
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA CIVIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL



MARIANA BRAGA NANES

**INFLUÊNCIA DA AMÔNIA LIVRE NA NITRIFICAÇÃO PARCIAL EM REATORES
EM SÉRIE ANAERÓBIO E AERÓBIO**

Recife
2017

MARIANA BRAGA NANES

**INFLUÊNCIA DA AMÔNIA LIVRE NA NITRIFICAÇÃO PARCIAL EM REATORES
EM SÉRIE ANAERÓBIO E AERÓBIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil do Centro de Tecnologia e Geociências da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Civil

Área de concentração: Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos

Orientador: Profº Drº Mário Takayuki Kato

Recife
2017

Catálogo na fonte
Bibliotecária Margareth Malta, CRB-4 / 1198

- N177i Nanes, Mariana Braga.
Influência da amônia livre na nitrificação parcial em reatores em série anaeróbio e aeróbio / Mariana Braga Nanes. - 2017.
83 folhas, il., gráfs., tabs.
- Orientador: Prof. Dr. Mário Takayuki Kato.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, 2017.
Inclui Referências.
1. Engenharia civil. 2. Nitrificação e desnitrificação simultânea. 3. Amônia livre. 4. Nitrificação parcial. 5. Anammox. 6. Meio suporte de poliuretano. I. Kato, Mário Takayuki. (Orientador). II. Título.

UFPE

624 CDD (22. ed.)

BCTG/2017-388



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL

A comissão examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado

**INFLUÊNCIA DA AMÔNIA LIVRE NA NITRIFICAÇÃO PARCIAL
EM REATORES EM SÉRIE ANAERÓBIO E AERÓBIO**

defendida por

Mariana Braga Nanes

Considera a candidata APROVADA

Recife, 06 de julho de 2017

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Mario Takayuki Kato – UFPE
(orientador)

Prof.^a Dr.^a Paula Loureiro Paulo – UFMS
(examinadora externa)

Prof.^a Dr.^a Juliana Cardoso de Moraes – UFPE
(examinadora externa)

Prof. Dr. Wanderli Rogério Moreira Leite – UFPE
(examinador externo)

*Aos meus pais, Kátia e Romel,
Meu alicerce em tudo na vida;
Aos meus amigos “Esgotados”,
parceiros incríveis que a jornada
acadêmica me concedeu.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Divino, por iluminar meu caminho e sempre me guiar com muita proteção e amor.

Aos meus pais que, além de me gerarem, foram meus primeiros mestres e vibram com cada conquista profissional minha. Sem o apoio deles eu não teria conquistado nada do que conquistei até hoje.

Ao meu namorado Tiago, pelo amor e incentivo.

Ao meu orientador, Mário Takayuki Kato, e aos professores Lourdinha Florêncio, Sávia Gavazza e Wanderli Leite pelo acolhimento, pelos conselhos, por todas as orientações e ensinamentos.

A Juliana Moraes e Gabriela Valones por todo acolhimento, pela paciência e auxílio.

A Rô, Dan e Iago, técnicos do laboratório que deram seu melhor para auxiliar em todas as questões diariamente, e a todos os amigos do LSA.

Aos estagiários Gustavo, Thiago, Breno e Marília, que durante toda essa jornada foram meu suporte no processo experimental, trabalhando todos os dias com dedicação. Gratidão pelo companheirismo e parceria durante todo esse tempo.

Aos meus professores particulares que me ensinaram e me ajudaram muito no período final: Antônio (Toin), Poliana (Polizinha), Oucilane (Cici), Carlos (Carlitos) e Osmar (ito); e aos que me ajudaram durante todo o período de mestrado, seja em discussões científicas ou pelo acolhimento e carinho: Nathaly (Nathyca), Sofia (Sofi), Larissa (Lariquita), Denise (Dêzinha), Sandra (Sandroca), Marcelo (Tchelo), Jucélia (Celinha), Bárbara (Babinha) e Bruno (Delvaz).

Aos “Esgotados”, especialmente. Grupo que nasceu no LSA e que trouxe muita alegria para minha vida, exemplos de empatia, companheirismo e alto astral. Vocês me proporcionaram os melhores momentos durante todo esse tempo.

À Finep (Projeto RentED) e ao CNPq pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

“Se vi mais longe, foi por estar sobre os ombros de gigantes.” (Isaac Newton)

RESUMO

A remoção de nitrogênio dos esgotos sanitários é fundamental para promover o equilíbrio dos ecossistemas aquáticos, evitar problemas ambientais como a eutrofização e preservar a saúde humana. Devido à importância do tema, vários processos de tratamento de esgotos vêm sendo desenvolvidos para aumentar a eficiência de remoção do nitrogênio. Um deles é a nitrificação parcial e desnitrificação via nitrito, que possibilita economia de cerca de 25% de oxigênio e 40% de matéria orgânica. Nesse contexto, este estudo teve como objetivo promover o acúmulo de nitrito através de inibidor químico (amônia livre) em um sistema com dois reatores anaeróbio e aeróbio em série em escala de bancada e alimentado com esgoto sintético. Ambos os reatores possuíam um volume de 4,71 L, com tempo de detenção hidráulica (TDH) total de 30 h e vazão de 7,54 L.d⁻¹. O oxigênio dissolvido no reator aeróbio foi mantido a 1,75±0,4 mg O₂.L⁻¹. O experimento teve duração de 250 dias e foi dividido em quatro fases em função da variação de amônio (N-NH₄⁺): 16±2 mg N.L⁻¹ (Fase I), 34±3 mg N.L⁻¹ (Fase II), 159±16 mg N.L⁻¹ (Fase III) e 57±3 mg N.L⁻¹ (Fase IV). A concentração de amônia livre (NH₃) no meio foi alterada em função das variações de pH, temperatura e amônio, variando entre 0,3±0,2 mg N-NH₃.L⁻¹ (Fase I), 1,5±0,5 mg N-NH₃.L⁻¹ (Fase II), 4,8±1,8 mg N-NH₃.L⁻¹ (Fase III) e 1,6±0,3 mg N-NH₃.L⁻¹ (Fase IV). A carga orgânica volumétrica (COV) variou entre 0,567±0,151 e 0,757±0,031 kg DQO.m⁻³.d⁻¹ e a carga nitrogenada volumétrica (CNV) entre 0,036±0,003 e 0,286±0,017 kg N.m⁻³.d⁻¹. As bactérias oxidantes de nitrito (BON) foram inibidas à concentração de 4,8 mg N-NH₃.L⁻¹. Os resultados indicaram que ocorreu remoção de nitrogênio nos reatores anaeróbio e aeróbio através dos processos de oxidação anaeróbia da amônia (anammox) e nitrificação e desnitrificação simultânea (NDS). Apesar da relativamente alta concentração de oxigênio dissolvido no reator (1,75±0,4 mg O₂.L⁻¹), o meio suporte possivelmente favoreceu a NDS promovendo ambientes anóxicos. O sistema em sua melhor condição experimental (Fase IV), com 57±3 mg N-NH₄⁺.L⁻¹ e 1,6±0,3 mg N-NH₃.L⁻¹, obteve remoção de 95% de matéria orgânica e de 50% de nitrogênio. Os resultados de PCR identificaram a presença de anammox, desnitrificantes e bactérias oxidantes de amônio (BOA) no reator anaeróbio, enquanto no reator aeróbio foram encontradas BOA, BON e anammox. A taxa de oxidação da amônia foi reduzida em 50% na Fase III de maior inibição (4,8 mg N-NH₃.L⁻¹).

Palavras-chave: Nitrificação e desnitrificação simultânea. Amônia livre. Nitrificação parcial. Anammox. Meio suporte de poliuretano.

ABSTRACT

The nitrogen removal from domestic sewage is essential to promote the aquatic ecosystems equilibrium, to avoid environmental problems such as eutrophication and to preserve human health. Due to the importance of this topic, several sewage treatment processes have been developed to increase the efficiency of nitrogen removal. One of them is the partial nitrification and denitrification via nitrite, which can save 25% of oxygen and 40% of organic matter. Therefore, this study aimed to promote the accumulation of nitrite through chemical inhibitor (free ammonia) in a system with two sequential reactors, anaerobic and aerobic, on bench scale and fed with synthetic sewage. Both reactors had a volume of 4.71 L, with total hydraulic detention time (TDH) of 30 h and with a flow rate of 7.54 L.d⁻¹. The dissolved oxygen in the aerobic reactor was maintained at 1.75±0.4 mg O₂.L⁻¹. The experiment lasted 250 days and was divided in four phases based on ammonium concentration (N-NH₄⁺): 16±2 mg N.L⁻¹ (Phase I), 34±3 mg N.L⁻¹ (Phase II), 159±16 mg N.L⁻¹ (Phase III) and 57±3 mg N.L⁻¹ (Phase IV). The concentration of free ammonia (NH₃) in the system was changed in function of pH, temperature and ammonium, changing of 0.3±0.2 mg N-NH₃.L⁻¹ (Phase I), 1.5±0.5 mg N-NH₃.L⁻¹ (Phase II), 4.8±1.8 mg N-NH₃.L⁻¹ (Phase III) and 1.6±0.3 mg N-NH₃.L⁻¹ (Phase IV). The organic loading rate (OLR) varied between 0.567±0.151 and 0.757±0.031 kg DQO.m⁻³.d⁻¹ and the nitrogen loading rate (NLR) varied between 0.036±0.003 and 0.286±0.017 kg N.m⁻³.d⁻¹. The nitrite oxidizing bacteria (NOB) were inhibited at a concentration of 4.8 mg N-NH₃.L⁻¹. The results indicated that nitrogen removal occurred in the anaerobic and aerobic reactors by anaerobic oxidation of ammonia (anammox) and simultaneous nitrification and denitrification (SND). Despite the high concentration of dissolved oxygen in the reactor (1.75±0.4 mg O₂.L⁻¹), the support medium may have promoted anoxic environments for SND. The best experimental condition (Phase IV) was obtained with 57±3 mg N-NH₄⁺.L⁻¹ and 1.6±0.3 mg N-NH₃.L⁻¹, resulting in removal efficiency of organic matter and nitrogen of 95% and 50%, respectively. The PCR results showed the presence of anammox, denitrifying and ammonium oxidizing bacteria (AOB) in the anaerobic reactor, while in the aerobic reactor AOB, NOB and anammox were found. The oxidation rate of ammonia was reduced by 50% in the phase of higher inhibition (Phase III with 4.8 mg N-NH₃.L⁻¹).

Keywords: Simultaneous nitrification and denitrification. Free ammonia. Partial nitrification. Anammox. Poliuretane support medium.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 3.1 - Ciclo do nitrogênio. Fonte: Ni; Zhang (2013).

Figura 4.2 - Inóculo de reator anaeróbio (Fonte: arquivo pessoal).

Figura 4.3 - Representação esquemática do funcionamento dos reatores sequenciais anaeróbio e aeróbio. (Fonte: próprio autor).

Figura 4.4 - Protocolos de amplificação dos primers.

Figura 4.5 - Procedimento da PCR (Fonte: www.icb.ufmg.br, 2015).

Figura 5.6 - Variação de pH nos reatores anaeróbio (AN) e aeróbio (AE) e a relação de nitrificação e desnitrificação.

Figura 5.7 - Boxplot sobre a variação de SSV (mgSSV.L^{-1}) nos reatores anaeróbio e aeróbio nas Fases I, II, III e IV.

Figura 5.8 - Alcalinidade parcial ($\text{mgCaCO}_3\text{.L}^{-1}$) no esgoto sintético (afluente) e no efluente dos reatores anaeróbio e aeróbio.

Figura 5.9 - Alcalinidade total ($\text{mgCaCO}_3\text{.L}^{-1}$) no esgoto sintético (afluente) e no efluente dos reatores anaeróbio e aeróbio.

Figura 5.10 - DQO bruta Afluente (AF), Efluente Anaeróbio (AN), Efluente Aeróbio (AE) e eficiência de remoção de DQO ($\text{DQO}_{\text{bruta}}/\text{bruta}$).

Figura 5.11 - DQO filtrada Afluente (AF f), Efluente Anaeróbio (AN f), Efluente Aeróbio (AE f) e eficiência de remoção de DQO ($\text{DQO}_{\text{bruta}}/\text{filtrada}$).

Figura 5.12 - Eficiência de remoção de DQO bruta no reator anaeróbio (AN) e no aeróbio (AE).

Figura 5.13 - PCR dos reatores anaeróbio (AN) e aeróbio (AE) nas Fases I, II, III e IV para o domínio Bacteria: bactérias oxidantes de amônia (BOA), Nitrospira, desnitrificantes e anammox.

Figura 5.14 - Eficiência de oxidação de N-NTK bruta/bruta (N-NTK b) e bruta/filtrada (N-NTK f) nos reatores anaeróbio (AN) e aeróbio (AE) e as parcelas de N-NO_x- e N₂ produzidas na Fase I.

Figura 5.15 - Amônio afluente, amônio efluente, nitrato e nitrito efluente no reator aeróbio na Fase I.

Figura 5.16 - Eficiência de oxidação de N-NTK bruta/bruta (N-NTK b) e bruta/filtrada (N-NTK f) nos reatores anaeróbio (AN) e aeróbio (AE) e as parcelas de N-NO_x- e N₂ produzidas na Fase II.

Figura 5.17 - Amônio afluente, amônio efluente, nitrato e nitrito efluente no reator aeróbio na Fase II.

Figura 5.18 - Eficiência de oxidação de N-NTK bruta/bruta (N-NTK b) e bruta/filtrada (N-NTK f) nos reatores anaeróbio (AN) e aeróbio (AE) e as parcelas de N-NOx- e N₂ produzidas na Fase III.

Figura 5.19 - Amônio afluente, amônio efluente, nitrato e nitrito efluente no reator aeróbio na Fase III.

Figura 5.20 - Eficiência de oxidação de N-NTK bruta/bruta (N-NTK b) e bruta/filtrada (N-NTK f) nos reatores anaeróbio (AN) e aeróbio (AE) e as parcelas de N-NOx- e N₂ produzidas na Fase IV.

Figura 5.21 - Amônio afluente, amônio efluente, nitrato e nitrito efluente no reator aeróbio na Fase IV.

Figura 5.22 - Amônio afluente, amônio efluente, nitrato e nitrito efluente no reator aeróbio nas Fases I, II, III e IV.

Figura 5.23 - N-NTK bruto do esgoto sintético afluente (AF) e do N-NTK efluente do reator anaeróbio (EF AN) e do aeróbio (EF AE) nas Fases I, II, III e IV.

Figura 5.24 - N-NTK filtrado do esgoto sintético afluente (AFf) e do N-NTK efluente do reator anaeróbio (EF ANf) e do aeróbio (EF AEf) nas Fases I, II, III e IV.

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Água sintética para alimentação do lodo do reator anaeróbio antes do inóculo.

Tabela 4.2 - Composição da solução de sais minerais.

Tabela 4.3 - Composição da solução de micronutrientes.

Tabela 4.4 - Composição do substrato sintético utilizado na alimentação dos reatores sequenciais.

Tabela 4.5 - Condições operacionais do experimento nas Fases I, II, III e IV.

Tabela 4.6 - Parâmetros analisados, pontos de amostragem e frequência de monitoramento.

Tabela 4.7 - Solução preparada para amplificação do DNA.

Tabela 4.8 - Primers utilizados na amplificação do DNA.

Tabela 5.9 - Resumo estatístico da variação de pH e temperatura ($^{\circ}\text{C}$) nos reatores anaeróbio (AN) e aeróbio (AE) nas Fases I, II, III e IV.

Tabela 5.10 – Resumo estatístico da variação de oxigênio dissolvido ($\text{mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$) nos reatores anaeróbio (AN) e aeróbio (AE) nas Fases I, II, III e IV.

Tabela 5.11 - Resumo estatístico da variação de sólidos suspensos voláteis ($\text{mg SSV}\cdot\text{L}^{-1}$) nos reatores anaeróbio (AN) e aeróbio (AE) nas Fases I, II, III e IV.

Tabela 5.12 - Resumo estatístico da variação de alcalinidade parcial ($\text{mg CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$) no esgoto sintético (AF), nos reatores anaeróbio (AN) e aeróbio (AE) nas Fases I, II, III e IV.

Tabela 5.13 - Resumo estatístico da variação de alcalinidade total ($\text{mg CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$) no esgoto sintético (AF), nos reatores anaeróbio (AN) e aeróbio (AE) nas Fases I, II, III e IV.

Tabela 5.14 - Resumo estatístico da variação de matéria orgânica bruta e filtrada ($\text{mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$) no esgoto sintético (AF), nos reatores anaeróbio (AN) e aeróbio (AE) nas Fases I, II, III e IV.

Tabela 5.15 – Identificação das amostras dos reatores anaeróbio (AN) e aeróbio (AE) e suas respectivas fases.

Tabela 5.16 - Resumo estatístico da variação de nitrogênio ($\text{mg N}\cdot\text{L}^{-1}$) no esgoto sintético (AF), nos reatores anaeróbio (AN) e aeróbio (AE) na Fase I.

Tabela 5.17 - Resumo estatístico da variação de nitrogênio ($\text{mg N}\cdot\text{L}^{-1}$) no esgoto sintético (AF), nos reatores anaeróbio (AN) e aeróbio (AE) na Fase II.

Tabela 5.18 - Resumo estatístico da variação de nitrogênio (mg N.L^{-1}) no esgoto sintético (AF), nos reatores anaeróbio (AN) e aeróbio (AE) na Fase III.

Tabela 5.19 - Resumo estatístico da variação de nitrogênio (mg N.L^{-1}) no esgoto sintético (AF), nos reatores anaeróbio (AN) e aeróbio (AE) na Fase IV.

LISTA DE ABREVIATURAS

UASB – Upflow Anaerobic Sludge Blanket
BOA – Bactérias Oxidantes de Amônia
AMO – Amônia Monoxigenase
HAO – Hidroxilamina Oxidoredutase
BON – Bactérias Oxidantes de nitrito
NDS – Nitrificação e Desnitrificação Simultânea
TDH – Tempo de Detenção Hidráulica
TRC – Tempo de Retenção Celular
OD – Oxigênio Dissolvido
PH – Potencial Hidrogeniônico
PVC – Policloreto de Vinila
ETE – Estação de Tratamento de Efluentes
SSV – Sólidos Suspensos Voláteis
DQO – Demanda Química de Oxigênio
NTK – Nitrogênio Total Kjeldahl
COV – Carga Orgânica Volumétrica
CNV – Carga Nitrogenada Volumétrica
AF - Afluente
AN – Reator Anaeróbio
AE – Reator Aeróbio
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL.....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	REFERENCIAL TEÓRICO	19
3.1	CICLO DO NITROGÊNIO	19
3.2	AMONIFICAÇÃO.....	20
3.3	NITRIFICAÇÃO	21
3.3.1	Nitritaço	21
3.3.2	Nitrataço	22
3.4	DESNITRIFICAÇÃO.....	22
3.5	BACTÉRIAS NITRIFICANTES	23
3.5.1	Bactérias oxidantes de amônia (BOA).....	23
3.5.2	Bactérias oxidantes de nitrito (BON).....	23
3.6	BACTÉRIAS DESNITRIFICANTES.....	24
3.7	NITRIFICAÇÃO PARCIAL E DESNITRIFICAÇÃO VIA NITRITO.....	25
3.7.1	Tempo de detença hidráulico (TDH) e tempo de retenço celular (TRC).....	27
3.7.2	Concentraço de Oxigênio Dissolvido (OD)	27
3.7.3	Concentraço do substrato.....	28
3.7.4	Temperatura e pH.....	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1	APARATO EXPERIMENTAL.....	30
4.2	INÓCULO	30
4.3	ESGOTO SINTÉTICO	34
4.4	ALIMENTAÇO E COLETA DE AMOSTRAS	35
4.5	CONDIÇOES OPERACIONAIS	37
4.6	DETERMINAÇOES ANALÍTICAS	37
4.7	ANÁLISE DE BIOLOGIA MOLECULAR	40
4.7.1	Biologia molecular	40
4.7.2	Extraço do DNA Genômico	40

4.7.3	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	43
5.1.1	Potencial hidrogeniônico (pH) e temperatura	43
5.1.2	Oxigênio dissolvido (OD)	45
5.1.3	Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)	46
5.1.4	Alcalinidade	47
5.2	REMOÇÃO DE MATÉRIA ORGÂNICA	51
5.3	BIOLOGIA MOLECULAR	56
5.4	REMOÇÃO DE NITROGÊNIO	58
5.4.1	Fase I (1º ao 124º dia)	58
5.3.2	Fase II (125º ao 162º dia)	61
5.3.3	Fase III (163º ao 206º dia)	64
5.3.4	Fase IV (207º ao 250º dia)	67
6	CONCLUSÕES	76
7	RECOMENDAÇÕES	77
	REFERÊNCIAS	78

1 INTRODUÇÃO

As principais fontes de poluição dos corpos d'água pelas atividades antrópicas são a industrialização, crescimento populacional e seus resíduos gerados, uso de fertilizantes e pesticidas na agricultura, dentre outras. Nos grandes aglomerados urbanos o esgotamento sanitário e industrial continua sendo a principal. Como resposta à necessidade sanitária e ambiental de resolver a questão dos resíduos lançados nos corpos hídricos, principalmente os excretas humanos, foram desenvolvidas várias tecnologias desde as civilizações mais antigas, havendo indícios de tratamentos anaeróbios de resíduos há mais de 5 mil anos (BOTHEJU; BAKKE, 2011).

Processos anaeróbios são mais eficientes e econômicos que os processos aeróbios para degradar compostos orgânicos biodegradáveis, sendo utilizado nos tratamentos de resíduos sólidos (resíduos agrícolas, excrementos de animais, lodo biológico) e de efluentes industriais e domésticos (CHERNICHARO et al., 2007). Reatores do tipo *Upflow anaerobic sludge blanket* (UASB) são largamente utilizados para tratamento de esgoto doméstico e possuem vantagens por apresentar alta compacticidade, não necessitar de energia elétrica e possuir baixa produção de lodo (SOUZA; FORESTI, 1996). Sistemas aeróbios de tratamento também são largamente utilizados no mundo, apesar do custo adicional com aeração. O mais conhecido é o sistema de lodos ativados.

Apesar do principal poluente nos esgotos ser a matéria orgânica, garantir a sua remoção não é suficiente para impedir os problemas causados pelos seus despejos. Os nutrientes contidos no esgoto, principalmente nitrogênio e fósforo, também podem causar diversos problemas no meio ambiente. O nitrogênio lançado em corpos d'água pode causar depleção do oxigênio dissolvido, desenvolvimento excessivo de algas e toxinas, causar doenças e, em estações de tratamento de água, podem diminuir a eficiência da cloração (METCALF; EDDY, 2003).

O processo convencional de remoção de nitrogênio ocorre em duas etapas: (i) a nitrificação, que consiste na oxidação de amônia a nitrito e, posteriormente, a nitrato, em meio aeróbio e com baixa concentração de material orgânico; (ii) e a desnitrificação, que consiste na formação de gás dinitrogênio a partir do nitrato em meio anóxico e necessita de uma fonte externa de carbono. Para promover a remoção de nitrogênio é comum associar reatores anaeróbios e aeróbios (WOSIACK et

al.,2015). Em sistemas de lodos ativados a biomassa bacteriana suspensa é responsável pela remoção de poluentes em ambientes aeróbios, podendo alcançar a remoção de nitrogênio, ao mesmo tempo em que remove material orgânico em determinadas condições (SOZEN et al., 1998; GERNAEY et al., 2004).

O sistema de nitrificação/desnitrificação é a tecnologia mais utilizada para remoção de nitrogênio, porém demanda altos custos com aeração, adição de carbono e produção de lodo biológico. Uma das alternativas para mitigar esses problemas é a nitrificação parcial e desnitrificação via nitrito, que diminui a demanda de aeração na nitrificação e de material orgânico na desnitrificação (WANG et al., 2016). Com a finalidade de promover melhor remoção de nitrogênio, este estudo avaliou a eficiência de reatores sequenciais contínuos anaeróbio e aeróbio em escala de bancada utilizando amônia livre como inibidor químico no processo de nitrificação.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da amônia livre na nitrificação parcial em reatores em série anaeróbio e aeróbio.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a eficiência de remoção de matéria orgânica e nitrogênio em reatores sequenciais anaeróbio e aeróbio;
- Avaliar a influência de diferentes concentrações do inibidor químico (amônia livre) na nitrificação parcial;
- Avaliar a melhor condição inibitória a ser aplicada no reator em série para atingir a nitrificação via nitrito;

3 REFERENCIAL TEÓRICO

O principal objetivo do tratamento biológico de esgotos é criar condições que favoreçam o metabolismo das bactérias envolvidas no processo de tratamento, manipulando os vários parâmetros de funcionamento para que a população desejada de micro-organismos se sobreponha à dos outros também presentes no reator (SINHA; ANNACHHATRE, 2007).

Quando o esgoto doméstico é lançado no corpo d'água, disponibiliza nutrientes (principalmente nitrogênio e fósforo) considerados limitantes no desenvolvimento e crescimento de algas. Isso pode promover a eutrofização, que consiste no crescimento excessivo de algas e outros problemas associados. O termo eutrófico deriva do grego, que significa rico em alimento, e foi criado para descrever processos que ocorrem em lagos que se tornam naturalmente ricos em nutrientes (SCHINDLER et al., 2016). Nesse contexto a remoção de matéria orgânica dos efluentes sanitários não é suficiente para evitar a poluição dos recursos hídricos, sendo o tratamento terciário fundamental para manter a saúde de rios e lagos e o acesso a águas de qualidade.

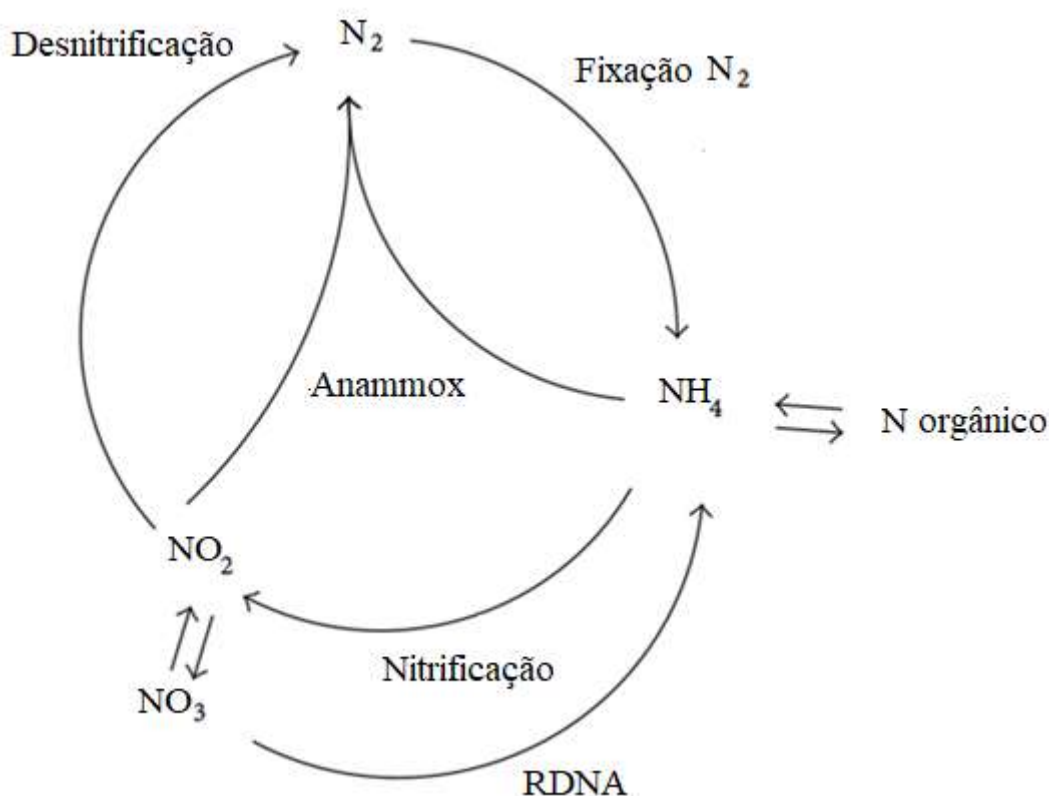
3.1 CICLO DO NITROGÊNIO

O nitrogênio é um macronutriente vital para os seres vivos, sendo o principal elemento em proteínas, aminoácidos e ácidos nucleicos como também o maior componente da atmosfera terrestre. O ciclo do nitrogênio é complexo devido aos seus vários estados de oxidação e ao fato de essas mudanças também serem provocadas por organismos vivos (SAWYER et al. 2003). O nitrogênio se apresenta na natureza em sete estados de oxidação diferentes, sendo eles -III (NH_3), 0 (N_2), +I (N_2O), +II (NO), +III (NO_2^-), +IV (NO_2) e +V (NO_3^-) (Figura 3.1).

Segundo Koops e Pommerening-Röser (2006) a amônia é a forma mais difundida de nitrogênio na biosfera, sendo altamente volatizada e alcançando longas distâncias. No meio terrestre a nitrificação não é desejável, pois a melhor forma de absorção de nitrogênio pelas plantas é como NH_4^+ , enquanto NO_x^- pode facilmente ser perdido do solo por lixiviação e desnitrificação (PAREDES et al., 2007). Na atmosfera o óxido nítrico é instável e pode reagir com o oxigênio ou ozônio formando gás dióxido de nitrogênio, podendo formar ácidos e causar chuvas ácidas.

Nos corpos hídricos, a amônia pode ser convertida a nitrito e nitrato, resultando no consumo e na diminuição do oxigênio dissolvido do meio, além de ser potencialmente tóxica a organismos aquáticos mesmo em baixas concentrações (PAREDES et al., 2007; EPA, 2013). Porém é fundamental que ocorra a nitrificação para que, posteriormente, haja a completa remoção do nitrogênio da água. Outras formas de nitrogênio, como nitrito e nitrato, podem ser muito graves à saúde humana e causar diversos tipos de câncer e a metahemoglobinemia ou “síndrome do bebê azul” (CHETTY; PRASAD, 2016).

Figura 3.1 - Ciclo do nitrogênio. Fonte: Adaptado de Ni; Zhang (2013).

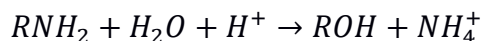


No processo biológico convencional de remoção de nitrogênio existem grupos de bactérias que participam de diferentes etapas. Dessa forma, o processo foi dividido em três partes: amonificação, nitrificação e desnitrificação.

3.2 AMONIFICAÇÃO

É a primeira reação a acontecer após o lançamento de efluentes sanitários, onde ocorre a hidrólise ou mineralização do nitrogênio orgânico (aminoácidos, ácido úrico, ureia, etc) a nitrogênio amoniacal (na forma livre NH_3 ou ionizada NH_4^+)

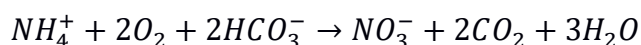
(PAREDES et al., 2007). Esse processo produz alcalinidade no meio ($50 \text{ g CaCO}_3 \cdot \text{mol N}^{-1}$), o que é importantíssimo para a próxima etapa biológica, pois na nitrificação há consumo de alcalinidade. Considerando-se a forma salina (NH_4^+) predominante em pH abaixo de 8, a equação de amonificação é escrita na Equação 3.1 (VAN HAANDEL; MARAIS, 1999):



Equação 3.1

3.3 NITRIFICAÇÃO

A nitrificação consiste na oxidação da amônia (NH_4^+) a nitrato (NO_3^-), onde as bactérias nitrificantes utilizam a amônia como fonte de energia e o dióxido de carbono (CO_2) como fonte de carbono. É um processo aeróbio, necessitando de oxigênio molecular para ocorrer. A equação da nitrificação convencional está representada na Equação 3.2 (PAREDES et al, 2007).

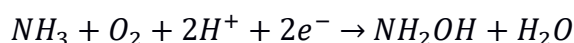


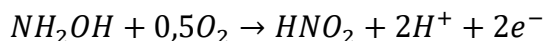
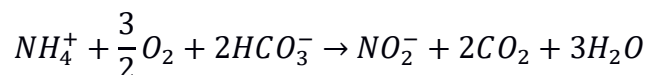
Equação 3.2

Durante a nitrificação há consumo de alcalinidade do meio ($100 \text{ g CaCO}_3 \cdot \text{mol N}^{-1}$), sendo este um parâmetro de fundamental importância para o seu desempenho. A nitrificação ocorre ainda em duas fases distintas por dois grupos diferentes de micro-organismos: a nitritação e a nitratação, que serão explicadas a seguir.

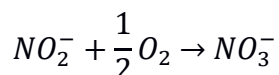
3.3.1 Nitritação

A nitritação é a produção de nitrito (NO_2^-) a partir da oxidação de amônia (NH_4^+) pelas bactérias oxidantes de amônia (BOA). Esse processo ocorre ainda em duas etapas: primeiramente a amônia é convertida a hidroxilamina (NH_2OH) a partir da enzima amônia monoxigenase (AMO). A Equação 3.3 ilustra a primeira etapa da nitritação, a partir da formação de hidroxilamina (GE et al., 2015). Depois, ocorre a oxidação da hidroxilamina a nitrito (NO_2^-) através da enzima hidroxilamina oxidoreductase (HAO), como mostram as Equações 3.4 e 3.5 da segunda etapa da nitritação (GE et al., 2015). A equação da nitritação (oxidação de amônia e produção de nitrito) é apresentada na Equação 3.6 (PAREDES et al., 2007).



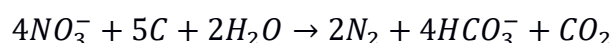
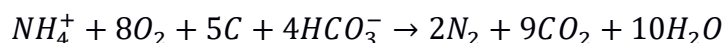
Equação 3.3**Equação 3.4 e 3.5****Equação 3.6****3.3.2 Nitratação**

A nitratação é a formação de nitrato (NO_3^-) a partir da oxidação de nitrito (NO_2^-) pelas bactérias oxidantes de nitrito (BON). O processo de nitratação é ilustrado na Equação 3.7 (PAREDES et al., 2007).

**Equação 3.7****3.4 DESNITRIFICAÇÃO**

A reação de desnitrificação é um processo de respiração o qual o nitrato ou nitrito (aceptores de elétrons) são reduzidos no lugar do oxigênio e convertidos a nitrogênio gasoso (N_2). O processo é dominado pelas bactérias desnitrificantes e tem diversos compostos orgânicos e inorgânicos como doadores de elétrons (MATEJU et al., 1992). Essas bactérias utilizam os compostos nitrogenados como fonte de energia e material carbonáceo como fonte de carbono e precisam de ambiente anóxico para seu metabolismo.

No processo de formação de N_2 podem ser formados alguns subprodutos como o óxido nitroso (N_2O) e o óxido nítrico (NO), dependendo da disponibilidade de doadores de elétrons no meio. A reação de desnitrificação também produz alcalinidade ($50 \text{ g CaCO}_3 \cdot \text{mol N}^{-1}$) e está ilustrada na Equação 3.8 (PAREDES et al., 2007). A Equação 3.9 ilustra o processo convencional geral de nitrificação e desnitrificação (PAREDES et al., 2007).

**Equação 3.8****Equação 3.9**

3.5 BACTÉRIAS NITRIFICANTES

As bactérias que participam da nitrificação são classificadas como quimiolitotóxicas, ou seja, utilizam compostos nitrogenados como fonte de energia e CO_2 como fonte de carbono. São bactérias aeróbias, ou seja, necessitam de O_2 nos seus processos metabólicos e possuem crescimento muito lento. Os dois grupos envolvidos na nitrificação possuem características específicas, abordadas a seguir.

3.5.1 Bactérias oxidantes de amônia (BOA)

São as bactérias que oxidam amônia a hidroxilamina e, então, a nitrito. São micro-organismos autotróficos que utilizam compostos químicos (amônia ou hidroxilamina) para obter energia para seu desenvolvimento e CO_2 como principal fonte de carbono. Pertencem a esse grupo as bactérias caracterizadas pelo prefixo Nitroso: *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosovibrio*, *Nitrosospira* e *Nitrosolobus*.

Várias bactérias que são geralmente consideradas como quimiolitotóxicas aeróbias como as *Nitrosomonas* possuem também a capacidade de desnitrificar mesmo sob condições completamente óxicas ou anóxicas com N_2 como produto final principal, podendo nitrificar e desnitrificar simultaneamente (AHN, 2006). A *N. europaea* possui a capacidade de reduzir nitrito a óxido nítrico (NO) ou óxido nitroso (N_2O) em ambientes com baixa oxigenação (METCALF; EDDY, 2003; YU; CHANDAN, 2010). A *N. Eutropha* possui a capacidade de metabolizar nitrito a nitrogênio gasoso em ambientes óxicos e anóxicos, bem como alguns intermediários do processo (AHN, 2006).

3.5.2 Bactérias oxidantes de nitrito (BON)

São as bactérias que oxidam nitrito a nitrato. Pertencem a esse grupo as bactérias caracterizadas pelo prefixo Nitro: *Nitrococcus*, *Nitrospira*, *Nitrospina* e *Nitrobacter*, sendo esta última a mais amplamente estudada. São micro-organismos quimiolitotóxicos, utilizando nitrito como única fonte de energia e CO_2 como principal fonte de carbono.

A *Nitrobacter* metaboliza nitrito através da enzima nitrito oxidoreductase (NOR), enquanto as demais espécies metabolizam através da enzima de oxidação de nitrito

(nitrite-oxidizing system: NOS). Em ambientes anóxicos ou com oxigenação limitada pode crescer heterotroficamente reduzindo nitrato, podendo ser convertido a nitrogênio gasoso (desnitrificação) (BOCK; WAGNER, 2006; KOOPS; POMMERENING-RÖSER, 2006).

3.6 BACTÉRIAS DESNITRIFICANTES

Segundo Metcalf e Eddy (2003), as bactérias responsáveis pela desnitrificação são diversas e podem ser classificadas como heterotróficas ou autotróficas. Alguns gêneros de bactérias desnitrificantes heterotróficas são *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Hypomicrobium*, *Paracoccus*, *Propionibacterium*, *Rhizobium*, *Spirillum*, *Vibrio* e *Pseudomonas*, sendo esta última considerada a mais comum.

Algumas das espécies desnitrificantes podem produzir nitrogênio gasoso na presença de O₂. Apesar da desnitrificação ocorrer também em ambientes com oxigênio, as enzimas associadas ao processo são sintetizadas em condições anaeróbias, podendo em alguns casos específicos serem sintetizadas em baixas concentrações de O₂ (BONIN et al., 1989; MATEJU et al., 1992). A baixa aeração pode promover a formação de zonas anóxicas no sistema, a depender das condições de mistura e da distância do ponto de aeração, e possibilitar a desnitrificação (METCALF; EDDY, 2003). Apesar de várias espécies desnitrificarem em ambiente com oxigênio, a primeira observada desnitrificando em ambiente com alta aeração foi a espécie *Paracoccus*, seguida de outras como *Thiosphaerapantotropha* e *Magnetospirillum magnetotacticum* - esta última em ambientes microaerofílicos (AHN, 2006).

Algumas bactérias podem ainda oxidar amônia reduzindo nitrito em condições anaeróbias: as bactérias *Anammox*. São micro-organismos autotróficos que convertem amônia a gás dinitrogênio anaerobicamente, utilizando nitrito comoceptor de elétrons (MULDER et al., 1995; LAN et al., 2011). A descoberta dessas bactérias trouxe mudanças revolucionárias para os tratamentos convencionais de remoção de nitrogênio, pois apresentam baixo desenvolvimento de lodo, não precisam de oxigênio e nem de fonte externa de carbono (NI; ZHANG, 2013). Diferentemente da *N.*

europaea, as anammox não podem metabolizar o oxigênio e são até 10 vezes mais rápidas (METCALF; EDDY, 2003; AHN, 2006).

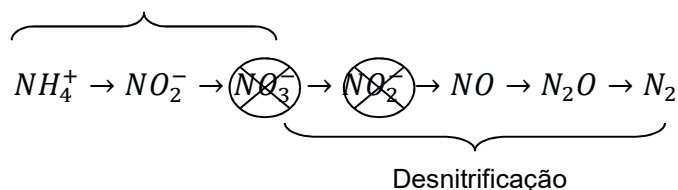
O processo convencional de remoção de nitrogênio possui algumas desvantagens: a completa remoção depende de grupos de micro-organismos distintos e que trabalham em condições diferentes. Esse fato resulta muitas vezes em um maior tempo de retenção e maior volume requerido, gasto de energia com a aeração na etapa de nitrificação ($4,57 \text{ g O}_2.\text{g N}^{-1}$) e a necessidade de uma fonte de carbono na desnitrificação ($2,86 \text{ g DQO.g N}^{-1}$) (ZHU et al., 2008).

Pensando em novos processos para diminuição de custos e maior eficiência na remoção de nitrogênio, surgiram vários novos sistemas de tratamento, os mais conhecidos são os de nitrificação parcial e desnitrificação via nitrito, nitrificação e desnitrificação simultânea (NDS) ou *simultaneous nitrification and denitrification* (SND), Canon (*completely autotrophic nitrogen removal over nitrite*), Sharon (*single reactor system for high ammonium removal over nitrite*), OLAND (*oxygen-limited autotrophic nitrification-denitrification*) e oxidação anaeróbia da amônia (via *anammox*) (LAN et al., 2011). O objeto de estudo dessa pesquisa foi a nitrificação parcial e desnitrificação via nitrito.

3.7 NITRIFICAÇÃO PARCIAL E DESNITRIFICAÇÃO VIA NITRITO

A nitrificação parcial é o processo onde há encurtamento das reações de nitrificação e desnitrificação. Na nitrificação convencional a amônia é metabolizada em ambiente aeróbio a nitrito e, depois, a nitrato; segue então para a etapa de desnitrificação, onde o nitrato é novamente metabolizado a nitrito por meio de material carbonáceo para finalmente ser convertido a gás dinitrogênio. De $4,57 \text{ g O}_2.\text{g N}^{-1}$ necessários na nitrificação, $3,43 \text{ g O}_2.\text{g N}^{-1}$ são utilizados para produção de nitrito e $1,14 \text{ g O}_2.\text{g N}^{-1}$ para produção de nitrato.

Na nitrificação parcial a reação de oxidação do nitrito a nitrato é inibida e ocorre um encurtamento das reações sem a formação de nitrato, como demonstra a Equação 3.10. Esse encurtamento poupa cerca de 25% de oxigênio na oxidação de nitrito a nitrato e de cerca de 40% de carbono na conversão de nitrito a nitrato na etapa de desnitrificação. A nitrificação parcial proporciona economia de energia, oxigênio e substrato, redução na produção de lodo e de 20% na emissão de CO_2 na desnitrificação (TURK; MAVINIC, 1986; TURK; MAVINIC, 1989).

**Equação 3.10**

Inúmeros parâmetros e modos diferentes de operação têm sido propostos, sejam eles fatores múltiplos ou individuais, na verificação da viabilidade da nitrificação parcial com vários tipos de águas residuárias (GE et al., 2015). Vários fatores influenciam na atividade das bactérias nitrificantes: temperatura do meio, pH, população de micro-organismos, tempo de retenção celular (TRC ou idade do lodo), tempo de detenção hidráulica (TDH), concentração do substrato e presença de compostos inibitórios, concentração de oxigênio dissolvido, aclimação (ANTHONISEN et al., 1976; TURK; MAVINIC, 1989; RUIZ et al., 2003; CHUNG et al., 2005).

A alcalinidade disponível também é um fator muito importante no acúmulo de nitrito, podendo dificultar ou até cessar o processo se em quantidade insuficiente (ZHANG et al., 2011; HOU et al., 2014). O carbono inorgânico presente no bicarbonato pode ser usado como fonte de carbono para as bactérias nitrificantes e utilizado para neutralizar os íons hidrogênio formados no processo (JUN et al., 2000). Esse pode ser inclusive um parâmetro de controle da nitrificação parcial como meio alternativo ao controle do pH (ZHANG et al., 2011). Hou et al. (2014), em experimento para avaliar a influência da alcalinidade na nitrificação parcial, observaram que esse parâmetro possui papel vital na remoção de nitrogênio e afetou diretamente a oxidação de amônia pelas BOA. O acúmulo de nitrito foi muito baixo quando não houve adição de alcalinidade nesse experimento.

A alternância entre os estados aeróbio/anóxico é mais uma ferramenta de inibição das BON, que demoram mais a se recuperar de períodos anóxicos que as BOA (GUO et al., 2009; GU et al., 2012; GE et al., 2014; WEI et al., 2014). O mecanismo que proporciona a nitrificação parcial é devido à maior sensibilidade das bactérias oxidantes de nitrito (BON) a esses parâmetros do que as bactérias oxidantes de amônia (BOA), podendo ser inibidas ou "lavadas" do meio e impedindo a oxidação de nitrito.

3.7.1 Tempo de detenção hidráulico (TDH) e tempo de retenção celular (TRC)

As BON possuem crescimento bastante lento, com tempo de geração celular que pode variar de 8 horas a alguns dias (KOOPS; POMMERENING-RÖSER, 2006). Dessa forma, a idade do lodo influencia no acúmulo de nitrito em reatores aeróbios, pois, mantendo-se o TRC baixo, ocorre a lavagem ou *whash out* das BON no reator. Isso facilita o acúmulo das BOA, que conseguem se multiplicar mais rapidamente. Já o TDH influencia no tempo de contato das bactérias com o inibidor. Yang et al. (2010) associando um menor TDH e TRC com baixa oxigenação alcançaram a lavagem das BON, porém observaram também que ocorreu perda considerável das BOA. Turk e Mavinic (1989) não conseguiram resultados positivos no acúmulo de nitrito através da diminuição do TDH.

3.7.2 Concentração de Oxigênio Dissolvido (OD)

As BOA possuem uma constante de semi-saturação de oxigênio de 0,2 a 1,5 mg O₂.L⁻¹ enquanto as BON possuem uma constante maior de 1,2-1,5 mg O₂.L⁻¹, indicando menor afinidade das BON com o oxigênio (LAANBROEK; GERARDS, 1993; GE et al., 2015). A maior afinidade das bactérias oxidantes de amônia com o oxigênio permite que elas possam sobreviver e dominar ambientes com baixa oxigenação e inibir a atividade das BON, acumulando nitrito no sistema. Vários trabalhos avaliam a influência desse parâmetro na nitrificação parcial (RUIZ et al., 2003; YANG et al., 2010; CHUNG et al., 2005; CHUNG et al., 2007; ZHANG et al., 2011; GU et al., 2012; WANG et al., 2014).

Wiesmann (1994) observou que as BON apresentam boa taxa de nitrificação quando o meio reacional apresentou concentração de OD maior que 1,8 mg O₂.L⁻¹. Yang et al. (2010) concluíram em seu experimento que as BOA podem se proliferar com eficiência em ambientes com oxigenação próxima a 0 mg O₂.L⁻¹. Wang et al. (2014) concluíram que ambientes com menos de 2 mg O₂.L⁻¹ afetam muito mais o crescimento das BON que das BOA; também concluíram que ambientes com mais de 2 mg O₂.L⁻¹ podem prejudicar a atividade das bactérias nitrificantes devido ao mais rápido crescimento das bactérias heterotróficas que removem carbono. Ruiz et al. (2003) observaram em reator de lodos ativados de bancada com OD de 5,7 a 2,7 mg O₂.L⁻¹ que não houve interferência na nitrificação. Quando o oxigênio diminuiu para

1,7 mg O₂.L⁻¹ houve pequeno acúmulo de nitrito, que atingiu sua taxa máxima a 0,7 mg O₂.L⁻¹.

3.7.3 Concentração do substrato

A concentração do substrato no processo de nitrificação, juntamente com o pH e a temperatura, influencia no equilíbrio químico do meio e na forma que o substrato estará disponível: se estará na forma livre e tóxica aos micro-organismos (amônia livre -NH₃ e ácido nitroso livre -HNO₂) ou na forma ionizada (íon amônio -NH₄⁺ e íon nitrito -NO₂⁻). Dessa forma, o próprio substrato utilizado pode inibir as atividades desses micro-organismos na nitrificação. As concentrações de amônia livre e ácido nitroso livre são estimadas através das Equações 3.11 e 3.12, respectivamente, propostas por Anthonisen et al. (1976) e apresentadas a seguir.

$$\text{Amônia livre (mgNH}_3\text{.L}^{-1}\text{)} = \frac{17}{14} \times \frac{N - \text{NH}_4^+ \times 10^{pH}}{\left[\exp\left(\frac{6334}{273+^{\circ}\text{C}}\right) + 10^{pH}\right]}$$

Equação 3.11

$$\text{Ácido nitroso livre (mgHNO}_2\text{.L}^{-1}\text{)} = \frac{47}{14} \times \frac{N - \text{NO}_2^-}{\left[\exp\left(\frac{-2300}{273+^{\circ}\text{C}}\right) \times 10^{pH}\right] + 1}$$

Equação 3.12

Através da aplicação dessas fórmulas é possível perceber que em meios com pH alto a amônia livre prevalece, enquanto em meios com pH baixo o ácido nitroso livre é o que prevalece.

3.7.4 Temperatura e pH

Como mostrado anteriormente, a temperatura e o pH do meio influenciam diretamente na toxicidade da amônia e do ácido nitroso. As BOA possuem uma maior taxa de crescimento em ambientes com temperaturas mais altas comparado às BON (RUIZ et al., 2003). Segundo Koops e Pommerening-Röser (2006) as bactérias oxidantes de amônia se desenvolvem melhor em meios com pH de 7,5 a 8,0 e a temperaturas de 25° a 30°C. Gabarró et al. (2012) observaram a interferência positiva da temperatura na atividade das BOA e a sua influência na concentração de amônia

livre. Zhang et al. (2011) identificaram em seu experimento que, quando a temperatura diminuiu, a nitrificação parcial foi bastante afetada, retomando sua eficiência com o retorno da temperatura para 28°C. Em um reator SBR (*Sequencing Batch Reactor*) de escala piloto houve incremento de crescimento das BOA e inibição das BON com temperatura <16°C utilizando a estratégia de controle em tempo real do pH e da aeração (GU et al. 2012). Ruiz et al. (2003) não observaram acúmulo de nitrito entre pH 6,45 e 8,95, porém observaram inibição completa da nitrificação abaixo e acima desses valores.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 APARATO EXPERIMENTAL

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Saneamento Ambiental – LSA, localizado no Departamento de Engenharia Civil da Universidade Federal de Pernambuco – DECIV/UFPE.

O sistema de tratamento empregado para a remoção de matéria orgânica e nitrogenada foi constituído de dois reatores de fluxo ascendente em série, operação contínua e em escala de bancada. Os reatores foram construídos em tubo de PVC (polímero policloreto de vinila), apresentando altura de 0,60 m e diâmetro de 0,10 m, perfazendo um volume útil de 4,71 L cada. O primeiro reator do sistema de tratamento era anaeróbio com configuração de UASB (sem separador trifásico) para remoção de matéria orgânica, seguido de um reator aeróbio com a finalidade de promover a nitrificação parcial.

4.2 INÓCULO

Reator Anaeróbio

O reator anaeróbio foi inoculado com lodo de reator UASB da ETE de Rio Formoso-PE. O reator foi inoculado dia 11/08/16 utilizando um volume aproximado de 1,5 L (Figura 4.2). O inóculo anaeróbio possuía 21,24 g SSV.L⁻¹, promovendo introdução de 31,9 g de biomassa.

Figura 4.2 - Inóculo de reator anaeróbio (Fonte: arquivo pessoal).



Antes da inoculação foi feita a elutriação do lodo para a separação do material inerte e biomassa inativa ou de baixa atividade, que possui como característica baixa capacidade de sedimentação. No processo de elutriação o lodo é homogeneizado com água potável e espera-se decantar, desprezando o sobrenadante. O procedimento é feito diversas vezes até que a água da superfície esteja visualmente límpida. A biomassa ainda foi enriquecida com 1 L de água sintética nitrificada (adaptado de Callado e Foresti, 2000; Garbossa, 2006) e 5 mL de solução de micronutrientes (adaptado de Torres, 1992; Moura, 2011) por um período de 24 horas antes de ser inoculado no reator. A composição detalhada das soluções adicionadas está apresentada nas Tabelas 4.1, 4.2 e 4.3.

Tabela 4.1 – Água sintética para alimentação do lodo do reator anaeróbio antes do inóculo.

Composição	Concentração
Bicarbonato de sódio (NaHCO_3)	300 mg.L^{-1}
Fosfato de potássio (KH_2PO_4)	36 mg.L^{-1}
Nitrito de sódio (NaNO_2)	49 mg.L^{-1}
Sulfato de sódio (Na_2SO_4)	11 mg.L^{-1}
Ureia (CON_2H_4)	9 mg.L^{-1}
Solução de sais minerais	5 mL.L^{-1}
Solução de micronutrientes	5 mL.L^{-1}

Fonte: Adaptado de Callado e Foresti (2000) e Garbossa (2006).

Tabela 4.2– Composição da solução de sais minerais.

Composição	Concentração (g.L^{-1})
Cloreto de sódio (NaCl)	100
Cloreto de magnésio ($\text{MgCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$)	2,8
Cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$)	1,8

Fonte: Adaptado de Torres (1992).

Tabela 4.3 – Composição da solução de micronutrientes.

Composição	Concentração (g.L⁻¹)
Ácido nitrilotriacético (N(CH ₂ COOH) ₃)	12,800
Cloreto férrico (FeCl ₃ .6H ₂ O)	1,350
Cloreto de sódio (NaCl)	1,000
Cloreto de níquel (NiCl ₂ .6H ₂ O)	0,120
Cloreto de manganês (MnCl ₂ .4H ₂ O)	0,100
Cloreto de cálcio (CaCl ₂ .2H ₂ O)	0,100
Cloreto de zinco (ZnCl ₂ anidro)	0,100
Selenito de sódio (Na ₂ SeO ₃ .5H ₂ O)	0,026
Cloreto de cobre (CuCl ₂ .2H ₂ O)	0,025
Cloreto de cobalto (CoCl ₂ .2H ₂ O)	0,024
Molibdato de sódio (NaMoO ₄ .2H ₂ O)	0,024
Ácido bórico (H ₃ BO ₃)	0,010

Adaptado de Torres (1992) e Moura (2011)

Reator Aeróbio

O reator aeróbio foi inoculado com lodo nitrificante proveniente de reator híbrido aeróbio da área experimental do LSA/UFPE na ETE Mangueira, Recife/PE. Foi utilizado cerca de 1 L de licor misto para a inoculação. O inóculo apresentou concentração de 2,0 g SSV.L⁻¹. A biomassa nitrificante foi enriquecida com solução de cloreto de amônio (40 mg.L⁻¹ de N-NH₄⁺) e micronutrientes a cada 2 dias até o dia da inoculação e mantida sob oxigenação a 29±1°C até a transferência para o reator.

O reator aeróbio foi preenchido em cerca de 20 cm de altura com 12 g de espuma de poliuretano com densidade D33 como meio suporte, fixados através de grade na altura média do reator. A espuma foi cortada em cubos com arestas de aproximadamente 1,0 cm que ocupou cerca de 20 cm na altura média do reator. Materiais plásticos têm sido amplamente utilizados como meio suporte para promover uma maior área superficial específica e crescimento de micro-organismos aderidos, apresentando inúmeras vantagens no seu uso como: melhor característica do lodo, menor perda de biomassa, maiores taxas de carregamento volumétrico, dentre outras, incluindo a coexistência de micro-organismos aeróbios e anóxicos (O'REILLY et al., 2008; HUO et al., 2014).

4.3 ESGOTO SINTÉTICO

A água residuária utilizada nessa pesquisa para alimentar o sistema foi sintética, baseada na composição sugerida por Torres (1992) e Moura (2011) com adaptações. Possui características semelhantes ao esgoto sanitário após remoção de gorduras e sólidos, portanto, não possui lipídeos. Segundo Metcalf e Eddy (2003) é classificado como esgoto intermediário. No preparo do esgoto sintético adicionou-se 2,5 mL de sais minerais (Tabela 4.2) e 1 mL de micronutrientes (Tabela 4.3) a cada litro de solução, de modo a satisfazer os nutrientes necessários para o metabolismo dos micro-organismos envolvidos no tratamento (Torres, 1992; Moura, 2011). Foi adicionado 1 mg de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) para cada mg de DQO do substrato. Também houve acréscimo de NaHCO_3 durante o experimento para manter a relação Alcalinidade/ NH_4^+ de 4,8 no afluente do reator aeróbio. O esgoto sintético foi acondicionado em geladeira a 7°C e preparado a cada dois dias, mantendo uma degradação máxima de DQO de 15% entre uma troca e outra. Para permitir sua uniformidade no reservatório de alimentação foi utilizada uma bomba de aquário da BOYU SP-500 ($Q_{\text{máx}} = 150 \text{ L.h}^{-1}$) como misturador submerso. A composição do esgoto sintético está descrita na Tabela 4.4, com as modificações para cada fase.

Tabela 4.4 – Composição do substrato sintético utilizado na alimentação dos reatores sequenciais.

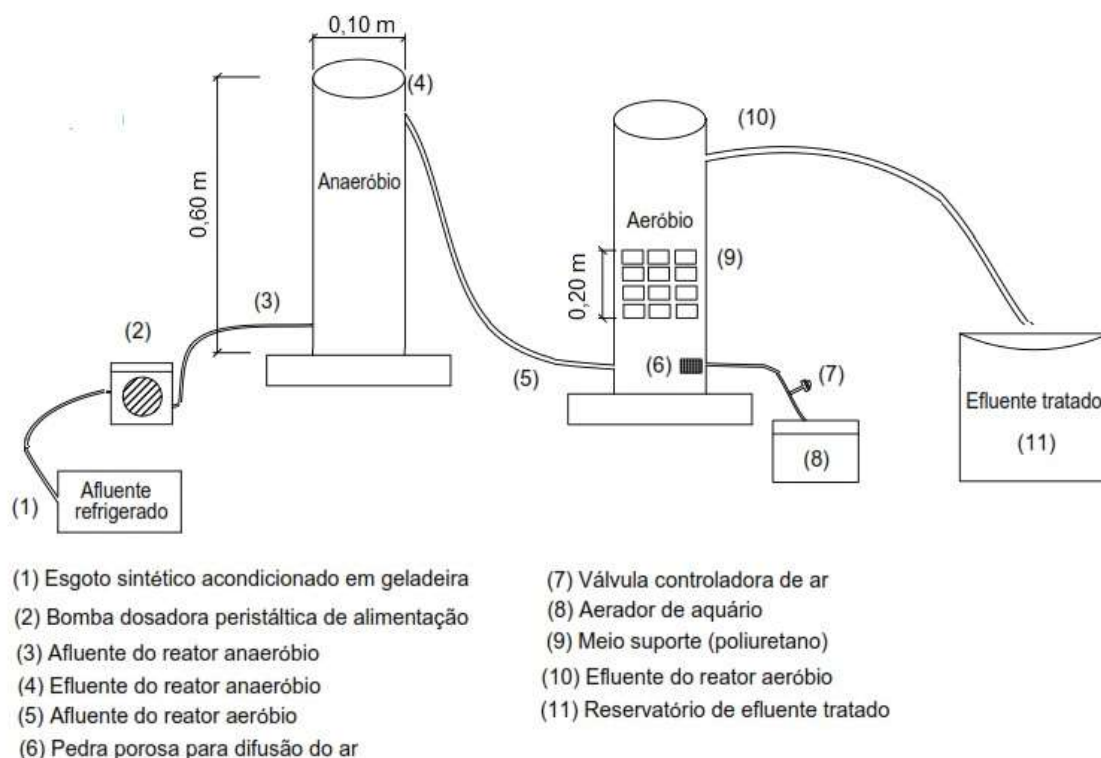
Composição	Fases	Concentração (mg.L⁻¹)
Extrato de carne	I	208
	II, III, IV	267
Sacarose (20%)	Todas	35
Amido comercial (60%)	Todas	114
Celulose em pó (20%)	Todas	34
Cloreto de amônio	I	0
	II	50
	III	590
	IV	160

Fonte: Adaptado de Torres (1992) e Moura (2011).

4.4 ALIMENTAÇÃO E COLETA DE AMOSTRAS

A alimentação dos reatores foi contínua e as coletas foram feitas no afluente (esgoto sintético), efluente dos reatores anaeróbio e aeróbio. Nos reatores a coleta foi feita pela abertura superior com um becker de 50 mL até preencher uma garrafa de 500 mL, sendo feita primeiramente a coleta do reator aeróbio e depois a coleta do anaeróbio. As análises com multiparâmetro de pH, oxigênio dissolvido e temperatura foram feitas diretamente no reator, enquanto o potencial redox foi medido no becker de coleta. O tempo de detenção hidráulica (TDH) utilizado no experimento foi de 30 horas. O esquema de funcionamento do sistema está representado na Figura 4.3:

Figura 4.3 - Representação esquemática dos reatores sequenciais anaeróbio e aeróbio. (Fonte: próprio autor).



O substrato foi acondicionado em geladeira (7°C) e por meio de bomba peristáltica era bombeado para a parte inferior do reator anaeróbio. O efluente do reator anaeróbio segue por gravidade para a parte inferior de alimentação do reator aeróbio, seguindo pela saída superior para o reservatório do efluente tratado. As coletas foram realizadas pela abertura superior dos reatores, coletando um volume de cerca de 500 mL de amostra para as análises.

A bomba utilizada para alimentação do sistema foi uma MS Tecnopon modelo DMC 400. O equipamento possuía vazão controlada, porém semanalmente era conferida por medição direta (volume no tempo) no efluente do sistema. O compressor de ar utilizado foi uma bomba de aeração para aquário modelo JAD S-510 com duas saídas de ar e vazão média de 4 L.min⁻¹. Na saída de ar foi acoplada uma válvula reguladora para controlar a vazão de entrada no sistema. A parte interna da entrada de ar possuía uma pedra porosa de modo a possibilitar uma distribuição mais uniforme do oxigênio no reator.

4.5 CONDIÇÕES OPERACIONAIS

Os reatores foram operados por 250 dias em quatro fases operacionais: Fase I, Fase II, Fase III e Fase IV com variação entre elas de concentração de DQO e N-NH_4^+ . A vazão de aeração foi controlada para fornecer concentração inferior a $1,8 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$, evitando taxa altas de nitrificação e atividade das BON (WIESMANN, 1994). Dessa forma, atingiu-se concentração média de $1,75 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$ durante todo período experimental. O TDH do sistema foi de 30 horas. As características de cada fase aplicadas ao conjunto de reatores como dias de operação, carga orgânica volumétrica (COV), DQO, carga nitrogenada volumétrica (CNV), NTK, concentração de N-NH_4^+ e N-NH_3 afluentes ao reator aeróbio são apresentados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 – Condições operacionais do experimento nas Fases I, II, III e IV.

Parâmetro	Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
Dias de operação	124	37	44	44
COV ($\text{kg DQO}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$)	$0,567\pm 0,151$	$0,725\pm 0,032$	$0,757\pm 0,031$	$0,755\pm 0,017$
DQO ($\text{mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$)	354 ± 94	453 ± 20	473 ± 20	472 ± 11
CNV ($\text{kg N-NTK}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$)	$0,036\pm 0,003$	$0,070\pm 0,002$	$0,286\pm 0,017$	$0,111\pm 0,004$
N-NTK ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	22 ± 2	44 ± 1	179 ± 10	70 ± 3
N-NH_4^+ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)*	16 ± 2	34 ± 3	159 ± 16	57 ± 3
N-NH_3 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)*	$0,3\pm 0,2$	$1,5\pm 0,5$	$4,8\pm 1,8$	$1,6\pm 0,3$

* Afluentes ao reator aeróbio.

4.6 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

Para monitorar o comportamento e eficiência dos reatores foram feitas de 2 a 3 coletas semanais, com exceção de períodos de problemas operacionais, totalizando 60 coletas no período de 250 dias. No primeiro mês após a inoculação não foram feitas análises devido a diversos problemas operacionais com a bomba de alimentação. Parâmetros de controle no processo de inibição e nitrificação, foram

analisados diariamente: N-NH_4^+ , pH, temperatura, oxigênio dissolvido (reator aeróbio), N-NO_3^- e N-NO_2^- . O amônio, pH e temperatura foram utilizados no cálculo da amônia livre presente no sistema. As variáveis, pontos de amostragem, frequência, método e referência, utilizados para a obtenção dos parâmetros, estão listados na Tabela 4.6. Todas as análises foram feitas no LSA/UFPE, baseadas no Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (APHA, 2012). As coletas no reator anaeróbio (AN) e aeróbio (AE) foram realizadas, nos seus efluentes. O afluente (AF) é o esgoto sintético. O medidor multiparâmetro utilizado foi da marca HACH, modelo portátil HQ40 D. Foram utilizadas amostras brutas e filtradas (membrana de $1,2\ \mu\text{m}$) para análises de DQO e N-NTK.

Tabela 4.6 – Parâmetros analisados, pontos de amostragem e frequência de monitoramento.

Variável	Pontos de amostragem	Frequência	Método	Equipamento/ Referência
Oxigênio dissolvido ($\text{mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$)	AE	Diariamente	Potenciométrico (multiparâmetro)	Multiparâmetro HACH CO HQ40d
Potencial oxi-redução (redox) (mV)	AF, AN e AE	2 x semana	Potenciométrico (multiparâmetro)	Multiparâmetro HACH CO HQ40d
pH	AF, AN e AE	Diariamente	Potenciométrico (multiparâmetro)	Multiparâmetro HACH CO HQ40d
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	AN e AE	Diariamente	Potenciométrico (multiparâmetro)	Multiparâmetro HACH CO HQ40d
Alcalinidade* ($\text{mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$)	AF, AN e AE	2 x semana	Titulométrico	SM 2320
DQO* ($\text{mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$)	AF, AN e AE	2 x semana	Colorimétrico	SM 5220 D
N-NTK* ($\text{mg N}\cdot\text{L}^{-1}$)	AF, AN e AE	2 x semana	Macro-digestão/ Titulométrico	SM 4500 N- org.B
N-NH_4^{+*} ($\text{mg N}\cdot\text{L}^{-1}$)	AF, AN e AE	Diariamente	Titulométrico	SM 4500 N- NH_3C

Variável	Pontos de amostragem	Frequência	Método	Equipamento/ Referência
N-NO ₂ ⁻ (mg N.L ⁻¹)	AE	Diariamente	Colorimétrico	SM 4500 NO ₂ ⁻ B
N-NO ₃ ⁻ (mg N.L ⁻¹)	AE	Diariamente	Espectrofotométrico (UV/visível)	SM 4500 NO ₃ ⁻ E
Sólidos suspensos voláteis (SSV*mg.L ⁻¹)	AN e AE	Semanal	Gravimétrico	SM 2540

*APHA (2012).

Os cálculos de eficiência de remoção de DQO e de oxidação de nitrogênio bruta/bruta e bruta/filtrada foram obtidos através das Equações 4.13 e 4.14.

$$E(b) = \frac{AFb - EFb}{AFb} \times 100$$

Equação 4.13

Onde:

E(b) = eficiência de remoção de DQO ou oxidação de N-NTK bruta/bruta (%)

AFb = afluente bruto (mg O₂.L⁻¹, kg DQO.m⁻³.d⁻¹, kg N.m⁻³.d⁻¹)

EFb = efluente bruto (mg O₂.L⁻¹, kg DQO.m⁻³.d⁻¹, kg N.m⁻³.d⁻¹)

$$E(f) = \frac{AFb - EFf}{AFb} \times 100$$

Equação 4.14

Onde:

E(f) = eficiência de remoção de DQO ou oxidação de N-NTK bruta/filtrada (%)

AFb = afluente bruto (mg O₂.L⁻¹, kg DQO.m⁻³.d⁻¹, kg N.m⁻³.d⁻¹)

EFf = efluente filtrado (mg O₂.L⁻¹, kg DQO.m⁻³.d⁻¹, kg N.m⁻³.d⁻¹)

A carga orgânica volumétrica (COV) e a carga nitrogenada volumétrica (CNV) foram calculadas segundo a Equação 4.15 a seguir.

$$CV = \frac{Q \times C}{V}$$

Equação 4.15

Onde:

CV = carga volumétrica ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$)

Q = vazão ($\text{m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$)

S = concentração afluenta ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$)

V = volume total do reator (m^3)

O nitrogênio gasoso (NO , N_2O e N_2) foi calculado através da diferença entre a eficiência de oxidação (bruta ou filtrada) e a parcela convertida a nitrito e nitrato (NO_x^-). Para simplificar a discussão dos resultados, todo o nitrogênio gasoso produzido foi considerado N_2 .

4.7 ANÁLISE DE BIOLOGIA MOLECULAR

4.7.1 Biologia molecular

Para a avaliação do desenvolvimento das comunidades microbianas, foram empregadas técnicas de biologia molecular, cujos procedimentos foram realizados em duas etapas, extração do DNA e PCR (Reação em Cadeia de Polimerase). Na etapa da PCR foram utilizados *primers* específicos para BOA, BON, Desnitrificantes e Anammox. Foram selecionadas as amostras mais representativas, com coleta do lodo de inóculo de ambos os reatores (Fase I), e do licor misto do reator aeróbio nas Fases I, II e III. Os procedimentos de cada etapa serão descritos a seguir.

4.7.2 Extração do DNA Genômico

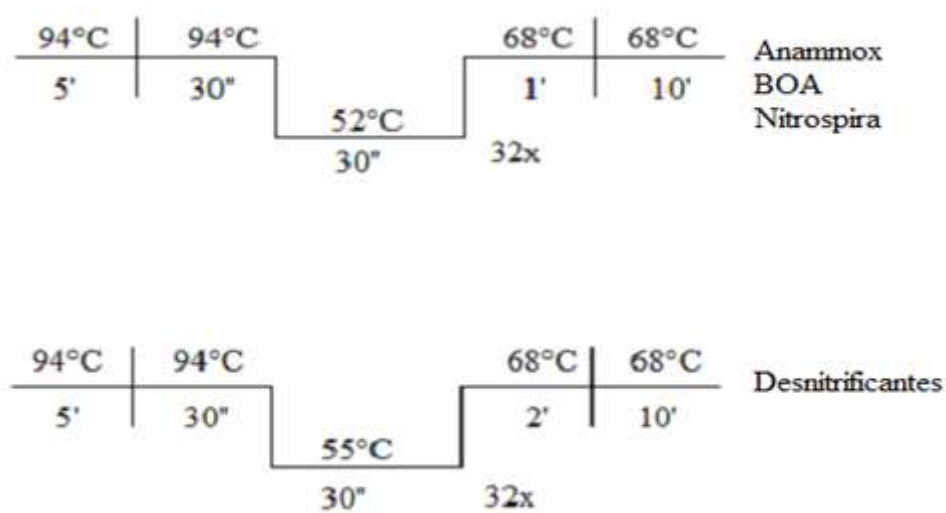
A extração do DNA foi realizada com o *Kit Power Soil TM DNA Isolation* da MO BIO Laboratórios Inc. As amostras para esta análise foram obtidas do licor misto, sendo colocado nos tubos *PowerBead* 0,25 mg de biomassa. Concluído o processo de extração, foi quantificada a concentração do DNA em cada amostra extraída. Para isso, era tomado 1 μL da amostra e colocado no espectrofotômetro (Nanodrop). Ao final, as amostras obtidas foram acondicionadas a -20°C .

4.7.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Nesta etapa foi realizada uma amplificação das amostras no termociclador aplicando o protocolo adequado para cada *primer* utilizado, conforme a Figura 4.4. A

etapa de amplificação está descrita na Figura 4.5. Em seguida, com a alíquota resultante da etapa anterior, tomava-se 4 µL da amostra e preenchia os poços de gel de agarose em uma solução de TAE 1X. Ao final, se houvesse bandas no gel, significaria a presença de micro-organismos do *primer* aplicado; caso nenhuma banda fosse identificada no gel, haveria ausência do gênero ou da espécie investigada.

Figura 4.4 – Protocolos de amplificação dos *primers*.



A solução preparada para realizar a amplificação do DNA está exemplificada na Tabela 4.7 abaixo:

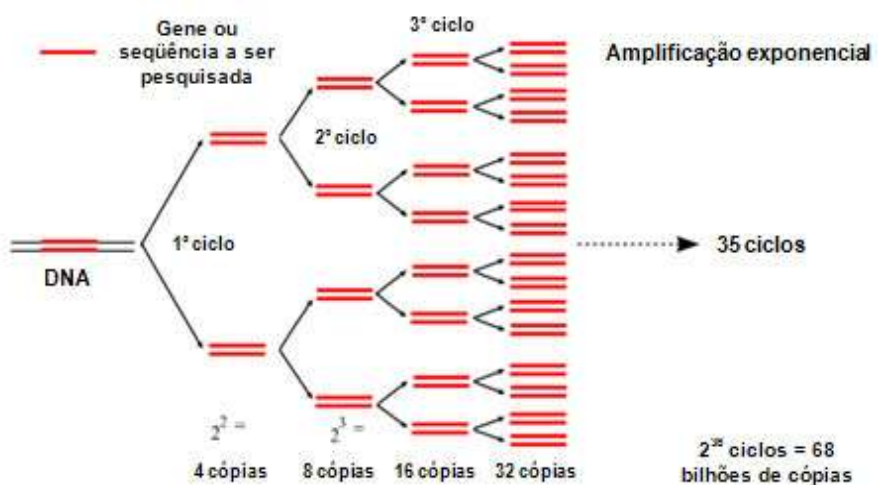
Tabela 4.7 – Solução preparada para amplificação do DNA

Componentes	Volume (µL)
Água	36,8
Buffer	5
Mg ⁺²	2
dNTP	1
Primer 1	2
Primer 2	2
Taq DNA polimerase	0,2
DNA	1
Volume Total	50

Na Tabela 4.8 são apresentados todos os pares de *primers* utilizados neste trabalho para amplificação do DNA.

Tabela 4.8 – Primers utilizados na amplificação do DNA

Domínio	Primer	Sequência	Referência
DNAr 16S - Desnitrificantes	nirS2F-GC	TACCACCCCGAGCCGCGCGT	Nittami et al., (2003); Shoji et al., (2006)
	nirS3R	GCCGCCGTCGTGCAGGAA	
DNAr 16S - Anammox	amx368F	TTCGCAATGCCCGAAAGG	Schimd et al., (2001); Schimd et al., (2003)
	amx 820R	AAAACCCCTCTACTTAGTGCCC	
DNAr 16S - Nitrospira	NTS232F	GCTCATGTCCTATCAGCTTG	Lim et al., (2008)
	NTS1200R	AGGCATAAAGGCCATGCTG	
DNAr 16S – BOA	NOS190F	CGATCCCCTGCTTTTCTCC	Mobarry et al., (1996)
	NSO1225R	CGCCATTGTATTACGTGTGA	

Figura 4.5 – Procedimento da PCR (Fonte:www.icb.ufmg.br, 2015).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O período de operação do experimento foi de 250 dias dividido em 4 Fases: na Fase I a concentração de N-NH_4^+ foi de $16 \pm 2 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$, sendo modificada na Fase II para $34 \pm 3 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ com o objetivo de aumentar a disponibilidade de nitrogênio à biomassa nitrificante e evitar a deficiência de substrato. Após a estabilização da nitrificação completa na Fase II, foi iniciada a Fase III de inibição das BON através do incremento de amônio para $159 \pm 16 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$. Na Fase IV foi testada nova condição inibitória com $57 \pm 3 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ para verificar quais mudanças ocorreriam no sistema. Os resultados de pH e temperatura, oxigênio dissolvido, alcalinidade, matéria orgânica e nitrogênio (N-NTK , N-NH_4^+ , N-NO_x^-) estão descritos nos próximos tópicos.

5.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

5.1.1 Potencial hidrogeniônico (pH) e temperatura

O pH e a temperatura, associados à concentração de N-NH_4^+ , são os parâmetros que controlam o equilíbrio dinâmico da concentração de amônia livre no meio. Portanto, são parâmetros de controle no processo de inibição. A temperatura nos dois reatores obteve média entre 28 e 29°C, mantendo-se durante todo o experimento na faixa ótima de 25° a 30°C para bactérias nitrificantes (KOOPS; POMMERENING-RÖSER, 2006).

O reator anaeróbio apresentou na Fase I o menor pH ($7,2 \pm 0,3$), aumentando para $7,7 \pm 0,2$ na Fase II e diminuindo para $7,5 \pm 0,1$ nas Fases III e IV. Nessas duas últimas fases é possível perceber estabilização desse parâmetro e nenhuma diferença nas médias e desvio padrão. O controle do pH no reator anaeróbio é muito importante pois a digestão anaeróbia pode produzir ácidos orgânicos e diminuir o pH (FORESTI et al., 1999). No reator aeróbio o comportamento foi semelhante, iniciando o experimento com seu menor valor ($7,5 \pm 0,2$) e mantendo o pH de $7,7 \pm 0,2$ e $7,7 \pm 0,1$ nas fases seguintes, indicando estabilidade. Esses valores correspondem ao valor de pH recomendado para as BOA de 6 a 9 (SPINOLA, 2009). Na Fase I, após os 15 primeiros dias de operação, o pH dos reatores anaeróbio e aeróbio diminuiu e, depois, aumentou gradativamente até manter-se entre 7,6 e 7,8, respectivamente. Esse comportamento indica o período de adaptação dos micro-organismos e de seus

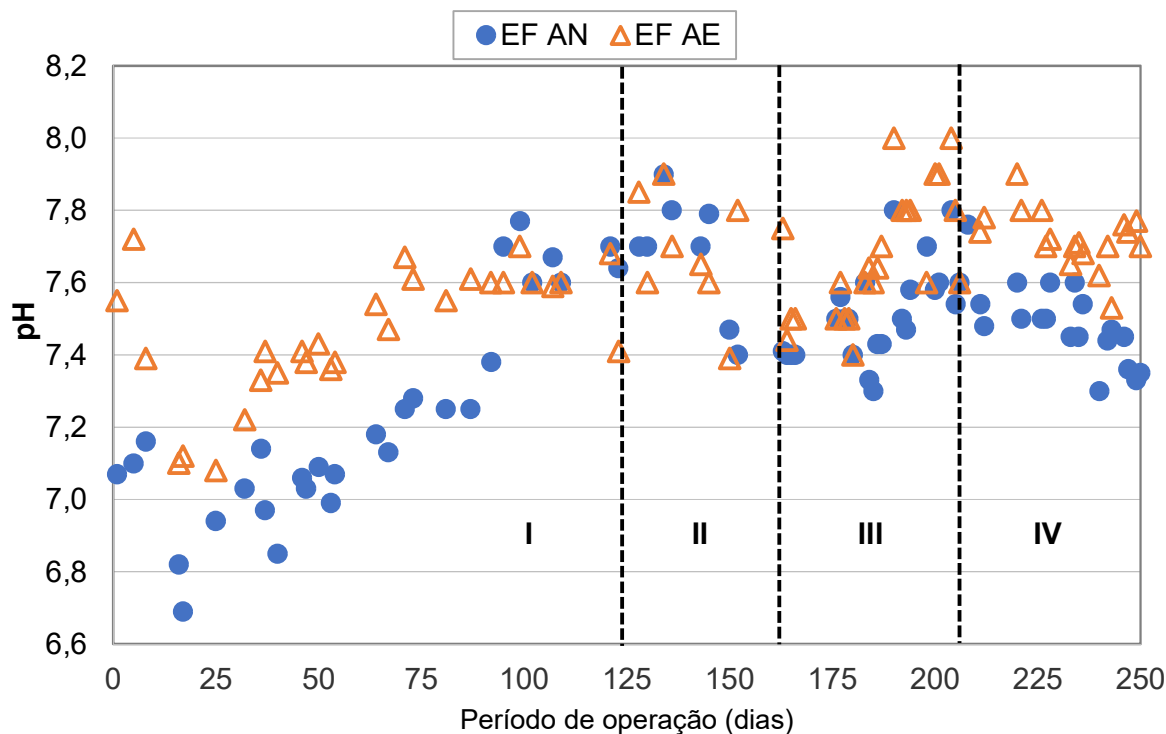
processos metabólicos no sistema. A Tabela 5.9 apresenta os dados de pH e temperatura durante o experimento nos reatores anaeróbio e aeróbio.

Tabela 5.9 - Resumo estatístico da variação de pH e temperatura (°C) nos reatores anaeróbio (AN) e aeróbio (AE) nas Fases I, II, III e IV.

Fase	Amostra	N	pH			Temperatura		
			Mínimo	Média/ Desvio Padrão	Máximo	Mínimo	Média/ Desvio Padrão	Máximo
I	AN	28	6,7	7,2±0,3	7,8	25,6	28,0±1,0	29,4
	AE		7,1	7,5±0,2	7,7	25,6	28,0±1,0	29,4
II	AN	8	7,4	7,7±0,2	7,9	28,0	29,1±0,6	29,6
	AE		7,4	7,7±0,2	7,9	28,0	29,1±0,6	29,9
III	AN	24	7,3	7,5±0,1	7,8	27,0	28,7±0,9	30,9
	AE		7,4	7,7±0,1	7,9	26,9	28,8±1,0	31,0
IV	AN	18	7,3	7,5±0,1	7,8	27,1	28,7±1,2	31,0
	AE		7,5	7,7±0,1	7,9	27,0	28,7±1,2	31,0

O período final de menor instabilidade da Fase I no reator aeróbio coincide com o aumento do nitrato efluente. Na Fase II a faixa de pH se mantém próxima, porém com uma discreta queda de pH no final do período, coincidindo com o momento de estabilização da nitrificação. Essas variações de pH têm relação com o consumo e produção de alcalinidade na nitrificação e desnitrificação. A nitrificação consome alcalinidade e pode causar diminuição do pH, enquanto na amonificação e desnitrificação ocorre produção de alcalinidade. Apesar dessa influência, os reatores mantiveram a mesma faixa de pH até o final do experimento. A representação gráfica dessas variações no período experimental é apresentada na Figura 5.6.

Figura 5.6 - Variação de pH nos reatores anaeróbio (AN) e aeróbio (AE).



5.1.2 Oxigênio dissolvido (OD)

Para manter a concentração de OD inferior à condição ótima para as BON, o OD foi mantido a $1,8 \text{ mg O}_2\text{L}^{-1}$ (WIESMANN, 1994). Os valores da concentração de oxigênio nos dois reatores estão descritos na Tabela 5.10. Na Fase I houve maior variação e oxigenação relativamente mais baixa ($1,4 \pm 0,8 \text{ mg O}_2\text{L}^{-1}$) no reator aeróbio devido a problemas na válvula de controle de vazão de ar. Na Fase II obteve-se o maior valor médio da concentração de OD ($1,9 \pm 0,2 \text{ mg O}_2\text{L}^{-1}$), enquanto nas duas últimas fases a aeração obteve média de $1,7 \text{ mg O}_2\text{L}^{-1}$.

Tabela 5.10 – Resumo estatístico da variação de oxigênio dissolvido ($\text{mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$) nos reatores anaeróbio (AN) e aeróbio (AE) nas Fases I, II, III e IV.

Fase	Amostra	N	Mínimo	Média/ Desvio Padrão	Máximo
I	AN	25	0,09	$0,15\pm 0,3$	0,18
	AE		0,11	$1,42\pm 0,8$	2,77
II	AN	10	0,13	$0,14\pm 0,1$	0,16
	AE		1,77	$1,95\pm 0,2$	2,20
III	AN	30	0,09	$0,13\pm 0,2$	0,16
	AE		1,24	$1,73\pm 0,4$	3,00
IV	AN	28	0,12	$0,15\pm 0,2$	0,18
	AE		0,21	$1,75\pm 0,6$	2,20

5.1.3 Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)

Ao longo dos 250 dias de operação do sistema, a concentração de SSV nos efluentes dos reatores anaeróbio e aeróbio variou entre 4 e 72 $\text{mg SSV}\cdot\text{L}^{-1}$ e entre 1 e 59 $\text{mg SSV}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Tais valores indicam que houve perda de lodo no sistema. O comportamento da concentração de sólidos pode ser avaliado na Figura 5.7. Os dados de SSV nos reatores anaeróbio e aeróbio estão descritos na Tabela 5.11. Na Fase I a perda de biomassa foi maior nos dois reatores, coerente com o período de estabilização do sistema. Nas Fases II e III a perda de lodo foi semelhante no reator anaeróbio (20 e 21 $\text{mg SSV}\cdot\text{L}^{-1}$) e no aeróbio (8 $\text{mg SSV}\cdot\text{L}^{-1}$). A Fase IV apresentou a menor concentração de sólidos suspensos voláteis, com máximas de 21 e 18 $\text{mg SSV}\cdot\text{L}^{-1}$ e mínimas de 4 e 2 $\text{mg SSV}\cdot\text{L}^{-1}$ nos reatores anaeróbio e aeróbio, respectivamente.

Figura 5.7 - *Boxplot* sobre a variação de sólidos suspensos voláteis (SSV) no efluente dos reatores anaeróbio e aeróbio nas Fases I, II, III e IV.

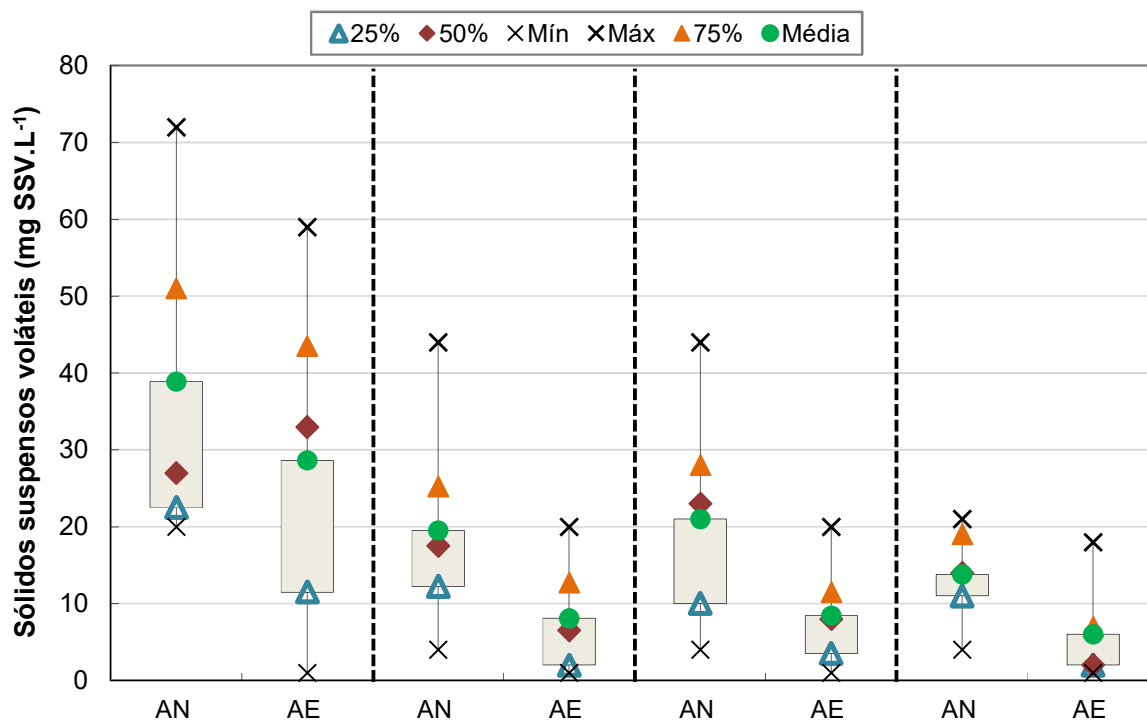


Tabela 5.11 - Resumo estatístico da variação de sólidos suspensos voláteis (mg SSV.L⁻¹) nos reatores anaeróbio (AN) e aeróbio (AE) nas Fases I, II, III e IV.

Fase	Amostra	N	Mínimo	Média/ Desvio Padrão	Máximo
I	AN	11	20,0	39±19	72,0
	AE		1,0	29±19	59,0
II	AN	10	4,0	20±12	44,0
	AE		4,0	8±7	21,0
III	AN	7	4,0	21±14	45,0
	AE		3,0	8±7	20,0
IV	AN	5	4,0	14±7	21,0
	AE		2,0	6±7	18,0

5.1.4 Alcalinidade

Durante o experimento foi necessário fazer alterações nos valores de NaHCO₃ do esgoto sintético, corrigindo as demandas de alcalinidade durante as fases experimentais. Na Fase II houve aumento da alcalinidade relativo ao aumento da

carga orgânica afluyente (1 mg NaHCO_3 / mg DQO). Nas Fases III e IV a alcalinidade também foi corrigida para favorecer a nitrificação parcial e evitar a diminuição de pH pela nitrificação, com o objetivo de manter a relação $\text{Alc}/\text{N-NH}_4^+$ ótima de 4,8 para atingir a nitrificação parcial (ZHANG et al., 2011).

No reator anaeróbio houve produção de alcalinidade em todas as fases em relação ao afluyente devido à amonificação do nitrogênio orgânico. Já no reator aeróbio o consumo de alcalinidade prevaleceu em todas as fases em relação ao reator anaeróbio, indicando atividades de nitrificação. O comportamento da alcalinidade parcial e total durante o período experimental pode ser avaliado através das Figuras 5.8 e 5.9. As Tabelas 5.12 e 5.13 apresentam os dados de alcalinidade parcial e total, respectivamente, durante todo o período experimental.

Figura 5.8 - Alcalinidade parcial ($\text{mg CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$) no esgoto sintético (afluyente) e no efluente dos reatores anaeróbio e aeróbio nas Fases I, II, III e IV.

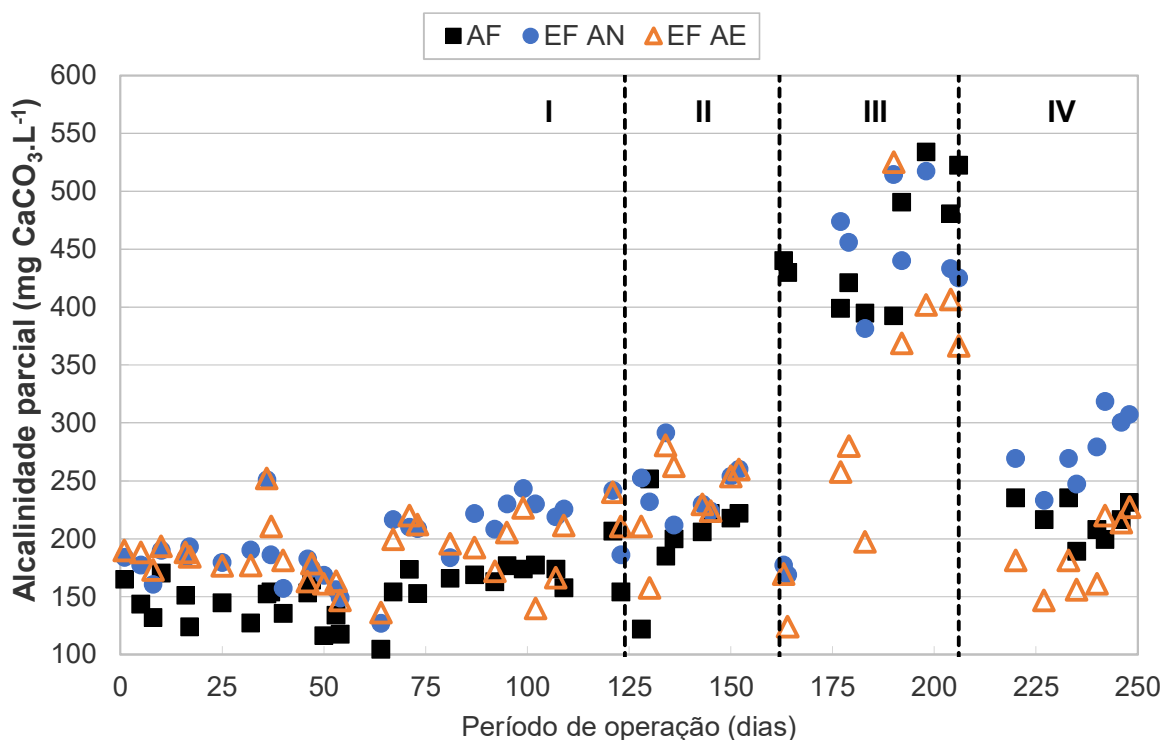


Figura 5.9 - Alcalinidade total ($\text{mg CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$) no esgoto sintético (afluente) e no efluente dos reatores anaeróbio e aeróbio nas Fases I, II, III e IV.

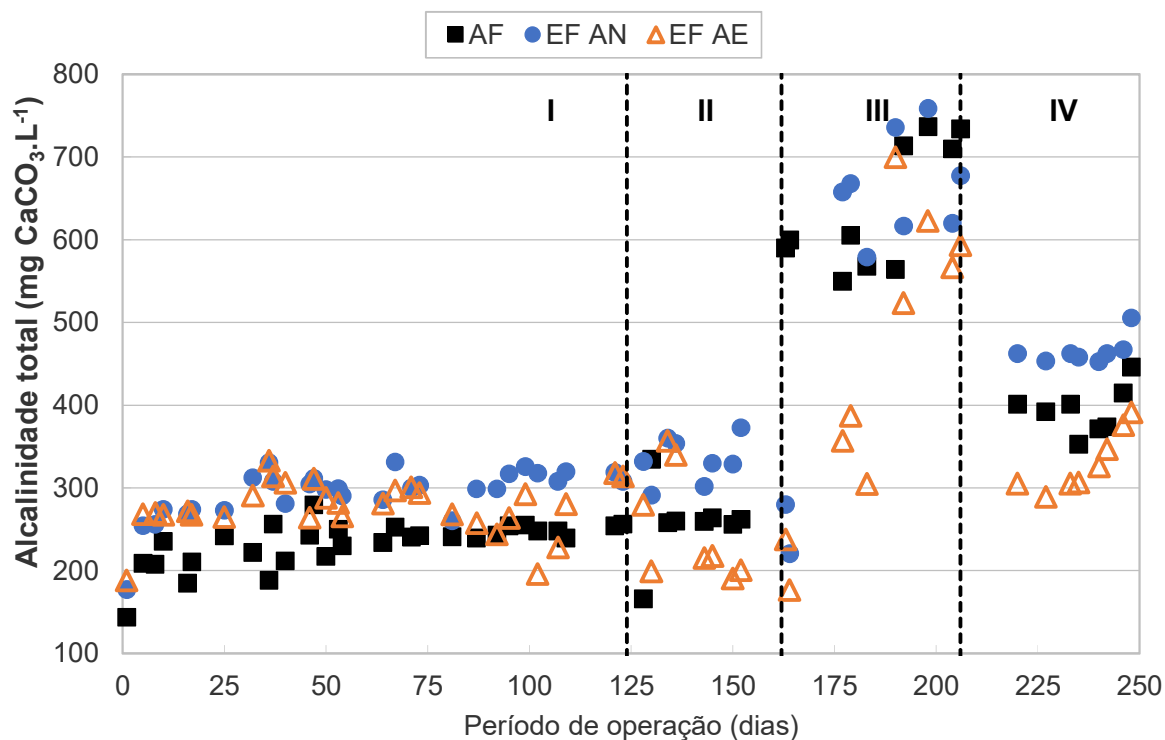


Tabela 5.12 - Resumo estatístico da variação de alcalinidade parcial ($\text{mg CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$) no esgoto sintético (AF), nos reatores anaeróbio (AN) e aeróbio (AE) nas Fases I, II, III e IV.

Fase	Amostra	N	Mínimo	Média/ Desvio Padrão	Máximo
I	AF	29	105	153±23	207
	AN		127	197±32	251
	AE		136	189±29	240
II	AF	8	122	203±38	252
	AN		212	244±25	291
	AE		140	235±39	281
III	AF	15	374	442±49	534
	AN		177	396±133	517
	AE		124	303±131	567
IV	AF	13	208	216±17	407
	AN		233	278±30	520
	AE		147	186±31	315

Tabela 5.13 - Resumo estatístico da variação de alcalinidade total ($\text{mg CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$) no esgoto sintético (AF), nos reatores anaeróbio (AN) e aeróbio (AE) nas Fases I, II, III e IV.

Fase	Amostra	N	Mínimo	Média/ Desvio Padrão	Máximo
I	AF	29	185	238±21	280
	AN		255	302±19	331
	AE		196	280±30	333
II	AF	8	166	257±45	335
	AN		291	334±28	379
	AE		191	250±67	357
III	AF	15	550	637±77	737
	AN		221	581±183	759
	AE		177	447±178	700
IV	AF	13	353	394±29	446
	AN		453	466±17	505
	AE		289	331±37	391

A produção de alcalinidade prevalece no reator anaeróbio, enquanto no aeróbio prevalece o consumo de alcalinidade. Esse comportamento está relacionado à amonificação principalmente no reator anaeróbio, processo que produz alcalinidade, e à nitrificação principalmente no reator aeróbio, que consome alcalinidade. A desnitrificação ocorreu nos dois sistemas, sendo em menor proporção no sistema anaeróbio.

Nos primeiros 16 dias da Fase I houve aumento de alcalinidade no reator anaeróbio ($126\pm 11\%$) e também no aeróbio ($5\pm 2\%$). O fato pode indicar que nesse período também houve amonificação no reator aeróbio e que as bactérias nitrificantes ainda estavam se adaptando. A partir do 32º dia essa variação começa a ser mais perceptível, apesar de instável, havendo consumo de alcalinidade no reator aeróbio e indicando atividade das bactérias nitrificantes. Na Fase II o consumo de alcalinidade no reator aeróbio começou a se acentuar até ficar mais perceptível e estável no final do período, podendo estar relacionado à estabilização da nitrificação simultaneamente.

Na transição entre a Fase II e a Fase III nos dias 163 e 164, logo após o aumento do N-NH_4^+ , a alcalinidade do reator anaeróbio foi inferior à afluenta. Esse fato pode indicar sensibilidade à mudança de carga nitrogenada pelas bactérias envolvidas no ciclo do nitrogênio, pois nesse período a oxidação da amônia diminuiu bastante. A partir do 190º dia a produção de alcalinidade no reator anaeróbio e o consumo no aeróbio voltou a prevalecer.

A alcalinidade carbonato equilibra o nível ácido-base do meio e afeta o estado da matéria presente em solução aquosa, sendo fundamental para a manutenção do pH no reator aeróbio para o metabolismo das bactérias nitrificantes (HUO et al., 2014). O aumento/consumo de alcalinidade não está exclusivamente relacionado aos processos de nitrificação e desnitrificação. Araújo (2015) no mesmo reator anaeróbio com carga nitrogenada volumétrica (CNV) de $0,016 \text{ kg N.m}^{-3}.\text{L}^{-1}$ identificou principalmente o consumo de alcalinidade e associou esse consumo a uma possível produção de AGV's ou acúmulo de hidrogênio no processo de digestão anaeróbia. Com a fase lag das bactérias envolvidas no ciclo do nitrogênio causada pelo aumento do N-NH_4^+ na Fase III, o consumo de alcalinidade pode ter se sobressaído nesses dias.

Zhang et al. (2011) avaliaram a influência da alcalinidade na nitrificação parcial e atingiu acúmulo de nitrito com relação Alcalinidade/ N-NH_4^+ mínima de 4,8. Nas Fases I, II, III e IV as relações foram de $19,1 \pm 2,1$; $10,0 \pm 0,7$; $4,2 \pm 0,4$ e $8,2 \pm 0,5$, respectivamente. No período de inibição da Fase III, a relação esteve um pouco menor que a ideal, enquanto na Fase IV a relação foi superior, podendo ter auxiliado no metabolismo das nitrificantes nesse período de melhor remoção de nitrogênio.

5.2 REMOÇÃO DE MATÉRIA ORGÂNICA

O esgoto sintético utilizado para alimentação dos reatores possuía características de esgoto intermediário segundo Metcalf e Eddy (2003), que possui DQO com concentração de $430 \text{ mg O}_2.\text{L}^{-1}$. Foram analisadas a DQO bruta e filtrada do esgoto sintético (afluente) e dos efluentes dos reatores anaeróbio e aeróbio nas Fases I, II, III e IV, como mostram as Figuras 5.10 e 5.11. A maior variação da DQO afluenta na Fase I foi relacionada à má solubilização do esgoto sintético e problemas na geladeira de acondicionamento do afluente, ocorrendo alta degradação da matéria orgânica antes de entrar no sistema de tratamento. A DQO bruta do esgoto sintético

na Fase I foi de $354 \pm 94 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$, menor do que as fases subsequentes quando houve alteração na sua composição e aumento da DQO.

Figura 5.10 - DQO bruta Afluente (AF), Efluente Anaeróbio (EF AN), Efluente Aeróbio (EF AE) e eficiência de remoção de DQO (DQObruta/bruta) do sistema.

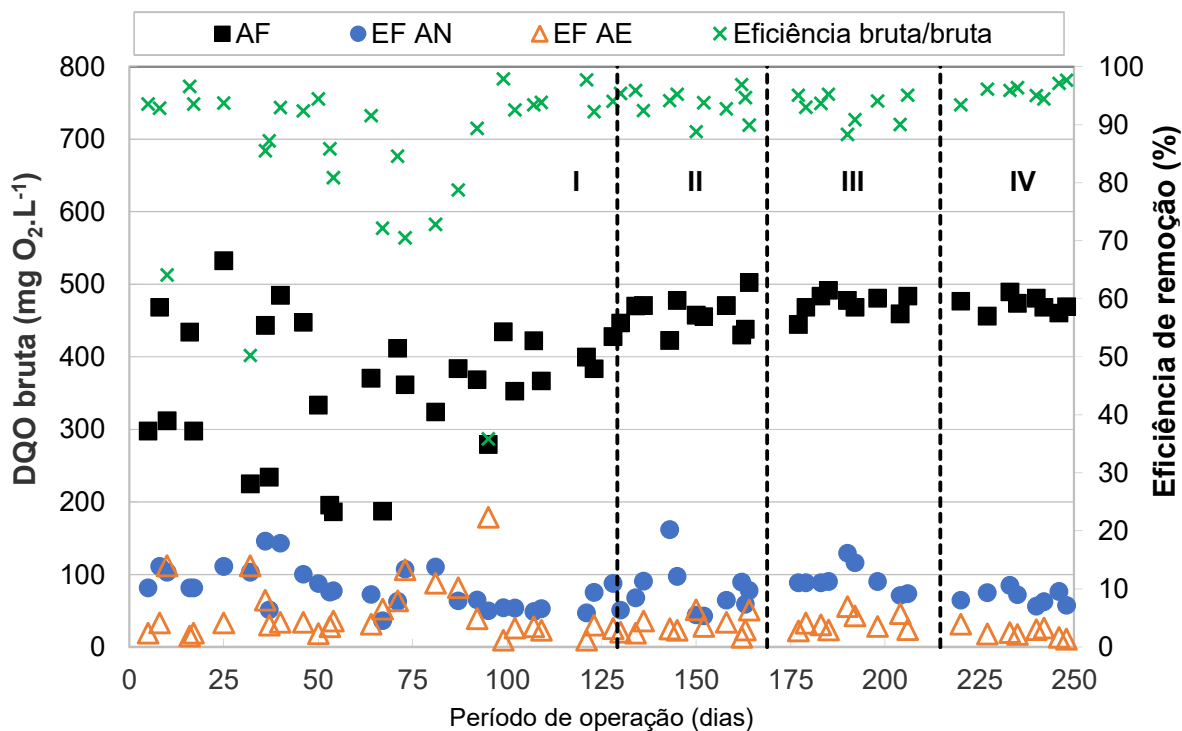
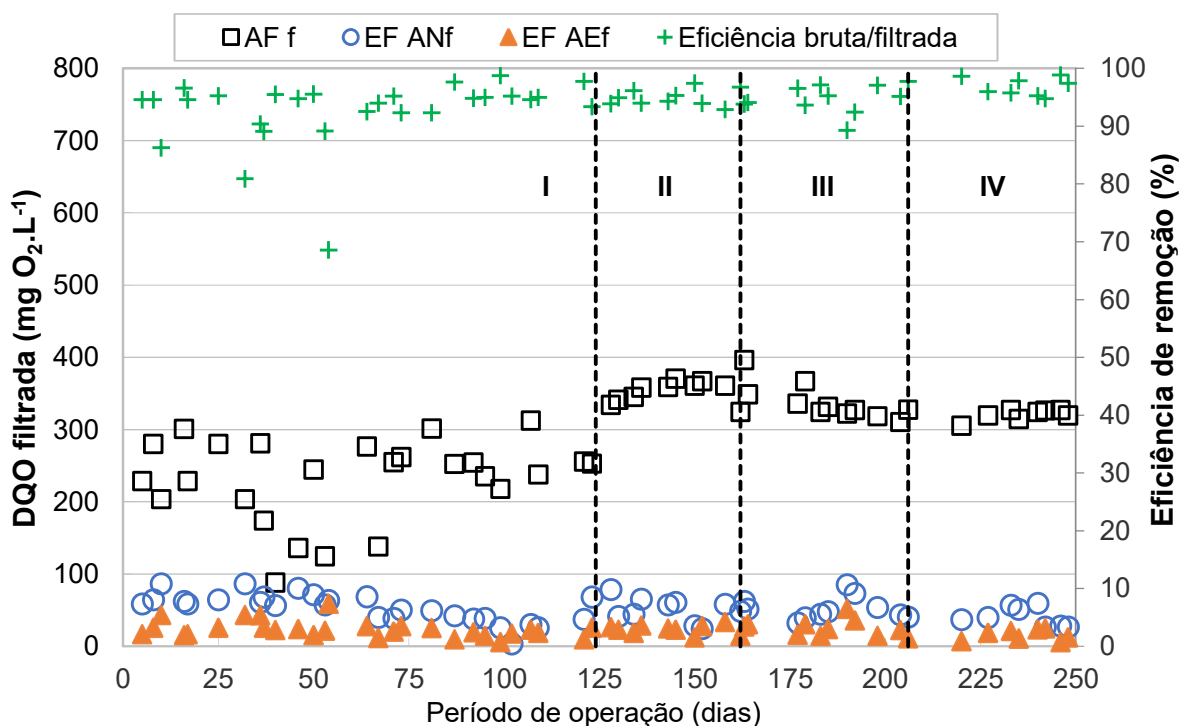


Figura 5.11 - DQO filtrada Afluente (AF f), Efluente Anaeróbio (EF ANf), Efluente Aeróbio (EF AEf) e eficiência de remoção de DQO (DQObruta/filtrada).



Apesar do aumento da carga orgânica após a Fase I, a DQO efluente bruta (78 ± 29 , 80 ± 35 e 89 ± 20 mg $O_2.L^{-1}$) e filtrada (51 ± 19 , 51 ± 17 e 52 ± 16 mg $O_2.L^{-1}$) do reator anaeróbio nas Fases I, II e III não foi afetada. Na Fase IV a DQO efluente foi um pouco menor e menos variável, com média de DQO bruta de 69 ± 10 mg $O_2.L^{-1}$ e DQO filtrada de 41 ± 13 mg $O_2.L^{-1}$, podendo indicar uma biomassa mais desenvolvida e adaptada. Apesar da DQO bruta média na fase inibitória ter aumentado discretamente de 80 mg.L⁻¹ para 89 mg.L⁻¹, a DQO filtrada foi praticamente a mesma, podendo a variação da DQO bruta ter sido influenciada por perda de biomassa. Os dados de SSV confirmam que a média da perda de lodo na Fase III foi um pouco maior do que as Fases II e IV. Não foi observado indícios de inibição no reator anaeróbio devido à variação de concentração de amônia. Efeitos inibitórios de amônia livre na digestão anaerobia são superiores a 52 mg N-NH₃.L⁻¹, valor muito acimado atingido nesse estudo (RAJAGOPAL et al., 2013).

No reator aeróbio a DQO efluente bruta foi de 48 ± 40 , 28 ± 11 , 35 ± 12 e 20 ± 7 mg $O_2.L^{-1}$ nas Fases I, II, III e IV, respectivamente. A maior DQO efluente do reator aeróbio foi na Fase I, o que era previsto devido à fase de estabilização das bactérias, enquanto o menor valor foi na Fase IV. A DQO filtrada do reator aeróbio foi de 22 ± 12 , 23 ± 7 e 25 ± 12 e 15 ± 8 mg $O_2.L^{-1}$ nas Fases I, II, III e IV, respectivamente. Nas três primeiras fases a DQO foi bastante próxima, com exceção da Fase IV.

Na última fase do experimento houve diminuição de cerca de 40% na DQO bruta e filtrada no reator aeróbio em relação à fase anterior (Fase III). Os dados de SSV confirmam a menor interferência de lodo nessa fase. Além da biomassa estar mais desenvolvida e adaptada nessa fase, fato observado também pelos outros parâmetros analisados, essa diminuição pode ser explicada pela via metabólica do nitrogênio. Os menores valores de DQO nesse período podem ter influência do aumento da taxa de desnitrificação. Na desnitrificação há consumo de matéria orgânica pelos micro-organismos envolvidos. Na Fase IV ocorreu a maior taxa de remoção de nitrogênio do período experimental, podendo ter influenciado na maior remoção de carbono neste período. Os dados de matéria orgânica durante o período experimental estão descritos na Tabela 5.14 a seguir.

Tabela 5.14 - Resumo estatístico da variação de matéria orgânica bruta e filtrada ($\text{mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$) no esgoto sintético (AF), nos reatores anaeróbio (AN) e aeróbio (AE) nas Fases I, II, III e IV.

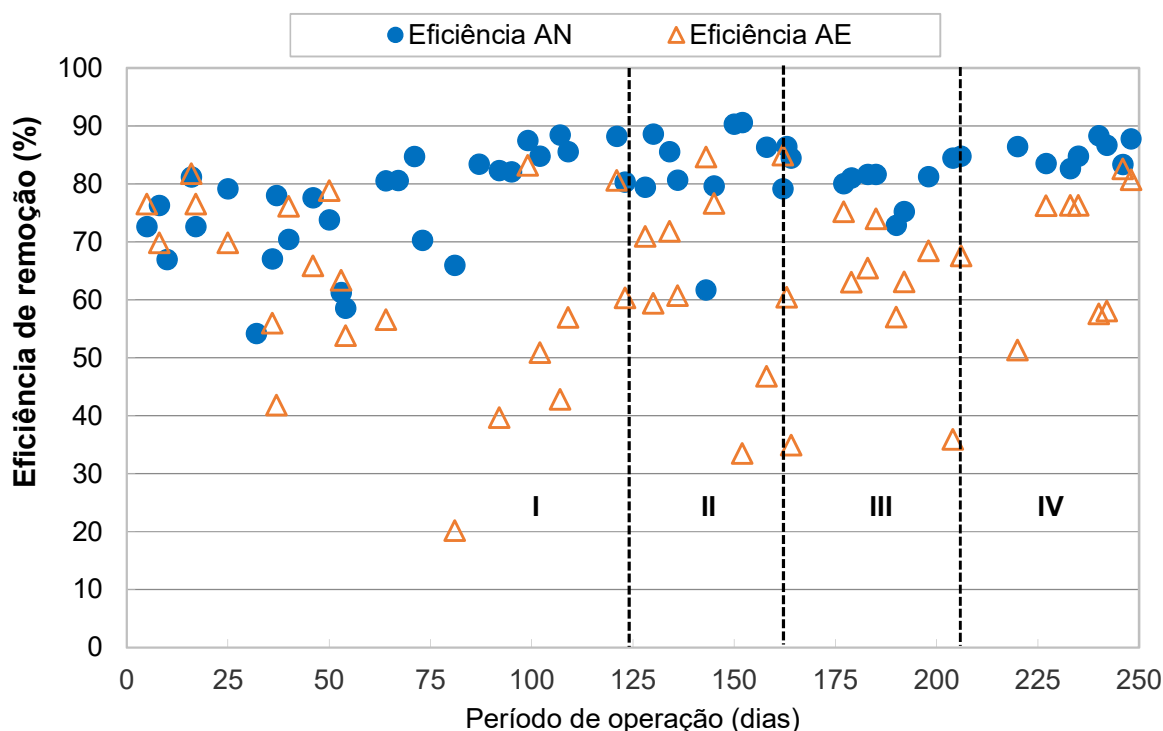
Fase	Amostra	N	Matéria orgânica					
			Bruta			Filtrada		
			Mínimo	Média/ Desvio Padrão	Máximo	Mínimo	Média/ Desvio Padrão	Máximo
I	AF	78	186	354±94	532	88	221±77	312
	AN		36	78±29	146	26	51±19	87
	AE		9	48±40	179	6	22±12	59
II	AF	29	423	453±20	478	324	352±15	370
	AN		43	80±35	162	24	51±17	79
	AE		13	28±11	51	12	23±7	34
III	AF	33	438	473±20	503	310	337±25	396
	AN		59	89±20	130	32	52±16	85
	AE		22	35±12	56	11	25±12	51
IV	AF	24	456	472±11	489	305	320±8	327
	AN		56	69±10	85	27	41±13	59
	AE		11	20±7	31	5	15±8	25

Considerando os dois reatores sequenciais anaeróbio e aeróbio, a média de eficiência de remoção de DQO bruta/bruta do sistema na Fase I foi de $85\pm 15\%$, na Fase II de $94\pm 2\%$, na Fase III de $93\pm 2\%$ e na Fase IV de $95\pm 1\%$. Já a eficiência de remoção de DQO bruta/filtrada na Fase I foi de $93\pm 6\%$, na Fase II de $95\pm 1\%$, na Fase III de $95\pm 2\%$ e na Fase IV de $96\pm 2\%$. Com exceção da primeira fase, período de maior estabilização do lodo, a eficiência de remoção de DQO bruta do sistema foi maior que 93%, obtendo os melhores resultados na Fase IV (95%). Apesar da eficiência de remoção de DQO bruta/filtrada ser maior do que a DQO bruta/bruta em todas as fases operacionais, a diferença é relativamente pequena (exceto na Fase I), demonstrando que a perda de lodo não prejudicou a eficiência de tratamento. Após o aumento na COV aumentou a eficiência de remoção de DQO de 85% (Fase I) para 94% (Fase II), mantendo-se nessa faixa até o final do experimento.

A Figura 5.12 mostra a eficiência de remoção de DQO do reator anaeróbio e do reator aeróbio individualmente. A remoção de matéria orgânica no reator anaeróbio foi de 276 mg O₂.L⁻¹ (77±10%), 373 mg O₂.L⁻¹ (82±9%), 384 mg O₂.L⁻¹ (81±4%) e 403 mg O₂.L⁻¹ (86±2%) nas Fases I, II, III e IV respectivamente. No reator aeróbio a remoção foi de 31 mg O₂.L⁻¹ (61±17%), 52 mg O₂.L⁻¹ (66±17%), 54 mg O₂.L⁻¹ (61±14%) e 49 mg O₂.L⁻¹ (70±12%) nas Fases I, II, III e IV respectivamente. Os reatores anaeróbio e aeróbio obtiveram as melhores eficiências de remoção de DQO na Fase IV. A fase de maior eficiência de remoção de DQO no reator aeróbio também foi a de maior eficiência de remoção de nitrogênio, não sendo observada competição entre as bactérias heterotróficas e autotróficas. Alguns dias nas Fases I e II o efluente do reator aeróbio obteve maior DQO do que o anaeróbio, indicando perda de biomassa e apresentando eficiência negativa. No gráfico esses eventos não foram representados.

Os reatores sequenciais anaeróbio/aeróbio, em sua melhor condição, removeram 95% de matéria orgânica com COV de 0,75 kg DQO.m⁻³.d⁻¹ na Fase IV. Araújo (2015) atingiu eficiência máxima de 86% com menor COV de 0,14 kg DQO.m⁻³.d⁻¹ em reatores idênticos, incluindo um reator anóxico após o aeróbio.

Figura 5.12 – Eficiência de remoção de DQO bruta/bruta no reator anaeróbio (AN) e no aeróbio (AE).



5.3 BIOLOGIA MOLECULAR

O método da PCR foi aplicado para os indicadores específicos (primers) de *Nitrospira* (Bactéria Oxidante de Nitrito – BON), Bactérias Oxidantes de Amônia – BOA, Bactérias Desnitrificantes – BD e Anammox. As análises foram feitas nas Fases I, II e III do reator aeróbio e I no reator anaeróbio, como mostra a Tabela 5.15.

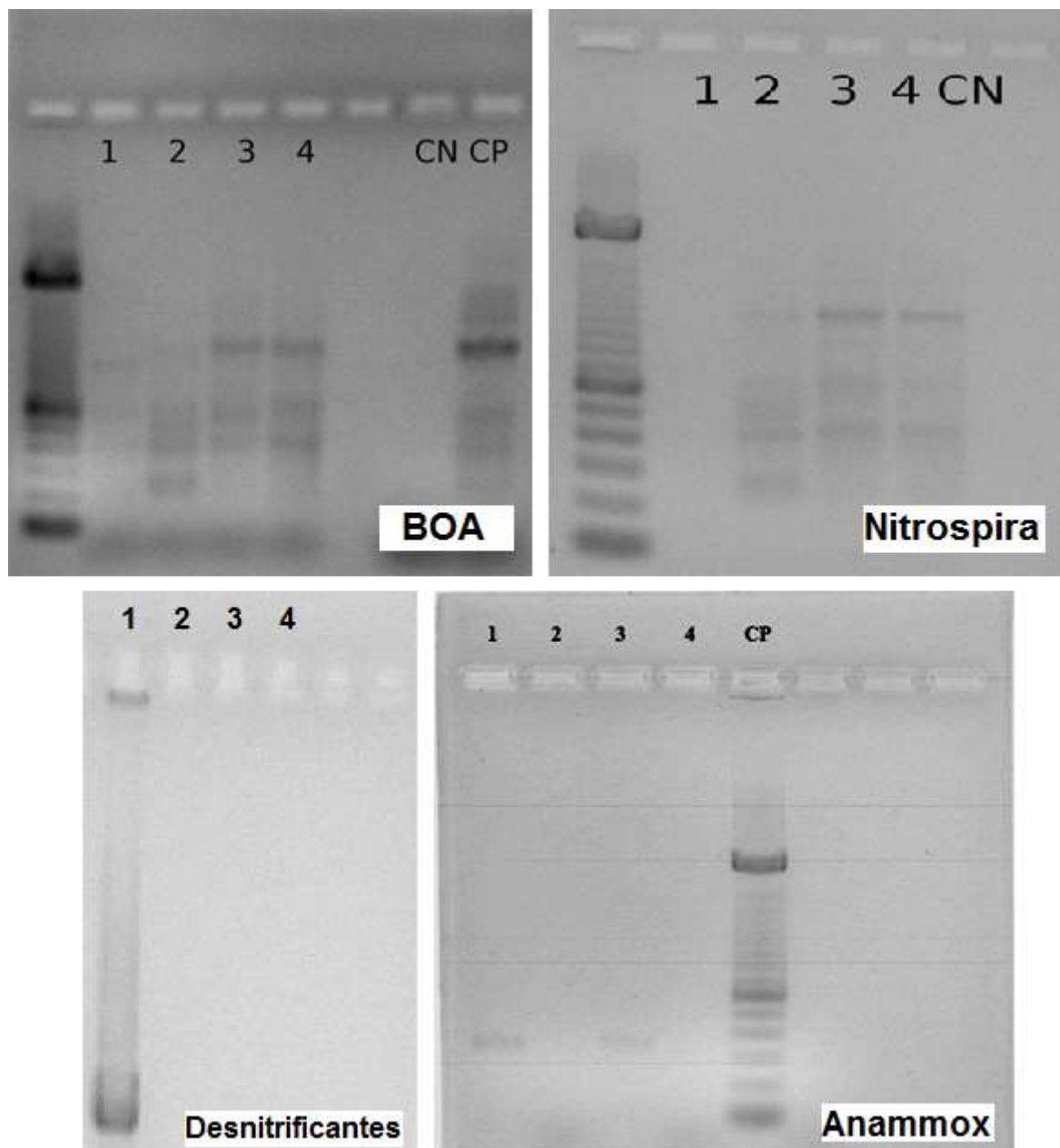
Tabela 5.15 – Identificação das amostras dos reatores anaeróbio (AN) e aeróbio (AE) e suas respectivas fases.

Amostra	Fase	Legenda
AN	I	1
AE	I	2
AE	II	3
AE	III	4

A técnica da PCR aplicada nas amostras dos reatores se trata de um método qualitativo que visa identificar a presença ou ausência de micro-organismos (Figura 5.13). Os controles negativo e positivo foram aplicados como indicadores da isenção de contaminação e confirmação do método nas amostras analisadas, pois se houver amplificação do CN há contaminação, enquanto se não houver amplificação do CP ocorreu erro na análise.

Analisando os resultados da PCR observa-se que foram identificadas BOA, desnitrificantes e Anammox no reator anaeróbio, indicando que o processo dominante de desnitrificação pode ter ocorrido via nitrito e oxidação anaeróbia da amônia. Porém não pode ser descartada a hipótese da presença de BON no sistema, pois o método escolhido para análise não permitiu identificar outros grupos de BON. No reator aeróbio as análises de PCR identificaram BOA, *Nitrospira* e Anammox, indicando que o processo de desnitrificação pode ter ocorrido principalmente por bactérias nitrificantes e Anammox. O método escolhido para análise não permitiu identificar outros grupos de desnitrificantes.

Figura 5.13 - PCR dos reatores anaeróbio (AN) e aeróbio (AE) nas Fases I, II, III e IV para o domínio Bacteria: bactérias oxidantes de amônia (BOA), *Nitrospira*, desnitrificantes e anammox.



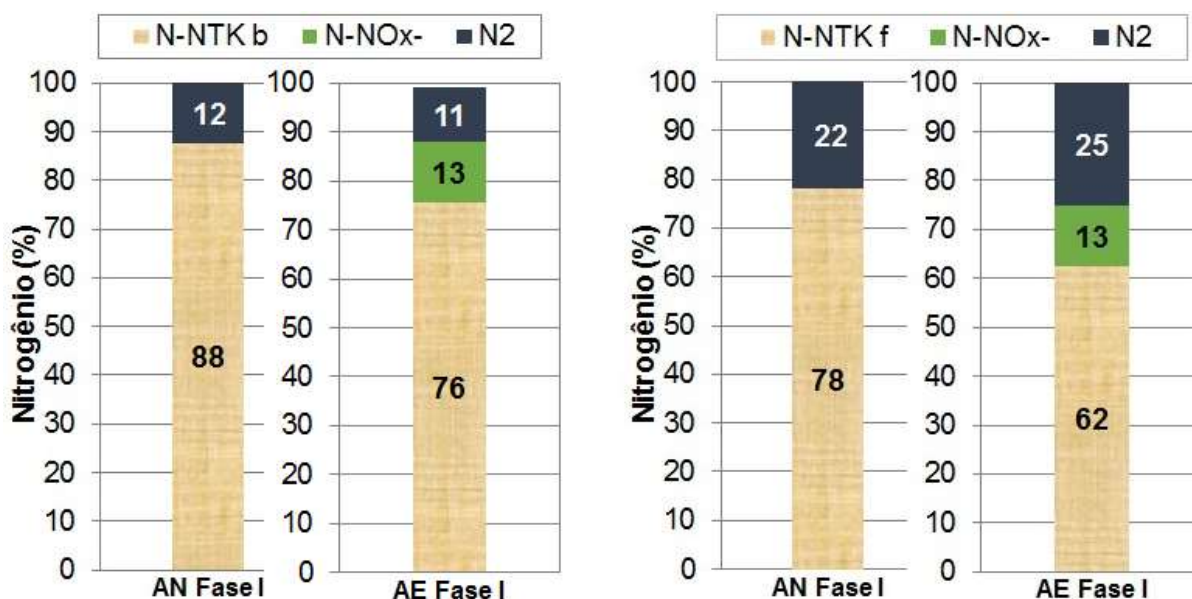
5.4 REMOÇÃO DE NITROGÊNIO

5.4.1 Fase I (1º ao 124º dia)

A primeira fase de operação do sistema durou 124 dias. A CNV foi de $0,036 \pm 0,003 \text{ kg N-NTK.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, produzindo $16 \pm 2 \text{ mg N-NH}_4^+.\text{L}^{-1}$ de amônio no reator anaeróbio e mantendo a concentração de amônia livre em $0,3 \pm 0,2 \text{ mg N-NH}_3.\text{L}^{-1}$. Esse valor está dentro da faixa de inibição de $0,1\text{--}1,0 \text{ mg N-NH}_3.\text{L}^{-1}$ para as nitratantes (ANTHONISEN et al., 1976). Nessa fase todo o N-NH_4^+ do sistema foi produzido através da amonificação do nitrogênio orgânico do esgoto sintético. O OD nessa fase foi de $1,4 \pm 0,8 \text{ mg O}_2.\text{L}^{-1}$.

De $22 \pm 2 \text{ mg N-NTK.L}^{-1}$ afluente, $3,3 \pm 2,2 \text{ mg N.L}^{-1}$ foi oxidado no reator anaeróbio, promovendo eficiência de oxidação bruta/bruta de $12 \pm 10\%$. Avaliando as amostras filtradas, considerando que o material particulado se refere à perda de lodo do sistema, $4,9 \pm 2,4 \text{ mg N.L}^{-1}$ foi oxidado no reator anaeróbio, resultando em uma eficiência de oxidação bruta/filtrada de $22 \pm 10\%$. No reator aeróbio foi observada oxidação de $5,8 \pm 3,7 \text{ mg N.L}^{-1}$ (eficiência de oxidação de $24 \pm 23\%$ do N-NTK afluente). A eficiência de oxidação bruta/filtrada foi de $38 \pm 24\%$ com $7,4 \pm 4,1 \text{ mg N.L}^{-1}$ de nitrogênio oxidado. A Figura 5.14 ilustra a eficiência de oxidação de N-NTK bruta/bruta e bruta/filtrada no reator anaeróbio e no aeróbio e as parcelas de N-NO_x^- e N_2 produzidas na Fase I.

Figura 5.14 - Eficiência de oxidação de N-NTK bruta/bruta (N-NTK b) e bruta/filtrada (N-NTK f) nos reatores anaeróbio (AN) e aeróbio (AE) e as parcelas de N-NO_x^- e N_2 produzidas na Fase I.



Do nitrogênio oxidado no reator aeróbio, $4,0 \pm 5,4 \text{ mg.L}^{-1}$ foi convertido a N-NO_x^- , produzindo $3,9 \pm 5,4 \text{ mg N.L}^{-1}$ de nitrato e $0,1 \pm 0 \text{ mg N.L}^{-1}$ de nitrito, e $2,5 \pm 2,6 \text{ mg.L}^{-1}$ foi removido do sistema. Da parcela filtrada, $4,9 \pm 2,4 \text{ mg.L}^{-1}$ foi convertido a nitrogênio gasoso. Nos primeiros 45 dias, além de haver baixa produção de nitrato e nitrito (máxima de $4,1 \text{ mg N-NO}_x^- \text{.L}^{-1}$), houve aumento do N-NH_4^+ no reator aeróbio em relação ao reator anaeróbio, indicando que o processo de amonificação continuou ocorrendo. A produção de nitrato começou a aumentar a partir do 87º dia, chegando a concentrações de $16 \text{ mg N-NO}_x^- \text{.L}^{-1}$, porém ainda de forma instável. A amônia livre, apesar de presente em concentração inibitória às BON, não impediu o metabolismo desses micro-organismos, porém pode ter dificultado a nitrificação completa do amônio e impedido melhor eficiência. A inibição completa pode não ter ocorrido devido à oxidação do N-NH_4^+ no reator, causando diminuição da amônia livre no sistema e possibilitando novamente o metabolismo das BON. A variação do nitrogênio amoniacal e da produção de nitrito e nitrato no reator aeróbio pode ser observada na Figura 5.15. Os dados de N-NTK , N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- e N-NH_3 da Fase I estão descritos na Tabela 5.16.

Figura 5.15 - Amônio afluente, amônio efluente, nitrato e nitrito efluente no reator aeróbio na Fase I.

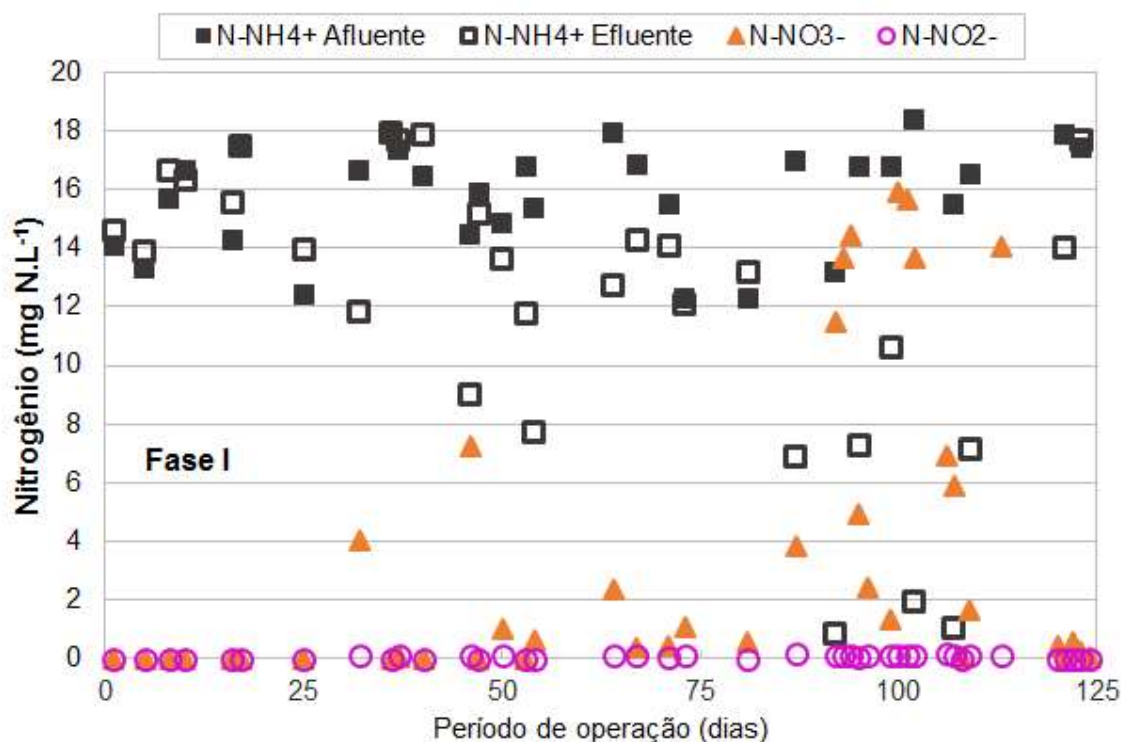


Tabela 5.16 - Resumo estatístico da variação de nitrogênio (mg N.L⁻¹) no esgoto sintético (AF), nos reatores anaeróbio (AN) e aeróbio (AE) na Fase I.

Fase	Unidade	Amostra	N	Mínimo	Média/ Desvio Padrão	Máximo
N-NTK bruto		AF	25	17,9	22,4±1,7	25,5
		AN		15,5	19,8±2,5	25,3
		AE		4,2	15,2±5,2	20,7
N-NTK filtrado		AF	25	8,8	20,1±3,1	23,0
		AN		12,8	17,5±2,1	20,8
		AE		0,8	12,4±5,6	20,0
N-NH ₄ ⁺	mg N.L ⁻¹	AN	30	12,3	15,9±1,8	18,4
		AE		0,8	11,7±5,1	17,9
N-NO ₂ ⁻		AE	41	0,0	0,1±0,1	0,1
N-NO ₃ ⁻		AE	41	0,0	3,9±5,4	15,9
N-NH ₃		AN	30	0,1	0,3±0,2	0,8
		AE		0,0	0,3±0,1	0,6

De acordo com os resultados da PCR, foi observada a presença de Anammox, BOA e desnitrificantes no reator anaeróbio. No reator aeróbio, foram identificadas BOA e *Nitrospira*. Além da pequena parcela incorporada à biomassa e da oxidação anaeróbia da amônia pelas Anammox, a concentração de oxigênio no afluente pode ter proporcionado condições microaeróbias para a nitrificação e desnitrificação simultânea (NDS) no reator anaeróbio. No reator aeróbio o nitrogênio também pode ter sido removido por NDS. Segundo Wei et al. (2014) diminuição de N-NH₄⁺ sem acúmulo de NO_x⁻ no efluente é indicativo de NDS.

Sistemas com meio suporte podem facilitar a nitrificação e desnitrificação simultânea devido à formação de gradientes de concentração e zonas anóxicas (METCALF; EDDY, 2003; KOOPS; POMMERENING-RÖSER, 2006; MORAIS, 2015). Cao et al. (2009) encontraram em reator aeróbio remoção de 50% de nitrogênio, relacionando essa remoção à formação de micronichos no meio suporte.

A formação de micronichos não é determinante na NDS. Apesar de não ser esperada nitrificação representativa em ambientes com menos de 0,3 mg O₂.L⁻¹, tratamentos com NDS podem atingir nitrificação superior a 80% em ambientes

anóxicos, comprovando que organismos nitrificantes, desnitrificantes e bactérias anammox podem coexistir no mesmo ambiente (KELUSKAR et al., 2013). Da mesma forma, em ambientes aerados pode ocorrer desnitrificação. Philips (2008) identificou remoção de nitrogênio por via autotrófica aeróbia através de teste de batelada em condições completamente aeróbias e OD de 6 mg O₂.L⁻¹.

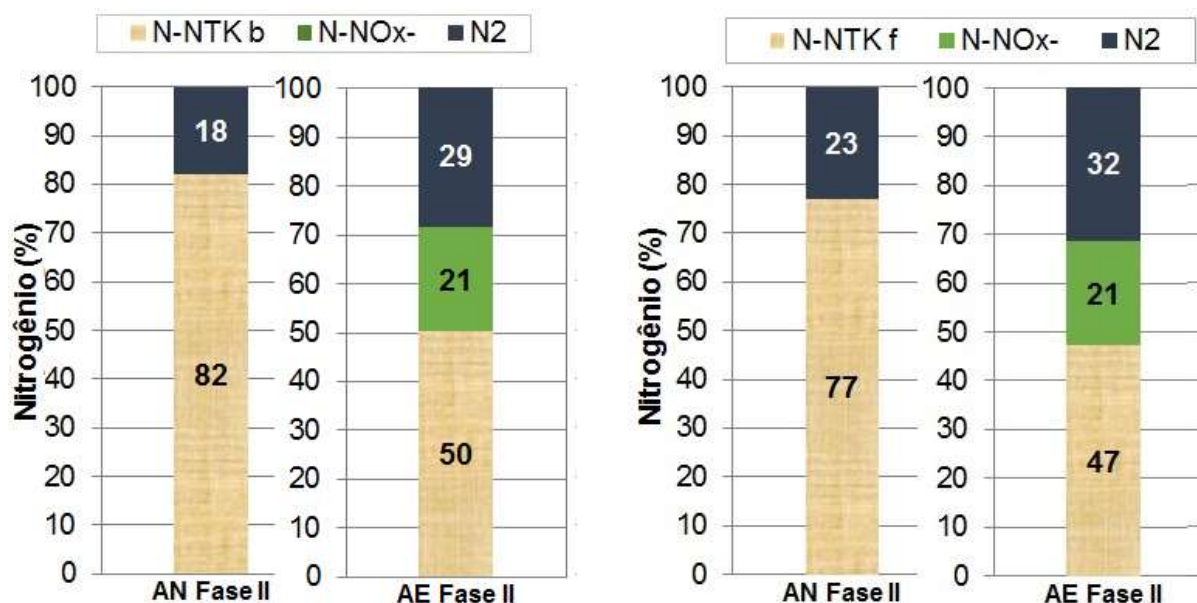
Organismos do tipo *Nitrosomonas* e várias outras bactérias consideradas quimiolitotóxicas aeróbias podem desnitrificar tanto em condições óxicas como anóxicas com N₂ como principal produto, podendo nitrificar e desnitrificar simultaneamente (BOCK et al., 1995; AHN, 2006). Bactérias oxidantes de amônio como a *N. europaea* podem reduzir nitrito a óxido nítrico (NO) ou óxido nitroso (N₂O) em ambientes com baixa oxigenação (METCALF; EDDY, 2003; YU; CHANDRAN, 2010). A *N. eutropha* também metaboliza nitrito a nitrogênio gasoso e alguns intermediários do processo em ambientes anóxicos.

5.3.2 Fase II (125º ao 162º dia)

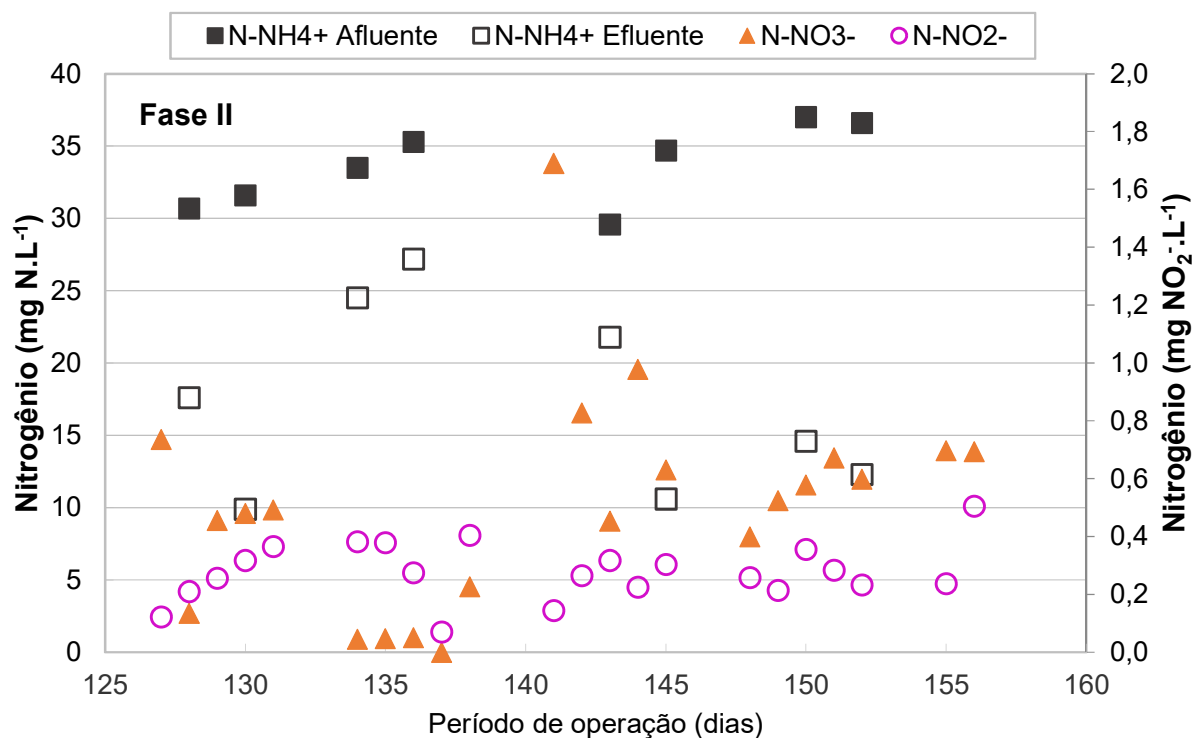
Essa fase durou 37 dias e ainda foi de estabilização da nitrificação. A CNV aumentou para 0,070±0,002 kg N-NTK.m⁻³.d⁻¹ produzindo 34±3 mg N-NH₄⁺.L⁻¹ de amônio. Cerca de 60% do N-NH₄⁺ total do sistema foi produzido através da amonificação do nitrogênio orgânico do esgoto sintético, enquanto 40% foi introduzido através da adição de NH₄Cl. Com o aumento do N-NH₄⁺, a amônia livre atingiu concentração de 1,5±0,5 mg N.L⁻¹, acima da faixa de inibição de 0,1–1,0 mg N-NH₃.L⁻¹ para as BON (ANTHONISEN et al., 1976). O oxigênio dissolvido nesse período foi de 1,9±0,2 mg O₂.L⁻¹.

De 44±1 mg N-NTK.L⁻¹ afluente, 7,9±3,6 mg N.L⁻¹ foi oxidado no reator anaeróbio, promovendo eficiência de oxidação bruta/bruta de 18±8% (maior do que a Fase I). Na amostra filtrada do reator, a oxidação foi de 10,1±2,9 mg N.L⁻¹ (eficiência de oxidação bruta/filtrada de 23±6%), semelhante à fase anterior, porém com o dobro da carga nitrogenada. No reator aeróbio foi observada oxidação de 17,9±8,4 mg N.L⁻¹, com eficiência de oxidação de 50±21% do N-NTK afluente (efluente do reator anaeróbio). Já a eficiência de oxidação bruta/filtrada foi de 53±19%, com oxidação de 19,0±7,9 mg N.L⁻¹. A Figura 5.16 ilustra a eficiência de oxidação de N-NTK bruta/bruta e bruta/filtrada no reator anaeróbio e no aeróbio e as parcelas de N-NO_x⁻ e N₂ produzidas na Fase II.

Figura 5.16 - Eficiência de oxidação de N-NTK bruta/bruta (N-NTK b) e bruta/filtrada (N-NTK f) nos reatores anaeróbio (AN) e aeróbio (AE) e as parcelas de N-NO_x⁻ e N₂ produzidas na Fase II.



De 50% oxidado bruto do reator aeróbio, 21±14% foi convertido a NO_x⁻ e 29±13% foi convertido a nitrogênio gasoso. Em relação à parcela oxidada filtrada, dos 53% oxidado, 32±14% foi convertido a N₂. A produção média de nitrato aumentou para 10,4±7,6 mg N.L⁻¹ e de nitrito para 0,3±0,1 mg N.L⁻¹ nessa fase, com remoção de 10,8±4,8 mg N.L⁻¹, podendo ser observada na Figura 5.17. O aumento na carga nitrogenada pode ter proporcionado melhores condições nutricionais para os micro-organismos e aumentado seu metabolismo. Os resultados de PCR identificaram nessa fase BOA, *Nitrospira* e Anammox no reator aeróbio. A remoção de nitrogênio no reator aeróbio, portanto, pode ter sido via NDS e oxidação anaeróbia. Novamente não foi observada inibição completa das BON, mesmo a amônia livre estando acima do limite inibitório. A partir do 141º dia de experimento foi observada estabilização na nitrificação. No 162º dia foi iniciada a Fase III de inibição química com aumento da amônia livre no sistema. Os dados de N-NTK, N-NH₄⁺, N-NO₂⁻, N-NO₃⁻ e N-NH₃ da Fase II estão descritos na Tabela 5.17.

Figura 5.17 - Amônio afluente, amônio efluente, nitrato e nitrito efluente no reator aeróbio na Fase II.**Tabela 5.17** - Resumo estatístico da variação de nitrogênio (mg N.L⁻¹) no esgoto sintético (AF), nos reatores anaeróbio (AN) e aeróbio (AE) na Fase II.

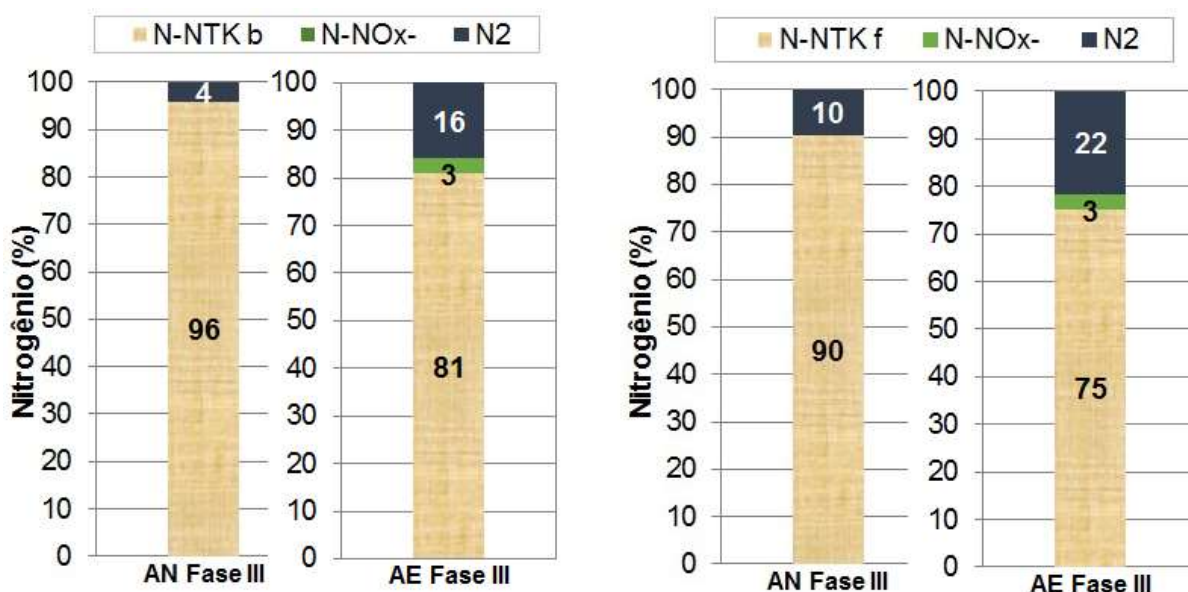
Fase	Unidade	Amostra	N	Mínimo	Média/ Desvio Padrão	Máximo
N-NTK bruto		AF	8	42,6	43,8±1,3	46,8
		AN		29,0	35,9±3,7	39,2
		AE		11,2	18,1±6,4	26,8
N-NTK filtrado		AF	8	40,1	41,1±1,5	44,8
		AN		29,6	33,7±2,8	37,0
		AE		10,2	17,7±6,2	25,9
N-NH ₄ ⁺	mg N.L ⁻¹	AN	8	29,6	33,6±2,8	37,0
		AE		9,9	17,3±6,6	27,2
N-NO ₂ ⁻		AE	22	0,1	0,3±0,1	0,5
N-NO ₃ ⁻		AE	22	0,0	10,4±7,6	33,8
N-NH ₃		AN	8	0,9	1,5±0,5	2,4
		AE		0,4	0,8±0,5	1,8

5.3.3 Fase III (163° ao 206° dia)

Para atingir a inibição das BON e promover acúmulo de nitrito no sistema, a concentração de amônia livre utilizada na Fase III foi de 5 mg $\text{NH}_3\cdot\text{L}^{-1}$. Essa concentração está abaixo da faixa de inibição das bactérias oxidantes da amônia (BOA), que ocorre de 10 a 150 mg $\text{NH}_3\cdot\text{L}^{-1}$ e acima da concentração limite das BON de 0,1 a 1,0 mg $\text{NH}_3\cdot\text{L}^{-1}$ (ANTHONISEN et al., 1976). A concentração média de amônia livre atingida foi $4,8\pm1,8$ mg $\text{NH}_3\cdot\text{L}^{-1}$, com CNV de $0,286\pm0,017$ kg N-NTK. $\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ e amônio de 159 ± 16 mg $\text{NH}_4^+\cdot\text{L}^{-1}$. A maior parte do N- NH_4^+ do sistema foi introduzida através da adição de NH_4Cl (87%). O oxigênio dissolvido nessa fase foi de $1,7\pm0,4$ mg $\text{O}_2\cdot\text{L}^{-1}$. A Fase III durou 44 dias.

De 179 ± 10 mg N-NTK. L^{-1} afluyente, $8,9\pm8,4$ mg $\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$ foi oxidado no reator anaeróbio, promovendo eficiência de oxidação bruta/bruta de $4\pm4\%$. Na amostra filtrada do reator, a oxidação foi de $19,7\pm12,1$ mg $\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$ com eficiência de oxidação bruta/filtrada de $10\pm7\%$, indicando diminuição de mais de 50% em relação à fase anterior. A Figura 5.18 ilustra a eficiência de oxidação de N-NTK bruta/bruta e bruta/filtrada no reator anaeróbio e no aeróbio e as parcelas de N- NO_x^- e N_2 produzidas na Fase III.

Figura 5.18 - Eficiência de oxidação de N-NTK bruta/bruta (N-NTK b) e bruta/filtrada (N-NTK f) nos reatores anaeróbio (AN) e aeróbio (AE) e as parcelas de N- NO_x^- e N_2 produzidas na Fase III.



Nessa fase as análises de PCR identificaram BOA e *Nitrospira* no reator aeróbio. A análise da oxidação da amônia no reator aeróbio na Fase III (Figura 5.19)

foi feita em dois períodos: os primeiros 21 dias de estabilização da nova fase (163° - 183° dia) e os 23 dias finais (184° - 206° dia). Os dados de N-NTK, N-NH₄⁺, N-NO₂⁻, N-NO₃⁻ e N-NH₃ da Fase III estão descritos na Tabela 5.18.

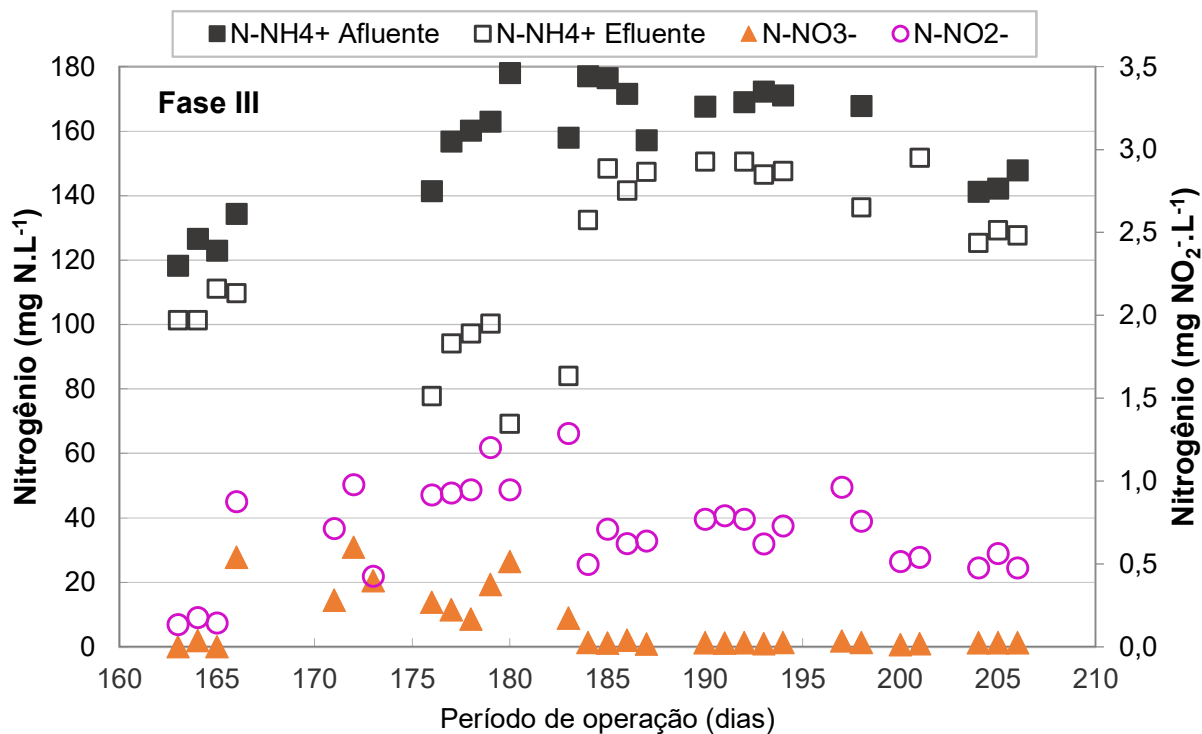
- 163° – 183° dia (21 dias)

A fase lag da nova condição com alta concentração de amônio durou 8 dias. As bactérias diminuíram consideravelmente a produção de N-NO_x⁻, produzindo 2 mg N.L⁻¹ de nitrato apenas no 2° dia e 0,1–0,2 mg N.L⁻¹ de nitrito. A taxa de nitrificação foi de 3,5±4%, com desnitrificação da maior parte do N-NH₄⁺ oxidado.

Após a fase lag a nitrificação voltou a ocorrer com produção média de 18,2±8,1 mg N-NO₃⁻.L⁻¹ e 0,9±0,2 mg N-NO₂⁻.L⁻¹. Foi observada oxidação de 65,4±3,7 mg N.L⁻¹ da amostra bruta e 65,9±4,5 mg N.L⁻¹ da amostra filtrada (eficiência de oxidação de 41±4%). A nitrificação foi de 15,3±7,3 mg N.L⁻¹ e desnitrificação de 50,1±11,0 mg N.L⁻¹, indicando que a maior parte da amônia oxidada foi desnitrificada (78% do N-NH₄⁺ oxidado). O percentual desnitrificado foi semelhante ao da Fase II, porém a CNV é quase cinco vezes maior.

- 184° - 206° dia (23 dias)

A produção de nitrato baixou para 1,2±0,3 mg N-NO₃⁻.L⁻¹ e a de nitrito para 0,7±0,1 mg N-NO₂⁻.L⁻¹, diminuindo a oxidação de N-NTK para 21,7±7,9 mg N.L⁻¹ da amostra bruta (12±4%) e 35,0±7,1 mg N.L⁻¹ da amostra filtrada (20±4%). Da parcela oxidada, 1,9±0,2 mg N.L⁻¹ foi convertido a nitrito e nitrato e 19,8±7,8 mg N.L⁻¹ convertido a nitrogênio gasoso.

Figura 5.19 - Amônio afluente, amônio efluente, nitrato e nitrito efluente no reator aeróbio na Fase III.**Tabela 5.18** - Resumo estatístico da variação de nitrogênio (mg N.L^{-1}) no esgoto sintético (AF), nos reatores anaeróbio (AN) e aeróbio (AE) na Fase III.

Fase	Unidade	Amostra	N	Mínimo	Média/ Desvio Padrão	Máximo
N-NTK bruto		AF	8	157,1	178,8±10,4	192,2
		AN		157,0	171,5±12,0	186,7
		AE		89,0	138,9±28,1	163,1
N-NTK filtrado		AF	8	144,6	166,2±12,1	184,5
		AN		141,2	161,7±12,0	174,0
		AE		87,9	132,8±22,5	154,1
N-NH ₄ ⁺	mg N.L ⁻¹	AN	27	29,6	159,1±15,7	37,0
		AE		9,9	120,9±26,2	27,2
N-NO ₂ ⁻		AE	29	0,1	0,7±0,3	1,3
N-NO ₃ ⁻		AE	29	0,0	7,0±9,5	30,9
N-NH ₃		AN	27	2,8	4,8±1,8	9,5
		AE		1,5	5,7±3,3	13,2

A inibição ativa das BON a partir do 184º dia diminuiu pela metade a oxidação da amônia, indicando possível influência na desnitrificação por esse grupo de micro-organismos. Após a inibição das BON as outras bactérias envolvidas na produção de nitrogênio gasoso (BOA e anammox) estariam em período de adaptação à nova condição, diminuindo consequentemente a eficiência de oxidação da amônia no sistema.

A baixa produção de nitrato no reator pode estar relacionada à oxidação anaeróbia das bactérias anammox ($0,26 \text{ mol NO}_3^-/\text{mol de NH}_4^+$; PAREDES et al., 2007) ou a BON parcialmente inibidas. Não é possível afirmar se houve inibição completa das BON, tanto pela baixa produção de nitrato como pela impossibilidade de contabilizar a NDS via nitrato no reator. Não houve acúmulo de nitrito no efluente, sugerindo que todo o NO_x^- produzido foi desnitrificado. Com o objetivo de verificar o comportamento das BON em concentração menor de amônia livre, o amônio foi alterado de $159 \text{ mg N-N-NH}_4^+.\text{L}^{-1}$ para $57 \text{ mg N-N-NH}_4^+.\text{L}^{-1}$ na fase seguinte.

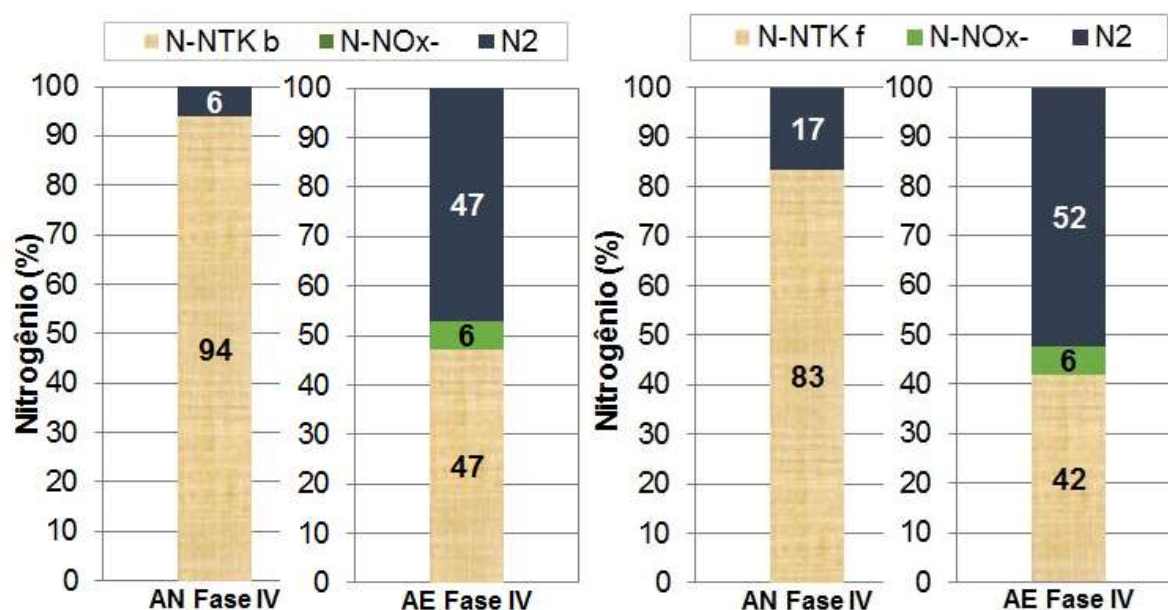
5.3.4 Fase IV (207º ao 250º dia)

Com duração de 44 dias, o CNV foi de $0,111 \pm 0,004 \text{ kg N-NTK.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ produzindo $57 \pm 3 \text{ mg N-N-NH}_4^+.\text{L}^{-1}$ de amônio no reator anaeróbio e concentração de amônia livre de $1,6 \pm 0,3 \text{ mg N.L}^{-1}$. O oxigênio dissolvido nessa fase foi de $1,7 \pm 0,4 \text{ mg O}_2.\text{L}^{-1}$. Apesar da maior concentração de NH_4^+ comparado à Fase II quando não foi observada inibição, a amônia livre foi muito próxima. A amônia livre aumenta exponencialmente em função do pH, enquanto aumenta linearmente em função do amônio. Mesmo com uma diferença pequena de pH, o aumento de amônio não foi suficiente para que o NH_3 superasse o da Fase II. Cerca de 63% do N-NH_4^+ do sistema nesse período foi introduzido através da adição de NH_4Cl .

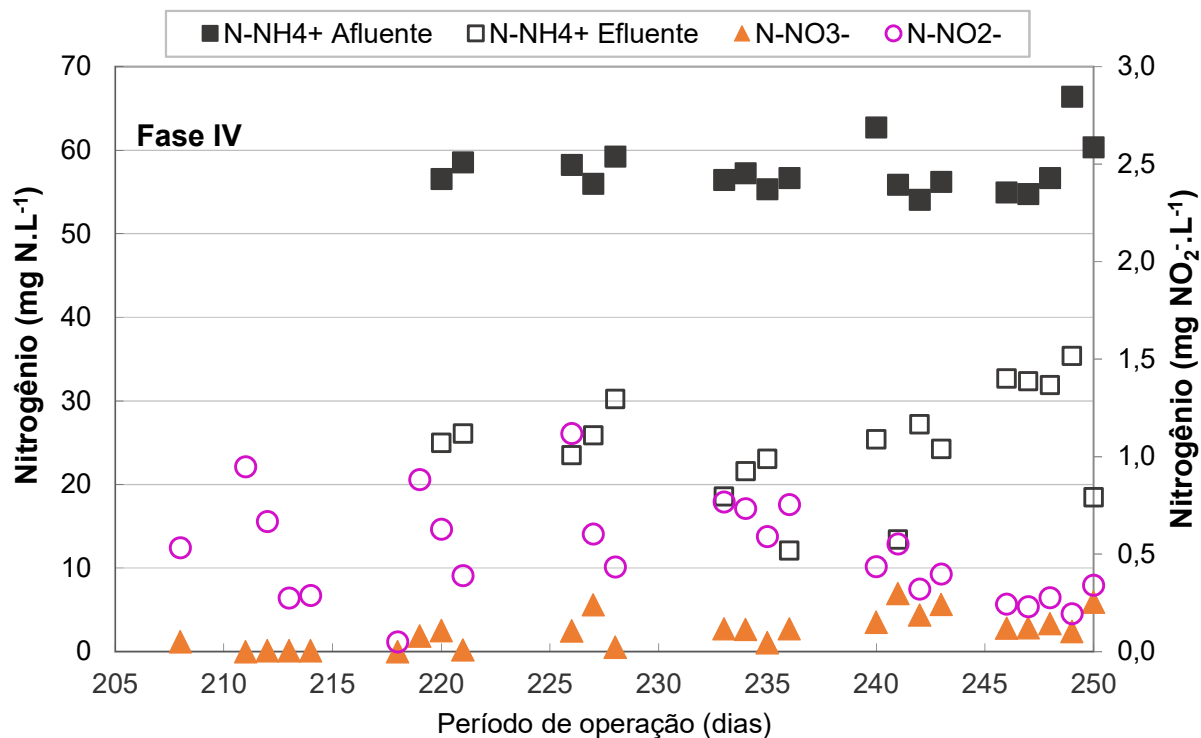
De $70 \pm 3 \text{ mg N-NTK.L}^{-1}$ afluente, $4,3 \pm 3,0 \text{ mg N.L}^{-1}$ foi oxidado no reator anaeróbio (oxidação bruta/bruta de $6 \pm 4\%$). Na amostra filtrada a oxidação foi de $11,6 \pm 3,0 \text{ mg N.L}^{-1}$ (oxidação bruta/filtrada de $17 \pm 4\%$). Ambas foram superiores à oxidação da fase anterior e inferiores às Fases I e II. No reator aeróbio foi observada oxidação de $34,5 \pm 4,0 \text{ mg N.L}^{-1}$ e eficiência de oxidação de $53 \pm 7\%$. A eficiência de oxidação bruta/filtrada foi de $58 \pm 5\%$ com oxidação de $37,9 \pm 3,2 \text{ mg N.L}^{-1}$. A oxidação de N-NTK nessa fase foi a maior durante todo o experimento. A Figura 5.20 mostra a eficiência de oxidação de N-NTK bruta/bruta e bruta/filtrada no reator anaeróbio e no

aeróbio e as parcelas de N-NO_x^- e N_2 produzidas na Fase IV. Nos primeiros 15 dias dessa fase o destilador de nitrogênio quebrou, não sendo possível obter dados de NTK e amônio.

Figura 5.20 - Eficiência de oxidação de N-NTK bruta/bruta (N-NTK b) e bruta/filtrada (N-NTK f) nos reatores anaeróbio (AN) e aeróbio (AE) e as parcelas de N-NO_x^- e N_2 produzidas na Fase IV.

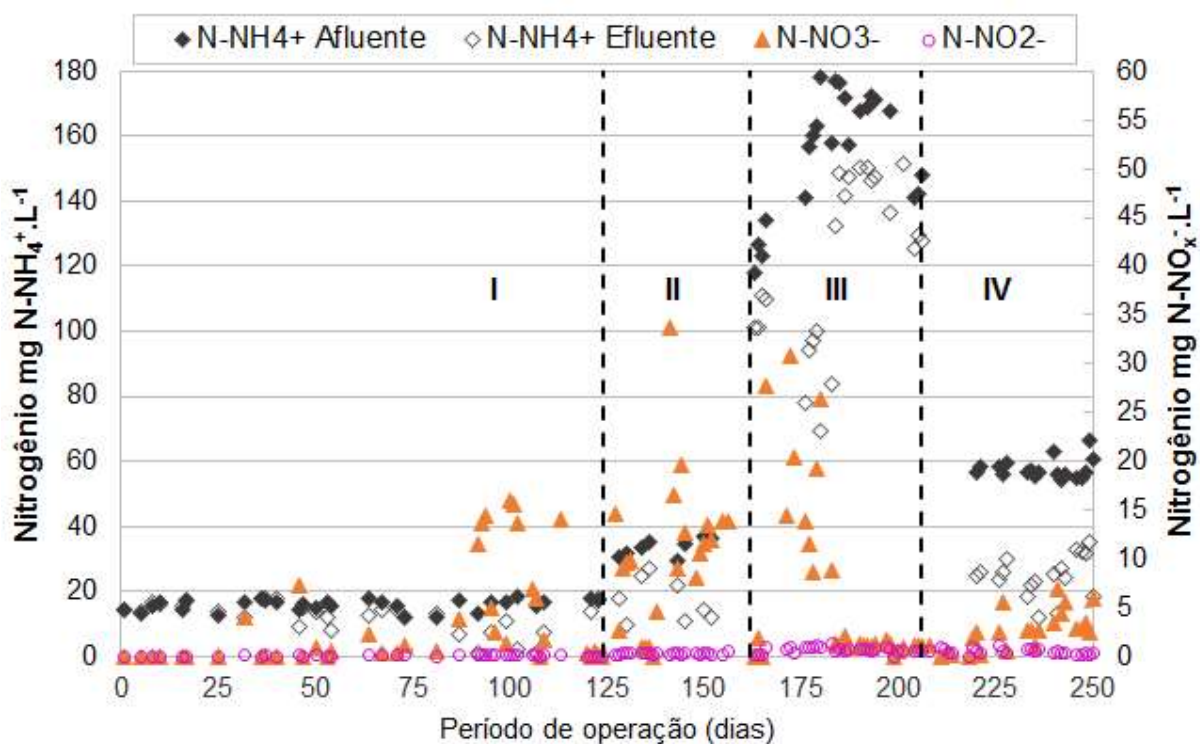


A produção de nitrato e nitrito foi de $3,3 \pm 1,3 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$ e $0,5 \pm 0,2 \text{ mg N-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$, representando nitrificação de $6 \pm 2\%$ de 58% oxidado. A Figura 5.21 mostra a relação entre amônio e o N-NO_x^- produzido no período. A desnitrificação foi a maior de todo o período experimental ($47 \pm 7\%$ bruto e $52 \pm 7\%$ filtrado), com produção de $30,8 \pm 4,3 \text{ mg N} \cdot \text{L}^{-1}$ de nitrogênio gasoso. A inibição se manteve nessa fase, mas a partir do 219º dia a produção de nitrato aumenta discretamente, apesar de ainda baixa. A Figura 5.22 mostra o comportamento do amônio, do nitrito e do nitrato no reator aeróbio em todas as fases do experimento. Os dados de N-NTK, N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- e N-NH_3 da Fase IV estão descritos na Tabela 5.19.

Figura 5.21 - Amônio afluente, amônio efluente, nitrato e nitrito efluente no reator aeróbio na Fase IV.**Tabela 5.19** - Resumo estatístico da variação de nitrogênio (mg N.L⁻¹) no esgoto sintético (AF), nos reatores anaeróbio (AN) e aeróbio (AE) na Fase IV.

Fase	Unidade	Amostra	N	Mínimo	Média/ Desvio Padrão	Máximo
N-NTK bruto		AF	8	67,2	69,6±2,4	73,7
		AN		62,0	65,3±2,2	68,3
		AE		22,4	30,8±5,3	37,9
N-NTK filtrado		AF	8	61,0	63,2±1,5	65,0
		AN		52,0	58,0±3,3	62,7
		AE		20,4	27,4±4,1	32,0
N-NH ₄ ⁺	mg N.L ⁻¹	AN	18	54,1	56,6±2,6	66,4
		AE		12,1	24,8±6,4	35,4
N-NO ₂ ⁻		AE	25	0,1	0,5±0,2	1,1
N-NO ₃ ⁻		AE	25	0,0	3,3±1,3	6,9
N-NH ₃		AN	18	1,3	1,6±0,3	2,2
		AE		0,4	1,2±0,5	2,0

Figura 5.22 - Amônio afluente, amônio efluente, nitrato e nitrito efluente no reator aeróbio nas Fases I, II, III e IV.



As variações do N-NTK (bruto e filtrado) do esgoto sintético (afluente) nos reatores sequenciais anaeróbio e aeróbio nas Fases I, II, III e IV podem ser observadas nas Figuras 5.23 e 5.24.

Figura 5.23 - N-NTK bruto do esgoto sintético afluente (AF) e do N-NTK efluente do reator anaeróbio (EF AN) e do aeróbio (EF AE) nas Fases I, II, III e IV.

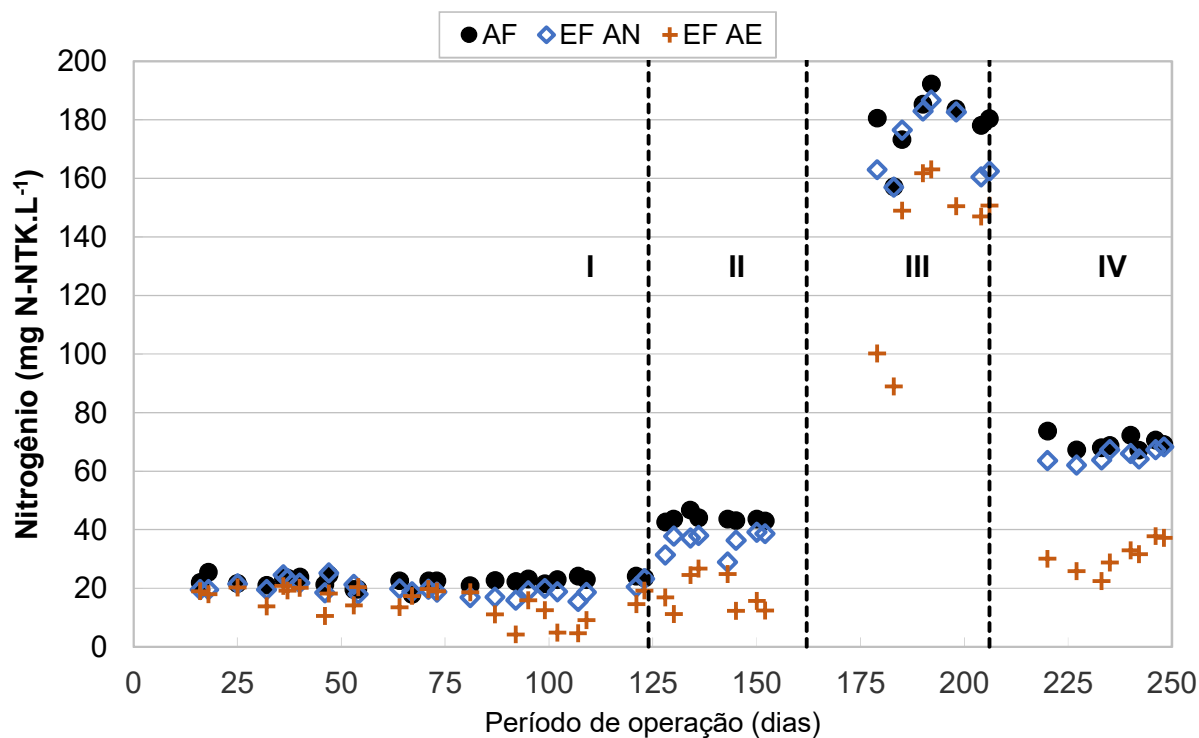
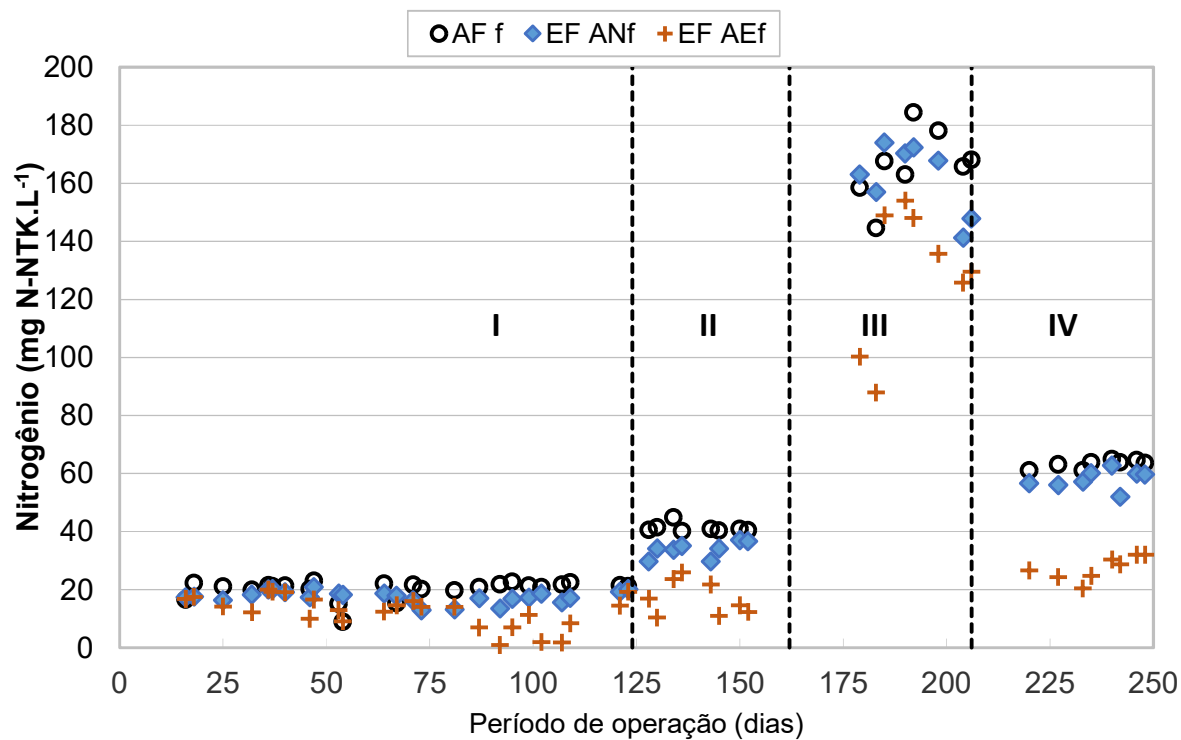


Figura 5.24 - N-NTK filtrado do esgoto sintético afluente (AFf) e do N-NTK efluente do reator anaeróbio (EF ANf) e do aeróbio (EF AEf) nas Fases I, II, III e IV.



Comparando a Fase II e a Fase IV com condição inibitória similar, as BON não foram inibidas na Fase II, enquanto na última houve inibição. Isso pode ser entendido avaliando a amônia livre efluente ao reator aeróbio. Wei et al. (2014) observaram que, mesmo com concentração afluenta inibitória, a amônia livre pode diminuir com a degradação do N-NH_4^+ e perder seu efeito de inibição. Na Fase II o consumo de amônia no reator aeróbio diminuiu a concentração de amônia livre de $1,5 \text{ mg N-NH}_3.\text{L}^{-1}$ para $0,3 \pm 0,1 \text{ mg N-NH}_3.\text{L}^{-1}$ no efluente final. Essa concentração de amônia livre foi a mesma afluenta da Fase I, quando não houve inibição. Na Fase IV a amônia livre efluente foi de $1,2 \pm 0,5 \text{ mg N-NH}_3.\text{L}^{-1}$, estando acima da concentração inibitória máxima das BON de $1,0 \text{ mg N-NH}_3.\text{L}^{-1}$ e próxima à concentração afluenta inibitória. O N-NH_4^+ efluente do reator foi próximo nessas duas fases, porém o pH mais alto na Fase IV tornou a amônia livre mais alta, mantendo a inibição das BON até a saída do efluente final.

O nitrato efluente do sistema aeróbio na Fase IV pode ter sido produzido pelas BON mais resistentes à inibição ou pelas bactérias anammox. É pouco provável que tenha havido inibição das BOA, pois a inibição das BON ocorreu em concentração acima do limite definido por Anthonisen et al. (1976). Outros estudos também observaram inibição com concentrações acima do limite definido. Wang et al. (2014) identificaram inibição das BON acima de $3,5 \text{ mg N-NH}_3.\text{L}^{-1}$. Abeling e Seyfried (1992) também alcançaram a inibição das BON nessa concentração.

A partir do 220º dia a concentração de nitrato efluente apresentou discreto aumento, com produção máxima de $7 \text{ mg N}.\text{L}^{-1}$. Apesar de ainda baixa, foram maiores que as anteriores desde o início da inibição ativa da Fase III, com produção de menos de $2 \text{ mg N-NO}_3^-\text{L}^{-1}$. Sem variação da amônia livre efluente ao reator aeróbio e mantendo-se na faixa inibitória, o aumento da produção de nitrato pode ter ocorrido devido à adaptação dos micro-organismos à menor condição inibitória depois de 20 dias de mudança de fase. O aumento de N-NO_3^- efluente também pode ser indicativo de aclimação das BON à inibição, tornando-se resistentes e retomando seu metabolismo após 67 dias de inibição ativa. Wang et al. (2014) também avaliaram a possibilidade de aclimação das BON à inibição através do aumento da produção de NO_3^- no efluente.

Villaverde et al. (2000) concluíram que o processo de nitrificação e desnitrificação via nitrito não é estável e possível por longos períodos devido à aclimação das BON à amônia livre. Turk e Maivinic (1989) identificaram aclimação

irreversível das BON e concluíram que para alcançar a nitrificação parcial estável é necessário associar outros fatores. Chung et al. (2007) obtiveram nitrificação parcial estável por mais de um ano e meio associando a inibição química (amônia livre) com baixa disponibilidade de OD.

A variação da remoção de nitrogênio no reator anaeróbio também pode ter relação com a amônia livre. Com NH_3 de $0,3 \pm 0,2 \text{ mg N.L}^{-1}$ na Fase I, $1,5 \pm 0,5 \text{ mg N.L}^{-1}$ na Fase II, $4,8 \pm 1,8 \text{ mg N.L}^{-1}$ na Fase III e $1,6 \pm 0,3 \text{ mg N.L}^{-1}$ na Fase IV, a remoção de nitrogênio desconsiderando a perda de biomassa no reator foi respectivamente de 22%, 23%, 10% e 17%. Quanto maior a amônia livre no sistema anaeróbio, menor a eficiência de remoção de nitrogênio. Considerando a presença de anammox, BOA e desnitrificantes, micro-organismos envolvidos na desnitrificação e indentificados pela PCR, houve condição inibitória para anammox.

A inibição das desnitrificantes pode ocorrer com concentrações de 1350 mg N.L^{-1} de nitrato e 150 mg N.L^{-1} de nitrito (GLASS et al., 1997), não ocorrendo essas condições no sistema anaeróbio. Já as bactérias anammox podem ser inibidas em meios com amônia livre superior a 2 mg N.L^{-1} (JUNG et al., 2007; JAROSZYNSKI et al., 2012). Na Fase II o aumento de $0,3 \text{ mg N.L}^{-1}$ para $1,5 \text{ mg N.L}^{-1}$ não diminuiu a remoção de nitrogênio no reator anaeróbio, mudando de 22% para 23%. Na Fase III, com aumento para $4,8 \text{ mg N-NH}_3.\text{L}^{-1}$, diminuiu para 10%. Na Fase IV com NH_3 de $1,6 \text{ mg N.L}^{-1}$ aumentou para 17% em relação à fase anterior, porém foi menor do que na Fase II com menor NH_3 . Portanto a diminuição na remoção de nitrogênio pode ter inibido as bactérias anammox. Como no reator aeróbio, a inibição na Fase IV e não inibição na Fase II pode novamente ser entendida através da amônia livre afluenta ao sistema, podendo ter sido maior na Fase IV.

A diminuição da desnitrificação no reator aeróbio após a inibição ativa das BON na Fase III também pode indicar inibição das anammox e desnitrificação exclusivamente pelas BOA nesse período. Na Fase IV, mesmo ainda sendo observada baixa produção de nitrato efluente e inibição das BON e anammox, o aumento da desnitrificação pode ter ocorrido devido à maior adaptação das BOA à condição de protagonista na produção de N_2 ou pela aclimação das BON e anammox. É pouco provável que a inibição das anammox tenha sido completa pois não houve aumento de nitrito no efluente que indicasse essa inibição, além da baixa produção de nitrato efluente durante toda a fase inibitória. Para avaliar se ocorreu

aclimação das bactérias na Fase IV seria necessário um maior tempo de estudo e verificar se a concentração de N-NOx- efluente continuaria aumentando.

No reator aeróbio o mesmo comportamento do reator anaeróbio de diminuição na produção de nitrogênio gasoso a partir do aumento do NH_3 foi observado, com exceção da Fase IV quando houve a maior remoção de nitrogênio. Com a presença de BOA e anammox em ambos os reatores e avaliando a possível inibição dessa última pela amônia livre, provavelmente a desnitrificação nessa fase foi pelas BOA. Portanto a maior taxa de desnitrificação no reator aeróbio com o mesmo grupo de micro-organismos envolvido, com exceção das bactérias desnitrificantes do reator anaeróbio, pode ter ocorrido devido à melhor condição metabólica do sistema aeróbio para o desenvolvimento de biomassa das BOA do que no sistema anaeróbio. Apesar das BOA também desnitrificarem, a oxidação anaeróbia da amônia pelas anammox é muito mais eficiente (AHN, 2006). Portanto a inibição das anammox no reator anaeróbio pode ter causado maior impacto na desnitrificação do que no reator aeróbio.

Considerando o sistema sequencial de reatores como um todo, o percentual nitrificado foi de $11 \pm 16\%$ na Fase I, $18 \pm 12\%$ na Fase II, $3 \pm 4\%$ na Fase III e $5 \pm 2\%$ na Fase IV. A taxa de desnitrificação considerando a influência da perda de biomassa foi de $21 \pm 15\%$ na Fase I, $41 \pm 10\%$ na Fase II, $20 \pm 10\%$ na Fase III e $50 \pm 7\%$ na Fase IV. Em relação à amostra filtrada obteve-se $33 \pm 14\%$ na Fase I, $44 \pm 9\%$ na Fase II, $24 \pm 8\%$ na Fase III e $55 \pm 6\%$ na Fase IV. A melhor fase de remoção de nitrogênio do sistema foi na Fase IV, com taxa de remoção maior que 50%. Mesmo com taxa de oxidação relativamente baixa das BOA, a perda de amônia por desnitrificação em ambientes anóxicos pode ser acima de 60% (SCHMIDT; BOCK, 1997; AHN, 2006). Porém não é possível afirmar se um determinado grupo de bactérias foi o principal no processo de remoção de nitrogênio.

Nas fases de inibição é possível que tenha havido inibição total das BON, permitindo a desnitrificação via nitrito pelas BOA e anammox, essa última justificando também a produção baixa de nitrato no período. Nas fases de estabilização, quando o nitrato produzido foi relativamente alto e a desnitrificação mais baixa comparados com a Fase IV, pode ter havido um maior domínio das BON no meio. Isso pode justificar também a diminuição da desnitrificação na Fase III, podendo ser entendida como o período de adaptação dos outros grupos de micro-organismos que também desnitrificam à inibição das BON. Wang et al. (2014) observaram que as BOA

demoraram cerca de 30 dias para estabilizar a produção de NO_2^- e que são sensíveis a mudanças de carga de nitrogênio.

6 CONCLUSÕES

A melhor condição de remoção de matéria orgânica e nitrogênio foi na Fase IV, com COV de $0,755 \pm 0,017$ kg DQO.m⁻³.L⁻¹ e CNV de $0,111 \pm 0,004$ kg N.m⁻³.L⁻¹, apresentando remoção de 95% e 50%, respectivamente.

Não foi observada inibição da digestão anaeróbia devido à variação de concentração de amônia.

Houve NDS em ambos os reatores, com maior taxa de remoção de 25% de nitrogênio no sistema anaeróbio (Fase I) e de 52% no aeróbio (Fase IV).

A amônia livre em concentração de 4,8 mg N-NH₃.L⁻¹ inibiu a oxidação de N-NH₄⁺ em cerca de 50% na Fase III.

Não foi identificada inibição das BON com amônia livre de 0,3 mg N-NH₃.L⁻¹.

Não foi possível identificar se houve inibição total das BON devido ao processo de nitrificação e desnitrificação simultânea (NDS) e à baixa produção de nitrato efluente, possivelmente pelo metabolismo das bactérias anammox.

Não foi possível identificar se houve inibição das BOA na fase de maior inibição devido à NDS. Não houve acúmulo de nitrito, provavelmente devido à NDS.

É possível ter ocorrido inibição das anammox pela amônia livre.

O meio suporte pode ter contribuído na NDS.

No final do experimento pode ter havido início de aclimação dos micro-organismos à inibição por amônia livre.

Não foi possível definir qual foi a melhor condição inibitória para as BON devido ao não acúmulo de nitrito no efluente.

7 RECOMENDAÇÕES

De acordo com os resultados e conclusões obtidas neste estudo, algumas recomendações são apresentadas para o desenvolvimento de trabalhos futuros:

- Aumentar o período de monitoramento dos reatores de forma a obter dados com biomassa estabilizada às condições de inibição;
- Se for avaliada a aclimação da biomassa, associar o controle da inibição com concentração de oxigênio baixa;
- Fazer coletas em diferentes alturas do reator para avaliar o comportamento dos micro-organismos;
- Testar o controle da inibição por amônia livre através do pH ao invés do NH_4^+ ;
- Analisar a atividade da biomassa dos reatores em ambiente completamente anóxico e verificar as condições de NDS;
- Identificar por meio da técnica de PCR os principais grupos de micro-organismos do biofilme formado no meio suporte;
- Analisar o efeito de concentrações de amônia livre diferentes das avaliadas nesse estudo (0,3; 1,5; 1,6 e 4,8 mg $\text{N-NH}_3\cdot\text{L}^{-1}$).
- Realizar o sequenciamento das amostras.

REFERÊNCIAS

- ABELING, U.; SEYFRIED, C.F. Anaerobic–aerobic treatment of high strength ammonia wastewater nitrogen removal via nitrite. **Water Science and Technology** 26, 1007–1015. 1992.
- AHN, Y-H. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. **Process Biochemistry** 41 (2006) 1709–1721.
- ANTHONISEN, A. C.; LOEHR, R.C.; PRAKASAM, T.B.S.; SRINATH, E.G. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. **Journal of the Water Pollution Control Federation**. v. 48, p. 835-852, 1976.
- APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for examination of water and wastewater**. 22^a ed. Washington, D.C.: ed. APHA, 2012.
- ARAÚJO, G. V. R. **Remoção de carbono e nitrogênio de efluente sintético através de reatores em série anaeróbio, aeróbio e anóxico**. Dissertação de Mestrado (2015). Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).
- BOCK, E.; SCHMIDT, I.; STRIVEN, R.; ZART, D. Nitrogen loss caused by denitrifying Nitrosomonas cells using ammonium or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor. **Archives of Microbiology**. (1995) 163 : 16-20.
- BOCK, E.; WAGNE, M. **Oxidation of Inorganic Nitrogen Compounds as an Energy Source**. p.457-495. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.; STACKEBRANDT, E. The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria. Volume 2: Ecophysiology and Biochemistry, 3^a edição, 2006.
- BONIN, P.; GILEWICZ, N. M.; BERTRA, J. C. Effects of oxygen on each step of denitrification on Pseudomonas náutica. **Canadian Journal of Microbiology**. 1989. Vol 35. P. 1061-1064.
- BOTHE, H.; JOST, G.; SCHLOTTER, M.; WARD, B. B.; WITZEL, K-P. Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. **FEMS Microbiology Reviews**. Vol.24 (2000) 673-690.
- BOTHEJU, D.; BAKKE, R. Oxygen Effects in Anaerobic Digestion – A Review. **The Open Waste Management Journal**, 2011, 4, 1-19. 1876-4002/11.
- CALLADO, N.H.; FORESTI, E. **Tratamento de esgoto doméstico com remoção de nitrogênio e fósforo em reatores sequenciais em batelada**. In Congresso Interamericano de Ingenieria Sanitaria y Ambiental – AIDIS, Porto Alegre, 2000.
- CHERNICHARO, C. A. L. **Post-treatment options for the anaerobic treatment of domestic wastewater**. Reviews in Environmental Science and BioTechnology, v. 5, p. 73-92, 2006.
- CHERNICHARO, C. A. L. **Anaerobic Reactors**. Biological Wastewater Treatment Series, v.4. IWA. 2007. ISBN: 84339 164 3. 175p.

CHETTY, A. A.; PRASAD S. Flow injection analysis of nitrate and nitrite in commercial baby foods. **Food Chemistry** 197 (2016) 503–508.

CHUNG, J.; SHIM, H.; LEE, Y.W.; BAE, W. Comparison of influence of free ammonia and dissolved oxygen on nitrite accumulation between suspended and attached cells. **Environmental Technology**, Vol. 26. pp 21-33. 2005.

CHUNG, J.; BAE, W.; LEE, Y-W.; RITTMANN, B. E. Shortcut biological nitrogen removal in hybrid biofilm/suspended growth reactors. **Process Biochemistry** 42 (2007) 320–328.

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, 5170–5174. 2012.

FORESTI, E.; FLORÊNCIO, L.; VAN HAANDEL, A.C.; ZAIAT, M; CAVALCANTI, P. F. F. Fundamentos do tratamento anaeróbio. In Campos, J. R. (org). **Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo**. Rio de Janeiro: PROSAB, p29-52. 1999.

GABARRÓ, J.; GANIGUÉ, R.; GICH, F.; RUSCALLEDA, M.; BALAGUER, M.D.; COLPRIM, J. Effect of temperature on AOB activity of a partial nitrification SBR treating landfill leachate with extremely high nitrogen concentration. **Bioresource Technology** 126 (2012) 283–289.

GARBOSSA, L. H. P. **Avaliação de sistemas anaeróbio - aeróbio com biomassa imobilizada para remoção de matéria carbonácea e nitrogênio de esgoto sanitário e uso do biogás na desnitrificação**. Tese de Doutorado, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo – USP, 2006.

GE, S.; PENG, Y.; QIU, S.; ZHU, A.; REN, N. Complete nitrogen removal from municipal wastewater via partial nitrification by appropriately alternating anoxic/aerobic conditions in a continuous plug-flow step feed process. **Water Research**. 55 (2014) 95 e 105.

GE, S.; WANG, S.; YANG, X.; QIU, S.; LI, B.; PENG, Y. Detection of nitrifiers and evaluation of partial nitrification for wastewater treatment: A review. **Chemosphere** 140 (2015) 85–98.

GERNAEY K., V.; LOOSDRECHT M., C., M.; HENZE M.; LIND M.; JORGENSEN S. B. Activated sludge wastewater treatment plant modelling and simulation: state of the art. **Environmental Modelling & Software**. 19 (2004) 763–783.

GLASS, C.; SILVERSTEIN, J.; OH, J. Inhibition of denitrification in activated sludge by nitrite. **Water Environment Research**, Volume 69, Number 6. 1997.

GU, S.; WANG, S.; YANG, Q.; YANG, P.; PENG, Y. Start up partial nitrification at low temperature with a real-time control strategy based on blower frequency and pH. **Bioresource Technology** 112 (2012) 34–41.

GUO, J.; PENG, Y.; WANG, S.; ZHENG, Y.; HUANG, H.; GE, S. Effective and robust partial nitrification to nitrite by real-time aeration duration control in an SBR treating domestic wastewater. **Process Biochemistry** 44 (2009) 979–985.

HOU, B.; HAN, H.; JIA, S.; ZHUANG, H.; ZHAO, Q.; XU, P. Effect of alkalinity on nitrite accumulation in treatment of coal chemical industry wastewater using moving bed biofilm reactor. **Journal of Environmental Science**. 26 (2014) 1014–1022.

JAROSZYNSKI, L. W.; CICEK, N.; SPARLING, R.; OLESZKIEWICZ, J. A. Impact of free ammonia on anammox rates (anoxic ammonium oxidation) in a moving bed biofilm reactor. **Chemosphere** 88 (2012) 188–195.

JUN, B. H.; TANJI, Y.; UNNO, H. Stimulating accumulation of nitrifying bacteria in porous carrier by addition of inorganic carbon in a continuous-flow fluidized bed wastewater treatment reactor. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 89, 334–339. 2000.

JUNG, J.Y.; KANG, S.H.; CHUNG, Y.C.; AHN, D.H.. Factors affecting the activity of anammox bacteria during start up in the continuous culture reactor. **Water Science and Technology**. 55 (1–2), 459–468. 2007.

KELUSKAR, R.; NERURKAR, A.; DESAI, A. Development of a simultaneous partial nitrification, anaerobic ammonia oxidation and denitrification (SNAD) bench scale process for removal of ammonia from effluent of a fertilizer industry. **Bioresource Technology** 130 (2013) 390–397.

KOOPS, H-P.; POMMERENING-RÖSER, A. **The lithoautotrophic ammonia-oxidizing bacteria**. p.778–811. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.; STACKEBRANDT, E. *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria*. Volume 2: Ecophysiology and Biochemistry, 3^a edição, 2006.

LAN, C.; KUMAR, M.; WANG, C.; LIN, J. Development of simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification (SNAD) process in a sequential batch reactor. **Bioresource Technology** 102 (2011) 5514–5519.

LAANBROEK, H. J.; GERARDS, S. Competition for limiting amounts of oxygen between *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradskyi* grown in mixed continuous cultures. **Archives of Microbiology**. 1993, 159 (5), 453–459.

LIM, J.; DO, H.; SHIN, S. G.; HWANG, S. Primer and probe sets for group-specific quantification of the genera *Nitrosomonas* and *Nitrosospira* using real-time PCR. **Biotechnology and Bioengineering**. 99, 1374–1383, 2008.

MATEJU, V.; CIZINSKA, S.; KREJCI, J.; JANOCH, T. Biological water denitrification – a review. **Enzyme and Microbial Technology**. 14(3), 170 –183. 1992.

METCALF; EDDY. Inc. **Wastewater Engineering treatment Disposal Reuse**. 4. ed. New York, McGraw - Hill Book, 1815p. 2003.

MOBARRY, B. K.; WAGNER, M.; URBAIN, V.; RITTMANN, B. E.; STAHL, D. A. Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. 62, 2156-2162, 1996.

MORAIS, J. C. **Remoção de matéria orgânica e nitrogênio em reator compartimentado anaeróbio/anóxico e aeróbio tratando esgoto doméstico**. Tese de doutorado, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), 2015.

MULDER, A.; VAN DE GRAAF, A. A.; ROBERTSON, L. A.; KUENEN, J.G. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. **FEMS Microbiology Ecology**. 16(3):177-184. 1995.

NI, S-Q.; ZHANG, J. Anaerobic Ammonium Oxidation: From Laboratory to Full-Scale Application. **BioMed Research International**. Artigo ID 469360 DOI 10.1155/2013/469360. 2013.

NITTAMI, T., KURISU, F., SATOH, H., MINO, T. Analysis of the populations of denitrifying bacteria in activated sludge by PCR-DGGE analysis of the nirS nitrite reductase genes. **Journal of Japan Society on Water Environmental**. 26, 583-588, 2003.

O'REILLY, E.; RODGERS, M.; ZHAN, X. M. Pumped flow biofilm reactors (PFBR) for treating municipal wastewater. **Water Science & Technology**. 57.12. 2008.

PAREDES, D.; KUSCHK, P.; MBWETTE, T. S. A.; STANGE, F.; MÜLLER, R. A.; KÖSER, H. New Aspects of Microbial Nitrogen Transformations in the Context of Wastewater Treatment – A Review. **Engineering in Life Sciences**. 2007, 7, No. 1, 13–25.

PHILIPS, A. M. L. Utilização de reator de biodiscos para tratamento de efluentes com altas concentrações de nitrogênio. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Florianópolis, 2008.

RAJAGOPAL, R.; MASSÉ, D. I.; SINGH, G. A critical review on inhibition of anaerobic digestion process by excess ammonia. **Bioresource Technology** 143 (2013) 632–641.

RUIZ, G.; JEISON, D.; CHAMY, R. Nitrification with high nitrite accumulation for the treatment of wastewater with high ammonia concentration. **Water Research**. 37, 1371–1377. 2003.

SCHMID, M., SCHMITZ-ESSER, S., JETTEN, M., WAGNER, M. 16S-23S rDNA intergenic spacer and 23S rDNA of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: implications for phylogeny and in situ detection. **Environmental Microbiology**. 3 (7), 450-459, 2001.

SCHMID, M., WALSH, R., WEBB, R., RIJPSTRA, W. I. C., VAN de PASSCHOONEN, K., VERBRUGGEN, M. J., HILL, T., MOFFETT, B., FUERST, J., SCHOUTEN, S., DAMSTE, J. S. S., HARRIS, J., SHAW, P., JETTEM, E., STROUS, M. *Candidatus "Scalindua brodae"*, sp nov., *Candidatus "Scalindua wagneri"*, sp

nov., two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. **System Applied Microbiology**. 26, 529- 538, 2003.

SCHMIDT, I.; BOCK, E. Anaerobic ammonia oxidation with nitrogen dioxide by *Nitrosomonas europaea*. **Archives Microbiology** (1997) 167 : 106–111.

SCHINDLER, D. W. ORIHEL, D. M., CARPENTER, S. R., CHAPRA, S. C., HECKY, R. E. Reducing Phosphorus to Curb Lake Eutrophication is a Success. **Environmental Science and Technology**. 2016, 50, 8923–8929.

SINHA, B.; ANNACHATRE, A. P. Partial nitrification—operational parameters and microorganisms involved. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**. (2007) 6:285–313.

SOUZA, J. T.; FORESTI, E. Domestic sewage treatment in a upflow anaerobic sludge blanket - sequencing batch reactor system. **Water Science and Technology**. Vol. 33. No.3. pp. 73-84, 1996.

SOZEN, S.; ÇOKGOR E. U.; ORHON D.; HENZE, M. Respirometric analysis of activated sludge behaviour-II. Heterotrophic growth under aerobic and anoxic conditions. **Water Research**. Vol. 32, Nº 2, p.476–488, 1998.

SPINOLA, A. L. G. **Biofilmes aeróbios para remoção de nitrogênio em células de fluxo, submetidos a diferentes velocidades superficiais e taxas de carregamento**. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, 2009.

STEIN, L. Y.; KLOTZ, M. G. Nitrifying and denitrifying pathways of methanotrophic bacteria. **Biochemical Society Transactions** (2011) Volume 39, part 6.

TURK, O.; MAVINIC, D.S. Preliminary assessment of a shortcut in nitrogen removal from wastewater. **Canadian Journal of Civil Engineering**. 1986. Eng. 13 (6), 600–605.

TURK, O.; MAVINIC, D.S. Maintaining nitrite buildup in a system acclimated to free ammonia. **Water Research**. 23 (1989) 1383–1388.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). 1991. Aquatic Life Ambient Water Quality Criteria For Ammonia – Freshwater. EPA-822-R-13-001. Office of Science and Technology. Washington, DC.

VAN HAANDEL, A. C., MARAIS, G. V. R. **O Comportamento do Sistema de Lodo Ativado: teoria e aplicações para projetos e operações**. Campina Grande. 472 p. 1999.

VILLAVERDE, S.; FDZ-POLANCO, F.; GARCIA, P. A. Nitrifying biofilm acclimation to free ammonia in submerged biofilters. Start-up influence. **Water Research**. 2000;34:602–10.

WANG, L.; ZENG, G.; YANG, Z.; LUO, L.; XU, H.; HUANG, J. Operation of partial nitrification to nitrite of landfill leachate and its performance with respect to different oxygen conditions. **Biochemical Engineering Journal** 87 (2014) 62–68.

WANG, L.; ZHENG, P.; ABBAS, G.; YANG, J.; XING, Y.; LI, W.; WANG, R.; DENG, L.; ZHENG, D. A start-up strategy for high-rate partial nitrification based on DO-HRT control. **Process Biochemistry**. 51 (2016) 95–104.

WEI, D.; XUE, X.; YAN, L.; SUN, M.; ZHANG, G.; SHI, L.; DU, B. Effect of influent ammonium concentration on the shift of full nitrification to partial nitrification in a sequencing batch reactor at ambient. **Chemical Engineering Journal** 235 (2014) 19–26.

WIESMANN, U. **Biological nitrogen removal from wastewater**. Advances in Biochemical Engineering Biotechnology. v.51, p.113–154, 1994.

WOSIACK, P. A.; LOPES, D. D.; DAMIANOVIC M. H. R. Z.; FORESTI, E.; GRANATO, D.; BARANA, A. C. Removal of COD and nitrogen from animal food plant wastewater in an intermittently-aerated structured-bed reactor. **Journal of Environmental Management**. 154 (2015) 145-150.

YANG, J.; ZHANG, L. DAISUKE, H.; TAKAHIRO, S.; MA, Y.; LI, Z.; FURUKAWA, K. High rate partial nitrification treatment of reject wastewater. **Journal of Bioscience and Bioengineering** vol. 110 N. 4, 436– 440, 2010.

YU, R.; CHANDRAN, K. Strategies of *Nitrosomonas europaea* 19718 to counter low dissolved oxygen and high nitrite concentrations. **BMC Microbiology** 2010, 10:70. 1471-2180/10/70.

ZHANG, L.; YANG, J.; HIRA, D.; FUJII, T.; FURUKAWA, K. High-rate partial nitrification treatment of reject water as a pretreatment for anaerobic ammonium oxidation (Anammox). **Bioresource Technology**. 102 (2011) 3761–3767.

ZHU, G.; PENG, Y.; LI, B.; GUO, J.; YANG, Q.; WANG, S. Biological removal of nitrogen from wastewater. **Reviews Environmental Contamination & Toxicology**, v.192, p.159-195, 2008.