado quando utilizou-se a Biomassa 3 enquanto que as Figuras 29 e 30 apresentam os resultados para a Biomassa 2.

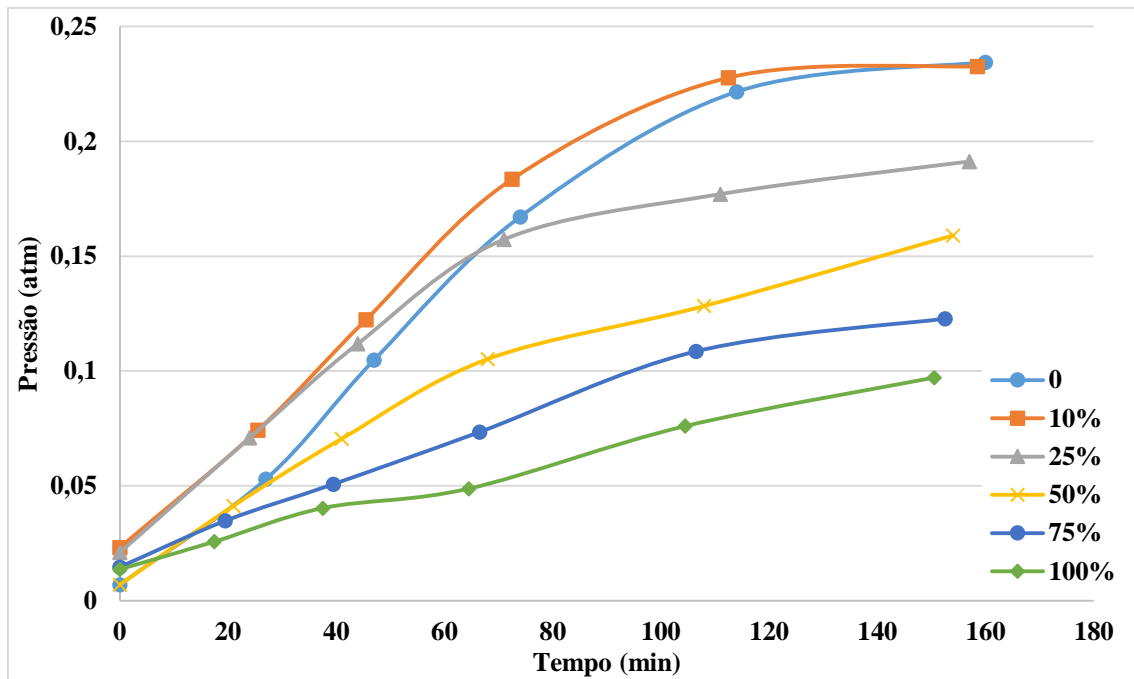


Figura 27- Segundo ensaio de inibição por lixiviado utilizando Biomassa 2

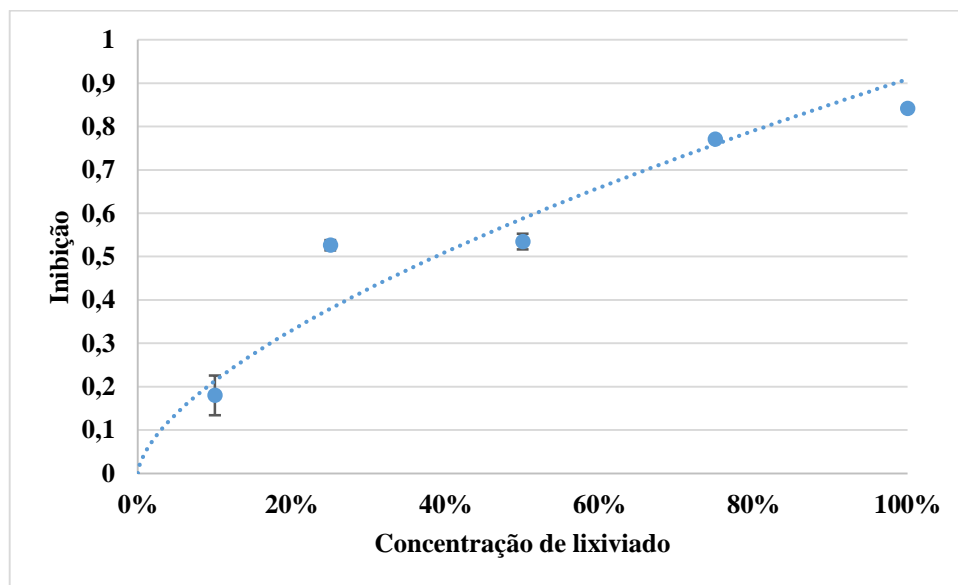


Figura 28 - Curva de inibição do segundo ensaio utilizando Biomassa 2

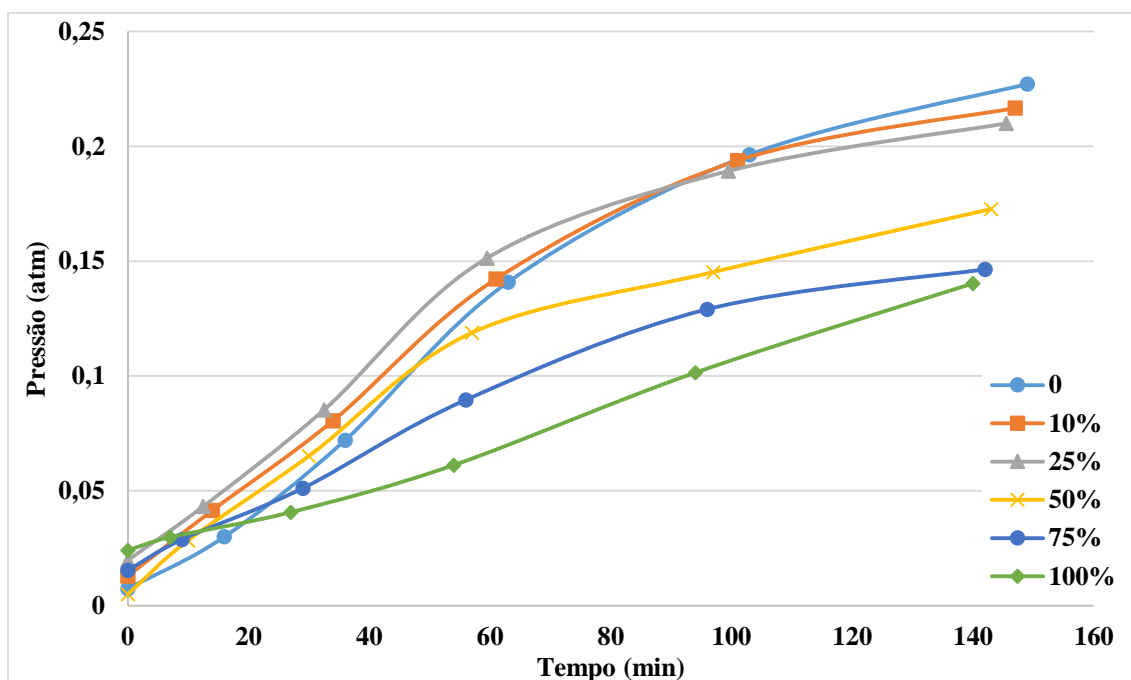


Figura 29 - Segundo ensaio de inibição por lixiviado utilizando Biomassa 3

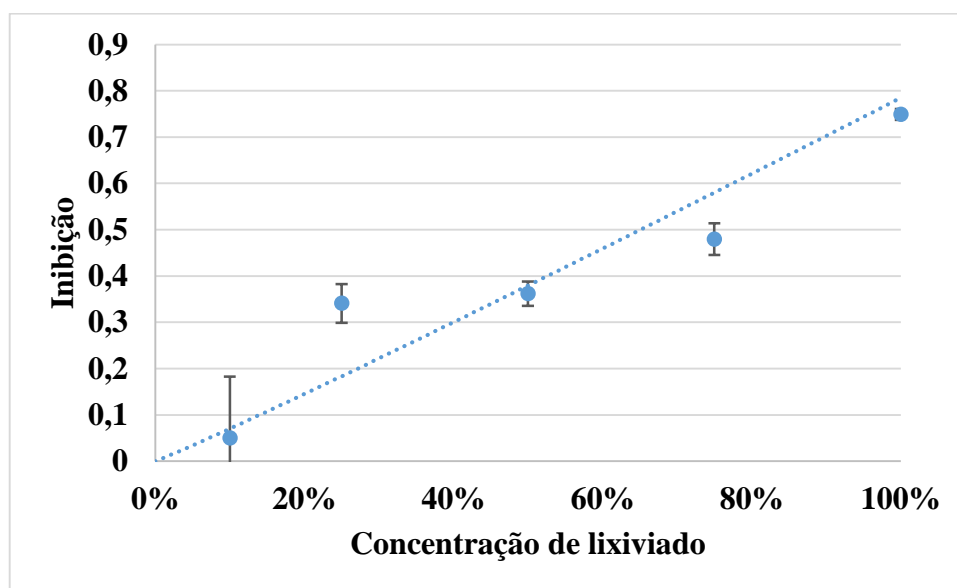


Figura 30 - Curva de inibição do segundo ensaio utilizando Biomassa 3

Neste ensaio os resultados foram opostos ao anterior. Ambas as biomassas desempenharam atividade iguais, sendo que a Biomassa 3 apresentou atividade máxima de $0,36 \text{ g N-N}_2 (\text{g SSV} \cdot \text{d})^{-1}$ enquanto a Biomassa 2 desempenhou $0,35 \text{ g N-N}_2 (\text{g SSV} \cdot \text{d})^{-1}$. A IC_{50} para estes ensaios também não foi precisamente encontrada.

Os resultados apontaram que 75% de lixiviado resultou em 48% de inibição para a Biomassa 3 e 50% de lixiviado resultou em 53% da inibição da Biomassa 2. Sendo assim, é possível observar que a inibição foi maior na biomassa com grânulos maiores, contrariando o ensaio anterior em que a inibição é menor em grânulos maiores.

A presença de nitrato junto à matéria orgânica presente no lixiviado possibilitaria a ocorrência da desnitrificação. Este processo poderia acarretar em grandes erros na medição da AAE através do método utilizado. Entretanto, os valores brutos de produção de gás permaneceram normais no decorrer do ensaio. Sendo assim, o resultado deste ensaio foi considerado surpreendente e, portanto, investigações futuras mais detalhadas serão necessárias para a compreensão dos resultados.

A Tabela 14 apresenta o resultado global deste ensaio.

Tabela 14 - Resultados do segundo ensaio com lixiviado

Concentração do lixiviado (%)	Atividade anammox (g N-N ₂ (g SSV . d) ⁻¹)	
	Biomassa 2	Biomassa 3
Controle	0,3461	0,3549
10%	0,2838	0,3371
25%	0,1640	0,2340
50%	0,1611	0,2266
75%	0,0795	0,1847
100%	0,0548	0,0890

6.4.2.3 Terceiro Ensaio

Este ensaio seguiu a metodologia descrita, porém o período de aclimação foi estendido para 72 horas (com a adição de nitrato) para se analisar a influência do tempo de contato na inibição da biomassa. Os frascos foram preparados e mantidos no escuro por 3 dias dentro do *shaker* nas mesmas condições (30 °C e 150 rpm). Após as 72 horas de aclimação, adicionou-se os substratos e prosseguiu-se com o ensaio.

As Figuras 31 e 32 apresentam o resultado utilizando-se a Biomassa 2 enquanto que Figuras 33 e 34 as apresentam os resultados para a Biomassa 3.

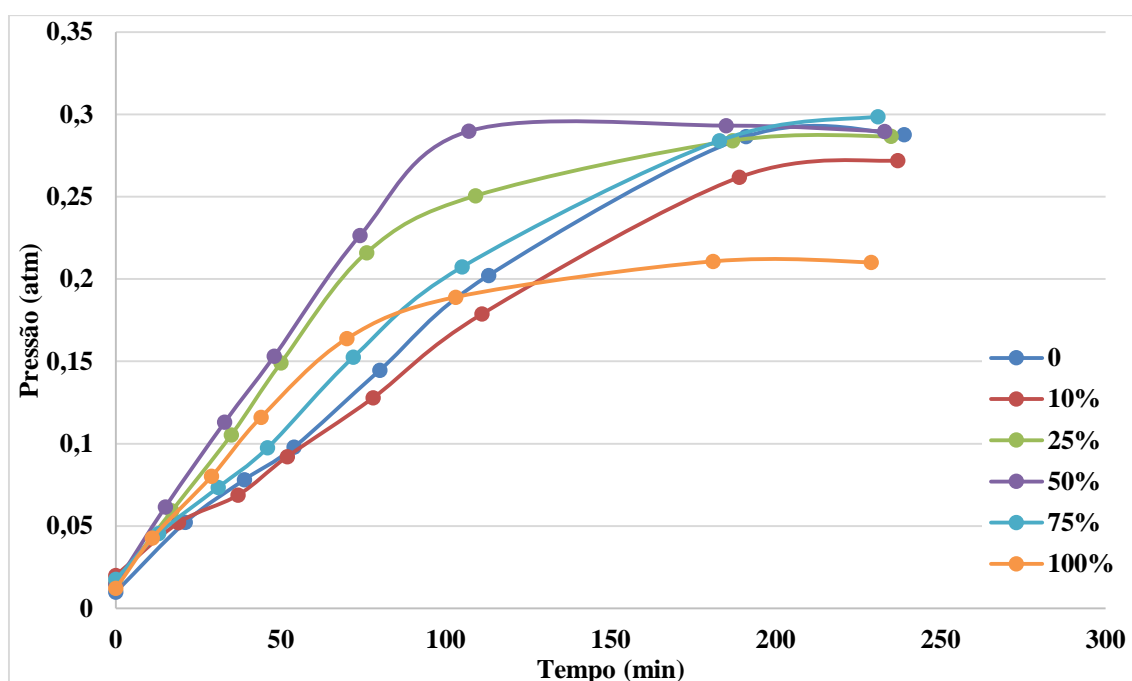


Figura 31 - Terceiro ensaio de inibição por lixiviado utilizando Biomassa 2

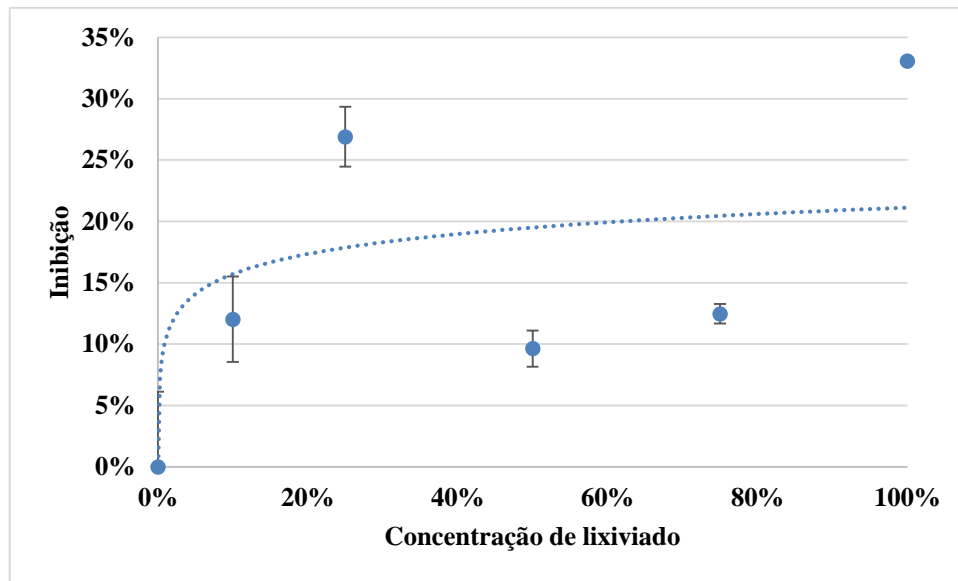


Figura 32 - Curva de inibição do terceiro ensaio utilizando Biomassa 2

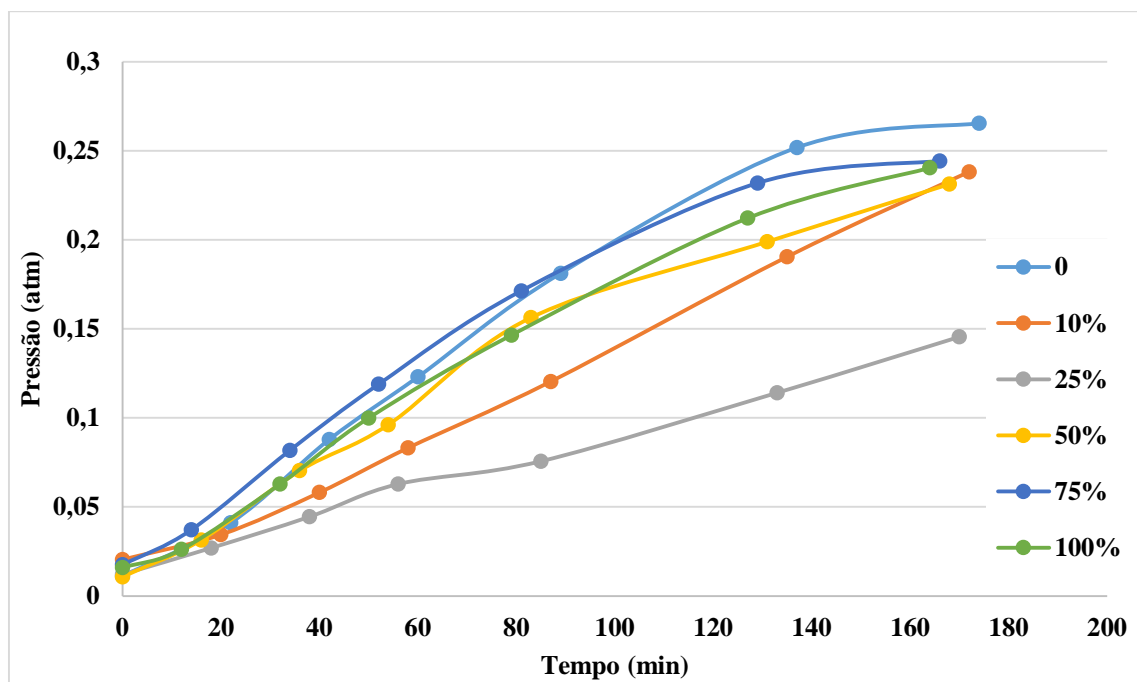


Figura 33 - Terceiro ensaio de inibição por lixiviado utilizando Biomassa 3

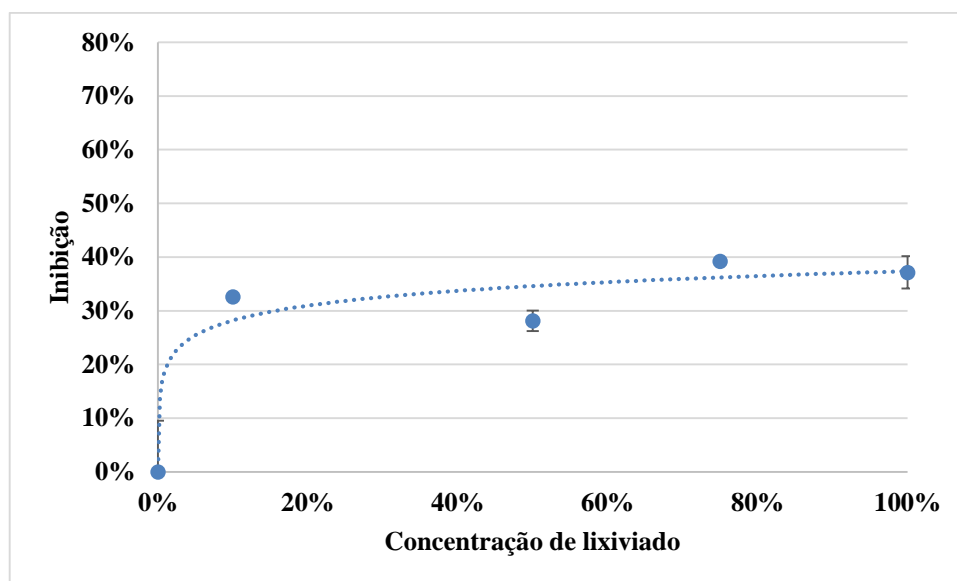


Figura 34 - Curva de inibição do terceiro ensaio utilizando Biomassa 3

A expectativa para o resultado deste ensaio era de que, com o maior tempo de contato, a inibição fosse maior. Apesar disso, tanto para a Biomassa 2 quanto para 3, a inibição foi consideravelmente menor.

Outro fato curioso foi a maior produção de gás neste ensaio. Para compreender melhor este fato, realizou-se um teste para verificar a produção de gases com lixiviado puro ou com lixiviado e biomassa, em ambos os casos, sem adicionar substratos. Se uma grande produção de gás fosse verificada, isso representaria um grande erro no resultado do ensaio pois maiores quantidades de lixiviado possibilitariam maior produção de gases, isto porque o lixiviado possui substratos para outros processos produtores de gás (provavelmente desnitrificação devido à presença de matéria orgânica e amônio em abundância além de nitrato).

A Figura 35 abaixo apresenta o resultado deste teste.

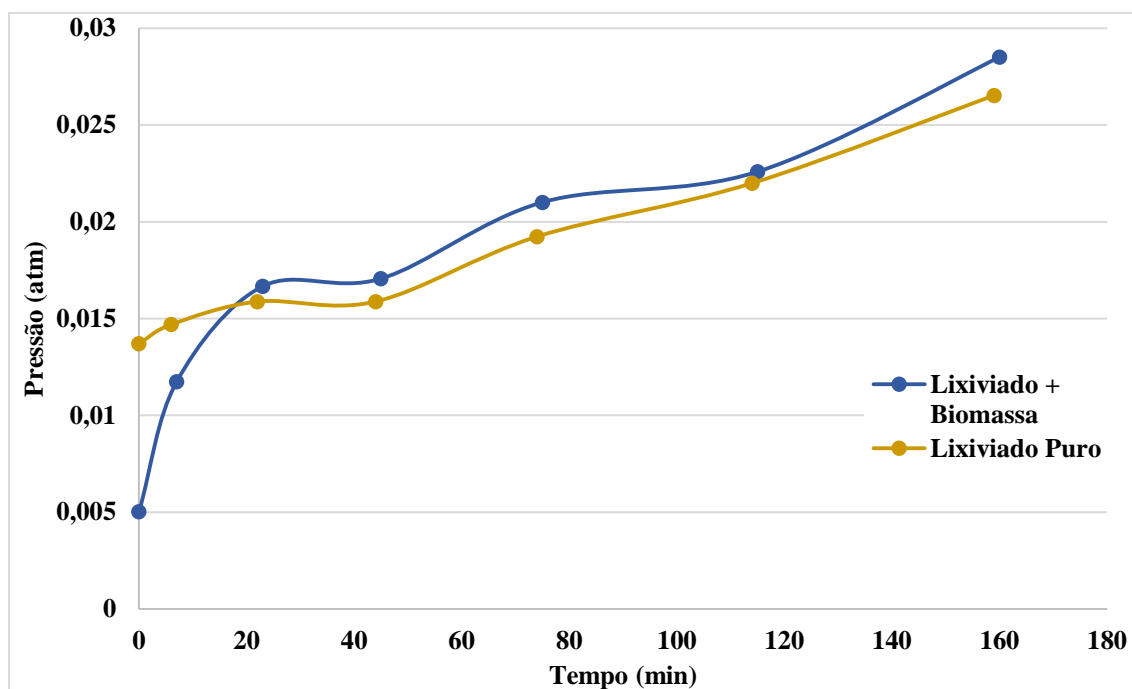


Figura 35 - Curva de produção de gases sem a adição de lixiviado

Uma grande produção de gás foi verificada, entretanto, esta produção poderia representar uma grande diferença no resultado final do ensaio. Apesar de pequena, a quantidade de gás produzida poderia implicar em cerca de 10% a mais na produção de gás normal de um ensaio de atividade anammox. Sendo assim, o resultado do terceiro ensaio precisa de uma investigação mais aprofundada.

Além deste problema, outro fator que pode ter interferido bastante no resultado é a atividade endógena da biomassa utilizada. Após o período de aclimação de 72 horas verificou que, quanto maior a concentração de lixiviado, mais a biomassa se tornou escura, indicando a existência desta hipótese. A digestão anaeróbia produz CO_2 , gás que, se produzido durante um ensaio de AAE, seria detectado e analisado como N_2 , modificando os resultados. Portanto, a digestão anaeróbia da biomassa pode ser o fator de erro deste ensaio. A Figura 36 apresenta a diferença de coloração dos grânulos, indicativo da morte da biomassa.



Figura 36 - Comparação da biomassa no frasco controle (esq.) e com 100% de lixiviado (dir.)

A Tabela 15 apresenta o resultado deste ensaio.

Tabela 15 - Resultados do segundo ensaio com lixiviado

Concentração do lixiviado (%)	Atividade anammox (g N-N ₂ (g SSV . d) ⁻¹)	
	Biomassa 2	Biomassa 3
	Controle	0,3202
10%	0,2158	0,2736
25%	0,1269	0,2273
50%	0,2302	0,2810
75%	0,1947	0,2722
100%	0,2013	0,2081

A Tabela 16 apresenta uma visão ampla da inibição alcançada nos três ensaios.

Tabela 16 - Visão geral dos ensaios com lixiviado

Concentração de lixiviado					
(Inibição mais próxima da IC ₅₀ (%))					
Primeiro ensaio		Segundo ensaio		Terceiro ensaio	
Sem nitrato		Com nitrato		Longa exposição – 72h	
Biomassa 2	Biomassa 3	Biomassa 2	Biomassa 3	Biomassa 2	Biomassa 3
100%	50%	50%	75%	100%	100%
(57%)	(53%)	(53%)	(48%)	(37%)	(33%)

6.4.3 Ensaio com metais

Para analisar a inibição causada por metais encontrados no lixiviado, foram realizados oito ensaios de atividade anammox. Os metais estudados foram aqueles encontrados na caracterização do lixiviado de São Carlos/SP, apresentada na Tabela 17. Os primeiros cinco ensaios foram concretizados com a Biomassa 1, os outros três com a Biomassa 2.

Tabela 17 - Caracterização do lixiviado da cidade de São Carlos

Parâmetros	Valores	Parâmetros	Valores
pH	8,36	Fe	4,452 mg L ⁻¹
DQO	4.353,9 mg L ⁻¹	Zn	0,672 mg L ⁻¹
Amônio	2.292 mg N-NH ₄ ⁺ L ⁻¹	Pb	0,52 mg L ⁻¹
Nitrito e Nitrato	nd	Cd	0,128 mg L ⁻¹
Sulfato	119,9 mg L ⁻¹	Ni	0,650 mg L ⁻¹
Fosfato	51,18 mg L ⁻¹	Mn	0,128 mg L ⁻¹
Alcalinidade Total	10.665 mg L ⁻¹ mg CaCO ₃ L ⁻¹	Cu	0,036 mg L ⁻¹
Alcalinidade Intermediária	2.212 mg CaCO ₃ L ⁻¹	Cr	0,658 mg L ⁻¹

Nd – Não detectado

No caso do cádmio, foi executado um ensaio paralelo que verificou a influência do diâmetro na inibição. Para tal, os grânulos foram triturados com a ajuda de um *mixer*.

A Figura 37 apresenta o resultado do ensaio com a biomassa triturada. A Figura 38a apresenta os resultados do ensaio de inibição com cádmio.

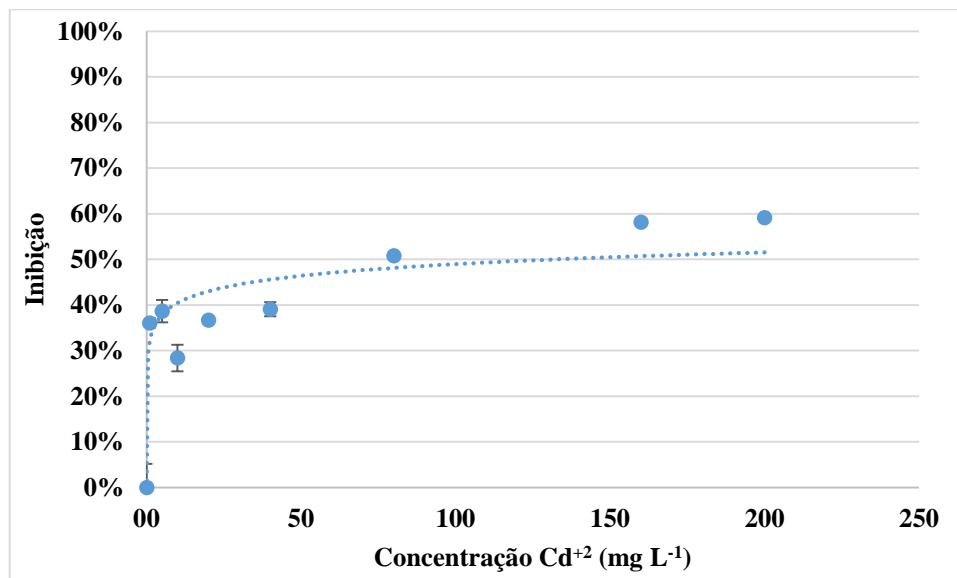


Figura 37 - Curva de inibição do cádmio com biomassa triturada

Com o resultado de ambos os ensaios, verificou-se que o diâmetro dos grânulos implicou em uma grande diferença nos resultados. Com os grânulos normais, a IC_{50} foi de $200 \text{ mg Cd}^{2+} \text{ L}^{-1}$ enquanto que a IC_{50} utilizando a biomassa triturada foi de $80 \text{ mg Cd}^{2+} \text{ L}^{-1}$. Este resultado sustenta a hipótese de que a inibição é maior em grânulos menores devido à maior difusão do agente inibidor.

Este resultado se mostrou diferente do observado por Bi *et al.* (2014), em que os autores obtiveram uma IC_{50} de $11.16 \pm 0.42 \text{ mg Cd}^{2+} \text{ L}^{-1}$. Além disso, ambos foram diferentes do resultado encontrado por Li *et al.* (2014), o qual relatou uma inibição de 80% com $5 \text{ mg Cd}^{2+} \text{ L}^{-1}$.

A Figura 38b apresenta os resultados do ensaio de inibição com chumbo. A IC_{50} neste ensaio foi próxima de $40 \text{ mg Pb}^{2+} \text{ L}^{-1}$ (49% inibição). Valor bem diferente do relatado por Bi *et al.* (2014) o qual obteve 7.19% de inibição testando a mesma concentração de chumbo.

A Figura 38c apresenta os resultados do ensaio de inibição com ferro. Neste ensaio verificou-se que o ferro tem o menor potencial inibitório sobre a atividade anammox. A

IC₅₀ não foi encontrada ainda que a maior concentração de metal testada fosse de 800 mg Fe⁺² L⁻¹, a qual resultou em apenas 39% de inibição.

A Figura 38d apresenta os resultados do ensaio de inibição com zinco. A partir do gráfico é possível notar que a IC₅₀ foi próxima de 200 mg Zn⁺² L⁻¹, entretanto, não foi possível encontrar o ponto exato. O ponto mais próximo da IC₅₀ representou 36% de inibição (160 mg Zn⁺² L⁻¹). Lotti (2011) relatou uma inibição de 15% quando a concentração de zinco era de 1 mg Zn⁺² L⁻¹, enquanto que este trabalho encontrou valores de 18% de inibição em concentrações de 10 mg Zn⁺² L⁻¹.

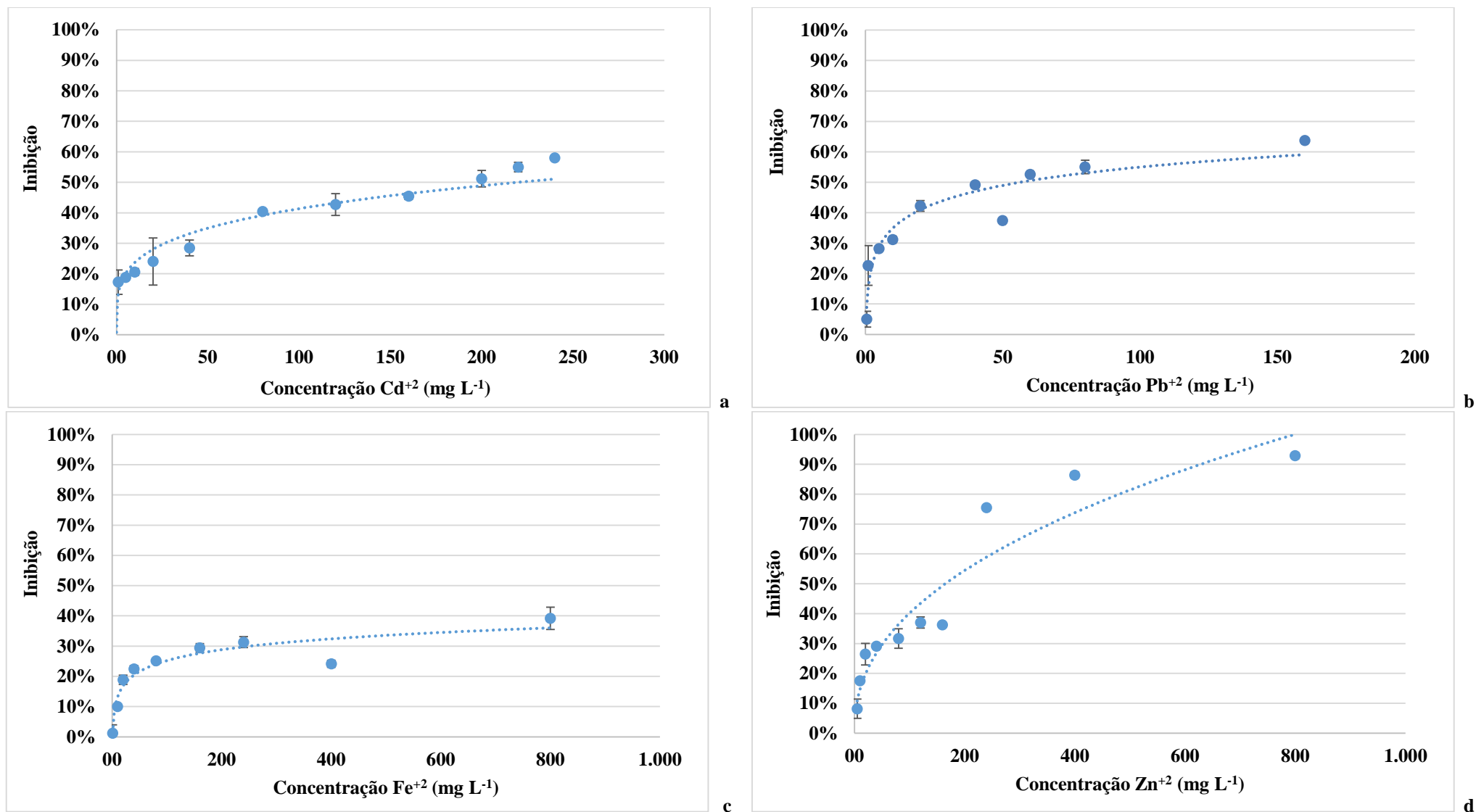


Figura 38 – Curvas de inibição da atividade anammox por a) cadmio, b) chumbo, c) ferro e d) zinco

A Figura 39 a seguir apresenta a curva de pressão x tempo do ensaio com níquel.

Neste gráfico é possível observar com mais clareza a grande inibição causada nas pequenas concentrações de níquel, entretanto, este efeito não apresentou grande crescimento conforme se aumentaram as concentrações.

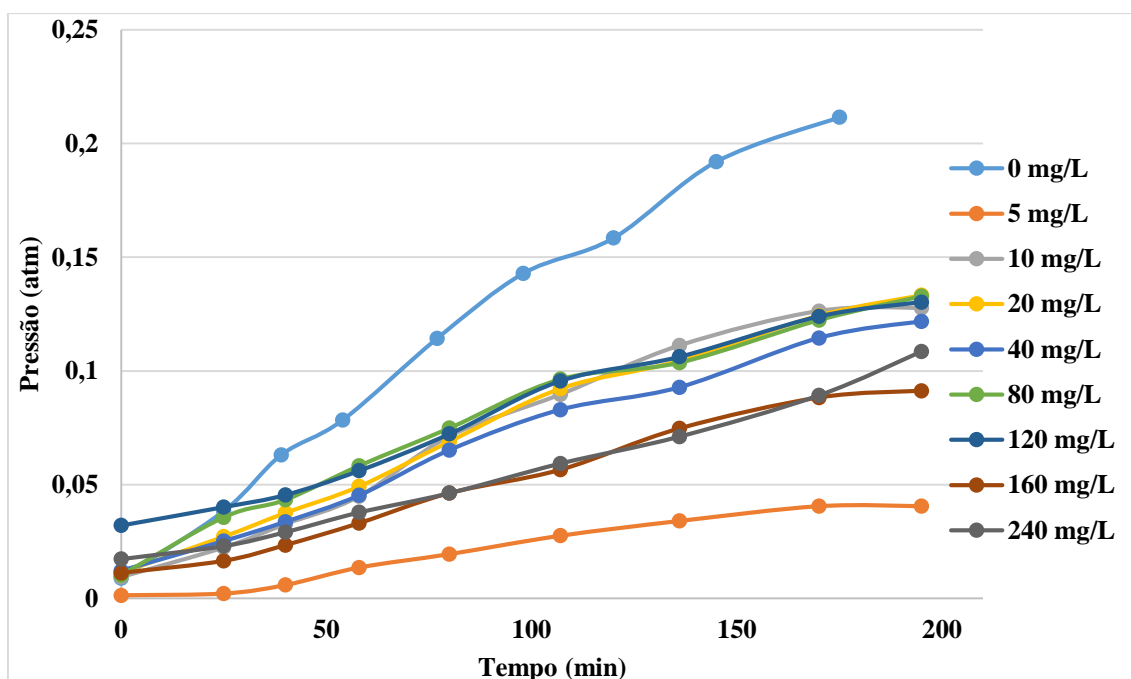


Figura 39 - Curva de Pressão x Tempo do ensaio de inibição com níquel

A Figura 40 a seguir apresenta a curva de pressão x tempo do ensaio com manganês e nesta é possível notar o pequeno efeito inibitório do manganês, verificado pelas retas praticamente paralelas entre si.

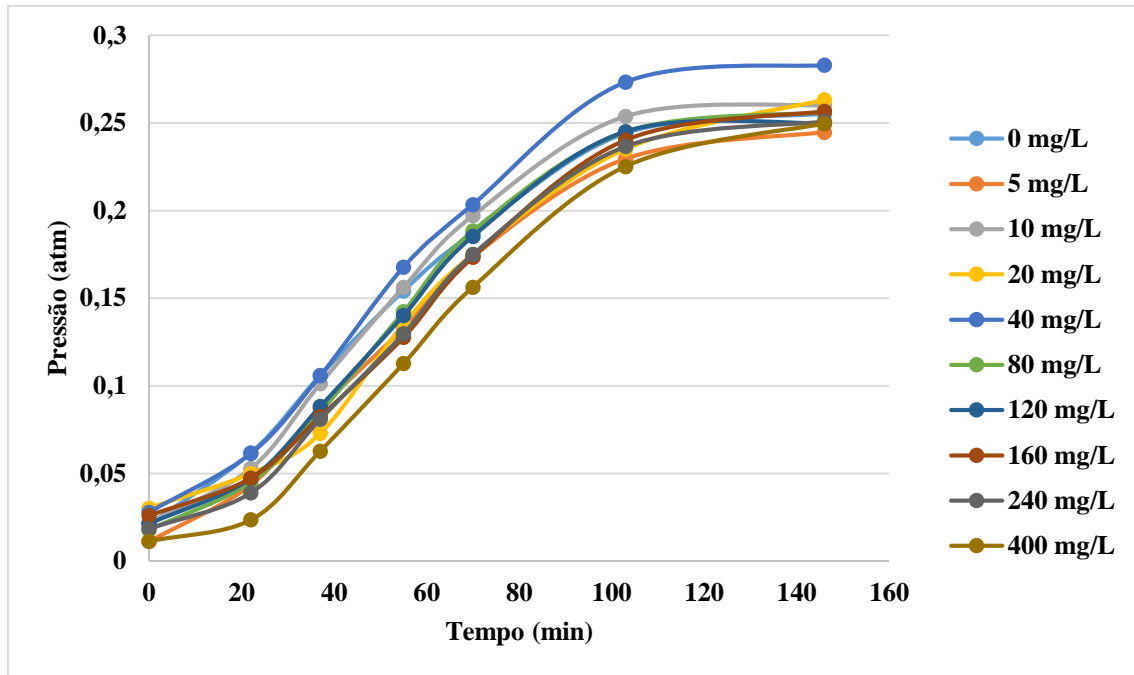


Figura 40 - Curva de Pressão x Tempo do ensaio de inibição com manganês

Na Figura 41, onde está apresentada a curva de pressão x tempo, abaixo é possível observar o grande efeito inibitório do cobre sobre a atividade anammox. A queda da inclinação das retas conforme se aumenta a concentração é bem visível no gráfico.

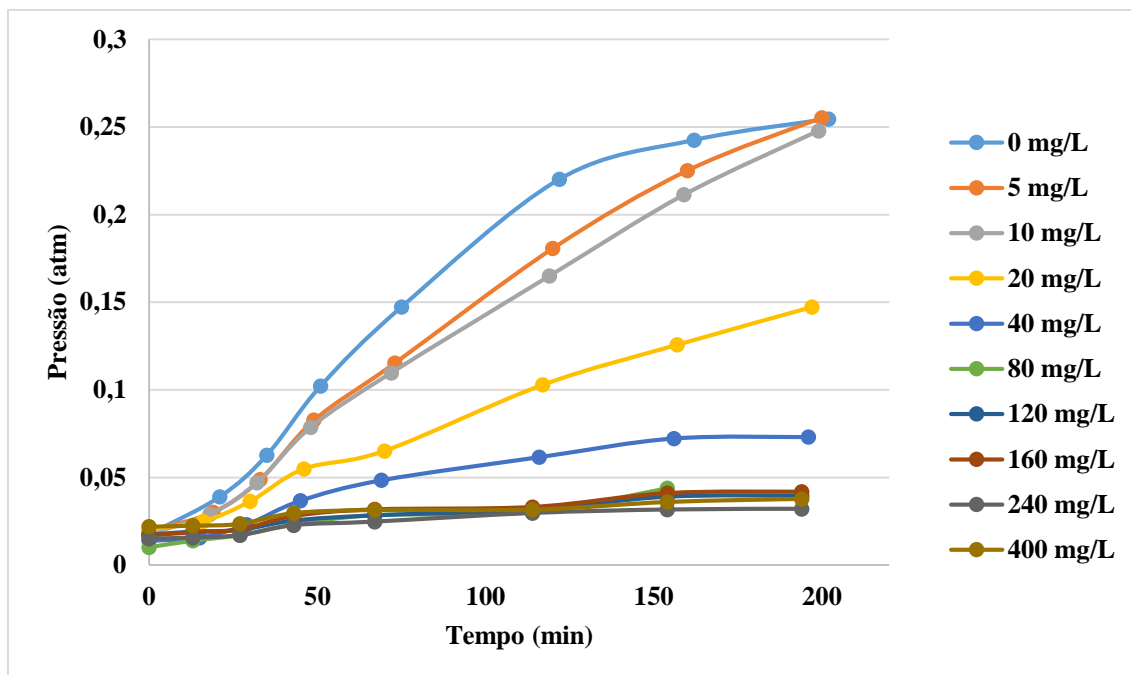


Figura 41 - Curva de Pressão x Tempo do ensaio de inibição com cobre

Assim como no ensaio utilizando cobre, na Figura 42 abaixo, onde está apresentada a curva de pressão x tempo do ensaio utilizando cromo, é possível observar a queda da inclinação das retas conforme se aumenta a concentração do agente inibidor.

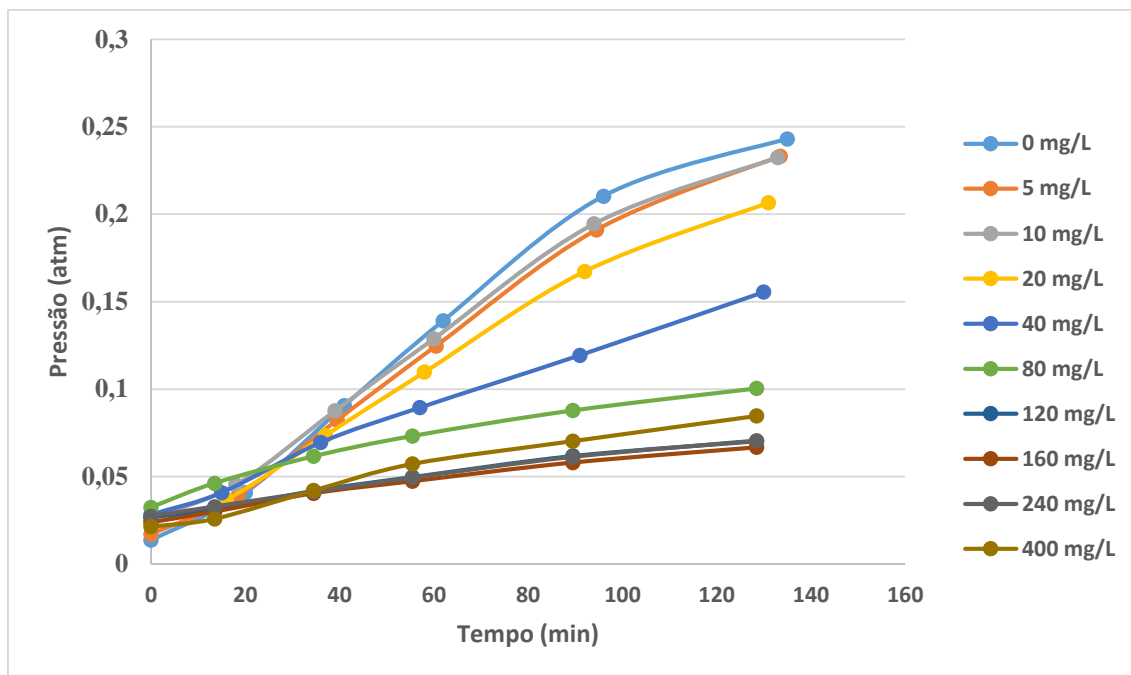


Figura 42 - Curva de Pressão x Tempo do ensaio de inibição com cromo

A Figura 43a apresenta os resultados do ensaio de inibição utilizando níquel.

O ensaio relativo ao níquel foi o que apresentou maior inibição da atividade anammox nas menores concentrações. Apenas 5 mg Ni⁺² L⁻¹ resultou em 34% de inibição da atividade sendo que a IC₅₀ para este metal foi encontrada em 60 mg Ni⁺² L⁻¹. Li et al. (2014) também estudaram os efeitos potenciais do níquel sobre a atividade anammox e obtiveram 40% de inibição com 40 mg Ni⁺² L⁻¹, resultado muito próximo do encontrado neste trabalho, em que foi observado 38% de inibição na mesma concentração.

A Figura 43b exibe os resultados obtidos no ensaio de inibição utilizando manganês.

O efeito inibitório do manganês não foi muito grande. A IC₅₀ deste metal não foi precisamente encontrada entretanto os resultados mostraram que esta deve ser encontrada em valores de concentração próximos de 400 mg Mn⁺² L⁻¹. O valor mais próximo disso, 400 mg Mn⁺² L⁻¹, resultou em 54% de inibição da atividade da biomassa.

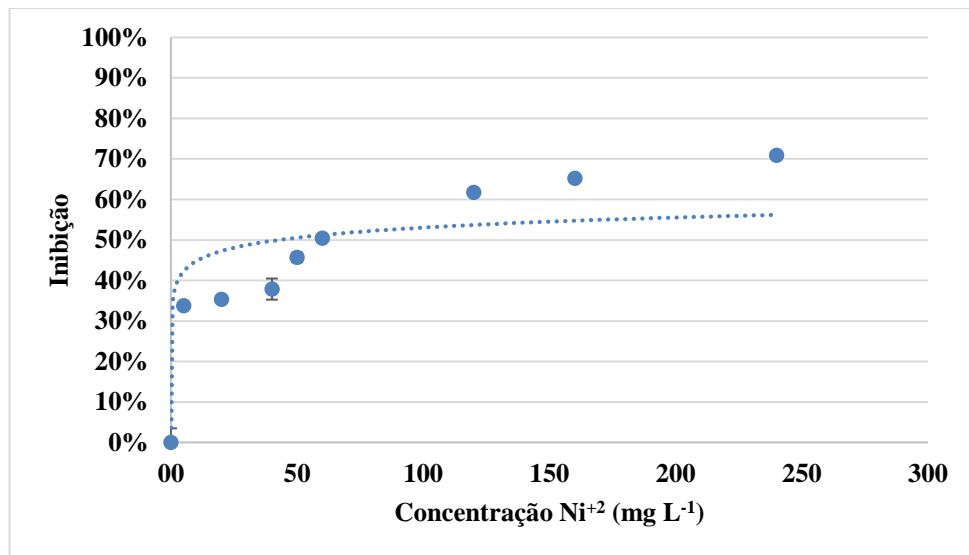
A Figura 43c apresenta os resultados do ensaio de inibição empregando o cobre como agente inibidor.

Dentre todos os metais testados, o cobre foi o que apresentou valores mais tóxicos para a biomassa anammox, em que a IC₅₀ encontrada foi de 17,5 mg Cu⁺² L⁻¹. Entretanto,

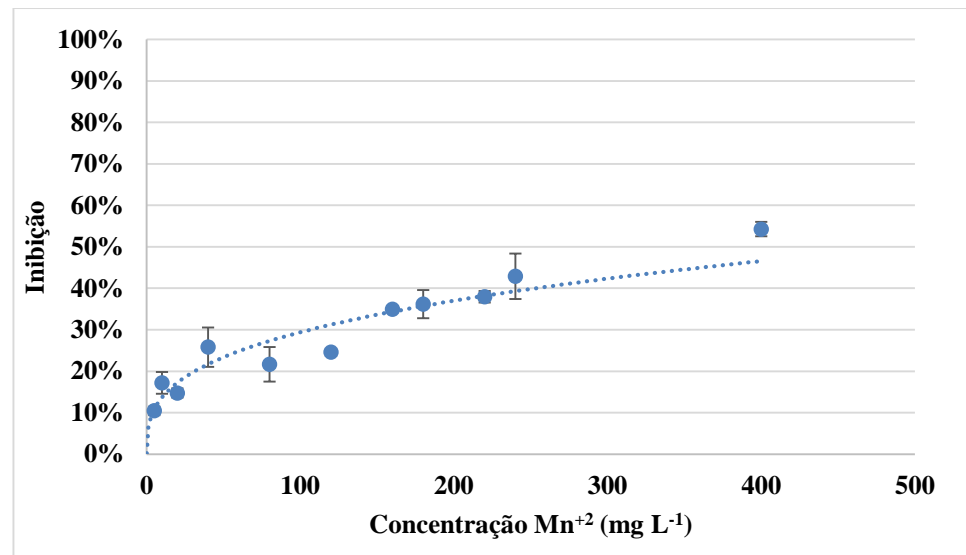
mesmo sendo o metal mais tóxico testado, a concentração encontrada no lixiviado não deve ser considerada perigosa, uma vez que esta foi encontrada abaixo de $0,050 \text{ mg Cu}^{+2} \text{ L}^{-1}$. Lotti (2011) relatou uma inibição de 25% quando empregada uma concentração de $1 \text{ mg Cu}^{+2} \text{ L}^{-1}$, enquanto que neste trabalho, $10 \text{ mg Cu}^{+2} \text{ L}^{-1}$ resultou em 12% de inibição.

Na Figura 43d apresentam-se os dados de inibição da atividade anammox testando o cromo.

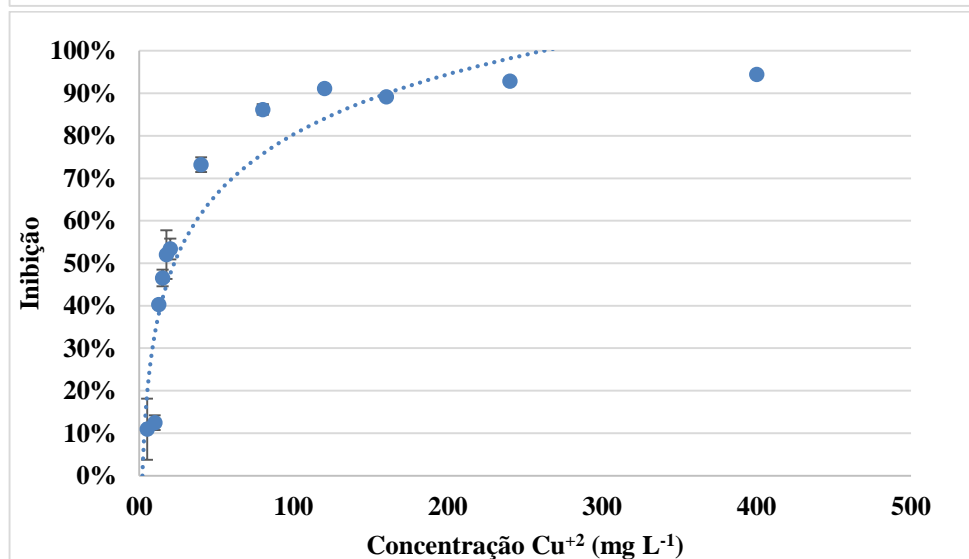
O efeito da inibição causada pelo cromo na atividade anammox foi substancial. A IC_{50} encontrada foi de $35 \text{ mg Cr}^{+2} \text{ L}^{-1}$, sendo assim, o cromo apresentou o segundo maior potencial inibidor dentre os metais testados.



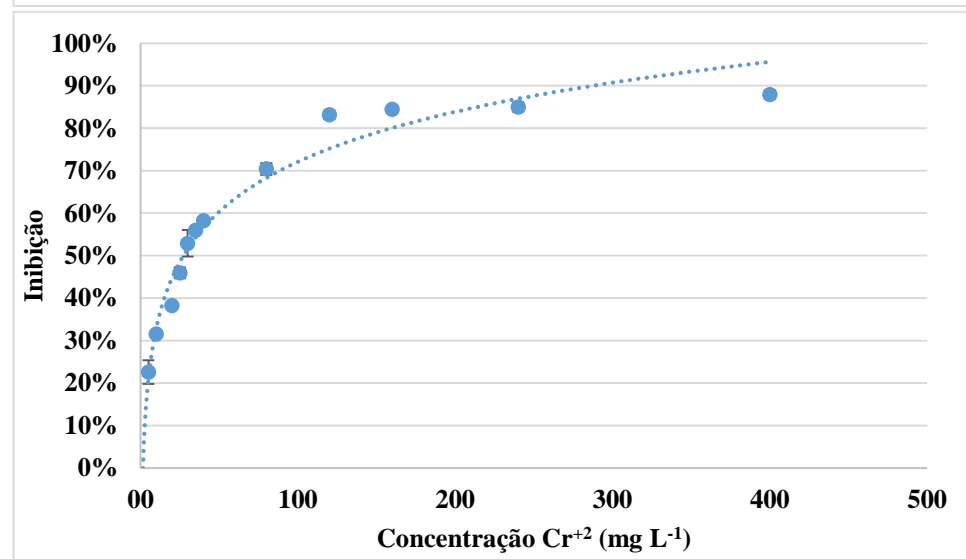
a



b



c



d

Figura 43 - Curvas de inibição da atividade anammox por a) níquel, b) manganês, c) cobre e d) cromo

A Tabela 18 apresenta o quadro geral dos resultados dos ensaios de inibição da AAE por metais.

Tabela 18 – IC₅₀ dos ensaios de inibição realizados com metais

Metal	IC ₅₀ (mg L ⁻¹)
Cádmio	200,0
Chumbo	55,0
Ferro	> 800,0
Zinco	~ 165,0
Níquel	60,0
Manganês	~ 400,0
Cobre	17,5
Cromo	35,0

Nesta Tabela, ~ significa que o resultado foi aproximado e > significa que o resultado foi maior do que a concentração testada

A Tabela 19 abaixo apresenta o resultado global dos ensaios. Nesta tabela, é possível verificar que, mesmo em concentrações altas de metais, a atividade anammox foi considerável. Outro fato notável foi o decréscimo da atividade anammox do frasco controle ao longo do tempo. O período de tempo entre o primeiro e o quinto ensaio (todos com Biomassa 1) foi de 2 meses. Isto não se aplica aos últimos três ensaios (todos com Biomassa 2), já que estes foram todos realizados na mesma semana. Apesar disso, esse decréscimo nos valores da atividade não implica em erros no resultado do experimento uma vez que os frascos controle foram sempre realizados quando se iniciava um teste com um metal diferente.

Tabela 19 - Resultado de todos os ensaios de inibição da atividade anammox

Concentração de metal (mg L ⁻¹)	Cd ⁺²	Pb ⁺²	Fe ⁺²	Zn ⁺²	Ni ⁺²	Mn ⁺²	Cu ⁺²	Cr ⁺²
Frasco controle	0,3165	0,3031	0,2508	0,2143	0,2016	0,3065	0,2798	0,3575
5	0,2619	0,2176	-	0,1968	0,1335	0,2745	0,2492	0,2769
10	0,2569	0,2086	0,2256	0,1767	-	0,2538	0,2449	0,2447
20	0,2513	0,1751	0,2035	0,1577	0,1304	0,2613	0,1305	0,2207
40	0,2404	0,1542	0,1944	0,1519	0,1253	0,2274	0,0750	0,1493
80	0,2263	0,1363	0,1876	0,1465	-	0,2400	0,0386	0,1058
120	0,1886	-	-	0,1350	0,0772	0,2312	0,0248	0,0602
160	0,1814	0,1100	0,1770	0,1367	0,0702	0,1993	0,0303	0,0556
240	0,1302	-		0,1008	0,0587	0,1751	0,0200	0,0537
400		-		0,0560	-	0,1401	0,0156	0,0432

7 CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos no RBS foi possível concluir que a biomassa esteve apta à execução do processo anammox. Sendo assim, é possível concluir que a biomassa estava enriquecida.

Os dados do RLF sugeriram que a biomassa anammox seguiu desempenhando o processo anammox quando foi inoculada no RLF. Além disso, a biomassa mostrou-se mais ativa do que quando se encontrava no RBS. Portanto, conclui-se que a mudança para um reator de leito fixo foi benéfica para a biomassa e, por conseguinte, para o processo anammox.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o enriquecimento de uma biomassa anammox se mostrou mais eficiente em reator contínuo do que em descontínuo.

A Tabela 20 abaixo apresenta o quadro geral do desempenho da atividade anammox em todos os reatores.

Tabela 20 - Panorama de máxima remoção de nitrogênio dos reatores

Reator	RBS	RLF
Máxima taxa de remoção de nitrogênio (kg-N/m ³ d)	0,320	0,357

O tamanho dos grânulos foi uma variável importante, uma vez que se obteve maiores valores de inibição em grânulos de menor tamanho.

O lixiviado tem efeitos inibitórios na atividade anammox, entretanto, pode-se concluir que é possível aplicar esta tecnologia quando se estiver tratando este tipo de água residuária, desde que diluída. Foi apresentado que concentrações abaixo de 50% de lixiviado não representam grandes riscos para as bactérias responsáveis pelo processo anammox. Ainda assim, se considerada a adaptabilidade das bactérias anammox, a longo prazo, ao meio, é possível que este tipo de tratamento melhore quanto maior for o tempo de aplicação.

A ordem dos maiores e menores inibidores foi a seguinte:

Cu > Cr > Pb > Zn > Cd > Ni > Mn > Fe.

Entretanto, é importante mencionar que, mesmo o metal com maior potencial inibitório (caso do cobre) não apresenta o menor risco nas concentrações presentes no lixiviado, uma vez que estas concentrações são extremamente baixas. Mesmo o metal que é encontrado em maior quantidade, caso do ferro (aproximadamente 5 mg L⁻¹) não representa riscos para o processo anammox.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABMA, W. R.; SCHULTZ, C. E.; MULDER, J. W.; VAN DER STAR, W. R. L.; STROUS, M.; TOKUTOMI, T.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Full-scale granular sludge anammox process. *Water Science and Technology*, v. 55, n. 8-9, p. 27-33, 2007.

ABMA, W. R.; SCHULTZ, C. E.; MULDER, J. W.; VAN DER STAR, W. R. L.; STROUS, M.; TOKUTOMI, T.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Full-scale granular sludge anammox process. *Water Science and Technology*, v. 55, n. 8-9, p. 27-33, 2007.

ANFRUNS, A.; GABARRÓ, J.; GONZALEZ-OLMOS, R.; PUIG, S.; BALAGUER, M.D.; COLPRIM, J. Coupling anammox and advanced oxidation-based technologies for mature landfill leachate treatment. *Journal of Hazardous Materials* 258– 259, 2013.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped blast and psi-blast: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, v. 25, n. 17, September 1, 1997, p. 3389-3402, 1997.

APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater. 19th ed. ed. Washington, DC, USA, 2005

BETTAZZI, E.; CAFFAZ, S.; VANNINI, C.; LUBELLO, C. Nitrite inhibition and intermediates effects on Anammox bacteria: A batch-scale experimental study. *Process Biochemistry* 45 (2010) 573–580, 2010.

BI, Z.; QIAO, S.; ZHOU, J., TANG, X.; CHENG, Y. Inhibition and recovery of Anammox biomass subjected to short-term exposure of Cd, Ag, Hg and Pb. *Chemical Engineering Journal – Accepted Manuscript*, 2014

BRODA, E. 2 kinds of lithotrophs missing in nature. *Zeitschrift Fur Allgemeine Mikrobiologie*, v. 17, n. 6, p. 491-493, 1979.

BUYS, B.R., MOSQUERA-CORRAL, A., SANCHEZ, M. AND MENDEZ, R. Development and application of a denitrification test based on gas production. *Wat. Sci. Tech.*, 41(12), 113 –X120. 2000

CARVAJAL-ARROYO, J. M.; SUN, W.; SIERRA-ALVAREZ, R.; FIELD, J.A.. Inhibition of anaerobic ammonium oxidizing (anammox) enrichment cultures by substrates, metabolites and common wastewater constituents. *Chemosphere* 91, 22–27, 2013.

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

CHO, S.; TAKAHASHI, Y.; FUJII, N.; YAMADA, Y.; SATOH, H.; OKABE, S. Nitrogen removal performance and microbial community analysis of an anaerobic up-flow granular bed anammox reactor. *Chemosphere*, v. 78, n. 9, Feb, p. 1129-1135, 2010.

COLE, J. R.; WANG, Q.; FISH, J. A.; CHAI, B.; MCGARRELL, D. M.; SUN, Y.; BROWN, C. T.; PORRAS-ALFARO, A.; KUSKE, C. R.; TIEDJE, J. M. Ribosomal database project: Data and tools for high throughput rna analysis. *Nucleic Acids Research*, v. 42, n. D1, January 1, 2014, p. D633-D642, 2014.

DAPENA-MORA, A.; VAN HULLE, S. W. H.; CAMPOS, J. L.; MENDEZ, R.; VANROLLEGHEM, P. A.; JETTEN, M. Enrichment of anammox biomass from municipal activated sludge: Experimental and modelling results. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 79, n. 12, Dec, p. 1421-1428, 2004a.

DAPENA-MORA, A., CAMPOS, J.L., MOSQUERA-CORRAL, A. AND MENDEZ, R. Development and application of an Anammox activity test based on gas production. *European Symposium on Environmental Biotechnology, ESEB 2004*, ISBN 90 5809 653 X, pp. 649 – 652., 2004b

DAPENA-MORA, A.; FERNANDEZ, I.; CAMPOS, J. L.; MOSQUERA-CORRAL, A.; MENDEZ, R.; JETTEN, M. S. M. Evaluation of activity and inhibition effects on anammox process by batch tests based on the nitrogen gas production. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, n. 4, Mar 5, p. 859-865, 2007.

DESANTIS, T. Z.; HUGENHOLTZ, P.; KELLER, K.; BRODIE, E. L.; LARSEN, N.; PICENO, Y. M.; PHAN, R.; ANDERSEN, G. L. Nast: A multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16s rna genes. *Nucleic Acids Research*, v. 34, p. W394-W399, 2006.

DOSTA, J.; FERNÁNDEZ, I.; VÁZQUEZ-PADÚN, J.R.; MOSQUERA-CORRAL A.; CAMPOS, J.L.; MATA-ÁLVAREZ, J.; MÉNDEZ, R. Short- and long-term effects of temperature on the Anammox process. *Journal of Hazardous Materials* 154, 688–693, 2008.

FERNÁNDEZ, I.; DOSTA, J.; FAJARDO, C.; CAMPOS, J.L.; MOSQUERA-CORRAL, A., MÉNDEZ, R. Short- and long-term effects of ammonium and nitrite on the Anammox process. *Journal of Environmental Management* 95 S170-S174, 2012.

GAO, DA-WEN E TAO, YU. Versatility and application of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 91:887–894, 2011.

GRIFFITHS, R. I.; WHITELEY, A. S.; O'DONNELL, A. G.; BAILEY, M. J. Rapid method for coextraction of DNA and rna from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rna-based microbial community composition. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 12, p. 5488-5491, 2000.

GUVEN, D., VAN DE PAS-SCHOONEN, K., SCHMIDT, M.C., STROUS, M., JETTEN, M.S.M., SOZEN, S., ORHON, D., SCHMIDT, I. Implementation of the anammox process for improved nitrogen removal. *J. Environ. Sci. Health, Part A: Toxic/Hazard. Subst. Environ. Eng.* A39, p. 1729–1738, 2004.

JIN, R.C., HU, B.L., ZHENG, P., QAISAR, M., HU, A.H., ISLAM, E. Quantitative comparison of stability of ANAMMOX process in different reactor configurations. *Bioresour. Technol.* v. 99, p. 1603–1609, 2008.

JETTEN, M. S. M.; STROUS, M.; VAN DE PAS-SCHOONEN, K. T.; SCHALK, J.; VAN DONGEN, U.; VAN DE GRAAF, A. A.; LOGEMANN, S.; MUYZER, G.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; KUENEN, J. G. The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 22, n. 5, p. 421-437, 1998.

KARTAL, B.; VAN NIFTRIK, L.; RATTRAY, J.; VAN DE VOSSENBERG, J. L.C.M.; SCHMID, M. C.; SINNINGHE DAMSTÉ, J.; JETTEN, M. S.M.; STROUS, M. Candidatus 'Brocadia fulgida': an autofluorescent anaerobic ammonium oxidizing bacterium. *FEMS Microbiology Ecology*, 63: 46–55, 2007.

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

KUMAR, M., LIN, J.-G., Co-existence of anammox and denitrification for simultaneous nitrogen and carbon removal – strategies and issues. *J. Hazard. Mater.* v. 178, p. 1–9, 2010.

KUYPERS M. M. M., SLIEKERS A. O., LAVIK G., SCHMID M., JORGENSEN B. B., KUENEN J. G., DAMSTE J. S. S., STROUS M. AND JETTEN M. S. M.. Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. *Nature* v. 422(6932), p. 608-11., 2003.

LI, X.R., DU, B., FU, H.X., WANG, R.F., SHI, J.H., WANG, Y., JETTEN, M.S.M., QUAN, Z.X. The bacterial diversity in an anaerobic ammonium-oxidising (anammox) reactor community. *Syst. Appl. Microbiol.* v. 32, p. 278–289, 2009.

LI, G.; PUYOL, D.; SIERRA-ALVAREZ, R.; FIELD, J.A. Inhibitory effect of heavy metals on nitrogen production by anaerobic ammonium oxidation bacteria. 2014

LOPEZ, H.; PUIG, S.; GANIGUE, R.; RUSCALLEDA, M.; BALAGUER, M. D.; COLPRIM, J. Start-up and enrichment of a granular anammox sbr to treat high nitrogen load wastewaters. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 83, n. 3, p. 233-241, 2008.

LOTTI, T. Monitoraggio del processo anammox: aspetti fisiologici per un utilizzo in piena scala. Tese (Doutorado) *Università degli Studi della Basilicata*, 2011

MAGRÍ, A.; BÉLINE, F.; DABERT, P. Feasibility and interest of the anammox process as treatment alternative for anaerobic digester supernatants in manure processing - An overview. *Journal of Environmental Management* v. 131 p. 170 – 184, 2013.

MARTINS, T. H.; FORESTI, E. Ammonium removal from leachate by integrated approach: Preliminary results. In: *Ecotechnologies for Wastewater Treatment (ecoSTP)*. Santiago de Compostela, Spain: IWA, 2012.

MARTINS, T.H. Conversão de compostos nitrogenados em reatores biológicos: operação, caracterização microbiológica e filogenética. 113p. Tese (Doutorado) Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

MEYER, F.; PAARMANN, D.; D'SOUZA, M.; OLSON, R.; GLASS, E.; KUBAL, M.; PACZIAN, T.; RODRIGUEZ, A.; STEVENS, R.; WILKE, A.; WILKENING, J.; EDWARDS, R. The metagenomics rast server - a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics*, v. 9, n. 1, p. 386, 2008.

MULDER, A.; VAN GRAAF, A. A.; ROBERTSON, L. A.; KUENEN, J. G. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized-bed reactor. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 16, n. 3, p. 177-183, 1995.

OVERBEEK, R.; OLSON, R.; PUSCH, G. D.; OLSEN, G. J.; DAVIS, J. J.; DISZ, T.; EDWARDS, R. A.; GERDES, S.; PARRELLO, B.; SHUKLA, M.; VONSTEIN, V.; WATTAM, A. R.; XIA, F.; STEVENS, R. The seed and the rapid annotation of microbial genomes using subsystems technology (rast). *Nucleic Acids Research*, v. 42, n. D1, January 1, 2014, p. D206-D214, 2014.

PILCHER, H. Microbiology: Pipe Dreams. *NATURE*, Vol. 437, 2005

PUYOL, D.; CARVAJAL-ARROYO, J. M.; SIERRA-ALVAREZ, R.; FIELD, J. A. Nitrite (not free nitrous acid) is the main inhibitor of the anammox process at common pH conditions. *Biotechnol Lett* v.36 p. 547–551, 2014.

SCAGLIONE, D.; RUSCALLEDA, M.; FICARA, E.; BALAGUER, M.D., COLPRIM, J. Response to high nitrite concentrations of anammox biomass from two SBR fed on synthetic wastewater and landfill leachate. *Chemical Engineering Journal* 209, 62–68, 2012.

SCHMIDT, M., TWACHTMANN, U., KLIEN, M., STROUS, M., JURETSCHKO, S., JETTEN, M. Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation. *Syst. Appl. Microbiol.* v. 23, p. 93–106, 2000.

SCHMIDT, I.; SLIEKERS, O.; SCHMID, M.; BOCK, E.; FUERST, J.; KUENEN, J. G.; JETTEN, M. S. M.; STROUS, M. New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 27, n. 4, p. 481-492, 2003.

SHALINI, S. S.; JOSEPH, K. Nitrogen management in landfill leachate: Application of SHARON, ANAMMOX and combined SHARON–ANAMMOX process. *Waste Management* p. 2385–2400, 2012

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 20th ed. American Public Health Association / American Water Works Association / Water Environment Federation, Washington, DC, USA, 1998.

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

STROUS, M.; FUERST, J. A.; KRAMER, E. H. M.; LOGEMANN, S.; MUYZER, G.; VAN DE PAS-SCHOONEN, K. T.; WEBB, R.; KUENEN, J. G.; JETTEN, M. S. M. Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature*, v. 400, n. 6743, Jul, p. 446-449, 1999a.

STROUS, M.; KUENEN, J. G.; JETTEN, M. S. M. Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n. 7, Jul, p. 3248-3250, 1999b.

STROUS, M.; VANGERVEN, E.; ZHENG, P.; KUENEN, J. G.; JETTEN, M. S. M. Ammonium removal from concentrated waste streams with the anaerobic ammonium oxidation (anammox) process in different reactor configurations. *Water Research*, v. 31, n. 8, Aug, p. 1955-1962, 1997.

STROUS, M., KUENEN, G.J., FUERST, J.A., WAGNER, M., JETTEN, M.S.M. The anammox case – a new experimental manifesto for microbiological eco-physiology. *Antonie Leeuw*. v. 81, p. 693–702, 2002.

TANG, C.; ZHENG P.; CHAI L.; MIN X. Thermodynamic and kinetic investigation of anaerobic bioprocesses on ANAMMOX under high organic conditions. *Chemical Engineering Journal* 230 149–157, 2013

THAMDRUP, B.; DALSGAARD, T. Production of n₂ through anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 3, Mar, p. 1312-1318, 2002.

THIRD, K. A.; PAXMAN, J.; SCHMID, M.; STROUS, M.; JETTEN, M. S. M.; CORD-RUWISCH, R. Enrichment of anammox from activated sludge and its application in the canon process. *Microbial Ecology*, v. 49, n. 2, Feb, p. 236-244, 2005.

VAN DE GRAAF, A. A.; DEBRUIJN, P.; ROBERTSON, L. A.; JETTEN, M. S. M.; KUENEN, J. G. Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology-Uk*, v. 142, Aug, p. 2187-2196, 1996.

VAN DE GRAAF, A. A.; DEBRUIJN, P.; ROBERTSON, L. A.; JETTEN, M. S. M.; KUENEN, J. G. Metabolic pathway of anaerobic ammonium oxidation on the basis of n₁₅ studies in a fluidized bed reactor. *Microbiology-Uk*, v. 143, p. 2415-2421, 1997.

VAN DER STAR, W. R. L.; ABMA, W. R.; BLOMMERS, D.; MULDER, J. W.; TOKUTOMI, T.; STROUS, M.; PICIOREANU, C.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Startup of reactors for anoxic ammonium oxidation: Experiences from the first full-scale anammox reactor in Rotterdam. *Water Research*, v. 41, n. 18, p. 4149-4163, 2007.

VAN GRAAF, A. A. V.; DEBRUIJN, P.; ROBERTSON, L. A.; JETTEN, M. S. M.; KUENEN, J. G. Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology-Uk*, v. 142, Aug, p. 2187-2196, 1996.

VANDEGRAAF, A. A.; MULDER, A.; DEBRUIJN, P.; JETTEN, M. S. M.; ROBERTSON, L. A.; KUENEN, J. G. Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, n. 4, Apr, p. 1246-1251, 1995.

VERSTRAETE, W.; PHILIPS, S. Nitrification-denitrification processes and technologies in new contexts. In: *1st International Nitrogen Conference 1998*. Noordwijkerhout, Netherlands. Mar 23-27, 1998. p. 717-726.

VLAEMINCK, S.E., DE CLIPPELEIR, H., VERSTRAETE, W. Microbial resource management of one-stage partial nitrification/anammox. *Microb. Biotechnol.* v. 5 p. 433 – 448, 2012.

WANG, C.-C.; LEE, P.-H.; KUMAR, M.; HUANG, Y.-T.; SUNG, S.; LIN, J.-G. 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.

WILKE, A.; HARRISON, T.; WILKENING, J.; FIELD, D.; GLASS, E.; KYRPIDES, N.; MAVROMMATIS, K.; MEYER, F. The m5nr: A novel non-redundant database containing protein sequences and annotations from multiple sources and associated tools. *BMC Bioinformatics*, v. 13, n. 1, p. 141, 2012.

WUYTS, J.; VAN DE PEER, Y.; WINKELMANS, T.; DE WACHTER, R. The european database on small subunit ribosomal rna. *Nucleic Acids Res*, v. 30, n. 1, Jan 1, p. 183-5, 2002.

YANG, J.; ZHANG, L.; HIRA, D.; FUKUZAKI, Y.; FURUKAWA, K. High-rate nitrogen removal by the Anammox process with a sufficient inorganic carbon source. *Bioresource Technology* 102, 672–676, 2011.

ZAIAT, M.; VIEIRA, L. G. T.; FORESTI, E.; Spatial and Temporal Variations of Monitoring Performance Parameters in Horizontal-Flow Anaerobic Immobilized Sludge (HAIS) Reactor treating Synthetic Substrate. *Water Research*, v.31, p. 1760-1766, 1997.

ZHANG, L., ZHENG, P., TANG, C., JIN, R. Anaerobic ammonium oxidation for treatment of ammonium-rich wastewaters. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* v. 9, p. 416–426, 2008.