



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

MARCUS VINÍCIUS ALVES DOS SANTOS

**REMOÇÃO DE MATÉRIA ORGÂNICA E NITROGÊNIO EM ESGOTO  
DOMÉSTICO DILUÍDO: desempenho e dinâmica da comunidade microbiana  
em reatores sequenciais anaeróbio-aeróbio**

Recife

2020

MARCUS VINÍCIUS ALVES DOS SANTOS

**REMOÇÃO DE MATÉRIA ORGÂNICA E NITROGÊNIO EM ESGOTO  
DOMÉSTICO DILUÍDO: desempenho e dinâmica da comunidade microbiana  
em reatores sequenciais anaeróbio-aeróbio**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Civil.

Área de concentração: Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos.

Orientador: Prof. Dr. Mario Takayuki Kato.  
Coorientador: Prof. Dr. Wanderli Rogério Moreira Leite.

Recife

2020

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

S237r

Santos, Marcus Vinícius Alves dos.

Remoção de matéria orgânica e nitrogênio em esgoto doméstico diluído: desempenho e dinâmica da comunidade microbiana em reatores sequenciais anaeróbio-aeróbio / Marcus Vinícius Alves dos Santos. - 2020.

172 folhas, il., gráfs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Mario Takayuki Kato.

Coorientador: Prof. Dr. Wanderli Rogério Moreira Leite.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, 2020.

Inclui Referências e Apêndices.

1. Engenharia Civil. 2. Acúmulo de nitrito. 3. Análise de componentes principais. 4. Nitrificação. 5. Desnitrificação. 6. Sequenciamento massivo. I. Kato, Mario Takayuki (Orientador). II. Leite, Wanderli Rogério Moreira (Coorientador). III. Título.

UFPE

624 CDD (22. ed.)

BCTG/2021-37

MARCUS VINÍCIUS ALVES DOS SANTOS

**REMOÇÃO DE MATÉRIA ORGÂNICA E NITROGÊNIO EM ESGOTO  
DOMÉSTICO DILUÍDO: desempenho e dinâmica da comunidade microbiana  
em reatores sequenciais anaeróbio-aeróbio**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Civil.

Aprovada em: 23/10/2020.

**BANCA EXAMINADORA**

Participação por vídeo conferência  
Prof. Dr. Mario Takayuki Kato (Orientador)  
Universidade Federal de Pernambuco

Participação por vídeo conferência  
Prof. Dr. Wanderli Rogério Moreira Leite (Coorientador)  
Universidade Federal de Pernambuco

Participação por vídeo conferência  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Nélia Henriques Callado (Examinadora Externa)  
Universidade Federal de Alagoas

Participação por vídeo conferência  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Juliana Cardoso de Moraes (Examinadora Externa)  
Instituto Federal de Pernambuco

Participação por vídeo conferência  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Kenia Kelly Barros da Silva (Examinadora Externa)  
Universidade Federal de Pernambuco

Participação por vídeo conferência  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Shyrlane Torres Soares Veras (Examinadora Externa)  
Universidade Federal de Pernambuco

A minha família e a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

À Deus por toda fé e resiliência vital para galgar meus objetivos nesse ciclo.

Aos meus pais, Marcos Antônio dos Santos e Nadja Alves dos Santos, por serem minha base; bem como, demonstrar à importância da harmonia familiar, o caráter, à educação e o respeito pelo próximo.

A minha querida e amada esposa Helena Albuquerque, por ser um dos meus pilares e presente nesta vitória e de muitas outras que não de vir.

Ao meu orientador professor Mario Kato, pela amizade, por sempre acreditar no meu potencial e instigar-me a buscar os bons resultados nessa pesquisa.

As professoras Lourdinha Florêncio e Sávvia Gavazza, pelos ensinamentos e ajuda; principalmente nos debates das apresentações das reuniões semanais.

Ao professor Wanderli Leite, pela amizade, ajuda e dedicação para a realização deste trabalho.

Aos técnicos e amigos Danúbia Freitas e Iago José e Ronaldo Fonseca, que sempre foram ágeis e disponíveis, quando eu precisei de equipamentos e necessidades no laboratório.

A todos os membros do Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA), em especial: Alynne Soares, Amanda Leal, Antônio Gustavo, Bárbara Karoline, Bárbara Moraes, Edécio Souza, Edjailson Celestino, Elissandra Nascimento, Erivaldo Lobo, Fernanda Magalhães, Gabriela Valones, Henrique Cesar, Idayana Marinho, José Roberto, Jucélia Ferreira, Juliana Moraes, Juliana Mello, Larissa Martins, Luiz Silva, Marcos Sales, Marcos Ribeiro, Marília Marques, Nathaly Cordeiro, Natanna Melo, Oucillane Ingrett, Poliana Januário, Robson Silva, Rhayssa Brito, Sandra Meirelles, Shyrlane Veras, Silvia Mariana e Talita Tavares nas trocas de conhecimentos e amizade.

Aos alunos de iniciação científica, Breno Fonseca, Luana Prado, Talita Moura. Por toda dedicação, disponibilidade e por todos os bons momentos.

Ao amigo Edmilson, operador da ETE Mangueira. Agradeço imensamente pelo auxílio prestado.

A secretária do Grupo de Saneamento Ambiental Tamyls Sandrelle, pela agilidade com as questões financeiras, e a Andrea Negromonte, secretária do grupo de Pós-Graduação em Engenharia Civil. Obrigado por “quebrar os galhos” com tanto bom humor.

Agradeço de coração à “família LSA”, um lugar ótimo de trabalhar. Obrigado por ser parte de minha jornada.

Aos órgãos de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa para realização da pesquisa, à Fundação de Apoio ao Desenvolvimento da UFPE (FADE), e ao PRONEX pela concessão de recursos para realização das viagens a campo.

A COMPESA e BRK Ambiental por autorizar a realização dos estudos na ETE Mangueira.

## RESUMO

A remoção de matéria orgânica e nitrogênio de esgoto doméstico diluído foi avaliada em dois experimentos com reatores sequenciais. No experimento A, com esgoto doméstico real, foram utilizados dois reatores híbridos, um anaeróbio (RHAN) e outro aeróbio (RHAE). O RHAN era formado por uma câmara tipo UASB sobreposta por outra de filtro anaeróbio, enquanto o RHAE tinha uma câmara de lodo ativado sobreposta por outra de biofilme aerado submerso. A operação foi dividida em cinco fases (Ia a Ie), com razões de recirculação de 0,5 a 1,5 e duração de 500 dias. Para a remoção do nitrogênio, o RHAE foi operado com oxigênio dissolvido (OD) de 3,0 mg.L<sup>-1</sup>. A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) foi empregada tanto para o lodo suspenso das câmaras inferiores, como para o biofilme aderido nas câmaras superiores, para confirmar a presença de bactérias desnitrificantes e nitrificantes. As maiores eficiências de remoção em termos de demanda química de oxigênio (DQO) e nitrogênio total (N-NT) foram obtidas em Id, sendo 85% e 70%, respectivamente; as concentrações no efluente foram 40 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> e 10 mg N-NT.L<sup>-1</sup>. A presença de bactérias desnitrificantes, oxidantes de amônia e nitrito no biofilme aderido do RHAE, foi confirmada, sugerindo a possibilidade do processo de nitrificação e desnitrificação simultânea (NDS). No experimento B, a remoção de matéria orgânica e nitrogênio foi avaliada em esgoto doméstico sintético, usando um sistema composto também por dois reatores sequenciais: um anaeróbio (RAN) com lodo suspenso e outro aeróbio (RAE) com lodo suspenso e aderido em espumas de poliuretano. A remoção de nitrogênio consistiu na operação do RAE em baixas concentrações de OD (1,5 a 3,0 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>), a fim de favorecer o processo NDS. A operação foi dividida em três fases (F) (FI a FIII), com duração de 150 dias. Em FIII, o efluente rico em nitrogênio nitrito foi recirculado do RAE para o RAN. Ensaio cinéticos foram realizados para determinar as velocidades de nitrificação e desnitrificação das biomassas presentes no RAN e RAE, na fase FIII. Alterações na comunidade microbiana foram avaliadas ao longo das fases FI a FIII por sequenciamento massivo. Na fase FIII, foram obtidos os melhores resultados para a remoção de DQO e N-NT, com percentuais de remoção próximos a 94 e 65%, respectivamente; e concentrações finais abaixo de 30 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> e 15 mg N-NT.L<sup>-1</sup>. As velocidades de nitrificação e desnitrificação via nitrito foram 10,5 e 6,8 mg N.g SSV<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, respectivamente. A análise de sequenciamento massivo confirmou a presença de uma comunidade mixotrófica.

Palavras-chave: Acúmulo de nitrito. Análise de componentes principais. Nitrificação. Desnitrificação. Sequenciamento massivo.

## ABSTRACT

The removal of organic matter and nitrogen from diluted domestic sewage was evaluate in two experiments with sequential reactors. In experiment A, with real domestic sewage, two hybrid reactors were use, an anaerobic (ANHR) and the other aerobic (AEHR). The ANHR was forme by a UASB-type chamber overlaid by another with anaerobic filter, while the AEHR had an activated sludge chamber overlaid by another of submerged aerated biofilm. The operation was divided into five phases (Ia to Ie), with recirculation ratios of 0.5 to 1.5 and duration of 500 days. For nitrogen removal, AEHR was operate with dissolved oxygen (DO) of 3.0 mg.L<sup>-1</sup>. The polymerase chain reaction (PCR) technique was use both for the sludge suspended from the lower chambers and for the biofilm adhered to the upper chambers, to confirm the presence of denitrifying and nitrifying microorganism. The highest removal efficiencies in terms of chemical oxygen demand (COD) and total nitrogen (TN-N) were obtained in Id, being 85% and 70%, respectively; the concentration in the effluent were 42 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> and 10 mg TN-N.L<sup>-1</sup>. The presence of denitrifying bacteria, ammonia oxidants and nitrite oxidants in the adhered biofilm of AEHR, was confirm, suggesting the possibility of the simultaneous nitrification and denitrification (SND) process. In experiment B, the removal of organic matter and nitrogen was evaluate in synthetic domestic sewage, using a system also composed of two sequential reactors: an anaerobic (ANR) with suspended sludge and another aerobic (AER) with suspended sludge and adhered in polyurethane foams. The nitrogen removal consisted of the operation of the AER in low concentrations of OD (1.5 to 3.0 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>), in order to favor the NDS process. The operation was divided into three phases (F) (FI to FIII), lasting 150 days. In FIII, the nitrogen-rich nitrite effluent was recirculate from the AER to the RAN. Kinetic tests were perform to determine the rates of nitrification and denitrification of the biomass present in the ANR and AER, in phase FIII. Changes in the microbial community were assess throughout the FI to FIII phases by massive sequencing. In phase FIII, the best results were obtain for the removal of COD and TN-N, with removal efficiencies close to 94% and 65%, respectively. In these conditions, final concentrations below 30 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> and 15 mg TN-N.L<sup>-1</sup> were verify. The nitrification and denitrification rates were 10.5 and 6.8 mg N.g VSS<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, respectively. The massive sequencing analysis confirmed the presence of a mixotrophic community.

Keywords: Nitrite accumulation. Principal component analysis. Nitrification. Denitrification. Massive sequencing.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Representação esquemática do ciclo de nitrogênio em sistemas de tratamento biológico de esgoto.....	23
Figura 2 –	Transformação do nitrogênio no tratamento biológico de esgotos .....	27
Figura 3 –	Esquema da inibição do nitrato no processo de nitrificação parcial .....	34
Figura 4 –	Variáveis ambientais que moldam a formação de biofilme .....	51
Figura 5 –	Representação esquemática dos reatores híbridos, anaeróbio (RHAN: UASB + FAN) e aeróbio (RHAE: LA + BAS) .....	57
Figura 6 –	Protocolo de amplificação para primers universais (A) e específicos (B) .....	61
Figura 7 –	Representação esquemática dos reatores sequenciais anaeróbio-aeróbio, em escala de bancada.....	65
Figura 8 –	Esquema dos reatores em batelada (frascos de Duran® 500 mL) utilizado nos ensaios cinéticos de nitrificação e desnitrificação.....	67
Figura 9 –	Concentração de DQO bruta e filtrada no afluente do sistema durante o período do estudo .....	73
Figura 10 –	Concentração de N-NTK, N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> e N-N <sub>ORG</sub> no afluente do sistema durante o período do estudo.....	73
Figura 11 –	Concentração de sólidos totais, fixos e voláteis no afluente do sistema durante o período do estudo.....	74
Figura 12 –	Concentração de sólidos suspensos, fixos e voláteis no afluente do sistema durante o período do estudo.....	75
Figura 13 –	Concentração de alcalinidade parcial (ALCP) e alcalinidade total (ALCT) afluente do sistema durante o período do estudo.....	75
Figura 14 –	Concentração afluente do sistema para a variável DQO bruta no perfil temporal do período chuvoso e seco.....	77
Figura 15 –	Concentração afluente do sistema para a variável DQO filtrada no perfil temporal do período chuvoso e seco .....	77
Figura 16 –	Concentração afluente do sistema para a variável N-NTK no perfil temporal do período chuvoso e seco .....	78
Figura 17 –	Concentração afluente do sistema para a variável N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> no perfil temporal do período chuvoso e seco .....	78

Figura 18 –	Concentração afluyente do sistema para a variável alcalinidade parcial no perfil temporal do período chuvoso e seco.....	79
Figura 19 –	Concentração afluyente do sistema para a variável alcalinidade total no perfil temporal do período chuvoso e seco.....	80
Figura 20 –	Eficiência de remoção de DQO no RHAN nas fases operacionais estudadas sendo br/br a eficiência com base na DQO afluyente e efluente bruta do RHAN e br/fil, a eficiência com base na DQO bruta afluyente e DQO filtrada efluente do RHAN.....	81
Figura 21 –	Concentrações obtidas no afluyente - P1 (○), efluente do FAN - P3 (□), efluente do BAS - P5 (△) durante a fase Ia (RR=0,50), fase Ib (RR=0,75), fase Ic (RR=1,00), fase Id (RR=1,25) e fase Ie (RR=1,50): A) DQO e B) SSV.....	86
Figura 22 –	Concentrações obtidas no afluyente - P1 (○), efluente do FAN - P3 (□), efluente do BAS - P5 (△) durante a fase Ia (RR=0,50), fase Ib (RR=0,75), fase Ic (RR=1,00), fase Id (RR=1,25) e fase Ie (RR=1,50): A) N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (N-NTK em P1a (◆)) e B) N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> .....	90
Figura 23 –	Balanço das formas de nitrogênio (%) no afluyente do sistema e efluentes do RHAN (A) e RHAE (B) nas fases estudadas dos reatores híbridos .....	92
Figura 24 –	Gráfico bidimensional para as projeções dos pesos (loadings) (A) e gráfico dos casos (cases) (B) da CP1 versus variáveis da CP2 no efluente do BAS .....	96
Figura 25 –	PCR para bactérias desnitrificantes nas fases: Ia (RR = 0,50), Ib (RR = 0,75), Ic (RR= 1,00), Id (RR = 1,25) e Ie (RR = 1,50) .....	98
Figura 26 –	PCR para bactérias oxidantes de amônia nas fases: Ia (RR = 0,50), Ib (RR = 0,75), Ic (RR= 1,00), Id (RR = 1,25) e Ie (RR = 1,50) .....	100
Figura 27 –	PCR para Nitrospira nas fases: Ia (RR = 0,50), Ib (RR = 0,75), Ic (RR= 1,00), Id (RR = 1,25) e Ie (RR = 1,50) .....	102
Figura 28 –	PCR para arqueia nas fases: Ia (RR = 0,50), Ib (RR = 0,75), Ic (RR= 1,00), Id (RR = 1,25) e Ie (RR = 1,50) .....	104
Figura 29 –	Diversidade de bandas no gel de DGGE para o domínio <i>Bacteria</i> em RR de 0,5 a 1,5. Gel de acrilamida (AA) 8% e gradiente desnaturante ureia e formaminda (UF) 40% - 60% .....	106

Figura 30 –	Análise de <i>Clustering</i> dos padrões de bandas da DGGE para o domínio <i>Bacteria</i> . Medida de distância: índice de <i>Jaccard</i> ; agrupamento de algoritmo: UPGM. Coeficiente de correlação cofenética: 1,00 .....	106
Figura 31 –	Diversidade de bandas no gel de DGGE para o domínio <i>Archaea</i> em RR de 0,5 a 1,5. Gel de acrilamida (AA) 8% e gradiente desnaturante ureia e formamida (UF) 40% - 60% .....	107
Figura 32 –	Análise de <i>Clustering</i> dos padrões de bandas da DGGE para o domínio <i>Archaea</i> . Medida de distância: índice de <i>Jaccard</i> ; agrupamento de algoritmo: UPGM. Coeficiente de correlação cofenética: 1,00 .....	108
Figura 33 –	Concentrações obtidas no afluente - P1 (○), efluente do RAN – P2 (□), efluente do RAE – P3 (▲) durante a fase FI (3,0 mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> e RR = 0,0), fase FII (1,5 mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> e RR = 0,0) e fase FIII (1,5 mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> e RR = 0,25). DQO (A) e SSV (B) .....	112
Figura 34 –	Desempenho do sistema de tratamento nas três fases experimentais FI (3,0 mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> e RR = 0,0), FII (1,5 mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> e RR = 0,0) e FIII (1,5 mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> e RR = 0,25). Concentrações de N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (A), nitrogênio efluente do RAE (B) e razão de acúmulo de nitrito.....	118
Figura 35 –	Balanço das formas de nitrogênio (%) no afluente do sistema e efluentes do RAN (A) e RAE (B) nas fases estudadas dos reatores sequenciais anaeróbio-aeróbio.....	119
Figura 36 –	PCRs para desnitrificantes (A), BOA (B) e bactérias Anammox (C) nas amostras Lsu FI e Lad FI (FI), Lsu FII e Lad FII (FII) e Lsu FIII e Lad FIII (FIII). Legenda: Lsu = lodo suspenso e Lad = Lodo aderido, pb (pares de base) e CN (controle negativo) .....	122
Figura 37 –	Perfil de bandas para o domínio <i>Bacteria</i> nos lodos suspensos (Lsu) e aderidos (Lad) em FI, FII e FIII pela ferramenta da DGGE (A). O dendograma da análise de <i>Clustering</i> . Medida de distância: <i>Jaccard</i> index; algoritmo: UPGMA, coeficiente de correlação cofenética: 1,0 (B) .....	123
Figura 38 –	Curvas de rarefação das amostras de lodo suspenso e aderido durante as fases FI, FII e FIII.....	124
Figura 39 –	Índices de alfa diversidade de Simpson Lsu = ponto de coleta do lodo suspenso do RAN. Lad = ponto de coleta do lodo aderido do RAE.....	127

Figura 40 –	Composição taxonômica da comunidade microbiana revelada em nível de filo (A) e gênero (B).....	128
Figura 41 –	Variação da concentração de $N-NH_4^+$ (▲), $N-NO_2^-$ (▲), $N-NO_3^-$ (▲) no perfil temporal do ensaio de nitrificação via $N-NH_4^+$ (A), nitrificação via $N-NO_2^-$ (B), desnitrificação via $N-NO_3^-$ (C). Modelo de ordem zero ajustado para nitrificação via $N-NH_4^+$ (D), nitrificação via $N-NO_2^-$ (E), desnitrificação via $N-NO_3^-$ (F) . Dados experimentais (■ e ○) .....	134
Figura 42 –	Análise das componentes principais. Gráfico bidimensional para as projeções dos pesos (A). Gráfico dos casos da CP1 versus variáveis da CP2 no efluente do RAE (B). Legenda: período transiente da fase FI (partida, dados 1 a 4), fase FII (ajuste na concentração de OD, dados 16, 17, 18 e 19) e fase FIII (ajuste na razão de recirculação, dados 31, 32, 33 e 34). Período estacionário da fase FI (dados 5 a 15), fase FII (dados 20 a 30) e fase FIII (dados 35 a 45) .....	138

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Diretrizes da classe do corpo receptor em função das formas nitrogenadas.....	25
Tabela 2 –	Efeito de algumas variáveis (amônia livre, pH e temperatura) no crescimento e atividade das bactérias nitrificantes.....	30
Tabela 3 –	Efeito da concentração de oxigênio dissolvido no processo de nitrificação.....	31
Tabela 4 –	Efeito de algumas variáveis (pH, OD, temperatura, relação DQO/N) no crescimento e atividade das bactérias desnitrificantes.....	33
Tabela 5 –	Comparação do desempenho de diversos sistemas de remoção de carbono e nitrogênio operados pela via NDS.....	39
Tabela 6 –	Efeito de algumas variáveis (pH, OD, temperatura, relação DQO/N, TRS) no crescimento e atividade das bactérias Anammox.....	41
Tabela 7 –	Condições operacionais aplicadas no sistema de tratamento com reatores híbridos com lodo suspenso e aderido durante o período experimental ....	58
Tabela 8 –	Insumos utilizados na ferramenta da Reação em Cadeia Polimerase (PCR) .....	60
Tabela 9 –	Planejamento para a Reação em Cadeia Polimerase (PCR) para Domínio <i>Bacteria</i> . X1 foi o volume por reação para 1 amostra e X5 foi o volume por reação para 4 amostras + 1 amostra (Controle Negativo – sem DNA) .....	61
Tabela 10 –	<i>Primers</i> utilizados para a Reação em Cadeia Polimerase (PCR) .....	62
Tabela 11 –	Condições para a formação do gradiente para a eletroforese em gel de gradiente desnaturante .....	62
Tabela 12 –	Referência dos equipamentos utilizados na PCR e DGGE .....	63
Tabela 13 –	Condições operacionais aplicadas no sistema de tratamento com reatores anaeróbio (lodo suspenso) e aeróbio (lodo suspenso e aderido) sequenciais durante o período experimental .....	65
Tabela 14 –	Valores mínimos, médios e máximos obtidos na caracterização de esgoto bruto do sistema de tratamento .....	72
Tabela 15 –	Valores médios das análises físico-químicas nas fases Ia a Ie durante o período experimental (500 dias) para as amostras nos pontos de coleta	

	P2 a P3 (efluente do reator híbrido anaeróbio - RHAN) .....	82
Tabela 16 –	Valores médios das análises físico-químicas nas fases Ia a Ie durante o período experimental (500 dias) para as amostras nos pontos de coleta P4 a P5 (efluente do reator híbrido aeróbio - RHAE) .....	83
Tabela 17 –	Pesos obtidos na modelagem do efluente do BAS .....	93
Tabela 18 –	Valores médios das análises físico-químicas nas fases FI, FII e FIII durante o período experimental (150 dias) para as amostras nos pontos de coletas P1a (afluente ao RAN), P1m (ponto da mistura), P2 (efluente do RAN) e P3 (efluente do RAE) .....	109
Tabela 19 –	Resultados das correlações por ACP entre as 9 variáveis estudadas para o desempenho do sistema de tratamento (efluente do RAE): DQO, N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , OD, pH, ALCP, TEMP e SSV nas fases FI, FII e FIII .....	110
Tabela 20 –	Carga orgânica e nitrogenada diária aplicada nos reatores sequenciais anaeróbio-aeróbio nas fases FI e FII FIII e carga remanescente no efluente final (calculadas com base nas concentrações afluentes em P1a a P3) .....	120
Tabela 21 –	Índices de alfa diversidade de filotipos de micro-organismos.....	124
Tabela 22 –	Micro-organismos chave na remoção de matéria orgânica e nitrogênio em nível de filo e gênero.....	129
Tabela 23 –	Velocidades de nitrificação via N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> e via N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> em sistemas de remoção de nitrogênio.....	131
Tabela 24 –	Velocidades de desnitrificação via N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> e via N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> em sistemas de remoção de nitrogênio.....	133
Tabela 25 –	Pesos obtidos na modelagem do efluente do RAE.....	135

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Acrilamida
ALCP	Alcalinidade parcial
AMO	Ammonia monooxygenase
ALCT	Alcalinidade total
BAS	Biofiltro aerado submerso
BOA	Bactéria oxidante de amônia
BON	Bactéria oxidante de nitrito
CNA	Carga nitrogenada aplicada
CO	Carga orgânica
COV	Carga orgânica volumétrica
DGGE	Eletroforese em gel de gradiente desnaturante
DQO	Demanda química de oxigênio bruta
DQOF	Demanda química de oxigênio filtrada
FAN	Filtro anaeróbio
HAO	Hydroxylamine dehydrogenase
LA	Lodos ativados
Lad	Lodo aderido
Lsu	Lodo suspenso
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Nitrogênio amoniacal
N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrogênio nitrito
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrogênio nitrato
NRX	Nitrite oxidoreductase
N-NT	Nitrogênio total
N-NTK	Nitrogênio total de Kjeldahl
OD	Oxigênio dissolvido
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Q <sub>REC</sub>	Vazão de recirculação
RAE	Reator aeróbio
RAN	Reator anaeróbio
RAN <sub>1</sub>	Razão de acúmulo de nitrito

RBN	Remoção biológica de nitrogênio
RHAN	Reator híbrido anaeróbio
RHAE	Reator híbrido aeróbio
RR	Razão de recirculação
ST	Sólidos totais
SST	Sólidos suspensos totais
SSV	Sólidos suspensos voláteis
TEMP	Temperatura
TFS	Tampão fosfato salino
UF	Ureia e formamida
UTO	Unidade taxonômica operacional
$V_{asc}$	Velocidade ascensional

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	<b>20</b>
<b>2.OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
2.1 GERAL.....	22
2.2 ESPECÍFICOS .....	22
<b>3.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>23</b>
3.1 NITROGÊNIO NAS ÁGUAS RESIDUÁRIAS .....	23
<b>3.1.1. Legislação brasileira - padrões de lançamento de efluentes</b> .....	<b>24</b>
3.2.FORMAS DE REMOÇÃO DE NITROGÊNIO .....	26
<b>3.2.1.Processo convencional de remoção de nitrogênio</b> .....	<b>26</b>
Nitrificação convencional.....	27
<i>Variáveis importantes no processo de nitrificação</i> .....	28
Desnitrificação convencional .....	31
<i>Variáveis importantes no processo de desnitrificação</i> .....	32
<b>3.2.2.Novas rotas alternativas de remoção biológica de nitrogênio</b> .....	<b>33</b>
Nitrificação parcial .....	34
Nitrificação e desnitrificação simultânea (NDS).....	36
Oxidação anaeróbia da amônia (Anammox) .....	40
Completa oxidação da amônia por um único micro-organismo (Comammox) .....	44
3.3.REATORES HÍBRIDOS COM LODO SUSPENSO E ADERIDO NA REMOÇÃO DE MATÉRIA ORGÂNICA E NITROGÊNIO .....	45
3.4.BIOFILME .....	50
3.5.FERRAMENTAS DE BIOLOGIA MOLECULAR UTILIZADAS EM BIOMASSA SUSPensa E ADERIDA EM REATORES HÍBRIDOS .....	52
<b>4.MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>56</b>
4.1.REATORES HÍBRIDOS ANAERÓBIO-AERÓBIO COM LODO SUSPENSO E ADERIDO (EXPERIMENTO A).....	56
<b>4.1.1.Descrição e operação dos reatores híbridos</b> .....	<b>56</b>
<b>4.1.2 Monitoramento físico-químico do sistema</b> .....	<b>58</b>
<b>4.1.3 Extração de DNA e PCR-DGGE de amostras de lodo</b> .....	<b>59</b>
<b>4.1.4 Tratamentos estatístico dos dados</b> .....	<b>63</b>

4.2.REATORES SEQUENCIAIS ANAERÓBIO COM LODO SUSPENSO E AERÓBIO COM LODO ADERIDO (EXPERIMENTO B) .....	64
4.2.1.Descrição e operação dos reatores sequenciais anaeróbio com lodo suspenso e aeróbio com lodo aderido .....	64
4.2.2.Característica do esgoto sintético .....	65
4.2.3. Monitoramento físico-químico dos reatores sequenciais anaeróbio com lodo suspenso e aeróbio com lodo aderido .....	66
4.2.4.Ensaio cinético para determinar as velocidades aparentes de nitrificação e desnitrificação .....	66
4.2.4.1.Ensaio de nitrificação via $N-NH_4^+$ e $N-NO_2^-$ .....	68
4.2.4.2.Ensaio de desnitrificação via $N-NO_2^-$ e $N-NO_3^-$ .....	69
4.2.5.Extração de DNA e PCR-DGGE de amostras de lodo .....	69
4.2.6.Tratamento estatístico dos dados .....	70
<b>5.RESULTADOS</b> .....	<b>71</b>
5.1. DESEMPENHO DOS REATORES HÍBRIDOS ANAERÓBIO-AERÓBIO, EM ESCALA PILOTO (EXPERIMENTO A).....	71
5.1.2.Caracterização do esgoto bruto afluente do sistema .....	71
5.1.3.Desempenho dos reatores híbridos anaeróbio e aeróbio.....	80
5.1.4.Fatores influentes no desempenho do sistema e estudo da variabilidade dos dados	93
5.1.5.Comunidade microbiana presente no lodo suspenso e aderido.....	97
5.2.DESEMPENHO DOS REATORES SEQUENCIAIS ANAERÓBIO-AERÓBIO EM ESCALA DE BANCADA (EXPERIMENTO B) .....	108
5.2.1.Desempenho dos reatores sequenciais anaeróbio (lodo suspenso) e aeróbio (lodo aderido).....	108
5.2.2.Comunidade microbiana presente no lodo suspenso e aderido dos reatores sequenciais anaeróbio e aeróbio .....	121
5.2.3.Ensaio cinético de nitrificação e desnitrificação .....	130
5.2.4.Fatores influentes no desempenho do sistema e estudo da variabilidade dos dados	135
<b>6.CONCLUSÕES</b> .....	<b>139</b>
<b>7.RECOMENDAÇÕES</b> .....	<b>141</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>142</b>
<b>APÊNDICE A - NORMALIDADE UTILIZANDO O TESTE DE SHAPIRO-WILK PARA OS DADOS (N= 75, 15 PARA CADA FASE) DO EFLUENTE DO RHAE</b> .....	<b>157</b>

APÊNDICE B - NORMALIDADE UTILIZANDO O TESTE DE SHAPIRO-WILK PARA OS DADOS (N= 45, 15 PARA CADA FASE) DO EFLUENTE DO RAE.....	158
APÊNDICE C - TESTES ANOVA E TUKEY PARA AS VARIÁVEIS DQO, SSV, N- NO <sub>3</sub> - E N-NT DO EFLUENTE DO BAS (P5) .....	159
APÊNDICE D- BALANÇO DE MASSA DE MATÉRIA ORGÂNICA E NITROGÊNIO PARA AS FASES ESTUDADAS .....	160
APÊNDICE E - RESULTADOS DAS CORRELAÇÕES POR ACP ENTRE AS 8 VARIÁVEIS ESTUDADAS PARA O DESEMPENHO DO SISTEMA DE TRATAMENTO: DQO, N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , OD, PH, ALCP, TEMP E SSV NAS FASES IA, IB, IC, ID E IE. EM VERMELHO = CORRELAÇÕES ACIMA DE 0,5 PARA P<0,05 .....	165
APÊNDICE F - MEIO SUPORTE (CONDUÍTES) SEM BIOMASSA ADERIDA (A), BIOMASSA PRESENTE ADERIDA NO MEIO SUPORTE NA FASE IA (B); BIOMASSA ADERIDA NO MEIO SUPORTE NA FASE IB (C).....	166
APÊNDICE G – AUTOVALORES ( <i>EIGENVALUES</i> ), PROPORÇÃO DA VARIÂNCIA EXPLICADA POR COMPONENTE E ACUMULADA ENTRE AS COMPONENTES E AS VARIÁVEIS ORIGINAIS .....	167
APÊNDICE H - TESTES ANOVA E TUKEY PARA AS VARIÁVEIS DQO, SSV, N- NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> E N-NT NO EFLUENTE DO RAE (P3) .....	168
APÊNDICE I - MEIO SUPORTE (ESPUMA DE POLIURETANO) SEM BIOMASSA (SETA VERMELHA) E BIOMASSA ADERIDA PRESENTE NO MEIO SUPORTE (SETA AZUL) (A), REDE DE AÇO GALVANIZADA ANTES DA OPERAÇÃO (SETA VERMELHA) E REDE DE AÇO GALVANIZADO APÓS A OPERAÇÃO (SETA AZUL).....	169
APÊNDICE J - AUTOVALORES PROPORÇÃO DA VARIÂNCIA EXPLICADA POR COMPONENTE E ACUMULADA ENTRE OS COMPONENTES E AS VARIÁVEIS ORIGINAIS .....	170



## 1 INTRODUÇÃO

Em regiões tropicais e subtropicais, os processos anaeróbios para o tratamento de esgotos domésticos se encontram bem consolidados, em especial com o emprego de reatores do tipo *upflow anaerobic sludge blanket* (UASB). Tem sido obtida elevada eficiência de remoção de matéria orgânica (LETTINGA *et al.* 1993; BARROS *et al.* 2015; WALIA *et al.* 2020), mas como ocorre em sistemas biológicos anaeróbios ou aeróbios convencionais, a remoção de nutrientes, como nitrogênio e fósforo, é baixa (PATHAK *et al.* 2020). Frações remanescentes de matéria orgânica, nitrogênio e fósforo, causam impactos negativos ao meio ambiente, como é o caso de eutrofização em corpos aquáticos (PITTMAN *et al.* 2011; HU E REN, 2019). Para melhorar a eficiência do tratamento de esgotos e atender às regulamentações mais rigorosas, têm sido propostos sistemas alternativos de pós-tratamento (PANTOJA FILHO *et al.* 2015; ALLEGUE *et al.* 2020).

No caso da remoção de matéria orgânica e nitrogênio, têm sido aplicados sistemas combinando reatores híbridos contendo compartimentos com lodo suspenso na parte inferior e lodo aderido na parte superior; os reatores híbridos em sequência anaeróbia e aeróbia, com recirculação, favorecem a nitrificação e desnitrificação (LEYVA-DÍAZ *et al.* 2016; HOSSEINPOUR *et al.* 2019). Na parte inferior dos reatores, o lodo suspenso favorece a remoção de matéria orgânica e a desnitrificação, e a nitrificação, nos compartimentos anaeróbio e aeróbio, respectivamente; e as condições hidrodinâmicas otimizam o contato entre os substratos e os micro-organismos. Na parte superior, o meio suporte com lodo aderido favorece uma maior retenção de micro-organismos e, eventualmente, de biomassa carregada dos compartimentos inferiores; em especial das nitrificantes e desnitrificantes em suspensão, sujeitas frequentemente à perda por ocorrência de lavagem. Há, portanto, vantagens operacionais e econômicas com o uso de configuração convencional de reatores anaeróbio e aeróbio sequenciais, mas cada qual com compartimentos separados, em função do menor volume, área ocupada em planta e menor requisito de bombeamento (LEYVA-DÍAZ *et al.* 2016; GONZALEZ-TINEO *et al.* 2020).

Este sistema operado com baixa aeração ( $1,0$  a  $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) tem sido usado objetivando uma melhor eficiência da remoção do nitrogênio, através do uso do processo de nitrificação e desnitrificação simultânea (NDS) (MÜNCH *et al.* 1996; PATHAK *et al.* 2020). O processo NDS é considerado vantajoso quando comparado com processos convencionais porque (i) não há exigência de um tanque anóxico adicional em um sistema contínuo, uma vez que a

desnitrificação é proeminente também no tanque aerado, juntamente com a nitrificação; e (ii) condições de operação mais estáveis podem ser mantidas sem precisar de uma combinação complexa entre o tanque aerado e o tanque anóxico (MÜNCH *et al.* 1996; XIA *et al.* 2019). Fisicamente, a explicação é a formação de um gradiente de concentração de oxigênio no biofilme no tanque aerado (WIJFFELS E TRAMPER, 1995; MÜNCH *et al.* 1996); biologicamente, a explicação é baseada na existência de certas bactérias capazes de reduzir o nitrogênio em condições aeróbias (FENG *et al.* 2018; REN *et al.* 2020). E é interessante observar que em condições anóxicas, o gênero *Nitrosomonas* também pode oxidar amônia (SCHMIDT E BOCK, 1997; STEIN, 2019).

O Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) vem desenvolvendo pesquisas desde 1986, com estas temáticas como principais linhas de pesquisas: o tratamento biológico de esgotos domésticos, de efluentes têxteis, lodo granular aeróbio, pesquisas com micro e macroalgas e reúso. Em 2011, pesquisas com reatores híbridos com lodo suspenso e aderido foram iniciadas em escala de bancada e piloto (PIMENTA 2011; SILVA, 2012 (a,b); MORAIS, 2015; ARAÚJO, 2015; CELESTINO, 2017).

A presente pesquisa teve o intuito de avaliar o desempenho de remoção de matéria orgânica e nitrogênio utilizando reatores híbridos sequenciais anaeróbio-aeróbio sob diferentes condições operacionais (concentração de oxigênio dissolvido e razão de recirculação). O reator anaeróbio foi a principal unidade para a remoção de matéria orgânica (vantagens: menor produção de lodo e baixo consumo de energia). O reator aeróbio teve a finalidade de remover a matéria orgânica remanescente e promover a nitrificação convencional (experimento A) e parcial (experimento B) em esgoto doméstico diluído. Bem como, avaliar a comunidade microbiana por ferramentas de biologia molecular.

## 2.OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

O objetivo geral dessa pesquisa foi avaliar (i) o desempenho de dois reatores híbridos uma anaeróbio (RHAN) e outro aeróbio (RHAE) de fluxo contínuo e escala piloto, sob diferentes condições operacionais (razão de recirculação), na remoção de matéria orgânica remanescente e promover a nitrificação convencional (experimento A); e no experimento B (ii), foi utilizado dois reatores sequenciais um anaeróbio (RAN) e outro aeróbio (RAE), em escala de bancada, no intuito de promover o processo de nitrificação parcial e avaliar a comunidade microbiana a partir de ferramentas de biologia molecular.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- a) Estabelecer a melhor condição operacional dos conjuntos híbridos na remoção de DQO e N-NT, por meio da variação da taxa de recirculação (experimento A);
- b) Avaliar a influência da concentração do oxigênio dissolvido no acúmulo de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (experimento A) e N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (experimento B);
- c) Estabelecer quais variáveis foram as mais significativas no agrupamento dos dados pela análise de componentes principais (ACP) (experimento A e B);
- d) Obter os parâmetros cinéticos de nitrificação parcial e desnitrificação via nitrito do sistema após atingir as condições ótimas de operação (experimento B);
- e) Avaliar o efeito da razão de recirculação na diversidade da comunidade microbiana presente por técnicas de PCR-DGGE (experimento A);
- f) Analisar o comportamento da comunidade microbiana em relação às diferentes concentrações de oxigênio dissolvido e razão de recirculação, por técnicas de PCR-DGGE e sequenciamento massivo (experimento B).

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 NITROGÊNIO NAS ÁGUAS RESIDUÁRIAS

Nas águas residuárias domésticas, o nitrogênio apresenta-se singularmente sob a forma de nitrogênio amoniacal e nitrogênio orgânico, estando em minoria nas formas oxidadas. No ambiente, o nitrogênio é encontrado mais constantemente na forma de nitrogênio orgânico, amônia ( $\text{NH}_3$ ), amoniacal ( $\text{NH}_4^+$ ), nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e nitrogênio gasoso ( $\text{N}_2$ ).

O nitrogênio amoniacal é um dos mais importantes compostos nitrogenados em águas de superfícies por constituir um nutriente bastante assimilável por fitoplâncton, macrófitas e bactérias autotrófica, e posteriormente facilmente oxidado em ambientes aquáticos (KALDEC E KNIGHT, 1996; AHN, 2006; REN *et al.* 2020).

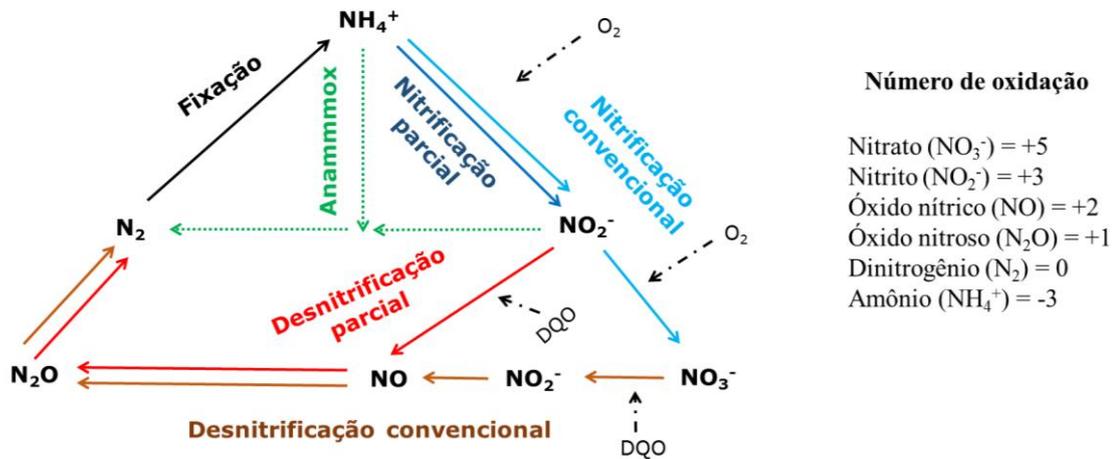
O equilíbrio amônia-amônio ( $\text{NH}_4^+ \leftrightarrow \text{NH}_3 + \text{H}^+$ ) ocorre em função do pH. Valores ácidos de pH favorecem o aumento da concentração de  $\text{H}^+$ , deslocando o equilíbrio para a esquerda com predominância do íon amônio. Valores alcalinos de pH deslocam a reação para a direita, devido à redução da concentração de  $\text{H}^+$ ; e a amônia predominante, neste caso. Metcalf e Eddy (2016) reportaram que valores de pH inferiores a 7, praticamente todo o nitrogênio amoniacal está na forma de íon amônio ( $\text{NH}_4^+$ ).

Valores de pH entre 10 e 12 (alcalinos), mais de 90% do nitrogênio amoniacal está na forma de amônia livre, a forma mais tóxica de todas as formas nitrogenadas, mesmo que em pequenas concentrações.

Do ponto de vista biológico, a amônia é extremamente tóxica restringindo a vida dos peixes, uma vez que muitas espécies não toleram concentrações acima de  $5 \text{ mg.L}^{-1}$  (CETESB, 2020). Nos processos de tratamento biológico dos esgotos, o nitrogênio orgânico é prontamente convertido pelas bactérias heterotróficas, em nitrogênio amoniacal oriundo do processo de amonificação. O nitrogênio amoniacal serviu como fonte de nitrogênio para a síntese da biomassa heterotrófica e como substrato para bactérias autotróficas nitrificantes. (PAREDES *et al.* 2007; REN *et al.* 2020).

O processo de remoção de nitrogênio em águas residuárias podem ocorrer por diversas formas. Cabello *et al.* (2004); Madigan *et al.* (2010) e Ren *et al.* (2020) mencionaram que as principais conversões entre os compostos nitrogenados, por metabolismo microbiano foram os processos de fixação, nitrificação, desnitrificação, oxidação anaeróbia de amônia via nitrito (Figura 1).

Figura 1 - Representação esquemática do ciclo de nitrogênio em sistemas de tratamento biológico de esgoto doméstico



Fonte: Adaptado de Cabello *et al.* (2004).

### 3.1.1. Legislação brasileira - padrões de lançamento de efluentes

No intuito de adequar um efluente de um sistema de tratamento de esgotos aos padrões legais para o seu lançamento é importante considerar as normas estaduais e/ou municipais. Caso o estado ou município não disponha de leis específicas, considera-se com referência a Resolução CONAMA N°430 de 13 de maio 2011 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA).

No que tange ao nitrogênio e suas variadas formas, a legislação federal vigente só dispõe de limite de emissão para o nitrogênio amoniacal, parâmetro que serve como padrão de classificação das águas naturais e de emissão de esgotos. Bem como, a amônia oxidada biologicamente resultará no consumo de oxigênio dissolvido dos corpos hídricos. A Resolução CONAMA N°430/11 fixa o valor máximo de 20 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.L<sup>-1</sup> para padrões de lançamentos de efluentes, uma vez que esta forma é tida como a mais nociva ao meio ambiente.

Os níveis de nitrito e nitrato são controlados em águas potáveis. A legislação CONAMA N°357/05 estabelece a concentração máxima de nitrito em 1,0 mg N-NO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> e nitrato em 10,0 mg N-NO<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup>, sendo a concentração de nitrogênio amoniacal é fixada de acordo com o pH (Tabela 1). O nitrito e nitrato têm implicações envolvimento na patogenicidade para os seres vivos.

Tabela 1 - Diretrizes da classe do corpo receptor em função das formas nitrogenadas

<b>Classe do corpo receptor</b>	<b>Forma Nitrogenada</b>	<b>Concentração máxima permitida (CMP)</b>
<b>Classe I - Águas doces</b>	Nitrito	1,0 mg.L <sup>-1</sup>
	Nitrato	10,0 mg.L <sup>-1</sup>
	Nitrogênio amoniacal	3,7 mg.L <sup>-1</sup> , para pH < 7,5
		2,0 mg.L <sup>-1</sup> , para 7,5 < pH < 8,0 1,0 mg.L <sup>-1</sup> , para 8,0 < pH < 8,5 0,5 mg.L <sup>-1</sup> , para pH > 8,5
<b>Classe II - Águas doces</b>	Nitrito	1,0 mg.L <sup>-1</sup>
	Nitrato	10,0 mg.L <sup>-1</sup>
	Nitrogênio amoniacal	3,7 mg.L <sup>-1</sup> , para pH < 7,5
		2,0 mg.L <sup>-1</sup> , para 7,5 < pH < 8,0 1,0 mg.L <sup>-1</sup> , para 8,0 < pH < 8,5 0,5 mg.L <sup>-1</sup> , para pH > 8,5
<b>Classe III - Águas doces</b>	Nitrito	1,0 mg.L <sup>-1</sup>
	Nitrato	10,0 mg.L <sup>-1</sup>
	Nitrogênio amoniacal	13,3 mg.L <sup>-1</sup> , para pH < 7,5
		5,6 mg.L <sup>-1</sup> , para 7,5 < pH < 8,0 2,2 mg.L <sup>-1</sup> , para 8,0 < pH < 8,5 1,0 mg.L <sup>-1</sup> , para pH > 8,5
<b>Classe IV - Águas doces</b>	Nenhuma restrição de lançamento	
<b>Classe I - Águas salinas</b>	Nitrito	0,07 mg.L <sup>-1</sup>
	Nitrato	0,40 mg.L <sup>-1</sup>
	Nitrogênio amoniacal	0,40 mg.L <sup>-1</sup>
<b>Classe II - Águas salinas</b>	Nitrito	0,20 mg.L <sup>-1</sup>
	Nitrato	0,70 mg.L <sup>-1</sup>
	Nitrogênio amoniacal	0,70 mg.L <sup>-1</sup>
<b>Classe III - Águas salinas</b>	Nenhuma restrição de lançamento	
<b>Classe I - Águas salobras</b>	Nitrito	0,07 mg.L <sup>-1</sup>
	Nitrato	0,40 mg.L <sup>-1</sup>
	Nitrogênio amoniacal	0,40 mg.L <sup>-1</sup>
<b>Classe II - Águas salobras</b>	Nitrito	0,20 mg.L <sup>-1</sup>
	Nitrato	0,70 mg.L <sup>-1</sup>
	Nitrogênio amoniacal	0,70 mg.L <sup>-1</sup>
<b>Classe III - Águas salobras</b>	Nenhuma restrição de lançamento	

Fonte: Adaptada da CONAMA N°357/05.

O nitrito pode promover graves problemas de anemia; quando incorporado no sistema sanguíneo, o íon pode combinar-se com a hemoglobina formando a metahemoglobina, uma proteína incapaz de conduzir o oxigênio no sangue com a mesma eficácia da hemoglobina. Do fenômeno, resulta a metahemoglobinemia ou conhecida popularmente por síndrome do bebê azul (RAMOS *et al.* 2006).

A Resolução N°357/05 do CONAMA, estabelece que o lançamento de efluentes em corpos hídricos deve, não só atender as condições e padrões de lançamento de efluentes; como também, respeitados padrões de qualidade da água estabelecidos para a classe, em que o corpo receptor se enquadra.

Caso um corpo de água não apresente enquadramento, a Resolução N°357/05 do CONAMA o considera de Classe 2 e recebe as atribuições desta classe. Todavia, para águas doces, algumas condições e padrões da Classe 2 são estabelecidos pela Classe 1. Por exemplo, destacando às frações nitrogenadas, o limite aceitável é de: (i) até 10,0 mg L<sup>-1</sup> para nitrato; (ii) 1,0 mg.L<sup>-1</sup> para nitrito; e entre 0,5 a 3,7 mg.L<sup>-1</sup> para nitrogênio amoniacal, conforme o pH.

Na próxima seção será apresentado o processo convencional de remoção de nitrogênio e nas subseções seguintes serão abordados processos alternativos para remoção biológica de nitrogênio, sendo estes: remoção de nitrogênio via nitrito, nitrificação e desnitrificação simultânea, Anammox, Canon, Oland, Deamox e Comammox.

## 3.2.FORMAS DE REMOÇÃO DE NITROGÊNIO

### 3.2.1.Processo convencional de remoção de nitrogênio

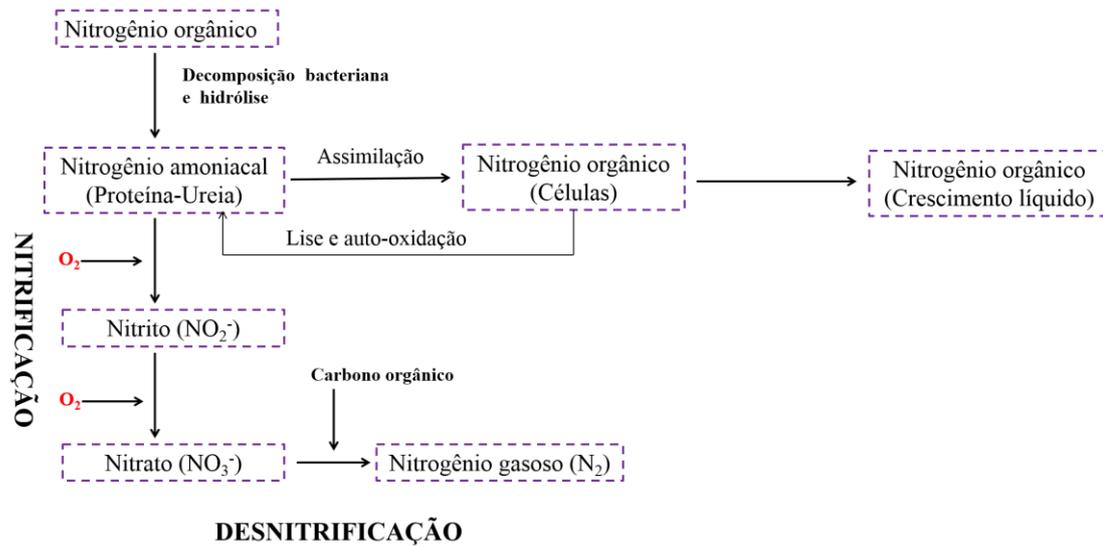
O produto final da mineralização do nitrogênio orgânica (N-N<sub>ORG</sub>), pela via anaeróbia ou aeróbia, é a amônia (NH<sub>3</sub>) e pode ser produzido por bactérias heterotróficas. Esse processo é chamado de amonificação, que ocorre pela hidrólise da ureia (CO[NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>) (Equação 1), já que tal composto é excretado pelos organismos e gerados de compostos heterocíclicos (ácidos nucleicos) (THAMDRUP E DALSGAARD, 2008)



A remoção do nitrogênio pelo sistema convencional biológico é feita por meio das etapas de nitrificação e desnitrificação, uma vez que a formação da biomassa autotrófica e heterotrófica (redução por assimilação) não é hábil para suprir totalmente o nitrogênio presente na água residuária (Figura 2).

De modo geral, na primeira etapa do processo, chamada de nitrificação, o nitrogênio amoniacal é oxidado a nitrato em condições aeróbias, no qual o oxigênio é utilizado com acceptor de elétrons na cadeia respiratória; assim, gera ATP (AHN, 2006; HOW *et al.* 2018; REN *et al.* 2020). A segunda etapa do processo, conhecida por desnitrificação, o nitrato é reduzido em nitrogênio gasoso (N<sub>2</sub>), tendo como possíveis intermediários gasosos o óxido nítrico (NO) e óxido nitroso (N<sub>2</sub>O). A desnitrificação é realizada em condições anóxicas, tendo o nitrato como receptor de elétrons (AHN, 2006; MADIGAN *et al.* 2010; LU *et al.* 2014; REN *et al.* 2020). Para facilitar o entendimento deste processo complexo, cada etapa do processo convencional de remoção de nitrogênio será explicada separadamente abaixo.

Figura 2 - Transformação do nitrogênio no tratamento biológico de esgotos



Fonte: Adaptado de Metcalf;Eddy (2016), Morais (2015).

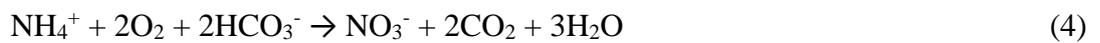
### Nitrificação convencional

Na nitrificação convencional os compostos orgânicos e inorgânicos são convertidos de um estado reduzido para um estado oxidado (HANAKI *et al.* 1990; GE *et al.*, 2015; REN *et al.* 2020). Em condições aeróbias, o íon amônio é oxidado a nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), tendo o nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) como produto intermediário, por participação de bactérias quimiolitotróficas.

O processo de nitrificação é dividido em duas etapas sequenciais. A primeira etapa é chamada de nitritação, onde ocorre a oxidação do  $\text{N-NH}_4^+$  em  $\text{N-NO}_2^-$ , atribuída a bactérias oxidantes de amônia (BOA), tal como *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrosococcus*, *Nitrosovibrio*, *Nitrosolobus*. Na segunda etapa do processo, ocorre a oxidação do  $\text{N-NO}_2^-$ , até  $\text{N-NO}_3^-$ , realizada por bactérias oxidantes de nitrito (BON), tal como *Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrospina* e *Nitrococcus*. Essa etapa é denominada nitratção (AHN, 2006; REN *et al.* 2020). As Equações 2 e 3 representam estes dois processos (PAREDES *et al.* 2007):



Nota-se, nas Equações acima, uma alta demanda por oxigênio para a oxidação do nitrogênio amoniacal. São necessários 4,57 mg de O<sub>2</sub> para cada mg de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> oxidado (AHN, 2006; METCALF E EDDY, 2016; HOW *et al.* 2018). A Equação 2 apresenta a geração de íons H<sup>+</sup>; logo, podem reduzir o pH do sistema, caso o efluente não contenha alcalinidade em quantidade suficiente para tamponar a ação deste íon. Assim, o bicarbonato é de suma importância no meio. A partir da estequiometria da Equação 4 (PAREDES *et al.* 2007), pode-se estimar o requerimento geral de alcalinidade do processo de nitrificação, que é de 7,04 g de CaCO<sub>3</sub> para cada g de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> oxidado (RITTMANN E MCCARTY, 2001).



Bactérias nitrificantes apresentam crescimento lento em tratamentos de águas residuárias. Yu *et al.* (2010) e How *et al.* (2018) mencionaram que é necessário um alto tempo de retenção de sólidos (TRS) entre 20 e 30 dias, para favorecer a permanência da biomassa nitrificante no sistema. Variáveis importantes, tais como: amônia livre, o valor de pH, a temperatura e alcalinidade contribuem ou não para o desenvolvimento e crescimento das bactérias nitrificantes em reatores. Abaixo estão descritos alguns fatores intervenientes no processo.

#### *Variáveis importantes no processo de nitrificação*

##### a) Amônia livre

De acordo com os autores (ANTHONIENSE *et al.* 1976; MIAO *et al.* 2016), a estabilidade do processo de nitrificação pode ser prejudicada, em concentrações elevadas de amônia livre e ácido nitroso (formas não ionizadas).

A amônia livre, em concentração de 10 a 150 mg.L<sup>-1</sup>, é inibidora das *Nitrosomonas*. Já as *Nitrobacter* são inibidas em concentrações de 0,1 a 1,0 mg.L<sup>-1</sup>. O ácido nitroso livre tende a inibir *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* em concentrações de 0,22 a 2,8 mg.L<sup>-1</sup> (ZHANG *et al.* 2017).

##### b) Temperatura

A influência da temperatura sobre o processo de nitrificação interfere no crescimento e decaimento dos micro-organismos nitrificantes. Cho *et al.* (2014) sugeriram que as taxas de

nitrificação aumentaram com a elevação da temperatura e estabilizaram em temperatura ótima (32° C), em biofilmes nitrificantes oriundos de um reator de lodos ativados, em escala real. Tal variável pode influenciar na mudança da população nitrificante, como mencionado no estudo de Zhang *et al.* (2014), em que o aumento da temperatura de 10°C a 28°C e 17°C a 28°C contribuiu para o enriquecimento de *Nitrospira* e *Nitrobacter*, respectivamente, na população microbiana presente.

Zoppas *et al.* (2016) sugeriram o crescimento de culturas de *Nitrosomonas* em temperaturas entre 30 e 36°C, com crescimento ótimo em 35°C. Já para a cultura de *Nitrobacter*, a temperatura varia entre 8 e 28°C, com crescimento ótimo em 28°C.

### c) pH e Alcalinidade

O valor de pH é uma variável importante para a cinética de crescimento das bactérias nitrificantes em reatores. Valores na faixa de pH entre 7,0 e 8,2 favoreceram uma maior dinâmica da população nitrificante (PRINIC *et al.* 1998). Ge *et al.* (2015) indicaram que a população de BOA foi favorecida entre pH de 5,8 até 8,5. Enquanto, a escala de pH para BON foi de 6,5 até 8,5. Contudo, o processo de nitrificação foi inibido em valores abaixo de 5,8 (PAINTER E LOVELESS, 1981).

O consumo de alcalinidade do meio é outro fator limitante. A alcalinidade é fornecida através da amonificação e desnitrificação. Sabe-se que durante a oxidação da amônia, ocorre a produção de ácido, e resultando um consumo de alcalinidade de 7,05 g CaCO<sub>3</sub>/g N-NH<sub>4</sub> (RITTMAN E MCCARTY, 2001).

Shanahan e Semmens (2015) operando um biorreator aerado por membrana indicaram, que a dinâmica da comunidade microbiana esteve intrinsecamente ligada às mudanças de pH e concentrações de amoniacal no interior do biofilme. Os efeitos da amônia livre, temperatura e pH que influenciam no mecanismo da nitrificação são apontados na Tabela 2.

Tabela 2 - Efeito de algumas variáveis (amônia livre, pH e temperatura) no crescimento e atividade das bactérias nitrificantes

Variáveis	Efeito	Referências
<b>Temperatura</b>		
20 - 25°C	O processo de nitrificação (acúmulo de nitrito) é favorecido	Cho <i>et al.</i> (2014); Zhang <i>et al.</i> (2014); Zoppas <i>et al.</i> (2016)
15 - 32°C	O processo de nitrificação é favorecido	Cho <i>et al.</i> (2014); Zhang <i>et al.</i> (2014); Zoppas <i>et al.</i> (2016)
<b>pH</b>		
7,0 – 8,2	Faixa ótima para a nitrificação	Ge <i>et al.</i> (2015); Zoppas <i>et al.</i> (2016)
7,2 – 7,8	Faixa ótima para BOA	Prinic <i>et al.</i> 1998; Cho <i>et al.</i> (2014); Ge <i>et al.</i> (2015)
7,8 – 8,2	Faixa ótima para BON	Prinic <i>et al.</i> 1998; Cho <i>et al.</i> (2014); Ge <i>et al.</i> (2015); Zoppas <i>et al.</i> (2016)
<b>Amônia livre</b>		
150 mg.L <sup>-1</sup>	Inibição das BOA e BON	Anthonisen <i>et al.</i> (1976)
1,0 a 7,0 mg.L <sup>-1</sup>	Inibição de BOA e acúmulo de nitrito	Anthonisen <i>et al.</i> (1976); Paredes <i>et al.</i> (2007); Ge <i>et al.</i> (2015)
0,4 a 1,8 mg.L <sup>-1</sup>	Inibição de 50% da BON	Paredes <i>et al.</i> (2007); Zhou <i>et al.</i> (2011); Ge <i>et al.</i> (2015)

Fonte: O Autor (2020).

#### d) Oxigênio dissolvido

Em sistemas de tratamento de águas residuárias com biofilmes presentes, a interação entre bactérias nitrificantes e heterotróficas para oxigênio dissolvido (OD) é de suma importância para o processo de nitrificação porque o oxigênio é aplicado simultaneamente pelos organismos heterotróficos na remoção da matéria orgânica carbonácea em ambientes aeróbios e pelos organismos nitrificantes autotróficos.

Em particular, a concentração de OD é um parâmetro crítico nos processos de remoção biológica de nutrientes e tem um impacto significativo sobre a composição de espécies de BOA e BON (PENG E ZHOU, 2006; LI *et al.* 2018; HOW *et al.* 2018; NALING *et al.* 2019).

Hanaki *et al.* (1990) indicaram que concentrações de 0,5 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> dobraram a taxa de crescimento da BOA. Entretanto, o crescimento da BON apresentou distúrbio pela baixa concentração de OD aplicado ao sistema, causando acúmulo de nitrito no reator. Entretanto, Daims *et al.* (2015) e How *et al.* (2018) sugeriram que concentrações de OD ente 0,5 e 1,0 mg.L<sup>-1</sup> não inibiram o crescimento das BON. Ge *et al.* (2015) verificaram que uma concentração de OD = 1,5 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> permitiu acumular nitrito e oxidar amônia, porém baixos níveis como 0,3 a 0,5 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> pode causar problemas de intumescimento no lodo (lodo filamentoso). Os efeitos da concentração de OD que influenciam no mecanismo da nitrificação são apontados na Tabela 3.

Tabela 3 - Efeito da concentração de oxigênio dissolvido no processo de nitrificação

OD (mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> )	Efeito	Referências
0,5	Começo da nitrificação, mas inexpressiva	Ahn (2006); Ciudad <i>et al.</i> (2007)
1,0 – 1,7	Taxa de nitrificação torna-se expressiva (acúmulo de nitrito)	Jianlong e Ning (2004); Ciudad <i>et al.</i> (2007); Ge <i>et al.</i> (2015).
2,0 - 3,0	Pico da taxa de nitrificação (acúmulo de nitrato)	Ahn (2006); Paredes <i>et al.</i> (2007)
> 3,0	Ocorre melhoria do processo de nitrificação, se as bactérias organotróficas removerem matéria orgânica	Ahn 2006, Ahn <i>et al.</i> 2011

Fonte: O Autor (2020).

#### e) Relação Demanda química de oxigênio/Nitrogênio (DQO/N)

A presença da carga orgânica na nitrificação é uma questão que também merece atenção. A capacidade de nitrificação é elevada com a redução da relação DQO/N. Com baixa relação DQO/N, as bactérias heterotróficas ficam limitadas pelo carbono e disponibilizam amônia em excesso para a nitrificação (CALLADO E FORESTI, 2001).

A relação DQO/N é uma das variáveis mais críticas para o processo de remoção biológica do nitrogênio em efluentes, pois atua diretamente sobre os efeitos funcionais das populações nitrificantes (FU *et al.* 2009; HAN *et al.* 2018).

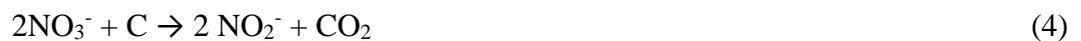
Metcalf e Eddy (2016) reportaram que em valores superiores a 5, a remoção simultânea de matéria orgânica e nitrogênio pode ser viabilizada, favorecendo o processo de nitrificação e desnitrificação simultânea (NDS) em um reator aeróbio (SANTOS *et al.* 2016; DAMIANOVIC *et al.* 2018; FENG *et al.* 2018). Entretanto, alguns autores avaliaram o processo NDS em biomassa aderida utilizando relação DO/N inferior a 3,0 (FENG *et al.* 2018; YAN *et al.* 2019).

#### Desnitrificação convencional

As bactérias desnitrificantes são facultativas e utilizam o nitrato, como receptor de elétron na geração de energia (ATP). Tais micro-organismos podem se desenvolver em sistema aeróbio conveniente a sua habilidade em oxidar a matéria orgânica utilizando o oxigênio. Dentre os principais gêneros envolvidos no processo de desnitrificação foram: *Achromobacter*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Paracoccus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Rhodopseudomonas*, *Sulfurimonas*, *Thiobacillus* (MADIGAN *et al.* 2010; METCALF E EDDY, 2016; ZHANG *et al.* 2020).

Vale salientar que outros micro-organismos também podem converter  $\text{NO}_2^-$  ou  $\text{NO}_3^-$  a produtos desnitrificados, tais como  $\text{NO}$ ,  $\text{N}_2\text{O}$  e  $\text{N}_2$  em condições aeróbias. O grupo de bactérias *Alcaligenes faecalis*, *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas stutzeri*, *Rhodococcus sp.* e *Thiosphaera pantotrapha* são capazes em condições distintas de desnitrificar aerobiamente e nitrificar heterotroficamente (AHN, 2006; CHEN *et al.* 2012; FENG *et al.* 2018).

As Equações 4 e 5 apresentam a estequiometria do processo, caso a desnitrificação seja baseada na redução do nitrito (desnitrificação via nitrito) ou a redução do nitrato (desnitrificação via nitrato), respectivamente (PAREDES *et al.* 2007).



Algumas variáveis importantes, tais como a concentração de OD, relação DQO/N, concentração de  $\text{NO}_3^-$ , temperatura, alcalinidade e pH têm a capacidade de influenciar o processo de desnitrificação, (LU *et al.* 2014; LU *et al.*, 2018); e abaixo seguem tais variáveis.

#### *Variáveis importantes no processo de desnitrificação*

##### a) pH e Temperatura

O desenvolvimento da biomassa desnitrificante é favorecida próxima a 30°C. De acordo com Lu *et al.* (2018), a temperatura de 20°C a 30°C e pH ótimo de 7 a 8 favorecem a desnitrificação em tratamento de águas residuárias (Tabela 4).

Contudo, a maioria das bactérias desnitrificantes são mais sensíveis às variações de temperatura do que o pH. Saleh-Lakha *et al.* (2009) os níveis de expressão de gene desnitrificante nirS (*nitrite reductase gene*) e norS (*nitrite oxide reductase gene*) em *Pseudomonas mandelii* quantificados por PCR em tempo real foram semelhantes em pH entre 6 e 8 mas, as células cultivadas a 30°C apresentaram níveis significativamente maiores de expressão do que aquelas cultivadas a 10°C e 20°C.

##### b) Oxigênio dissolvido

A presença do OD em sistema com biomassa estritamente desnitrificante pode inibir a atividade, bem como a síntese de enzimas dos micro-organismos. Assim, a concentração entre 0,6 e 0,8 mg  $\text{O}_2\text{L}^{-1}$  podem interferir na atividade desnitrificante. (LU *et al.* 2014; LI *et al.* 2018). Os mesmos autores reportaram que o processo de desnitrificação não é prejudicado em

concentração 0,2 a 0,5 mg.L<sup>-1</sup> (Tabela 4), visto que algumas bactérias desnitrificantes são facultativas.

c) Relação Demanda química de oxigênio/Nitrogênio (DQO/N)

A relação DQO/N é fundamental para a completa redução de nitrato a nitrogênio gasoso pelas bactérias desnitrificantes. A capacidade de desnitrificar está intrinsecamente associada com a quantidade de substrato biodegradável presente (RUIZ *et al.* 2006; LU *et al.* 2014; ZHANG *et al.*, 2020). Os reatores anaeróbios removem grande parte da matéria orgânica; assim, a relação DQO/N disponível em águas residuárias torna-se reduzida. Adicionar fontes externas de carbono (etanol, metanol e ácido acético) e/ou recircular o efluente nitrificado na combinação anaeróbia e aeróbia são alternativas para manter a estabilidade do processo. Pelaz *et al.* (2017) reportaram que o processo de desnitrificação aumenta, quando a razão DQO/N fica próximo a 5,0. Entretanto, se a razão DQO/N for menor que 2,5 o processo de desnitrificação é reduzido (FENG *et al.* 2018).

Tabela 4 - Efeito de algumas variáveis (pH, OD, temperatura, relação DQO/N) no crescimento e atividade das bactérias desnitrificantes

Variáveis	Efeito	Referências
<b>Temperatura</b>		
20 a 35°C	Favorece o desenvolvimento de bactérias desnitrificantes	Lu <i>et al.</i> (2014)
<b>pH</b>		
6,0 a 8,5	Favorece o processo de desnitrificação	Ahn (2006); Lu <i>et al.</i> (2014)
<b>OD</b>		
0,0 a 0,2 mg.L <sup>-1</sup>	Condição ótima para o processo de desnitrificação	Ahn (2006); Lu <i>et al.</i> (2014)
> 0,5 mg.L <sup>-1</sup>	Pode inibir o processo de desnitrificação	Münch <i>et al.</i> (1996); Ruiz <i>et al.</i> (2006); Ciudad <i>et al.</i> (2007)
<b>DQO/N</b>		
5 – 10	Favorece o processo de desnitrificação	Lu <i>et al.</i> 2014; Chen <i>et al.</i> (2012); Daminovic <i>et al.</i> (2018)

Fonte: O Autor (2020).

### 3.2.2. Novas rotas alternativas de remoção biológica de nitrogênio

Na última década, foram intensificados estudos com objetivo de reduzir custos de aeração e fonte de carbono, para converter biologicamente nitrogênio amoniacal para nitrogênio gasoso em reatores biológicos. A seguir são apresentadas algumas formas alternativas de remoção de nitrogênio encontradas na literatura.

## Nitrificação parcial

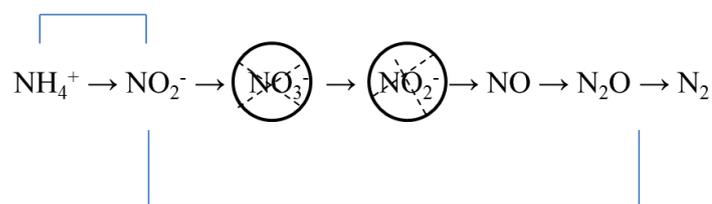
Pesquisas vêm sendo desenvolvidas para aperfeiçoar a remoção biológica de nitrogênio (BNR), principalmente no que concerne à demanda de oxigênio requerida no processo de nitrificação. Uma alternativa é o processo de nitrificação parcial e desnitrificação via nitrito; em que o composto intermediário da nitrificação é utilizado nas etapas de nitrificação e desnitrificação.

Jialong e Ning (2004), Ge *et al.* (2015), Wang *et al.* (2016) mencionaram que as principais vantagens desse processo é a redução da demanda por aeração durante a nitrificação e a demanda de matéria orgânica durante a desnitrificação. Tal estreitamento (Figura 3) no processo reduz 25% o consumo de oxigênio na nitrificação e na etapa da desnitrificação a exigência da fonte de carbono é menor (40%) (PAREDES *et al.* 2007; WEN *et al.* 2017; REN *et al.* 2020).

Uma alternativa para o acúmulo de nitrito é o processo SHARON (*Single reactor high activity ammonia removal over nitrite*), que foi viabilizado por inibição das BON utilizando amônia livre, baixa concentração de OD e baixa relação DQO/N (JIALONG E NING, 2004; CHO *et al.* 2011; WANG *et al.* 2016).

Figura 3 - Esquema da inibição do nitrato no processo de nitrificação parcial

### Nitrificação parcial



### Desnitrificação via nitrito

Fonte: Adaptado de Peng e Zhu (2006).

Fatores como a temperatura do meio, pH, alcalinidade, TRS, tempo de detenção hidráulico (TDH), concentração de oxigênio dissolvido influenciam na atividade das bactérias nitrificantes no processo da nitrificação parcial (PENG E ZHU, 2006; ZHANG *et al.* 2017).

O parâmetro da temperatura influencia na nitrificação parcial, sendo uma estratégia para acumular  $\text{N-NO}_2^-$ . Bactérias nitrificantes são sensíveis às mudanças de temperaturas, e

reduções bruscas poderão causar distúrbio no processo. Hellinga *et al.* (1998) operando um reator Sharon, observaram acúmulo de nitrito em temperaturas próximas a 35°C, TRS de 6 dias, alta concentração de amônia em escala de bancada (1,5 volume útil).

Sabe-se que as BOA apresentam taxa de crescimento específico mais elevado a partir de 20°C, enquanto os micro-organismos BON apresentam crescimento específico mais elevado a partir de 22°C (PAREDES *et al.* 2007). Zhang *et al.* (2017) mencionaram que o distúrbio no processo de nitrificação parcial foi devido à temperatura próximas a 20°C; entretanto, a retomada do processo foi viabilizada em temperatura de 28°C.

Cho *et al.* (2014) e Luo *et al.* (2017) verificaram que BOA tem maior taxa de crescimento em temperaturas variando de 28°C a 31°C. Paredes *et al.* (2007) e Ge *et al.* (2015) indicaram que os micro-organismos BON foram mais sensíveis à inibição em pH abaixo de 7,5.

Zhou *et al.* (2011) indicaram que os limiares de inibição de amônia livre entre 0,4 a 1,7 mg N.L<sup>-1</sup> reduziu em 50% a atividade da BOA, enquanto concentrações mais baixas de 0,02 a 0,22 mg N.L<sup>-1</sup> inibiu o crescimento de BON.

Chen *et al.* (2019) utilizando um RBS para tratar esgoto sintético, sob diferentes razões de CaCO<sub>3</sub>/N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (7:1, 6:1 e 4:1), concluíram que a taxa 4:1 contribuiu para o melhor acúmulo de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> no processo de nitrificação parcial. A alcalinidade fornecida ao meio por adição externa (NaHCO<sub>3</sub>) ou interna (recirculação de efluente rico em nitrito/desnitrificação) pode favorecer o acúmulo de nitrito. Yan *et al.* (2019) sugeriram que pH próximo e/ou superior a 7,5 e concentrações de amônia (50 mg.L<sup>-1</sup>) favoreceram o acúmulo de nitrito e estabilidade do processo.

Cho *et al.* (2011) utilizaram a ferramenta da biologia molecular eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) e verificaram que os micro-organismos pertencentes ao grupo BOA tiveram maior diversidade nas bandas, na comunidade microbiana, em relação aos micro-organismos pertencentes ao grupo BON. Tal fato esteve associado pela afinidade das condições ambientais de pH (7,8), temperatura de 30°C e 1,4 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>, encontradas no meio. A nitrificação parcial ocorreu predominantemente na superfície aeróbia do biofilme, enquanto o processo Anammox ocorreu no interior do biofilme, como sugerido pela hibridização *in situ* por fluorescência (FISH).

O OD é uma variável importante para acúmulo de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Hanaki *et al.* (1990) e Peng e Zhu (2006) sugeriram que o OD é o co-substrato para a nitrificação; logo, sua concentração influencia na taxa de reação da oxidação de amônia a nitrito. Outros autores (Bueno *et al.*

2018) promoveram o acúmulo de  $\text{N-NO}_2^-$ , quando a concentração de OD foi mantida em  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ .

BOA apresentam tempo mínimo de duplicação de 7 a 8 horas, indicando vantagem aos micro-organismos BON que apresentam tempo de duplicação entre 10 e 13 horas (PENG E ZHU, 2006). Galí *et al.* (2007) operaram um RBS e promoveram à nitrificação parcial utilizando TRS de 5 dias. Em outro estudo, Ahn *et al.* (2011) sugeriram a ocorrência da nitrificação parcial em TRS de 3 dias e OD de  $1,1 \text{ mg O}_2.\text{L}^{-1}$ .

Yang *et al.* (2010) utilizando um menor TDH e baixo TRS com baixa oxigenação promoveram a lavagem das BON, porém ocorreu perda considerável das BOA. Dessa forma, a idade do lodo influencia no acúmulo  $\text{N-NO}_2^-$  em reatores aeróbios. Ou seja, mantendo-se o TRS baixo proporciona a lavagem (*wash out*) das BON no reator.

Sob estas condições operacionais idênticas no mesmo reator podem viabilizar o processo NDS apresentando uma vantagem em reação a reatores sequenciais.

#### Nitrificação e desnitrificação simultânea (NDS)

O processo de nitrificação e desnitrificação simultânea (NDS) tornou-se uma tecnologia atraente devido ao seu potencial de eliminar a necessidade de tanques separados, exigidos em estações de tratamentos convencionais, induzindo um design simplificado e menor. Tal processo ocorre sob baixas concentrações de oxigênio dissolvido, sendo um fator chave para viabilizar uma elevada remoção de nitrogênio (ZHANG E ZHOU, 2007; REN *et al.* 2020).

Os fenômenos físicos e biológicos podem explicar o processo NDS. A explicação física afirma que o conceito básico do processo é criar um gradiente de concentração de oxigênio no biofilme (AHN, 2006). Desse modo, tanto condições aeróbias quanto anóxicas podem ser estabelecidas dentro de um único reator. Sob tais condições, tanto bactérias desnitrificantes e nitrificantes atuam no desempenho de suas transformações biológicas de forma associada (BUENO *et al.* 2018; FENG *et al.* 2018).

A explicação biológica é baseada na existência de certas bactérias desnitrificantes, capazes de reduzir o nitrogênio em condições aeróbias e também na existência de bactérias heterotróficas e autotróficas nitrificantes (MÜNCH *et al.* 1986; CHEN *et al.* 2012). A presença de tais micro-organismos implica diretamente na redução dos fluxos de recirculação

nos sistemas de tratamento e na diminuição dos custos com adição de fontes externas de carbono.

Sistemas que operam com NDS são capazes de manter o pH do reator sem que seja necessário adicionar uma fonte externa de base. Durante o processo de nitrificação, a alcalinidade é consumida, porém ela é produzida na desnitrificação, mantendo-se um equilíbrio do pH que pode promover o desenvolvimento de diferentes populações de micro-organismo em um único reator (POCHANA E KELLER, 1999).

Supõe-se que micro-organismos responsáveis pela desnitrificação sejam capazes de reduzir o nitrogênio durante um certo período de tempo, mesmo quando a concentração de OD tende a aumentar, considerando que a biomassa é submetida à baixa concentração de OD (BUENO *et al.* 2018; FENG *et al.* 2018).

Bueno *et al.* 2018 mencionaram que gradientes de concentração de oxigênio dissolvido no interior de flocos ou biofilmes microbianos (100 a 150  $\mu\text{m}$  de diâmetro) promoveram uma população microbiana diversa em todo o biofilme, devido ao limite de difusão. Logo, as bactérias nitrificantes estão localizadas em zona de alta concentração de OD e as bactérias desnitrificantes estão localizados em regiões de menor concentração.

Zhang e Zhou (2007) operaram um sistema de lodos ativados de completa mistura, em escala de bancada, para remoção de nitrogênio sob baixas concentrações de OD. Os resultados demonstraram que o processo NDS foi possível para uma concentração de OD entre 0,3 a 0,8  $\text{mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$ , resultando em uma remoção de nitrogênio acima de 66,7% com um TRS de 45 dias, relação DQO/N de 10 dias.

Nos últimos anos, alguns estudos indicaram que a alternância aeróbia e condições anóxicas resultantes de aeração intermitente poderiam favorecer a nitrificação (YANG E YANG, 2011; MOURA *et al.* 2012; SANTOS *et al.* 2016). Em teoria, a aeração intermitente no biorreator tem uma alta probabilidade de resultar em uma condição de OD baixa, o que beneficiaria a multiplicação de BOA e o acúmulo de nitrito por inibição da segunda etapa da nitrificação; bem como, a condição anóxica (sem aeração) seria benéfica para a desnitrificação via nitrito (BUENO *et al.* 2018; FENG *et al.* 2018; DAMIANOVIC *et al.* 2018).

O controle rigoroso da concentração de OD em baixas concentrações é um fator chave para o desenvolvimento e a estabilidade do processo NDS, alto TRS, matéria orgânica disponível e temperatura fornecendo condições favoráveis para o processo de nitrificação (PATHAK *et al.* 2020).

A relação DQO/N é outro fator importante para o processo NDS. Chiu *et al.*, (2007) estudaram o controle da relação DQO/N em um reator NDS operando em bateladas sequenciais e alimentado com efluente sintético. Nesse trabalho, o acetato foi utilizado com fonte orgânica e o cloreto de amônio como fonte de nitrogênio. Os autores obtiveram como resultado que o RBS pode viabilizar à remoção quase completa de matéria orgânica e do nitrogênio amoniacal sem nenhum acúmulo do intermediário nitrito quando a relação inicial de DQO/N foi de 11.

Meng *et al.* (2008) estudaram os efeitos da relação DQO/N e da concentração de OD sobre o processo NDS em um reator de membrana, operando com efluente sintético similar ao esgoto doméstico. Sacarose foi utilizada como fonte de carbono. O processo NDS foi viabilizado quando a relação DQO/N foi de 9,5.

Sabe-se que relação DQO/N inferior a 1,5 pode causar distúrbio em tal processo (WANG *et al.* 2013). A relação mínima requerida nessa relação foi de 1,8 (FENG *et al.* 2018). Damianovic *et al.* (2018) operando um reator de leito fluidizado, alimentado com esgoto sintético, promoveram o processo NDS utilizando a relação DQO/N entre 6,0 e 7,3. Outro estudo realizado por Feng *et al.* (2018) analisaram o processo NDS utilizando a relação DQO/N entre 1,8 e 7,6. Entretanto, o recente estudo viabilizou o processo NDS utilizando uma relação DQO/N próxima a 1,5 (ZHANG *et al.* 2017).

A Tabela 5 apresenta uma comparação entre os desempenhos na remoção de matéria orgânica (DQO) e nitrogênio total (N-NT) pelo processo NDS.

Tabela 5 - Comparação do desempenho de diversos sistemas de remoção de carbono e nitrogênio operados pela via NDS

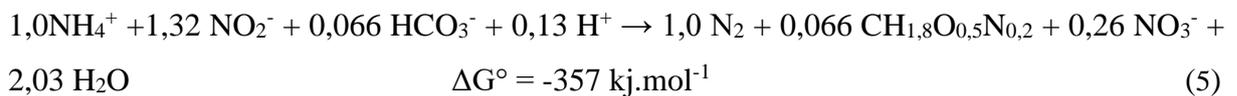
Água residuária	Tipo de reator	Tempo de operação	OD	DQO		N-NT		DQO/N	Referência
		(d)	(mg.L <sup>-1</sup> )	C <sub>AF</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	C <sub>EF</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	C <sub>AF</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	C <sub>EF</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )		
Esgoto sintético/ Extrato de carne	Leito estruturado, escala de bancada	160	2,0 a 3,5	354,0	39,0 a 54,0	30,5	5,3 a 16,0	11,6	Moura <i>et al.</i> (2012)
Esgoto sintético/ Sacarose	Leito estruturado, escala de bancada	150	2,0 a 3,5	482,0 a 529,0	13,0 a 45,0	49,1 a 193,4	17,4 a 36,7	2,9 a 9,7	Santos <i>et al.</i> (2016)
Esgoto real	Batelada sequencial/Escala de bancada	120	0,2 a 1,4	2100,0	498,0	2325,0	16,3	1,5	Zhang <i>et al.</i> (2017)
Esgoto real	Lodos ativados/Escala piloto	270	0,3 a 0,8	345 a 511	29,0 a 46,0	63,0 a 77,0	6,0 a 18,0	4,3 a 10,0	Bueno <i>et al.</i> (2018)
Esgoto sintético/ Acetato	batelada sequencial, escala de bancada	70	0,3 a 1,9	266,8	27,6 a 71,5	35,4 a 71,5	4,4 a 21,0	1,8 a 7,6	Feng <i>et al.</i> (2018)
Esgoto sintético/ Etanol	Leito fluidizado/Escala de bancada	125	0,5 a 4,8	400 ,0	34 a 42	71,1 a 84,0	5,5 a 38,8	6,2 a 7,3	Damianovic <i>et al.</i> (2018)
Esgoto sintético/ Glicose	Batelada sequencial, escala de bancada	225	0,7 a 1,2	250,1 a 260,7	38,0 a 45,0	39,1 a 40,7	10,5 a 12,6	6,3 a 6,7	Yan <i>et al.</i> (2019)
Esgoto sintético/ Glicose	Biorreator de microfiltração, escala de bancada	34	0,3 a 6,0	350,0	5,9 a 10,3	28,0	6,5 a 10,1	12,0	Pathak <i>et al.</i> (2020)

Fonte: O Autor (2020).

d(dias), C<sub>AF</sub> (concentração afluenta), C<sub>EF</sub> (concentração efluente).

### Oxidação anaeróbia da amônia (Anammox)

O processo de nitrificação parcial presente em um reator aeróbio, pode ser utilizado como pré-tratamento de um sistema Anammox. Principalmente, em efluente com composição próxima a 50% de amônio e 50% de nitrito (JETTEN *et al.* 1997; JUNG *et al.* 2007; JIN *et al.* 2012). Assim, o efluente foi propício para a utilização do sistema Anammox. Tais micro-organismos têm uma fisiologia atípica, pois, obtém energia por oxidação de nitrogênio amoniacal, em condições anóxicas, utilizando o nitrito como acceptor de elétrons e gerando nitrogênio molecular e nitrato, não necessitando de adição de fonte externa de carbono orgânico (AHN, 2006). Logo, apresenta-se como uma das tecnologias alternativas para a remoção de nitrogênio (Equação 5).



Schmid *et al.* (2001), Ahn, (2006), Jin *et al.* (2012) e Yang *et al.* (2020) reportaram que os micro-organismos *Planctomyces*, *Candidatus Brocadia anamoxidans*, *Candidatus Kuenia stuttgartiensis*, *Candidatus Scalindua brodae*, *Candidatus Scalindua wagneri* e *Candidatus Saclindua sorokinii* foram os principais responsáveis pelo o processo Anammox.

Os principais substratos do processo Anammox consistem em amônio, nitrito e bicarbonato (VAN DE GRAAF *et al.* 1996). Os micro-organismos responsáveis por este processo crescem muito lentamente devido ao tempo de duplicação ser de vários dias, o que implica no desafio desse processo. Sob condições ideais, o tempo de duplicação varia de 3 até 30 dias (AHN, 2006; LOTTI *et al.* 2015; MA *et al.* 2016).

A atividade desses micro-organismos está intrinsecamente ligada a temperatura. Alguns autores (JIN *et al.* 2012) indicaram que a temperatura ótima para o processo variou de 30 a 40°C para tratamento de águas residuárias. Por esta razão, o processo é geralmente utilizado em temperaturas de 30 a 35°C e pH de 6,7 a 8,3 (Tabela 6) em sistemas de tratamentos (AHN, 2006). Contudo, Dosta *et al.* (2008) promoveram o processo Anammox em temperaturas de 18 a 22°C.

Sabe-se que bactérias Anammox são micro-organismos anaeróbios obrigatórios e inibidos em ambientes apresentando concentrações próxima a 1,0 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>. (SCHMID, 2001; AHN, 2006; JIN *et al.*, 2012; YANG *et al.* 2020). Cho *et al.* (2011) e Ren *et al.* (2020)

sugeriram que tais micro-organismos podem conviver em condições anóxicas no interior de biofilmes aeróbios; logo, favorecendo a remoção de nitrogênio.

A concentração de nitrito é um importante parâmetro a ser controlado no processo Anammox. Dosta *et al.* (2008) aplicaram uma carga nitrogenada de 0,3 g N.L<sup>-1</sup> para a estabilidade do processo Anammox. A menor carga nitrogenada aplicada (0,3 g N.L<sup>-1</sup>) e aliada à baixa concentração de OD requerida (0,2 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>) favoreceu o processo Sharon-Anammox. (MATTEI *et al.* 2015; HAN *et al.* 2018). Os mesmos autores mencionaram que em baixa temperatura, um biofilme espesso é requerido. Em contrapartida, um biofilme fino requer menor concentração de OD. Logo, altas concentrações de OD poderá causar a nitrificação completa e menor remoção de nitrogênio total.

Ma *et al.* (2016) reportaram uma boa retenção de bactérias Anammox foi viabilizada, quando o TRS foi maior do que o tempo de duplicação da bactéria Anammox. Tempos típicos de duplicação desses micro-organismos são de 15 a 30 dias (AHN, 2006; DU *et al.* 2019). Contudo, esses micro-organismos podem estar presentes em TRS menores.

Wang *et al.* (2015) indicaram que bactérias Anammox estavam presentes em unidades de ETEs municipais, independentemente do tempo de retenção do lodo (2 a 20 d). Lotti *et al.* (2015) mencionaram que bactérias Anammox podem ser retidas em biorreator de membrana operado em 30°C com um TRS de 3 dias. Os mesmos autores indicaram que a redução do TRS de 12 para 3 dias reduziram à remoção de nitrito do sistema (Tabela 6).

Tabela 6 - Efeito de algumas variáveis (pH, OD, temperatura, relação DQO/N, TRS) no crescimento e atividade das bactérias Anammox.

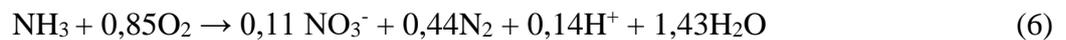
Variáveis	Efeito	Referências
<b>Temperatura</b>		
30 a 35°C	Temperatura ótima para o processo Anammox	Ahn, (2006); Dosta <i>et al.</i> (2008); Jin <i>et al.</i> (2012)
<b>pH</b>		
6,7 a 8,3	Favorece o processo de Anammox	Ahn, (2006); Jin <i>et al.</i> (2012)
<b>OD</b>		
> 0,2 mg.L <sup>-1</sup>	Pode inibir o processo Anammox	Schmid <i>et al.</i> (2001); Ahn, (2006); Cho <i>et al.</i> (2011); Ma <i>et al.</i> (2016)
<b>DQO/N</b>		
0,2 a 2,5	Favorece o processo Anammox	Miao <i>et al.</i> (2016); Sheng <i>et al.</i> (2018)
<b>TRS</b>		
15 a 30 dias	Favorece o processo Anammox	Lotti <i>et al.</i> , 2015; Wang <i>et al.</i> 2015; Du <i>et al.</i> (2019)

Fonte: O Autor (2020).

Os processos de nitrificação parcial e Anammox podem ser favorecidos em um único reator (THIRD *et al.*, 2001) e chamado de Canon (*Completely Autotrophic Nitrogen Removal over Nitrite*). Os micro-organismos nitrificantes, particularmente as BOA, são responsáveis pela oxidação do nitrogênio amoniacal a nitrito, consumindo boa parte do oxigênio e criando

condições anóxicas para a conversão de amônio e nitrito em nitrogênio gasoso pelas bactérias Anammox. As bactérias nitrificantes e Anammox atuam em cooperação durante todo o processo, o que possibilita a ocorrência das reações sequenciais de forma simultânea (AHN, 2006, WU *et al.* 2020).

A interação entre as bactérias oxidantes de amônia e anaeróbias, sob condições limitadas de oxigênio, resulta em uma quase completa conversão de amônio em nitrogênio gasoso. O processo Canon apresenta-se como uma alternativa econômica e eficiente para o tratamento de efluentes, especialmente, ricos em amônio e pobres em carbono orgânico. A remoção quase que total do nitrogênio pode ser possível em um único reator com baixa aeração e nenhuma fonte de carbono (SINHA E ANNACHHATRE, 2007). O processo Canon está representado por meio da Equação 6 (SLIEKERS *et al.* 2003).

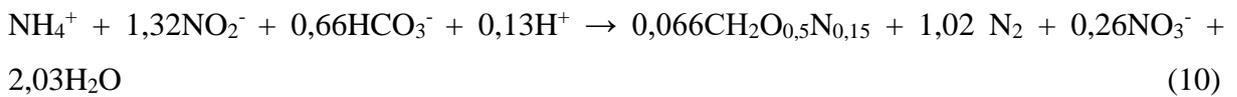
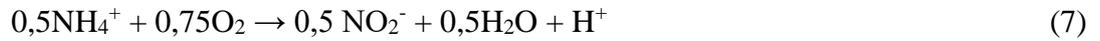


Sliekers *et al.* (2003) e Nielsen *et al.* (2005) promoveram o processo Canon em temperaturas na faixa de 30 a 35°C e carga nitrogenada aplicada (CNA) entre 0,075 a 1,5 kg N.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>. Nessa faixa de temperatura, as bactérias que oxidam amônia crescem mais rapidamente do que as bactérias responsáveis pela oxidação de nitrito (AHN, 2006; GE *et al.* 2015). O crescimento dos micro-organismos responsáveis pelo processo Anammox é estimulado nessas condições de temperatura, que por sinal coincide com valores ideais para o crescimento para essas bactérias (JIN *et al.* 2012; MA *et al.* 2016; YANG *et al.* 2020).

Outro importante processo que aplica à nitrificação parcial e Anammox é o processo Oland (*Oxygen Limited Autotrophic Nitrification and Denitrification*). O oxigênio é fornecido em baixa quantidade (0,1 a 0,3 mg.L<sup>-1</sup>) visando à nitrificação parcial (SINHA E ANNACHHATRE, 2007); bem como, o nitrito sendo utilizado como aceptor de elétron para a oxidação do nitrogênio amoniacal (AHN, 2006; REN *et al.* 2020). Os mesmos autores indicaram uma economia próxima a 60% de oxigênio e 100% em doadores de elétrons.

O processo Oland utiliza a atividade das bactérias desnitrificante e nitrificantes; bem diferente do processo Canon, que incorpora o processo Anammox, realizado por bactérias específicas e anaeróbias estritas (AHN, 2006; LI *et al.* 2020). Sabe-se que tais processos apresentaram eficiência de remoção de nitrogênio total próximo a 80% (HAN *et al.* 2018). As Equações 7 e 8 apresentam as conversões do nitrogênio no processo Oland (AHN, 2006;

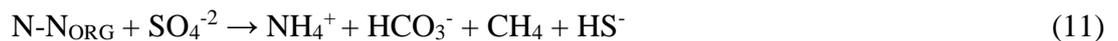
MORAIS, 2015). Em relação ao processo Canon, a Equação 9 e 10 apresenta tal conversão (AHN, 2006; LI *et al.* 2020).



A combinação dos processos Anammox e desnitrificação é outra alternativa na remoção biológica do nitrogênio; tal processo é conhecido por Deamox (Denitrifying ammonium oxidation) (KALYUZNYI *et al.* 2006; SHENG *et al.* 2018; DU *et al.* 2019; Zhang *et al.* 2020).

Este processo combinado é altamente eficiente e econômico visto que, as bactérias desnitrificantes utilizam a DQO como doador de elétrons e reduzem o  $\text{NO}_3^-$  (subproduto Anammox) em  $\text{N}_2$ . Então, o efluente ricos em  $\text{NO}_3^-$  aliado ao sulfeto de hidrogênio ( $\text{HS}^-$ ), este oriundo da redução de sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) na degradação anaeróbia, é utilizado como doador de elétron, para reduzir o  $\text{NO}_3^-$  para  $\text{NO}_2^-$ . Em seguida, o  $\text{NO}_2^-$  aliado ao nitrogênio  $\text{NH}_4^+$  é convertido a  $\text{N}_2$ ,  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{H}_2\text{O}$  (subprodutos do processo Anammox) (DU *et al.* 2019; ZHANG *et al.* 2020). Mas, para tal processo ocorrer, a relação DQO/N deverá ser baixa (DQO/N 1,2 a ~2,0) (Sheng *et al.* 2018; Du *et al.* 2019; Zhang *et al.* 2020).

As reações podem ser vistas nas Equações de 11 a 14 (KALYUZNYI *et al.* 2006; MORAIS, 2015; ZHANG *et al.* 2020).





Completa oxidação da amônia por um único micro-organismo (Comammox)

Em meados de 2006, um grupo de pesquisa levantou a hipótese da existência de uma bactéria capaz de oxidar completamente amônia a nitrato; mas, comprovado em 2015. Tal grupo confirmou que esse micro-organismo pertence ao gênero *Nitrospira*. (DAIMS et al. 2015; VAN KESSEL et al. 2015). Novos trabalhos vêm apresentando resultados surpreendentes na identificação de micro-organismo pré-formando à nitrificação completa por conta própria, sendo o processo chamado Comammox. (*Complete Ammonium Oxidation*).

O alto rendimento de crescimento, postulado para micro-organismo Comammox, pode ser vantajoso em sistemas de crescimento lento e limitado a nutrientes com baixa taxa de eliminação de células, por exemplo, encontrado em biofilmes. Cotto et al. (2020) avaliaram o processo Comammox utilizando o TRS de 10 dias em biomassa aderida. De fato, as primeiras culturas de enriquecimento em Comammox foram obtidas de amostras de biofilmes (DAIMS et al. 2015; VAN KESSEL et al. 2015). Quando analisaram, por análise metagenômica, essa cultura enriquecida e identificaram o conjunto de genes para nitrificação completa em códigos de genomas atribuídos a *Nitrospira*.

Candidatus *Nitrospira inopinata*, descrita por Daims et al. (2015) apresentaram um conjunto de genes semelhante de AMO (*ammonia monooxygenase*), HAO (hydroxylamine dehydrogenase), genes necessários para oxidação da amônia, e proteína uréase. Como também, unidades nitrato oxidoreductase (*nitrite oxidoreductase* – NRX) necessárias para oxidação do nitrito. O processo Comammox foi visualizado in situ utilizando a técnica direct gene-FISH em *Nitrospira* (BARRERO-CANOSA et al. 2017) para detectar o gene amoA, que codifica a subunidade “A” do AMO, ou por imunofluorescência visando a proteína AMO.

Annavajhala et al. (2018) reportaram que os principais micro-organismos presentes em biofilmes aos processos CMX foram *Candidatus “Nitrospira inopinata”*, *Candidatus “Nitrospira nitrificans”*, *Candidatus “Nitrospira nitrosa e Candidatus “Nitrospira defluvii”*.

Nos processos de RBN convencionais, o CMX pode ser benéfico ou alternativa equivalente à nitrificação mediada por BOA e nitratação mediada por BON, dependendo da cinética relativa e utilização de substratos presentes no meio (ANNAVAJHALA et al. 2018). O processo Comammox pode coexistir com os processos de nitrificação parcial e Anammox

em reatores com lodo suspenso e/ou aderido (COTTO *et al.* 2020; REN *et al.* 2020; WU *et al.* 2020) logo, favorecendo um efluente com qualidade no que tange à remoção de nitrogênio.

### 3.3. REATORES HÍBRIDOS COM LODO SUSPENSO E ADERIDO NA REMOÇÃO DE MATÉRIA ORGÂNICA E NITROGÊNIO

A remoção simultânea de matéria orgânica e nitrogênio, têm sido amplamente aplicados sistemas de tratamento combinando reatores híbridos com compartimentos de lodo suspenso e lodo aderido, em sequência anaeróbia e aeróbia (PIMENTA, 2012; LEYVA-DÍAZ *et al.* 2016; CELESTINO, 2017; PATHAK *et al.* 2020).

O lodo suspenso na parte inferior de reatores híbridos favorece a remoção de MO e a nitrificação nos compartimentos anaeróbio e aeróbio, respectivamente, pelas condições hidrodinâmicas que otimizam o contato entre os substratos e os micro-organismos; e o lodo aderido nos compartimentos superiores favorece a maior retenção dos micro-organismos, e eventualmente de sólidos carregados dos compartimentos inferiores. Adicionalmente, diversos estudos já apontaram vantagens operacionais e de custos desses reatores em relação ao uso da configuração convencional com compartimentos separados, em função do menor volume, área ocupada em planta e menor requisito de bombeamento (ARTIGA *et al.* 2005; LIM E FOX, 2011; LEYVA-DÍAZ *et al.* 2016; FUCHS *et al.* 2017).

O reator UASB foi desenvolvido na década de 70 com a finalidade de tratar efluentes industriais com alta concentração de matéria orgânica (LETTINGA *et al.* 1993). Em regiões de clima quente, favorável a digestão anaeróbia, a remoção de DQO proporcionada por esse tipo de reator é de aproximadamente 70% (KATO *et al.* 2003; BARROS *et al.* 2015; LU *et al.* 2018).

Dentre os pontos positivos podem ser mencionados: fácil manutenção, baixo custo de implantação e operação e produção de biogás, podendo ser aproveitado na própria estação de tratamento de esgoto (ETE) (NNAJI *et al.* 2014). Os efluentes desse tipo de reator geralmente não se enquadram nos padrões de lançamento, especificado pela resolução CONAMA n°430/11, principalmente no tocante à remoção de nitrogênio (PIMENTA, 2012; BARROS *et al.* 2015; CELESTINO, 2017). Logo, faz-se necessário a implantação de uma etapa de tratamento complementar.

Os micro-organismos presentes em alta concentração no reator, se aderem uns aos outros formando flocos ou grânulos sedimentáveis, dando origem a camada espessa,

denominada manta de lodo, e onde se processa a digestão anaeróbia. A depender da condição hidráulica interna, o lodo pode ser mais disperso ou estratificado (GROTHENHUIS *et al.* 1991; HUANG *et al.* 2005; LU *et al.* 2018). Entretanto, distúrbios internos provocados pelas condições hidráulicas podem promover maiores concentrações de sólidos no efluente. Assim, uma alternativa é a utilização de filtros anaeróbios visando à retenção de sólidos.

O filtro anaeróbio é um reator que possui o seu interior preenchido com material inerte, tal como pedra, britada, conduítes, espumas, que serve como meio suporte para retenção de sólidos e desenvolvimento de micro-organismos. Este tipo de tratamento é melhor indicado para efluentes mais solúveis, devido ao risco de entupimento do meio suporte. Logo, é indicado para o pós-tratamento, o que proporciona ao sistema segurança operacional e estabilidade do efluente (AKUNA *et al.* 1994; TONON *et al.* 2015).

O biofilme que se desenvolve no meio suporte, proporciona a degradação da matéria orgânica remanescente; bem como, indicados para atuar como unidade complementar aos reatores de manta de lodo (PIMENTA, 2012; CELESTINO, 2017). Entretanto, por se tratar de um pós-tratamento de efluente anaeróbio não há remoção de nitrogênio.

Na exigência de um efluente de melhor qualidade, no que tange ao nitrogênio, o reator de lodos ativados é uma alternativa (BUENO *et al.* 2018). Ele é composto basicamente por um tanque de aeração, tanque de decantação e recirculação de lodo (METCALF E EDDY, 2016). Entretanto, requer mão de obra mais especializada e certo grau de mecanização; assim, faz com que o custo com a manutenção seja mais elevado. Em contrapartida, não precisa de grandes áreas para sua implementação.

Devido à formação de floco, a biomassa é facilmente separada no decantador, na qual estão presentes bactérias heterotróficas, aeróbias, autotróficas nitrificantes, heterotróficas desnitrificantes, filamentosas envolvidas em uma matriz polissacarídeos (HUANG *et al.* 2005). Visando reter essa biomassa presente no sistema, faz necessário à aplicação de um filtro como meio suporte.

Logo, a aplicação de um biofiltro aerado submerso (BAS) atenderia essa demanda. Tal configuração é um tanque preenchido com meio suporte inerte pelo qual o efluente e ar fluem permanentemente. Trata-se de um sistema trifásico no qual a parte sólida é constituída pelo meio suporte e lodo aderido (biofilme); a fase líquida, composta pelo efluente e a fase gasosa, formada pela aeração artificial e subprodutos da atividade biológica (YUE *et al.* 2018).

O efluente do BAS geralmente apresenta baixa concentração de sólidos e de matéria orgânica. Logo, este tipo de configuração tem satisfatória resposta a mudanças de

temperatura, vazão, redução do pH e baixa concentração de oxigênio, conseguindo retomar a operação normal em curto espaço favorecendo o processo de nitrificação (LIM E FOX, 2011; CHEN *et al.* 2015).

Uma alternativa para aplicar tais processos são os reatores híbridos, amplamente aceitos por fornecerem características para o desenvolvimento concentrações microbianas (ZHOU *et al.* 2016), especialmente crescimento lento de bactérias nitrificantes, essenciais para remoção de nitrogênio em águas residuárias. Logo, a conjugação de compartimento híbrido anaeróbio e compartimento híbrido aeróbio sequencial tem a finalidade demonstrar as vantagens de cada tratamento, minimizando seus aspectos negativos.

Os conjuntos com biomassa suspensa e aderida no mesmo sistema de tratamento, coexistindo atividade metabólica anaeróbia/anóxica e aeróbia dentro do mesmo ecossistema de biomassa torna possível a remoção de nitrogênio (MANININA E VIVIANI, 2009; LIM E FOX, 2011; OLIVEIRA NETTO E ZAIAT, 2012; LEYVA-DÍAZ *et al.* 2016; PATHAK *et al.* 2020).

Artiga *et al.* (2005) operaram um reator híbrido aeróbio de leito circulante (CBR) contendo biomassa suspensa e aderida. O crescimento da biomassa nitrificante foi presente no meio suporte, enquanto o crescimento da biomassa heterotrófica foi em suspensão em TRS entre 1 a 10 dias. A carga orgânica diária de 4,5 kg DQO  $m^{-3}.d^{-1}$ ; bem como, a carga nitrogenada diária de 1,2 kg N/ $m^{-3}.d^{-1}$  favoreceram a remoção de DQO (95%) e nitrogênio amoniacal (97%) apresentando concentrações no efluente do sistema de 100 mg DQO.L<sup>-1</sup> e 10 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Manina e Viviani (2009) obtiveram taxas de conversão de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (35 a 98%) sob a taxa de aplicação de 5,7 kg N.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup> e concentração de 2,0 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>. Constatam também que taxas de aplicação de até 30,8 g DQO.d<sup>-1</sup> não interferiram na nitrificação, uma vez que grande parte da matéria orgânica foi degradada no compartimento anaeróbio.

Lim e Fox (2011) avaliaram o desempenho de um reator híbrido composto por um filtro anaeróbio e um filtro biológico aerado, alimentado com esgoto sintético, com recirculação de 100%, 200% e 300%. As concentrações de DQO no efluente final foram 27, 24 e 13 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>; e de nitrogênio foram 71, 42 e 28 mg N-NT.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Oliveira Netto e Zaiat (2012), com reatores híbridos em escala de bancada, tempo de detenção hidráulico (TDH) de 12 horas e taxas de recirculação de 50% e 150%, obtiveram efluente final com DQO de 44 e 31 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>; e 14 e 10 mg N-NT.L<sup>-1</sup>, respectivamente; em escala

piloto e recirculação de 150% e 300%, as concentrações no efluente final foram 57 e 54 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>; e 25 e 20 mg N-NT.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Pimenta (2012) utilizando dois reatores híbridos, em escala piloto, tratando esgoto doméstico, um anaeróbio (UASB + filtro anaeróbio) e outro aeróbio (lodos ativados + biofiltro aerado submerso) com TDH entre 8 e 10h com a razão de recirculação (RR) variando entre 0 a 200%. Para o reator aeróbio a concentração de oxigênio dissolvido foi disponibilizada entre 2,0 a 4,0 mg.L<sup>-1</sup>. Logo, viabilizaram eficiências de DQO de 62 a 90% apresentando concentrações efluentes de 56 a 140 mg.L<sup>-1</sup>. Em relação à nitrificação, o processo foi alcançado em RR de 0 a 100%; bem como, o processo de desnitrificação no reator anaeróbio sem que houvesse necessidade de aplicação de fonte externa de carbono. Contudo, o processo de nitrificação não ocorreu no experimento em RR de 200%, o que inviabilizou a remoção de amônia em ambos os conjuntos.

Tawafik *et al.* (2015) operaram um reator híbrido combinado com esponjas suspensas no tratamento de esgoto doméstico, carga orgânica de 1,7 kg DQO.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup> apresentaram concentração média de DQO total no efluente de 39±12 mg.L<sup>-1</sup> e eficiências de remoção próxima a 94%. No que tange ao nitrogênio amoniacal, a concentração no efluente foi de 6 mg.L<sup>-1</sup> e remoção de 85%. Os mesmos autores reportaram que os conjuntos híbridos também poderiam ser utilizados na remoção de coliformes totais, coliforme fecal e estreptococos fecais, além de remoção de espécies de protozoários; por exemplo, Sarcodinas (*Entamoeba cysts*), Flagelados (*Giardia cysts*) e Ciliados (*Cryptosporidium oocysts*).

Chatterjee *et al.* (2016) operaram um reator híbrido anaeróbio-aeróbio de biomassa suspensa e aderida para alcançar remoção simultânea de matéria orgânica e nitrogênio. O reator híbrido foi operado com TDH de 6 horas, carga orgânica de 2,0 kg DQO.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup> e carga nitrogenada de 0,2 kg N.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>; logo, alcançando remoção 99% e 89% de DQO e nitrogênio, respectivamente; bem como a concentração no efluente do sistema foi de 10 mg DQO.L<sup>-1</sup> e 12 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.L<sup>-1</sup>.

Leyva-Díaz *et al.* (2016) utilizaram um reator híbrido de biomassa suspensa para remoção de matéria orgânica e nitrogênio em esgoto municipal, com taxa de recirculação de 100% e 200% do efluente do compartimento aeróbio para o anaeróbio; as respectivas concentrações de DQO e de nitrogênio total (N-NT) no efluente foram 32 e 26 de mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> e 35 e 33 mg N-NT.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Já as eficiências de remoção para tais parâmetros, foram de 82% a 85% e 58% a 61%, respectivamente.

Celestino (2017) operando reatores híbridos sequencias anaeróbio aeróbio com TDH de 8h, RR entre 0% e 50% e concentração de OD entre 6,0 e 7,0 mg.L<sup>-1</sup> disponibilizada ao reator aeróbio, no intuito de remover simultaneamente matéria orgânica e nitrogênio promoveram eficiências superiores a 83% na remoção de DQO, com efluente do sistema apresentando concentração inferior a 47 mg.L<sup>-1</sup>. A concentração de nitrogênio amoniacal no efluente do reator híbrido aeróbio ficaram entre 7 a 18 mg.L<sup>-1</sup>. Já o processo de desnitrificação apresentou remoção de 97% no reator anaeróbio com RR de 25% e 50%, respectivamente; bem como, as concentrações de nitrito de 0,3 mg.L<sup>-1</sup> e nitrato 0,5 mg.L<sup>-1</sup> no efluente do reator híbrido anaeróbio.

Hosseinpour *et al.* (2019) estudaram reatores híbridos (lodo suspenso e aderido) com concentração de OD entre 0,9 a 1,2 mg.L<sup>-1</sup> disponibilizado ao reator aeróbio, no intuito de remover nitrogênio obtiveram eficiências de 85% e 81% de nitrogênio amoniacal e nitrogênio total, respectivamente, no efluente.

Gonzalez-Tineo *et al.* (2020) operaram um reator híbrido anaeróbio-aeróbio composto por um reator UASB e filtro aeróbio com OD médio de 3,3 mg.L<sup>-1</sup>.no intuito de promover o processo NDS. A remoção de matéria orgânica foi de 40% a 99%. No que concerne ao nitrogênio total, as eficiências variaram entre 62% a 71% e concentrações efluentes de 43 a 85 mg.L<sup>-1</sup>.

Pathak *et al.* (2020) operaram um sistema híbrido composto por um biorreator-microfiltração de membrana osmótica promoveram o processo NDS; logo, a remoção de matéria orgânica variou entre 86% a 98% e concentrações efluentes de 5,9 a 10,3 mg.L<sup>-1</sup>. No que concerne ao nitrogênio total, as eficiências variaram entre 62% a 71% e concentrações efluentes de 6,5 a 10,1 mg.L<sup>-1</sup>.

Ahn (2006) e Ge *et al.* (2015) reportaram crescimento favorável de bactérias nitrificantes para temperaturas entre 25 a 30°C, pH na faixa de 7,5 a 8,0 e oxigênio dissolvido entre 2,0 a 5,0 mg.L<sup>-1</sup>. Mannina e Viviani, (2009); Leyva-Díaz *et al.* (2015) mencionaram que concentrações de oxigênio dissolvido igual ou superior a 2,0 mg.L<sup>-1</sup> não houve alteração no processo de nitrificação. Já o acúmulo de nitrito ocorreu em concentrações de OD entre 1,0 a 2,0 mg.L<sup>-1</sup>.

O biofilme, presente no compartimento de biomassa aderida, pode contribuir com grande importância em remover nutrientes, como o nitrogênio e o fósforo, assim sendo usado no pré-tratamento de águas residuárias. Madigan *et al.* (2010) sugeriram que os biofilmes

retêm os nutrientes necessários ao desenvolvimento microbiano e promovendo a inibição do destacamento das células de superfícies presentes em sistemas de fluxo corrente.

### 3.4.BIOFILME

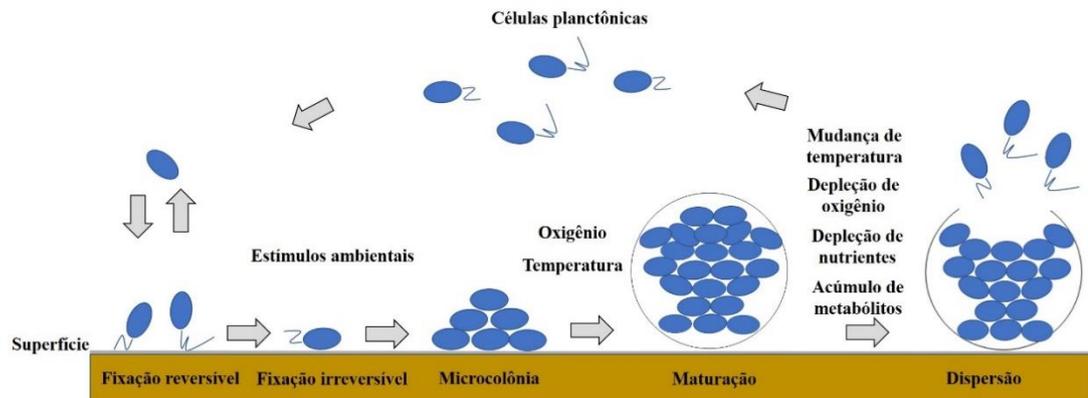
Biofilmes são comunidades abrangentes de micro-organismos e produtos extracelulares aderidos às superfícies ou interfaces. Os agrupamentos microbianos são frequentemente compostos por bactérias, cianobactérias, protozoários, que interagem uma com as outras e com o ambiente. A arquitetura do biofilme tem profundas implicações na função dessas complexas comunidades.

A percolação dos esgotos permite o crescimento bacteriano na superfície do material de enchimento (meio suporte), formando uma película ativa (biofilme), constituídas por colônias gelatinosas de micro-organismos (zooglea) de espessura máxima de 2 a 3 mm (METCALF E EDDY, 2016). A matéria orgânica e inorgânica é adsorvida pela película microbiana, ficando retida em um determinado período de tempo suficiente para a sua estabilização.

O início da formação do biofilme se dá pelo contato com a superfície irregular, porosa ou provida de interstício. A formação da estrutura interna do biofilme é composta por aglomerados contendo células e polímeros que preenchem os espaços entre os aglomerados de micro-organismos, canais e poros preenchidos por líquidos (MADIGAN *et al.* 2010).

Toyofuku *et al.* (2016) reportaram que a formação de biofilme é geralmente estabelecida através de várias etapas. Primeiro, as células planctônicas aderem à superfície em um processo conhecido como “fixação da superfície”. Após a fixação, os biofilmes formam uma arquitetura estruturada com auxílio do EPS (*Extracellular polymeric substance*) no estágio de “maturação”. Em seguida, a célula deixa o biofilme no estágio de “dispersão”. Logo, cada estágio é afetado por vários fatores ambientais e um processo altamente regulamentado (Figura 4).

Figura 4 - Variáveis ambientais que moldam a formação de biofilme



Fonte: Adaptado de Toyofuku *et al.* (2016).

No biofilme, em geral, organismos de crescimento rápido estão localizados na parte externa, enquanto organismos de crescimento lento podem ser encontrados no interior do biofilme. Logo, tem sido experimentalmente verificado em biofilmes aeróbios, cujos micro-organismos heterotróficos de crescimento rápido estão localizados na parte externa, enquanto organismos nitrificantes de crescimento lento podem ser localizados na parte interna do biofilme (CHAO *et al.* 2016; HAN *et al.* 2018).

Biofilmes nitrificantes utilizados no tratamento de águas residuárias estão se tornando cada vez mais importante na remoção biológica de nitrogênio, a fim de manter as descargas de nitrogênio para o ambiente suficientemente baixo (CHEN *et al.* 2019). Contudo, uma forma de evitar perda da biomassa no efluente, é através da imobilização em material suporte formando a biopelícula (OLIVEIRA NETTO E ZAIAT, 2012; YUE *et al.* 2018). Portanto, desvincula de fato o TRS do TDH possibilitando continuidade dos micro-organismos no reator.

Alternativamente, altas taxas de NDS podem ser alcançadas, tanto em reatores de lodos ativados quanto em biofilme aderido, em condições operacionais em que estão presentes microambientes aeróbios e anóxicos (MÜNCH *et al.* 1996; SANTOS *et al.* 2016; BUENO *et al.* 2018; FENG *et al.* 2018).

Reatores utilizando crescimento de lodo aderido podem fornecer zonas aeróbias, anóxicas e anaeróbia permitindo transferência de massa, fornecendo um ambiente favorável a nitrificação e desnitrificação simultânea (YANG *et al.* 2010; CHAO *et al.* 2016). Logo, parte do biofilme excedente é despreendida, podendo elevar a concentração de sólidos suspensos no efluente final. Tal efeito ocorre devido a uma conjugação de fatores, tais como, tensão de cisalhamento causada pela velocidade de escoamento do líquido entre os espaços vazios do

meio suporte, grau de estabilização dos sólidos, relação crescimento da espessura do biofilme e geração de zonas inativas (MÜNCH *et al.* 1996; POCHANA E KELLER, 1999).

Novas e numerosas abordagens e metodologias experimentais têm sido desenvolvidas a fim de explorar interações metabólicas, agrupamentos filogenéticos e a competição entre membros da comunidade microbiana presentes em biofilmes. Para complementar esta ampla visão da ecologia dos biofilmes, os organismos individuais têm sido estudados com o uso da técnica da biologia molecular, a fim de identificar genes necessários para o desenvolvimento do biofilme e para dessecar as rotas regulatórias que controlam o processo de nitrificação e desnitrificação.

### 3.5.FERRAMENTAS DE BIOLOGIA MOLECUPAR UTILIZADAS EM BIOMASSA SUSPENSA E ADERIDA EM REATORES HÍBRIDOS

É fundamental compreender o papel e função de grupo de micro-organismos presentes em biofilmes de reatores híbridos. Esse conhecimento associado aos efeitos de parâmetros operacionais, podem ajudar a diminuir as dificuldades associadas ao emprego de culturas mistas e contribuir para sua aplicação em larga escala.

Desde meados da década de 80, tem sido possível o estudo da diversidade e ecologia de micro-organismos em ambientes naturais por meio de técnicas de biologia molecular. Tais técnicas fornecem mais autonomia, quando se quer estudar a diversidade de micro-organismos associados a específicos ambientes, destinando analisar a estrutura da comunidade microbiana ou ainda a detecção de organismos específicos em amostras mais complexas. Entre as técnicas empregadas nas análises de ecologia molecular microbiana estão à reação em cadeia da polimerase (PCR), hibridização *in situ* fluorescente (FISH), a eletroforese em gel de gradiente desnaturante, a clonagem molecular, o sequenciamento massivo.

A reação em cadeia da polimerase (PCR), que foi desenvolvida por Kary Mullis, uma ferramenta muito sensível para a amplificação da informação genética. Em linhas gerais, esta técnica constitui-se na capacidade de iniciadores específicos (primers), da qual as regiões delimitadas do DNA de um organismo têm de anelar meramente com a sequência desejada recorrente da complementariedade das bases.

Os primers são oligonucleotídeos diminutos apresentando de 10 a 20 pares de bases, concedendo uma hibridização aprimorada com os filamentos opostos da sequência alvo (par de bases da fita do DNA estudado), e estimular a síntese da sequência-alvo do DNA

complementar com a contribuição da enzima DNA-polimerase. (SANZ E KÖCHLING, 2007).

Contudo, a enzima é comumente extraída de *Thermus aquaticus*, uma espécie de bactéria, que sobrevive em altas temperaturas, ou seja, termofílicas (SAIKI *et al.* 1988). A PCR apresenta um destaque por sua aplicação em avaliar a presença de micro-organismos em amostras ambientais sem a necessidade de cultivá-los.

A hibridização *in situ* fluorescente (FISH), a qual combina a precisão da genética molecular com a informação visual a partir da microscopia, possibilitando a visualização e identificação de células microbianas no seu habitat natural (SIMONATO *et al.* 2010) e artificiais (HAN *et al.* 2018).

O FISH permite identificar uma sequência alvo de ácido ribonucleico (RNA) mediante o uso de uma sonda (*primers*) pequena (16-20 nucleotídeos) marcadas com fluorocromo, uma substância que absorve luz ultravioleta e emite luz fluorescente). Estas sequências (nucleotídeos) reconhecem sequências de 16S rRNA em células fixas e hibridizam com elas *in situ* (SANZ E KÖCHLING, 2007).

Em função do pequeno tamanho de seus nucleotídeos, estes permeiam a parede celular dos micro-organismos e, sendo complementares à sequência alvo são visualizados em microscópio de fluorescência utilizando filtros especiais e distinguidas das demais através da contagem do número total pela coloração DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindol) (AMMAN *et al.* 2001).

Micro-organismos podem ser localizados, identificados e determinar sua distribuição temporal em biofilmes, grânulos e lodos ativados com hibridização (AMMAN *et al.* 2001; KINDAICHI *et al.* 2004; FERNANDEZ-GONZALEZ *et al.* 2018). A principal desvantagem desta técnica está na falta de disponibilidade de sondas destinadas ao táxon bacteriano.

A eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE), oriundo do trabalho de Muyzer *et al.* (1993), é uma técnica que permite o estudo filogenético de comunidades de micro-organismo, baseia-se na eletroforese de fragmentos de DNA, previamente amplificados pela técnica da PCR. Esses fragmentos são submetidos a um ambiente com níveis crescentes de agentes químicos desnaturantes (agarose, ureia e formamida). Assim, promove mudança na molécula e reduz a sua migração (SIGLER *et al.* 2004)

Seu princípio baseia-se na diferença de estabilidade das fitas duplas de DNA, que depende principalmente do conteúdo das bases nitrogenadas guanina (G) e citosina (C), num gradiente de desnaturação. Nesse sentido, o DNA submetido à eletroforese em condições

crescentes de desnaturação, os fragmentos permanecem em fita dupla até atingir as condições necessárias para a desnaturação dos domínios das moléculas (*melting domains*).

Quando um domínio sofre a desnaturação, ocorre uma transição na conformação da molécula, a qual passa de helicoidal para parcialmente desnaturada. Nestas condições, a migração da molécula no gel cessa, ocupando uma posição particular no gel. A migração diferenciada dos produtos de PCR amplificados dispõe um perfil de bandas, e cada banda separada é interpretada como sendo de um organismo presente no ambiente estudado.

Por ter caráter qualitativo e semi-quantitativo, a ferramenta PCR é particularmente útil para examinar séries temporais e dinâmicas populacionais, comparando partida e evolução de sistemas de tratamento.

Após os dados oriundos da técnica de DGGE, esses seguem para o sequenciamento com a finalidade de obter informações da comunidade microbiana e correlacionar dados da com os dados físico-químicos de reatores (NAKAZAWA, 2017; VERAS, 2019). O banco de dados de genes ou genomas completos contidos no *Ribosomal Data Project* (RDP) ou rRNA SILVA 16S ([www.arb-silva.de](http://www.arb-silva.de)), auxiliam na análise de resultados.

No estudo da filogenia molecular dos micro-organismos, os genes que codificam o RNA ribossomal da subunidade menor (rRNA 16S) são os mais importantes e utilizados (SANZ E KÖCHLING, 2007). Os recentes avanços no sequenciamento de DNA e na bioinformática permitem a exploração da diversidade genética dos micro-organismos pertencentes as comunidades microbianas em reatores. O sequenciamento do amplicon (moléculas de DNA previamente amplificadas em outras reações), por exemplo, é o método mais amplamente utilizado para caracterizar a diversidade microbiana (WANG *et al.* 2007). Aqui, o DNA de uma amostra de água e/ou solo, por exemplo, é extraído de todas as células da amostra.

O desenvolvimento do sequenciador de próxima geração (*Next Generation Sequencing* – NGS) foi de suma importância para agregar novos conhecimentos e romper barreiras tecnológicas anteriores. Cabezas *et al.* (2015) reportaram que os NGS promovem baixo custo e grande volume de dados em tempos reduzidos. Comumente, o que distingue as plataformas de sequenciamento são os fatores de precisão, que envolve: (i) o tamanho dos fragmentos dos pares de bases, (ii) o rendimento por corrida e (iii) o custo.

Dentre as principais regiões do 16S, a ser cuidadosamente escolhida, destacam-se as regiões V2 e V4 (WANG *et al.* 2007). Principalmente, em questões de definir novos filos bacterianos, e sequências bem distintas ao banco de dados. Neste caso, o sequenciamento do

16S inteiro é viável. No que concerne ao sequenciamento metagenômico, o tamanho dos fragmentos é de suma importância porque está intrinsecamente relacionado a identificar a função ou espécies de cada gene.

O rendimento da corrida (número de sequências identificadas) para caracterizar uma amostra, dependerá da diversidade de espécies na amostra, do tamanho do fragmento e região escolhida para o sequenciamento (DELFORNO, 2014).

No intuito de estimar maiores filos bacterianos em uma amostra, caso esse seja o objetivo, poucas sequências por amostra são necessárias. Entretanto, se a amostra apresenta elevada diversidade e espécies raras até níveis taxonômicos de família/gênero, vasto número de sequências pode ser necessário (DELFORNO, 2014).

Contudo, existem algumas desvantagens; primeiro, problemas na PCR pode causar falha na diversidade em uma comunidade microbiana (LOGARES *et al.* 2014; SHARPTON *et al.* 2014). Em segundo lugar, o sequenciamento do amplicon pode produzir estimativas amplamente variadas na resolução da taxa (LIU *et al.* 2008). Em terceiro lugar, o sequenciamento de amplificação, normalmente, fornece apenas uma visão da composição taxonômica da comunidade microbiana (LANGILE *et al.* 2013).

Dessa maneira, o sequenciamento massivo tem sido amplamente aplicado para caracterizar as populações taxonômica ou filogeneticamente e também, para conhecer os diversos grupos de micro-organismos envolvidos bem como associar seu metabolismo ao funcionamento do sistema. (FENG *et al.* 2018; YAN *et al.* 2019).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

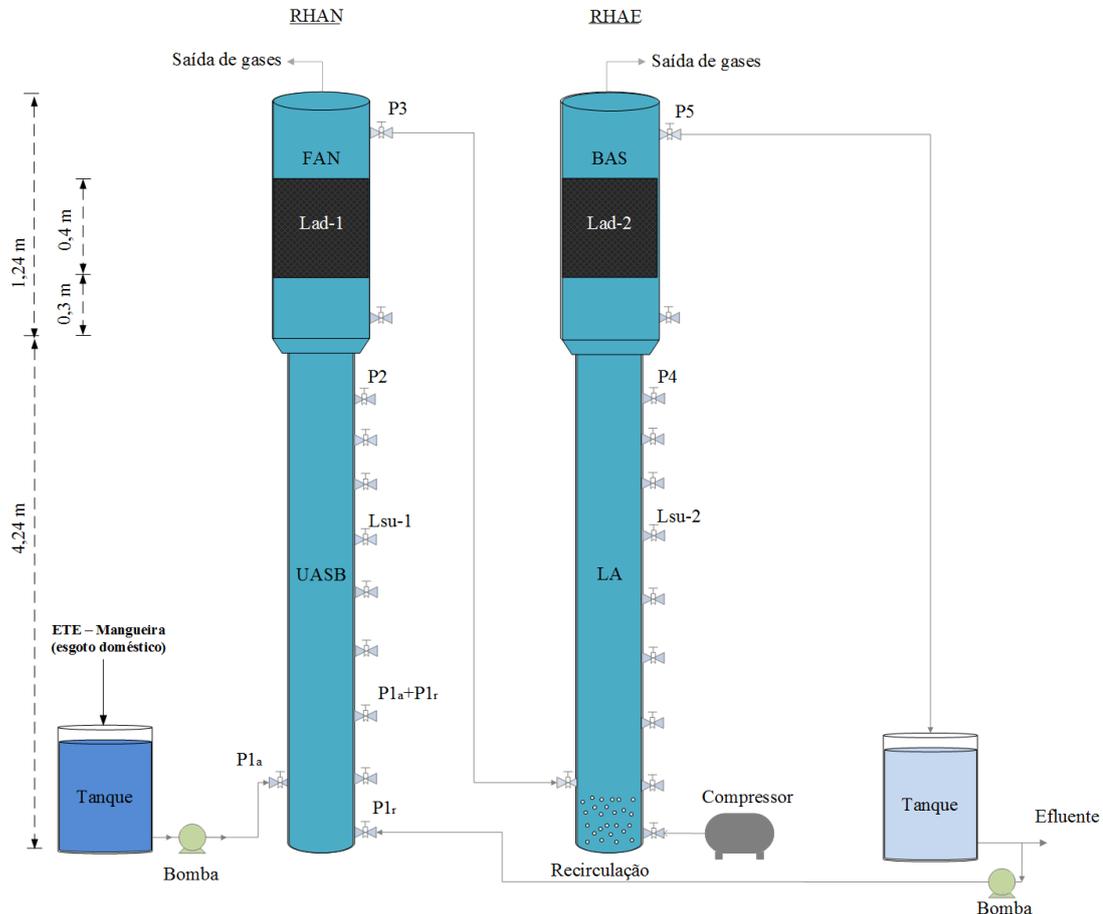
O presente trabalho foi dividido em dois experimentos; no experimento “A”, foram utilizados reatores híbridos com biomassa suspensa e aderida, em escala piloto, na estação experimental na ETE Mangueira. O experimento “B”, buscou-se o processo de nitrificação parcial-desnitrificação via nitrito utilizando reatores sequenciais anaeróbio-aeróbio, em escala de bancada., sendo desenvolvido no Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA), localizado no Departamento de Engenharia Civil e Ambiental da Universidade Federal de Pernambuco – DECIVIL/UFPE. Ambos experimentos, foram objetos de estudo de um doutorado, envolvidos especificamente na operacionalidade e comparação da eficiência de remoção de matéria orgânica e nitrogênio.

### 4.1.REATORES HÍBRIDOS ANAERÓBIO-AERÓBIO COM LODO SUSPENSO E ADERIDO (EXPERIMENTO A)

#### 4.1.1.Descrição e operação dos reatores híbridos

O sistema de tratamento era composto por dois reatores híbridos, cada qual com compartimentos ou câmaras de lodo suspenso e de lodo aderido. O primeiro reator híbrido era anaeróbio (RHAN), formado por uma câmara do tipo UASB e sobreposta por outra de filtro anaeróbio (FAN). Já o segundo era aeróbio (RHAE), composto por uma câmara de lodos ativados (LA) e sobreposta por outra com um biofilme aerado submerso (BAS). Os dois reatores híbridos foram confeccionados em fibra de vidro e as câmaras sobrepostas foram instaladas como apresentado na Figura 5. Anéis de conduíte de PVC (25x25 mm) foram utilizados como material suporte em leito com altura de 40 cm e instalado a 30 cm do fundo do FAN e do BAS. O sistema foi instalado e operado na estação de tratamento de esgotos domésticos (ETE) Mangueira, localizada na cidade de Recife-PE, que atendia aproximadamente 18000 habitantes (população de projeto), recebendo esgoto bruto, classificado como diluído (KATO *et al.* 2003).

Figura 5 - Representação esquemática dos reatores híbridos, anaeróbio (RHAN: UASB + FAN) e aeróbio (RHAE: LA + BAS). Dimensões das câmaras UASB e LA (altura x diâmetro): 4,24 x 0,30 m (volume 300 L); FAN e BAS: 1,24 x 0,40 m (volume 156 L). Os pontos de amostragem para o afluente, recirculação, mistura entre o afluente e o efluente recirculado, efluente do UASB, efluente do FAN efluente do LA e efluente do BAS estão representados por **P1a**, **P1r**, **P1a+P1r**, **P2**, **P3**, **P4**, **P5**, respectivamente. Os pontos de coleta de biomassa suspensa e aderida para análise de biologia molecular estão representados por Lsu e Lad, respectivamente



Fonte: O Autor (2020).

A alimentação do sistema de reatores híbridos foi feita de forma contínua, em fluxo ascendente e com vazão de  $57 \text{ L.h}^{-1}$ , resultando em TDH total de 16 horas, sendo 8 h em cada reator. A vazão de ar aplicada no RHAE (LA+BAS) foi  $25 \text{ L.min}^{-1}$ , com aeração por ar difuso utilizando compressor com pistão de ar (Schulz, modelo Patric Air) com deslocamento teórico de  $283 \text{ L.min}^{-1}$ , resultando em concentração média de oxigênio dissolvido (OD) de  $3,0 \pm 0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ , medida em amostra específica coletada no primeiro registro a partir do fundo do LA. O efluente final do sistema (efluente do BAS) foi recirculado para o RHAN (afluente do UASB) no intuito de promover a desnitrificação, conforme razões de recirculação descritas na Tabela 7.

A operação do sistema durou 500 dias e foi dividida em cinco fases (I), com diferentes razões de recirculação (RR) variando de 0,5 a 1,50 (Tabela 7). Balanços de massa de matéria

orgânica e nitrogênio foram efetuados para diferentes condições operacionais nas fases estudadas. As cargas orgânicas e nitrogenadas diárias aplicadas foram determinadas no afluente das câmaras de cada reator do sistema e no efluente final do sistema.

Tabela 7 - Condições operacionais aplicadas no sistema de tratamento com reatores híbridos com lodo suspenso e aderido durante o período experimental

Fases	Tempo	TDH	Recirculação		$V_{asc}$	COV	CNA
	operacional (d)	total (h)	(L.h <sup>-1</sup> )	(%)	(m.h <sup>-1</sup> )	(g DQO m <sup>-3</sup> .d <sup>-1</sup> )	(g N.m <sup>-3</sup> .d <sup>-1</sup> )
<b>Ia</b>	105	16	28,50	50	1,21	1149	88,8
<b>Ib</b>	125	16	42,75	75	1,41	1212	91,5
<b>Ic</b>	88	16	57,00	100	1,61	512	78,9
<b>Id</b>	97	16	71,25	125	1,81	866	97,2
<b>Ie</b>	85	16	85,50	150	2,01	919	98,1

$V_{asc}$ : velocidade ascensional. COV: carga orgânica volumétrica. CNA: carga nitrogenada aplicada.

Fonte: O Autor (2020).

Os reatores híbridos utilizados neste estudo foram operados em trabalho de pesquisa anterior. Desta forma, a partida foi, portanto, uma continuidade da operação da pesquisa de Celestino (2017). No início do período experimental já existia uma biomassa ativa, cuja concentração era 15,6 g SSV.L<sup>-1</sup> no compartimento UASB do RHAN e de 1,4 g SSV.L<sup>-1</sup> no reator LA do RHAÉ. A determinação dos sólidos SST e SSV foi realizada a cada 15 dias para as duas fases experimentais, onde foram coletadas amostras de lodo nos registros ao longo dos reatores (Figura 5). Com o perfil de sólidos, determinava-se a sua concentração média. Do final da fase Ia Até a fase Ie a concentração de SSV no UASB aumentou para 18,6 e 26,4 g SSV. L<sup>-1</sup>, respectivamente. Enquanto que a concentração de SSV no LA aumentou para 1,4 e 3,6 g SSV.L<sup>-1</sup>.

#### 4.1.2 Monitoramento físico-químico do sistema

Para as análises físico-químicas de amostras líquidas, foram coletadas amostras no esgoto bruto afluente (P1a, Figura 5) e nos efluentes das quatro câmaras do sistema híbrido (pontos P2, P3, P4 e P5, respectivamente). O controle da idade do lodo, foi calculada com base na perda de sólidos com o efluente do UASB e do LA, como sendo a concentração de SSV no último registro, obtida na determinação do perfil de sólidos a cada 15 dias, quando se calculava também a massa existente dentro de cada reator. Os valores ao longo das fases variaram entre 30 e 45 dias para o UASB e entre 5 e 12 dias para o LA.

As amostras líquidas foram coletadas duas vezes por semana para as determinações analíticas, seguindo-se as recomendações do *Standard Methods* (APHA, 2012): demanda

química de oxigênio total (DQO); nitrogênio total Kjeldahl (N-NTK); nitrogênio amoniacal ( $\text{N-NH}_4^+$ ); alcalinidade parcial (ALCP); nitrogênio nitrito ( $\text{N-NO}_2^-$ ) e nitrogênio nitrato ( $\text{N-NO}_3^-$ ), sólidos suspensos totais (SST) e voláteis (SSV). A DQO particulada (DQOP) foi calculada pela diferença da DQO total com a DQO filtrada (DQOF), esta determinada utilizando-se uma membrana de 1,2  $\mu\text{m}$ . Nitrogênio total (N-NT) se refere à soma de todas as formas de nitrogênio.

Medições *in situ* de OD, potencial hidrogeniônico (pH) e temperatura (TEMP) foram realizados por um analisador multiparâmetro (HACH, modelo 40D).

#### 4.1.3 Extração de DNA e PCR-DGGE de amostras de lodo

Para identificação dos micro-organismos envolvidos, foram coletadas amostras de lodo suspenso e aderido dos dois reatores híbridos; no caso do lodo contido nos efluentes, foram coletadas amostras líquidas para posterior centrifugação e filtração nos pontos P3 do reator FAN e P5 do reator BAS (Figura 5). Todas as coletas foram efetuadas ao final da fase Ia, aos 105 dias, Ib aos 230 dias, Ic aos 318 dias, Id aos 415 dias e Ie aos 500 dias do monitoramento do experimento.

No caso dos pontos Lsu-1 e Lsu-2, coletava-se 300 mL de amostra, sendo transferidos 50 mL para um tubo Falcon e centrifugado; após descartar o sobrenadante, o lodo era lavado e novamente centrifugado (3000 RPM, 5 min, 24°C) com tampão fosfato salino (TFS) para remoção de impurezas. Retirou-se depois 0,4 g de lodo para a extração do DNA utilizando o kit comercial PowerSoil™ DNA Isolation Kit (Mobio Laboratories, Califórnia, EUA). A concentração do DNA foi avaliada por espectrofotometria (relação 260/280 nm) utilizando o espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, EUA).

No caso dos pontos P3 e P5, foram coletadas amostras do efluente e transferia-se uma alíquota de 50 mL para um tubo Falcon para centrifugação nas mesmas condições de Lsu-1 e Lsu-2 e posterior descarte do sobrenadante; o lodo foi também lavado com o mesmo tampão TFS e adicionava-se depois 40 mL de água ultra pura (resistividade 18,2 M $\Omega$ .cm e condutividade < 1  $\mu\text{S.cm}^{-1}$  a 25 °C, Milli-Q Reference, Merck-Millipore, Brasil) para homogeneizar e posterior filtração em membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  (Schleicher e Schuell: SeS, Alemanha). Posteriormente, as membranas foram recortadas em diminutos tamanhos e adicionadas naquele mesmo kit comercial anterior para a extração do DNA do lodo.

No caso dos pontos Lad-1 e Lad-2, primeiramente foram retiradas oito peças de conduíte no interior do leito com meio suporte, colocando-as em tubos Falcon e posteriormente no congelador (-8 °C) por 3 horas. Após este período, o lodo aderido era raspado com uma espátula e transferido para outro tubo Falcon. Similarmente, foi adicionado 40 mL do tampão TFS, centrifugado e descartado o sobrenadante; retirou-se então 0,4 g do lodo para a extração do DNA. Após a quantificação do DNA, essas amostras foram preservadas a -20 °C.

Os extratos de DNA genômico foram submetidos à amplificação pela técnica da PCR utilizando diferentes iniciadores (*primers*) para bactérias oxidantes de amônia (BOA) (190 Forward (F) – 1225 Reverse (R)), *Nitrospira* (232F - 1200R), bactéria desnitrificante (nirS 2F - nirS 3R) e bactéria Anammox (368F – 820R, experimento B). De acordo com os estudos de Hikuma *et al.* (2002), Lim *et al.* (2008), Shoji *et al.* (2006) e Schmid *et al.* (2001). Bem como, os *primers* 1400FGC-1100R (Kudo *et al.* 1997) R e 968FGC-1392R (Nielsen *et al.* 1999) para os domínios *Archaea* e *Bacteria*, respectivamente.

Os tampões utilizados, em ambos os experimentos, na técnica da PCR foram Tris-EDTA (TE, 10 mM Tris HCl e 1,0 mM EDTA, pH 7,5 a 8,0) e Tris-Acetato-EDTA (TAE, 80 mM Tris base, 2,0 mM EDTA e 40 mM Acetato de sódio, pH 7,4). As soluções e modelos empregadas na técnica da PCR podem ser observadas na Tabela 8.

Tabela 8 - Insumos utilizados na ferramenta da Reação em Cadeia Polimerase (PCR)

Soluções	Insumos utilizados
Tampão de reação 10x	Invitrogen (Life Technologies)
Mg <sup>2+</sup>	Invitrogen (Life Technologies)
dNTPs	New England Biolabs (N04465)
968F - GC; 1392R (primer universal)	Invitrogen (Life Technologies)
1100F - GC; 1400R (primer universal)	Invitrogen (Life Technologies)
190F;1225R (primer específico)	Invitrogen (Life Technologies)
232F;1200R (primer específico)	Invitrogen (Life Technologies)
nirS 2F; nirS 3R (primer específico)	Invitrogen (Life Technologies)
Taq. Polimerase	Platinum Taq DNA polymerase Invitrogen (Life Technologies)

Fonte: O Autor (2020).

As concentrações e volumes das reações de PCR estão apresentados na Tabela 9. As extrações obtidas para as amostras analisadas foram submetidas à amplificação pela técnica da PCR utilizando diferentes iniciadores (*primers*) para o domínio *Bacteria*.

Tabela 9 - Planejamento para a Reação em Cadeia Polimerase (PCR) para Domínio *Bacteria*. X1 foi o volume por reação para 1 amostra e X5 foi o volume por reação para 4 amostras + 1 amostra (Controle Negativo – sem DNA)

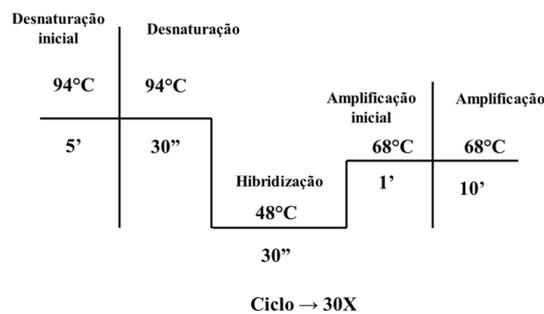
Solução	volume por reação (X <sub>1</sub> )	volume estoque (X <sub>5</sub> )
10 x Buffer (tampão)	5,0 µL	25 µL
Mg <sup>+2</sup> 50 Mm	2,0 µL	10 µL
dNTPs 10 Mm	1,0 µL	5 µL
968F-GC	2,0 µL	10 µL
1392R	2,0 µL	10 µL
DNA 10 ng/µL	1,0 µL	5 µL
Taq polim. 5U/ µL	0,2 µL	1,0 µL
Água ultra-pura	36,3 µL	184 µL
Volume final	50,0 µL	250 µL

Fonte: O Autor (2020).

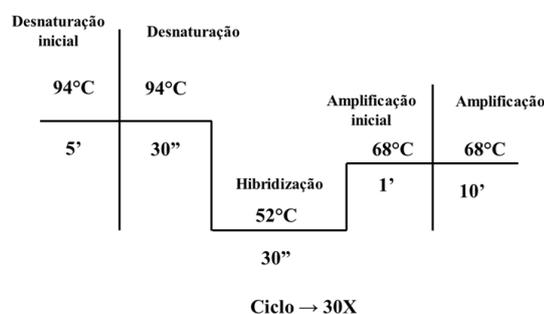
Desse modo, foi elaborado um protocolo ideal para a amplificação dos primers universais, reportada por estes autores (KUDO *et al.* 1997; NIELSEN *et al.* 1999) e específicos (SCHMID *et al.* 2001; HIKUMA *et al.* 2002; SHOJI *et al.* 2006; LIM *et al.* 2008), podendo ser visualizado na Figura 6.

Figura 6 - Protocolo de amplificação para *primers* universais (A) e específicos (B).

**A**



**B**



Fonte: O Autor (2020).

Todos os pares de *primers* utilizados para as amplificações (dois experimentos) podem ser observados na Tabela 10.

Tabela 10 - Primers utilizados para a Reação em Cadeia Polimerase (PCR)

Primers universais	Sequência (5' → 3')	Referência
<b>Bacteria</b>		
BAC 968F <sup>a</sup> - GC	AACGCGAAGAACCTTAC	Nielsen <i>et al.</i> (1999)
BAC 1392R	ACGGGCGGTGTGTRC	
<b>Archaea</b>		
1100 F <sup>a</sup> - GC	AACCGTCGACAGTCAGGYAACGAGCGAG	Kudo <i>et al.</i> (2007)
1400 R	CGGCGAATTCGTGCAAGGAGCAGGGAC	
Primers específicos	Sequência (5' → 3')	Referência
<b>Bactéria oxidante de amônia</b>		
190F	GGAGAAAAGCAGGGGATCG	Hikuma <i>et al.</i> (2002)
1225R	CGCCATTGTATTACGTGTGA	
<b>Nitrospira</b>		
232F	GCTCATGTCCTATCAGCTTG	Lim <i>et al.</i> (2008)
1200R	AGGCATAAAGGCCATGCTG	
<b>Bactéria desnitrificante</b>		
nirS 2F	TACCACCCCGAGCCGCGCGT	Shoji <i>et al.</i> (2006)
nirS 3R	GCCGCCGTCGTGCAGGAA	
<b>Bactéria Anammox</b>		
368F	CCTTTCGGGCATTGCGAA	Schmid <i>et al.</i> (2001)
820R	AAAACCCCTCTACTTAGTGCCC	Schmid <i>et al.</i> (2001)

a- É necessário utilizar sequência rica em GC unida ao extremo 5' do primer: 5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC GCC-3' para os resultados na DGGE.

Fonte: O Autor (2020).

As condições das corridas das PCRs foram otimizadas para uma voltagem de 85 Volts (V), 400 mA (miliampère) e tempo de corrida de 55 minutos. Os gradientes foram gerados utilizando uma cuba de eletroforese (Mini sub cell, BioRad); bem como, o tampão utilizado foi o TAE.

Se o resultado for positivo, pode-se verificar pela presença de bandas no gel, entretanto se o resultado da PCR for negativo, é verificado pela ausência de bandas no gel, e implica que o domínio ou gênero investigado estava ausente na amostra, ou estava abaixo do limite da detecção da técnica.

Os produtos da PCR foram submetidos a uma eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE), ao qual foi realizado pelo método descrito por Muyzer *et al.* (1993). As condições dos gradientes para a formação do gel de DGGE para o domínio *Bacteria* apresentou uma variação de 40% até 60% de ureia e formamida (UF) e 8% de acrilamida (AA). As condições para as formações dos gradientes podem ser visualizadas na Tabela 11.

Tabela 11 - Condições para a formação do gradiente para a eletroforese em gel de gradiente desnaturante

Condições	AA e UF 0%	AA e UF 80%	APS (10%)	TEMED	Volume final (Vf)
Alta	3,5 mL	10,5 mL	100 µL	10 µL	14 mL
Baixa	7,0 mL	7,0 mL	100 µL	10 µL	14mL
Stacking	8,0 mL	-	50 µL	5 µL	8 mL

Fonte: O Autor (2020).

As condições da eletroforese foram otimizadas para uma temperatura de  $T = 60^{\circ}\text{C}$ , voltagem = 250 V e tempo de corrida de 5 horas. Os gradientes foram gerados usando um formador de gradientes de duas câmeras com agitação magnética na câmera de saída. O tampão de corrida foi o TAE.

Após a formação do gel (PCR ou de DGGE) corou-se o mesmo em brometo de etídio ( $0,5 \mu\text{g/mL}$ ) e observou-se com o auxílio de um transiluminador UVP de luz ultravioleta (UV). As imagens dos géis foram registradas por um sistema de captura de imagem L – PIX – ST Loccus do Brasil. Os marcadores de peso molecular utilizados foram 1 kb plus DNA ladder e o 100 pb DNA ladder.

As referências dos equipamentos utilizados nas técnicas da PCR e DGGE podem ser observadas na Tabela 12.

Tabela 12 - Referência dos equipamentos utilizados na PCR e DGGE

<b>Equipamentos</b>	<b>Modelo</b>
Kit de extração do DNA	PowerSoil™ DNA Isolation Kit (MOBIO)
Centrifuga	351R (MPW)
Vortex	Genie 2
Termociclador	My cycler (Bio Rad)
Transiluminador	UVP
Capturador de imagens	L-Pix-St (Loccus dos Brasil)
Espectrofotômetro	Nanodrop 2000 (Thermo scientific)
Pipetas automáticas	Labmate Soft (HT polonia)
DGGE	Universal mutation detection system (DCODE™)

Fonte: O Autor (2020).

#### 4.1.4 Tratamentos estatístico dos dados

Foram elaborados gráficos em dispersão para a apresentação e discussão dos resultados utilizando métodos paramétricos para análise de variância (ANOVA); e foi aplicada a correlação linear para oito variáveis físico-químicas: TEMP, pH, OD, DQO, ALCP,  $\text{N-NH}_4^+$ ,  $\text{N-NO}_3^-$ , e SSV com nível de confiança de 95%. O estudo do agrupamento dos dados e do efeito multivariado no desempenho dos reatores foi realizado a partir da análise das componentes principais (ACP) para um conjunto de 75 dados (15 em cada fase) do efluente do BAS, daquelas 8 variáveis supracitadas. A ACP foi realizada utilizando o software Statistica 7.0 (StatSoft-Six Sigma). A normalidade dos dados foi verificada através do teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO E WILK, 1965) (Apêndice A).

## 4.2. REATORES SEQUENCIAIS ANAERÓBIO COM LODO SUSPENSO E AERÓBIO COM LODO ADERIDO (EXPERIMENTO B)

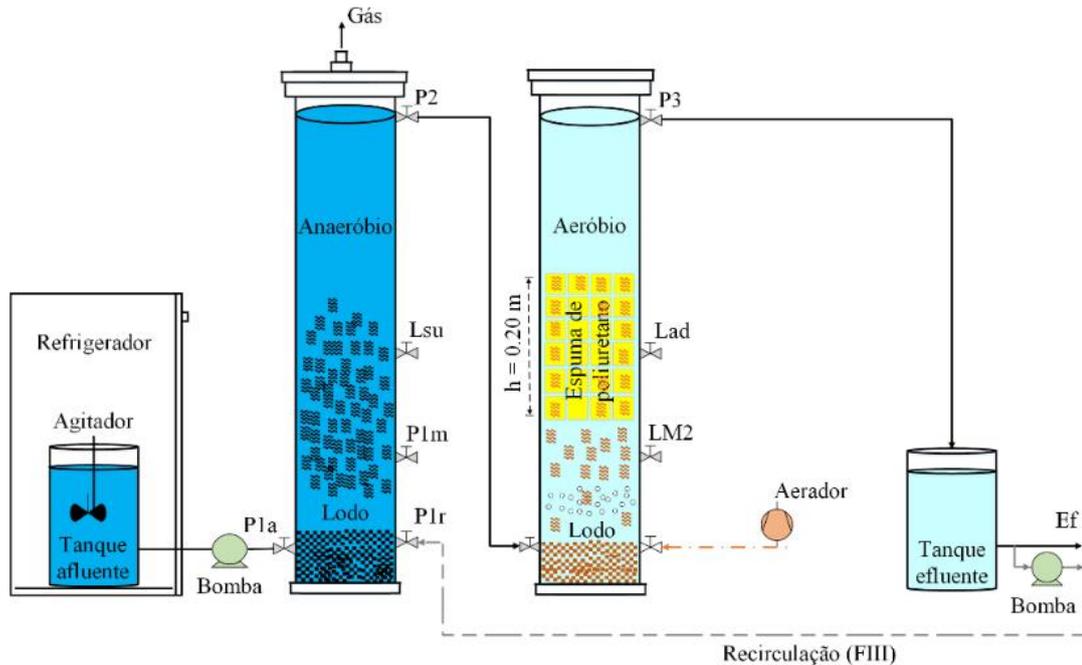
### 4.2.1. Descrição e operação dos reatores sequenciais anaeróbio com lodo suspenso e aeróbio com lodo aderido

O sistema de tratamento utilizado com dois reatores sequenciais construídos em tubos de PVC (Figura 7): um primeiro, anaeróbio (RAN) tipo UASB com lodo suspenso, mas sem separador trifásico; e um segundo, aeróbio (RAE), com lodo aderido, também de fluxo ascensional. O RAE foi preenchido com meio suporte de cubos (1 cm) de espumas de poliuretano (12g) com densidade D33. Uma tela de aço galvanizado foi utilizada para que os cubos ficassem fixos e ocupassem cerca de 20 cm na altura média do RAE.

Cada reator tinha um volume útil de 4,3 L e um tempo de detenção hidráulica (TDH) de 9,1 horas, sendo o TDH total do sistema de 18,2 h (Tabela 13). A operação do sistema foi dividida em três fases (F) com duração de 51, 53 e 46 dias, respectivamente, totalizando 150 dias de operação. A alimentação do sistema foi realizada por meio de uma bomba dosadora peristáltica DMC 400 (MS Tecnopon, Brasil). O equipamento possuiu vazão controlada, porém semanalmente era conferida por medição direta (volume x tempo) com vazão afluyente de 11,3 L.d<sup>-1</sup>. A vazão de ar aplicada para o RAE foi de 0,7 a 1,5 L.min<sup>-1</sup>, com aeração por ar difuso utilizando bomba eletromagnética de ar ACO-001 (Resun, China) com deslocamento teórico máximo de 38 L.min<sup>-1</sup>.

As concentrações de oxigênio dissolvido (OD) no RAE foram (mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>): 3,0 ± 0,1 mg.L<sup>-1</sup> (FI) e 1,5 ± 0,1 mg.L<sup>-1</sup> (FII e FIII). Em FIII, o sistema foi operado com recirculação do efluente do RAE para o RAN utilizando uma bomba peristáltica Hei Flow (Heidolph, Alemanha) em uma razão de 0,25 em relação à vazão afluyente, no intuito de promover a desnitrificação via nitrito. As características de cada fase aplicadas aos reatores, como período de operação, TDH, vazão de recirculação (Q<sub>REC</sub>), razão de recirculação (RR), velocidade ascensional (V<sub>asc</sub>), carga orgânica volumétrica (COV) e carga nitrogenada aplicada (CNA), são apresentadas na Tabela 13.

Figura 7 - Representação esquemática dos reatores sequenciais anaeróbio-aeróbio, em escala de bancada. Pontos de coleta de amostras líquidas: P1a = afluente do RAN; P1r = afluente do RAN da recirculação do efluente do RAE; P1m = mistura dos afluentes P1a e P1r; P2= efluente do RAN; P3 = efluente do RAE e EF: efluente do sistema. Pontos de coleta de lodo: Lsu = lodo suspenso do RAN na sua parte média; Lad = lodo aderido do RAE na sua parte média (região dos cubos com biomassa aderida). Ponto LM2 = descarte de lodo do RAE. Altura: 60 cm, diâmetro: 10 cm, volume total: 4,7 L e volume útil: 4,3 L.



Fonte: O Autor (2020).

Balances de massa de matéria orgânica e nitrogênio foram efetuados para as diferentes condições operatórias nas fases FI, FII e FIII. As cargas aplicadas (massa/tempo) foram determinadas no afluente e efluente de cada reator do sistema.

Tabela 13 - Condições operacionais aplicadas no sistema de tratamento com reatores anaeróbio (lodo suspenso) e aeróbio (lodo suspenso e aderido) sequenciais durante o período experimental

Fases	Tempo operacional (d)	TDH* total (h)	RR (%)	V <sub>asc</sub> (m.h <sup>-1</sup> )	OD (mg.L <sup>-1</sup> )	COV (g DQO m <sup>-3</sup> .d <sup>-1</sup> )	CNA (g N.m <sup>-3</sup> .d <sup>-1</sup> )
<b>FI</b>	51	18,2	0	0,06	3,0	1148	96
<b>FII</b>	53	18,2	0	0,06	1,5	1091	94
<b>FIII</b>	46	18,2	25	0,07	1,5	1075	96

\*TDH total = TDH no RAN (9,1h) + TDH no RAE (9,1h). A vazão afluente foi mantida em torno de 11,3 L.d<sup>-1</sup>

Fonte: O Autor (2020).

#### 4.2.2. Característica do esgoto sintético

A composição do esgoto doméstico sintético foi adaptada de Moura *et al.* (2012) e era composta por (em mg.L<sup>-1</sup>): extrato de carne (208), sacarose 20% (35), amido comercial 60% (114), celulose em pó 20% (34), cloreto de amônio (140), NaCl (249,7), MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (6,9),

CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (4,5) e NaHCO<sub>3</sub> (1000). A solução de micronutrientes adicionada foi preparada de acordo com Touzel e Albagnac (1983). A água residuária sintética, contendo os macro e micronutrientes, foi preparada duas vezes por semana e armazenada em recipiente de 20 L (tanque afluente, Fig. 1) sob refrigeração (7 a 10 °C) para evitar a degradação e alteração da composição inicial.

#### **4.2.3. Monitoramento físico-químico dos reatores sequenciais anaeróbio com lodo suspenso e aeróbio com lodo aderido**

Para as análises físico-químicas, além do esgoto bruto afluente (P1a, Figura 7), foram coletadas amostras dos efluentes dos dois reatores sequenciais (pontos P2 e P3, respectivamente). O controle da idade do lodo dos reatores, considerou-se o ponto P1m (RAN) e LM2 (RAE) foram considerados para o eventual descarte do excesso de lodo.

Durante os experimentos, amostras foram coletadas duas vezes por semana nos reatores e os seguintes parâmetros foram analisados: DQO; nitrogênio total Kjeldahl (N-NTK); nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>); alcalinidade parcial (ALCP); nitrogênio nitrito (N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>); nitrogênio nitrato (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>); sólidos suspensos totais (SST) e voláteis (SSV). Medições *in situ* de OD, potencial hidrogeniônico (pH) e temperatura (TEMP) foram realizados por um medidor multiparâmetro (HACH, modelo 40D, EUA). Todos foram determinados de acordo com o *Standard Methods* (APHA, 2012).

Para o cálculo da DQO particulada, utilizou-se um filtro de 1,2 µm. Amostras do efluente do RAE foram utilizadas para calcular a razão de acúmulo de nitrito (RAN<sub>I</sub>) (YAN *et al.* 2019), seguindo a Equação 15:

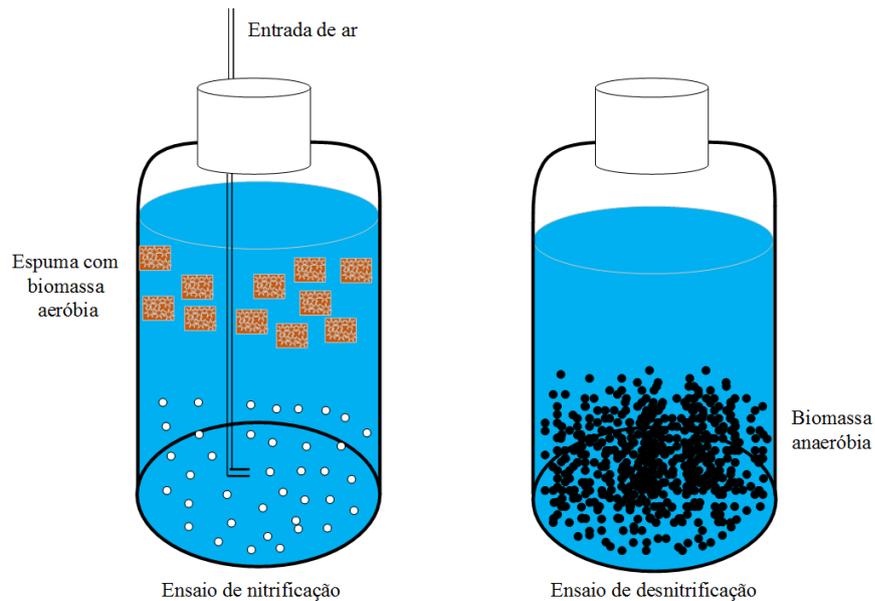
$$RAN_I = \frac{N-NO_2^-}{N-NO_2^- + N-NO_3^-} \times 100 \quad (\text{Eq. 15})$$

#### **4.2.4. Ensaios cinéticos para determinar as velocidades aparentes de nitrificação e desnitrificação**

Ensaios cinéticos com a biomassa aderida (Lad) do RAE e a suspensa (Lsu) do RAN, foram realizados para determinar as velocidades aparentes de nitrificação e desnitrificação. A coleta das biomassas foi feita no último dia de operação do sistema (dia 150). Os ensaios foram divididos em quatro etapas distintas, sendo: duas de nitrificação (via N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) e duas de desnitrificação (via N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> e N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Para isso, foram utilizados frascos de

Duran<sup>®</sup> de 500 mL com volume útil de 400 mL e a mesma composição nutricional aplicada aos reatores (Figura 8). Os ensaios foram realizados em duplicata e os procedimentos estão descritos adiante. Para a modelagem cinética, foram considerados os perfis temporais da concentração de cada componente no meio líquido.

Figura 8 - Esquema dos reatores em batelada (frascos de Duran<sup>®</sup> 500 mL) utilizado nos ensaios cinéticos de nitrificação e desnitrificação.



Fonte: O Autor (2020).

Diante disso, o método integral foi utilizado para a determinação da ordem de reação e para modelar um sistema em batelada.

A função de velocidade de nitrificação e desnitrificação foi determinada de acordo com a Equação 16 (MOURA, 2011):

$$(-r_N) = \frac{dC_N}{dt} = k.f(C_N) \quad (\text{Eq. 16})$$

Onde:

$r_N$  = Velocidade específica de consumo de nitrogênio ( $\text{mg N.L}^{-1}.\text{gSSV}^{-1}.\text{h}^{-1}$ );

$C_N$  = Concentração de nitrogênio por unidade de massa de SSV no tempo  $t$  ( $\text{mg N.L}^{-1}.\text{gSSV}^{-1}$ );

$k$  = constante de velocidade depende da ordem da reação e do modelo cinético;

$f(C_N)$  = função a ser avaliada, dependente da concentração de nitrogênio;

$t$  = tempo (horas).

Os perfis temporais das concentrações de  $\text{N-NH}_4^+$ ,  $\text{N-NO}_2^-$  e  $\text{N-NO}_3^-$  nos experimentos foram descritos por reações de ordem zero. Dessa maneira, a velocidade  $r$  foi determinada

conforme a Equação 16. Ao integrar esta Equação, foi obtida a expressão para a variação da concentração específica de nitrogênio ( $C_N$ ) com o tempo ( $t$ ) (Equação 16);  $C_0$  é a concentração inicial de nitrogênio no tempo inicial  $t_0$  e  $k_0$  a constante cinética específica de ordem zero ( $\text{mg N.L}^{-1}.\text{gSSV}^{-1}$ ) (Equação 17).

$$(-r_N) = \frac{dC_N}{dt} = k_0 \quad (\text{Eq. 17})$$

Em que:

$k_0$  = constante cinética específica de ordem zero ( $\text{mg N.L}^{-1}.\text{gSSV}^{-1}$ ).

Integrando a Equação 16 de uma constante inicial de nitrogênio ( $C_{N0}$ ) em um tempo inicial  $t_0$  para uma concentração  $C_N$  no tempo  $t$ , obtém-se a expressão que indica a variação da concentração específica de nitrogênio linearmente com o tempo (Equação 18).

$$C_N = C_{N0} - k_0 \cdot (t - t_0) \quad (\text{Eq. 18})$$

#### 4.2.4.1. Ensaios de nitrificação via N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>

Duas soluções foram preparadas: uma contendo 30  $\text{mg.L}^{-1}$  de NH<sub>4</sub>Cl e outra contendo 25  $\text{mg.L}^{-1}$  de NaNO<sub>2</sub> para os ensaios de nitrificação via N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, respectivamente. NaHCO<sub>3</sub> (1,0  $\text{g.L}^{-1}$ ) foi adicionado para que não houvesse limitação de fonte de carbono para os micro-organismos nitrificantes. Para os testes em duplicata, 200 cubos de espumas de poliuretano (~ 8,0 g) contendo biofilme foram removidos do RAE (ponto Lad, Figura 7). A concentração de biomassa utilizada nos testes via N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> foi 0,69 e 0,72  $\text{g SSV.L}^{-1}$ , respectivamente. Para a determinação dos sólidos, a biomassa foi removida do meio de suporte com o auxílio de um bastão de vidro. Em seguida, o material foi centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos. O precipitado foi colocado em cápsula previamente calcinada para secagem em estufa a 120 °C, sendo posteriormente colocados em uma mufla a 500 °C. A concentração de OD foi mantida próxima a 1,5  $\text{mg.L}^{-1}$  por meio de um aerador (Modelo S-510, JAD, Brasil) conectado a um pedra porosa para uma melhor difusão de ar no meio líquido. Em uma incubadora rotativa (Modelo N11713, Nova Etica, Brasil), os frascos foram mantidos sob agitação (120 rpm) e temperatura próxima a 30 ± 1 °C. Amostras de 40 mL foram coletadas a cada 30 minutos até que as formas iniciais de nitrogênio em cada teste (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) não fossem mais detectadas.

#### 4.2.4.2. Ensaios de desnitrificação via N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> e N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>

Uma solução contendo 20 mg.L<sup>-1</sup> de NaNO<sub>3</sub> foi preparada para os ensaios de desnitrificação via N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Os dados para a desnitrificação via N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> foram obtidos a partir da concentração de nitrito formada ao longo do experimento. Assim como nos testes anteriores, NaHCO<sub>3</sub> (1,0 g.L<sup>-1</sup>) foi utilizado. Acetato de sódio (CH<sub>3</sub>COONa, 1,5 g.L<sup>-1</sup>) foi utilizado como doador de elétrons para a desnitrificação heterotrófica. Aproximadamente 400 mL de biomassa foram coletadas no RAN (ponto Lsu, Figura 7) e, em cada frasco, a concentração de biomassa foi 0,74 g SSV.L<sup>-1</sup>. Os frascos foram lacrados e a purga de oxigênio do *headspace* foi feita com N<sub>2</sub> (100%) durante 3 minutos. As condições de agitação, temperatura e coleta foram as mesmas aplicadas aos ensaios de nitrificação.

#### 4.2.5. Extração de DNA e PCR-DGGE de amostras de lodo

Para a extração de ácido desoxirribonucleico (DNA) e PCR do lodo, foram coletadas amostras nos pontos Lsu e Lad (Figura 7). Todas as coletas foram efetuadas ao final da fase FI aos 51 dias, da fase FII aos 104 dias e da fase FIII aos 150 dias do monitoramento do experimento.

No caso dos pontos Lsu e Lad, coletava-se 50 mL de amostra e em seguida, transferidos para um tubo Falcon para centrifugação (3000 RPM, 5 min., 24°C); após descartar o sobrenadante, o lodo era lavado e novamente centrifugado com tampão fosfato salino (TFS) para remoção de impurezas. Retirava-se depois 0,4 g do lodo para a extração do DNA utilizando o kit comercial PowerSoil™ DNA Isolation Kit (Mobio Laboratories, Califórnia, EUA). A pureza do DNA foi avaliada por espectrofotometria (relação 260/280 nm) utilizando o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, EUA).

Os extratos de DNA genômico foram submetidos à amplificação pela técnica da PCR utilizando os conjuntos de iniciadores (*primers*) 190F/1225R (Hikuma *et al.* 2002) e nirS 2F/nirS 3R (Shoji *et al.* 2006) para bactérias oxidante de amônia e desnitrificante, respectivamente; bem como, o primer 968F-GC-1392R (Nielsen *et al.* 1999) para o domínio *Bactéria*.

Os produtos da PCR para o domínio *Bacteria* foram submetidos à eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) e corrido em Dcode systems (Bio-Rad). As condições de gradiente para a formação do gel para bactéria apresentaram uma variação de 40% até 60% de ureia e formamida (UF) e 8% de acrilamida (AA). As condições de eletroforese foram

otimizadas para uma temperatura de  $T = 60^{\circ}\text{C}$ , voltagem = 250 V e tempo de corrida de 5 horas. Os gradientes foram gerados usando um formador de gradientes de duas câmeras com agitação magnética na câmera de saída. O tampão de corrida foi o tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE).

Após verificar a diversidade das bandas na análise de DGGE, as amostras foram escolhidas para o sequenciamento massivo; logo, 20  $\mu\text{L}$  das amostras de DNA extraídas foram enviadas para o laboratório Neoprospecta (Florianópolis-SC), onde foram sequenciadas. A identificação das arqueias e bactérias foram realizadas utilizando-se o sequenciamento de alto desempenho das regiões V3/V4 do gene 16S rRNA utilizando os primers 341F-806R (WANG E QIAN, 2009), uma vez que este par de *primers* têm grande cobertura taxonômica em bactérias e arqueias (TAKAHASHI *et al.* 2014). O sequenciamento foi realizado no equipamento MiSeq (Illumina Inc., USA), utilizando o kit V2 de 300 ciclos, *single-end*.

A estrutura da comunidade microbiana das amostras de Lsu e Lad das três fases foram analisadas através do servidor MG-RAST (versão 4,0) (MEYER *et al.* 2008), considerando o filtro de qualidade de leitura (E) maior que 99%. Quantidades iguais de *amplicon* purificado foram reunidas para sequenciamento subsequente. Sequências com similaridade maior que 97% foram agrupadas em uma unidade taxonômica operacional (OTU), e a análise subsequente da informação biológica foi baseada em unidade taxonômica operacional (*operational taxonomic unit*: OTU).

#### 4.2.6. Tratamentos estatístico dos dados

Representações de gráficos em dispersão foram elaboradas para a apresentação e discussão dos resultados. Métodos paramétricos de análise de variância (ANOVA) e correlação linear foram aplicados para 9 variáveis físico-químicas: TEMP, pH, OD, DQOP, ALCP, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, e SSV com nível de confiança de 95%. O estudo do agrupamento dos dados e do efeito multivariado no desempenho dos reatores foi realizado a partir da ACP para um conjunto de 45 dados do efluente do RAE (ponto P3) para as variáveis supracitadas (15 para cada fase). A ACP foi realizada utilizando o software Statistica 7.0 (StatSoft-Six Sigma). A normalidade dos dados foi verificada através do teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO E WILK, 1965) (Apêndice B).

## 5. RESULTADOS

Na primeira seção foram apresentados os resultados do experimento “A”, no que concerne à caracterização do esgoto bruto do sistema de tratamento. Posteriormente, os resultados físico-químicos dos reatores híbridos anaeróbio-aeróbio, com recirculação do efluente nitrificado (condições relatadas na metodologia) e os resultados da biologia molecular.

Em relação ao experimento B, foram apresentados o desempenho dos reatores sequenciais anaeróbio-aeróbio nas remoções de concentrações e eficiências descritas na metodologia. Bem como, a caracterização da comunidade microbiana por meio das ferramentas da PCR-DGGE e sequenciamento massivo.

### 5.1. DESEMPENHO DOS REATORES HÍBRIDOS ANAERÓBIO-AERÓBIO, EM ESCALA PILOTO (EXPERIMENTO A)

#### 5.1.2. Caracterização do esgoto bruto afluyente do sistema

O esgoto bruto da ETE Mangueira, com tratamento prévio composto por grades de barras e caixa de areia, foi utilizado como afluyente dos reatores híbridos. Assim, a partir de 83 coletas, foi realizada a caracterização do esgoto por meio dos seguintes parâmetros: temperatura, pH, potencial redox, alcalinidade parcial e total, sólidos totais e suspensos, DQO (bruta e filtrada) e nitrogênio (NTK, amoniacal, nitrito e nitrato).

Os valores médios do afluyente ao sistema (P1a, Figura 5), para as fases experimentais, confirmaram que se tratava de um esgoto diluído, como observado em trabalhos anteriores (KATO *et al.* 2003; BONFIM *et al.* 2016). A Tabela 14 apresenta os valores mínimos, médios e máximos referentes à caracterização do esgoto bruto afluyente utilizado no estudo, ao longo de 500 dias de operação.

A temperatura afluyente não apresentou variância significativa durante o período do estudo, com valor médio de  $27,7 \pm 0,9$  °C (Tabela 14). Zhang *et al.* (2014) e Zhou *et al.* (2016) afirmaram que bactérias nitrificantes não são resistentes aos distúrbios provocados por redução de temperatura; assim, reduz a capacidade de nitrificação. Já o valor médio de pH  $7,1 \pm 0,1$  ficou entre a faixa (6,5 a 8,0) para as melhores eficiências de nitrificação (PAREDES *et al.* 2007).

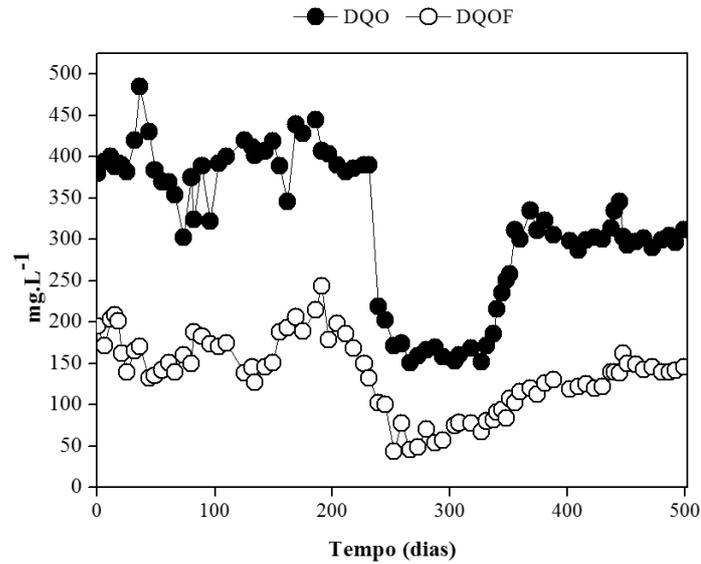
Tabela 14 - Valores mínimos, médios e máximos obtidos na caracterização de esgoto bruto do sistema de tratamento

Parâmetro	Unidade	N	Mínimo	Média	Máximo	Desvio Padrão
Temperatura	°C	83	26,3	27,7	30,0	0,9
pH	-	83	6,8	7,1	7,5	0,1
Alcalinidade parcial (AP)	mg.L <sup>-1</sup>	83	82,0	175,6	240,0	38,7
Alcalinidade total (AT)	mg.L <sup>-1</sup>	83	124,0	230,6	414,0	63,5
Relação AP/AT	-	83	0,48	0,79	1,23	0,16
Sólidos totais	mg.L <sup>-1</sup>	83	450,0	812,2	1428	196,3
Sólidos totais fixos	mg.L <sup>-1</sup>	83	246,0	441,2	828,0	133,7
Sólidos totais voláteis	mg.L <sup>-1</sup>	83	141,0	377,6	640,0	107,1
Sólidos suspensos totais	mg.L <sup>-1</sup>	83	168,0	312,0	457,0	70,6
Sólidos suspensos fixos	mg.L <sup>-1</sup>	83	95,0	191,2	278,0	50,6
Sólidos suspensos voláteis	mg.L <sup>-1</sup>	83	60,0	120,0	184,0	33,1
DQO bruta	mg.L <sup>-1</sup>	83	151,0	317,8	485,0	86,6
DQO filtrada	mg.L <sup>-1</sup>	83	44,0	136,9	243,0	43,3
Relação DQO filt/br	-	83	0,26	0,43	0,60	0,07
Nitrogênio total de Kjeldahl	mg.L <sup>-1</sup>	83	23,6	30,3	36,4	2,5
Nitrogênio amoniacal	mg.L <sup>-1</sup>	83	16,2	23,0	27,4	2,0
Nitrogênio nitrito	mg.L <sup>-1</sup>	83	0,0	0,0	0,1	0,1
Nitrogênio nitrato	mg.L <sup>-1</sup>	83	0,0	0,0	0,1	0,1

Fonte: O Autor (2020).

No que concerne à DQO bruta afluente, a concentração média foi de  $317,8 \pm 86,6$  mg.L<sup>-1</sup>. Na fase Ia e Ib, que representou os primeiros 250 dias de experimento, apresentaram-se com as maiores concentrações. Na fase IC, foi possível observar uma significativa diminuição na concentração de DQO afluente, com concentração média de  $170,7 \pm 19,0$  mg.L<sup>-1</sup>. O período chuvoso promoveu a diluição do esgoto bruto afluente. Entretanto, após o período chuvoso a concentração de DQO aumentou (fases Id e Ie). A DQO filtrada teve concentração média de  $136,9 \pm 43,3$  mg.L<sup>-1</sup>, apresentando valor mínimo e máximo de 44,0 e 243,0 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 9).

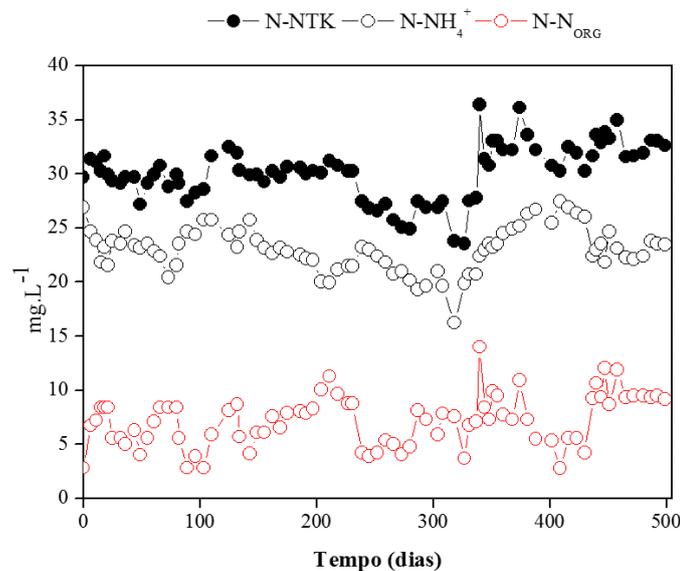
Figura 9 - Concentração de DQO bruta e filtrada no afluente do sistema durante o período do estudo



Fonte: O Autor (2020).

No que tange ao nitrogênio, as concentrações médias foram  $30,3 \pm 2,5$ ,  $23,0 \pm 2,0$  e  $7,3 \pm 2,3$   $\text{mg.L}^{-1}$  para N-NTK, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, respectivamente (Figura 10), presentes no afluente dos reatores híbridos. No que concerne ao nitrogênio orgânico (N-N<sub>ORG</sub>), a concentração média no afluente foi de  $7,3 \pm 2,3$   $\text{mg.L}^{-1}$ . Assim, as formas de nitrogênio amoniacal e orgânico afluente foram 77% e 23%, respectivamente. As formas oxidadas de nitrogênio (N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> e N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) apresentaram concentrações próximas a zero no afluente.

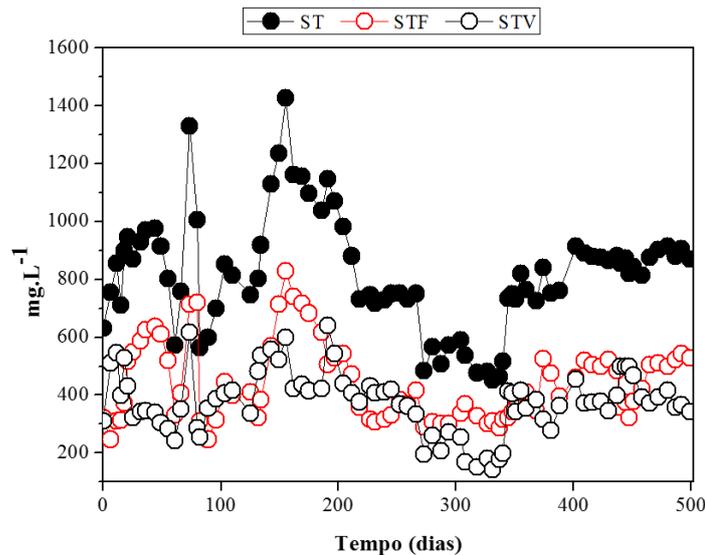
Figura 10 - Concentração de N-NTK, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e N-N<sub>ORG</sub> no afluente do sistema durante o período do estudo



Fonte: O Autor (2020).

A Figura 11 apresentam as concentrações de sólidos totais no esgoto bruto com concentração média de  $812,2 \pm 196,3 \text{ mg.L}^{-1}$ . Já a concentração média de sólidos totais fixos de  $441,2 \pm 133,7 \text{ mg.L}^{-1}$  sugeriu que, provavelmente, oriundo de distúrbios ocorridos na caixa de areia presente na ETE Mangueira.

Figura 11 - Concentração de sólidos totais, fixos e voláteis no afluente do sistema durante o período do estudo

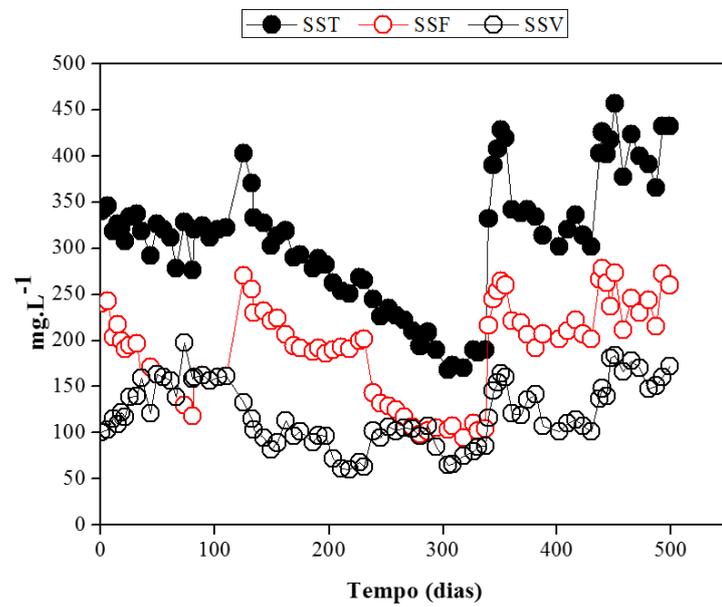


Fonte: O Autor (2020).

No tocante aos sólidos suspensos totais, a concentração média foi de  $312,1 \pm 70,6 \text{ mg.L}^{-1}$  (Figura 12). Já os sólidos suspensos voláteis, que representaram a biomassa tiveram valor médio de  $120,0 \pm 33,1 \text{ mg.L}^{-1}$  (Tabela 14).

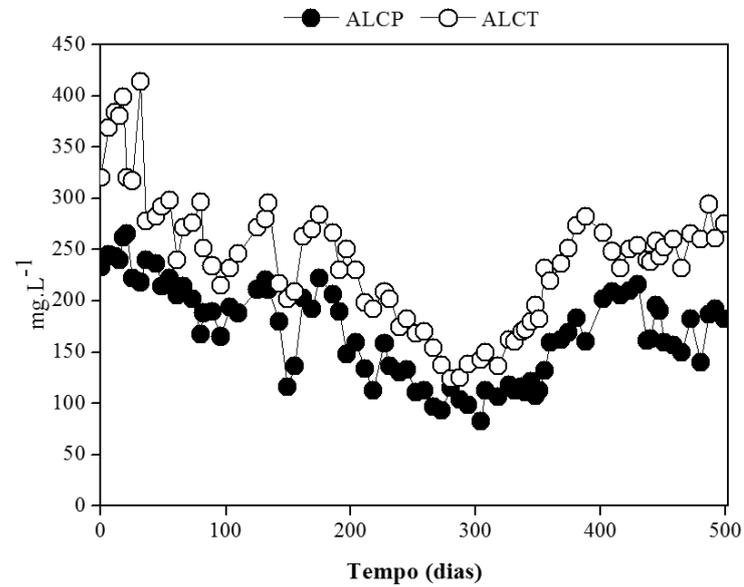
No que concerne à alcalinidade, o esgoto bruto do sistema apresentou concentrações favoráveis para o crescimento de bactérias nitrificantes, visto que as concentrações médias de alcalinidade total (ALCT) e parcial (ALCP) foram  $230,6 \pm 63,5 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $175,6 \pm 38,7 \text{ mg.L}^{-1}$  (Figura 13), respectivamente, com relação AP/AT de  $0,79 \pm 0,16$ . Tal relação ficou próxima ao estudo de Moraes (2015) com o valor de 0,74, utilizando o mesmo esgoto bruto. Sabe-se que a alcalinidade do esgoto bruto é uma variável interferente no controle do processo de nitrificação, visto que na oxidação da amônia, ocorre o consumo de alcalinidade de  $7,05 \text{ g CaCO}_3/\text{g N-NH}_4^+$ , devido a produção de ácido (RITTMANN E MCCARTY, 2001).

Figura 12 - Concentração de sólidos suspensos, fixos e voláteis no afluente do sistema durante o período do estudo



Fonte: O Autor (2020).

Figura 13 - Concentração de alcalinidade parcial (ALCP) e alcalinidade total (ALCT) afluente do sistema durante o período do estudo



Fonte: O Autor (2020).

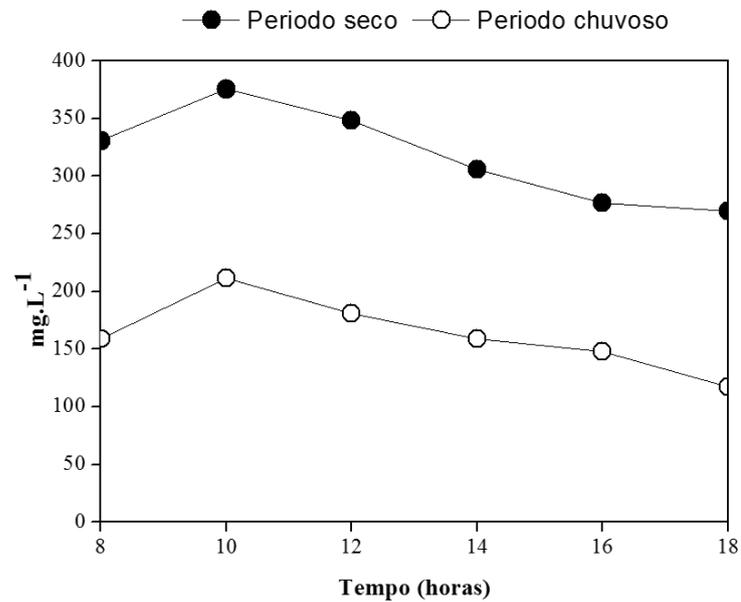
Tendo em vista a alta interferência da precipitação pluviométrica, em relação às características do afluente dos reatores híbridos, dois perfis temporais foram realizados, sendo um no período seco e outro no período chuvoso. A cada 2 horas, foram coletadas amostras do afluente entre às 8 e 18 horas. As variáveis analisadas na caracterização temporal foram: pH, temperatura, alcalinidade (parcial e total), DQO (bruta e filtrada), nitrogênio (N-NTK, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> e N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>).

Em Pernambuco, as estações do ano apresentam-se dividida em dois períodos distintos: um chuvoso e outro seco. Segundo a Agência Pernambucana de Águas e Clima (APAC), na região do litoral de Pernambuco, o período chuvoso, em geral, ocorre de junho a setembro. Assim, em junho de 2017 foi realizado o perfil temporal no período chuvoso, com precipitação acumulada de 487,0 mm (APAC, 2020a). Nesse perfil, a temperatura ficou entre 26,6 e 28,3°C, com temperatura mais baixas na coleta das 18 horas. Já o pH variou entre 6,9 e 7,2.

Em relação ao período seco, corresponde aos meses de outubro a fevereiro. Então, em novembro de 2017, foi realizado o perfil temporal no período seco, com precipitação acumulada de 14,8 mm (APAC, 2020b). A temperatura variou entre 28,2 e 30,5 °C com temperatura mais amena na coleta das 18 horas, neste perfil. Em relação a variável pH, o valor ficou ente 7,2 e 7,6.

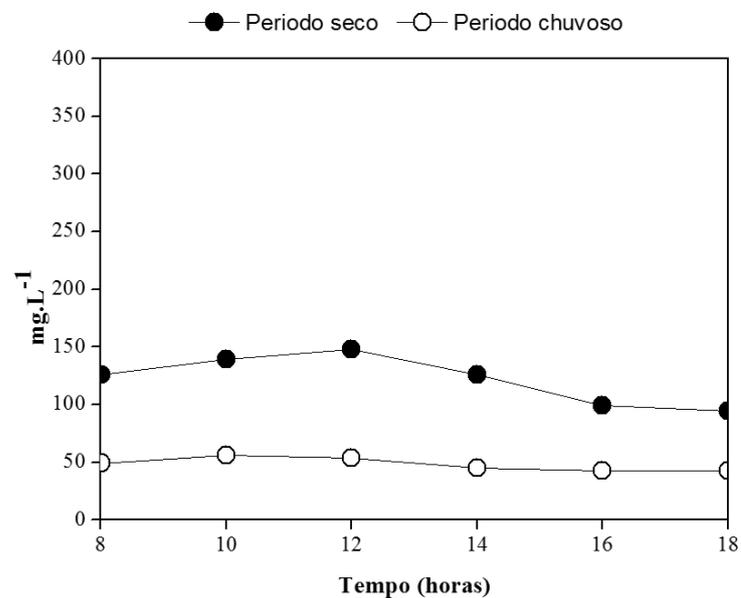
Em relação à matéria orgânica no perfil temporal do período chuvoso, a DQO bruta esteve bem diluída, com concentrações próximas a 200 mg.L<sup>-1</sup> (Figura 14). Já no perfil temporal do período seco, as concentrações de DQO bruta ficaram entre 270 e 375 mg.L<sup>-1</sup>. A DQO filtrada apresentou-se com concentrações inferiores a 200 mg.L<sup>-1</sup> (Figura 15) no período chuvoso e seco, respectivamente. Assim, as concentrações no período seco ficaram entre 94 e 148 mg.L<sup>-1</sup>. Já no período chuvoso, as concentrações variaram entre 43 e 56 mg.L<sup>-1</sup>.

Figura 14 - Concentração afluyente do sistema para a variável DQO bruta no perfil temporal do período chuvoso e seco



Fonte: O Autor (2020).

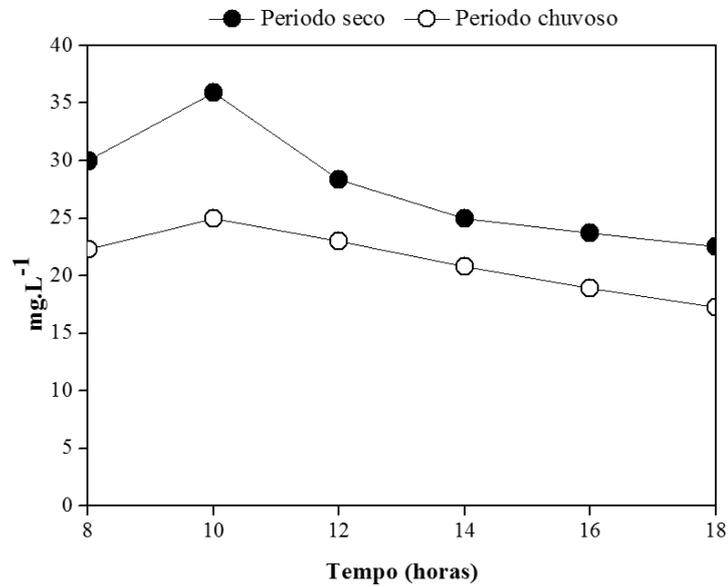
Figura 15 - Concentração afluyente do sistema para a variável DQO filtrada no perfil temporal do período chuvoso e seco



Fonte: O Autor (2020).

A Figura 16 apresentou o perfil temporal de nitrogênio NTK com concentrações entre 22,5 e 35,9 mg.L<sup>-1</sup>, no período seco. No perfil temporal do período chuvoso as concentrações variaram entre 17,2 e 25,0 mg.L<sup>-1</sup>.

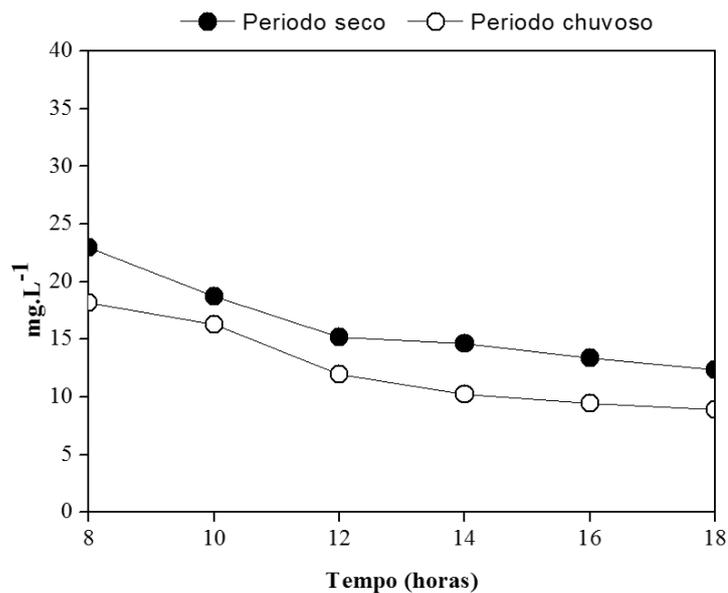
Figura 16 - Concentração afluyente do sistema para a variável N-NTK no perfil temporal do período chuvoso e seco



Fonte: O Autor (2020).

No que concerne ao nitrogênio amoniacal, as concentrações variaram entre 12,3 e 23,0 mg.L<sup>-1</sup> com valor médio de  $16,2 \pm 4,0$  mg.L<sup>-1</sup> no período seco (Figura 17). No período chuvoso, a concentração variou de 8,9 a 18,2 mg.L<sup>-1</sup> e média de  $12,5 \pm 3,9$  mg.L<sup>-1</sup>.

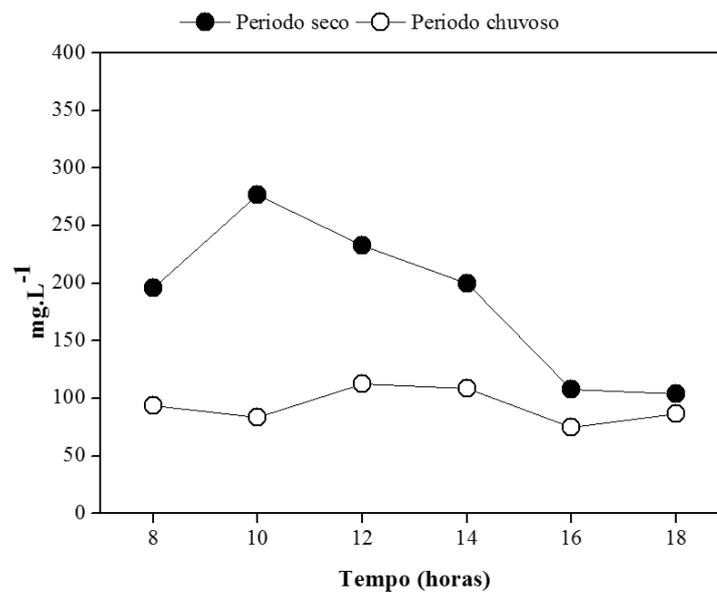
Figura 17: Concentração afluyente do sistema para a variável de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> no perfil temporal do período chuvoso e seco



Fonte: O Autor (2020).

No que concerne à alcalinidade, o afluente da ETE Mangueira era viável para o sistema, visto que apresentou capacidade de tamponamento e confirmado no perfil temporal chuvoso com contrações entre 74,8 e 112,4 mg.L<sup>-1</sup> (Figura 18). Como também, no período seco com concentrações entre 104,0 e 276,9 mg.L<sup>-1</sup>.

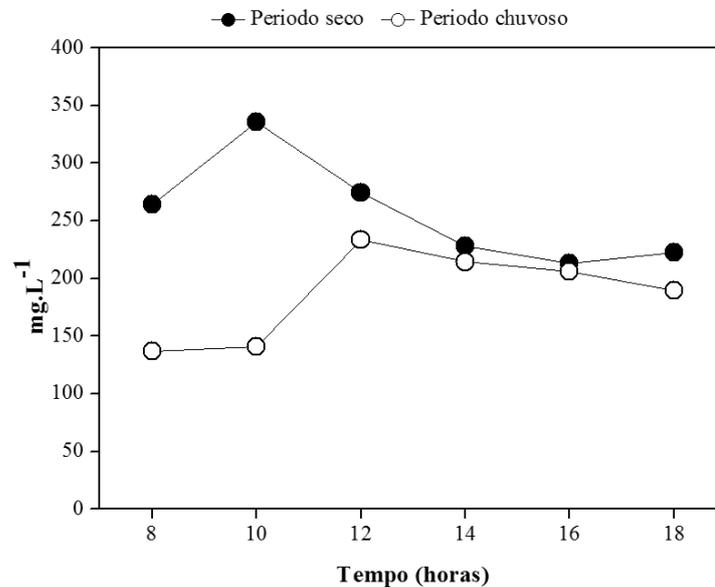
Figura 18 - Concentração afluente do sistema para a variável alcalinidade parcial no perfil temporal do período chuvoso e seco



Fonte: O Autor (2020).

Em relação à alcalinidade total, o perfil temporário do período seco as concentrações variaram entre 213,4 a 335,8 mg.L<sup>-1</sup>, com média 256,4±45,7 (Figura 19). No que tange ao período chuvoso, as concentrações variaram entre 137,1 a 233,7 mg.L<sup>-1</sup> e média de 186,9±39,8 mg.L<sup>-1</sup>. Assim, possíveis distúrbios provocados pela digestão anaeróbia no RHAN e nitrificação no RHAE foram evitados.

Figura 19 - Concentração afluente do sistema para a variável alcalinidade total no perfil temporal do período chuvoso e seco



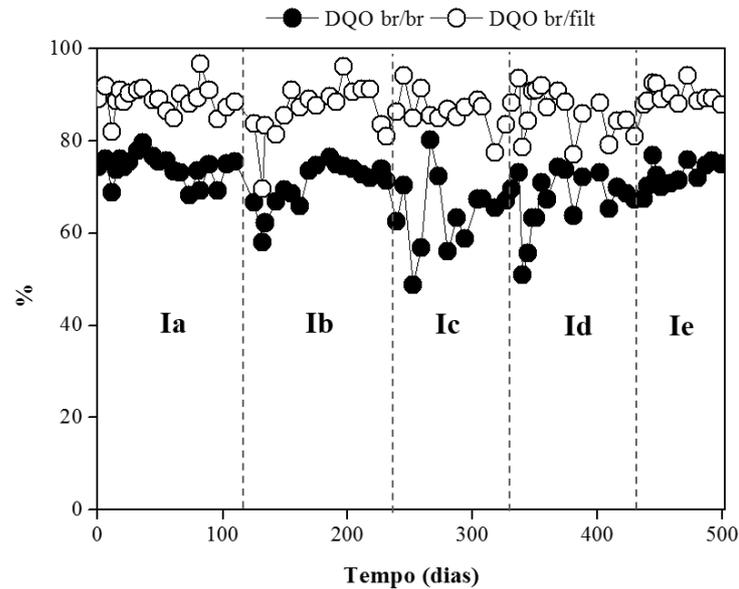
Fonte: O Autor (2020).

### 5.1.3. Desempenho dos reatores híbridos anaeróbio e aeróbio

Os resultados físico-químicos, análise de componentes principais e biologia molecular (PCR-DGGE) obtidos durante a operação dos reatores RHAN e RHAE foram discutidos nesta seção.

O primeiro reator híbrido era anaeróbio com a finalidade de remover matéria orgânica a fim de diminuir a competição das bactérias autotróficas e heterotróficas pelo substrato. A eficiência de remoção de DQO bruta no RHAN foi de  $74,1 \pm 3,0\%$ ,  $70,3 \pm 5,0\%$ ,  $65,3 \pm 7,9\%$ ,  $66,6 \pm 6,6\%$  e  $73,4 \pm 3,0\%$  nas fases Ia, Ib, Ic, Id e Ie. Quando considerado a DQO bruta afluente e a DQO filtrada efluente do RHAN, a remoção de matéria orgânica foi bastante satisfatória com valores de  $89,0 \pm 3,0\%$ ,  $86,5 \pm 5,9\%$ ,  $87,0 \pm 4,1\%$ ,  $85,6 \pm 4,9\%$  e  $89,7 \pm 1,9\%$  nas fases Ia, Ib, Ic, Id e Ie (Figura 20).

Figura 20 - Eficiência de remoção de DQO no RHAN nas fases operacionais estudadas sendo br/br a eficiência com base na DQO afluente e efluente bruta do RHAN e br/fil, a eficiência com base na DQO bruta afluente e DQO filtrada efluente do RHAN



Fonte: O Autor (2020).

O valor médio da DQO bruta efluente do RHAN (P3) foi de  $98,3 \pm 6,8$ ,  $120,6 \pm 22,2$ ,  $59,4 \pm 15,3$ ,  $94,5 \pm 9,9$  e  $81,5 \pm 10,3$   $\text{mg.L}^{-1}$ , para as fases Ia, Ib, Ic, Id e Ie, respectivamente (Tabela 15). Pode-se notar que mesmo com o aumento da razão de recirculação (RR), os filtros foram efetivos na retenção da biomassa. As concentrações de DQO filtrada efluente foram bastante estáveis independente das condições operacionais aplicadas, com valores médios de  $42,1 \pm 11,5$ ,  $57,1 \pm 7,9$ ,  $21,9 \pm 6,8$ ,  $41,5 \pm 14,4$  e  $31,6 \pm 5,9$   $\text{mg.L}^{-1}$ , para as fases Ia, Ib, Ic, Id e Ie. Na fase Ic, período chuvoso, a concentração afluente foi menor devido a diluição; contudo, a eficiência de remoção de matéria orgânica foi eficiente.

Tabela 15 - Valores médios das análises físico-químicas nas fases Ia a Ie durante o período experimental (500 dias) para as amostras nos pontos de coleta P2 a P3 (efluente do reator híbrido anaeróbio - RHAN)

<b>RHAN</b>					
Efluente do UASB (P2)					
Parâmetros	Fase Ia	Fase Ib	Fase Ic	Fase Id	Fase Ie
	RR = 0,50	RR = 0,75	RR = 1,00	RR = 1,25	RR = 1,50
Temperatura (°C)	29,2±1,2	28,4±0,4	27,0±0,1	28,3±1,1	29,6±0,7
pH	7,3±0,1	7,4±0,1	7,3±0,1	7,3±0,1	7,3±0,1
Potencial redox (mV)	-355,0±37,3	-290,9±45,0	-218,2±13,7	-215,6±20,7	-276,7±30,5
Oxigênio dissolvido (mg.L <sup>-1</sup> )	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1
DQO bruta (mg.L <sup>-1</sup> )	135,3±14,8	158,0±15,8	90,9±8,5	124,7±4,4	156,2±5,0
DQO filtrada (mg.L <sup>-1</sup> )	67,0±15,7	74,8±28,4	36,5±9,4	43,8±11,0	69,6±3,1
Alcalinidade parcial (mg.L <sup>-1</sup> )	232,2±38,5	210,1±17,7	144,8±23,3	218,3±41,0	217,7±25,9
N-NTK (mg.L <sup>-1</sup> )	29,6±1,2	30,4±0,9	26,3±1,3	32,4±1,7	32,7±1,0
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	29,6±1,2	30,4±0,9	26,3±1,3	32,4±1,7	32,7±1,0
N-NO <sub>2</sub> <sup>+</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
SSV (mg.L <sup>-1</sup> )	60,9±18,9	64,7±7,1	48,6±13,8	67,5±10,6	66,3±11,4
Efluente do FAN (P3)					
Parâmetros	Fase Ia	Fase Ib	Fase Ic	Fase Id	Fase Ie
	RR = 0,50	RR = 0,75	RR = 1,00	RR = 1,25	RR = 1,50
Temperatura (°C)	29,9±1,1	28,6±0,5	26,9±0,6	28,6±1,4	29,3±0,7
pH	7,5±0,1	7,4±0,1	7,2±0,1	7,3±0,1	7,2±0,1
Potencial redox (mV)	-376,9±44,5	-329,5±30	-124,2±13,3	-121,8±20,4	-121,7±53,4
Oxigênio dissolvido (mg.L <sup>-1</sup> )	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,2
DQO bruta (mg.L <sup>-1</sup> )	98,3±6,8	120,6±22,2	59,4±15,3	94,5±9,9	81,5±10,3
DQO filtrada (mg.L <sup>-1</sup> )	42,1±11,5	57,1±7,9	21,9±6,8	41,5±14,4	31,6±5,9
Alcalinidade parcial (mg.L <sup>-1</sup> )	235,2±29,6	232,1±19,5	138,5±27,2	207,1±24,3	217,7±25,9
N-NTK (mg.L <sup>-1</sup> )	29,1±1,4	30,2±1,0	25,9±1,5	32,3±1,6	32,7±1,0
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	29,1±1,4	30,2±1,0	25,9±1,5	32,3±1,6	32,7±1,0
N-NO <sub>2</sub> <sup>+</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	0,2±0,2	0,2±0,2	0,3±0,2	0,1±0,1	0,0 ± 0,0
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	0,2±0,2	0,1±0,1	0,1±0,1	0,0±0,0	0,0 ± 0,0
SSV (mg.L <sup>-1</sup> )	14,0±1,6	20,4±5,1	35,1±5,7	35,3±8,7	36,5±7,0

Fonte: O Autor (2020).

No tocante ao desempenho na remoção de matéria orgânica, a remoção global apresentou concentração final de DQO do sistema de tratamento (P5, efluente do BAS), entre 29,6 e 50,6 mg.L<sup>-1</sup> nas cinco fases estudadas (Tabela 16 e Figura 21A). A eficiência de remoção de matéria orgânica foi de 82% a 91% quando considerada DQO afluente bruta (DQObr/br) e a DQO efluente filtrada (DQObr/filt) de 93 a 97%.

Tabela 16 - Valores médios das análises físico-químicas nas fases Ia a Ie durante o período experimental (500 dias) para as amostras nos pontos de coleta P4 a P5 (efluente do reator híbrido aeróbio - RHAE)

<b>RHAE</b>					
Efluente do LA (P4)					
Parâmetros	Fase Ia	Fase Ib	Fase Ic	Fase Id	Fase Ie
	RR = 0,50	RR = 0,75	RR = 1,00	RR = 1,25	RR = 1,50
Temperatura (°C)	29,6±1,5	28,6±0,5	27,2±0,1	28,7±1,1	29,4±0,5
pH	7,0±0,1	7,2±0,1	7,2±0,1	7,2±0,1	7,2±0,1
Potencial redox (mV)	99,2±8,6	89,0±13,5	102,5±111,0	118,0±14,7	88,8±19,2
Oxigênio dissolvido (mg.L <sup>-1</sup> )	1,6 ± 0,2	1,7 ± 0,2	1,4±0,2	1,3±0,2	1,0±0,1
DQO bruta (mg.L <sup>-1</sup> )	64,4±21,0	71,5±16,1	35,8±12,9	52,6±7,3	67,5±9,7
DQO filtrada (mg.L <sup>-1</sup> )	22,3±8,6	32,6±6,1	12,1±4,7	16,5±5,8	33,4±8,9
Alcalinidade parcial (mg.L <sup>-1</sup> )	142,4±29,9	138,4±28,6	99,3±17,4	105,1±11,4	113,8±10,2
N-NTK (mg.L <sup>-1</sup> )	13,5±2,6	12,5±3,1	9,3±2,6	7,4±2,3	10,6±4,1
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	13,5±2,6	12,5±3,1	9,3±2,6	7,4±2,3	10,6±1,4
N-NO <sub>2</sub> <sup>+</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	1,4±0,3	1,2±0,3	1,3±0,3	1,6±0,7	0,7±0,3
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	9,0±1,7	5,2±1,7	2,3±0,2	1,7±0,2	1,4±0,3
SSV (mg.L <sup>-1</sup> )	33,2±10,9	32,3±9,9	66,7±7,9	65,6±10,9	82,0±11,6
Efluente do BAS (P5)					
Parâmetros	Fase Ia	Fase Ib	Fase Ic	Fase Id	Fase Ie
	RR = 0,50	RR = 0,75	RR = 1,00	RR = 1,25	TR = 150
Temperatura (°C)	29,9±1,1	28,7±0,5	27,2±0,1	29,0±1,3	29,8±0,7
pH	6,8±0,2	7,2±0,1	7,2±0,1	7,0±0,1	7,0±0,1
Potencial redox (mV)	171,5±39,6	116,8±11,6	179,4±32,0	171,3±24,3	126,9±27,6
Oxigênio dissolvido (mg.L <sup>-1</sup> )	2,1 ± 0,1	2,3 ± 0,3	1,8±0,3	1,5±0,2	1,0±0,1
DQO bruta (mg.L <sup>-1</sup> )	33,0±9,9	39,6±8,3	29,6±3,5	42,3±4,5	50,6±9,6
DQO filtrada (mg.L <sup>-1</sup> )	10,8±6,2	18,9±6,4	5,1±3,5	17,7±3,6	21,1±3,5
Alcalinidade parcial (mg.L <sup>-1</sup> )	78,0±24,7	96,1±7,1	81,3±19,3	79,6±10,1	83,8±6,7
N-NTK (mg.L <sup>-1</sup> )	7,4±1,8	6,6±0,7	5,8±3,5	5,2±2,2	7,0±2,9
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	7,4±1,8	6,6±0,7	5,8±3,5	5,2±2,2	7,0±2,9
N-NO <sub>2</sub> <sup>+</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	1,9±0,3	1,0±0,4	1,0±0,4	1,3±0,8	1,0±0,2
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	11,8±1,1	7,2±1,3	4,7±0,9	3,6±1,3	2,5 ±0,2
SSV (mg.L <sup>-1</sup> )	8,6±2,4	17,0±2,0	23,2±7,8	27,0±3,3	28,1±2,7

Fonte: O Autor (2020).

Os testes de análise de variância (ANOVA) e *Tukey* confirmaram diferença significativa entre as médias dos tratamentos ( $p < 0,05$ ) (Apêndice C). Avaliando o resultado das razões de recirculação na variável DQO, o teste *Tukey* apontou os tratamentos RR 1,00, RR 1,25 e RR 1,50 como as fases diferentes significativamente. O resultado sugeriu que o sistema foi mais eficiente nas duas primeiras fases. O aumento da recirculação promoveu o desprendimento da biomassa aderida do BAS; consequentemente, corroborou com o aumento das concentrações médias dos sólidos no efluente (ver adiante).

Pimenta (2011) operando reatores híbridos sequenciais anaeróbio (UASB + filtro anaeróbio - FAN) e aeróbio (biofiltro aerado submerso - BAS), em escala piloto, com TDH de 8 horas, RR de 0,0 a 2,0 e aeração de 4,0 mg.L<sup>-1</sup> com o objetivo de remover simultaneamente matéria orgânica e nitrogênio. Nestas condições foram obtidas concentrações médias de DQO entre 20 e 100 mg.L<sup>-1</sup> e eficiências de remoção de 77% a 84% no efluente do sistema do

primeiro conjunto. No segundo conjunto, estes valores ficaram entre 40 e 140 mg.L<sup>-1</sup> para a DQO média e remoção entre 72% a 84%.

Silva (2012) operando o mesmo reator com RR de 0,0 a 1,0 reportou eficiência de remoção de DQO entre 65% e 88%, com concentração média inferior a 100 mg.L<sup>-1</sup> no conjunto 1. No conjunto 2, obtiveram remoção de DQO entre 59% e 82%, com concentração média inferior a 92 mg.L<sup>-1</sup>.

Celestino (2017) operando RHAN (UASB + filtro anaeróbio - FAN) e RHAE (lodos ativados - LA + biofiltro aerado submerso - BAS), em escala piloto, com TDH de 8 horas, razão de recirculação (RR) de 0,0 a 0,5 e aeração de 6,0 mg.L<sup>-1</sup> no intuito de remover simultaneamente matéria orgânica e nitrogênio viabilizou concentração média de DQO entre 39 e 47 mg.L<sup>-1</sup> e eficiência 83% a 89%.

Os respectivos autores, operaram o reator híbrido aeróbio com OD próximo a 5,0 mg.L<sup>-1</sup>. Sabe-se que OD mais baixo (1,0 a 3,0 mg.L<sup>-1</sup>) favorecem o crescimento de bactérias heterotróficas, desnitrificantes e nitrificantes em biomassa aderida (FENG *et al.* 2018; YANG *et al.* 2019). No presente estudo, o OD disponibilizado ao RHAE foi próximo a 3,0 mg.L<sup>-1</sup>; provavelmente, tais condições não favoreceram uma biomassa mixotrófica no biofilme e confirmado por PCR (discutido mais adiante).

Morais (2015) operando dois reatores compartimentados anaeróbio/aeróbio/anóxico com TDH de 8 a 12 horas e RR de 0,0 a 3,0 e aeração de 2,5 mg.L<sup>-1</sup> obteve significativa remoção de matéria orgânica, com eficiências médias de remoção superiores a 80%. Sendo o melhor desempenho na remoção de matéria orgânica com TDH de 12 horas e RR de 1,5, com concentração média efluente de DQO bruta e filtrada de 119 e 50 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

A carga orgânica (CO) aplicada e removida no sistema apresentaram variações em função das condições operacionais aplicadas. O apêndice D apresenta as cargas orgânicas aplicadas no sistema em todas as fases operacionais em cada reator híbrido. A fase Ia, onde os reatores obtiveram o melhor desempenho na remoção de matéria orgânica, a CO aplicada foi de 523,9±53,0 g O<sub>2</sub>.d<sup>-1</sup>. Enquanto que a CO no BAS (ponto P5) foi de 67,7±18,2 g O<sub>2</sub>.d<sup>-1</sup> (Apêndice D).

O RHAN removeu uma parcela significativa da carga orgânica afluenta de 26,3, a 61,5%, considerando as cargas de entrada e saída. Nestas condições, a parcela remanescente menor no RHAE nas fases Ia a Ie de 162,5 a 291,0 g O<sub>2</sub>.d<sup>-1</sup> aplicadas ao LA, apresentou condições favoráveis ao processo de nitrificação, por operar com baixa relação DQO/N (CALLADO E FORESTI, 2001, METCALF E EDDY, 2016; FENG *et al.* 2018).

A eficiência acima de 70% mantida de sólidos suspensos voláteis no BAS nas fases estudadas demonstraram que, apesar do aumento da velocidade ascensional (Tabela 7) pelo aumento da RR de 0,5 a 1,5, o arraste do efluente no sistema foi minimizado pelos filtros. Logo, as concentrações foram inferiores ou próximas a 20 mg SSV.L<sup>-1</sup> (Ia e Ib) e inferiores a 30 mg.L<sup>-1</sup> (Ic, Id e Ie) (Figura 21B e Tabela 16).

O teste ANOVA e Tukey confirmaram diferenças significativas entre as médias dos tratamentos para o efluente do BAS (P5) ( $p < 0,05$ ). Os tratamentos RR 0,50, RR 0,75 e RR 1,00 foram as fases diferentes significativamente (Apêndice C). O resultado sugere que os filtros foram mais eficientes na retenção da biomassa nas três primeiras fases. Tais resultados corroboraram com as correlações fortes positivas obtidas entre DQO e SSV (Apêndice E); bem como, a formação de biofilme denso presente na superfície do material suporte (Apêndice F).

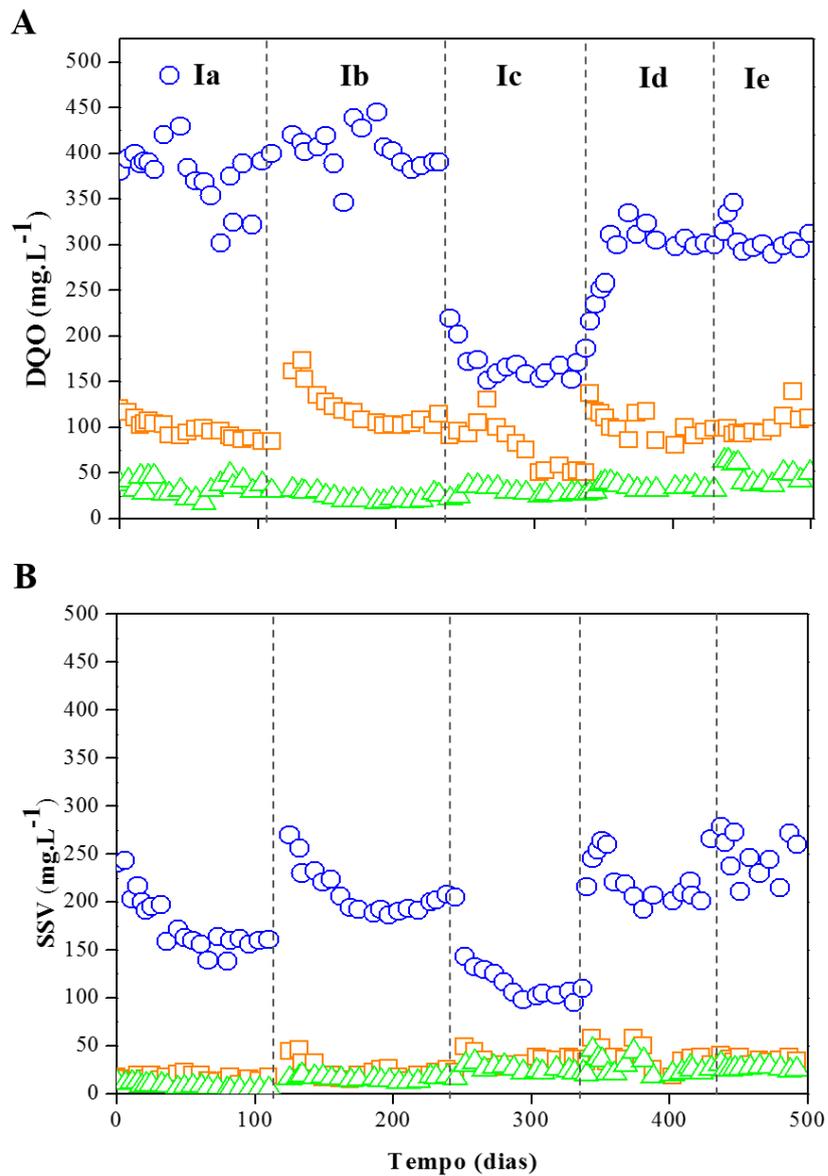
Pimenta (2011) operando reatores híbridos sequenciais anaeróbio-aeróbio, em escala piloto, com razão de recirculação (RR) de 0,0 a 2,0 viabilizou concentração média de SSV abaixo de 30 e 40 mg.L<sup>-1</sup> nos filtros anaeróbio (FAN) e biofiltro aerado submerso (BAS), respectivamente. Silva (2012) operando o mesmo reator com RR de 0,0 a 1,0 viabilizou eficiências de remoção de SSV entre 74% a 95%, com concentração média próxima a 40 mg.L<sup>-1</sup>.

Morais (2015) operando dois reatores compartimentados anaeróbio/aeróbio/anóxico indicou que o incremento da recirculação (0,0 a 3,0) e, principalmente, a diminuição do TDH de 12 para 8 horas ocasionou um aumento gradativo da concentração de SSV no efluente do sistema. Logo, as concentrações de SSV no efluente variaram entre 19 a 95 mg.L<sup>-1</sup>, no primeiro reator compartimentado. Enquanto, a média de SSV no efluente foram de 20 a 155 mg.L<sup>-1</sup> no segundo reator compartimentado.

Lim e Fox (2011) avaliaram o desempenho de um reator híbrido composto por um filtro anaeróbio e um filtro biológico aerado, alimentado com esgoto sintético, com recirculação de 1,0 a 3,0. As concentrações de DQO no efluente final foram de 13 a 27 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>; e de SSV ficaram próximas a 10 mg SSV.L<sup>-1</sup>. Leyva-Díaz *et al.* (2016) utilizaram um reator híbrido de biomassa suspensa para remoção de matéria orgânica e nitrogênio em esgoto municipal, com razão de recirculação entre 1,0 e 2,0 do efluente do compartimento aeróbio para o anaeróbio; as respectivas concentrações de DQO e de SSV no efluente foram 26 a 32 de mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> e 60 mg SSV.L<sup>-1</sup>.

Celestino (2017) operando reatores híbridos, com TDH de 8 horas e RR de 0,0 a 0,5 sugeriu que os FAN e BAS foram de suma importância para viabilizar concentração média de SSV de 20 mg.L<sup>-1</sup>. Entretanto, com o incremento da recirculação as eficiências de remoção diminuíram.

Figura 21 - Concentrações obtidas no afluente - P1 (○), efluente do FAN - P3 (□), efluente do BAS - P5 (△) durante a fase Ia (RR=0,50), fase Ib (RR=0,75), fase Ic (RR=1,00), fase Id (RR=1,25) e fase Ie (RR=1,50): A) DQO e B) SSV



Fonte: O Autor (2020).

No tocante à remoção de nitrogênio no sistema de tratamento (Figura 22A), observou-se que o processo de amonificação no RHAN foi proeminente em todas as cinco fases, uma vez que as concentrações de  $\text{N-NH}_4^+$  no efluente (ponto P3 de 25,9 a 32,7  $\text{mg.L}^{-1}$ ) foram iguais às de N-NTK, portanto, sem conteúdo de nitrogênio orgânico.

Nas cinco fases estudadas, uma pequena parcela de nitrito e nitrato recirculado (0,4 a 1,3  $\text{mg N-NO}_2^-.\text{L}^{-1}$  e 1,6 a 3,9  $\text{mg N-NO}_3^-.\text{L}^{-1}$ ) do RHAE para o RHAN, foi desnitrificada. Isso justifica os valores próximos a zero de nitrito e nitrato na saída do RHAN (Figura 22B, Tabela 15), sendo confirmado posteriormente a identificação de micro-organismos desnitrificantes neste reator (discutido adiante).

Harper e Pohland (1986) reportaram a importância do nitrogênio nitrito e nitrato na digestão anaeróbia, no intuito de evitar o colapso (azedamento) do reator. Assim, as formas nitrogenadas podem ser convertidas à bicarbonato e nitrogênio amoniacal e fornece alcalinidade ao sistema. Os valores de pH entre 7,3 a 7,5 e concentrações médias de 210,1 a 235,2  $\text{mg CaCO}_3.\text{L}^{-1}$  presentes no RHAN em Ia a Ie (Tabela 15), obtiveram o tamponamento no sistema.

A carga orgânica remanescente no efluente final (BAS, P5) foi de 67,7 a 173,0  $\text{g O}_2.\text{d}^{-1}$  dos quais 22,5 a 103,8  $\text{g O}_2.\text{d}^{-1}$  (Apêndice D) recircularam ao RHAN, representando um aumento de 4,3% a 24,8% comparando com a carga do afluente (UASB, P1), na disponibilidade de fonte de carbono para os micro-organismos heterotróficos.

Silva (2012) operando reatores híbridos observou o processo de desnitrificação quando foi introduzida a vazão de recirculação 0,5. Entretanto, nem todo o nitrato foi convertido a  $\text{N}_2$  no RHAN, visto que os níveis médios de OD nessa fase foram próximos a 0,7  $\text{mg.L}^{-1}$ . Na fase posterior, o aumento da RR de 1,0 favoreceu à concentração de nitrato próximo a zero, com valor médio de OD de 0,1  $\text{mg.L}^{-1}$ .

Morais (2015) utilizando reatores compartimentados viabilizou o processo de desnitrificação quando foi introduzida a vazão de recirculação de 1,5, assim as concentrações de nitrogênio nitrito e nitrogênio nitrato foram reduzidas gradativamente nas fases estudadas. Bem como, a atividade desnitrificante foi caracterizada pelo aumento da alcalinidade a bicarbonato no efluente tratado, com valores entre 123 a 146  $\text{mg.L}^{-1}$  para o reator compartimentado 1 e, de 181 a 193  $\text{mg.L}^{-1}$ , para o reator compartimentado 2.

Celestino (2017) utilizando reatores híbridos observou o processo de desnitrificação quando foi introduzida a vazão de recirculação 0,25, com concentrações de nitrogênio nitrito e nitrato próximos a zero.

Aesoy *et al.* (1998), Ruiz *et al.* (2006), Santos *et al.* (2016), Damianovic *et al.* (2018) apontaram que na relação DQO/N de 5 a 10, valores de pH entre 6 a 8 e temperatura próxima de 30°C, foram verificadas boas condições para a remoção simultânea de carbono e nitrogênio em reatores anaeróbios. No presente estudo, a temperatura entre 27,0 e 29,9°C e o pH entre 7,3 e 7,5 foram condições que favoreceram a atividade da biomassa desnitrificante a oxidar matéria orgânica e reduzir o nitrato a nitrogênio molecular. No entanto, a relação DQO/N ficou entre 6,5 e 13,2 no UASB e 3,9 a 5,2 no FAN nas fases estudadas, mas não inibiram o processo de desnitrificação.

O produto da amonificação do efluente do RHAN foi disponibilizado para os microorganismos nitrificantes no LA e no BAS (Tabela 15). Dada a baixa a relação DQO/N deste substrato (2,3 a 5,5), as bactérias heterotróficas no RHAE ficaram limitadas pela disponibilidade de carbono.

A correlação forte negativa entre  $N-NH_4^+$  e  $N-NO_3^-$  nas fases Ia (-0,80), Ib (-0,86), Ic (-0,72), Id (-0,60) e Ie (-0,74) corroboraram com a evidência do processo de nitrificação no RHAE. Bem como, a correlação linear positiva entre ALCP e  $N-NH_4^+$  (0,07 a 0,87), indicou como se esperava, sua maior ocorrência no RHAE (Apêndice E); e por consequência, provocando a diminuição da relação  $N-NH_4^+/ALCP$  de 0,10 a 0,07.

A nitrificação no RHAE resultou em concentrações médias de nitrogênio amoniacal em P5 de 7,4 (Ia), 6,6 (Ib) e 5,8 (Ic), 5,2 (Id) e 7,0 (Ie) mg  $N-NH_4^+ \cdot L^{-1}$  (Tabela 16 e Figura 22A) e corroboraram com a correlações negativas obtidas entre  $N-NH_4^+$  e  $N-NO_3^-$  (Apêndice E). Como a totalidade de N-NTK em P5 consistia somente de  $N-NH_4^+$ , as eficiências de remoção de N-NTK no sistema foram de 75% (Ia), 78% (Ib), 78% (Ic), 84% (Id) e 78% (Ie).

Adicionalmente, a nitrificação no RHAE promoveu em termos médios nas fases, um consumo da alcalinidade de cerca de 110 mg  $CaCO_3 \cdot L^{-1}$  para a oxidação de amônia de cerca de 23 mg  $N-NH_4^+ \cdot L^{-1}$  (Tabelas 15 e 16). Isto correspondeu a um consumo médio de 4,7 g  $CaCO_3$  g  $(N-NH_4^+)^{-1}$ , próximo do valor de 7,05 g  $CaCO_3$  g  $(N-NH_4^+)^{-1}$  citado por Rittmann e McCarty (2001). Como nesta oxidação ocorre a produção de ácido e como não ocorreram mudanças significativas de pH nas três fases, mantendo-se próximo do neutro, o bom tamponamento resultou em um processo de nitrificação estável. Esta estabilidade pode ser indicada também pelas correlações positivas entre  $N-NH_4^+$  e ALCP, pH e ALCP e pH e  $N-NH_4^+$  (Apêndice E).

A relação OD/ $N-NH_4^+$  resultante ficou entre 0,14 e 0,35, sendo levemente maior em Ib (Tabela 16), o que favoreceu as nitrificantes nesta fase. O OD é o co-substrato para o processo

de nitrificação e sua concentração influencia na taxa de reação da oxidação de amônia a nitrito (PENG E ZHU, 2006). Logo, a correlação negativa de -0,36 a -0,73 entre OD e  $N-NH_4^+$ , nas 5 fases estudadas; bem como, a correlação positiva de 0,55 a 0,91 entre DQO e  $N-NH_4^+$  confirmaram a estabilidade da nitrificação no RHAE (Apêndice E).

Oliveira Netto e Zaiat (2012) operaram reatores híbridos, em escala piloto, com RR variando de 0,0 a 3,0. Tais estudos sugeriram que as fases com  $RR > 0$ , os valores da relação OD/ $N-NH_4^+$  ficaram 21% a 27% maior comparados com os dados da fase com RR de 0,0.

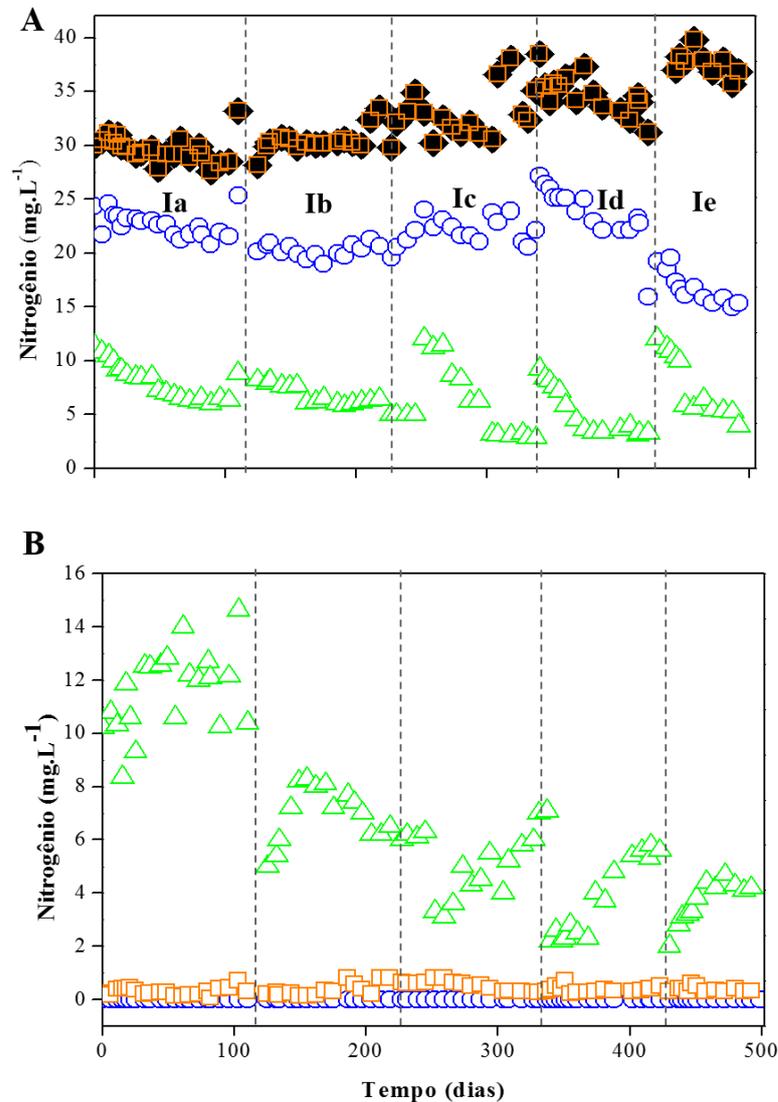
A correlação forte negativa de -0,66 a -0,86 entre SSV e  $N-NO_3^-$ , foi outro indício para a estabilidade do processo de nitrificação. Zielínska *et al.* (2012) e Ge *et al.* (2015) reportaram que as BOA foram mais resistentes do que as BON em possíveis mudanças de OD, pH e temperatura no ambiente. Como foi dito anteriormente, o lodo aeróbio esteve bem aderido no BAS, mesmo com o aumento da RR ( $2,01 \text{ m.h}^{-1}$ ); logo, o pH, temperatura e OD não apresentaram variações bruscas durante a operação do reator (Tabela 16).

No que tange ao nitrogênio na forma de nitrato (Figura 22B), o aumento da recirculação e conseqüentemente da velocidade ascensional foram favoráveis para a redução da concentração média no efluente final em P5 de  $11,8 \pm 1,1$  (Ia) para  $2,5 \pm 0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ , em Ie (Tabela 16). As concentrações no efluente do BAS (ponto P5) apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ) (Apêndice C).

Avaliando o resultado das razões de recirculação na variável  $N-NO_3^-$ , o teste *Tukey* apontou os tratamentos RR 0,50, RR 0,75 e RR 1,50 como as fases diferentes significativamente (Apêndice C). O resultado sugeriu que o aumento da RR foi de suma importância para a redução da concentração de  $N-NO_3^-$  no efluente. Mesmo tendo uma discreta lavagem de biomassa presente no BAS, confirmada pela correlação positiva entre as variáveis DQO e SSV (Apêndice E), o processo de nitrificação não foi inibido.

A maior fração presente na recirculação, em relação ao nitrogênio, foi a de nitrato. A carga nitrogenada recirculada foi 5,1 a 8,1  $\text{g } N-NO_3^- \cdot \text{d}^{-1}$ , ocorrendo a desnitrificação no RHAN nas fases estudadas. Porém, ainda estavam presentes na recirculação elementos da nitrificação parcial (0,8 a 2,0  $\text{g } N-NO_2^- \cdot \text{d}^{-1}$ ), além da amônia (5,1 a 14,3  $\text{g } N-NH_4^+ \cdot \text{d}^{-1}$ ) (Apêndice D).

Figura 22 - Concentrações obtidas no afluente - P1 (○), efluente do FAN - P3 (□), efluente do BAS - P5 (△) durante a fase Ia (RR=0,50), fase Ib (RR=0,75), fase Ic (RR=1,00), fase Id (RR=1,25) e fase Ie (RR=1,50): A)  $\text{N-NH}_4^+$  (N-NTK em P1a (◆)) e B)  $\text{N-NO}_3^-$



Fonte: O Autor (2020).

Pimenta (2011) operando reatores híbridos na remoção simultânea de carbono e nitrogênio em esgoto doméstico, obteve nitrificação total da amônia devido à RR de 0,0 com concentração média de  $20,5 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $18,3 \text{ mg.L}^{-1}$  no RHAE 1 e 2, respectivamente. Devido ao incremento da RR de 0,5 e 1,0 existiu o processo de desnitrificação sem a adição de fonte externa de carbono; assim, a concentração média variou entre  $5,4$  e  $8,1 \text{ mg.L}^{-1}$  para o RHAE 1 e  $3,2$  e  $4,2 \text{ mg.L}^{-1}$  para o RHAE 2. No entanto, na última fase do experimento (RR = 2,0), devido ao aumento da velocidade ascensional do líquido, o processo de nitrificação não ocorreu.

Oliveira Netto e Zaiat (2012) operaram reatores híbridos, em escala piloto, com RR variando de 0,0 a 3,0 com OD entre 2,5 e 3,0 mg.L<sup>-1</sup> obtiveram concentrações médias de 4,0 a 12,0 mg.N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.L<sup>-1</sup>. Morais (2015) viabilizou o processo de nitrificação e desnitrificação utilizando 2 reatores compartimentados, com a concentração média de nitrogênio nitrato de 5,1 e 5,4 mg.L<sup>-1</sup> nos reatores 1 e 2, respectivamente; corroborando com as presenças das bandas nas PCRs específicas para BOA e BON, respectivamente.

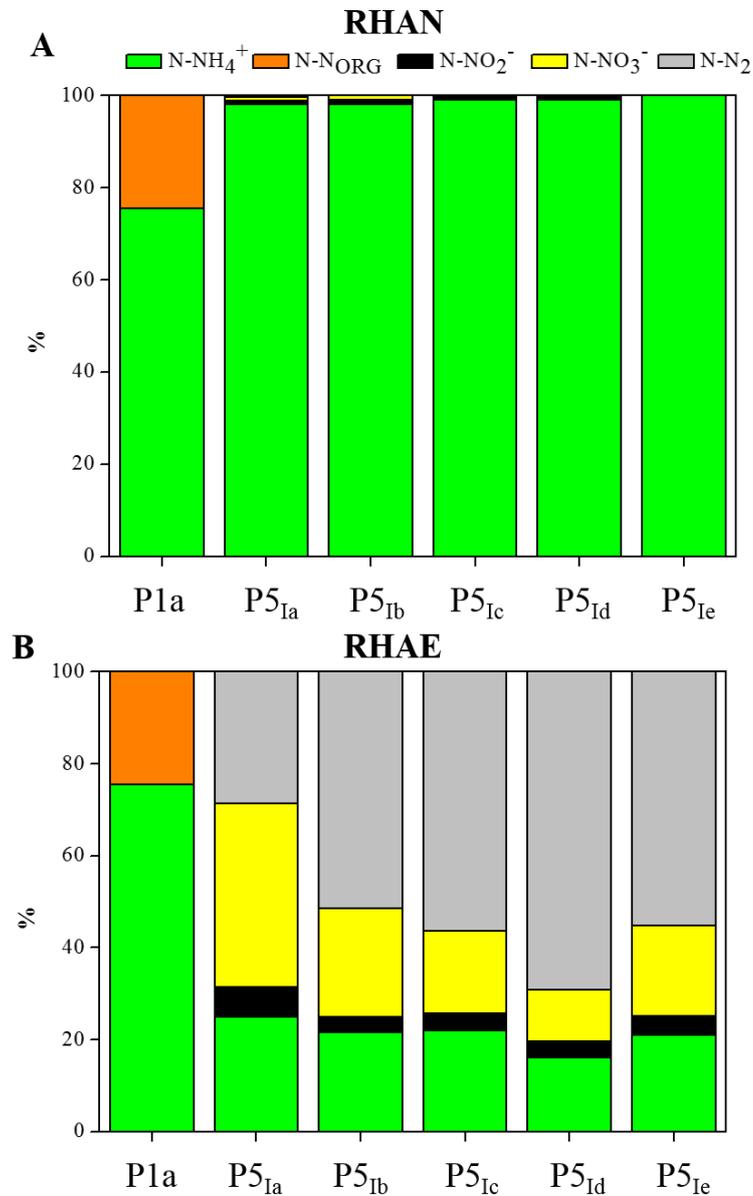
Celestino (2017) operando reatores híbridos com OD de 6,0 mg.L<sup>-1</sup> e RR entre 0,0 e 0,5 promoveu a remoção simultânea de carbono e nitrogênio. Na fase 1 (sem recirculação) a concentração média no efluente do BAS foi de 20,1 mg N-NO<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup>. Na fase 2 existiu incremento da recirculação (RR = 0,25), provavelmente o maior contato biomassa e substrato promoveu o aumento na concentração média de 24,5 mg N-NO<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup>. Na fase 3, a RR de 0,5 promoveu à redução da concentração de nitrogênio nitrato para 12,3 mg.L<sup>-1</sup>, provavelmente atribuída ao processo NDS.

No presente estudo, o resultado da PCR indicou à presença concomitante de bactéria desnitrificante e nitrificante no lodo suspenso (ponto Lsu-2) e aderido (ponto Lad-2) do RHAE (item 5.1.4). Esta evidência sugere à viabilidade de ocorrência do processo de nitrificação e desnitrificação simultânea (NDS) devido a uma biomassa mixotrófica presente no lodo aeróbio.

Provavelmente, as condições de pH 6,8 a 7,2, temperatura entre 28,7 a 29,9, OD entre 1,0 e 2,3 mg.L<sup>-1</sup>, carga orgânica de 97,6 a 350,9 g DQO.d<sup>-1</sup>, carga nitrogenada de 32,9 a 49,8 g N.d<sup>-1</sup> e relação DQO/N de 1,8 a 7,6 presentes no BAS foram favoráveis para a ocorrência do processo NDS (BUENO *et al.* 2018; DAMIANOVIC *et al.* 2018; FENG *et al.* 2018; PATHAK *et al.* 2020).

A concentração de nitrogênio total (N-NT) no efluente final em P5 variou de 10,1 a 21,1 mg.L<sup>-1</sup> nas 5 fases estudadas; em Ia, a parcela de nitrogênio nitrato (11,8 mg.L<sup>-1</sup>) foi um pouco maior que a de amoniacal (7,4 mg.L<sup>-1</sup>). Em Ie, a parcela de nitrogênio nitrato (2,5 mg.L<sup>-1</sup>) foi bem menor do que nitrogênio amoniacal (7,0 mg.L<sup>-1</sup>). Logo, as eficiências de remoção de N-NT foram de 28 a 69% nas fases estudadas (Figura 23), com diferenças significativas (p<0,05). O teste Tukey apontou os tratamentos RR 0,50 e RR 0,75 como as fases diferentes significativamente. Logo, as fases Ic, Id e Ie deram a mesma resposta no que tange à eficiência de remoção para a variável N-NT.

Figura 23 - Balanço das formas de nitrogênio (%) no afluente do sistema e efluentes do RHAN (A) e RHAE (B) nas fases estudadas dos reatores híbridos



Fonte: O Autor (2020).

A RR 1,25 (fase Id) indicou uma melhor nitrificação e desnitrificação simultânea, assim contribuiu significativamente para a melhor qualidade do efluente. Oliveira Netto e Zaiat, (2012) operaram um reator, em escala piloto com RR de 0,0 a 3,0, obtiveram 20 a 29 mg N-NT.L<sup>-1</sup> no efluente do sistema, correspondendo a eficiências de 32% a 55%, respectivamente.

#### 5.1.4. Fatores influentes no desempenho do sistema e estudo da variabilidade dos dados

Para o estudo com a ACP, as 8 variáveis físico-químicas consideradas para a qualidade do efluente final (BAS, ponto P5) foram correlacionadas em cada fase experimental. O agrupamento dos dados se refere a um conjunto de 75 observações, sendo 15 para cada fase. Este conjunto de dados apresenta média zero e desvio padrão igual a um. Nesta ACP, apenas duas componentes principais (CP1 e CP2) foram consideradas significativas e ambas atenderam ao critério de Kaiser e Guttman ( $K > 1$ , Apêndice G) (JACKSON, 1993). Assim, os gráficos bidimensionais resultantes mostraram uma variância acumulativa explicada de 44,28% para CP1 e 14,44% para CP2, totalizando 58,72% (Apêndice G).

As variáveis  $N-NH_4^+$ , ALCP e pH apresentaram pesos bem próximos (0,56, 0,57 e 0,58), enquanto  $N-NO_3^-$  apresentou o menor peso desse conjunto (-0,90) de variáveis (Tabela 17). Os valores mais negativos de peso na CP1 indicaram que esta componente apresentou tendência de aumento com reduções de DQO (0,90), SSV (0,84), pH (0,58), ALCP (0,57),  $N-NH_4^+$  (0,56) e TEMP (0,33). O maior peso da DQO seguido de SSV indicaram maior influência no comportamento de 58% dos dados (Apêndice G). Tal resultado sugere que o BAS foi favorável ao acúmulo da biomassa; bem como, o processo de nitrificação não sofreu impactos negativos pelo aumento da velocidade ascensional.

Tabela 17 - Pesos obtidos na modelagem do efluente do BAS

Variável	CP1	CP2
<b>DQO</b>	0,90	-0,15
<b>N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	0,56	0,54
<b>N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	-0,90	0,19
<b>OD</b>	-0,28	0,51
<b>pH</b>	0,58	-0,01
<b>ALCP</b>	0,57	0,23
<b>TEMP</b>	0,33	-0,64
<b>SSV</b>	0,84	-0,22

Fonte: O Autor (2020).

A variável  $N-NH_4^+$  apresentou peso positivo e elevado na CP2, seguido pela variável OD, sugerindo que a representação da variabilidade do conjunto de dados aumentou com a elevação dessas duas variáveis; porém, o efeito delas sobre a variável SSV foram minimizados, já que a biomassa apresentou baixo valor absoluto nesta CP2, corroborando com as baixas concentrações de sólidos obtidas (8,7 a 28,1 mg SSV.L<sup>-1</sup>).

As variáveis  $N-NH_4^+$  e OD estiveram correlacionados inversamente (Apêndice E e Figura 24) nas fases estudadas e favoreceram a cinética de crescimento dos micro-organismos nitrificantes. A concentração do substrato nitrogênio amoniacal; bem como, o co-substrato oxigênio dissolvido influenciam na taxa de reação da oxidação de amônia a nitrito (PENG E ZHU, 2006).

Zhang *et al.* (2014), utilizando reatores com biofilme, sugeriram que o aumento da taxa de remoção de amônia foi proeminente em concentrações de OD entre 1,5 a 3,0  $mg.L^{-1}$  e temperaturas próximas a 30°C. Aqueles mesmos autores afirmam ainda que, quando a concentração de OD foi reduzida à medida que a temperatura aumentou, a taxa de nitrificação sofreu um impacto negativo. No presente estudo, a temperatura média foi de 28,7 a 29,9 °C e a concentração de OD de 1,0 a 2,3  $mg O_2.L^{-1}$  estavam disponibilizados para os micro-organismos nitrificantes no reator aeróbio.

Os resultados gráficos da CP se encontram na Figura 24. Os gráficos bidimensionais com os pesos obtidos no modelo utilizado se encontram na Figura 24A; observa-se que as variáveis OD,  $N-NO_3^-$  e TEMP foram agrupados ao lado negativo da CP1 e as variáveis  $N-NH_4^+$ , ALCP, pH, DQO e SSV foram agrupadas ao lado positivo da CP1.

A Figura 24B mostra notadamente, que os conjuntos de dados experimentais da fase Ia (dados 1 a 15, na cor cinza) e fase Ib (observações 16, a 30, na cor vermelha) foram agrupados no lado negativo da CP1 e positivo da CP2 e influenciados pelas variáveis OD,  $N-NO_3^-$  e TEMP. Os valores médios de temperatura, OD e  $N-NO_3^-$  foram de  $29,9 \pm 1,1^\circ C$ ,  $2,1 \pm 0,3 mg O_2.L^{-1}$  e  $11,8 \pm 1,1 mg N-NO_3^-.L^{-1}$ , em Ia e  $28,7 \pm 0,5^\circ C$ ,  $2,3 \pm 0,3 mg O_2.L^{-1}$  e  $7,2 \pm 1,3 mg N-NO_3^-.L^{-1}$ , em Ib, favoreceram o crescimento de BON.

As concentrações de OD próximas a 3,0  $mg.L^{-1}$  favorecem as BON (AHN, 2006); contudo, a concentração de OD no RHAE ficaram próximas a 2,0  $mg.L^{-1}$ , no intuito de favorecer as BOA e o processo NDS. Logo, BOA estiveram mais estáveis no processo de nitrificação do que as BON.

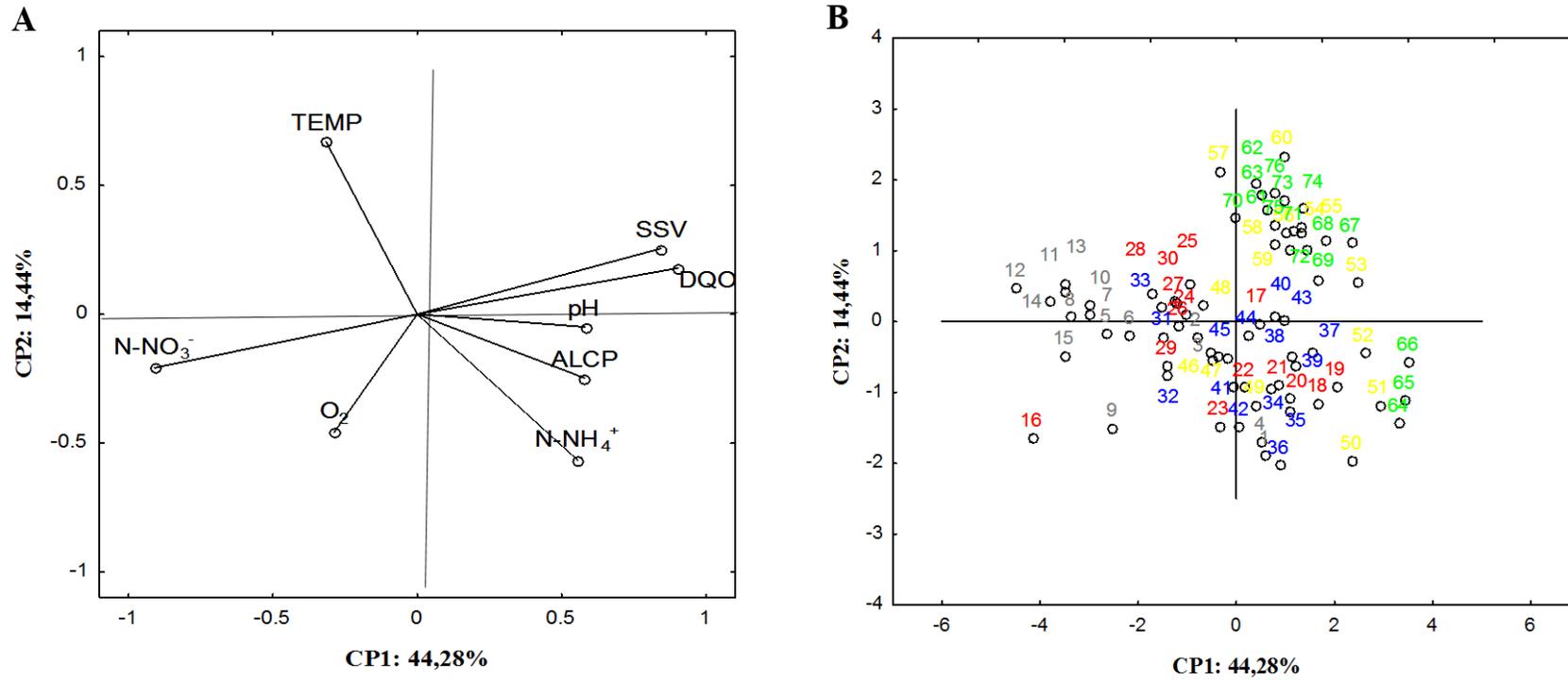
Em relação à fase Ic, foi possível observar à migração do conjunto de dados (31 a 45, na cor azul) junto com a fase Id (46 a 60, na cor amarela) para o lado positivo da CP1 e negativo da CP2 e influenciados pelas variáveis  $N-NH_4^+$ , ALCP, pH. Os conjuntos de dados corroboraram com as concentrações médias de  $5,8 \pm 3,5 mg N-NH_4^+.L^{-1}$ ,  $81,3 \pm 19,3 mg CaCO_3.L^{-1}$  e  $7,2 \pm 0,1$  (Ic) e valores médios de  $5,2 \pm 2,2 mg N-NH_4^+.L^{-1}$ ,  $79,6 \pm 10,1 mg CaCO_3.L^{-1}$  e  $7,0 \pm 0,1$  (Id); indicando que o processo de nitrificação foi proeminente em tais fases.

A correlação entre  $\text{N-NH}_4^+$  e  $\text{N-NO}_3^-$  foi moderada a forte negativa em Ic (-0,72) e Id (-0,60); bem como, a relação DQO/N de 2,8 a 2,9 disponibilizadas para o BAS foi outro indicativo para a maior oxidação da amônia nestas fases. Sabe-se que com baixa relação DQO/N, as bactérias heterotróficas ficam limitadas pela baixa quantidade de carbono, disponibilizando amônia em excesso para a nitrificação (CALLADO E FORESTI, 2001). Para elevadas relações DQO/N, o processo de nitrificação é inibido pelo excesso de carbono orgânico (LU *et al.* 2014; FENG *et al.* 2018).

A correlação entre as variáveis pH e  $\text{N-NH}_4^+$  foi moderada positiva (0,47 e 0,58) em Ic e Id; logo, este foi outro indício para a estabilidade do processo no RHAE. Os valores médios de pH nas fases Ic e Id foram  $7,2 \pm 0,1$  e  $7,0 \pm 0,1$  respectivamente, favoráveis ao desenvolvimento das BOA e BON é de 5,8 a 8,5 e para o crescimento de BON é de 6,5 a 8,5 (GE *et al.* 2015).

O conjunto de dados da fase Ie (61 a 75, na cor verde) foram agrupados no lado positivo da CP1 e negativo da CP2 e influenciados pelas variáveis as variáveis, DQO e SSV. Logo, os valores médios de  $50,6 \pm 9,6 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$  e  $28,1 \pm 2,7 \text{ mg SSV} \cdot \text{L}^{-1}$  sugeriram que o aumento da velocidade ascensional de  $1,21 \text{ m} \cdot \text{h}^{-1}$  (Ia) para  $2,01 \text{ m} \cdot \text{h}^{-1}$  (Ie) contribuiu para o maior arraste da biomassa presente no efluente do BAS. Contudo, o processo de nitrificação não foi inibido, haja vista as concentrações médias de  $7,0 \pm 2,9 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$  e  $2,5 \pm 0,2 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$ , as correlações fortes negativas entre DQO e  $\text{N-NO}_3^-$  (-0,81) e SSV e  $\text{N-NO}_3^-$  (-0,86) e relação DQO/N que foi de 5,5, em Ie.

Figura 24 - Gráfico bidimensional para as projeções dos pesos (*loadings*) (A) e gráfico dos casos (*cases*) (B) da CP1 versus variáveis da CP2 no efluente do BAS



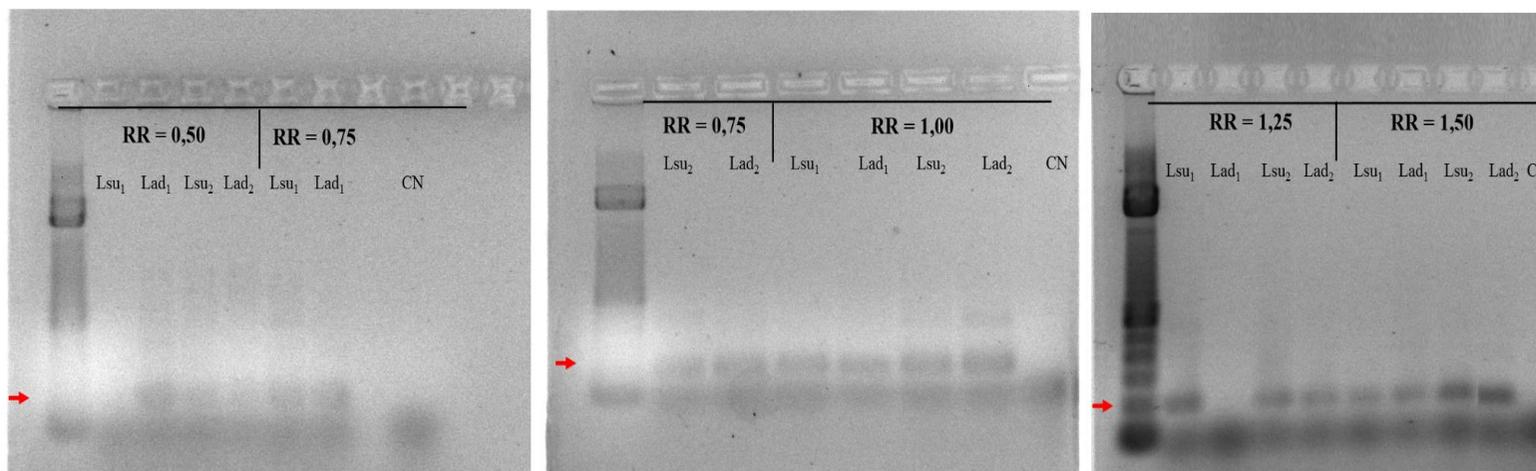
Fonte: O Autor (2020).

### 5.1.5. Comunidade microbiana presente no lodo suspenso e aderido

A presença de micro-organismos desnitrificantes e nitrificantes tanto no RHAN como no RHAE foram confirmadas com a PCR das amostras, como mostra as Figuras 25 a 27. Bactérias desnitrificantes estiveram presentes nos pontos Lsu1 e Lad1 do RHAN praticamente em todas as fases experimentais, conforme confirmadas pela técnica da PCR (Figura 25). A existência de bactérias desnitrificantes, tanto no lodo suspenso quanto no aderido nas duas câmaras (LA e BAS) do RHAE, indica que a biomassa é capaz de realizar o processo de NDS.

Relações DQO/N entre 1,8 e 9,2, TDH entre 8 e 10 horas e OD entre 0,1 e 4,8 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>, são fatores chave para a presença de micro-organismos desnitrificantes em reatores aeróbios (SANTOS *et al.* 2016; BUENO *et al.* 2018; DAMIANOVIC *et al.* 2018; FENG *et al.* 2018); e tais condições são semelhantes às aplicadas ao LA e BAS no presente estudo. Como discutido anteriormente, a fase Id foi fase com melhor remoção de nitrogênio e o desempenho pode estar associado ao processo NDS no RHAE.

Figura 25 - PCR para bactérias desnitrificantes nas fases: Ia (RR = 0,50), Ib (RR = 0,75), Ic (RR= 1,00), Id (RR = 1,25) e Ie (RR = 1,50). Legenda: Lsu (lodo suspenso), Lad (lodo aderido) e CN (controle negativo)



Fonte: O Autor (2020).

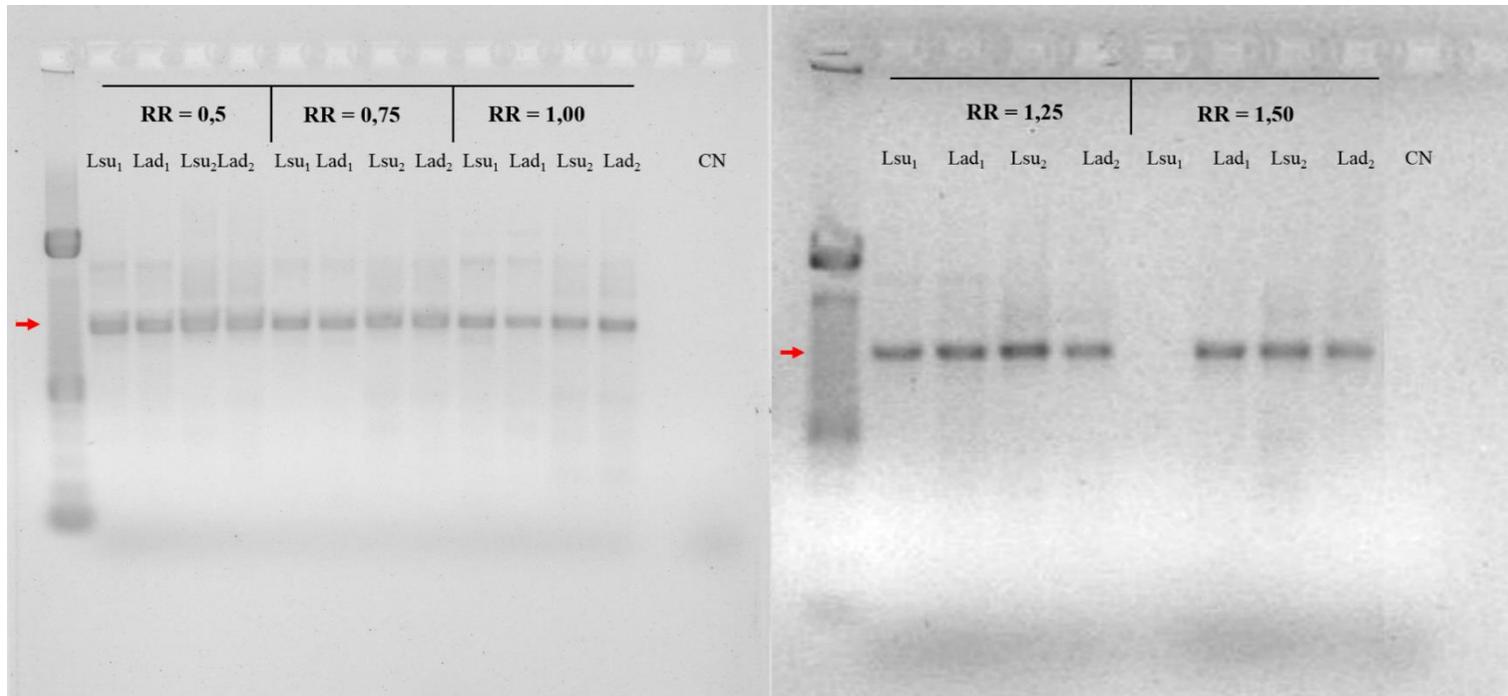
Por outro lado, bactérias oxidantes de amônia BOA estiveram presentes em todas as amostras das fases Ia a Ie (Figura 26). A operação de reatores com pH 7,2-7,8 e OD 0,5-1,7 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>, favorecem um maior crescimento dessas bactérias (AHN, 2006; GE *et al.*, 2015) e estas condições são similares às aplicadas no RHAE. O incremento da velocidade ascensional por ação da recirculação não afetou a presença de BOA no lodo aderido (Lad-1 e Lad-2); a recirculação possivelmente possibilitou a migração destas bactérias para o RHAN. Além da oxidação da amônia, elas também podem atuar na desnitrificação em condições anaeróbias (SCHMIDT e BOCK, 1997; SCHMIDT *et al.*, 2004). Isso pode ser associado às menores concentrações de nitrito ( $0,2 \pm 0,2$  mg N-NO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>, Tabela 15) no efluente do FAN.

As bactérias oxidantes de nitrito BON (*Nitrospira*) foram identificadas na Fase FI em amostras efluentes do RHAN (P3) e RHAE (P5) e nas amostras de lodo suspenso (Lsu-1 e Lsu-2) e de lodo aderido, mas nestas apenas no RHAE (Lad-2). Na fase FII, estiveram presentes em todos os pontos de coleta do RHAE, mas no RHAN foram identificadas apenas no lodo aderido (Lad-1) (Figura 27). Provavelmente, tais bactérias foram lavadas do UASB pelo incremento da recirculação, mas retidas no leito suporte dos biofilmes do FAN (Lad-1).

Tanto o FAN como o BAS foram eficientes na retenção da biomassa nitrificante, tendo ocorrido a formação de biofilmes densos na superfície do material suporte e evitando a lavagem dos micro-organismos do sistema. Bactérias nitrificantes apresentam taxa de crescimento lento e necessitam um alto TRS para se desenvolverem e permanecerem no sistema (YU *et al.*, 2010). Alguns autores indicam um tempo mínimo de duplicação de 7-8 h e 10-13 h para BOA e BON, respectivamente (PENG e ZHU, 2006). Outros mencionam que TRS de 4 a 30 d favorecem o crescimento de ambas (YU *et al.*, 2010; LIU e WANG, 2013). Estes últimos autores indicam também que o processo de nitrificação parcial ou convencional depende da concentração de OD adotada, de 0,5-1,7 mg.L<sup>-1</sup> e acima de 2,0 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Figura 26 - PCR para bactérias oxidantes de amônia nas fases: Ia (RR = 0,50), Ib (RR = 0,75), Ic (RR= 1,00), Id (RR = 1,25) e Ie (RR = 1,50).

Legenda: Lsu (lodo suspenso), Lad (lodo aderido) e CN (controle negativo).

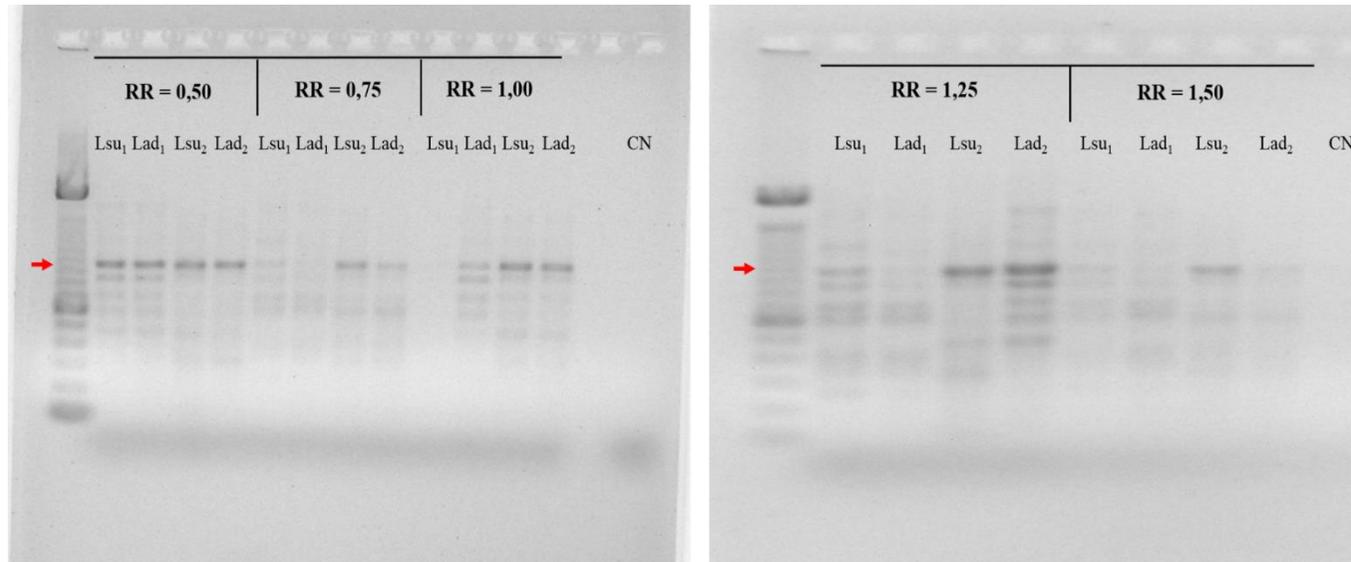


Fonte: O Autor (2020).

Ainda sobre as nitrificantes, elas podem ser consideradas bactérias estrategistas por apresentar taxa específica de crescimento líquido máxima ( $r$ ), ou seja, taxa de crescimento específica bruta máxima menos taxa de mortalidade específica mínima; ou aquelas com densidade máxima de indivíduos ( $K$ ), que um dado ambiente pode suportar no equilíbrio da população (ANDREWS E HARRIS, 1986). Assim, as bactérias estrategistas  $r$  crescem mais lentamente do que as estrategistas  $K$  com baixas concentrações de substrato ( $N-NO_2^-$ ). Schram *et al.* (1999) sugeriram que *Nitrospira* possui afinidade elevada com substrato em concentração baixa (estrategista  $K$ ); enquanto *Nitrobacter* crescem mais rapidamente em concentrações elevadas (estrategistas  $r$ ). Logo, concentrações médias de 0,7 a 1,8 mg  $N-NO_2^-$  .L<sup>-1</sup> no RHAE (LA + BAS) favoreceram *Nitrospira* (Figura 27).

Figura 27: PCR para *Nitrospira* nas fases: Ia (RR = 0,50), Ib (RR = 0,75), Ic (RR= 1,00), Id (RR = 1,25) e Ie (RR = 1,50).

Legenda: Lsu (lodo suspenso), Lad (lodo aderido) e CN (controle negativo)



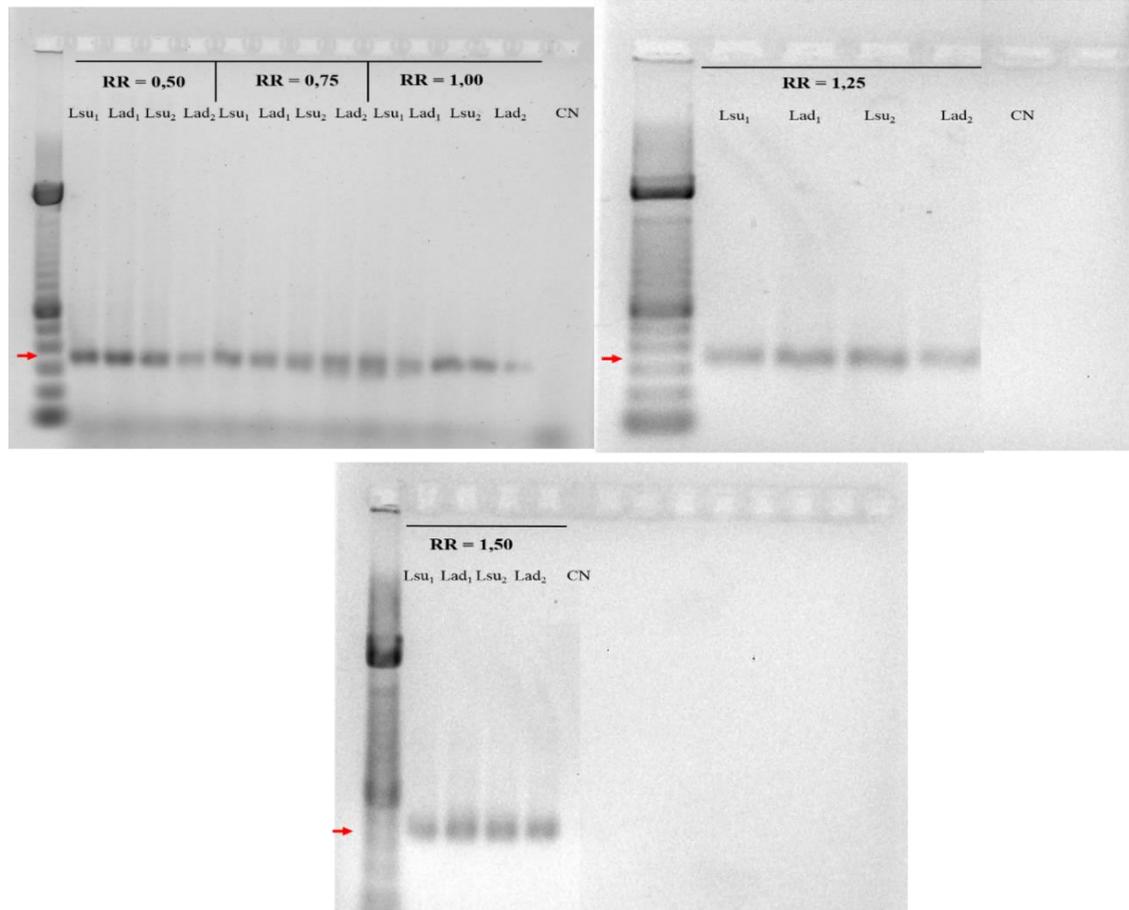
Fonte: O Autor (2020).

Arqueias, identificadas em todas as amostras das fases Ia a Ie (Figura 28), são associadas à conversão da matéria orgânica em CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> (CADILLO-QUIROZ *et al.*, 2009). No RHAE, provavelmente, elas se mantiveram ativas nas zonas anaeróbias mais internas do biofilme. Além de atuar na remoção de matéria orgânica, elas podem ter atuado na oxidação de amônia. Park *et al.* (2006) e Ren *et al.* (2020) reportaram que algumas arqueias podem oxidar a amônia e contribuir para a remoção de nitrogênio em condições aeróbias; como as suas condições foram similares, no presente estudo a presença de arqueias oxidantes de amônia (AOA) pode ter sido favorecida. No entanto, para afirmar a principal função dos micro-organismos que compõem a microbiota, mais estudos devem ser realizados.

Cabello *et al.* (2004) mencionaram que arqueias podem auxiliar no processo de desnitrificação; logo, um biofilme mixotrófico no BAS facilitou o processo NDS. Park *et al.* (2006) mencionaram que o processo NDS foi estabelecido pela coexistência de bactérias nitrificantes, desnitrificantes e arqueias, em lodos ativados.

Figura 28 - PCR para arqueia nas fases: Ia (RR = 0,50), Ib (RR = 0,75), Ic (RR= 1,00), Id (RR = 1,25) e Ie (RR = 1,50).

Legenda: Lsu (lodo suspenso), Lad (lodo aderido) e CN (controle negativo)



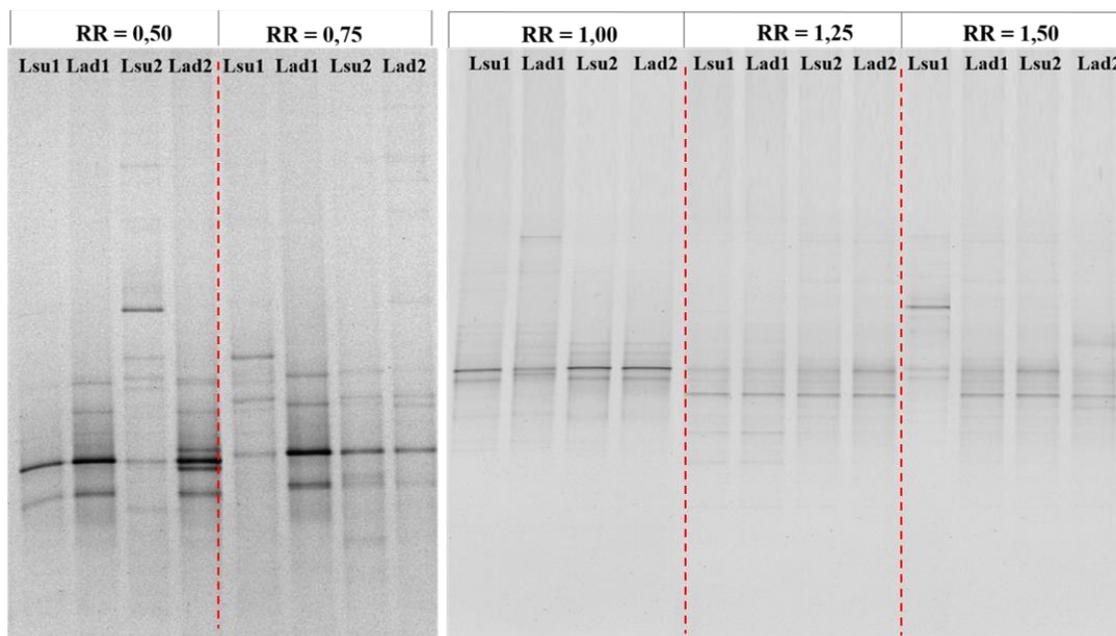
Fonte: O Autor (2020).

No presente estudo, a recirculação favoreceu o aumento da biomassa em quantidade e diversidade presente aderida no meio suporte do BAS (Apêndice F). Isso foi confirmado pela presença de arqueias, desnitrificantes, BOA e *Nitrospira*, por meio de PCR. Diante disso, além de não prejudicar a retenção de micro-organismos, a recirculação permitiu um maior contato biomassa-substrato.

A diversidade das bandas na DGGE para o domínio *Bacteria* pode ser observada na (Figura 29). O aumento no número de bandas foi evidente no RHAN em Ia para Ib, respectivamente, por ação da recirculação do efluente nitrificado tratado. Na fase Ic (período chuvoso), foi notável a diferença na diversidade das bandas em comparação as fases anteriores. Nas fases Id e Ie, as bactérias menos resistentes foram lavadas do sistema corroborando com as concentrações médias no efluente do BAS para as variáveis DQO (40 a 50 mg.L<sup>-1</sup>) e SSV (próximo a 30 mg.L<sup>-1</sup>). Como também, as variáveis DQO e SSV foram responsáveis pelo agrupamento dos dados no gráfico bidimensional nas fases Id e Ie (Figura 24B) apresentando correlação forte positiva 0,81 e 0,87, respectivamente.

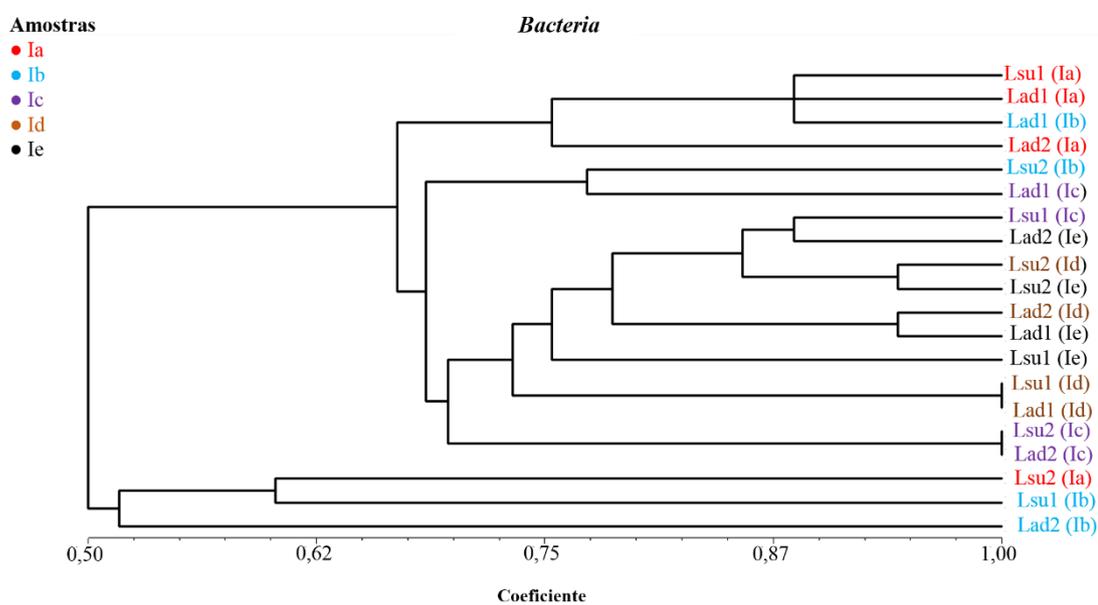
No que tange à similaridade das bandas no gel entre as amostras Lsu e Lad (Figura 30), foi possível observar que a amostra Lad2 (Ib) apresentou 50% de similaridade com relação as demais amostras, conforme o índice de similaridade de *Jaccard*. Provavelmente, esta amostra apresentou uma discreta diversidade microbiana maior comparativamente as outras amostras, assim corrobora com a Figura 23. O gráfico de similaridade confirmou que ao aumentar a recirculação, os micro-organismos mais resistente permaneceram no sistema; enquanto, os micro-organismos menos resistentes foram lavados do sistema, haja vista as similaridades serem maiores. Bem como, o período chuvoso (Fase Ic) promoveu uma modificação na diversidade microbiana, e esta permaneceu com reduzidas modificações nas fases seguintes (fases Id e Ie). As amostras que apresentaram maior diversidade serão enviadas para sequenciamento futuro.

Figura 29 - Diversidade de bandas no gel de DGGE para o domínio *Bacteria* em RR de 0,5 a 1,5. Gel de acrilamida (AA) 8% e gradiente desnaturante ureia e formaminda (UF) 40% - 60%



Fonte: O Autor (2020).

Figura 30 - Análise de *Clustering* dos padrões de bandas da DGGE para o domínio *Bacteria*. Medida de distância: índice de Jaccard; agrupamento de algoritmo: UPGM. Coeficiente de correlação cofenética: 1,00

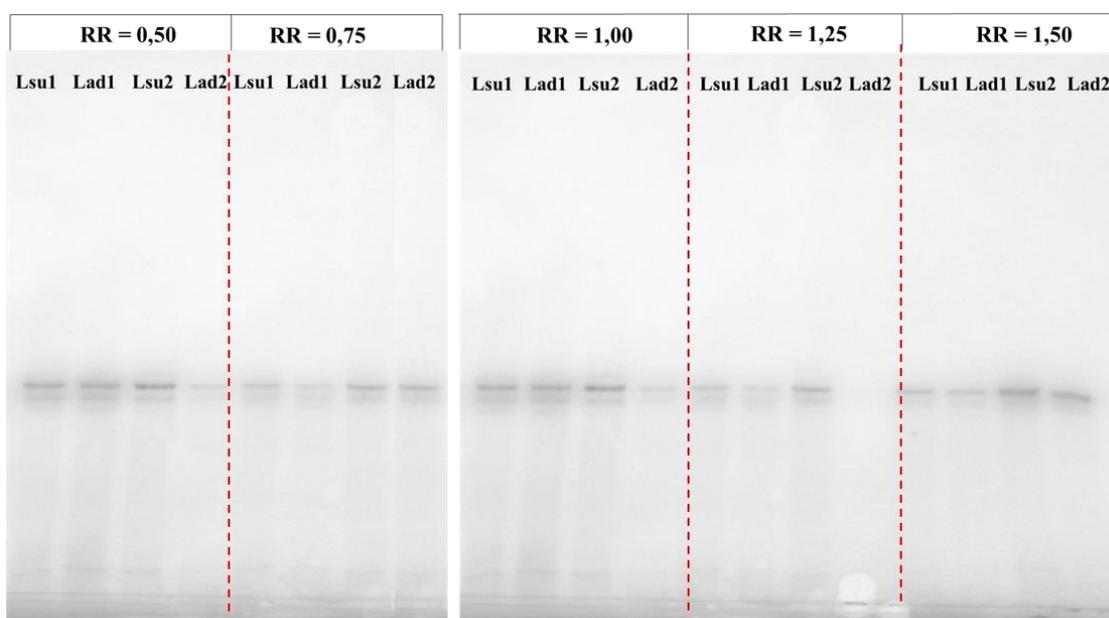


Fonte: O Autor (2020).

No que concerne às arqueias, a RR não promoveu uma alta diversidade de bandas (Figura 31) e os resultados indicaram uma estabilidade temporal da comunidade em relação as mudanças de pH, OD, temperatura e cargas orgânicas e nitrogenadas.

Arqueias metanogênicas detêm grande potencial de estabilizar a matéria orgânica e são micro-organismos anaeróbios estritos. Os principais representantes do filo *Euryarchaeota*, compreendem quatro classes: *Methanobacteria*, *Methanococci*, *Methanopyri* e *Methanomicrobia* com suas respectivas ordens: *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanopyrales*, *Methanomicrobiales* e *Methanosarcinales*, sendo as duas últimas pertencentes à classe *Methanomicrobia* (MADIGAN *et al.* 2010).

Figura 31 - Diversidade de bandas no gel de DGGE para o domínio *Archaea* em RR de 0,5 a 1,5. Gel de acrilamida (AA) 8% e gradiente desnaturante ureia e formaminda (UF) 40% - 60%



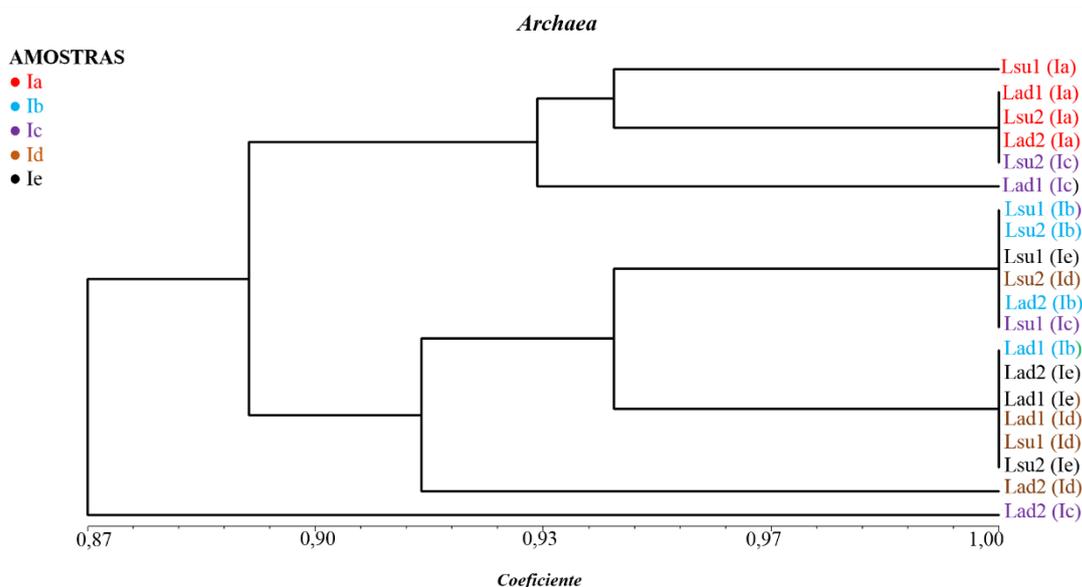
Fonte: O Autor (2020).

A amostra Lad2 (Ic) apresentou a menor similaridade (0,87) com o agrupamento dos dados (Figura 32) O resultado confirmou que o aumento da RR não influenciou na dinâmica da população microbiana de arqueias no reator RHAN e RHAE. No presente estudo, o pH entre 7,2 a 7,5, temperatura entre 26,9 a 29,9°C, OD entre 0,1 a 0,5 mg.L<sup>-1</sup> e CO de 233,5 a 523,9 g O<sub>2</sub>.d<sup>-1</sup> (UASB) e 248,7 a 534,2 g O<sub>2</sub>.d<sup>-1</sup> (FAN), favoreceram o equilíbrio da digestão anaeróbia. Provavelmente, não existiu o acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGV), visto o pH acima de 7,0 e concentração média da alcalinidade parcial no efluente do FAN, exceto na Fase Ic (período chuvoso), sempre foi próximo ou superior a 200 mg CaCO<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup>.

Em relação ao RHAE, as arqueias também estiveram presentes no LA e no BAS, mesmo em concentrações de OD próximas de 2,0 mg.L<sup>-1</sup>. Provavelmente, zona microaeradas nos flocos do LA e biofilme do BAS favoreceram o desenvolvimento desses micro-organismos. Park *et al.* (2006) e Ren *et al.* 2020 reportaram que a baixa escala de oxigênio

pode ser um dos fatores mais determinantes para o desenvolvimento de arqueias oxidantes de amônio (AOA) ocorram.

Figura 32 - Análise de *Clustering* dos padrões de bandas da DGGE para o domínio *Archaea*. Medida de distância: índice de Jaccard; agrupamento de algoritmo: UPGM. Coeficiente de correlação cofenética: 1,00



Fonte: O Autor (2020).

## 5.2. DESEMPENHO DOS REATORES SEQUENCIAIS ANAERÓBIO-AERÓBIO EM ESCALA DE BANCADA (EXPERIMENTO B)

Nesta seção serão apresentados os resultados dos reatores sequenciais anaeróbio-aeróbio com baixa aeração e recirculação do efluente rico em nitrito, nas condições relatadas na metodologia e os resultados da biologia molecular.

### 5.2.1. Desempenho dos reatores sequenciais anaeróbio (lodo suspenso) e aeróbio (lodo aderido)

As concentrações médias das variáveis físico-químicas do sistema de tratamento para as três fases se encontram na Tabela 18, referente às coletas de amostras líquidas em três pontos (P1a a P3, Figura 7). Somente na fase FIII, devido à recirculação, tem-se também um quarto ponto de coleta (P1m), o mais próximo de P1a e P1r, representativo da mistura de ambos os fluxos. Os valores médios das concentrações dos parâmetros físico-químicos do

afluente do sistema, para as três fases experimentais, mostraram que o esgoto sintético se classificava como o de nível intermediário (METCALF E EDDY, 2016), como aquele utilizado em trabalho anterior (NANES, 2017).

Tabela 18 - Valores médios das análises físico-químicas nas fases FI, FII e FIII durante o período experimental (150 dias) para as amostras nos pontos de coletas P1a (afluente ao RAN), P1m (ponto da mistura), P2 (efluente do RAN) e P3 (efluente do RAE)

<b>Fase FI – OD = 3,0 mg.L<sup>-1</sup> e RR = 0%</b>					
<b>Parâmetros</b>	<b>Afluente (P1a)</b>	<b>Mistura (P1m)</b>	<b>RAN (P2)</b>	<b>RAE (P3)</b>	
pH	7,3 ± 0,1	-	7,6 ± 0,1	7,2 ± 0,2	
Temperatura (°C)	9,3 ± 0,4	-	27,9 ± 0,7	28,1 ± 0,6	
Oxigênio dissolvido (mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> )	0,2 ± 0,1	-	0,3 ± 0,1	2,2 ± 0,2	
DQO total (mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> )	437,9 ± 12,1	-	115,6 ± 19,1	28,3 ± 3,9	
DQO filtrada (mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> )	117,5 ± 5,9	-	51,8 ± 10,6	11,8 ± 2,6	
DQO particulada (mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> )	320,4 ± 11,7	-	63,8 ± 13,1	16,5 ± 3,0	
Alcalinidade parcial (mg CaCO <sub>3</sub> .L <sup>-1</sup> )	205,3 ± 18,1	-	299,1 ± 37,0	121,1 ± 15,2	
Nitrogênio total Kjeldahl (mg N-NTK.L <sup>-1</sup> )	36,8 ± 1,0	-	36,3 ± 1,0	5,6 ± 1,4	
Nitrogênio amoniacal (mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> .L <sup>-1</sup> )	24,5 ± 0,8	-	36,3 ± 1,0	5,6 ± 1,4	
Nitrogênio nitrito (mg N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> .L <sup>-1</sup> )	0,0 ± 0,0	-	0,2 ± 0,2	1,4 ± 0,2	
Nitrogênio nitrato (mg N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> .L <sup>-1</sup> )	0,0 ± 0,0	-	0,2 ± 0,2	7,2 ± 0,4	
Sólidos suspensos voláteis (mg SSV.L <sup>-1</sup> )	35,9 ± 4,1	-	12,9 ± 3,9	9,8 ± 3,6	
<b>Fase FII – OD = 1,5 mg.L<sup>-1</sup> e RR = 0%</b>					
<b>Parâmetros</b>	<b>Afluente (P1a)</b>	<b>Mistura (P1m)</b>	<b>RAN (P2)</b>	<b>RAE (P3)</b>	
pH	7,4 ± 0,1	-	7,8 ± 0,1	7,1 ± 0,1	
Temperatura (°C)	10,4 ± 0,3	-	27,4 ± 0,3	27,5 ± 0,4	
Oxigênio dissolvido (mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> )	0,1 ± 0,1	-	0,3 ± 0,1	1,5 ± 0,1	
DQO total (mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> )	416,0 ± 17,1	-	92,7 ± 7,9	24,6 ± 1,8	
DQO filtrada (mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> )	117,5 ± 12,6	-	24,9 ± 5,7	9,6 ± 4,6	
DQO particulada (mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> )	298,5 ± 16,0	-	67,8 ± 10,8	15,0 ± 4,9	
Alcalinidade parcial (mg CaCO <sub>3</sub> .L <sup>-1</sup> )	236,4 ± 14,2	-	335,4 ± 18,5	103,7 ± 3,2	
Nitrogênio total Kjeldahl (mg N-NTK.L <sup>-1</sup> )	36,1 ± 0,4	-	36,0 ± 0,2	2,5 ± 0,5	
Nitrogênio amoniacal (mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> .L <sup>-1</sup> )	23,8 ± 0,6	-	36,0 ± 0,2	2,5 ± 0,5	
Nitrogênio nitrito (mg N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> .L <sup>-1</sup> )	0,0 ± 0,0	-	0,1 ± 0,1	6,1 ± 2,9	
Nitrogênio nitrato (mg N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> .L <sup>-1</sup> )	0,0 ± 0,0	-	0,0 ± 0,0	4,7 ± 2,5	
Sólidos suspensos voláteis (mg SSV.L <sup>-1</sup> )	38,6 ± 5,9	-	7,3 ± 1,8	5,8 ± 1,3	
<b>Fase FIII – OD = 1,5 mg.L<sup>-1</sup> e RR = 0,25</b>					
<b>Parâmetros</b>	<b>Afluente (P1a)</b>	<b>Mistura (P1m)</b>	<b>RAN (P2)</b>	<b>RAE (P3)</b>	
pH	7,4 ± 0,1	7,3 ± 0,1	7,6 ± 0,1	7,2 ± 0,1	
Temperatura (°C)	11,5 ± 0,4	14,7 ± 0,3	27,4 ± 0,3	27,7 ± 0,3	
Oxigênio dissolvido (mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> )	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,0	0,2 ± 0,0	1,4 ± 0,1	
DQO total (mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> )	409,7 ± 7,0	333,0 ± 5,6	72,6 ± 39,7	26,5 ± 5,1	
DQO filtrada (mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> )	122,7 ± 11,3	99,5 ± 9,2	26,0 ± 13,4	6,8 ± 3,1	
DQO particulada (mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> )	287,0 ± 11,5	233,5 ± 8,7	46,6 ± 27,4	19,7 ± 5,1	
Alcalinidade parcial (mg CaCO <sub>3</sub> .L <sup>-1</sup> )	236,5 ± 5,5	209,6 ± 4,5	324,6 ± 8,2	101,8 ± 3,6	
Nitrogênio total Kjeldahl (mg N-NTK.L <sup>-1</sup> )	36,7 ± 1,9	29,8 ± 1,4	36,6 ± 1,9	2,2 ± 1,0	
Nitrogênio amoniacal (mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> .L <sup>-1</sup> )	23,4 ± 0,5	19,2 ± 0,5	36,6 ± 1,9	2,2 ± 1,0	
Nitrogênio nitrito (mg N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> .L <sup>-1</sup> )	0,0 ± 0,0	2,0 ± 0,3	0,1 ± 0,1	9,8 ± 1,3	
Nitrogênio nitrato (mg N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> .L <sup>-1</sup> )	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,8 ± 0,2	
Sólidos suspensos voláteis (mg SSV.L <sup>-1</sup> )	41,5 ± 3,1	34,8 ± 3,1	23,4 ± 4,2	7,9 ± 4,8	

Fonte: O Autor (2020).

A maior parte de N-NTK afluente se encontrava na forma amoniacal (63 a 66%). O desempenho do sistema pode ser visualizado também nas Figuras 33 e 34, em termos de DQO total, SSV e nitrogênio. E na Tabela 18 são apresentadas para cada fase experimental, as correlações entre as 9 variáveis estudadas, obtidas com a ACP.

Tabela 19 - Resultados das correlações por ACP entre as 9 variáveis estudadas para o desempenho do sistema de tratamento (efluente do RAE): DQO, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, OD, pH, ALCP, TEMP e SSV nas fases FI, FII e FIII. Valores acima de 0,50 ou abaixo de -0,50 indicam correlação moderada a forte (em vermelho). Correlação positiva significa resultados crescentes ou decrescentes simultaneamente para ambas as variáveis; e negativas se discordantes.

Fase FI (OD = 3,0 mg.L <sup>-1</sup> e RR = 0,0)									
Variável	DQO	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	O <sub>2</sub>	pH	ALCP	TEMP	SSV
DQO	<b>1,00</b>								
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0,77	<b>1,00</b>							
N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	-0,80	-0,87	<b>1,00</b>						
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-0,78	-0,89	0,86	<b>1,00</b>					
O <sub>2</sub>	-0,59	-0,41	0,65	0,63	<b>1,00</b>				
pH	0,77	0,85	-0,76	-0,86	-0,37	<b>1,00</b>			
ALCP	0,86	0,85	-0,86	-0,87	-0,61	0,85	<b>1,00</b>		
TEMP	-0,87	-0,81	0,84	0,85	0,61	-0,75	-0,92	<b>1,00</b>	
SSV	0,97	0,78	-0,82	-0,80	-0,56	0,77	0,84	-0,86	<b>1,00</b>
Fase FII (OD = 1,5 mg.L <sup>-1</sup> e RR = 0,0)									
Variável	DQO	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	O <sub>2</sub>	pH	ALCP	TEMP	SSV
DQO	1,00								
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0,09	<b>1,00</b>							
N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0,23	-0,75	<b>1,00</b>						
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-0,18	-0,83	-0,98	<b>1,00</b>					
O <sub>2</sub>	0,08	0,24	-0,52	0,45	<b>1,00</b>				
pH	0,25	-0,62	0,77	-0,78	-0,37	<b>1,00</b>			
ALCP	-0,12	0,46	-0,50	0,53	-0,17	-0,41	<b>1,00</b>		
TEMP	0,07	-0,60	0,88	-0,86	0,57	0,58	-0,34	<b>1,00</b>	
SSV	0,93	0,07	0,41	-0,32	-0,09	0,36	-0,24	0,27	<b>1,00</b>
Fase FIII (OD = 1,5 mg.L <sup>-1</sup> e RR = 0,25)									
Variável	DQO	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	O <sub>2</sub>	pH	ALCP	TEMP	SSV
DQO	<b>1,00</b>								
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0,66	<b>1,00</b>							
N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0,88	-0,70	<b>1,00</b>						
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0,84	0,87	0,83	<b>1,00</b>					
O <sub>2</sub>	-0,72	-0,53	-0,89	-0,64	<b>1,00</b>				
pH	0,34	0,80	0,47	0,62	-0,26	<b>1,00</b>			
ALCP	0,35	0,73	0,34	0,53	-0,23	0,67	<b>1,00</b>		
TEMP	-0,08	-0,19	-0,37	-0,28	0,51	-0,35	-0,21	<b>1,00</b>	
SSV	0,98	0,64	0,81	0,83	-0,62	0,27	0,30	0,02	<b>1,00</b>

Fonte: O Autor (2020).

O primeiro reator era anaeróbico com a finalidade de remover matéria orgânica a fim de diminuir a competição das bactérias autotróficas e heterotróficas pelo substrato. A eficiência de remoção de DQO bruta no RAN foi de 73,6%, 77,7% e 82,3% nas fases FI, FII e FIII. O valor médio da DQO bruta efluente do RAN (ponto P2) foi de 115,6±19,1 mg.L<sup>-1</sup>, 92,7±7,9 mg.L<sup>-1</sup> e 72,6±39,7 mg.L<sup>-1</sup> em FI, FII e FIII.

O processo de degradação da matéria orgânica foi estável na fase FII em comparação à fase FI. Bem como, o discreto aumento da RR, em FIII, favoreceu à menor concentração de DQO no efluente do RAN devido ao maior contato biomassa e substrato. As concentrações de DQO filtrada efluente do RAN foram bastante estáveis independente das condições operacionais aplicadas, com valores médios de  $51,8 \pm 10,6$  mg.L<sup>-1</sup>,  $24,9 \pm 5,7$  mg.L<sup>-1</sup> e  $26,0 \pm 13,4$  mg.L<sup>-1</sup> em FI, FII e FIII.

O desempenho do sistema apresentou satisfatória remoção de matéria orgânica, uma vez que a concentração de DQO efluente (P3) foi inferior a 30 mg.L<sup>-1</sup> nas três fases operacionais (Figura 33A), correspondendo a uma boa eficiência de 93% a 94%. Análise estatística comparativa das concentrações de DQO do efluente final com base nos Testes ANOVA e *Tukey* apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as três fases (Apêndice H).

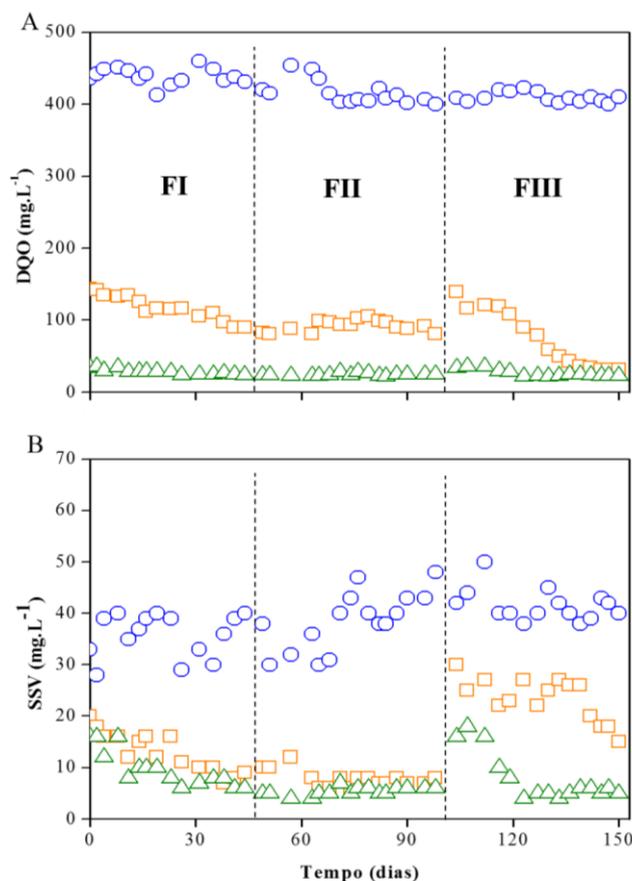
O teste *Tukey* apontou que a fase FII foi diferente significativamente entre as demais fases. O resultado sugeriu que o baixo OD favoreceu discretamente o maior consumo de DQO, visto que bactérias anaeróbias facultativas, desnitrificantes e nitrificantes (ver adiante) estiveram presentes no lodo aeróbio do RAE, ou seja, uma biomassa mixotrófica.

Também foi observada a remoção dos sólidos com concentrações no efluente final inferior a 10 mg SSV.L<sup>-1</sup> nas três fases, correspondendo a eficiências de remoção em 74%, 85% e 81% para as fases FI, FII e FIII, respectivamente (Tabela 18, Figura 33B). Comparativamente, as diferenças entre as concentrações de SSV em P3 foram significativas ( $p < 0,05$ ). (Apêndice H).

O teste *Tukey* apontou que a fase FII foi diferente significativamente entre as demais fases. O sistema estava estabilizado e promoveu à retenção da biomassa. Na fase FIII, devido ao incremento da RR 0,25 existiu uma discreta lavagem (*wash out*) da biomassa, no período estacionário. Assim, uma maior concentração de SSV no efluente do sistema.

O meio suporte foi de suma importância para a retenção da biomassa, assim impedindo possíveis desprendimento de excesso de lodo. Tais resultados corroboram com as correlações fortes positivas obtidas entre DQO e SSV em FI (0,97), FII (0,93) e FIII (0,98) (Tabela 19). A formação de um biofilme denso também foi observada na superfície do material suporte (Apêndice I).

Figura 33 - Concentrações obtidas no afluente - P1 (○), efluente do RAN – P2 (□), efluente do RAE – P3 (△) durante a fase FI (3,0 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> e RR = 0,0), fase FII (1,5 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> e RR = 0,0) e fase FIII (1,5 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> e RR = 0,25). DQO (A) e SSV (B).



Fonte: O Autor (2020).

Observa-se que as maiores parcelas de DQO e SSV removidas no sistema ocorreu no RAN, portanto, com o efluente alimentando o RAE favorecendo o processo de nitrificação com uma baixa relação DQO/N. E comparando os resultados de DQO e SSV no efluente do sistema com de outros trabalhos similares, o desempenho do sistema estudado pode ser considerado muito bom.

Moura *et al.* (2012) operaram um reator de leito estruturado em fluxo contínuo, em escala de bancada com aeração intermitente, alimentado também por esgoto sintético e RR de 0,5. As concentrações obtidas no efluente do sistema foram de 39 a 54 mg DQO.L<sup>-1</sup> e de 13 a 27 mg SSV.L<sup>-1</sup>, correspondendo a eficiências de remoção de 85-89% e 15-49%, respectivamente. Já Santos *et al.* (2016) obtiveram um efluente final com DQO entre 13 e 45 mg DQO.L<sup>-1</sup> e SSV entre 10 e 33 mg SSV.L<sup>-1</sup>, correspondendo a eficiências de 94-97% e 25-66%, respectivamente.

Araújo (2015) operou reatores sequenciais anaeróbio-aeróbio-anóxico, em escala de bancada, alimentado com esgoto sintético, TDH entre 5 h e 10 h e OD de 0,5 a 2,5 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>. As concentrações obtidas no efluente do sistema foram de 23 a 56 mg DQO.L<sup>-1</sup> e SSV entre 6 e 28 mg SSV.L<sup>-1</sup>. Nanes (2017) operou reatores sequenciais anaeróbio-aeróbio, em escala de bancada, alimentado com esgoto sintético, TDH de 10 h e OD de 1,7 mg.O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>. As concentrações obtidas no efluente do sistema foram de 20 a 48 mg DQO.L<sup>-1</sup> e SSV entre 2 e 29 mg SSV.L<sup>-1</sup>.

Yan *et al.* (2019) operaram um reator em batelada sequencial, em escala de bancada com aeração limitada (0,7 a 1,2 mg.L<sup>-1</sup>), alimentado também por esgoto sintético. As concentrações obtidas no efluente do sistema foram entre 40 a 50 mg DQO.L<sup>-1</sup>, correspondendo a eficiências de remoção de DQO entre 85% e 86%.

No tocante à remoção de nitrogênio no sistema de tratamento, observa-se primeiro que o processo de amonificação no reator RAN foi proeminente em todas as 3 fases, uma vez que as concentrações de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> efluentes (ponto P2, ~36,5 mg N.L<sup>-1</sup>) foram iguais às de N-NTK, portanto, sem conteúdo de nitrogênio orgânico, este alimentado somente pelo afluente (ponto P1a ~12,5 mg N.L<sup>-1</sup>). Em P2, o N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> nas 3 fases foi resultante do afluente e da completa amonificação do nitrogênio orgânico. Em FIII, uma pequena parcela é devido ao processo de desnitrificação dentro do RAN, que consumiu a matéria orgânica e nitrogênio nitrito, este recirculado do RAE, e convertidos a nitrogênio amoniacal e gerando ainda alcalinidade.

As concentrações médias de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> e N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> na parte inferior do RAN, logo após a mistura do afluente e da recirculação foram de 2,0 mg.L<sup>-1</sup> e 0,2 mg.L<sup>-1</sup> no ponto P1m (fase FIII, Tabela 18); estes valores são basicamente resultantes da recirculação, uma vez que as concentrações de ambos eram nulas (ou abaixo do limite de detecção) no afluente, o que ocorreu também nas duas fases anteriores sem recirculação. Em P2, no caso de FIII, aqueles valores se reduziram para 0,1 a 0,0 mg N-N.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

A estabilidade do processo no RAN pode ser creditada também à manutenção de valores de pH de 7,6 a 7,8, com tamponamento adequado obtido pela presença de alcalinidade com concentrações médias de 300 a 335 mg CaCO<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup> (Tabela 18). Os resultados de nitrogênio no RAN para a fase FIII com recirculação, como para as duas outras fases sem recirculação, pela presença de nitrito em P2, sugerem a ocorrência discreta do processo de nitrificação parcial, junto com a remoção de matéria orgânica.

*Nitrosomonas* podem oxidar amônia em condições anaeróbia (SCHMIDT E BOCK, 1997; STEIN, 2019) e foi confirmada por sequenciamento no RAN e RAE (ver adiante). A

biomassa presente no RAN foi proveniente do lodo do reator híbrido (experimento A); e provavelmente, esta bactéria adaptou-se as condições mínimas de pH, OD e temperatura no RAN.

O RAN foi responsável por remover grande parte da matéria orgânica; assim, removeu uma parcela significativa da carga orgânica afluenta de 73% (FI), 78% (FII) e 82% (FIII), o que resultou em cargas orgânicas no RAE de 1,3 g O<sub>2</sub>.d<sup>-1</sup> (FI) e 1,0 g O<sub>2</sub>.d<sup>-1</sup> (FII e FIII) (Tabela 19).

A nitrificação ocorreu principalmente no RAE, como esperado. A correlação linear positiva entre ALCP e N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> em FI (0,85), FII (0,46) e FIII (0,73) foi observada (Tabela 19); por consequência existiu diminuição da relação N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/ALCP de 0,04 para 0,02. A correlação forte negativa entre N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> nas fases FI (-0,87), FII (-0,75) e FIII (-0,70) também corrobora com a evidência do processo de nitrificação parcial no RAE.

A nitrificação no RAE resultou em concentrações médias de nitrogênio amoniacal em P3 de 5,6 (FI), 2,5 (FII) e 2,2 (FIII) mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.L<sup>-1</sup> (Tabela 18 e Figura 34A). Estes resultados apresentaram diferenças significativas entre as três fases (p<0,05) para os Testes ANOVA e Tukey (Apêndice H) e corroboraram com a correlações negativas obtidas entre N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (Tabela 19). Como a totalidade de N-NTK em P3 consistia somente de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, as eficiências de remoção de N-NTK no sistema foram de 84% (FI), 93% (FII) e 94% (FIII).

Adicionalmente, a nitrificação no RAE promoveu em termos médios nas fases, um consumo da alcalinidade de cerca de 21 mg CaCO<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup> para a oxidação de amônia de cerca de 33 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.L<sup>-1</sup> (Tabela 18). Isto correspondeu a um consumo médio de 6,4 g CaCO<sub>3</sub> g (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)<sup>-1</sup>, próximo do valor de 7,05 g CaCO<sub>3</sub> g (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)<sup>-1</sup> citado por Rittmann e McCarty (2001). Como nesta oxidação ocorre a produção de ácido e como não ocorreram mudanças significativas de pH nas três fases, mantendo-se próximo do neutro, o bom tamponamento resultou em um processo de nitrificação estável. Esta estabilidade pode ser indicada também pelas correlações positivas entre N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e ALCP, pH e ALCP e pH e N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Tabela 19).

Avaliando o resultado, o teste Tukey sugeriu que as fases FII e FIII foram diferentes significativamente da fase FI. Provavelmente, a biomassa mixotrófica composta BOA, Ananmmox e Comammox (*Nitrospira*) favoreceram o consumo de nitrogênio amoniacal (discussão mais adiante). As correlações nas três fases entre N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> foram fortes negativas (Tabela 19).

Em FII, possivelmente, a menor correlação entre ALCP e  $\text{N-NH}_4^+$  se deu pela menor disponibilidade de OD no RAE; o que resultou na inversão na rota do processo nitrificação e favoreceu à nitrificação ( $6,1 \pm 2,9 \text{ mg.L}^{-1}$ ) do que a nitratação ( $4,7 \pm 2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ). BOA (0,2 a  $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) tem uma constante de meia saturação de oxigênio mais baixa que as BON (1,2 a  $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) (GE *et al.* 2015). Assim, as BOA têm tendência de crescimento em ambientes com níveis de OD baixo, favorecendo o acúmulo de nitrito.

Em FIII, o OD já tinha sido reduzido para  $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ , na fase anterior, e aliado à recirculação o acúmulo de nitrito ( $9,8 \pm 1,3 \text{ mg.L}^{-1}$ , Figura 34B) foi proeminente. Logo, a correlação entre essas variáveis voltou a ser forte positiva.

No estudo de Araújo (2015) as concentrações médias no efluente do RAE variaram entre 3,5 e  $9,9 \text{ mg N-NH}_4^+.\text{L}^{-1}$ . Já o trabalho de Nanes (2017) apresentou concentrações médias no efluente do reator aeróbio entre 11,7 e  $24,8 \text{ mg N-NH}_4^+.\text{L}^{-1}$ . Em outros estudos, Moura *et al.* (2012) e Santos *et al.* (2016) obtiveram concentrações médias no efluente do sistema entre 1,2 a  $13,3 \text{ mg N-NH}_4^+.\text{L}^{-1}$  e 1,7 a  $24,4 \text{ mg N-NH}_4^+.\text{L}^{-1}$ , respectivamente.

Yan *et al.* (2019) operaram um reator em batelada sequencial, em escala de bancada com aeração limitada (0,7 a  $1,2 \text{ mg.L}^{-1}$ ), alimentado também por esgoto sintético. As concentrações obtidas no efluente do sistema foram entre 2,1 a  $8,6 \text{ mg N-NH}_4^+.\text{L}^{-1}$ , correspondendo a eficiências de remoção de nitrogênio amoniacal entre 91% e 97%.

O processo de nitrificação parcial apresentou diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ), nas três fases estudadas (Apêndice H). O teste *Tukey* apontou que as fases FII e FIII foram diferentes significativamente da fase FI. O resultado já era esperado, visto que as condições de operação estudadas visaram o acúmulo de nitrito na fase FIII.

Em comparação aos estudos da literatura, Araújo (2015) obteve concentrações médias de 0,2 a  $0,8 \text{ mg N-NO}_2^-.\text{L}^{-1}$  e 4,4 a  $5,7 \text{ mg N-NO}_3^-.\text{L}^{-1}$  no efluente do RAE. Já o experimento realizado por Nanes (2017) obteve concentrações médias de 0,1 a  $0,7 \text{ mg N-NO}_2^-.\text{L}^{-1}$  e 3,3 a  $10,4 \text{ mg N-NO}_3^-.\text{L}^{-1}$  no efluente do RAE.

Os estudos de Moura *et al.* (2012) e Santos *et al.* (2016), que utilizaram um reator com biomassa aderida e aeração intermitente entre 2,0 a  $3,5 \text{ mg O}_2.\text{L}^{-1}$ , em escala de bancada, apresentaram concentrações médias entre 0,0 e  $0,5 \text{ mg N-NO}_2^-.\text{L}^{-1}$  e 0,5 a  $1,6 \text{ mg N-NO}_3^-.\text{L}^{-1}$  e 1,1 a  $2,5 \text{ mg N-NO}_2^-.\text{L}^{-1}$  e 1,6 a  $13,4 \text{ mg N-NO}_3^-.\text{L}^{-1}$ , respectivamente.

Yan *et al.* (2019) operaram um reator em batelada sequencial, em escala de bancada com aeração limitada (0,7 a  $1,2 \text{ mg.L}^{-1}$ ), alimentado também por esgoto sintético. As concentrações obtidas no efluente do sistema foram entre 7,4 a  $12,2 \text{ mg N-NO}_2^-.\text{L}^{-1}$ .

No presente estudo, o resultado indicou que a variável OD foi de suma importância para o processo; bem como, o aumento na  $RAN_1$  de 16% (FI) a 92% (FIII) (Figura 34C). Nesse caso, como a  $RAN_i$  é superior a 50%, pode-se dizer que a nitrificação aconteceu principalmente via nitrito (Yuan e Gao, 2010). Yan *et al.* (2019) operaram um reator em batelada sequencial (0,7 a 1,2 mg  $O_2.L^{-1}$ ) viabilizaram a  $RAN_1$  de 91%. Quando a concentração de OD foi aumentada para 1,2 mg. $L^{-1}$ , a  $RAN_1$  foi reduzida gradualmente. Soliman e Eldyasti (2016) operaram um reator sequencial em batelada (0,5 a 1,5 mg  $O_2.L^{-1}$ ) e obtiveram a  $RAN_1$  de 93%.

O desenvolvimento de micro-organismos nitrificantes foi favorável pela reduzida quantidade de matéria orgânica, associada à disponibilidade de OD máxima de 3,0 mg. $L^{-1}$  e mínima faixa de 1,4 a 1,5 mg. $L^{-1}$  no RAE. A relação OD/N- $NH_4^+$  resultante ficou entre 0,4 e 0,7, sendo maior em FIII (Tabela 18), o que favoreceu as nitrificantes nesta fase. O OD é o co-substrato para o processo de nitrificação e sua concentração influencia na taxa de reação de amônia a nitrito (PENG E ZHU, 2006; GE *et al.* 2015). Logo, as correlações negativas entre OD e N- $NH_4^+$  (-0,53) e OD e N- $NO_2^-$  (-0,89), bem como as correlações positivas entre DQO e N- $NH_4^+$  (0,66) DQO e N- $NO_2^-$  (0,88) corroboram com o maior acúmulo de nitrito nesta fase, em comparação as Fases FI e FII.

Alguns autores reportaram que BOA foram mais resistentes do que BON às possíveis mudanças de OD, pH e temperatura no ambiente (ZIELÍNSKA *et al.* 2012; GE *et al.* 2015). O biofilme esteve bem aderido no RAE, mesmo com o discreto aumento da RR (0,07 m. $h^{-1}$ ), em FIII; logo, não existiu a lavagem (*wash out*) da biomassa nitrificante, bem como o pH, temperatura e OD não apresentaram variações bruscas (Tabela 18); logo, contribuiu para a recuperação instantânea da alcalinidade a bicarbonato no RAN, evitando-se variações bruscas no pH, e conseqüentemente em impactos negativos ao processo de nitrificação estabelecido.

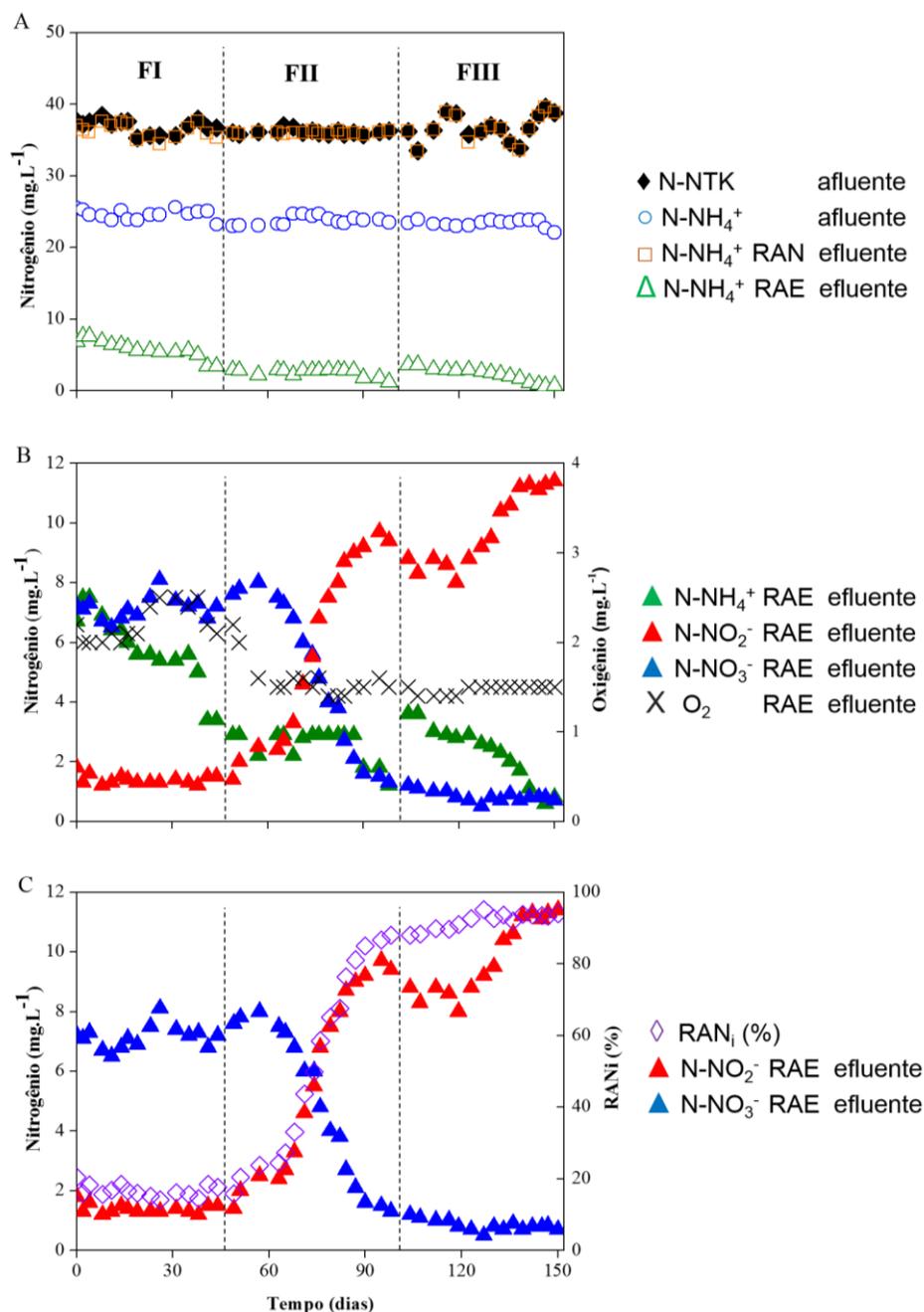
O efluente amonificado do reator RAN foi disponibilizado para os micro-organismos nitrificantes no RAE (Tabela 18); dada à baixa a relação DQO/N deste substrato (2,0 a 3,2) nas 3 fases, as bactérias heterotróficas no RAE ficaram limitadas pela disponibilidade de carbono. Entretanto, um interessante resultado do sequenciamento massivo sugeriu a presença concomitante de bactérias desnitrificantes e oxidantes de amônia no lodo aderido do RAE. Esta evidência sugere à viabilidade de ocorrência do processo de nitrificação parcial e desnitrificação simultânea (NDS) pelo consórcio microbiano presente no biofilme do RAE. Esta ocorrência foi confirmada posteriormente pelas análises de sequenciamento massivo (ver adiante).

A ocorrência do processo NDS foi reportada em estudo com reatores operando em pH de 6,7 a 8,5, temperatura de 17 a 27°C, relação DQO/N de 1,8 a 9,7, OD entre 0,1 e 4,8 mg.L<sup>-1</sup>, carga orgânica de 1,24 a 2,18 g DQO.d<sup>-1</sup>, carga nitrogenada de 0,18 a 0,31 mg N.d<sup>-1</sup> e TRS de 10 a 37 dias (SANTOS *et al.* 2016; BUENO *et al.* 2018; DAMIANOVIC *et al.* 2018; FENG *et al.* 2018). As condições no presente estudo foram: temperatura próximas a 28°C, pH de 7,2, OD entre 1,5 e 3,0 mg.L<sup>-1</sup> e cargas orgânica e nitrogenada de 1,0 a 1,3 g DQO.d<sup>-1</sup> e 0,4 a 0,5 g N.d<sup>-1</sup> aplicadas no RAE (Tabela 20); bem como, a relação DQO/N de 2,0 a 3,2 e TRS de 16 a 19 dias.

Nanes (2017) operando reatores sequenciais anaeróbio-aeróbio com aeração contínua de 1,7 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> viabilizou o consumo de nitrogênio amoniacal sem o acúmulo de N-NO<sub>x</sub><sup>-</sup>, portanto um indicativo de NDS no lodo aderido do RAE. Entretanto, os resultados das PCRs confirmaram presença das bandas para BOA e ausentes para desnitrificantes. Sabe-se que *Nitrosomonas* (BOA) pode desnitrificar em ambientes anóxicos (SCHMIDT E BOCK, 1997; SCHMIDT *et al.* 2004).

No que tange ao nitrogênio total, a concentração no efluente final (P3) foram de 12,8 a 14,2 mg N.L<sup>-1</sup> em FI, FII e FIII, respectivamente com diferença significativa (p<0,05). Avaliando o resultado, o teste *Tukey* apontou que as fases FII e FIII foram diferentes significativamente da fase FI. O resultado confirmou que as condições em operação favoreceram uma biomassa mixotrófica; bem como, o processo NDS.

Figura 34 - Desempenho do sistema de tratamento nas três fases experimentais FI ( $3,0 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$  e  $\text{RR} = 0,0$ ), FII ( $1,5 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$  e  $\text{RR} = 0,0$ ) e FIII ( $1,5 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$  e  $\text{RR} = 0,25$ ). Concentrações de  $\text{N-NH}_4^+$  (A), nitrogênio efluente do RAE (B) e razão de acúmulo de nitrito

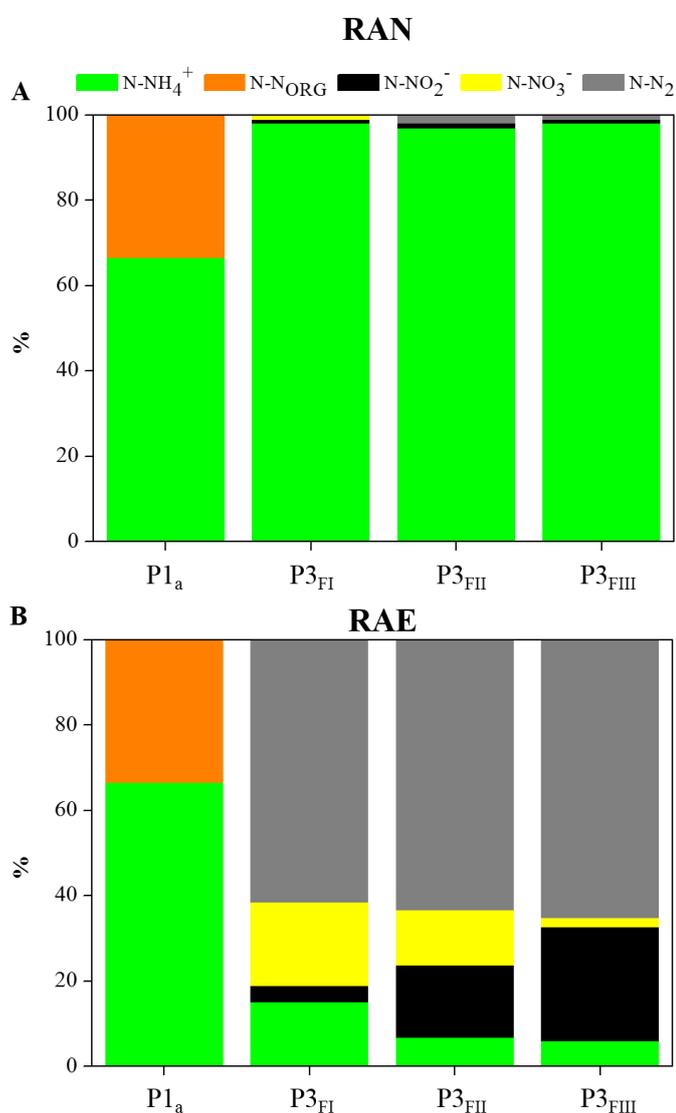


Fonte: O Autor (2020).

As eficiências de remoção de  $\text{N-NT}$  foram 61%, 63% e 65% nas fases FI, FII e FIII, respectivamente (Figura 35). Moura *et al.* (2012) operaram um reator de leito estruturado em fluxo contínuo, em escala de bancada com aeração intermitente ( $2,0$  a  $3,5 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$ ), alimentado também por esgoto sintético e  $\text{RR}$  de  $0,5$ . As concentrações obtidas no efluente do sistema foram de  $5,3$  a  $16,0 \text{ mg N-NT}\cdot\text{L}^{-1}$ , correspondendo eficiências de remoção de  $\text{N-NT}$

entre 38% e 79%. Santos *et al.* (2016) utilizaram um reator com biomassa aderida e aeração intermitente entre 2,0 a 3,5 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>, também alimentado com esgoto sintético e RR de 0,5, obtiveram um efluente final com concentrações médias de 17,4 a 36,7 mg N-NT.L<sup>-1</sup> no efluente do sistema. Yan *et al.* (2019) utilizaram um reator em batelada sequencial, também alimentado com esgoto doméstico sintético; obtiveram um efluente final com N-NT entre 12 e 15 mg.L<sup>-1</sup>, correspondendo eficiências de remoção N-NT entre 63% e 72%.

Figura 35 - Balanço das formas de nitrogênio (%) no afluente do sistema e efluentes do RAN (A) e RAE (B) nas fases estudadas dos reatores sequenciais anaeróbio-aeróbio



Fonte: O Autor (2020).

Tabela 20 - Carga orgânica e nitrogenada diária aplicada nos reatores sequenciais anaeróbio-aeróbio nas fases FI e FII FIII e carga remanescente no efluente final (calculadas com base nas concentrações afluentes em P1a a P3)

Vazão, concentração (C) e carga aplicada diária orgânica (CO) e nitrogenada (CN)	FI (3,0 mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> e RR = 0,0)			FII (1,5 mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> e RR = 0,0)			FIII (1,5 mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> e RR = 0,25)			
	RANA <sub>AF</sub> (P1a)	RAE <sub>AF</sub> (P2)	RAE <sub>EF</sub> (P3)	RANA <sub>AF</sub> (P1a)	RAE <sub>AF</sub> (P2)	RAE <sub>EF</sub> (P3)	RANA <sub>AF</sub> (P1a)	RAE <sub>AF</sub> (P2)	RAE <sub>EF</sub> (P3)	REC (P1 <sub>R</sub> )
Vazão (L.d <sup>-1</sup> )	11,3 (0,0)	11,3 (0,0)	11,3 (0,0)	11,3 (0,0)	11,3 (0,0)	11,3 (0,0)	11,3 (0,0)	14,1 (0,0)	14,1 (0,0)	2,8 (0,0)
<b>DQO</b>										
C (mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> )	437,9 (12,1)	115,6 (19,1)	28,3 (3,9)	416,0 (17,1)	92,7 (7,9)	24,6 (1,8)	409,7 (7,0)	72,6 (39,7)	26,5 (5,1)	26,5 (5,1)
CO (g O <sub>2</sub> .d <sup>-1</sup> )	4,9 (0,1)	1,3 (0,2)	0,3 (0,0)	4,7 (0,2)	1,0 (0,1)	0,3 (0,0)	4,6 (0,1)	1,0 (0,6)	0,4 (0,1)	0,1 (0,0)
<b>N-NTK</b>										
C (mg N.L <sup>-1</sup> )	36,8 (1,0)	36,3 (1,0)	5,6 (1,4)	36,1 (0,4)	36,0 (0,2)	2,5 (0,5)	36,7 (1,9)	36,6 (1,9)	2,2 (1,0)	2,2 (1,0)
CN (g N.d <sup>-1</sup> )	0,4 (0,0)	0,4 (0,0)	0,1 (0,0)	0,4 (0,0)	0,4 (0,0)	0,0 (0,0)	0,4 (0,0)	0,5 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
<b>N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>										
C (mg.L <sup>-1</sup> )	24,5 (0,8)	36,3 (1,0)	5,6 (1,4)	23,8 (0,6)	36,0 (0,2)	2,5 (0,5)	23,4 (0,5)	36,6 (1,9)	2,2 (1,0)	2,2 (1,0)
CN (g N.d <sup>-1</sup> )	0,3 (0,0)	0,4 (0,0)	0,1 (0,0)	0,3 (0,0)	0,4 (0,0)	0,0 (0,0)	0,3 (0,0)	0,5 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
<b>N-NORG</b>										
C (mg N.L <sup>-1</sup> )	12,3 (1,1)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	12,3 (0,7)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	13,3 (2,2)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
CN (g N.d <sup>-1</sup> )	0,1 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,1 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,1 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
<b>N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>										
C (mg N.L <sup>-1</sup> )	0,0 (0,0)	0,2 (0,2)	1,4 (0,2)	0,0 (0,0)	0,1 (0,1)	6,1 (2,9)	0,0 (0,0)	0,1 (0,1)	9,8 (1,3)	9,8 (1,3)
CN (g N.d <sup>-1</sup> )	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,1 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,1 (0,0)	0,0 (0,0)
<b>N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>										
C (mg N.L <sup>-1</sup> )	0,0 (0,0)	0,2 (0,2)	7,2 (0,4)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	4,7 (2,5)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,8 (0,2)	0,8 (0,2)
CN (g N.d <sup>-1</sup> )	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,1 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
<b>N-NT</b>										
C (mg N.L <sup>-1</sup> )	36,8 (1,0)	36,7 (1,2)	14,2 (1,4)	36,1 (0,4)	36,1 (0,2)	13,3 (0,9)	36,7 (1,9)	36,7 (1,9)	12,8 (0,5)	12,8 (0,5)
CN (g N.d <sup>-1</sup> )	0,4 (0,0)	0,4 (0,0)	0,2 (0,0)	0,4 (0,0)	0,4 (0,0)	0,1 (0,0)	0,4 (0,0)	0,5 (0,0)	0,1 (0,0)	0,0 (0,0)

Fonte: O Autor (2020).

### 5.2.2. Comunidade microbiana presente no lodo suspenso e aderido dos reatores sequenciais anaeróbio e aeróbio

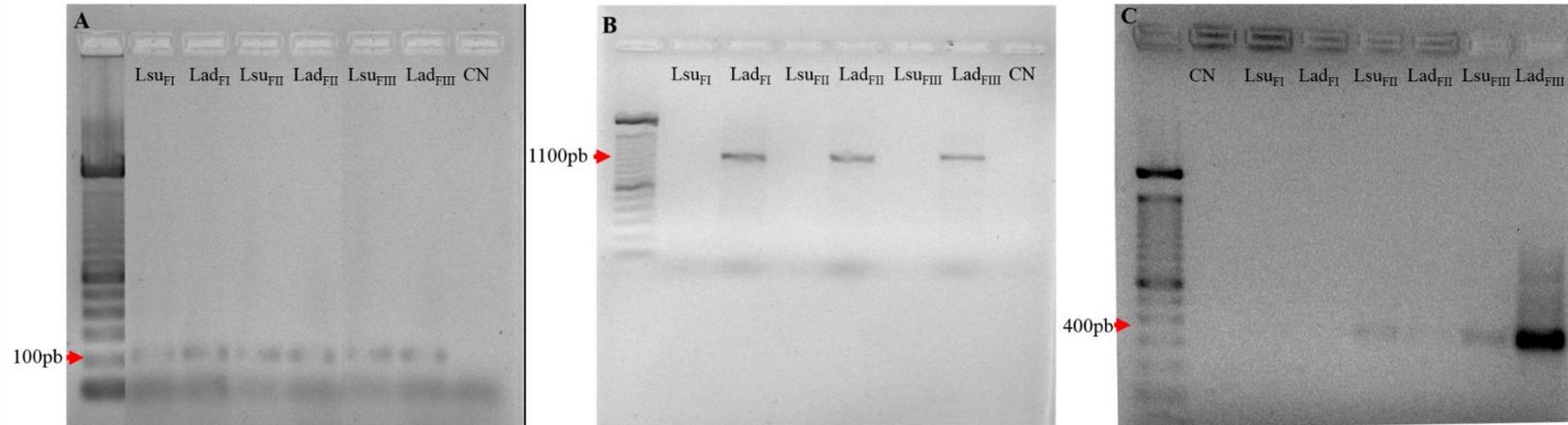
A PCR foi utilizada no intuito de conformar a presença ou ausência de microorganismos em amostras dos reatores. Assim, bactérias desnitrificantes estiveram presentes em todas as amostras de lodo do RAN e RAE (Figura 36A). Uma observação interessante foi a presença de bactérias desnitrificantes no ponto Lad do RAE em FI, FII e FIII. Esta evidência, sugere à viabilidade de ocorrência do processo NDS pelo consórcio microbiano presente no lodo do RAE.

Pochana e Keller, (1999), Santos *et al.* (2016) e Feng *et al.* (2018) reportaram que relações DQO/N próximas a 1,8 a 9,7 e concentrações de OD entre 0,3 e 3,5 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>, são fatores chaves para a presença do processo NDS em lodo aderido ou suspenso em reatores aeróbios. Tais condições também foram proeminentes no RAE do presente estudo.

As BOA (Figura 36B) estiveram presentes no ponto Lad do RAE nas fases FI, FII e FIII. O resultado já era esperado, devido às concentrações médias de nitrito no efluente do RAE. As BOA se adaptam melhor em ambientes com concentrações de OD entre 0,5 a 1,7 mg.L<sup>-1</sup>. Discutido anteriormente, o OD é o co-substrato para o processo de nitrificação (PENG E ZHU, 2006; GE *et al.* 2015); bem como, BOA têm uma constante de meia saturação de oxigênio mais baixa que as BON (1,2 a 1,5 mg.L<sup>-1</sup>) (PAREDES *et al.* 2007; GE *et al.* 2015). Assim, as BOA têm tendência de crescimento em ambientes com níveis de OD baixo, favorecendo o acúmulo de nitrito.

A baixa concentração de OD (0,3 mg.L<sup>-1</sup>) no RAN, aliada à recirculação do efluente do RAE rico em nitrito (substrato) pode ter favorecido o processo Anammox, confirmados pela presença da banda na PCR específica no ponto Lsu, em FIII (Figura 36C). As concentrações médias de  $2,0 \pm 0,3$  mg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.L<sup>-1</sup> e  $0,2 \pm 0,1$  mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> presentes no ponto P1m promoveram o processo Anammox no RAN. O processo Aammox também esteve presente no lodo do RAE, confirmados pela presença da banda na PCR específica; provavelmente, condições anóxicas no seu interior obtiveram condições mínimas para sua coexistência.

Figura 36 - PCRs para desnitrificantes (A), BOA (B) e bactérias Anammox (C) nas amostras Lsu FI e Lad FI (FI), Lsu FII e Lad FII (FII) e Lsu FIII e Lad FIII (FIII).  
Legenda: Lsu = lodo suspenso e Lad = Lodo aderido, pb (pares de base) e CN (controle negativo).

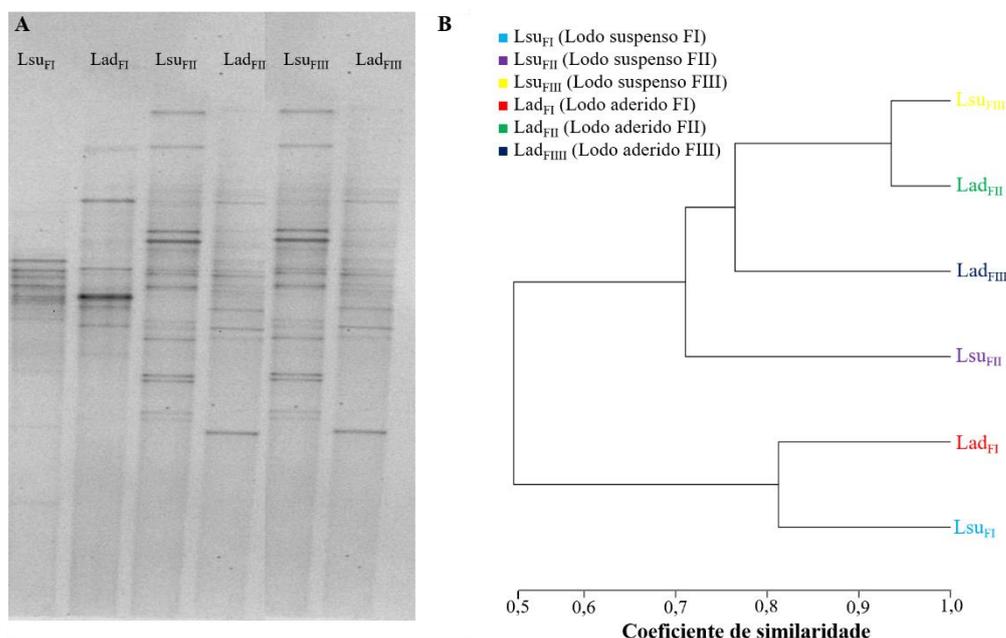


Fonte: O Autor (2020).

No que concerne à dinâmica da comunidade microbiana, a DGGE para o domínio *Bacteria* (Figura 37A) confirmou um aumento na diversidade das bandas, nos pontos Lsu e Lad dos reatores sequenciais anaeróbio-aeróbio em FIII, em comparação à fase FI. O baixo OD ( $1,5 \pm 0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e o discreto aumento no contato biomassa e substrato promovido pela RR de 0,25, pH de  $7,2 \pm 0,1$  e temperatura de  $27,7 \pm 0,3^\circ\text{C}$  resultaram em satisfatória remoção de DQO, nitrogênio amoniacal e nitrogênio total com concentrações no efluente do RAE de  $26,5 \pm 5,1 \text{ mg O}_2.\text{L}^{-1}$ ,  $2,2 \pm 1,0 \text{ mg N-NH}_4^+.\text{L}^{-1}$  e  $12,8 \pm 0,5 \text{ mg N-NT.L}^{-1}$ , em FIII.

No que tange à similaridade entre as amostras Lsu e Lad (Figura 37B), foi possível observar que as amostras Lsu e Lad (FI) apresentam uma distância filogenética de 50% com relação as demais amostras, conforme o índice de similaridade Jensen-Shanon. A redução da concentração de OD de  $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$  para  $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$  no RAE em FII e FIII, foi de suma importância para o aumento da diversidade bacteriana.

Figura 37 - Perfil de bandas para o domínio *Bacteria* nos lodos suspensos (Lsu) e aderidos (Lad) em FI, FII e FIII pela ferramenta da DGGE (A). O dendograma da análise de *Clustering*. Medida de distância: Jaccard index; algoritmo: UPGMA, coeficiente de correlação cofenética: 1,0 (B).

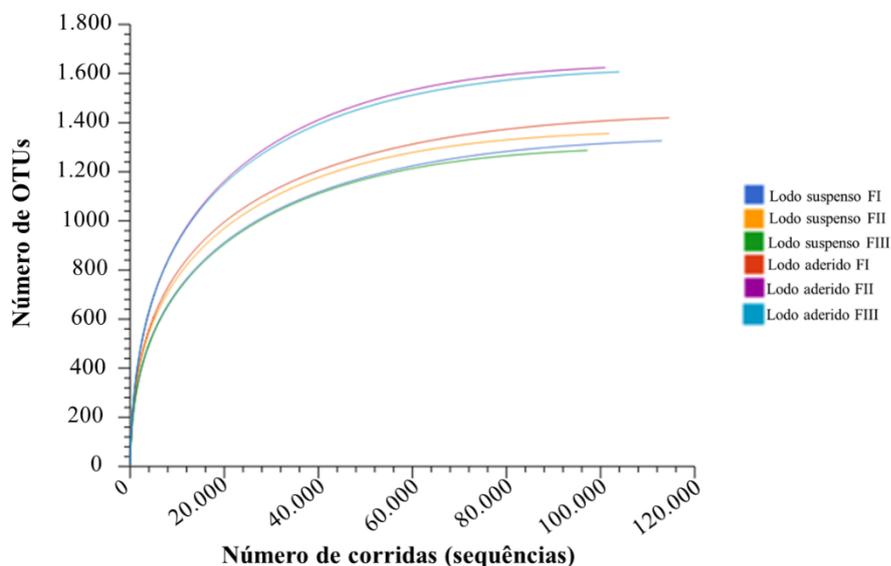


Fonte: O Autor (2020).

O sequenciamento MiSeq foi utilizado para revelar a composição da comunidade microbiana. As amostras Lsu e Lad foram coletadas no RAN e RAE, respectivamente. As curvas de rarefação determinaram o quanto o sequenciamento conseguiu explorar a diversidade microbiana das amostras (Figura 38). Assim, os números de OTUs (espécie)

identificados pelo número de corridas (sequências) estimaram todos os presentes nas amostras.

Figura 38 - Curvas de rarefação das amostras de lodo suspenso e aderido durante as fases FI, FII e FIII



Fonte: O Autor (2020).

Os números de sequências efetivas, assim como os índices de alfa diversidade, das amostras de Lsu e Lad ao longo das fases FI a FIII, estão contidos na Tabela 21, bem como o comprimento médio foi de 250 pb para todas as amostras dos pontos Lsu e Lad.

Tabela 21 - Índices de alfa diversidade de filotipos de micro-organismos

Amostra	Total de leituras	Chao1	ACE	Simpson (D)	Shannon (H)
Lsu <sub>FI</sub>	100.595	463,66	462,06	0,64	2,19
Lsu <sub>FII</sub>	41.950	544,02	548,77	0,93	3,78
Lsu <sub>FIII</sub>	39.296	577,05	539,37	0,88	3,34
Lad <sub>FI</sub>	60.964	583,34	545,56	0,89	3,36
Lad <sub>FII</sub>	37.417	656,36	641,39	0,95	4,08
Lad <sub>FIII</sub>	39.296	599,44	589,88	0,97	4,33

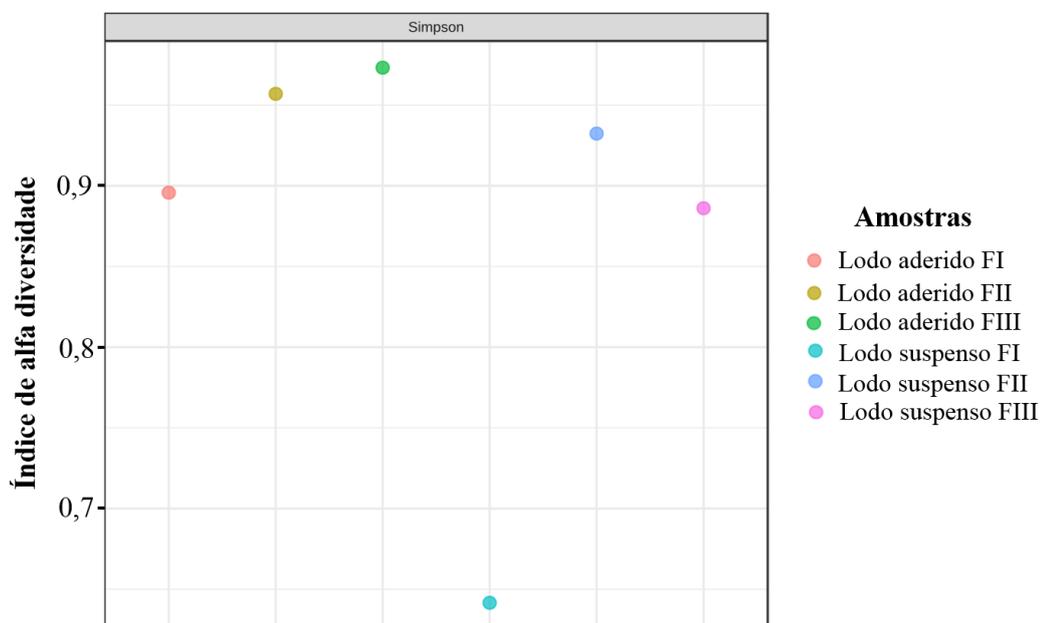
Fonte: O Autor (2020).

Em geral, os índices de Chao1 e ACE indicaram uma riqueza semelhante em todas as amostras. No entanto, as amostras do Lad apresentaram valores ligeiramente maiores, principalmente nas fases FII e FIII, indicando uma maior riqueza em comparação com as do lodo suspenso (Lsu). O índice de Shannon (H), também revelou maior uniformidade para

essas amostras ( $Lad_{FII}$  e  $Lad_{FIII}$ ). Segundo Jost (2007) e Cydzik-Kwiatkowska e Zielinska (2016) uma comunidade microbiana apresenta um alto valor do índice de alfa-diversidade, quando houver um alto número de espécies com um número semelhante.

A estabilidade das condições operacionais aplicadas, principalmente a da concentração de OD na FII e FIII, pode ter contribuído para a similaridade entre as amostras. Os valores do índice de Simpson (D) próximos a 1 indicam maior diversidade e menor dominância em cada amostra. Da FI a FII (menor valor de Simpson para o maior), tanto no lodo suspenso como no aderido, é possível que alguns grupos de micro-organismos tenham se adaptado às condições aplicadas e se revelado de forma mais significativa. Isto poderia justificar a observação sobre o aumento das populações de bactérias anaeróbias facultativas e bactérias desnitrificantes tolerantes a ambientes microaerados (biomassas mixotróficas). Com o uso da recirculação (na FIII), a dominância de alguns gêneros aumentou na biomassa suspensa (índice de Simpson de 0,93 para 0,88). Já o lodo aderido ( $Lad_{FIII}$ ) se manteve com elevada diversidade (índices de Simpson próximos a 1) (Figura 41).

Figura 39 - Índices de alfa diversidade de Simpson  $Lsu$  = ponto de coleta do lodo suspenso do RAN.  $Lad$  = ponto de coleta do lodo aderido do RAE



Fonte: O Autor (2020).

Tal resultado confirma uma biomassa composta por micro-organismos nitrificante, anaeróbias aerotolerantes e bactérias desnitrificantes; logo, as correlações positivas entre DQO e  $N-NO_3^-$  (0,84), DQO e  $N-NO_2^-$  (0,88), ALCP e  $N-NH_4^+$  (0,73) ALCP e  $N-NO_3^-$  (0,53),

ALCP e  $\text{N-NO}_2^-$  (0,34) sugeriram o processo de desnitrificação por bactérias desnitrificantes (Figuras 38A, 42B e Tabela 19).

A Figura. 40 mostra a composição taxonômica e a abundância relativa em nível de filo e gênero das amostras de lodo suspenso (Lsu) e aderido (Lad). Em nível de filo (Figura 40A e Tabela 22), *Actinobacteria* (69,9%) seguido de *Firmicutes* (menor contribuição, 26,1%) foram dominantes no  $\text{Lsu}_{\text{FI}}$ . Ao longo das fases FII e FIII, a abundância do filo *Actinobacteria* diminuiu consideravelmente (de 26,7 a 7,5%), ao passo que os filios *Firmicutes* e *Proteobacteria* permaneceram de modo representativo no lodo suspenso ( $\text{Lsu}_{\text{FII}}$  e  $\text{Lsu}_{\text{FIII}}$ ). Durante a FIII, o filo *Nitrospirae* se revelou significativamente no lodo suspenso (0,3%), com abundância relativa próxima à encontrada no lodo aderido na mesma fase ( $\text{Lad}_{\text{FIII}}$ ). Isso pode ter ocorrido devido à recirculação aplicada durante a FIII com conseqüente reinserção de alguns micro-organismos em suspensão do RAE para o RAN.

No lodo aderido ( $\text{Lad}_{\text{FI}}$ ), inicialmente, os filios *Actinobacteria* (38,2%), *Firmicutes* (26,7%) e *Euryarcheota* (5,6%) foram identificados com maior abundância. A abundância do filo *Firmicutes* se manteve praticamente estável no lodo aderido, enquanto que o filo *Proteobacteria* se revelou de modo mais representativo nas fases FII e FIII. Ainda nestas duas últimas fases, os grupos de micro-organismos pertencentes aos filios *Acidobacteria* (0,7%) e *Chloroflexi* (0,4%) foram identificados com maior abundância relativa. Micro-organismos do filo *Nitrospirae* foram identificados em todas as amostras do lodo aderido, porém apresentaram maior abundância, nas fases FII e FIII. O filo *Planctomyces* foi identificado, embora com abundância relativa muito pequena, em todas as amostras do lodo aderido (<0,04%) e nas amostras das fases FII (1,1%) e FIII (0,02%) do lodo suspenso. Alguns membros deste filo são capazes de oxidar anaerobicamente a amônia, convertendo sua concentração remanescente, bem como a de nitrito, em gás  $\text{N}_2$ . Esse processo é estritamente anóxico e é conhecido também como Anammox (YANG *et al.* 2020). Assim, apesar da baixa abundância relativa, esses micro-organismos podem ter contribuído com uma pequena parcela da remoção de nitrogênio.

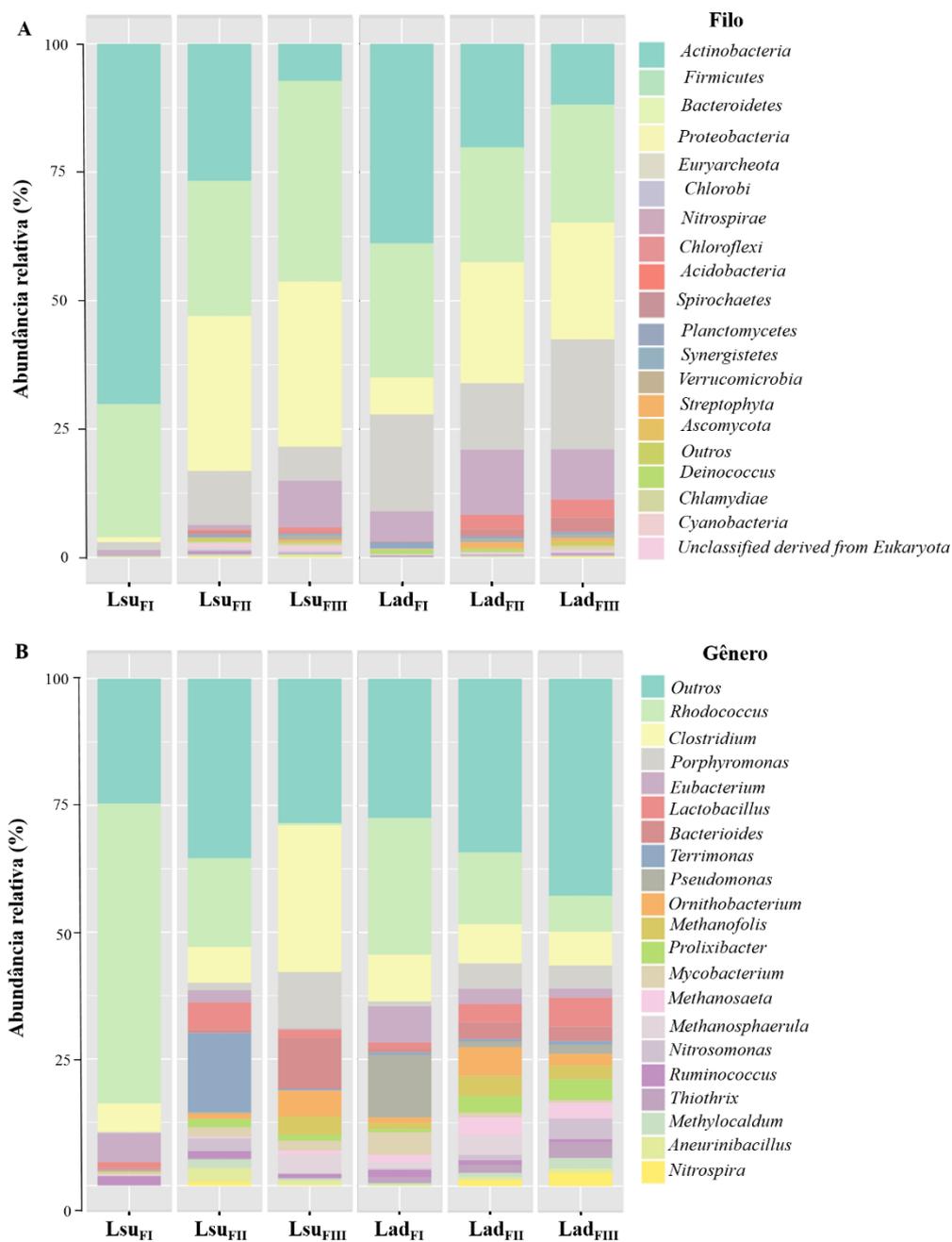
Micro-organismos pertencentes aos filios *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Chloroflexi*, *Bacteroidetes* e *Acidobacteria* são frequentemente reportados em trabalhos com remoção de matéria orgânica e estão presentes em vários sistemas de tratamento de águas residuárias (HE *et al.* 2018; ZHAO *et al.* 2019). Então, os gêneros pertencentes a esses filios (ex. *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Bacterioides*, *Lactobacillus*) foram responsáveis pela remoção de matéria orgânica do sistema (Figura 40B). Na fase FIII, o gênero *Clostridium*

(28,7%) presente no lodo suspenso pode ter assumido papel fundamental nessa remoção que ocorreu principalmente no RAN. A presença de *Clostridium* também foi identificada em todas as amostras do lodo aderido. Na literatura, alguns trabalhos já mostraram a formação de biofilmes com micro-organismos pertencentes a este gênero (VERAS *et al.* 2019) e a presença deles no interior de biofilmes aeróbios (CHO *et al.* 2011). Além deste gênero, os produtores de metano (com menor contribuição), pertencentes ao filo *Euryarcheota*, como *Methanofollis*, *Methanosphaerula*, *Methanosaeta* presentes no  $LSU_{FII}$  e  $LSU_{FIII}$ , também podem ter participado da remoção de DQO, tanto em  $Lsu$ , como em  $Lad$ .

O gênero *Rhodococcus* apresentou a maior abundância no lodo suspenso, com abundância relativa de 58,8% (FI), 17,3% (FII) e 0,4 % (FIII) (Tabela 22). No lodo aderido, estes valores foram 26,3% (FI), 14,0% (FII) e 7,0% (FIII). Como são bactérias aeróbias, elas podem ter sido desfavorecidas pela menor disponibilidade de OD (FII e FIII) e recirculação de efluente do RAE para o RAN (FIII). No entanto, diante da representatividade deste grupo de micro-organismos ao longo da operação e pela sua capacidade em desnitrificar aerobicamente e de nitrificar por via heterotrófica (CHEN *et al.* 2012), pode-se dizer que eles desempenharam um papel fundamental no processo de NDS. Além destes, também foram identificadas bactérias do gênero *Bacteroides*, *Aneurinibacillus*, *Porphyromonas*, *Prolixibacter*, *Pseudomonas*, *Terrimonas* e *Thiothrix*, que também são capazes de desnitrificar, reduzindo nitrito e/ou nitrato a nitrogênio molecular (JU E ZHANG, 2015; FENG *et al.* 2018; YAN *et al.* 2019; ZHAO *et al.* 2019). Neste estudo, elas foram identificadas tanto no lodo suspenso (ambiente anaeróbio) quanto no aderido (ambiente aeróbio) e podem ter contribuído para o processo de NDS junto com o *Rhodococcus*.

A presença de bactérias oxidantes de nitrito do gênero *Nitrospira* foi confirmada nas fases FII ( $Lsu$  e  $Lad$ ) e FIII ( $Lad$ ), coincidindo com a menor disponibilidade de oxigênio no meio. Muitas bactérias desse gênero são favorecidas em baixas concentrações de OD (DAIMS *et al.* 2001; HOW *et al.* 2018). Elas também podem oxidar amônia até nitrato pelo processo Comammox (KOCH *et al.* 2019; JAYAD-MEHRANI *et al.* 2020). O gênero *Nitrosomonas* (bactérias oxidantes de amônia) foi identificado em todas as amostras do lodo aderido, porém com maior representatividade na fase FIII (3,9%), indicando participação no acúmulo de nitrito observado no sistema na mesma fase operacional. Conforme discutido anteriormente, o processo de nitrificação (via nitrito) mais acentuado na fase FIII foi confirmado pela forte correlação negativa entre  $O_2$  e  $N-NO_2^-$  (-0,89) e entre  $N-NH_4^+$  e  $N-NO_2^-$  (-0,70) (Tabela 19).

Figura 40 - Composição taxonômica da comunidade microbiana revelada em nível de filo (A) e gênero (B)



Fonte: O Autor (2020).

Tabela 22 - Micro-organismos chave na remoção de matéria orgânica e nitrogênio em nível de filo e gênero

Filo	Gênero	Amostras						Ambientes	Referência
		Lsu FI (%)	Lsu FII (%)	Lsu FIII (%)	Lad FI (%)	Lad FII (%)	Lad FIII (%)		
<i>Firmicutes</i>	<i>Aneurinibacillus</i>	0,0	2,5	0,9	0,1	0,5	0,8	Microaerofilica	Brenner <i>et al.</i> (2005)
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroides</i>	0,2	0,8	9,8	0,8	3,3	2,9	Anaeróbia estrita	Brenner <i>et al.</i> (2005)
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridium</i>	5,7	7,0	28,7	9,4	7,8	6,4	Anaeróbia estrita	Brenner <i>et al.</i> (2005)
<i>Firmicutes</i>	<i>Eubacterium</i>	5,6	2,4	0,2	7,3	3,1	1,7	Anaeróbia estrita	Brenner <i>et al.</i> (2005)
<i>Firmicutes</i>	<i>Lactobacillus</i>	1,4	5,3	1,7	1,2	3,5	5,7	Anaeróbia facultativa	Brenner <i>et al.</i> (2005)
<i>Euryarchaeota</i>	<i>Methanofollis</i>	0,1	0,1	3,6	1,2	4,0	2,8	Anaeróbia estrita	Chauhan <i>et al.</i> (2006)
<i>Euryarchaeota</i>	<i>Methanosaeta</i>	0,1	0,3	0,8	1,4	3,5	3,0	Anaeróbia estrita	Jetten <i>et al.</i> (1992)
<i>Euryarchaeota</i>	<i>Methanosphaerula</i>	0,1	0,1	3,6	1,2	4,0	0,0	Anaeróbia estrita	Chauhan <i>et al.</i> (2006)
<i>Proteobacteria</i>	<i>Methylocaldum</i>	0,0	1,7	0,4	0,4	0,9	2,1	Aeróbia estrita	Brenner <i>et al.</i> (2005)
<i>Actinobacteria</i>	<i>Mycobacterium</i>	0,4	1,8	2,0	4,6	0,9	0,6	Aeróbia facultativa	Brenner <i>et al.</i> (2005)
<i>Proteobacteria</i>	<i>Nitrosomonas</i>	0,0	2,5	0,1	0,2	1,1	3,9	Aeróbia estrita	Brenner <i>et al.</i> (2005)
<i>Nitrospirae</i>	<i>Nitrospira</i>	0,0	0,8	0,1	0,1	1,2	2,7	Anaeróbia estrita	Brenner <i>et al.</i> (2005)
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Ornithobacterium</i>	0,1	1,0	4,7	1,1	5,7	2,4	Microaerofilico	Brenner <i>et al.</i> (2005)
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Porphyromonas</i>	0,2	1,5	11,5	0,9	5,1	4,4	Anaeróbia estrita	Brenner <i>et al.</i> (2005)
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Prolixibacter</i>	0,0	1,6	1,3	0,6	3,1	4,0	Aeróbia facultativa	Brenner <i>et al.</i> (2005)
<i>Proteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i>	0,3	0,2	0,0	12,4	1,3	1,9	Aeróbica facultativa	Brenner <i>et al.</i> (2005)
<i>Actinobacteria</i>	<i>Rhodococcus</i>	58,8	17,3	0,4	26,3	14,0	7,0	Anaeróbia facultativa	Chen <i>et al.</i> (2012)
<i>Firmicutes</i>	<i>Ruminococcus</i>	2,0	1,5	0,9	1,5	1,0	0,7	Anaeróbia estrita	Brenner <i>et al.</i> (2005)
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Terrimonas</i>	0,0	15,4	0,3	0,5	0,4	0,8	Aeróbia facultativa	Brenner <i>et al.</i> (2005)
<i>Proteobacteria</i>	<i>Thiothrix</i>	0,0	0,2	0,1	1,1	1,5	2,9	Microaerofilica	Brenner <i>et al.</i> (2005)
Outros		25,0	36,0	28,9	27,7	34,1	43,3		
Total		100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0		

Fonte – O Autor (2020).

### 5.2.3. Ensaios cinéticos de nitrificação e desnitrificação

Conforme discutido anteriormente, a biomassa inicial utilizada nos ensaios e coletada do RAE (Lad<sub>FIII</sub>) apresentou uma comunidade mixotrófica. Durante os ensaios de nitrificação via N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (nitritação), foi observado um comportamento semelhante ao descrito durante a operação com os reatores sequenciais. Os micro-organismos oxidaram o N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e produziram uma quantidade bem maior de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> do que N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Figura 41A). A concentração de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> se manteve baixa em todo o experimento, apresentando concentrações próximas a 1,4 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> nas duas primeiras horas e, depois, assumiu valores próximos a 0,7 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. No ensaio de nitrificação via nitrito (nitratção), todo o N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> foi oxidado a N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Figura 41B).

O modelo de decaimento cinético de ordem zero foi o mais adequado para o ajuste dos dados obtidos, tanto para a nitrificação, quanto para a desnitrificação (a seguir). A velocidade específica de nitritação (10,4 mg N.g SSV<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, R<sup>2</sup> = 0,99, Figura 41D) foi maior do que a de nitratção (6,5 mg N.g SSV<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, R<sup>2</sup>=0,95, Figura 41E).

Villaverde *et al.* (1997) operaram um reator com biofiltros submersos, em escala piloto, obtiveram uma velocidade de oxidação de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> de 15,0 mg N.g SSV<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, com uma biomassa predominantemente nitrificante, com OD de 1,0 mg.L<sup>-1</sup>. Yuan e Gao (2010) obtiveram velocidade de nitrificação via N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> de 2,7 mg N.g SSV<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> em um reator em batela sequencial operando com OD de 2,5 mg.L<sup>-1</sup>, com uma biomassa mixotrófica (nitrificante e desnitrificante).

Moura (2011) operando um reator de leito fixo estuturado, em escala de bancada, com OD entre 2,0 e 3,5 viabilizou a velocidade específica de nitrificação via N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> de 1,4 mg N.g SSV<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Santos (2014) utilizando o mesmo reator e OD, mas a relação DOQ/N de 2,0 a 9,7; viabilizou a velocidade específica de nitrificação via N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> de 5,4 mg N.g SSV<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Silva (2018) viabilizou a velocidade específica de nitrificação via N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> de 6,9 mg N.g SSV<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.

O resultado do presente estudo foi superior aos resultados obtido pelos autores utilizando uma biomassa mixotrófica. Provavelmente, a condição de baixo OD (1,5 mg.L<sup>-1</sup>) proeminente no RAE, em FIII, favoreceu as BOA; assim, corroborando com a correlação forte negativa entre N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (-0,70, Tabela 19).

Em relação à nitrificação via nitrito, Villaverde *et al.* (1997) obtiveram uma velocidade de oxidação de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> de 50,0 mg N.g SSV<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Chiu *et al.* (2007) operaram um

reator em batelada sequencial com OD de 0,6 mg.L<sup>-1</sup> e obtiveram uma velocidade de nitrificação via N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> a N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> de 9,4 mg N.g SSV<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, com uma biomassa mixotrófica.

Moura (2011) viabilizou a velocidade específica de nitrificação via N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> de 1,8 mg N.g SSV<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Santos (2014) viabilizou a velocidade específica de nitrificação via N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> de 4,9 mg N.g SSV<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Silva (2018) operando um reator anaeróbio-aeróbio de leito fixo, em escala de bancada, com OD de 5,0 mg.L<sup>-1</sup> viabilizou a velocidade específica de nitrificação via N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> de 8,5 mg N.g SSV<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.

A Tabela 23 sumariza as velocidades de nitrificação via N- N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> obtidas em diversos sistemas de remoção de nitrogênio, inclusive com os dados deste trabalho. Os resultados desta pesquisa corroboram com a literatura, reforçando a idéia de que a configuração do reator utilizada, aliada às adequadas condições operacionais, permitiu o estabelecimento de eficiente remoção de nitrogênio.

Tabela 23 - Velocidades de nitrificação via N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e via N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> em sistemas de remoção de nitrogênio

Água residual	Reator	OD (mg.L <sup>-1</sup> )	Velocidade de nitrificação via N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg N.g SSV <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Velocidade de nitrificação via N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg N.g SSV <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Autores
Efluente sintético	Biofiltro	1,0	15,0	15,0 a 50,0	Villaverde <i>et al.</i> (1997)
Lagoa anaeróbia (efluente real)	Reator em batelada sequencial	0,2 a 0,6	-	15,0	Pochana e Keller (1999)
Efluente sintético	Reator em batelada sequencial	0,6	-	9,4	Chiu <i>et al.</i> (2007)
Efluente Sintético	Reator de leito fixo e estruturado	2,0 a 3,5	1,4	1,3	Moura (2011)
Efluente sintético	Reator em batelada sequencial	1,0 a 4,5	2,7	-	Yuan e Gao (2010)
Efluente Sintético	Reator de leito fixo e estruturado	2,0 a 3,5	5,4	4,9	Santos (2014)
Efluente Sintético	Reator anaeróbio-aeróbio de leito fixo	5,0	6,9	8,5	Silva (2018)
Efluente Sintético	Reator sequenciais anaeróbio-aeróbio	1,5 a 3,0	10,4	6,4	Este trabalho

Fonte: O Autor (2020).

Comparando os resultados obtidos experimentalmente com o levantamento apresentado na Tabela 23, foi possível verificar semelhança entre os valores de velocidades encontrados; uma vez que, na grande maioria, os sistemas operaram em condições NDS.

Com relação ao ensaio de desnitrificação, a concentração de  $\text{N-NO}_3^-$  diminuiu de 20 a 0  $\text{mg N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$  após 4,5 horas. Por outro lado, a concentração de  $\text{N-NO}_2^-$  apresentou comportamento inverso e atingiu valor máximo (19,8  $\text{mg N-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$ ) no tempo de 4 horas (Figura 41C). Assim, corroboraram com as correlações positivas entre DQO e  $\text{N-NO}_3^-$  (0,84) e DQO e ALCP (0,53) (Tabela 19).

Depois disso, todo o  $\text{N-NO}_2^-$  foi totalmente consumido. A velocidade específica de desnitrificação via nitrato foi 5,8  $\text{mg N.g SSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  ( $R^2$  igual a 0,99, Figura 41F), enquanto que a de desnitrificação via nitrito foi 6,8  $\text{mg N.g SSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  ( $R^2$  igual a 0,98, Figura 41F). Van Haandel e Marais (1999) afirmaram que o tempo médio para a desnitrificação em ambiente anóxico é inferior a 8 horas.

Reyes-Ávila et al. (2004) usando uma biomassa predominantemente desnitrificante, reportaram uma velocidade específica quase duas vezes maior, de 12,5  $\text{mg N.g SSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

Moura (2011) observou a velocidade específica de desnitrificação via  $\text{N-NO}_3^-$  de 4,0  $\text{mg N.g SSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . E Santos (2014) viabilizou a velocidade específica de desnitrificação via  $\text{N-NO}_3^-$  de 6,6  $\text{mg N.g SSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Enquanto, Silva (2018) viabilizou a velocidade específica de desnitrificação via  $\text{N-NO}_3^-$  de 5,6  $\text{mg N.g SSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

Em relação à desnitrificação via nitrito, Santos (2014) viabilizou a velocidade específica de desnitrificação via  $\text{N-NO}_2^-$  de 5,7  $\text{mg N.g SSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Tal fato também foi observado no trabalho de Moura (2011), o qual obteve velocidade de nitrificação via  $\text{N-NO}_2^-$  de 2,9  $\text{mg N.g SSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

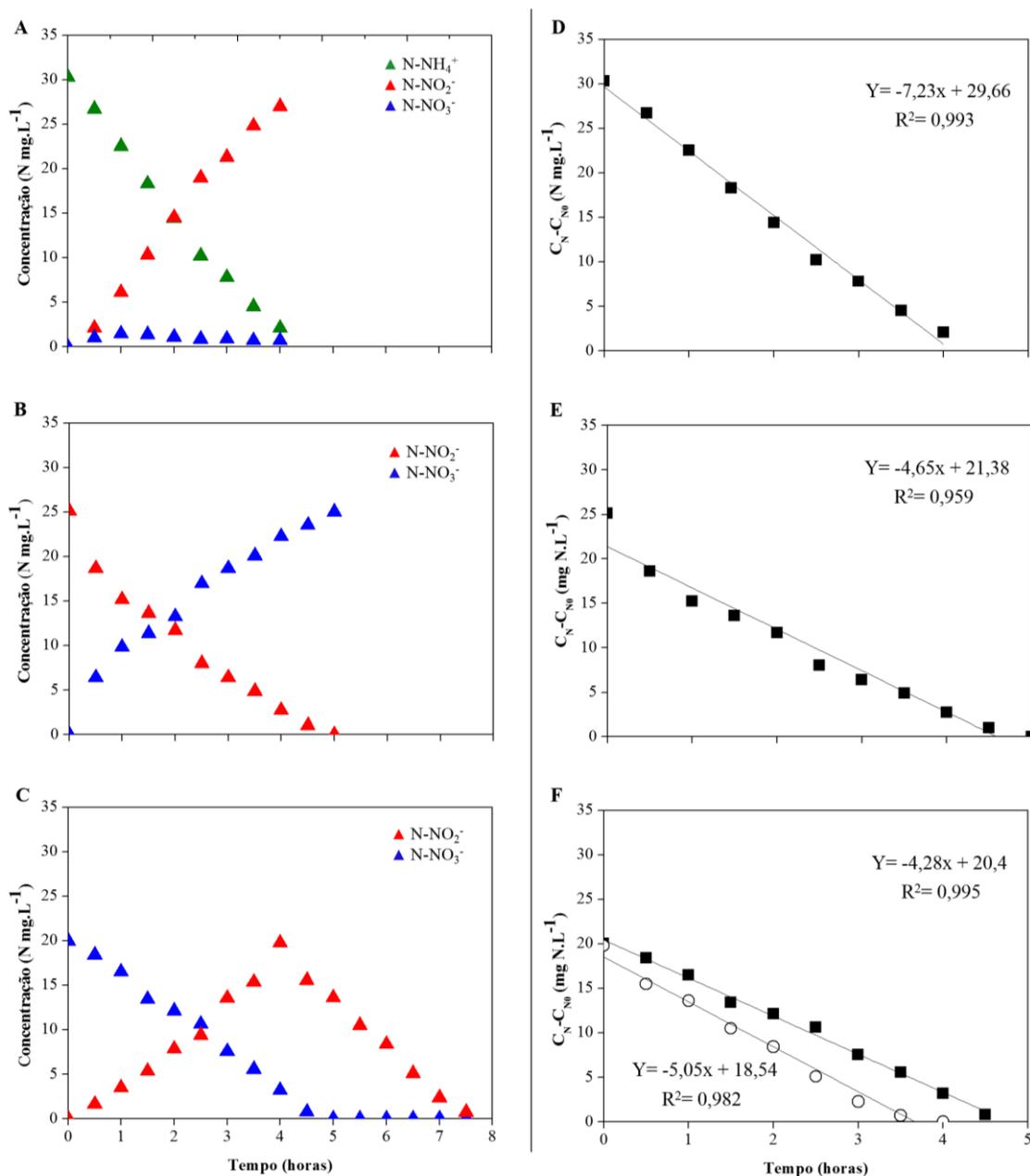
Observando as velocidades de consumo de  $\text{N-NO}_3^-$  e  $\text{N-NO}_2^-$  obtidas, pode-se notar que ambas velocidades ficaram próximas à literatura, assim corroboraram com o processo NDS proeminente no RAE. Comparando os resultados obtidos experimentalmente com o levantamento bibliográfico apresentado na Tabela 24, foi possível verificar semelhança entre os valores de velocidades encontrados; uma vez que todos os sistemas operaram em condições NDS.

Tabela 24 - Velocidades de desnitrificação via  $\text{N-NO}_3^-$  e via  $\text{N-NO}_2^-$  em sistemas de remoção de nitrogênio

<b>Água residuária</b>	<b>Reator</b>	<b>Relação DQO/N</b>	<b>Velocidade consumo de N- NO<sub>x</sub><sup>-</sup> (mg N.g SSV<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>)</b>	<b>Autores</b>
Lagoa anaeróbia (efluente real)	Reator em batelada sequencial	14,5	11,0	Pochana e Keller (1999)
Efluente sintético	Reator em batelada sequencial	1,7	12,5	Reyes-Avila <i>et al.</i> (2004)
Efluente Sintético	Reator de leito fixo e estruturado	11,6	4,0	Moura (2010)
Efluente Sintético	Reator de leito fixo e estruturado	2,9 a 9,7	6,6	Santos (2014)
Efluente sintético	Reator anaeróbio-aeróbio de leito fixo	12,0	5,6	Silva (2018)
Efluente Sintético	Reator sequenciais anaeróbio-aeróbio	11,0	6,8 a 5,7	Este trabalho

Fonte: O Autor (2020).

Figura 41 - Variação da concentração de  $\text{N-NH}_4^+$  ( $\blacktriangle$ ),  $\text{N-NO}_2^-$  ( $\blacktriangle$ ),  $\text{N-NO}_3^-$  ( $\blacktriangle$ ) no perfil temporal do ensaio de nitrificação via  $\text{N-NH}_4^+$  (A), nitrificação via  $\text{N-NO}_2^-$  (B), desnitrificação via  $\text{N-NO}_3^-$  (C). Modelo de ordem zero ajustado para nitrificação via  $\text{N-NH}_4^+$  (D), nitrificação via  $\text{N-NO}_2^-$  (E), desnitrificação via  $\text{N-NO}_3^-$  (F). Dados experimentais ( $\blacksquare$  e  $\circ$ ).



Fonte: O Autor (2020).

Então, assim como nos resultados obtidos com a operação dos reatores sequenciais, o estudo cinético também mostrou que a biomassa obtida do RAE favoreceu o processo de nitrificação parcial, enquanto que a biomassa do RAN favoreceu discretamente a desnitrificação via nitrito nas condições aplicadas. Contudo, é importante realizar novas pesquisas para otimizar o processo de NDS. Sendo assim, recomenda-se o uso de menores concentrações de oxigênio ( $<1,5 \text{ mg O}_2\text{.L}^{-1}$ ) combinado com maiores razões de recirculação

do RAE para o RAN, já que efluentes ricos em nitrito são importantes para o desenvolvimento de uma biomassa mixotrófica.

#### 5.2.4. Fatores influentes no desempenho do sistema e estudo da variabilidade dos dados

Para o estudo com a ACP, as 9 variáveis físico-químicas consideradas para a qualidade do efluente do RAE (P3) foram correlacionadas em cada fase experimental. O agrupamento dos dados se refere a um conjunto de 45 observações, sendo 15 para cada fase. Este conjunto de dados apresenta média zero e desvio padrão igual a um. Nesta ACP, apenas duas componentes principais (CP1 e CP2) foram consideradas significativas e ambas atenderam ao critério de Kaiser e Guttman ( $K > 1,0$ ) (JACKSON, 1993). Assim, os gráficos bidimensionais resultantes mostraram uma variância acumulativa explicada de 53,7% para CP1 e 25,2% para CP2, totalizando 78,9% (Apêndice J).

As variáveis DQO e SSV apresentaram pesos bem próximos (0,64 e 0,63), enquanto N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> e TEMP apresentaram os menores pesos (-0,84 e -0,57) (Tabela 25). Os valores mais negativos de peso na CP1 indicaram que estas componentes apresentaram tendências de aumento com reduções de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (0,95), ALCP (0,88), N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,75), O<sub>2</sub> (0,72), DQO (0,64), SSV (0,63) e pH (0,43). O maior peso do N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> indicou maior influência no comportamento próximo a 79% dos dados. Tal resultado indicou que o efluente do RAE foi favorável ao acúmulo de nitrito.

Tabela 25 - Pesos obtidos na modelagem do efluente do RAE

Variável	CP1	CP2
DQO	0,64	0,66
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0,95	0,01
N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	-0,84	0,49
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0,75	-0,61
O <sub>2</sub>	0,72	-0,46
pH	0,43	0,69
ALCP	0,88	0,17
TEMP	-0,57	0,18
SSV	0,63	0,67

Fonte: O Autor (2020).

A variável pH apresentou peso positivo e elevado na CP2, seguido pela variável SSV e DQO, sugerindo que a representação da variabilidade do conjunto de dados aumentou com a elevação destas variáveis; porém o efeito delas sobre o N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> foi minimizado, devido ao baixo valor absoluto nesta CP, corroborando com as concentrações obtidas de 2,2 a 5,6 mg N-

$\text{NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ , (Tabela 18) no efluente do RAE em FI, FII e FIII, respectivamente. Logo, promovendo à estabilidade no acúmulo de nitrito, em FIII; assim, a variável  $\text{N-NH}_4^+$  apresentou correlação negativa com a variável  $\text{N-NO}_2^-$  (Tabela 19).

A temperatura influencia na remoção de nitrogênio amoniacal, sendo que nas três fases do presente estudo, a variação ficou entre 27,4 a 27,9°C; o aumento da remoção de  $\text{N-NH}_4^+$  por BOA, com o aumento da temperatura, foi observada em reatores com biofilme (Zhang et al., 2014). Em consequência, o efluente totalmente amonificado no RAN foi disponibilizado no RAE para os micro-organismos nitrificantes. Assim, os pesos obtidos com o modelo utilizado foram agrupados nos gráficos bidimensionais, em um conjunto de dados localizados no lado negativo da CP1, e influenciados pelas variáveis TEMP e  $\text{N-NO}_2^-$  (Figura 42 A). As variáveis DQO e SSV ficaram sobrepostas uma às outras, isto indica que tais variáveis possuem a mesma representatividade no gráficos bidimensional e apresentaram fortes correlações.

A Figura 42 B mostra notadamente, que foi possível agrupar os dados experimentais durante o período transiente da fase FI (partida, dados 1, 2, 3 e 4 (cor cinza)), fase FII (ajuste na concentração de OD, dados 16, 17, 18 e 19 (cor roxo)) e fase FIII (ajuste da taxa de recirculação, dados 31, 32, 33 e 34 (cor vinho)); bem como, o período estacionário da fase FI (dados 5 a 15 (cor vermelha)), fase FII (dados 20 a 30 (cor azul)) e fase FIII (dados 35 a 45 (cor verde)).

Em relação à fase FI, os dados 5 a 15 foram agrupados próximos e do lado positivo da CP1 e negativo da CP; estes escores foram influenciados pelas variáveis OD e  $\text{N-NO}_3^-$ . As condições operacionais estabelecidas nesta fase, disponibilizando OD com  $3,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  no máximo, favoreceram o crescimento de BON e consequente acúmulo de nitrato de  $7,2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; entretanto, sem inibir o crescimento das BOA, haja vista que a concentração média de nitrito foi de  $1,4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . Logo, corroboraram com as correlações negativas entre as variáveis  $\text{N-NH}_4^+$  e OD (-0,41) e  $\text{N-NH}_4^+$  e  $\text{N-NO}_3^-$  (-0,89), bem como a correlação positiva entre  $\text{N-NO}_3^-$  e OD (0,63) (Tabela 19).

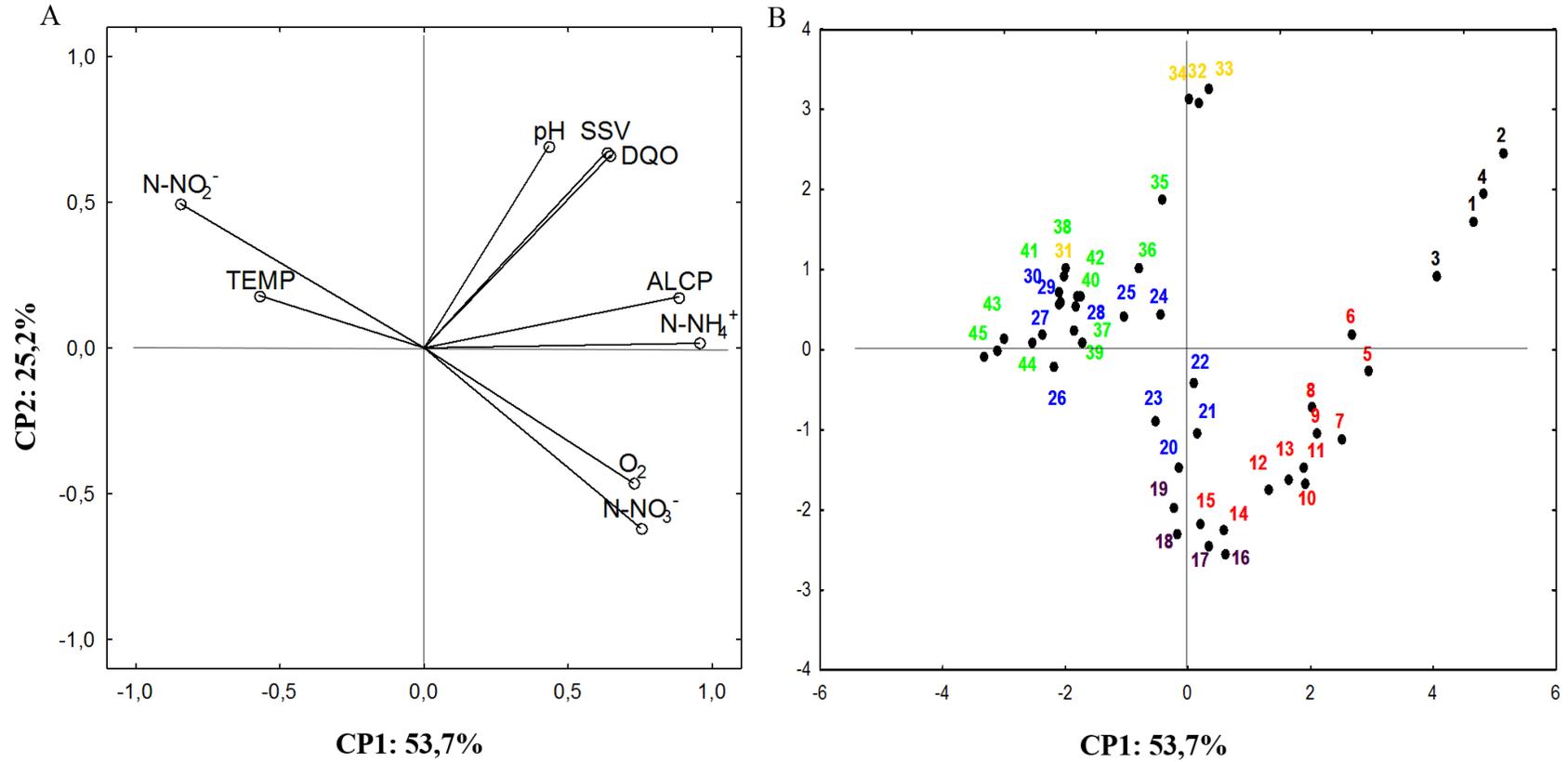
Em relação à fase FII (dados 24 a 30), na grande maioria os dados foram agrupados no lado negativo da CP1 e positivo na CP2. Estes escores foram agrupados mais próximos entre si e influenciados pelas variáveis  $\text{N-NO}_2^-$  e TEMP. Em FII, o OD disponibilizado para o RAE foi reduzido para  $1,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , no intuito de favorecer o processo de nitrificação parcial. A baixa carga orgânica de  $1,0 \pm 0,1 \text{ g DQO} \cdot \text{d}^{-1}$  e a carga nitrogenada de  $0,4 \text{ g N} \cdot \text{d}^{-1}$  aplicadas ao RAE favoreceram as BOA em relação as BON. Logo, os dados mostraram uma correlação

positiva entre TEMP e OD (0,57), TEMP e  $\text{N-NO}_2^-$  (0,88) e correlação negativa entre TEMP e  $\text{N-NH}_4^+$  (-0,60) (Tabela 19), as quais corroboraram com o acúmulo de nitrito ( $6,1 \text{ mg.L}^{-1}$ ), nesta fase.

No que concerne à fase FIII, (dados 35 a 45) foram agrupados no lado negativo da CP1 e positivo na CP2. Estes escores foram agrupados e influenciados pelas variáveis  $\text{N-NO}_2^-$  e TEMP. O OD disponibilizado para o RAE foi de  $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ , bem como a temperatura próxima a  $28^\circ\text{C}$  aliado à recirculação de 0,25, promoveram o maior acúmulo de nitrito ( $9,8 \text{ mg.L}^{-1}$ ), comparado com os das fases anteriores. As BON, são consideradas como sensíveis as pequenas mudanças de concentração de OD (Ge et al., 2015). Concentrações inferiores a  $2,0 \text{ mg O}_2.\text{L}^{-1}$  podem inibir parcialmente ou totalmente a atuação das BON (Jialong e Ning, 2004; Ge et al., 2015). Assim, as concentrações médias de  $\text{N-NO}_3^-$  no efluente do RAE diminuíram de  $7,2 \text{ mg N.L}^{-1}$  (FI) a  $0,8 \text{ mg N.L}^{-1}$  (FIII) e apresentaram diferenças significativas entre as fases ( $F = 73,1 > F_{\text{crítico}} = 3,2; p < 0,05$ ).

Alguns autores reportaram que concentrações inferiores a  $2,0 \text{ mg O}_2.\text{L}^{-1}$  podem inibir parcialmente ou totalmente atuação das BON (JIALONG E NING, 2004; GE *et al.* 2015; YAN *et al.* 2019). Assim, as concentrações médias de  $\text{N-NO}_3^-$  no efluente do RAE foram reduzidas de  $7,2 \text{ mg.L}^{-1}$  (FI) a  $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$  (FIII) e apresentaram diferenças significativas ( $F = 73,1 > F_{\text{crítico}} = 3,2; p < 0,05$ ).

Figura 42 - Análise das componentes principais. Gráfico bidimensional para as projeções dos pesos (A). Gráfico dos casos da CP1 versus variáveis da CP2 no efluente do RAE (B). Legenda: período transiente da fase FI (partida, dados 1 a 4), fase FII (ajuste na concentração de OD, dados 16, 17, 18 e 19) e fase FIII (ajuste na razão de recirculação, dados 31, 32, 33 e 34). Período estacionário da fase FI (dados 5 a 15), fase FII (dados 20 a 30) e fase FIII (dados 35 a 45).



Fonte: O autor 2020.

## 6. CONCLUSÕES

A utilização de reatores sequenciais anaeróbio e aeróbio com recirculação do efluente nitrificado e OD de 1,5 a 3,0 mg.L<sup>-1</sup> mostrou-se bastante atraente para o processo NDS em lodo aderido.

**No experimento A**, o desempenho do sistema com dois reatores híbridos sequenciais, um anaeróbio e aeróbio, cada qual com câmaras de lodo suspenso e aderido, aplicado a esgoto doméstico diluído (DQO ~400 mg.L<sup>-1</sup> e N-NT ~30 mg.L<sup>-1</sup>), apresentou desempenho satisfatório na remoção simultânea de matéria orgânica carbonácea e nitrogenada. O melhor desempenho ocorreu na fase Id. No efluente final do sistema, a DQO média ficou em ~40 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>, correspondendo a uma eficiência de remoção de cerca de 85%. Já a de nitrogênio total, o valor foi de 10 mg N.L<sup>-1</sup>, correspondendo uma remoção de 70%. Tanto a fração N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, como o do N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, contribuiu cada um com cerca de 51% e 36%, respectivamente, do N-NT no efluente em Id.

O oxigênio dissolvido (3,0 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>) disponibilizado para o RHAE, foi favorável para o acúmulo de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Fase Ia). Devido ao aumento da razão de recirculação nas fases seguintes, a concentração média de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> foi inferior e atendeu a legislação CONAMA 357/05 e 430/11. De qualquer maneira, observou-se que a recirculação do efluente aeróbio nitrificado favoreceu o tamponamento do sistema sem adição de uma fonte alcalina e/ou de um doador de elétron externo no processo de desnitrificação no RHAN. A maior razão de recirculação (Id, 1,25) do efluente nitrificado, foi favorável à melhor remoção de carbono e nitrogênio, comparada com a da fase Ia.

As variáveis DQO e SSV apresentaram os maiores pesos (0,90 e 0,88, respectivamente). Enquanto, a variável N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> apresentou o menor peso (-0,90) no gráfico bidimensional da análise de componentes principais (ACP). Então, a ACP confirmou o processo de nitrificação, visto que às variáveis OD e N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> estiveram em posição inversa às variáveis pH, ALCP e N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, no gráfico bidimensional. A recirculação proporcionou o aumento da biomassa aderida, bem como os micro-organismos mais resistentes permaneceram no sistema, confirmado pela DGGE. A presença de bactérias desnitrificantes, oxidantes de amônia, oxidantes de nitrito e arqueias foi confirmada, indicando condição favorável para o processo NDS.

**No experimento B**, o desempenho de um sistema com dois reatores sequenciais anaeróbio-aeróbio foi satisfatório na remoção simultânea de matéria orgânica e nitrogênio de esgoto doméstico sintético. A melhor condição operacional dos reatores sequenciais na

remoção de DQO e N-NT, foi viabilizada na fase FIII com concentrações médias de 26 mg  $O_2.L^{-1}$  e 12 mg  $N-NT.L^{-1}$ , respectivamente. A maior parte da remoção de DQO aconteceu no RAN e permitiu que o processo de nitrificação ocorresse de forma mais estável no RAE. Por outro lado, o processo de desnitrificação foi identificado nos dois reatores.

O oxigênio dissolvido (1,5 mg  $O_2.L^{-1}$ ) disponibilizado para o RAE e aliado a razão de recirculação (fase FIII), foi favorável para o acúmulo de  $N-NO_2^-$ . Bem como, A baixa relação DQO/N (2,0 a 3,2) foi importante para a operação estável do reator RAE e do sistema de tratamento.

O estudo cinético indicou uma velocidade específica de nitratação (10,5 mg  $N.SSV^{-1}.h^{-1}$ ) maior do que a de nitratação (6,5 mg  $N.SSV^{-1}.h^{-1}$ ), indicando a dominância do processo de nitrificação parcial. Na desnitrificação, as velocidades obtidas foram 5,8 e 6,8 mg  $N.SSV^{-1}.h^{-1}$  para nitrogênio nitrato e nitrito, respectivamente.

A variável  $N-NH_4^+$  apresentou o maior peso (0,95); enquanto, a variável  $N-NO_2^-$  apresentou o menor peso (-0,84), no gráfico bidimensional da ACP. Assim, sugeriu que o acúmulo de  $N-NO_2^-$  foi influenciado pela temperatura favorável ( $\sim 30^\circ C$ ) e esteve em posição inversa às variáveis OD e  $N-NO_3^-$  no gráfico bidimensional.

A DGGE indicou que OD baixo (1,5 mg  $O_2.L^{-1}$ ) e o incremento da razão de recirculação (0,25) favoreceu ao aumento da diversidade microbiana nas amostras de lodo suspenso e aderido, comparada com as outras fases sem recirculação e com OD alto (3,0 mg  $O_2.L^{-1}$ ). As análises de PCR e o sequenciamento massivo confirmaram a ocorrência do processo NDS e foi atribuída a uma biomassa mixotrófica, confirmada pela análise de alfa diversidade, que promoveu a nitrificação heterotrófica e desnitrificação aeróbia, nitrificação autotrófica simultânea e desnitrificação heterotrófica no lodo aderido do RAE, nas três fases estudadas.

## 7. RECOMENDAÇÕES

Novas pesquisas são necessárias para otimizar a remoção de matéria orgânica e nitrogênio; uma recomendação seria:

### Experimento A

- Aeração intermitente no reator híbrido aeróbio para melhorar o processo NDS, além de reduzir os custos com aeração;
- Inserir um tanque anóxico após o efluente aeróbio para favorecer o processo Anammox;
- Acompanhar o crescimento da biomassa aderida no meio suporte e, ao final de cada fase experimental, efetuar ensaios cinéticos de nitrificação e desnitrificação;
- Sequenciar as amostras do lodo suspenso e aderido, para avaliar os micro-organismos chave no processo de remoção de matéria orgânica e nitrogênio.

### Experimento B

- Utilizar um único reator com biomassa suspensa e aderida aliada à aeração intermitente; assim, favorece o processo NDS e reduz o custo com aeração;
- Inserir um tanque anóxico para favorecer o processo Anammox, visto que existiu o acúmulo de nitrito no reator aeróbio;
- Reduzir a concentração de OD (próximo a  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) para promover uma melhora no processo Anammox no interior lodo aderido do RAE;
- Utilizar a técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) para quantificar os micro-organismos desnitrificantes e nitrificantes, em diferentes profundidades do material suporte. Bem como, investigar a ocorrência de estratificação da biomassa.

## REFERÊNCIAS

- AESOIY, A.; ODEGAARD, H.; BACH, K.; PUJOL, R.; HAMOM, M. Denitrification in a packed bed biofilm reactor (BIOFOR) – Experiments with different carbon resources. **Water Research**, v. 32, n. 5, p. 1463 – 1470, 1998.
- AHN, Y.H. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. **Process Biochemistry**. v. 41, n. 8, p.1709-1721, 2006.
- AHN J.H.; KWAN, T.; CHANDRAN, K. Comparison of partial nitrification and full nitrification process applied for treating strength nitrogen wastewater: Microbial ecology through nitrous oxide production. **Environmental Science Technology**, v. 45, p. 2734-2740, 2011.
- AKUNNA, J.; BIZEAU, C.; MOLETTA, R.; BERNET, N.; HÉDUIT A. Combined organic and complete nitrogen removal using anaerobic and aerobic upflow filters. **Water Science Technology**, v. 30, n.12, p.297-306, 1994.
- AMANN, R.; FUCHS, B.M.; BEHRENS, S. The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. **Current Opinion Biotechnology**, v. 12, n.3, p. 231-236.
- ANDREWS, J.H.; HARRIS, R.F. *r*- and *K*- selection and microbial ecology. **Advances in Microbial Ecology**, v.9, p. 99-147, 1986.
- ANNAVAJHALA, M.; KAPOOR, V.; SANTO-DOMINGO, J.; CHANDRAN, K. Comammox functionality identified in diverse engineered biological wastewater treatment systems. **Environmental Science & Technology Letters**, v. 5, p.110-116, 2018.
- ANTHONISEN, A.C.; LOEHR, R.C.; PRAKASAM, T.B.; SRINATH, E.G. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid, **Journal Water Pollution Control**, v. 46, p. 835–852, 1976.
- APHA, AWWA, WPCF. **Standard methods for the examination of water and wastewater**, 22. ed. Washington DC, USA, 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. Recife, PE: Universidade Federal de Pernambuco, p. 119, 2015.
- ARTIGA, P.; OYANEDEL, V.; GARRIDO, J.M.; MÉNDEZ, R. An innovative biofilm-suspended biomass hybrid membrane bioreactor for wastewater treatment. **Desalination**, v. 179, p. 171-179, 2005.
- BARRERO-CANOSA, J.; MORARU, C.; ZEUGNER, L.; FUCHS, B.M.; AMANN, R. Direct-gene FISH: a simplified protocol for the simultaneous detection and quantification of genes and rRNA in microorganisms. **Environmental Microbiology**, v.19, n.1, pp.70-82, 2017.
- BARROS, K.K.; GAVAZZA, S.; FLORENCIO, L.; KATO, M.T. The influence of excess sludge discharge on the performance of a full-scale UASB reactor. **Water Practice & Technology**, v.10, n.2, pp. 250-259, 2015.

BOMFIM, J.H.; SILVA, L.G.; GAVAZZA, S.; FLORENCIO, L.; KATO, M.T. Remoção de LAS em esgoto doméstico tratado em reator UASB e lagoa de polimento. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 1, p. 397-406, 2016.

BUENO, R.F.; PIVELI, R.P.; CAMPOS, F.; ALEM SOBRINHO, P. Simultaneous nitrification and denitrification in the activated sludge systems continuous flow. **Environment Technology**, v. 39, n.20, pp. 2641-2652, 2018.

CABELLO, P.; ROLDAN, M.D.; MORENO-VÍVIAN, C. Nitrate reduction and the nitrogen cycle in *Archaea*. **Microbiology**, v. 150, p. 3527-3546, 2004.

CABEZAS A., ARAÚJO J. C., CALLEJAS C., GALÉS A., HAMELIN J., MARONE A., SOUSA D. Z., TRABLY E., ETCHEBEHERE C. How to use molecular biology tools for the study of the anaerobic digestion process. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v.14, n.4, pp.555-593, 2015.

CADILLO-QUIROZ, H.; YAVITT, J.B.; ZINDER, S.H. *Methanosphaerula palustris* gen. nov., a hydrogenotrophic methanogen isolated from a minetrophic fen peatland. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 928-935, 2009.

CALLADO, N. H.; FORESTI, E. Removal of organic carbon, nitrogen and phosphorus in sequential batch reactors integrating the aerobic/anaerobic processes. **Water Science and Technology**, v. 44, n. 4, p. 263-270, 2001.

CELESTINO, E. J. **Uso de reatores híbridos anaeróbios e aeróbios para a remoção de matéria orgânica e nitrogênio**. Dissertação de Mestrado. Recife, PE: Universidade Federal de Pernambuco, p.59, 2017.

CHATTERJEE, P.; GHANGREKAR, M.M.; RAO, S. Organic matter and nitrogen removal in a hybrid upflow anaerobic sludge blanket – Moving bed biofilm and rope bed biofilm reactor. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v.4, pp. 3240-3245, 2016.

CHAO, Y.; MAO, Y.; YU, K.; ZHANG, T. Novel nitrifiers and comammox in a full-scale hybrid biofilm and activated sludge reactor revealed by metagenomics approach. **Environmental Biotechnology**, v. 100, pp. 8225-8238. 2016.

CHAUHAN, A., REDDY, K.R., OGRAM, A.V. Syntrophic-archaeal associations in a nutrient impacted freshwater marsh. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n.1, pp. 73-84, 2006.

CHEN, P.; LI, J.; LI, Q.X.; WANG, Y.; LI, S.; REN, T.; WANG, L. Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by bacterium *Rhodococcus* sp. CPZ24. **Bioresource Technology**, v. 116, p. 266-270, 2012.

CHEN, Y.; LI, B.; YE, L.; PENG, Y. The combined effects of COD/N ratio and nitrate recycling ratio on nitrogen and phosphorus removal in anaerobic/ anoxic/ aerobic (A<sup>2</sup>/O) biological aerated filter (BAF) systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 93, pp. 235-242, 2015.

CHEN, J.; WANG, R.; WANG, X.; CHEN, Z.; FENG, X.; QIN, M. Response of nitrification performance and microbial community structure in sequencing biofilm batch reactors filled with different zeolite and alkalinity ratio. **Bioresource Technology**, v.273, pp 487-495, 2019.

CHIU, Y.; LEE, L.; CHANG, C.; CHAO, A.C. Control of carbon and ammonium ratio for simultaneous nitrification and denitrification in a sequencing batch bioreactor. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 59, p. 1-7, 2007.

CHO, S.; FUJII, N.; LEE, T.; OKABE, S. Development of a simultaneous partial nitrification and anaerobic ammonia oxidation process in a single reactor. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 652-659, 2011.

CHO, K. H.; KIM J.; KANG, S.; PARK, H.; KIM, S. Achieving enhanced nitrification in communities of nitrifying bacteria in full-scale wastewater treatment plants via optimal temperature and pH, **Separation and Purification Technology**, v. 132 p. 697–703, 2014.

CHONG, S., SEN, T. K., KAYAALP, A., ANG, H. M. The performance enhancements of upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors for domestic sludge treatment – A State-of-the-art review. **Water Research**, v. 46, pp. 3434-3470, 2012.

CIUDAD, G.; GONZÁLEZ, R.; BORNHARDT, C.; ANTILEO, C. Modes of operation and pH control as enhancement factors for partial nitrification with oxygen transport limitation. **Water Research**, v. 41, p. 4621-4629, 2007.

CONAMA. Resolução n° 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução n° 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Disponível em <http://www.mma.gov.br/port/conama>. Acesso: 2 de Dezembro de 2018.

COTTO, I.; DAI, Z.; HUO, L.; ANDERSON, C.L.; VILARDI, K.J.; IJAZ, U.; WENDEL, K.; WILSON, C.; DE CLIPPELEIR, H.; GILMORE, K.; BAILEY, E.; PINTO, A.J. Long solids retention times and attached growth phase favor prevalence of comammox bacteria in nitrogen removal systems. **Water Research**, v. 169, pp. 1152-1168, 2020.

CYDZIK-KWIATKOWSKA, A., ZIELINSKA, M. Bacterial communities in full scale wastewater treatment systems. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, v. 4, p. 66-74, 2016.

DAIMS, H.; LEBEDEVA, E.V.; PJEVAC, P.; HAN, P.; HERBOLD, C.; ALBERTSEN M, JELMICH, N, PALATINSZKY M, VIERHEILIG J, BULAEV A, KIRKEGAARD R.H.; von BERGEN, M., RATTEI, T; BENDINGER, B.; NIESEN, P.H, WAGNER, M. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. **Nature**, v. 573, n. 7583, p. 504-509, 2015.

DAMIANOVIC, M.H.R.Z.; SANTOS, D.C.E.; MARTÍN, M.A.M.; FDZ-POLANCO, M.; FORESTI, E.; FDZ-POLANCO, F.; GARCÍA-ENCINA, A. Specific activity bioassays as tools to evaluate combined nitrogen and organic matter removal in SND systems. **Environmental Engineering Science**, v. 35, n.9, p. 1-10, 2018.

DELFORNO, T. P. **Degradação de surfactante aniônico em reatores EGSB sob condição metanogênica e ferro redutora com água residuária de lavanderia comercial**. Tese de Doutorado. Recife, PE: Escola de Engenharia de São Carlos, p.204, 2014.

DO CANTO, C.S.A., RODRIGUES, J.A.D., RATUSZEI, S.M., ZAIAT, M., FOREST, E. Feasibility of nitrification/denitrification in a sequencing batch biofilm reactor with liquid circulation applied to post-treatment. **Bioresource Technology**, v. **99**, pp. 644-654, 2008.

DOSTA, J.; FERNANDEZ, I.; VÁZQUEZ-PADIM, J.R.; MOSQUERA-CORRAL, A.; CAMPOS, J.L.; MATA-ÁLVAREZI, M.; MÉNDEZ, R. Short- and long-term effects of temperature on the Anammox process, **Journal of Hazardous Materials**, v. 154, n. 1–3, pp. 688–693, 2008.

DU, R.; PENG, Y.; JI, J.; LIANGLIANG, S.; RUITAO, S.; LI, X. Partial denitrification providing nitrite: Opportunities of extending application anammox. **Environment International**, v. 131, p. 105001-105014, 2019.

FENG, L.; JIA, R.; ZENG, Z.; YANG, G.; XU, X. Simultaneous nitrification-denitrification and microbial community profile in an oxygen-limiting intermittent aeration SBBR with biodegradable carriers. **Biodegradation**, v. 5, pp. 473-486, 2018.

FERNANDEZ-GOZALEZ, N.; SIERRA-ALAVEZ, R. FIELD, J.A.; AMILS, R.; SANZ, J.L. Adaptation of granular sludge microbial communities to nitrate, sulfide, and / or p-cresol removal, **International Microbiology**, p. 1-12, 2018.

FU, Z.; YANG, F.; ZHOU, F.; XUE, Y. Control of COD/N ratio nutrient removal in a modified membrane bioreactor (MBR) treating high strength wastewater. **Bioresource Technology**, v. 100, n.1, p.136-141, 2009.

FUCHS, W.; BIERBAUMER, T.; SCHOPP, N.; WEISSENBACHER, N.; BOUSEK, J. New hybrid reactor concept incorporating a filter mesh for nitritation-anammox treatment of sludge return liquid. **Water Science & Technology**, v. 76, n.6, p. 1409-1417, 2017.

GALÍ A.; DOSTA, J.; van LOOSDRECHT, M.C.M.; MATA-ÁLVAREZI J. Two ways to achieve an anammox influent from real reject water treatment at lab-scale: partial SBR nitrification and Sharon process. *Process Biochemistry*. V. 42, n.4, pp. 715-720, 2007.

GAVAZZA, S.; VARESCHE, M.B.A.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Comparative research on the use of methanol, ethanol and methane as electron donors for denitrification. **Environmental Engineering Science**, v. 21, n. 3, p. 313-320, 2004.

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

GONZALEZ-TINEO, P.A.; DURÁN-HINOJOSA, U.; DELGADILLO-MIRQUEZ, L.R.; MEZA-ESCALANTE, E.R.; GORTÁRES-MOROYOQUI, P.; ULLOA-MERCADO, R.G.; SERRANO-PALACIOS. Performance improvement of an integrated anaerobic-aerobic hybrid reactor for the treatment of swine wastewater. **Journal of Water Process Engineering**, v. 34, pp. 101164, 2020.

GROTENHUIS, J.T.C., PLUGGE, C.M., STAMS, A.J.M., ZEHNDER, A.J.B., 1991. Role of substrate concentration in particle size distribution of methanogenic granular sludge in UASB reactors. *Water Research*, v.25, pp.21–27, 1991.

HAN, Y.; LIU, F.; XU, X.; YAN, Z.; LIU, Z. Nitrogen removal via a single stage PN-Anammox process in a novel combined biofilm reactor. **Water Science Technology**, v.77, n.6, pp. 1483-1492, 2018.

HANAKI, K.; WANTAWIN, C.; OHGAKI, S. Nitrification at low levels of dissolved oxygen with and without organic loading in a suspended growth reactor. **Water Research**, v. 24, p. 297-302, 1990.

HARPER, S.R.; POHLAND, F.G. Recent development in hydrogen management during wastewater treatment. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 28, pp. 585-602, 1986.

HE, Q., SONG, Q., ZHANG, S., ZHANG, W., WANG, H., 2018. Simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus removal in an aerobic granular sequencing batch reactor with mixed carbon sources: reactor performance, extracellular polymeric substances and microbial successions. **Chemical Engineering Journal**, v. 331, p.841-849, 2018.

HELLINGA, C., MULDER, J.W., SCHELLEN, A.A.J.C., van LOOSDRECHT, M.C.M.; HEIJNEN, J.J., The Sharon process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich wastewater. **Water Science. Technology**, v. 37 n. 9, pp. 135–142, 1998..

HIKUMA, M.; NAKAJIMA, M.; HIRAI, T.; MATSUOKA, H. Rapid detection of ammonia oxidizing bacteria in activated sludge based on 16S-rRNA gene by using PCR and Fluorometry. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 7, p. 323-326, 2002.

HOSSEINPOUR, B.; SABORIMANESH, N.; YERUSHALMI, L.; WALSH, D.; MULLIGAN, C.N. Start-up of oxygen-limited autotrophic partial nitrification-anammox process for treatment of nitrite-free wastewater in a single-stage hybrid bioreactor. **Environmental Technology**, v. 16, p. 467-477, 2019.

HOW, S.W.; LIM, S.Y.; LIM, P.B.; ARIS, A.M.; NGOH, G.C.; CURTIS, T.P.; CHUA, A.S.M. Low dissolved-oxygen nitrification in tropical sewage: an investigation on potential, performance and functional microbial community. **Water Science & Technology**, v. 77, n.9, pp. 2274-2284, 2018.

HUANG, J.S.; WU, C.S.; CHEN, C.M. Microbial activity in a combined UASB-Activated sludge reactor system. **Chemosphere**, v. 61, pp. 1032-1041, 2005.

JACKSON, D. Stopping rules in principal components analysis: a comparison of heuristical and statistical approaches. **Ecology**, v. 74, n. 8, p. 2204-2214, 1993.

JETTEN, M.S.M., STAMS, A.J.M., ZEHNDER, A.J.B. Methanogenesis from acetate: a comparison of the acetate metabolism in *Methanothrix soehngenii* and *Methanosarcina* spp. **FEMS Microbiology Reviews**, v, 88, p.181-198, 1992.

JETTEN, M.S.M; HORN, S.J.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M. Towards a more sustainable municipal wastewater treatment system. **Water Science and Technology**, n. 35, p. 171-180, 1997.

JIANLONG, W.; NING, Y. Partial nitrification under limited dissolved oxygen conditions. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1123-1129, 2004.

JIN, R.; YANG, G.; YU, J.; ZHENG, P. The inhibition of the anammox process: a review. **Chemical Engineering Journal**, v. 197, p. 67-79, 2012.

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 Technology**, v. 55, n.1, p. 459-468, 2007.

KADLEC, R. H.; KNIGHT, R. L. *Treatment wetlands Florida*: Lewis Boca Raton, 1996.

KALYUZHNYI, S.; GLADCHENKO, M.; MULDER, A.; VERSPRILLE, B. DEAMOX- New biological nitrogen removal process based on anaerobic ammonia oxidation coupled to sulphide-driven conversion of nitrate into nitrite. **Water Research**, v. 40, p. 3637-3645, 2006.

KATO, M.T.; FLORENCIO, L.; ARANTES, R.M.F. Post-treatment of UASB effluent in an expanded granular sludge bed reactor type using flocculent sludge. **Water science and Technology**, v.48, n.6, pp. 279-284, 2003.

KINDAICHI, T.; ITO, T.; OKABE, S. Ecophysiological Interaction between nitrifying bacteria and heterotrophic bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by microautoradiography-fluorescence in situ hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.3, pp. 1641-1650, 2004.

KLINDWORTH, A.; PRUESSE, E.; SCHWEER, T.; PEPLIES, J.; QUAST C.; HORN, M.; GLOCKNER, F.O. Evaluating of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. 1-10, 2013.

KOCH, H., VAN KESEL, M.A.H.J., LUCKER, S. Complete nitrification: insights into the ecophysiology of comammox *Nitrospira*. **Applied Microbiology and Biotechnology** v, 103, n. 1, p. 177-189, 2018.

KUDO, Y.; NAKAJIMA, T.; MIYAKI, T.; OYAIZU, H. Methanogen flora of paddy soils in Japan. **FEMS Microbiology Ecology**, v.22, p. 39-48, 1997.

LANGILE, M.G.; ZANEVELD, J.; CAPORASO, J.G.; McDONALD, D.; KNIGHT, D.; REYES, J.A.; CLEMENTE, J.C.; BURKEPILE, D.E.; THURBER, R.B.; KNIGHT, K.; BEIKO, R.G.; HUTTENHOWER, C. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. **Nature Biotechnology**, v. 31, pp. 814-821, 2013.

LEYVA-DÍAZ, J.C.; MUNIO, M.M.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J.; POYATOS, J.M. Anaerobic/anoxic/oxic configuration in hybrid moving bed biofilm reactor membrane bioreactor for nutrient removal from municipal wastewater. **Ecological Engineering**, v. 91, pp. 449-458, 2016.

LETTINGA, G. A.; DE MAN, A.R.M. VAN DER LAST, W. WIEGANT, K. VAN KNIPPENBERG, J. FRIJNS, J.C.L. VAN BUUREN, Anaerobic treatment of domestic sewage and wastewater, **Water Science Technology**, v. 27, pp. 67-73, 1993.

LI, L.; DONG, Y.; GUANGSHENG, Q.; HU, X.; YE, L. Performance and microbial community analysis of bio-electrocoagulation on simultaneous nitrification and denitrification

in submerged membrane bioreactor at limited dissolved oxygen. **Bioresource Technology**, v. 258, pp. 168-176, 2018.

LIM, J.; DO, H.; SHIN, S.G.; HWANG, S. Primer and probe sets for group-specific quantification of the genera *Nitrosomonas* and *Nitrospira* using real time PCR. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 99, n. 9, p. 1374-1383, 2008.

LIM, S.J.; FOX, P. A kinetic analysis and experimental validation of an integrated system of anaerobic filter and biological aerated filter. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10371-10376, 2011.

LIMPIYAKORN, T.; SONTHIPHAND, P.; RONGSAYAMANONT, C.; POLPRASERT, C. Abundance of amoA genes of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in activated sludge of full-scale wastewater treatment plants. **Bioresource Technology**, v.102, p. 3694-3701, 2011.

LIU, Z., DESANTIS, T.Z.; KNIGHT, R. Accurate taxonomy assignments from 16S r RNA sequences produced by highly parallel pyrosequencers. **Nucleic Acids Research**, v. 35. 2008.

LOGARES, R., SUNAGAWA, S., SALAZAR, G., CORNEJO-CASTILLO, F.M., FERRERA, I., SARMENTO, H., Metagenomic 16S rDNA illumine tags are a powerful alternative to amplicon sequencing to explore diversity and structure of microbial communities. **Environmental Microbiology**, v. 16, n. 9, pp. 2659-2671, 2014.

LOTTI, T.; KLEEREBEZEM, R.; ABELLEIRA-PEREIRA, J.M.; ABBAS, B.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M. Faster through training: The anammox case. **Water Research**, v. 81, p. 261-268, 2015.

LU, H.; CHANDRAN, K.; STENSEL, D. Microbial ecology of denitrification in biological wastewater treatment. **Water Research**, v. 64, p. 237-254, 2014.

LU, X.; NI, J.; ZHEN, G.; KUBOTA, K.; LI, Y. Response of morphology and microbial community structure of granules to influent COD/SO<sub>4</sub>-2 ratios in an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor treating starch wastewater. **Bioresource Technology**, v. 256, p. 456-465, 2018.

LUO, H.; SONG, Y.; ZHOU, Y.; YANG, L.; ZHAO, Y. Effects of rapid temperature rising on nitrogen removal and microbial community variation of anoxic/aerobic process for ABS resin wastewater treatment. **Environment Science Pollution Research**, v. 24, p. 5509-5520, 2017.

MA, B.; BAO, P.; WEI, Y.; ZHU, G., YUAN, Z.; PENG, Y. Suppressing nitrite oxidizing bacteria growth to achieve nitrogen removal from domestic wastewater via Anammox using intermittent aeration with low dissolved oxygen. **Nature**, v. 5, n.13048, p.1-9, 2015.

MA, B.; WANG, S.; CAO, S.; MIAO, Y.; JIA, F.; DU, R.; PENG, Y. Biological nitrogen removal from sewage via anammox: Recent advances. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 981-990, 2016.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. *Microbiologia de Brock*. 12 ed. Brasil, Artmed, p. 595-603, 2010.

MANNINA, G.; VIVIANI, G. Hybrid moving bed biofilm reactors: an effective solution for upgrading a large wastewater treatment plant. **Water Science & Technology**, v. 60, n. 5 p. 1103-11017, 2009.

MATTEI, M.R.; FRUNZO, L.; D'ACUNTO, B.; ESPOSITO, G.; PIROZZI, F. Modelling microbial population dynamics in multispecies biofilms including anammox bacteria. **Ecological Modelling**, v. 304, pp. 44-58, 2015.

MENG, Q.; YANG, F.; LIU, L.; MENG, F. Effects of COD/N ratio and DO concentration on simultaneous nitrification and denitrification in an airlift internal circulation membrane bioreactor. **Journal of Environmental Sciences**, v. 20, n.2, p. 933-939, 2008.

METCALF & EDDY. *Tratamento de efluentes e recuperação de recursos*. 5. ed. Brasil, McGraw - Bookman, p. 503 – 612, 2016.

MEYER, F.; PAARMANN, D.; SOUZA, M.D.; OLSON, R.; GLASS, E.M.; KUBAL, M.; PACZIAN, T.; RODRIGUEZ, A.; STEVENS, R.; WILKE, A.; WILKENING, J.; EDWARDS, R.A. The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. **BMC Bioinformatics**, v. 9, p. 386-394, 2008.

MIAO, Y.; ZHANG, L.; YANG, Y.; PENG, Y.; LI, B.; WANG, S.; ZHANG, Q. Start-up of single-stage partial nitrification-anammox process treating low-strength swage and its restoration from nitrate accumulation. **Bioresource Technology**, v.218, p. 771-779, 2016.

MORAIS, J.C. **Remoção de matéria orgânica e nitrogênio em reator compartimentado anaeróbio/anóxico e aeróbio tratando esgoto doméstico**. Tese de Doutorado. Recife, PE: Universidade Federal de Pernambuco, p. 150, 2015.

MOURA, R. B. **Remoção de matéria orgânica e nitrogênio de esgoto sanitário em reator de leito leito estruturado submetido à aeração intermitente e recirculação do efluente**. Tese de Doutorado. São Carlos, SP: Escola de Engenharia de São Paulo, p.132, 2011.

MOURA, R.B.; DAMIANOVIC, M.H.R.Z.; FORESTI, E. Nitrogen and carbon removal from synthetic wastewater in a vertical structured bed reactor under intermittent aeration. **Journal of Environmental Management**, v. 93, p. 163-167, 2012.

MÜNCH, E.V.; LANT, P.; KELLER, J. Simultaneous nitrification and denitrification in bench scale sequencing batch reactors. **Water Research**, v. 30, n. 2, p. 277-284, 1996.

MUYZER, G., DE WAAL, E. C., UITTERLINDEN, A. G. Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-amplified Genes Coding for 16s rRNA. **Applied Environmental Microbiology**. V. 59, p. 695-700, 1993.

NALING, Y.; ZHAO, C.; MA, B.; LI, S.; SHE, Z.; GUO, L.; ZHANG, Q.; JIN, C.; GAO, M. Impact of ampicillin on the nitrogen removal, microbial community and enzymatic activity of activated sludge. **Bioresource Technology**, v.272, pp. 337-345, 2019.

NAKAZAWA, M.M.; FLORENCIO, L.; KATO, M.T.; GAVAZZA, S.; SANZ, J.L. Effects of the operational conditions on the production of 1,3-propanediol derived from glycerol in anaerobic granular sludge reactors. **Water Science and Technology**, v. 75, p. 963–970, 2017.

NANES, M.B. **Influência da amônia livre na nitrificação parcial em reatores em série anaeróbio e aeróbio**. Dissertação de Mestrado. Recife, PE: Universidade Federal de Pernambuco, p. 77, 2017.

NIELSEN, M.; BOLLMANN, A.; SLIEKERS, O.; JETTEN, M.; SCHMID, M.; STROUS, M.; SCHMIDT, I.; LARSEN, L.H.; NIELSEN, L.P.; REVSBECH, N.P. Kinetics, diffusional limitation and microscale distribution of chemistry and organisms in a CANON reactor. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 51, p. 247-256, 2005.

NNAJI, C.C.. A review of the upflow anaerobic sludge blanket reactor. **Desalination and Water Treatment**, v. 52, pp. 22-24, 2014.

NIELSEN, A.T.; LIU, W.; FILIPE, C.; GRADY, L.; MOLIN, S.; STHAL, D.A. Identification of a novel group of bacteria in sludge from a deteriorated biological phosphorus removal reactor. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1251-1258, 1999.

OLIVEIRA NETTO, A.P.; ZAIAT, M. Treatment of domestic sewage in an anaerobic aerobic fixed bed reactor with recirculation of the liquid phase. **Clean, Air, Water**, v.40, n. 9, p. 965-971, 2012.

PANTOJA FILHO, J.L.R., DAMIANOVIC, M.H.R.Z., FONSECA, D.F., FORESTI, E. Nitrogen and residual organic matter removal from anaerobic reactor effluent in a fixed bed reactor with biogas for denitrification. **Journal Chemical Technology & Biotechnology**, v. 90, n. 12. p. 2227–2233, 2015.

PAREDES, D.; KUSCHK, P.; MBWETTE, T.S.A.; STANGE, F.; MULLER, R.A.; KOSER, H. New aspects of microbial nitrogen transformation in context of wastewater treatment – A review. **Engineering in Life Sciences**, v. 7, p. 13-25, 2007.

PARK, H.; WELLS, G.F.; BAE, H.; CRIDLE, C.S.; FRACIS, C.A. Occurrence of ammonia oxidizing archaea in wastewater treatment plant bioreactors. **Applied and Environment Microbiology**, v. 72, n. 8, pp. 5643-5647, 2006.

PATHAK, N.; PHUNTSHO, S.; TRAN, V.H.; JOHIR, M.A.H.; GHAF FOUR, N.; LEIKNES, T.; FUJIOAKA, T.; SHON, H.K. Simultaneous nitrification-denitrification using baffled osmotic membrane bioreactor-microfiltration hybrid system at different oxic-anoxic conditions for wastewater treatment. **Journal of Environmental Management**, v. 253, p. 109685-109695, 2020.

PELAZ, L.; GÓMEZ, A.; GARRALÓN, G.; LETONA, A.; POLANCO, M. F. Denitrification of the anaerobic membrane bioreactor (AnMBR) effluent with alternative electron donors in domestic wastewater treatment. **Bioresource Technology**, n.243, p.1173-1179, 2017.

PENG, Y.; ZHU, G. Biological nitrogen removal with nitrification and denitrification via nitrite pathway. **Application Microbiology and Biotechnology**, v.76, pp. 15-26, 2006.

PIMENTA, M. **Utilização de reatores híbridos para a remoção de carbono e nitrogênio em efluentes domésticos**. Tese de Doutorado. Recife, PE: Universidade Federal de Pernambuco, p. 97, 2011.

PITTMAN, J.K.; DEAN, A.P.; OSUNDEKO, O. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 17-25, 2011.

POCHANA, K.; KELLER, J. Study of factors affecting simultaneous nitrification and denitrification (SND). *Water Science and Technology*, v. 39, n. 6, p. 61-68, 1999.

QIU, S.; HU, Y.; LIU, R.; SHENG, S.; CHEN, L.; WU, G.; HU, H.; ZHAN, X. Start up of partial nitrification-anammox process using intermittently aerated sequencing batch reactor: Performance and microbial community dynamics. **Science of the Total Environment**, v.647, p. 1188-1198, 2019.

RAMOS, L. A.; CAVALHEIRO, C. C. S; CAVALHEIRO, E.T.G. Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. **Química Nova**, v.29 n.5, p. 1114-1120. 2006.

REN, Y.; NGO, H.H.; GUO, W.; WANG, D.; PENG, L.; NI, B.; WEI, W. New perspectives on microbial communities and biological nitrogen removal in wastewater treatment systems. **Bioresource Technology**, v. 297, p. 122491-122502, 2020.

REYES-ÁVILA, J.; RAZO-FLORES, E.; GOMÉZ, J. Simultaneous biological removal of nitrogen, carbon and sulfur by denitrification. **Water Research**, v. 38, p. 3313-3321, 2004.

RITTMANN, B.E., MCCARTY, P.L. **Environmental Biotechnology: principles and applications**. McGraw Hill, 2001.

RUIZ, G.; JEISON, D.; RUBILAR, O.; CIUDAD, G.; CHAMY, R. Nitrification-denitrification via nitrite accumulation for nitrogen removal from wastewater. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 330-335, 2006.

SALEH-LAKHA, S., SHANONN, K.E., HENDERSON, S.L., GOYER, C., TREVORS, J.T., ZEBARTH, B.J., BURTON, D.L. Effect of pH and temperature on denitrification gene expression and activity in *Pseudomonas mandelii*. **Applied. Environmental. Microbiology**. 75 (12), 3903 - 3911. 2009.

SANTOS, . E. D. **Influência da relação carbono/nitrogênio e da fonte de carbono no processo de nitrificação desnitrificação simultânea em reator de leito estruturado**. Dissertação de Mestrado. São Carlos, SP: Escola de Engenharia de São Paulo, p.144, 2014.

SANTOS. E.D.; MOURA, R.B.; DAMIANOVIC, M.H.R.Z.; FORESTI, E. Influence of COD/N ratio and carbon source on nitrogen removal in a structured bed reactor subjected to recirculation and intermittent aeration (SBRRIA). **Journal of Environmental Management**, v. 166, p. 519-524, 2016.

SANZ, J.L.; KÖCHLING, T. Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 119-133, 2007.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v.239, n. 4.839, pp. 487-491, 1988.

- 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**, v.3, n. 7, p. 450-459, 2001.
- SCHMIDT, I.; BOCK, E. Anaerobic ammonia oxidation with nitrogen dioxide by *Nitrosomonas eutropha*. **Archives of Microbiology**, v.167, p. 106-111, 1997.
- SCHMIDT, I.; VAN SPANNING, R.J.M.; JETTEN, M.S.M. Denitrification and ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea* wild-type, and NirK- and NorB-deficient mutants. **Microbiology**, v.150, p.4107-4114, 2004.
- SCHRAMM, A.; DE BEER, D.J.C.; VAN DE HEUVEL, S. OTTENGRAF, S. AMANN, R. Microscale distribution of populations and activities of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. Along a macroscale gradient in a Nitrifying bioreactor: Quantification by in situ hybridization and use of microsensors. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, n. 8, pp. 3690-3696, 1999.
- SHANAHAN, J.W.; SEMMENS, M.J. Alkalinity and pH on nitrification in a membrane aerated bioreactor: An experimental and model analysis. **Water Research**, v.74, p. 10-22, 2015.
- SHANNON, C.E. A mathematical theory of communication. **Bell System Technical Journal**, v, 27, p 379-523, 1948.
- SHARPTON, T.J. An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. **Frontiers Plant Science**, v.16, n.5, pp.2019-223, 2014.
- SHAPIRO, S.S., WILK, M.M.. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, v. 54, n. 3, 591-611, 1965
- SHENG, S.; LIU, B.; HOU, X.; LIANG, Z.; SUN, X.; DU, L.; WANG, D. Effects of different carbon sources and C/N ratios on the simultaneous anammox and denitrification process. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 127, p. 26-34, 2018.
- SHOJI, T.; NITTAMI, T.; ONUKI, M.; SATOH, H.; MINO, T. Microbial community of biological phosphorus removal process fed with municipal wastewater under different electron acceptor conditions. **Water Science and Technology**, v. 54, n.1, p. 81-90, 2006.
- SIGLER, W.V.; MINIACI, C.; ZEYER, J. Electrophoresis time impacts the denaturing gel electrophoresis-based assessment of bacterial community structure. **Journal of Microbiological Methods**, v. 57, p. 17-22, 2004.
- SILVA, E.G. **Acesso à comunidade bacteriana por métodos moleculares e a avaliação de parâmetros cinéticos durante a remoção de nitrogênio em reatores aeróbio e anóxico.** Tese de Doutorado. Recife, PE: Universidade Federal de Pernambuco, p.137, 2012.
- SILVA, P.M.J. **Avaliação das condições operacionais de sistemas de reatores híbridos anaeróbios e aeróbios na remoção de nitrogênio de esgotos sanitários.** Dissertação de Mestrado. Recife, PE: Universidade Federal de Pernambuco, p.66, 2012.

SILVA, N.T.M. **Remoção de carbono e nitrogênio de efluente de matadouro em reator anaeróbio-aeróbio de leito fixo.** Dissertação de Mestrado. Caruaru, PE: Universidade Federal de Pernambuco, p.92, 2018.

SIMONATO, F.; GÓMEZ-PEREIRA, P.R.; FUCHS, B.M.; AMANN, R. Bacterioplankton diversity and community composition in the southern lagoon of Venice. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 33, pp. 128-138, 2010.

SINHA, B.; ANNACHHATRE, A.P. Assessment of partial nitrification reactor performance through microbial population shift using quinone profile, FISH and SEM. **Bioresource Technology**, v. 98, n.18, p. 3602-3610, 2007.

SLIKERS, A.O.; THIRD, K.A.; ABMA, W.; KUENEN, J.G.; JETTEN, M.S.M. CANNON and anammox in a gas-lift reactor. **FEMS Microbiology Letters**, v. 218, p. 339-344, 2003.

SOLIMAN, M.; ELDYASTI, A. Development of partial nitrification as a first step of nitrite shunt process in a Sequential Batch Reactor (SBR) using Ammonium Oxidizing Bacteria (AOB) controlled by mixing regime. **Bioresource Technology**, v. 221, p. 85-95, 2016.

STEIN, L.Y. Insights into the physiology of ammonia oxidizing microorganisms. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 49, 2019, p. 9-15.

TAWFIK, A.; EL-ZAMEL, T.; HERRAWY, A.; EL-TAWEEL, G. Fate of parasites and pathogenic bacteria in anaerobic hybrid reactor followed by downflow hanging sponge system treating domestic wastewater **Environmental Science Pollution Research**, v.22, pp.12235–12245, 2015.

TAKAHASHI, S.; TOMITA, J.; NISHIOKA, K.; HISADA, T.; NISHIJIMA, M. Development of prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of *Bacteria* and *Archaea* using next-generation sequencing. **Plos One**, 2014.

THIRD, K.A.; SLIKERS, A.O.; KUENEN, J.G.; JETTEN, M.S.M. The CANON system (Completely Autotrophic Nitrogen Removal Over Nitrite) under Ammonium Limitation: interaction and competition between three groups of bacteria. **Systematic Applied Microbiology**, v. 24, p. 588-596, 2001.

THAMDRUP, B; DALSGAARD T. Nitrogen Cycling in sediments. In: Kirchman DL., Ed. *Microbial Ecology of the Ocean*. New Jersey: John Willey E Sons, p. 537-568.

TOYOFUKU, M.; INABA, T.; KIYOKAWA, T.; OBANA, N.; YAMATA, Y.; NOMURA, N. Environmental factors that shape biofilm formation. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.80, n.1, pp. 7-12, 2016.

TONON D.; TONETTI, A.L.; CORAUCCI FILHO, B.; BUENO, D.A.C. Wastewater treatment by anaerobic filter and sand filter: Hydraulic loading rates for removing organic matter, phosphorus, pathogens and nitrogen in tropical countries. **Ecological Engineering**, 82, pp. 583-589, 2015.

TORRES, P. **Desempenho de um reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) de bancada no tratamento de substrato sintético simulando esgotos sanitários.** Dissertação de Mestrado. São Carlos, SP: Escola de Engenharia de São Carlos, 1992.

- VAN DE GRAAF, A.A.; BRUIJN, P.; ROBERTSON, L.A.; JETTEN, M.S.M.; KUENEN, J.G. Autotrophic growth of anaerobic ammonium oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor. **Microbiology**, v. 142, p. 2187-2196, 1996.
- VAN HAANDEL, A.C.; MARAIS, G.O. O comportamento do sistema de lodos ativados teoria e aplicação para projetos e operação. Campina Grande: Epgraff, p.472, 1999.
- VAN KESSEL, M.; SPETH D.R.; ALBERTSEN, M.; NIELSEN, P.H.; OP DE CAMP, H.J.M.; KARTAL, B.; JETTEN, MSM.; LUCKER, S. Complete nitrification by a single microorganism. **Nature**, v.528, n.7583, 2015.
- VERAS, S.T.S.; OJEDA, P.R.; FLORENCIO, L.; KATO, M.T.; SANZ, J.L. Production of 1,3-propanediol from pure and crude glycerol using UASB reactor with attached biomass in silicone support. **Bioresource Technology**, v.279, pp. 140-148, 2019.
- VILLAVERDE, S.; GARCÍA-ENCINA, P.A.; FDZ-POLANCO, F. Influence of pH over nitrifying biofilm activity in submerged biofilters. **Water Research**, v. 31, n. 5, p. 1180-1186; 1997.
- WALIA, R.; KUMAR, P.; MEHROTRA, I. Post-treatment of effluent from UASB reactor by surface aerator. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 17, 2020, p.983-992.
- WANG, Q.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M.; COLE, J.R. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Applied Environmental Microbiology**, v.73, pp. 5261-5267, 2007.
- WANG, B.; PENG, Y.; GUO, Y.; ZHAO, M.; WANG, S. Illumina MISeq sequencing reveals the key microorganisms involved in partial nitritation followed by simultaneous sludge fermentation, denitrification and anammox process. **Bioresource Technology**, v. 207, 118-125, 2007.
- WANG, Y., QIAN, P.Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. **PloS one**, v9, p. 7401, 2009.
- WANG, K.; WANG, S.; ZHU, R.; MIAO, L.; PENG, Y. Advanced nitrogen removal from landfill leachate without addition of external carbon using a novel system coupling ASBR and modified SBR. **Bioresource Technology**, v. 134, p. 212-218, 2013.
- WANG, S.; PENG, Y.; MA, B.; WANG, S.; ZHU, G. Anaerobic ammonium oxidation in traditional municipal wastewater treatment plants with low strength ammonium loading: widespread but overlooked. **Water Research**, v. 84, p. 66-75, 2015.
- WANG, 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 nitritation based on DO-HRT control. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 95-104, 2016.
- WEN, X.; GONG, B.; ZHOU, J.; HE, Q.; QING, X. Efficient simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification (SNAD) system equipped with a real-time dissolved oxygen (DO) intelligent control system and microbial community shifts of different

substrate concentrations. **Water Research**, v.119, p. 201-211, 2017.

WIFFELS, R.H., TRAMPER, J. Nitrification by immobilized cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v.17, n. 6, pp. 482-492, 1995.

WU, P.; ZHANG, X.; WANG, X.; WANG, C.; FAUSTIN, F.; LIU, W. Characterization of the start-up of single and two-stage Anammox process with real low-strength wastewater treatment. **Chemosphere**, v. 245, p. 125572-125579, 2020.

XIA, Z.; WANG, Q.; SHE, Z., GAO, M.; ZHAO, Y.; GUO, L.; JIN, C. Nitrogen removal pathway and dynamics of microbial community with the increase of salinity in simultaneous nitrification and denitrification process. **Science of the Total Environment**, v. 697, p. 134047, 2019.

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.

YANG, S.; YANG, F. Nitrogen removal via short-cut simultaneous nitrification and denitrification in an intermittently aerated moving bed membrane bioreactor. **Journal of Hazardous Materials**, n. 195, pp. 318-323, 2011.

YAN, L.; LIU, S.; LIU, Q.; ZHANG, M.; LIU, Y.; WEN, Y.; CHEN, Z.; ZHANG, Y.; YANG, Q. Improved performance of simultaneous nitrification and denitrification via nitrite in an oxygen limited SBR by alternating the DO. **Bioresource Technology**., v. 275, p. 153-162, 2019.

YANG, Y.; LI, M.; LI, H.; LI, X. Y.; LIN, J. G.; DENECKE, M., GU, J.D.. Specific and effective detection of anammox bacteria using PCR primers targeting the 16S rRNA gene and functional genes. **Science of the Total Environment**, v. 734, p.139387, 2020.

YU, T.; QI, R.; LI, D.; ZHANG, Y.; YANG M. Nitrifier characteristics in submerged membrane bioreactors under different sludge retention times. **Water research**, v. 44, p. 2823 – 2830, 2010.

YUAN, X.; GAO, D. Effect of dissolved oxygen on nitrogen removal and process control in aerobic granular sludge reactor. **Journal of Hazardous Materials**, v. 178, 1041-1045. 2010.

YUE, X.; LIU, Z.; YU, G.; LI, Q.; TANG, J. Performance and microbial community of the completely autotrophic nitrogen removal over nitrite process with a submerged aerated biological filter. **Water Science & Technology**, v.78, n. 3, p. 515-522, 2018.

ZHANG, P.; ZHOU, Q. Simultaneous nitrification and denitrification in activated sludge systems under low oxygen concentration. *Frontiers Environment Science Engineering*, n.1, v.1, pp. 49-52, 2007.

ZHANG, S.; WANG, Y.; HE, W.; WU, M.; XING, M.; YANG, J.; GAO, N. Impacts of temperature and nitrifying community on nitrification kinetics in a moving bed biofilm reactor treating polluted raw water. **Chemical Engineering Journal**, v. 236, p. 242-250, 2014.

ZHANG, F.; PENG, Y.; MIAO, L.; WANG, Z.; WANG, S.; LI, B. A novel simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification (SNAD) with intermittent aeration for cost-effective nitrogen removal from mature landfill leachate. **Chemical Engineering Journal**, v. 313, p.619-628, 2017.

ZHANG, Z.; ZHANG, Y.; CHEN, Y. Recent advances in partial denitrification in biological nitrogen removal: From enrichment to application. **Bioresource Technology**, v.298, p.122444-122460, 2020.

ZHAO, Y., JING, B., TANG, X., LIU, S.. Metagenomic insights into functional traits variation and coupling effects on the anammox community during reactor start-up. **Science of the Total Environment**, v, 687, p, 50-60, 2019.

ZHENG, Z.; LI, Y.; ZHANG, Y.; BIAN, W.; WEI, J. ZHAO, B. YANG, J. Effects of carbon sources, COD/NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N ratios and temperature on the nitrogen removal performance of the simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification (SNAD) biofilm. **Water Science & Technology**, v. 75, n. 7, p.1712-1721, 2017.

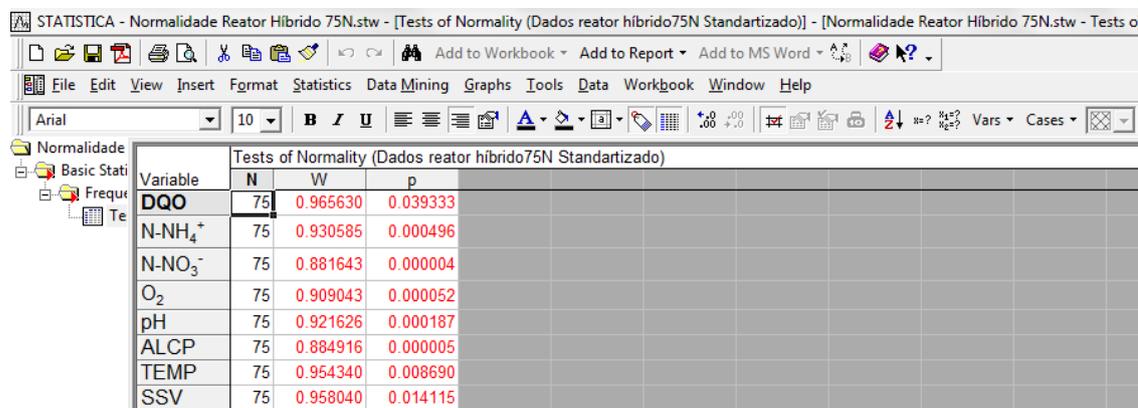
ZHOU, Y., OEHMEN, A., LIM, M., VADIVELU, V., NG, W.J. The role of nitrite and free nitrous acid (FNA) in wastewater treatment plants. **Water Research**, v. 45, n.15, pp. 4672–4682, 2011.

ZHOU, H.; LI, X.; CHU, Z.; ZHANG, J. Effect of temperature downshifts on a bench-scale hybrid A/O system: Process performance and microbial community dynamics. **Chemosphere**, v. 153, pp. 500-507, 2016.

ZIELINSKA, M.; BERNAT, K.; CYDZIK-KWIATKOWSKA, A.; SOBOLEWASKA, J.; WOJNOWSKA-BARYALA, I. Nitrogen removal from wastewater and a bacterial diversity in activated sludge at different COD/N ratios and dissolved oxygen concentrations. **Journal of Environmental Sciences**, n.24, v.6, pp.990-998, 2012.

ZOOPAS, F.M.; BERNARDES, A.M.; MENEGUZZI, A. Parâmetros operacionais na remoção biológica de nitrogênio de águas por nitrificação e desnitrificação simultânea. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.21, n.6, pp.29-42, 2016

**APÊNDICE A - Normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk para os dados (N= 75, 15 para cada fase) do efluente do RHAE**



Normalidade

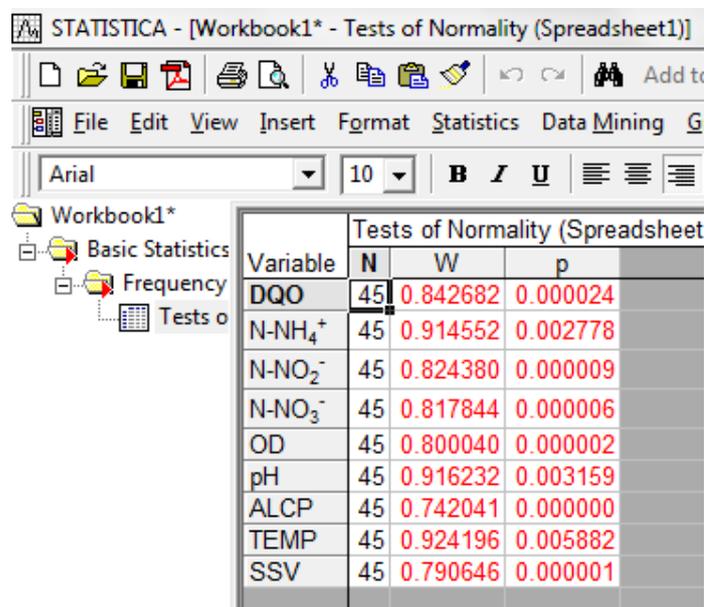
Basic Stati

Freque

Te

Tests of Normality (Dados reator hibrido75N Standartizado)			
Variable	N	W	p
DQO	75	0.965630	0.039333
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	75	0.930585	0.000496
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	75	0.881643	0.000004
O <sub>2</sub>	75	0.909043	0.000052
pH	75	0.921626	0.000187
ALCP	75	0.884916	0.000005
TEMP	75	0.954340	0.008690
SSV	75	0.958040	0.014115

**APÊNDICE B - Normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk para os dados (N= 45,  
15 para cada fase) do efluente do RAE**



STATISTICA - [Workbook1\* - Tests of Normality (Spreadsheet1)]

File Edit View Insert Format Statistics Data Mining G

Arial 10 B I U

Workbook1\*

- Basic Statistics
- Frequency
- Tests o

Variable	N	W	p
DQO	45	0.842682	0.000024
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	45	0.914552	0.002778
N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	45	0.824380	0.000009
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	45	0.817844	0.000006
OD	45	0.800040	0.000002
pH	45	0.916232	0.003159
ALCP	45	0.742041	0.000000
TEMP	45	0.924196	0.005882
SSV	45	0.790646	0.000001

## APÊNDICE C - Testes ANOVA e Tukey para as variáveis DQO, SSV, N-NO<sub>3</sub>- e N-NT do efluente do BAS (P5)

QO

ANOVAOneWay (20/07/2020 08:49:10)

Notes

Input Data

Descriptive Statistics

Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
la	15	33	9,97139
lb	15	39,6	9,39047
lc	15	29,6	3,5817
ld	15	42,33333	4,51453
le	15	50,66667	9,62635

One Way ANOVA

Overall ANOVA

DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F	
Model	4	4079,01333	1019,75333	17,24276	6,92149E-10
Error	70	4139,86667	59,14095		
Total	74	8218,88			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal  
Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different  
At the 0.05 level, the population means are significantly different.

Fit Statistics

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
0,4963	0,19699	7,69032	39,04

Means Comparisons

Tukey Test

MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL	
lb la	6,6	2,80811	3,32398	0,14159	0,05	0	-1,26314	14,46314
lc la	-3,4	2,80811	1,7123	0,74516	0,05	0	-11,26314	4,46314
lc lb	-10	2,80811	5,03618	0,00585	0,05	1	-17,86314	-2,13686
ld la	9,33333	2,80811	4,70044	0,01196	0,05	1	1,4702	17,19647
ld lb	2,73333	2,80811	1,37656	0,86625	0,05	0	-5,1298	10,59647
ld lc	12,73333	2,80811	6,41274	2,20563E-4	0,05	1	4,8702	20,59647
le la	17,66667	2,80811	8,89726	2,74158E-7	0,05	1	9,80353	25,5298
le lb	11,06667	2,80811	5,67338	0,00173	0,05	1	3,20353	18,9298
le lc	21,06667	2,80811	10,60956	3,3395E-8	0,05	1	13,20353	28,9298
le ld	8,33333	2,80811	4,19682	0,0324	0,05	1	0,4702	16,19647

Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0.05 level.  
Sig equals 0 indicates that the means difference is not significant at the 0.05 level.

SSV

ANOVAOneWay (20/07/2020 09:01:49)

Notes

Input Data

Descriptive Statistics

Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
la	15	8,66667	2,46885
lb	15	17	2,0702
lc	15	23,2	7,83034
ld	15	27,06667	3,39046
le	15	28,13333	2,77403

One Way ANOVA

Overall ANOVA

DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F	
Model	4	3906,98667	976,74667	53,73488	0
Error	70	1272,4	18,17714		
Total	74	5179,36667			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal  
Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different  
At the 0.05 level, the population means are significantly different.

Fit Statistics

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
0,75433	0,20484	4,26347	20,81333

Means Comparisons

Tukey Test

MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL	
lb la	8,33333	1,5568	7,5701	1,01725E-5	0,05	1	3,97406	12,69261
lc la	14,53333	1,5568	13,20226	0	0,05	1	10,17406	18,89261
lc lb	6,2	1,5568	5,63215	0,00151	0,05	1	1,84072	10,55928
ld la	18,4	1,5568	16,71478	0	0,05	1	14,04072	22,75928
ld lb	10,06667	1,5568	9,14468	1,52256E-7	0,05	1	5,70739	14,42594
ld lc	3,86667	1,5568	3,51253	0,10609	0,05	0	-0,49261	8,22594
le la	19,46667	1,5568	17,68375	0	0,05	1	15,10739	23,82594
le lb	11,13333	1,5568	10,11365	4,03838E-8	0,05	1	6,77406	15,49261
le lc	4,93333	1,5568	4,4815	0,01867	0,05	1	0,57406	9,29261
le ld	1,06667	1,5568	0,96897	0,95906	0,05	0	-3,29261	5,42594

Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0.05 level.  
Sig equals 0 indicates that the means difference is not significant at the 0.05 level.

N-NO<sub>3</sub>

ANOVAOneWay (20/07/2020 08:12:47)

Notes

Input Data

Descriptive Statistics

Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
la	15	11,88067	1,19852
lb	15	7,22	1,35604
lc	15	4,7498	0,90981
ld	15	3,6778	1,37364
le	15	2,592	0,72535

One Way ANOVA

Overall ANOVA

DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F	
Model	4	819,56737	204,89184	168,89188	0
Error	70	84,92077	1,21315		
Total	74	904,48814			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal  
Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different  
At the 0.05 level, the population means are significantly different.

Fit Statistics

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
0,90611	0,16284	1,10143	6,02405

Means Comparisons

Tukey Test

MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL	
lb la	-4,66067	0,40219	16,38837	0	0,05	1	-5,78685	-3,53448
lc la	-7,13987	0,40219	25,07437	1,35558E-7	0,05	1	-8,25795	-6,00498
lc lb	-2,4702	0,40219	8,686	4,73424E-7	0,05	1	-3,59638	-1,34402
ld la	-8,20287	0,40219	28,84398	2,58589E-8	0,05	1	-9,32995	-7,07666
ld lb	-3,5422	0,40219	12,45549	0	0,05	1	-4,66638	-2,41802
ld lc	-1,072	0,40219	3,76949	0,06965	0,05	0	-2,19818	0,05418
le la	-9,28857	0,40219	32,66187	0	0,05	1	-10,41485	-8,16248
le lb	-4,628	0,40219	16,2735	0	0,05	1	-5,75418	-3,50182
le lc	-2,1578	0,40219	7,5875	9,69705E-6	0,05	1	-3,28398	-1,03162
le ld	-1,0858	0,40219	3,81801	0,06411	0,05	0	-2,21198	0,04038

Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0.05 level.  
Sig equals 0 indicates that the means difference is not significant at the 0.05 level.

N-NT

ANOVAOneWay (20/07/2020 09:20:14)

Notes

Input Data

Descriptive Statistics

Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
la	15	21,12833	1,63373
lb	15	14,83056	0,62173
lc	15	11,54298	2,905
ld	15	10,09201	1,32527
le	15	10,87583	2,38036

One Way ANOVA

Overall ANOVA

DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F	
Model	4	1231,56637	307,89159	81,3793	0
Error	70	264,839	3,78341		
Total	74	1496,40537			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal  
Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different  
At the 0.05 level, the population means are significantly different.

Fit Statistics

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
0,82302	0,14204	1,9451	13,69394

Means Comparisons

Tukey Test

MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL	
lb la	-5,29777	0,71025	12,5398	0	0,05	1	-8,28658	-4,30896
lc la	-9,58535	0,71025	19,08586	0	0,05	1	-11,57416	-7,59654
lc lb	-3,28758	0,71025	6,54006	1,56669E-4	0,05	1	-5,27639	-1,29877
ld la	-11,03633	0,71025	21,97497	0	0,05	1	-13,02514	-9,04752
ld lb	-4,73655	0,71025	9,43916	8,54188E-8	0,05	1	-6,72736	-2,74974
ld lc	-1,45997	0,71025	2,8891	0,25681	0,05	0	-3,43978	0,53784
le la	-10,25251	0,71025	20,41426	0	0,05	1	-12,24132	-8,2637
le lb	-3,95473	0,71025	7,87446	4,38227E-6	0,05	1	-5,94354	-1,96592
le lc	-0,66715	0,71025	1,3284	0,88054	0,05	0	-2,65596	1,32166
le ld	0,78382	0,71025	1,5607	0,80409	0,05	0	-1,20499	2,72263

Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0.05 level.  
Sig equals 0 indicates that the means difference is not significant at the 0.05 level.

Fonte: O autor (2020)

**APÊNDICE D- Balanço de massa de matéria orgânica e nitrogênio para as fases estudadas**

Cargas Aplicadas	Ia (RR = 0,50)						
	UASB (P1)	Mistura (P1m)	FAN (P2)	LA (P3)	BAS (P4)	Ef (P5)	Rec (P1r)
CO (g O <sub>2</sub> .d <sup>-1</sup> )	523,9 (53,0)	546,4 (52,7)	277,7 (30,5)	201,7 (13,9)	132,2 (43,1)	67,7 (18,2)	22,5 (6,1)
Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	383,0 (38,7)	266,3 (26,9)	135,3 (14,8)	98,3 (6,8)	64,4 (21,0)	33,0 (9,9)	33,0 (9,9)
Vazão (L.d <sup>-1</sup> )	1368 (0,0)	2052 (0,0)	2052 (0,0)	2052 (0,0)	2052 (0,0)	2052 (0,0)	684 (0,0)
CN (g N.d <sup>-1</sup> )							
N-NTK	40,5 (1,7)	46,0 (2,3)	60,7 (2,5)	59,7 (2,9)	27,7 (5,4)	15,2 (3,3)	5,1 (1,1)
Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	29,6 (1,2)	22,4 (1,1)	29,6 (1,2)	29,1 (1,4)	13,5 (2,6)	7,4 (1,8)	7,4 (1,8)
Vazão (L.d <sup>-1</sup> )	1368 (0,0)	2052 (0,0)	2052 (0,0)	2052 (0,0)	2052 (0,0)	2052 (0,0)	684 (0,0)
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	31,6 (2,1)	37,7 (2,5)	60,7 (2,5)	59,7 (2,9)	27,7 (5,4)	15,2 (3,3)	5,1 (1,1)
Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	23,1 (1,5)	18,4 (1,2)	29,6 (1,2)	29,1 (1,4)	13,5 (2,6)	7,4 (1,8)	7,4 (1,8)
Vazão (L.d <sup>-1</sup> )	1368 (0,0)	2052 (0,0)	2052 (0,0)	2052 (0,0)	2052 (0,0)	2052 (0,0)	684 (0,0)
N-N <sub>ORG</sub>	8,8 (2,7)	8,3 (2,7)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	6,5 (2,0)	4,0 (1,3)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
Vazão (L.d <sup>-1</sup> )	1368 (0,0)	2052 (0,0)	2052 (0,0)	2052 (0,0)	2052 (0,0)	2052 (0,0)	684 (0,0)
N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0,0 (0,0)	1,2 (0,2)	0,0 (0,0)	0,4 (0,2)	2,9 (0,6)	3,8 (0,6)	1,2 (0,0)
Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	0,0 (0,0)	0,6 (0,1)	0,0 (0,0)	0,2 (0,2)	1,4 (0,3)	1,9 (0,3)	1,9 (0,3)
Vazão (L.d <sup>-1</sup> )	1368 (0,0)	2052 (0,0)	2052 (0,0)	2052 (0,0)	2052 (0,0)	2052 (0,0)	684 (0,0)
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0,0 (0,0)	8,0 (1,0)	0,0 (0,0)	0,4 (0,2)	18,4 (3,5)	24,2 (3,1)	8,1 (1,0)
Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	0,0 (0,0)	3,9 (0,5)	0,0 (0,0)	0,2 (0,2)	9,0 (1,7)	11,8 (1,1)	11,8 (1,1)
Vazão (L.d <sup>-1</sup> )	1368 (0,0)	2052 (0,0)	2052 (0,0)	2052 (0,0)	2052 (0,0)	2052 (0,0)	684 (0,0)
N-NT	40,5 (1,7)	55,2 (2,2)	60,7 (2,5)	60,5 (3,0)	49,0 (3,3)	43,2 (3,4)	14,4 (1,1)
Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	29,6 (1,2)	26,9 (1,1)	29,6 (1,2)	29,5 (1,4)	23,9 (1,6)	21,1 (1,6)	21,1 (1,6)
Vazão (L.d <sup>-1</sup> )	1368 (0,0)	2052 (0,0)	2052 (0,0)	2052 (0,0)	2052 (0,0)	2052 (0,0)	684 (0,0)

Fonte: O autor (2020)

Contínua na próxima página

<b>Cargas Aplicadas</b>	<b>UASB (P1)</b>	<b>Mistura (P1m)</b>	<b>FAN (P2)</b>	<b>LA (P3)</b>	<b>BAS (P4)</b>	<b>Ef (P5)</b>	<b>Rec (P1r)</b>
	<b>Ib (RR = 0,75)</b>						
CO (g O <sub>2</sub> .d <sup>-1</sup> )	552,6 (32,5)	593,2 (37,6)	378,2 (37,9)	288,7 (53,2)	171,1 (38,7)	94,8 (19,7)	40,6 (8,5)
Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	404,0 (22,0)	247,8 (12,7)	158,0 (15,8)	120,6 (22,2)	71,5 (16,1)	39,6 (8,3)	39,6 (8,3)
Vazão (L.d <sup>-1</sup> )	1368 (0,0)	2394 (0,0)	2394 (0,0)	2394 (0,0)	2394 (0,0)	2394 (0,0)	1026 (0,0)
CN (g N.d <sup>-1</sup> )							
N-NTK	41,7 (1,1)	48,1 (8,4)	73,0 (2,1)	72,3 (1,0)	29,9 (7,5)	15,8 (1,8)	6,7 (0,8)
Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	30,5 (0,8)	20,1 (3,5)	30,4 (0,9)	30,2 (1,0)	12,5 (3,1)	6,6 (0,7)	6,6 (0,7)
Vazão (L.d <sup>-1</sup> )	1368 (0,0)	2394 (0,0)	2394 (0,0)	2394 (0,0)	2394 (0,0)	2394 (0,0)	1026 (0,0)
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	30,9 (2,1)	37,6 (2,6)	72,7 (2,3)	72,3 (1,0)	29,9 (7,5)	15,8 (1,8)	6,7 (0,8)
Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	22,6 (1,6)	15,7 (1,1)	30,4 (0,9)	30,2 (1,0)	12,5 (3,1)	6,6 (0,7)	6,6 (0,7)
Vazão (L.d <sup>-1</sup> )	1368 (0,0)	2394 (0,0)	2394 (0,0)	2394 (0,0)	2394 (0,0)	2394 (0,0)	1026 (0,0)
N-N <sub>ORG</sub>	10,8 (2,4)	10,7 (2,4)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	7,9 (1,7)	4,4 (1,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
Vazão (L.d <sup>-1</sup> )	1368 (0,0)	2394 (0,0)	2394 (0,0)	2394 (0,0)	2394 (0,0)	2394 (0,0)	1026 (0,0)
N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0,0 (0,0)	0,9 (0,4)	0,2 (0,1)	0,2 (0,1)	2,9 (0,8)	2,4 (1,0)	1,0 (0,3)
Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	0,0 (0,0)	0,4 (0,2)	0,1 (0,1)	0,1 (0,1)	1,2 (1,3)	1,0 (0,4)	1,0 (0,4)
Vazão (L.d <sup>-1</sup> )	1368 (0,0)	2394 (0,0)	2394 (0,0)	2394 (0,0)	2394 (0,0)	2394 (0,0)	1026 (0,0)
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0,0 (0,0)	7,4 (0,9)	0,0 (0,0)	0,5 (0,3)	11,9 (3,7)	17,2 (2,2)	7,4 (0,9)
Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	0,0 (0,0)	3,1 (0,4)	0,0 (0,0)	0,2 (0,2)	5,0 (1,6)	7,2 (1,3)	7,2 (1,4)
Vazão (L.d <sup>-1</sup> )	1368 (0,0)	2394 (0,0)	2394 (0,0)	2394 (0,0)	2394 (0,0)	2394 (0,0)	1026 (0,0)
N-NT	41,7 (1,1)	56,6 (8,3)	73,0 (2,0)	73,0 (2,0)	44,7 (6,9)	35,4 (1,7)	15,1 (0,7)
Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	30,5 (0,8)	23,6 (3,5)	30,5 (0,9)	30,5 (1,0)	18,7 (2,9)	14,8 (0,6)	14,8 (0,7)
Vazão (L.d <sup>-1</sup> )	1368 (0,0)	2394 (0,0)	2394 (0,0)	2394 (0,0)	2394 (0,0)	2394 (0,0)	1026 (0,0)

Fonte: O autor (2020)

Contínua na próxima página

<b>Cargas Aplicadas</b>	<b>UASB (P1)</b>	<b>Mistura (P1m)</b>	<b>FAN (P2)</b>	<b>LA (P3)</b>	<b>BAS (P4)</b>	<b>Ef (P5)</b>	<b>Rec (P1r)</b>
	<b>Ic (RR = 1,00)</b>						
CO (g O <sub>2</sub> .d <sup>-1</sup> )	233,5 (26,0)	273,8 (29,9)	248,7 (23,1)	162,5 (41,8)	97,9 (35,2)	81,0 (10,5)	40,5 (5,2)
Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	170,7 (19,0)	100,1 (10,9)	90,9 (8,5)	59,4 (15,3)	35,8 (12,9)	29,6 (3,5)	29,6 (3,5)
Vazão (L.d <sup>-1</sup> )	1368 (0,0)	2736 (0,0)	2736 (0,0)	2736 (0,0)	2736 (0,0)	2736 (0,0)	1368 (0,0)
CN (g N.d <sup>-1</sup> )							
N-NTK	36,0 (1,9)	44,0 (5,6)	72,0 (3,6)	70,8 (4,0)	25,5 (7,1)	15,9 (10,0)	8,0 (5,0)
Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	26,3 (1,4)	16,1 (2,0)	26,3 (1,3)	25,9 (1,5)	9,3 (2,6)	5,8 (3,5)	5,8 (3,5)
Vazão (L.d <sup>-1</sup> )	1368 (0,0)	2736 (0,0)	2736 (0,0)	2736 (0,0)	2736 (0,0)	2736 (0,0)	1368 (0,0)
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	28,2 (2,3)	36,1(6,8)	72,0 (3,8)	70,8 (4,0)	25,5 (7,1)	15,9 (10,0)	8,0 (5,0)
Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	20,6 (1,7)	13,2 (2,5)	26,3 (1,3)	25,9 (1,5)	9,3 (2,6)	5,8 (3,5)	5,8 (3,5)
Vazão (L.d <sup>-1</sup> )	1368 (0,0)	2736 (0,0)	2736 (0,0)	2736 (0,0)	2736 (0,0)	2736 (0,0)	1368 (0,0)
N-N <sub>ORG</sub>	7,8 (2,2)	7,9 (2,2)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	5,7 (1,6)	2,9 (0,8)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
Vazão (L.d <sup>-1</sup> )	1368 (0,0)	2736 (0,0)	2736 (0,0)	2736 (0,0)	2736 (0,0)	2736 (0,0)	1368 (0,0)
N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0,0 (0,0)	1,6 (0,6)	0,0 (0,0)	0,8 (0,5)	3,5 (0,9)	2,7 (1,0)	1,3 (0,5)
Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	0,0 (0,0)	0,6 (0,2)	0,0 (0,0)	0,3 (0,2)	1,3 (0,3)	1,0 (0,4)	1,0 (0,4)
Vazão (L.d <sup>-1</sup> )	1368 (0,0)	2736 (0,0)	2736 (0,0)	2736 (0,0)	2736 (0,0)	2736 (0,0)	1368 (0,0)
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0,0 (0,0)	6,6 (1,2)	0,0 (0,0)	0,3 (0,2)	6,2 (0,3)	12,8 (2,6)	6,5 (1,2)
Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	0,0 (0,0)	2,4 (0,5)	0,0 (0,0)	0,1 (0,1)	2,3 (0,1)	4,7 (0,9)	4,7 (0,9)
Vazão (L.d <sup>-1</sup> )	1368 (0,0)	2736 (0,0)	2736 (0,0)	2736 (0,0)	2736 (0,0)	2736 (0,0)	1368 (0,0)
N-NT	36,0 (1,9)	52,2 (4,8)	72,0 (3,6)	71,9 (4,2)	35,2 (8,2)	31,4 (8,2)	15,8 (4,1)
Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	26,3 (1,3)	19,1 (1,7)	26,3 (1,3)	26,3 (1,3)	12,9 (3,0)	11,5 (3,0)	11,5 (3,0)
Vazão (L.d <sup>-1</sup> )	1368 (0,0)	2736 (0,0)	2736 (0,0)	2736 (0,0)	2736 (0,0)	2736 (0,0)	1368 (0,0)

Fonte: O Autor (2020).

Contínua na próxima página

<b>Cargas Aplicadas</b>	<b>UASB (P1)</b>	<b>Mistura (P1m)</b>	<b>FAN (P2)</b>	<b>LA (P3)</b>	<b>BAS (P4)</b>	<b>Ef (P5)</b>	<b>Rec (P1r)</b>
	<b>Id (RR = 1,25)</b>						
CO (g O <sub>2</sub> .d <sup>-1</sup> )	395,0 (45,9)	467,2 (43,8)	383,8 (13,4)	291,0 (30,3)	161,9 (22,5)	130,2 (13,9)	72,3 (7,7)
Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	288,7 (33,5)	151,8 (14,2)	124,7 (4,4)	94,5 (9,9)	52,6 (7,3)	42,3 (4,5)	42,3 (4,5)
Vazão (L.d <sup>-1</sup> )	1368 (0,0)	3078 (0,0)	3078 (0,0)	3078 (0,0)	3078 (0,0)	3078 (0,0)	1710 (0,0)
CN (g N.d <sup>-1</sup> )							
N-NTK	44,3 (2,5)	53,2 (5,0)	99,7 (5,7)	99,7 (5,5)	22,8 (7,2)	16,0 (6,9)	8,8 (3,8)
Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	32,4 (1,9)	17,3 (1,6)	32,4 (1,7)	32,3 (1,6)	7,4 (2,3)	5,2 (2,2)	5,2 (2,2)
Vazão (L.d <sup>-1</sup> )	1368 (0,0)	3078 (0,0)	3078 (0,0)	3078 (0,0)	3078 (0,0)	3078 (0,0)	1710 (0,0)
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	34,2 (2,2)	43,1 (2,0)	99,4 (5,3)	99,4 (5,2)	22,8 (7,2)	16,0 (6,9)	8,8 (3,8)
Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	25,0 (1,6)	14,0 (0,6)	32,4 (1,7)	32,3 (1,6)	7,4 (2,3)	5,2 (2,2)	5,2 (2,2)
Vazão (L.d <sup>-1</sup> )	1368 (0,0)	3078 (0,0)	3078 (0,0)	3078 (0,0)	3078 (0,0)	3078 (0,0)	1710 (0,0)
N-N <sub>ORG</sub>	10,1 (3,9)	10,1 (3,9)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	7,4 (2,9)	3,3 (1,3)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
Vazão (L.d <sup>-1</sup> )	1368 (0,0)	3078 (0,0)	3078 (0,0)	3078 (0,0)	3078 (0,0)	3078 (0,0)	1710 (0,0)
N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0,0 (0,0)	2,1 (1,4)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	4,9 (2,1)	4,0 (2,6)	2,2 (1,4)
Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	0,0 (0,0)	0,7 (0,5)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	1,6 (0,7)	1,3 (0,8)	1,3 (0,8)
Vazão (L.d <sup>-1</sup> )	1368 (0,0)	3078 (0,0)	3078 (0,0)	3078 (0,0)	3078 (0,0)	3078 (0,0)	1710 (0,0)
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0,0 (0,0)	6,2 (2,3)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	5,2 (0,8)	11,1 (4,2)	6,2 (2,3)
Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	0,0 (0,0)	2,0 (0,8)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	1,7 (0,2)	3,6 (1,3)	3,6 (1,3)
Vazão (L.d <sup>-1</sup> )	1368 (0,0)	3078 (0,0)	3078 (0,0)	3078 (0,0)	3078 (0,0)	3078 (0,0)	1710 (0,0)
N-NT	44,3 (2,5)	61,5 (3,0)	99,7 (5,7)	99,7 (5,7)	32,9 (5,8)	31,1 (3,7)	17,2 (2,1)
Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	32,4 (1,9)	20,0 (1,0)	32,4 (1,8)	32,4 (1,8)	10,7 (1,9)	10,1 (1,3)	10,1 (1,3)
Vazão (L.d <sup>-1</sup> )	1368 (0,0)	3078 (0,0)	3078 (0,0)	3078 (0,0)	3078 (0,0)	3078 (0,0)	1710 (0,0)

Fonte: O Autor (2020).

Contínua na próxima página

<b>Cargas Aplicadas</b>	<b>UASB (P1)</b>	<b>Mistura (P1m)</b>	<b>FAN (P2)</b>	<b>LA (P3)</b>	<b>BAS (P4)</b>	<b>Ef (P5)</b>	<b>Rec (P1r)</b>
	<b>Ie (RR = 1,50)</b>						
CO (g O <sub>2</sub> .d <sup>-1</sup> )	419,3 (20,9)	523,2 (37,2)	534,2 (17,1)	278,8 (34,2)	230,8 (33,2)	173,0 (32,9)	103,8 (19,8)
Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	306,5 (15,3)	153,0 (10,9)	156,2 (5,0)	81,5 (10,0)	67,5 (9,7)	50,6 (9,6)	50,6 (9,6)
Vazão (L.d <sup>-1</sup> )	1368 (0,0)	3420 (0,0)	3420 (0,0)	3420 (0,0)	3420 (0,0)	3420 (0,0)	2052 (0,0)
CN (g N.d <sup>-1</sup> )							
N-NTK	44,7 (1,3)	59,2 (6,4)	111,8 (3,4)	111,8 (3,4)	36,2 (14,2)	23,9 (10,0)	14,3 (6,0)
Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	32,7 (1,0)	17,3 (1,9)	32,7 (1,0)	32,7 (1,0)	10,6 (4,1)	7,0 (2,9)	7,0 (2,9)
Vazão (L.d <sup>-1</sup> )	1368 (0,0)	3420 (0,0)	3420 (0,0)	3420 (0,0)	3420 (0,0)	3420 (0,0)	2052 (0,0)
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	31,5 (1,0)	46,2 (5,9)	111,8 (3,4)	111,8 (3,4)	36,2 (14,2)	23,9 (10,0)	14,3 (6,0)
Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	23,0 (0,7)	13,5 (1,7)	32,7 (1,0)	32,7 (1,0)	10,6 (4,1)	7,0 (2,9)	7,0 (2,9)
Vazão (L.d <sup>-1</sup> )	1368 (0,0)	3420 (0,0)	3420 (0,0)	3420 (0,0)	3420 (0,0)	3420 (0,0)	2052 (0,0)
N-N <sub>ORG</sub>	13,2 (1,4)	13,0 (1,4)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	9,7 (1,0)	3,8 (0,4)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
Vazão (L.d <sup>-1</sup> )	1368 (0,0)	3420 (0,0)	3420 (0,0)	3420 (0,0)	3420 (0,0)	3420 (0,0)	2052 (0,0)
N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0,0 (0,0)	2,0 (0,4)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	2,4 (0,9)	3,4 (0,7)	2,1 (0,4)
Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	0,0 (0,0)	0,6 (0,1)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,7 (0,3)	1,0 (0,2)	1,0 (0,2)
Vazão (L.d <sup>-1</sup> )	1368 (0,0)	3420 (0,0)	3420 (0,0)	3420 (0,0)	3420 (0,0)	3420 (0,0)	2052 (0,0)
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0,0 (0,0)	5,4 (0,6)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	4,8 (1,1)	8,9 (0,9)	5,1 (0,6)
Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	0,0 (0,0)	1,6 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	1,4 (0,3)	2,5 (0,2)	2,5 (0,2)
Vazão (L.d <sup>-1</sup> )	1368 (0,0)	3420 (0,0)	3420 (0,0)	3420 (0,0)	3420 (0,0)	3420 (0,0)	2052 (0,0)
N-NT	44,7 (1,3)	66,6 (5,7)	111,8 (3,4)	111,8 (3,4)	43,4 (14,4)	36,2 (7,7)	21,5 (4,6)
Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	32,7 (1,0)	19,5 (1,7)	32,7 (1,0)	32,7 (1,0)	12,7 (4,2)	10,5 (2,3)	10,5 (2,1)
Vazão (L.d <sup>-1</sup> )	1368 (0,0)	3420 (0,0)	3420 (0,0)	3420 (0,0)	3420 (0,0)	3420 (0,0)	2052 (0,0)

Fonte: O Autor (2020).

**APÊNDICE E - Resultados das correlações por ACP entre as 8 variáveis estudadas para o desempenho do sistema de tratamento: DQO, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, OD, pH, ALCP, TEMP e SSV nas fases Ia, Ib, Ic, Id e Ie. **Em Vermelho** = Correlações acima de 0,5 para p<0,05**

Fase Ia (Recirculação de 0,50)								
Variável	DQO	N- NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	OD	pH	ALCP	TEMP	SSV
DQO	1,00	////////	////////	////////	////////	////////	////////	////////
N- NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	<b>0,91</b>	1,00	////////	////////	////////	////////	////////	////////
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	<b>-0,83</b>	<b>-0,80</b>	1,00	////////	////////	////////	////////	////////
OD	<b>-0,72</b>	<b>-0,73</b>	<b>0,85</b>	1,00	////////	////////	////////	////////
pH	<b>0,64</b>	<b>0,54</b>	<b>-0,50</b>	<b>0,80</b>	1,00	////////	////////	////////
ALCP	<b>0,73</b>	<b>0,61</b>	<b>-0,54</b>	<b>-0,28</b>	<b>0,58</b>	1,00	////////	////////
TEMP	<b>-0,48</b>	<b>-0,35</b>	<b>0,35</b>	<b>0,70</b>	<b>0,87</b>	<b>-0,70</b>	1,00	////////
SSV	<b>0,82</b>	<b>0,72</b>	<b>-0,67</b>	<b>-0,56</b>	<b>0,52</b>	0,43	0,38	1,00
Fase Ib (Recirculação de 0,75)								
Variável	DQO	N- NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	OD	pH	ALCP	TEMP	SSV
DQO	1,00	////////	////////	////////	////////	////////	////////	////////
N- NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	<b>0,82</b>	1,00	////////	////////	////////	////////	////////	////////
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	<b>-0,88</b>	<b>-0,86</b>	1,00	////////	////////	////////	////////	////////
OD	<b>-0,57</b>	<b>-0,36</b>	0,44	1,00	////////	////////	////////	////////
pH	0,17	0,42	<b>-0,14</b>	<b>0,77</b>	1,00	////////	////////	////////
ALCP	<b>0,80</b>	<b>0,87</b>	<b>-0,76</b>	<b>-0,38</b>	<b>0,53</b>	1,00	////////	////////
TEMP	<b>-0,63</b>	<b>-0,12</b>	0,22	<b>0,81</b>	<b>0,75</b>	<b>-0,18</b>	1,00	////////
SSV	<b>0,79</b>	<b>0,56</b>	<b>-0,72</b>	<b>-0,74</b>	<b>-0,80</b>	0,36	<b>-0,70</b>	1,00
Fase Ic (Recirculação de 1,00)								
Variável	DQO	N- NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	OD	pH	ALCP	TEMP	SSV
DQO	1,00	////////	////////	////////	////////	////////	////////	////////
N- NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	<b>0,55</b>	1,00	////////	////////	////////	////////	////////	////////
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	<b>-0,62</b>	<b>-0,72</b>	1,00	////////	////////	////////	////////	////////
OD	<b>-0,85</b>	<b>-0,57</b>	<b>0,73</b>	1,00	////////	////////	////////	////////
pH	<b>-0,31</b>	0,47	0,12	<b>0,87</b>	1,00	////////	////////	////////
ALCP	<b>-0,57</b>	0,07	0,21	0,42	0,19	1,00	////////	////////
TEMP	<b>-0,79</b>	<b>-0,30</b>	<b>0,67</b>	<b>0,83</b>	<b>0,74</b>	<b>0,55</b>	1,00	////////
SSV	<b>0,87</b>	0,04	<b>-0,84</b>	<b>-0,85</b>	<b>-0,79</b>	<b>0,51</b>	<b>-0,53</b>	1,00
Fase Id (Recirculação de 1,25)								
Variável	DQO	N- NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	OD	pH	ALCP	TEMP	SSV
DQO	1,00	////////	////////	////////	////////	////////	////////	////////
N- NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	<b>0,80</b>	1,00	////////	////////	////////	////////	////////	////////
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	<b>-0,70</b>	<b>-0,60</b>	1,00	////////	////////	////////	////////	////////
OD	<b>-0,20</b>	<b>-0,68</b>	<b>0,70</b>	1,00	////////	////////	////////	////////
pH	<b>-0,12</b>	<b>-0,58</b>	0,01	<b>0,82</b>	1,00	////////	////////	////////
ALCP	0,40	0,31	<b>-0,16</b>	0,09	<b>-0,15</b>	1,00	////////	////////
TEMP	<b>-0,62</b>	<b>-0,58</b>	<b>0,80</b>	<b>0,85</b>	<b>0,89</b>	0,07	1,00	////////
SSV	<b>0,81</b>	<b>0,90</b>	<b>-0,66</b>	<b>-0,82</b>	<b>-0,80</b>	0,28	<b>-0,67</b>	1,00
Fase Ie (Recirculação de 1,50)								
Variável	DQO	N- NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	OD	pH	ALCP	TEMP	SSV
DQO	1,00	////////	////////	////////	////////	////////	////////	////////
N- NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	<b>0,90</b>	1,00	////////	////////	////////	////////	////////	////////
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	<b>-0,81</b>	<b>-0,74</b>	1,00	////////	////////	////////	////////	////////
OD	0,20	<b>-0,67</b>	0,84	1,00	////////	////////	////////	////////
pH	<b>-0,19</b>	0,28	0,15	<b>0,75</b>	1,00	////////	////////	////////
ALCP	<b>0,55</b>	0,49	<b>-0,41</b>	0,02	<b>-0,05</b>	1,00	////////	////////
TEMP	<b>-0,48</b>	<b>-0,49</b>	<b>0,53</b>	<b>0,71</b>	<b>0,78</b>	0,07	1,00	////////
SSV	<b>0,87</b>	<b>0,75</b>	<b>-0,86</b>	<b>-0,80</b>	<b>-0,86</b>	<b>0,59</b>	<b>-0,53</b>	1,00

Fonte: O Autor (2020).

**APÊNDICE F - MEIO SUPORTE (conduítes) sem biomassa aderida (A), biomassa presente aderida no meio suporte na fase Ia (B); biomassa aderida no meio suporte na fase Ib (C)**



**Fonte: O Autor (2020).**

**APÊNDICE G – AUTOVALORES (*Eigenvalues*), proporção da variância explicada por componente e acumulada entre as componentes e as variáveis originais**

Componente principal	Autovalores (K)	Variância total (%)	Autovalores acumulativo	Variância acumulativa (%)
1	3,54	44,28	3,55	44,28
2	1,15	14,44	4,69	58,72
3	0,91	11,42	5,60	70,14
4	0,88	10,95	6,48	81,09
5	0,77	9,61	7,25	90,70
6	0,46	5,70	7,71	96,40
7	0,20	2,50	7,90	98,9
8	0,09	1,10	8,00	100,00

Fonte: O Autor (2020).

Value number	Eigenvalue	% Total variance	Cumulative Eigenvalue	Cumulative %
1	3.542185	44.27732	3.542185	44.2773
2	1.154977	14.43722	4.697163	58.7145
3	0.913534	11.41918	5.610697	70.1337
4	0.876054	10.95067	6.486751	81.0844
5	0.768659	9.60824	7.255410	90.6926
6	0.456130	5.70163	7.711540	96.3943
7	0.200223	2.50279	7.911764	98.8970
8	0.088236	1.10295	8.000000	100.0000

## Apêndice H - Testes ANOVA e Tukey para as variáveis DQO, SSV, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> e N-NT no efluente do RAE (P3)

DQO

ANOVAOneWay (26/06/2019 10:19:54)

Notes

Input Data

Descriptive Statistics

Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
FI	28,53333	3,88893	1,00412
FII	24,6	1,84391	0,4761
FIII	26,46667	5,09715	1,31608

One Way ANOVA

DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F	
Model	2	116,13333	58,06667	3,91419	0,02762
Error	42	623,06667	14,83492		
Total	44	739,2			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal  
Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different  
At the 0.05 level, the population means are significantly different.

Fit Statistics

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
0,15711	0,14516	3,85161	26,53333

Means Comparisons

Tukey Test

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
FI FI	-3,93333	1,40641	3,95516	0,02075	0,05	1	-7,3502	-0,51647
FII FI	-2,06667	1,40641	2,07813	0,31568	0,05	0	-5,48353	1,3502
FIII FI	1,86667	1,40641	1,87702	0,38827	0,05	0	-1,5502	5,28353

Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0.05 level.  
Sig equals 0 indicates that the means difference is not significant at the 0.05 level.

SSV

ANOVAOneWay (13/01/2020 14:36:36)

Notes

Input Data

Descriptive Statistics

Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean	
FI	15	9,8	3,62925	0,93707
FII	15	5,8	1,32017	0,34087
FIII	15	7,93333	4,78788	1,23623

One Way ANOVA

DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F	
Model	2	120,17778	60,08889	4,76416	0,01365
Error	42	529,73333	12,6127		
Total	44	649,91111			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal  
Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different  
At the 0.05 level, the population means are significantly different.

Fit Statistics

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
0,18491	0,45273	3,55144	7,84444

Means Comparisons

Tukey Test

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
FI FI	-4	1,2968	4,36216	0,00986	0,05	1	-7,15057	-0,84943
FII FI	-1,86667	1,2968	2,03567	0,33029	0,05	0	-5,01724	1,2839
FIII FI	2,13333	1,2968	2,32649	0,23838	0,05	0	-1,01724	5,2839

Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0.05 level.

N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

ANOVAOneWay (13/01/2020 13:13:04)

Notes

Input Data

Descriptive Statistics

Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean	
FI	15	5,80533	1,2611	0,32561
FII	15	2,54128	0,54771	0,14142
FIII	15	2,23067	1,01909	0,26313

One Way ANOVA

DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F	
Model	2	117,64383	58,82192	60,25009	4,57412E-13
Error	42	41,00443	0,9763		
Total	44	158,64826			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal  
Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different  
At the 0.05 level, the population means are significantly different.

Fit Statistics

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
0,74154	0,28025	0,98808	3,52576

Means Comparisons

Tukey Test

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
FI FI	-3,26405	0,36079	12,79417	0	0,05	1	-4,1406	-2,38751
FII FI	-3,57467	0,36079	14,01169	0	0,05	1	-4,45121	-2,69812
FIII FI	-0,31061	0,36079	1,21752	0,6676	0,05	0	-1,18716	0,56593

Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0.05 level.

N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>

ANOVAOneWay (03/07/2019 08:48:15)

Notes

Input Data

Descriptive Statistics

Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean	
FI	15	1,426	0,16517	0,04265
FII	15	6,09653	2,92552	0,75537
FIII	15	9,82	1,25596	0,32429

One Way ANOVA

DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F	
Model	2	530,68661	265,3433	78,32349	6,77236E-15
Error	42	142,28705	3,38779		
Total	44	672,97366			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal  
Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different  
At the 0.05 level, the population means are significantly different.

Fit Statistics

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
0,78857	0,3184	1,84059	5,78084

Means Comparisons

Tukey Test

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
FI FI	4,67053	0,67209	9,82775	0	0,05	1	3,0377	6,30337
FII FI	8,394	0,67209	17,66268	0	0,05	1	6,76116	10,02684
FIII FI	3,72347	0,67209	7,83493	5,31185E-6	0,05	1	2,09063	5,3563

Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0.05 level.

N-NT

ANOVAOneWay (02/07/2019 11:51:15)

Notes

Input Data

Descriptive Statistics

Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean	
FI	15	14,368	1,28364	0,33143
FII	15	13,35381	0,90162	0,2328
FIII	15	12,88353	0,54436	0,14055

One Way ANOVA

DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F	
Model	2	17,2669	8,63345	9,39451	4,24529E-4
Error	42	38,59752	0,91899		
Total	44	55,86442			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal  
Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different  
At the 0.05 level, the population means are significantly different.

Fit Statistics

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
0,30909	0,07083	0,95864	13,53512

Means Comparisons

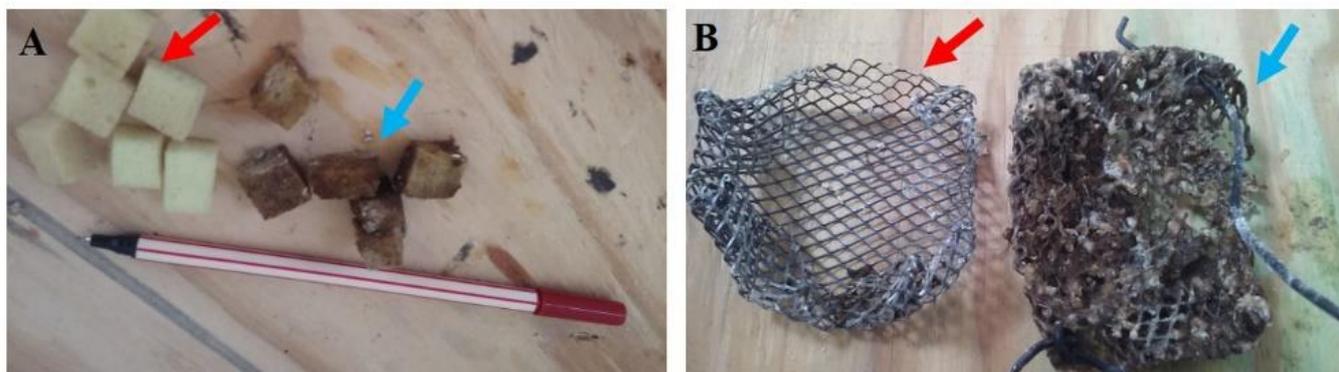
Tukey Test

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
FI FI	-1,01419	0,35005	4,0974	0,01608	0,05	1	-1,86462	-0,16375
FII FI	-1,48447	0,35005	5,99737	3,46148E-4	0,05	1	-2,3349	-0,63403
FIII FI	-0,47028	0,35005	1,89997	0,37957	0,05	0	-1,32071	0,38015

Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0.05 level.

Fonte: O autor (2020)

**APÊNDICE I - MEIO SUPORTE (espuma de poliuretano) sem biomassa (seta vermelha) e biomassa aderida presente no meio suporte (seta azul) (A), rede de aço galvanizada antes da operação (seta vermelha) e rede de aço galvanizado após a operação (seta azul)**



Fonte: O Autor (2020).

**APÊNDICE J - Autovalores proporção da variância explicada por componente e acumulada entre os componentes e as variáveis originais**

<b>Componente principal</b>	<b>Autovalores (K)</b>	<b>Variância total (%)</b>	<b>Autovalores acumulativo</b>	<b>Variância acumulativa (%)</b>
1	4,83	53,74	4,83	53,74
2	2,26	25,21	7,09	78,95
3	0,80	8,84	7,89	87,79
4	0,64	7,08	8,53	94,87
5	0,21	2,32	8,74	97,19
6	0,15	1,65	8,89	98,84
7	0,08	0,83	8,97	99,67
8	0,02	0,21	8,99	99,88
9	0,0	0,12	9,00	100,00

Fonte: O Autor (2020).