

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA**

**ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO LODO ANAMMOX EM
REATORES ALIMENTADOS COM EFLUENTE DA SUINOCULTURA**

JADIANE PAOLA CAVALER

**CASCAVEL – PR
DEZEMBRO
2024**

JADIANE PAOLA CAVALER

**ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO LODO ANAMMOX EM
REATORES ALIMENTADOS COM EFLUENTE DA SUINOCULTURA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola em cumprimento parcial aos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Engenharia Agrícola, área de concentração em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Airton Kunz

Coorientadora: Prof. Dra. Marina C. De Prá

**CASCADEL
2024**

FICHA CATALOGRÁFICA¹

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Cavaler, Jadiane Paola
ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO LODO ANAMMOX EM
REATORES ALIMENTADOS COM EFLUENTE DA SUINOCULTURA / Jadiane
Paola Cavaler; orientador Airton Kunz; coorientadora Marina
Celant De Prá . -- Cascavel, 2024.
93 p.

Tese (Doutorado Campus de Cascavel) -- Universidade
Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Exatas e
Tecnológicas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Agrícola, 2024.

1. Processo Anammox. 2. Remoção Biológica de Nitrogênio.
3. Tratamento do Digestato. 4. Dejetos da Suinocultura. I.
Kunz, Airton, orient. II. Celant De Prá, Marina, coorient.
III. Título.

¹ Revisão de português, inglês e de normas realizada por Silvana de Araújo Vaillões, em 20 de fevereiro de 2025.



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Reitoria

CNPJ 78.680.337/0001-84

Rua Universitária, 1619, Jardim

Universitário Tel.: (45) 3220-3000 -

www.unioeste.br

CEP: 85819-110 - Cx. P.: 701

Cascavel - PARANÁ



JADIANE PAOLA CAVALER

ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LODO ANAMMOX ENRIQUECIDO COM EFLUENTES DA SUINOCULTURA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Doutora em Engenharia Agrícola, área de concentração Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, linha de pesquisa Saneamento Ambiental, APROVADA pela seguinte banca examinadora:

Documento assinado digitalmente



AIRTON KUNZ

Data: 13/12/2024 17:39:30-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Orientador - Airtun Kunz

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

Documento assinado digitalmente



MARINA CELANT DE PRA

Data: 19/12/2024 14:48:23-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Coorientadora - Marina Celant de Prá
Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)

Documento assinado digitalmente



THEO SYRTO OCTAVIO DE SOUZA

Data: 16/12/2024 14:30:10-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Theo Syrto Octavio de Souza
Universidade de São Paulo (USP)

Documento assinado digitalmente



JULIANA CALABRIA DE ARAUJO

Data: 16/12/2024 10:43:39-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Juliana Calabria de Araújo
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

Documento assinado digitalmente



JACKELINE TATIANE GOTARDO

Data: 18/12/2024 08:57:44-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Jackeline Tatiane Gotardo
Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

Documento assinado digitalmente



SIMONE DAMASCENO GOMES

Data: 19/12/2024 10:35:09-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Simone Damasceno Gomes
Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)
Cascavel, 13 de dezembro de 2024.

BIOGRAFIA

Nascida em 15 de dezembro de 1994, na cidade de Foz do Iguaçu, Paraná. Em 2018, concluiu o curso de Engenharia Ambiental pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Medianeira. No mesmo ano, iniciou sua carreira como auxiliar de engenharia em uma empresa de consultoria voltada para meio ambiente, saúde e segurança do trabalho.

Em 2021, obteve o título de mestra em Tecnologias Ambientais pela UTFPR, Campus Medianeira, e concluiu uma pós-graduação em Engenharia de Segurança do Trabalho pela Universidade Cruzeiro do Sul. Atualmente, cursa o doutorado no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola (PGEAGRI) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), na área de concentração de Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental (RHESA), sendo bolsista do programa de Doutorado Acadêmico para Inovação (DAI) - CNPq.

Além de suas atividades acadêmicas, atua como Diretora de Comunicação na Sociedade Brasileira dos Especialistas em Resíduos Agropecuários e Agroindustriais (SBERA) e como Coordenadora de Engajamento na Rede de Mulheres do Biogás, contribuindo para o fortalecimento do setor, a equidade de gênero e o engajamento de profissionais na temática de sustentabilidade e gestão ambiental.

“O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém”.
(Dalai Lama)

“Eu erro muito, porque tudo o que faço nunca tinha feito antes”.
(Guto Lacaz)

“Depois do medo, vem o mundo”.
(Clarice Lispector)

“Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o SENHOR, o seu Deus, estará com você por onde você andar”.
(Josué 1:9)

AGRADECIMENTOS

Confesso, nestas primeiras linhas, que este foi o primeiro arquivo que escrevi para a tese. O doutorado é uma etapa extremamente solitária, e reconhecer aqueles que ousaram e insistiram em estar ao meu lado é mais do que motivo suficiente para estarem descritos nestas páginas.

Muito além dos aspectos técnicos desta pesquisa, esta seção é uma das mais importantes para mim. A gratidão nunca me foi difícil; pelo contrário, é essa gratidão por tudo o que Deus faz em minha vida que me trouxe até aqui, no momento de me tornar doutora. Começo, portanto, agradecendo a Ele, que me enviou sinais divinos e sussurros ao ouvido, dizendo sempre: "Vai dar certo, você vai conseguir, confia." Obrigada, meu Deus, por exatamente tudo, inclusive pelas provações, que me tornaram "forte e corajosa," como Ele sempre me lembrava por meio daquele versículo que aparecia quando tudo parecia dar errado.

Pai Joercio, mãe Genice, minha irmã Giovanna: nós conseguimos. Só nós sabemos o quanto essa trajetória foi difícil, principalmente pelos 600 quilômetros de distância e pela ausência em momentos importantes. Obrigada por me apoiarem e por sempre, sempre acreditarem em mim. Sou grata pela integridade e por tudo o que vocês me ensinaram. Vó Madalena, obrigada pelo amor incondicional e por todo o apoio – e pelos "dinheirinhos" escondidos nas despedidas, que salvaram alguns lanchinhos nas viagens de volta para casa. Eu amo vocês infinitamente; Deus não poderia ter me presenteado com família melhor neste plano.

Daniel, falar sobre o quanto você é importante para mim seria clichê demais aqui, não é mesmo? Agradeço diariamente a Deus e aos anjos do cupido por terem cruzado nossos caminhos. Teu apoio, palavras de conforto e colo nos momentos de aflição foram imprescindíveis. Te amo, e amo nossa pequena família (eu, você e as felinas, Pantera e Serena).

Deus também me enviou anjos em forma de amigos. Leandro e Daiane, obrigada pelos bons e memoráveis momentos juntos. Waleska e Maria Luiza, vocês foram grandes presentes que a Rede Mulheres do Biogás me proporcionou; sou muito feliz e grata por essa conexão de almas.

Meu orientador Airton Kunz, obrigada pela orientação e pela oportunidade de vivenciar a pesquisa científica de forma tão intensa e emocionante. Marina De Prá, minha coorientadora e, ainda melhor, minha conselheira: no momento mais crítico da minha vida acadêmica, você segurou minha mão e a barra junto comigo, me levantou e me fez continuar. Obrigada! Se não fosse por você, naquele momento, talvez, eu não chegaria até esta tese. A vocês dois, meu carinho e admiração por todos os ensinamentos, profissionais e pessoais. Obrigada.

Fabiane, minha grande inspiração. Obrigada por todos os conselhos, por revisar meus artigos e trabalhos para congresso com tanta maestria. Obrigada por sempre me mostrar o “copo meio cheio” e, muito além disso, por acreditar no meu potencial, especialmente nos momentos em que eu mesma não acreditava.

Aos meus colegas de pesquisa, afinal, os “et al.” trabalham muito nos bastidores: Éverton Rocha, Jaqueline Bohrer, Victor Vaz, Gabriel Dobrachinski, Carol Rucks, William Mioranza, Rubia Mores, João Fernando Ferri, Deisi Tapparo, Camila Hollas, Gabriela Bonassa. Obrigada por todos os bons momentos, apoio e conselhos! Vocês são incríveis.

À Embrapa Suínos e Aves, pelo espaço, e a todos os colaboradores, especialmente os da Estação de Tratamento de Dejetos Suínos (ETDS), da manutenção, do Laboratório de Análises e Experimentação Ambiental (LEAA), aos motoristas e aos vigilantes, que, muitas vezes, salvaram nossos experimentos durante as madrugadas. Não citarei nomes, pois seria injusto esquecer alguém.

À UNIOESTE e ao PGEAGRI, pela oportunidade de me tornar doutora em um programa de tanta excelência e em uma universidade pública e de qualidade. À Tatiana, secretária do PGEAGRI, pela prontidão e auxílio em todas as etapas até aqui. Obrigada Tati! Tens a minha admiração.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa pelo programa de Doutorado Acadêmico para Inovação (DAI), e à Kemia Tratamento de Efluentes, em especial, ao Rafael Celuppi pela parceria e todo o auxílio neste projeto.

Por fim, a todos que, de alguma forma, me auxiliaram a elaborar este estudo, desde os pequenos aos grandes feitos, MUITO OBRIGADA!!!!

Cavaler, Jadiane Paola. **Estudo das características morfológicas do lodo anammox em reatores alimentados com efluente da suinocultura**. Orientador: Airton Kunz; Coorientadora: Marina Celant De Prá. 2025. 93 f. - Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2025.

RESUMO

A produção suinícola é uma das principais cadeias agropecuárias do Brasil, com grande impacto econômico e social. Com o aumento da demanda global por proteína animal, a produção intensiva tornou-se mais comum, proporcionando maior produtividade e controle sanitário rigoroso, mas também gerando grandes volumes de dejetos, ricos em nitrogênio amoniacal. Para o tratamento desses efluentes, a digestão anaeróbia (DA) é amplamente utilizada, mas o digestato gerado ainda apresenta altas concentrações de nitrogênio, o que exige processos adicionais para sua remoção eficiente. O processo anammox e suas variações, como a desamonificação, têm sido investigados como alternativas eficazes para a remoção de nitrogênio em efluentes com altas cargas amoniacais. No entanto, a implementação desses processos enfrenta desafios, a exemplo da necessidade de se obter e manter as bactérias anammox (AnAOB), que possuem uma taxa de crescimento relativamente baixa. Este estudo teve como objetivo avaliar a formação, estabilidade e granulação do lodo anammox em sistemas alimentados com efluente real proveniente da digestão anaeróbia de resíduos suínocolas, por meio da investigação do impacto de (a) suplementação de nitrito e (b) o papel dos consórcios microbiológicos, em escala de bancada e piloto. Os resultados mostraram que o sistema Anammox em escala de bancada apresentou uma eficiência média de remoção de nitrogênio de 85%, com uma capacidade máxima de consumo de nitrogênio amoniacal (CNA) de $2,32 \text{ kg N m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Em contraste, o sistema de desamonificação demonstrou um desempenho superior, com uma CNA máxima de $5,79 \text{ kg N m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ e eficiência de remoção de nitrogênio (ERN) de 82%. A análise das substâncias poliméricas extracelulares (SPE) revelou que a relação entre proteínas, bem como polissacarídeos (PN/PS) foi fundamental para a estabilidade, além da formação dos grânulos e biofilmes, sendo mais estável no sistema de desamonificação, que apresentou maior resiliência a variações de carga. Na escala piloto, o sistema Anammox alcançou 72% de ERN e $2,66 \pm 0,27 \text{ kg N m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ de CNA. Este estudo confirmou a hipótese de que os consórcios anammox (AnAOB e BOA) contribuem para uma maior resiliência do processo a variações de carga, promovendo um desempenho mais estável a longo prazo. Além disso, a suplementação de nitrito foi eficaz na manutenção do processo Anammox, embora a presença de consórcios microbiológicos tenha sido crucial para a obtenção de melhores resultados, como no sistema de desamonificação. A formação de grânulos anammox e a estabilidade do sistema estão diretamente relacionadas à quantidade e composição das substâncias poliméricas extracelulares excretadas, que contribuem para a resistência mecânica dos grânulos e biofilmes.

Palavras-chave: Anammox. Grânulos. Morfologia. Remoção de nitrogênio. Digestato. Efluentes suínocolas.

Cavaler, Jadiane Paola. **Study of the morphological characteristics of anammox sludge in reactors fed with swine wastewater.** Advisor: Airton Kunz; Co-advisor: Marina Celant De Prá. 2025. 93 p. - Thesis (Doctorate in Agricultural Engineering) - Postgraduate Program in Agricultural Engineering, Western Paraná State University, Cascavel, 2025.

ABSTRACT

Swine production is one of the leading agricultural chains in Brazil, and it has a significant economic and social impact. With the increase in global demand for animal protein, intensive production has become more common, providing greater productivity and strict sanitary control and generating large volumes of waste rich in ammoniacal nitrogen. Anaerobic digestion (AD) is widely used to treat this wastewater, but the digestate generated still has high concentrations of nitrogen, which requires additional processes to remove it efficiently. The anammox process and its variations, such as deammonification, have been investigated as effective alternatives for removing nitrogen from effluents with high ammonia loads. However, implementing these processes faces challenges, such as obtaining and maintaining anammox bacteria (AnAOB), which have a relatively low growth rate. This study aimed to evaluate the formation, stability, and granulation of anammox sludge in systems fed with real wastewater from the anaerobic digestion of pig waste by investigating the impact of (a) nitrite supplementation and (b) the role of microbiological consortia on a bench and pilot scale. The results showed that the bench-scale Anammox system had an average nitrogen removal efficiency of 85%, with a maximum ammonia nitrogen consumption (ANC) capacity of 2.32 kgN m⁻³ d⁻¹. In contrast, the deammonification system performed better, with a maximum ANC of 5.79 kg N m⁻³ d⁻¹ and a nitrogen removal efficiency (NRE) of 82%. Analysis of the extracellular polymeric substances (EPS) revealed that the ratio of proteins to polysaccharides (PN/PS) was fundamental to stability, as well as the formation of granules and biofilms, being more stable in the deammonification system, which showed greater resilience to load variations. On a pilot scale, the Anammox system achieved 72% NRE and 2.66 ± 0.27 kg N m⁻³ d⁻¹ of ANC. This study confirmed the hypothesis that anammox consortia (AnAOB and AOB) contribute to greater process resilience to load variations, promoting more stable performance in the long term. In addition, nitrite supplementation effectively maintained the Anammox process, although microbiological consortia were crucial for obtaining better results, as in the deammonification system. The formation of anammox granules and the system's stability are directly related to the quantity and composition of the extracellular polymeric substances excreted, which contribute to the mechanical resistance of the granules and biofilms.

Keywords: Anammox. Granules. Morphology. Nitrogen removal. Digestate. Swine wastewater.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivos Gerais	19
3. REFERENCIAL TEÓRICO	20
3.1. Desafios Ambientais Associados aos Resíduos Suinícolas	20
3.2. Nitrogênio: Ciclo e Impactos Ambientais.....	21
3.3. Remoção Biológica de Nitrogênio.....	23
3.4. Processo Anammox.....	24
3.5. Configuração de Reatores.....	26
3.6. Estado da Arte: Processos e Mecanismos Envolvidos na Formação e Estruturação dos Grânulos de Lodo Anammox.....	28
4. REFERÊNCIAS	31
5. ARTIGO 1: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E DESEMPENHO DE BACTÉRIAS ANAMMOX EM UM REATOR DE ESCALA PILOTO PARA O TRATAMENTO DE DIGESTATO DA SUINOCULTURA	37
5.1. Introdução	37
5.2. Materiais e Métodos	39
5.2.1. Sistema experimental e operação.....	39
5.2.2. Módulo 1 (M1): Preparação do Efluente	39
5.2.3. Módulo 2 (M2): Mistura, Aquecimento e Reator Anammox	40
5.2.4. Fonte de Inóculo.....	41
5.2.5. Caracterização do digestato	42
5.2.6. Métodos Analíticos.....	42
5.2.7. Cálculo dos Coeficientes Estequiométricos	43
5.2.8. Distribuição Granulométrica.....	43
5.2.9. Extração do DNA, quantificação das bibliotecas e sequenciamento	43
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.3.1. Comportamento e desempenho de remoção de Nitrogênio	44
5.3.5. Coeficientes Estequiométricos.....	46
5.3.6. Distribuição granulométrica e Atividade do lodo anammox	48
5.3.7. Comunidade microbiana	51
5.4. Conclusão	54
5.5. Referências	55
APENDICE A.....	59

6. ARTIGO 2: INFLUÊNCIA DO CONSORCIO MICROBIANO NA ESTABILIDADE E FORMAÇÃO DE GRÂNULOS ANAMMOX: DESAFIOS PARA A IMPLEMENTAÇÃO EM ESCALA REAL.	62
6.1. Introdução:	62
6.2. Materiais e métodos	63
6.2.1. Sistema Experimental e Operação	63
6.2.2. Fonte de Inóculo	65
6.2.3. Caracterização do digestato	65
6.2.4. Métodos analíticos	65
6.2.5. Cálculo dos Coeficientes estequiométricos	66
6.2.6. Distribuição granulométrica	67
6.2.7. Substâncias poliméricas extracelulares (SPE)	67
6.2.8. Quantificação de genes de bactérias do ciclo do nitrogênio por qPCR	68
6.2.9. Metodologia de Sequenciamento e Análise das Comunidades Microbianas	69
6.3. Resultados e discussão	70
6.3.1. Desempenho da Remoção de N	70
6.3.2. Coeficientes estequiométricos	72
6.3.3. Distribuição granulométrica	74
6.3.4. Substâncias Poliméricas Extracelulares (SPE)	78
6.3.5. Comunidade microbiana	80
6.4. Conclusão	84
6.5. Referências	85
7. CONCLUSÕES GERAIS	91
8. PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS	93

LISTA DE FIGURAS

Figura 3-1 Representação esquemática das reações envolvidas no ciclo do nitrogênio. Fonte: Adaptado de Bonassa et al., 2021a.	22
Figura 3-2 Comparativo entre os métodos autotróficos e convencionais para remoção de N quanto ao uso de aeração e de fontes de carbono para funcionamento do processo. Fonte: Adaptado de Trinh et al., (2021).....	24
Figura 3-3 Ilustração esquemática de (a) uma bactéria anammox (AB) mostrando a via bioquímica anammox. Adaptado de (Srivastava et al., 2024).....	25
Figura 3-4 Representação esquemática de fluxo no reator: (a) leito fixo, (b) leito expandido, (c) leito suspenso, (d) leito fluidizado. Adaptado de Zheng et al., 2021.....	27
Figura 3-5 Formação do lodo granular anammox. Adaptado de Manonmani; Joseph, 2018. Grânulos do Tipo I são formados a partir da inoculação de reatores com lodos anammox já granulares, e Tipo II quando há a utilização de um lodo que possui células anammox.	28
Figura 5-1 Preparo do efluente para alimentação dos reatores em operação na estação de tratamento, onde: a) Reator UASB; b) Sistema verticalizado (vista frontal do sistema na imagem a direita); c) Tanque pulmão de digestato diluído.....	40
Figura 5-2 Reator anammox em operação. Onde: a) sistema de alimentação; b) dosagem de nitrito; c) sistema de aquecimento; d) reator de fluxo ascendente e) saída do sistema.	41
Figura 5-3 Cargas de Nitrogênio Aplicadas (CNA) e Eficiência de Remoção de Nitrogênio (ERN) durante os 700 dias de operação.	45
Figura 5-4 Coeficientes estequiométricos teóricos comparados aos coeficientes calculados durante os 700 dias de operação do reator.	47
Figura 5-5 Distribuição granulométrica dos dias 50, 100, 150, 200 e 421 do reator.	49
Figura 5-6 Distribuição granulométrica dos dias 495, 526 e 700 do reator.	50
Figura 5-7 Abundância relativa dos microrganismos por filo durante os dias 495, 700 e no inóculo (D0).	51
Figura 5-8 Abundância relativa dos microrganismos por gênero durante os dias 0, 495 e 700 de operação do sistema. Vermelho indica maior abundância e verde menor abundância.	53
Figura 6-1 Reatores RA e RD em operação, onde: a) a bomba peristáltica realiza a alimentação do reator RA; b) Reator RA em operação em banho aquecido a 35°C; c) RD operando em banho aquecido a 35°C; d) Decantador do reator RD; e) Bomba de recirculação do reator RD.....	64
Figura 6-2 Carga de Nitrogênio Aplicadas durante os 260 dias de operação de RA e RD e eficiências de remoção de nitrogênio (ERN).	70
Figura 6-3 Coeficientes estequiométricos teóricos comparados aos coeficientes calculados durante os 260 dias de operação.....	73

Figura 6-4 Distribuição granulométrica inicial do lodo anammox utilizado para inoculação dos reatores RA e RD no dia 0.	75
Figura 6-5 Distribuição granulométrica dos reatores RA e RD nos dias 30, 135 e 260 de operação.....	76
Figura 6-6 Características do lodo dos reatores em T0 (a) e RA (b) e RD (c) após 260 dias de operação.....	77
Figura 6-7 Conteúdo de SPE durante a operação dos reatores RA (a) e RD (b).....	79
Figura 6-8 Abundâncias relativas por filo encontradas na metagenômica de amostras dos tempos 0 e 260 de RA e RD.	80
Figura 6-9 Abundância dos genes de bactérias do ciclo do nitrogênio realizados por q-PCR em amoA (a) e nosZ (b).	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 6-1 Iniciadores utilizados na técnica de qPCR.	69
Tabela 6-2 Atividades específicas de consumo de substrato ao longo dos 260 dias de operação.....	72

1. INTRODUÇÃO

A suinocultura configura-se como uma das cadeias produtivas mais relevantes da agropecuária global, apresentando um crescimento anual de 2,1% no contexto mundial. O Brasil ocupa o quarto lugar como maior fornecedor global de carne suína, o que contribui de forma expressiva para a geração de empregos, fortalecimento da agricultura familiar, desenvolvimento de agroindústrias e incremento da renda no setor. Contudo, o crescimento dessa atividade econômica tem gerado preocupações ambientais significativas, especialmente no que diz respeito à gestão dos resíduos, que podem causar contaminação de águas superficiais e subterrâneas.

Entre as tecnologias desenvolvidas para mitigar os impactos ambientais dos resíduos suínos, destaca-se a digestão anaeróbia, amplamente utilizada para a remoção de matéria orgânica. Esse processo resulta na produção de digestato, uma fração líquida com baixa relação carbono/nitrogênio (C/N) (Jaramillo *et al.*, 2018). Embora o digestato possa ser aproveitado como biofertilizante devido ao seu elevado teor de nutrientes (Hollas *et al.*, 2019), seu uso enfrenta limitações, como a necessidade de aplicações sazonais e as restrições agronômicas impostas pelos balanços de nutrientes do solo, sobretudo em regiões com alta densidade pecuária.

Entre os componentes dos resíduos suínos, o nitrogênio destaca-se como uma das principais preocupações ambientais, diante de sua elevada concentração e potencial poluidor. O excesso de nitrogênio em corpos hídricos pode desencadear processos de eutrofização, prejudicando ecossistemas aquáticos, além de representar riscos à saúde pública, como a contaminação de mananciais (Chini *et al.*, 2016). Adicionalmente, o nitrogênio contribui para a formação de gases de efeito estufa (GEE) e para a poluição atmosférica (Tao *et al.*, 2024).

Nesse cenário, a busca por tecnologias economicamente viáveis e ambientalmente sustentáveis para a remoção de nitrogênio torna-se crucial. Dentre as alternativas mais promissoras, o processo anammox (oxidação anaeróbia do amônio) tem se destacado devido às suas diversas vantagens em comparação aos processos convencionais de nitrificação e desnitrificação, principalmente pela vantagem de não necessitar de carbono orgânico para suas sínteses metabólicas (Chen; Guo; Li, 2022). As bactérias anammox utilizam nitrito (NO_2^-) como aceptor de elétrons, convertendo amônio (NH_4^+) em nitrogênio gasoso (N_2), sem a necessidade de carbono orgânico ou de aeração.

Processos combinados, como a desamonificação, que integra a anammox com a nitrificação parcial, têm atraído crescente atenção devido à sua eficiência em termos de economia de energia e recursos. Esse mecanismo autotrófico de remoção de nitrogênio

pode reduzir em até 60% o consumo de oxigênio, 50% a necessidade de alcalinidade e 100% o uso de fontes de carbono orgânico, sendo, portanto, uma solução viável para o tratamento de efluentes com baixa relação C/N, como o digestato da suinocultura (Cao; Van Loosdrecht; Daigger, 2017).

Embora as bactérias anammox sejam essenciais no ciclo global do nitrogênio, sua aplicação prática enfrenta desafios significativos (Zhang *et al.*, 2019). Diversos processos já foram testados em escala laboratorial e piloto, como CANON (processos de remoção autotrófica de nitrogênio sobre nitrito) (Liu *et al.*, 2021), NITRAMMOX (Bonassa *et al.*, 2022), nitrificação parcial e anammox de estágio único (desamonificação) (Al-Hazmi *et al.*, 2022) e desnitrificação parcial/anammox (Du *et al.*, 2019). No entanto, todos esses métodos ainda enfrentam obstáculos para serem aplicados em larga escala, devido à manutenção de um fornecimento estável de NO_2^- com controle assíduo de parâmetros do processo, como a aeração e o pH, e a necessidade de obtenção de quantidades significativas de lodo anammox para a inicialização dos sistemas anammox.

Isso se deve à alta sensibilidade dessas bactérias a determinadas condições ambientais, à dificuldade em aumentar o volume de lodo devido às suas taxas de crescimento lentas e à complexidade na retenção de biomassa nos sistemas de tratamento. Esses fatores exigem a implementação de estratégias específicas para prolongar o tempo de retenção de lodo (TRL) nos reatores, visando ao aumento gradual da biomassa e, conseqüentemente, à estabilidade do processo.

Apesar de seu potencial, a aplicação do processo anammox em larga escala enfrenta desafios significativos, como a manutenção de um fornecimento estável de nitrito (NO_2^-), o controle das condições ambientais necessárias para o cultivo de bactérias anaeróbias oxidantes de amônio (AnAOB) (Zhang *et al.*, 2022)

Uma das estratégias mais promissoras para superar esses desafios é a formação de grânulos e anammox, que possibilita uma melhor retenção de biomassa, maior resistência ao cisalhamento hidrodinâmico e uma transferência de massa mais eficiente nos reatores. Esses benefícios podem reduzir significativamente o tempo de duplicação das bactérias anammox e aumentar a viabilidade do processo em escala industrial (Xue *et al.*, 2022) .

Além disso, fatores sinérgicos de cooperação microbológica desempenham um papel essencial em sistemas que promovem a formação de biofilmes estruturados. Esses biofilmes são compostos por agregados microbianos que, além de melhorar a retenção, protegem microrganismos de crescimento lento, como bactérias anammox (AnAOB) e bactérias oxidantes de amônia (BOA). Evidências indicam que a coexistência de AOB com arqueas oxidantes de amônia (AOA) podem contribuir para o

enriquecimento de AnAOB, promovendo maior estabilidade nos consórcios microbianos e otimizando o desempenho do processo.

Diante dessas considerações, esta tese teve como objetivo principal investigar as características morfológicas do lodo anammox, além de seu desenvolvimento e desempenho em reatores alimentados com digestato da suinocultura. A pesquisa foi organizada em dois artigos científicos, compondo dois capítulos e uma conclusão: o primeiro artigo aborda a caracterização morfológica e a avaliação do desempenho de um reator de escala piloto, enquanto, no segundo artigo, foi estudada a influência do consórcio microbiano sobre a estabilidade e formação de grânulos anammox, considerando os desafios para a implementação em escala real. Todas as etapas envolvidas neste trabalho – da concepção da ideia aos resultados obtidos – foram embasadas nas seguintes hipóteses:

Hipótese 1: Sistemas anammox suplementados com nitrito apresentam boa eficiência na remoção de nitrogênio e podem ser utilizados para uma possível produção de lodo anammox.

Hipótese 2: Consórcios anammox (AnAOB e BOA) contribuem para uma maior resiliência do processo a variações de carga, promovendo um desempenho mais estável a longo prazo. Além disso, a quantidade e composição das substâncias poliméricas extracelulares excretadas variam conforme o tipo de sistema operado (com ou sem BOA) e têm um papel determinante na formação e estabilidade dos grânulos, conferindo maior resistência mecânica ao lodo anammox.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Avaliar o processo de formação, estabilidade e granulação do lodo anammox em sistemas alimentados com efluente real, investigando a influência de consórcios microbianos que envolvem bactérias anammox (AnAOB) e oxidantes de amônia (BOA), bem como o impacto da suplementação de nitrito no desempenho do lodo em condição piloto e escala de bancada.

2.2. Objetivos Específicos:

1. Caracterizar morfologicamente o lodo anammox em diferentes estágios de operação, avaliando os fatores que influenciam a formação e maturação de grânulos em sistemas alimentados com efluente real.
2. Investigar o papel das Substâncias Poliméricas Extracelulares (SPE) na formação, estabilidade e resistência mecânica do lodo anammox em reatores operados sob diferentes condições.
3. Comparar a eficiência de remoção de nitrogênio em reatores submetidos a diferentes estratégias operacionais, como a suplementação de nitrito e a interação com bactérias oxidantes de amônia (AOB).

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Desafios Ambientais Associados aos Resíduos Suinícolas

A pecuária desempenha um papel essencial no abastecimento e na segurança alimentar global, sendo responsável por 34% da proteína consumida mundialmente, proveniente de carnes, leite e ovos. O Brasil ocupa a posição de quarto maior fornecedor mundial, com uma produção anual de 5,156 milhões de toneladas, em 2023, sendo os estados de Santa Catarina (54,6%), Rio Grande do Sul (23,1%) e Paraná (14,0%) os maiores produtores nacionais (ABPA, 2024).

A suinocultura, contudo, gera consideráveis volumes de resíduos, especialmente dejetos suínos e efluentes de abatedouros, ricos em matéria orgânica e nutrientes, como nitrogênio (N) e fósforo (P). A composição desses resíduos varia conforme o estágio de crescimento dos animais, condições ambientais, tempo de armazenamento e consumo de água, tanto pelos animais quanto nos processos de limpeza das instalações (Zubair *et al.*, 2020). Em média, um suíno com peso aproximado de 90 kg pode produzir 2,9 kg de dejetos diariamente (Kunz, 2006). No caso dos abatedouros, os efluentes apresentam elevadas concentrações de proteínas, lipídios, fibras e carboidratos, cuja composição é influenciada pelo porte das instalações, número de animais abatidos e volume de água utilizada nos processos (Aziz *et al.*, 2019).

A intensificação da suinocultura em sistemas de confinamento está associada a emissões significativas de gases de efeito estufa, como metano (CH₄) e dióxido de carbono (CO₂), além de compostos, como amônia (NH₃), sulfeto de hidrogênio (H₂S) e ácidos voláteis (Kunz, 2006). Embora o esterco suinícola seja amplamente utilizado como fertilizante agrícola devido à sua elevada carga de matéria orgânica e nutrientes, a saturação do solo em regiões de alta densidade pecuária limita essa prática. Esse cenário demanda a implementação de tecnologias alternativas que promovam o manejo sustentável dos resíduos (Dadrasnia *et al.*, 2021).

Entre as tecnologias biológicas disponíveis, a digestão anaeróbia destaca-se por sua eficiência na remoção de matéria orgânica, baixo consumo energético e capacidade de gerar biogás, uma fonte renovável de energia. O biogás, composto majoritariamente por metano e dióxido de carbono, pode ser utilizado diretamente como combustível ou passar por beneficiamento para obtenção de biometano, o que aumenta seu valor agregado (Pigozzo *et al.*, 2022). Esse processo também gera um subproduto líquido conhecido como digestato, rico em nutrientes e com potencial para uso como fertilizante, desde que atendidas as características agronômicas do solo e a disponibilidade de áreas para aplicação (Tyagi *et al.*, 2018).

No entanto, mesmo com o uso de digestão anaeróbia, o digestato pode conter elevadas concentrações de nitrogênio e fósforo, que, quando não adequadamente manejados, representam um potencial impacto ambiental. Esses nutrientes podem causar problemas, como redução de oxigênio dissolvido em corpos hídricos, eutrofização, toxicidade para organismos aquáticos e riscos à saúde humana (Ma *et al.*, 2016).

Frente às exigências ambientais crescentes sobre o manejo de resíduos agropecuários, torna-se indispensável a adoção de tecnologias complementares para o tratamento de digestatos, que promovem a remoção de nutrientes residuais antes da disposição final. Essa abordagem integrada possibilita a mitigação dos impactos ambientais associados aos resíduos suínolas e fomenta o uso sustentável desses recursos.

3.2. Nitrogênio: Ciclo e Impactos Ambientais

O nitrogênio (N) é um elemento essencial para todos os microrganismos, de forma que desempenha um papel crucial na formação de proteínas e ácidos nucleicos nas células. Embora represente cerca de 78% da atmosfera na forma de nitrogênio (N_2), esse gás precisa ser convertido em espécies químicas assimiláveis, como nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-), amônia (NH_3) e amônio (NH_4^+) — presentes em matéria orgânica e mineral — para ser incorporado na biossíntese celular (Holmes; Dang; Smith, 2019) (Figura 1).

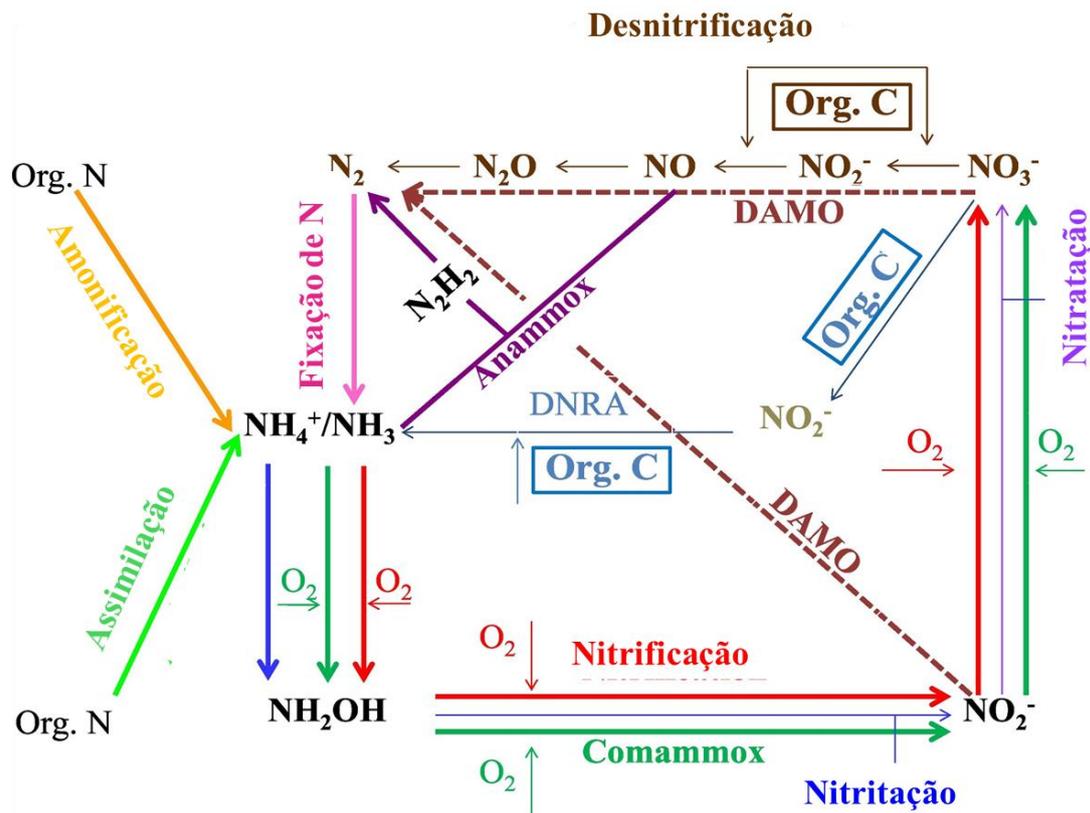


Figura 3-1 Representação esquemática das reações envolvidas no ciclo do nitrogênio. Fonte: Adaptado de Bonassa *et al.* (2021a).

Na Figura 3-1, observa-se o papel fundamental do ciclo do nitrogênio nos ecossistemas, regulando e disponibilizando o elemento em diversas formas químicas por meio de transformações biológicas realizadas por microrganismos especializados. Esses processos são essenciais para manter o equilíbrio do nitrogênio em diferentes ambientes (Kuypers; Marchant; Kartal, 2018). Microrganismos, como bactérias e arqueas, convertem o N_2 em espécies assimiláveis, principalmente, por meio da fixação biológica de nitrogênio, utilizando vias enzimáticas para transformar N_2 em NH_3 .

O crescimento populacional global tem impulsionado atividades antropogênicas, especialmente, na agricultura e na produção de alimentos, alterando e desequilibrando o ciclo natural do nitrogênio ((Rockström *et al.*, 2009);(Winkler; Straka, 2019)). Um dos métodos amplamente utilizados para a produção de fertilizantes nitrogenados é o processo Haber-Bosch, intensivo em energia, que permite a introdução de nitrogênio na biosfera sob a forma de amônio (NH_4^+) (Cruz *et al.*, 2019).

Dessa forma, uma grande quantidade de fertilizantes e resíduos da produção de alimentos, como dejetos animais e resíduos da agroindústria, contribui para a contaminação do solo, ar e, principalmente, dos corpos hídricos. Quando não tratados adequadamente, esses fluxos de nitrogênio podem causar

uma série de problemas ambientais, como eutrofização, proliferação de algas tóxicas, contaminação de águas subterrâneas e a liberação de gases de efeito estufa (GEE), os quais agravam o aquecimento global (Winkler; Straka, 2019; Shaw; Terada; Saikaly, 2024).

3.3. Remoção Biológica de Nitrogênio

O nitrogênio presente em águas residuais está, em sua maioria, na forma de nitrogênio amoniacal total (NAT), composto por NH_3 e NH_4^+ . A remoção biológica de nitrogênio (RBN) convencional é realizada por processos de nitrificação seguidos de desnitrificação (Gajewska *et al.*, 2015 ; Shoukat *et al.*, 2024).

A nitrificação ocorre em duas etapas e envolve a cooperação de dois grupos microbiológicos para a oxidação do NAT. Primeiramente, as bactérias oxidadoras de amônia (BOA), (*Nitrosomonas*, *Nitrospira*) convertem NH_3 em NO_2^- , por meio da nitrificação, utilizando oxigênio como aceptor de elétrons. Em seguida, as bactérias oxidadoras de nitrito (BON), (*Nitrobacter*, *Nitrospina*, *Nitrococcus*) convertem o NO_2^- gerado em NO_3^- durante o processo de nitrificação (Winkler; Straka, 2019) .

O processo de desnitrificação é realizado por bactérias heterotróficas desnitrificantes (BH), encontradas em diversos gêneros, como *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Paracoccus* e *Thiobacillus*. Essas bactérias convertem o NO_3^- gerado na nitrificação em N_2 , utilizando carbono como doador de elétrons ((Winkler; Straka, 2019)).

Embora essa rota biológica seja comprovadamente vantajosa e eficiente, ambas as etapas envolvem a produção de óxido nitroso (N_2O), um potente gás de efeito estufa (GEE), cujo impacto no aquecimento global é cerca de 300 vezes superior ao do dióxido de carbono (CO_2) (Ravishankara; Daniel; Portmann, 2009).

Além disso, a etapa de nitrificação exige uma alta demanda energética para fornecer oxigênio, enquanto a desnitrificação, frequentemente, carece de carbono biodisponível, o que pode inviabilizar o uso dessa tecnologia. O custo de remoção de nitrato residual, usando metanol, por exemplo, pode ser de aproximadamente \$1,14 por kg (Tang; Zheng; Mahmood, 2009; Massara *et al.*, 2017; Bonassa *et al.*, 2021a).

Os processos convencionais de remoção de nitrogênio encarecem devido à quantidade de energia necessária para a aeração, que pode chegar a 1/3 do custo operacional das estações (aproximadamente $0,58 \pm 0,17 \text{ € kg}^{-1}$ por N oxidado) (Srivastava *et al.*, 2024).

Dentre os processos da nova geração, destacam-se as tecnologias baseadas em remoção autotrófica de nitrogênio, que podem oferecer economia de energia de até 50% e redução nos custos de operação dos sistemas (Figura 3-2).

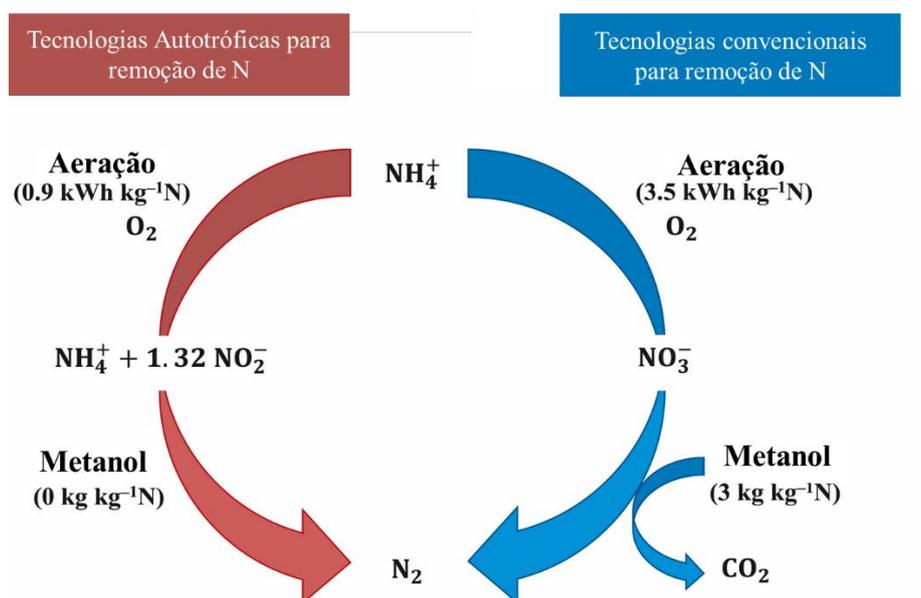


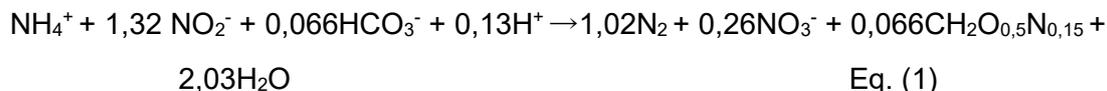
Figura 3-2 Comparativo entre os métodos autotróficos e convencionais para remoção de N quanto ao uso de aeração e de fontes de carbono para funcionamento do processo. Fonte: Adaptado de Trinh *et al.* (2021).

Esses desafios destacam a necessidade da implementação dessas novas tecnologias para a remoção biológica de nitrogênio, que apresentam mais eficiência e sustentabilidade em termos energéticos, de emissões de GEE e uso de carbono. A transição dos processos convencionais para tecnologias de nova geração é crucial para a melhoria da sustentabilidade ambiental (Shaw; Terada; Saikaly, 2024).

3.4. Processo Anammox

Na remoção de nitrogênio amoniacal de águas residuais, a oxidação anaeróbia do amônio (Anammox, do inglês *Anaerobic Ammonium Oxidation*) é considerada uma das inovações mais significativas no ciclo biogeoquímico do nitrogênio (Figura 1). Esse processo propõe a eliminação biológica do amônio (NH_4^+), utilizando o nitrito (NO_2^-) comoceptor final de elétrons, o que resulta na formação de uma quantidade reduzida de nitrato (NO_3^-) (equação 01). Em comparação com os processos tradicionais de nitrificação/desnitrificação, o Anammox apresenta vantagens consideráveis, como a diminuição da demanda energética e a redução do volume de lodo gerado, com uma

diminuição de até 60% e 90%, respectivamente. Além disso, não há a necessidade de fornecimento externo de carbono orgânico.



Os microrganismos responsáveis por essa reação são quimiolitotróficos (produzem seu alimento a partir da energia liberada por reações químicas), anaeróbios e sofrem inibição reversível na presença de oxigênio (Strous *et al.*, 1998). Essas bactérias possuem, ainda, citoplasma compartimentalizado por três membranas em bicamada, além de uma organela específica, denominada de anamoxossomo (Figura 3-3), em que ocorre o metabolismo energético do anammox (Van Niftrik *et al.*, 2008; Ahmad *et al.*, 2020).

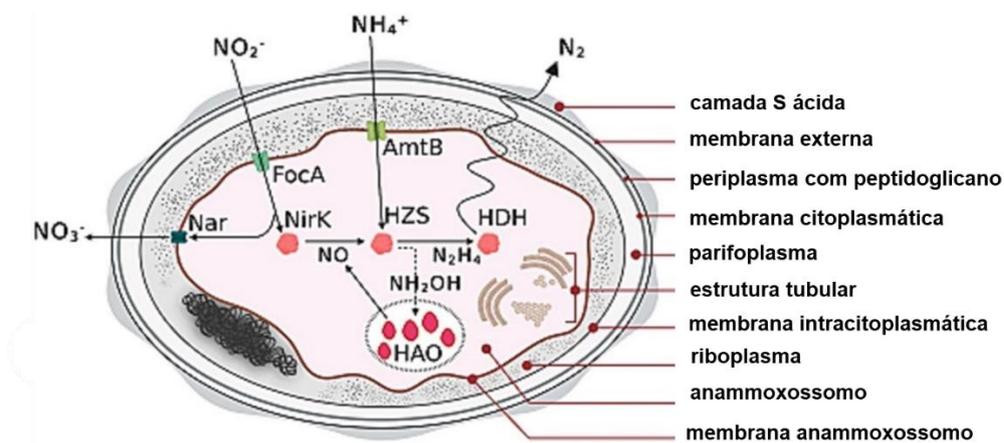


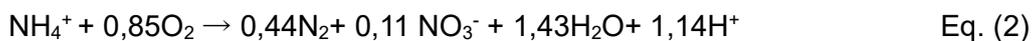
Figura 3-3 Ilustração esquemática de (a) uma bactéria anammox (AB) mostrando a via bioquímica anammox. Adaptado de (Srivastava *et al.*, 2024)

Conforme a estequiometria do processo Anammox (Equação 01), tanto o NH_4^+ quanto o NO_2^- são fundamentais para que a reação ocorra de forma eficiente. Entretanto, o NO_2^- raramente se encontra em águas residuárias após os processos convencionais de remoção de matéria orgânica. Como apontado por Bonassa *et al.*, (2021b), para garantir a disponibilidade adequada de NH_4^+ e NO_2^- e viabilizar a aplicação do processo Anammox, essas bactérias podem atuar em conjunto com outros microrganismos, como as bactérias nitrificantes heterotróficas e as Nitrospira, que realizam a oxidação completa da amônia (em inglês, *COMplete AMMonia Oxidizers – Comammox*).

A combinação da nitrificação parcial, com o processo Anammox (NP/A), é conhecida como desamonificação, considerada uma rota tecnológica promissora para

a remoção de nitrogênio. Nesse processo, ocorre um consórcio entre as bactérias nitrificantes (microrganismos aeróbios) e as bactérias anammox (microrganismos anóxicos) para o consumo do nitrogênio presente no meio (Bonassa *et al.*, 2021b).

Em termos operacionais, o processo consiste na oxidação parcial (nitritação parcial) de amônia a nitrito por BOA's sob concentrações de oxigênio dissolvido limitado. Posteriormente, o nitrito produzido e a amônia remanescente são consumidas por bactérias anammox e convertidas a nitrogênio gasoso, com um residual de 10% aproximadamente de nitrato. A fórmula estequiométrica para o processo de desamonificação está descrita abaixo, na Equação 2.



A desamonificação surge como uma tecnologia promissora quanto à remoção de altas cargas de nitrogênio amoniacal, como é o caso de efluentes suíncolas. Esse processo pode ser desenvolvido em dois reatores em série, ou em um único reator. Nas duas situações, tem-se uma economia de até 63% de oxigênio quando comparados a um sistema convencional de remoção de nitrogênio (Chini *et al.*, 2019).

Além da nitritação parcial e de desamonificação, várias outras configurações baseadas nesses processos já foram desenvolvidas para remoção biológica de nitrogênio de águas residuais em conjunto com os microrganismos anammox (Verma; Daverey, 2021). Dentre essas, destacam-se os processos de remoção autotrófica de nitrogênio sobre nitrito (CANON) (Sliemers, 2002; Winkler; Straka, 2019), a desnitrificação parcial de estágio único–anammox (DEAMOX) (Hou *et al.*, 2025; Kalyuzhnyi *et al.*, 2006), a nitrificação parcial de estágio único–anammox–desnitrificação (SNAD) (Cheng *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2022) e o processo de nitrificação parcial de dois estágios–anammox (SHARON–anammox) (Chen *et al.*, 2009; Sri Shalini; Joseph, 2018).

3.5. Configuração de Reatores

Devido ao lento crescimento das bactérias Anammox, torna-se essencial utilizar modelos reacionais que retenham a biomassa no sistema e ofereçam alta eficiência na remoção de nitrogênio amoniacal. Dessa forma, reatores, com configuração de fluxo ascendente, são amplamente aplicados também em escala real, pois apresentam custos operacionais mais baixos em comparação com configurações como Reatores por Batelada Sequencial (SBR), biorreatores de membrana e reatores anaeróbios de fluxo ascendente (UASB) (Casagrande *et al.*, 2013).

Embora a desamonificação tenha sido originalmente desenvolvida em reatores do tipo SBR, esse processo também pode ser aplicado em sistemas de biofilme (Chen *et al.*, 2022a) e reatores gas-lift (Bonassa *et al.*, 2022; Dapena-Mora *et al.*, 2004; De Prá *et al.*, 2016; Sliemers *et al.*, 2003).

Nos últimos anos, reatores de fluxo ascendente também vêm recebendo destaque em processos de desamonificação. Choi, Cho e Jung, (2018) empregaram um reator de fluxo ascendente com bactérias Anammox, que obteve remoção de uma carga de $17,4 \text{ gN L}^{-1}\text{d}^{-1}$. Em outro estudo, o mesmo objetivo foi alcançado com remoção de $18,3 \text{ gN L}^{-1}\text{d}^{-1}$ (Casagrande *et al.*, 2013), resultados muito superiores aos de processos convencionais de nitrificação/desnitrificação, que removem cerca de $0,41 \text{ gN L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Bortoli *et al.*, 2012).

Entre as configurações de reatores de leito, destaca-se o uso de leitos fixos, expandidos, suspensos e fluidizados, conforme ilustrado na Figura (3-4) (Zheng *et al.*, 2021). Dentre essas configurações, os reatores de leito expandido mostram vantagens notáveis, como maiores taxas de remoção de nitrogênio, devido à relação altura/superfície superior, que resulta em maior velocidade ascensional e melhora o contato substrato-microrganismo (Fang *et al.*, 2011).

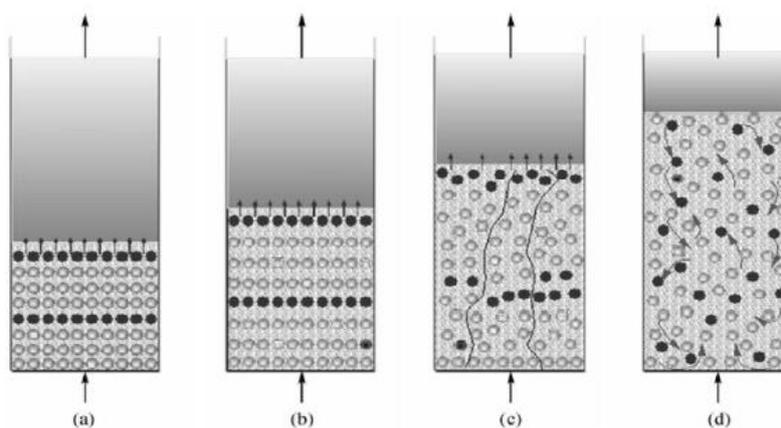


Figura 3-4 Representação esquemática de fluxo no reator: (a) leito fixo, (b) leito expandido, (c) leito suspenso, (d) leito fluidizado. Adaptado de Zheng *et al.*, 2021.

Os reatores de leito granular expandido (EGSB), também conhecidos como reatores de terceira geração, possuem uma relação altura/diâmetro elevada e permitem recirculação de efluente (Liu *et al.*, 2021). Devido à sua estrutura simples, capacidade de remover altas concentrações de nitrogênio ($600\text{--}1400 \text{ mgN L}^{-1}$) e adaptação a diferentes tipos de águas residuais, esses reatores vêm se popularizando no tratamento de efluentes (Lim; Kim, 2014).

Para operação em sistemas anammox, os reatores de fluxo ascendente são especialmente adequados, pois suas características hidrodinâmicas favorecem a formação de agregados densos de microrganismos ($0,91 - 1,04 \text{ g mL}^{-1}$) e grandes grânulos ($2,8 - 4,9 \text{ mm}$) por autoimobilização (Chen *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2020).

3.6. Estado da Arte: Processos e Mecanismos Envolvidos na Formação e Estruturação dos Grânulos de Lodo Anammox

Estratégias para o enriquecimento do lodo Anammox desempenham um papel fundamental na aplicação eficiente do processo. Fatores que investigam e desenvolvem métodos de enriquecimento desse lodo são cruciais, diante da baixa taxa de crescimento das bactérias Anammox, que compromete a aplicação em larga escala desse sistema, além de serem suscetíveis à eliminação em função de sua baixa densidade. Tais características tornam o processo de partida lento e frequentemente instável durante a operação (Ibrahim *et al.*, 2016; Jiang *et al.*, 2022).

Durante o processo de formação, as bactérias Anammox desenvolvem grânulos compactos e agregados densos, bem adaptados a ambientes anaeróbios e com alta capacidade de aderência a diferentes superfícies (Tomaszewski; Cema; Ziembinska-Buczynska, 2017). A formação dos grânulos ocorre em quatro estágios: célula única, zoogleia (aglomerado de células), subunidade e, finalmente, grânulo (Figura 3-5).

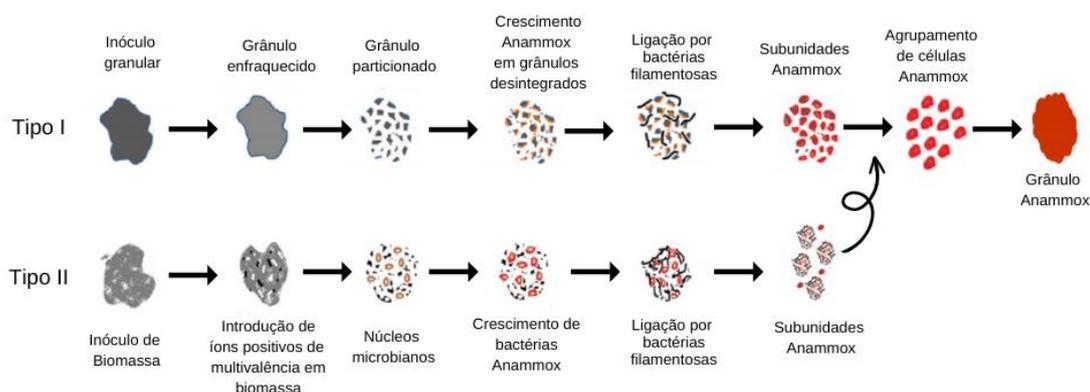


Figura 3-5 Formação do lodo granular anammox. Adaptado de Manonmani; Joseph, 2018. Grânulos do Tipo I são formados a partir da inoculação de reatores com lodos anammox já granulares, e Tipo II quando há a utilização de um lodo que possui células anammox.

Ao longo do crescimento, essas bactérias produzem substâncias poliméricas extracelulares (SPE), que facilitam a agregação celular e contribuem para a estabilidade estrutural dos grânulos, com o suporte adicional de bactérias filamentosas (Manonmani; Joseph, 2018).

Os grânulos e biofilmes formados pelas bactérias Anammox são compostos principalmente por células microbianas, substâncias poliméricas extracelulares (SPE) e componentes inorgânicos, os quais resultam em alta densidade e robustez estrutural. Essa configuração granular permite a operação estável de reatores sob altas cargas orgânicas, prevenindo a perda de biomassa e elevando a eficiência do sistema (Chen *et al.*, 2021).

As secreções bacterianas (SPE) são produtos de apoptose e lise celular, que podem ser classificados em fracamente ligados (com composição majoritária de polissacarídeos) e fortemente ligados (com concentrações maiores de proteínas). A composição do SPE forma uma arquitetura tridimensional que auxilia a nutrição das bactérias, ajudando inclusive na emulsificação e solubilização de compostos orgânicos complexos, o que melhora o seu processo de degradação ((Vandana; Priyadarshane; Das, 2023).

Atualmente, as duas formas mais empregadas para aumentar a retenção de biomassa anammox nos reatores é a formação de biofilme e grânulos (Wang *et al.*, 2019). Contudo, a formação do biofilme e grânulos anammox é um processo complexo, que envolve interações físicas, químicas e biológicas (Gao *et al.*, 2024). Várias teorias já foram propostas para tentar explicar o processo de formação do grânulo, a saber: Teoria da pressão de seleção hidráulica (Liu *et al.*, 2005; Qian *et al.*, 2021), teoria do atrito (Milferstedt *et al.*, 2017; Cao *et al.*, 2021), teoria da ligação iônica positiva multivalente (Ma *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2015), teoria da ligação SPE (Ding *et al.*, 2015; Li, Dang e Zhang, 2022), teoria dos núcleos inertes (Dehestaniathar *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2019), teoria da ligação de polímeros sintéticos e naturais (Chen *et al.*, 2022b; Liu *et al.*, 2003).

A pressão de seleção hidráulica consiste em aplicar baixos tempos de retenção hidráulica (TRH) para garantir a operação estável de processos baseados em nitrificação parcial e anammox de estágio único. Isso evita o acúmulo de biomassa orgânica assimilável (BOA) e biomassa orgânica não-assimilável (BON) dentro dos reatores, prevenindo interferências no consumo de nitrogênio pelas bactérias anammox (Qoan *et al.*, 2021).

Os sistemas de remoção de nitrogênio e anammox baseados na teoria do atrito sugerem que os grânulos se formam devido ao atrito gerado por altas velocidades ascensionais e alterações nas hidrodinâmicas dos sistemas. Esse processo facilita a colonização de sólidos suspensos (Milferstedt *et al.*, 2017).

Além disso, nos modelos de ligação iônica positiva multivalente e na teoria das substâncias poliméricas extracelulares (SPE), a granulação ocorre pela repulsão eletrostática entre bactérias carregadas negativamente e a adição de íons positivos. A

excreção de SPE facilita a bioagregação ao modificar a carga negativa das superfícies bacterianas, promovendo a coesão e contribuindo para a formação de estruturas granulares estáveis no lodo (Ma *et al.*, 2021; Zhang, 2022).

Por fim, a teoria dos núcleos inertes sugere que colônias bacterianas se desenvolvem ao redor de agregados minerais e outras partículas inertes acumuladas no interior dos reatores. No contexto dos processos anammox, destaca-se a formação de hidroxiapatita (HAP – $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$), que favorece a retenção de lodo e cria uma relação sinérgica com o processo anammox (Lin *et al.*, 2024).

Apesar das teorias sobre o processo de granulação e dos avanços na tecnologia anammox, o mecanismo exato de formação de agregados anammox ainda carece de uma explicação definitiva, sendo necessário o desenvolvimento de estudos aprofundados para elucidar melhor esses processos (Wang *et al.*, 2023).

Outro aspecto relevante que exige investigação mais detalhada é a cooperação entre grupos microbiológicos, facilitada por mecanismos, como o *quorum sensing* (QS). Esse tipo de comunicação intercelular, já identificado em estudos recentes, desempenha um papel essencial na organização e estabilidade do biofilme anammox, permitindo a interação cooperativa entre microrganismos de diferentes gêneros (Zhao *et al.*, 2021).

Estudos prévios apontam para desafios específicos que afetam a eficiência do processo anammox, como a presença de amônia livre, ácido nitroso, temperatura, presença de carbono orgânico, concentração de oxigênio dissolvido, além da baixa taxa de crescimento das bactérias anammox. No entanto, ainda, há lacunas no conhecimento em relação aos efeitos sinérgicos da interação entre o anammox e outros microrganismos coexistentes nos efluentes, cuja compreensão é essencial para otimizar o processo e melhorar a eficiência dos sistemas de tratamento (Wang *et al.*, 2023).

4. REFERÊNCIAS

AHMAD, H. A. *et al.* Gel immobilization: A strategy to improve the performance of anaerobic ammonium oxidation (anammox) bacteria for nitrogen-rich wastewater treatment. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 313, p. 123642, out. 2020.

AL-HAZMI, H. E. *et al.* Comparison of the Efficiency of Deammonification under Different DO Concentrations in a Laboratory-Scale Sequencing Batch Reactor. **Water**, [s.l.], v. 14, n. 3, p. 368, jan. 2022.

AZIZ, A. *et al.* Biological wastewater treatment (anaerobic-aerobic) technologies for safe discharge of treated slaughterhouse and meat processing wastewater. **Science of The Total Environment**, [s.l.], v. 686, p. 681-708, out. 2019.

BONASSA, G. *et al.* A new kinetic model to predict substrate inhibition and better efficiency in an airlift reactor on deammonification process. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 319, p. 124158, jan. 2021a.

BONASSA, G. *et al.* Organic carbon bioavailability: Is it a good driver to choose the best biological nitrogen removal process? **Science of The Total Environment**, [s.l.], v. 786, p. 147390, set. 2021b.

BONASSA, G. *et al.* Performance and microbial features of Anammox in a single-phase reactor under progressive nitrogen loading rates for wastewater treatment plants. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [s.l.], v. 10, n. 1, p. 107028, fev. 2022.

BORTOLI, M. *et al.* Emissão de óxido nitroso nos processos de remoção biológica de nitrogênio de efluentes. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, [s.l.], v. 17, n. 1, p. 01-06, mar. 2012.

CAO, R. *et al.* The stability of aerobic granular sludge under low energy consumption: optimization of the granular size distribution by a novel internal component. **Environmental Science: Water Research & Technology**, [s.l.], v. 7, n. 6, p. 1125-1136, 2021.

CAO, Y.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; DAIGGER, G. T. Mainstream partial nitrification–anammox in municipal wastewater treatment: status, bottlenecks, and further studies. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 101, n. 4, p. 1365-1383, fev. 2017.

CASAGRANDE, C. G. *et al.* High nitrogen removal rate using ANAMMOX process at short hydraulic retention time. **Water Science and Technology**, [s.l.], v. 67, n. 5, p. 968-975, mar. 2013.

CHEN, H. *et al.* The development of simultaneous partial nitrification, ANAMMOX and denitrification (SNAD) process in a single reactor for nitrogen removal. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 100, n. 4, p. 1548-1554, fev. 2009.

CHEN, J. *et al.* Floatation and control of granular sludge in a high-rate anammox reactor. **Water Research**, [s.l.], v. 44, n. 11, p. 3321-3328, jun. 2010.

CHEN, J. *et al.* Insights into deterioration and reactivation of a mainstream anammox biofilm reactor response to C/N ratio. **Journal of Environmental Management**, [s.l.], v. 320, p. 115780, out. 2022a.

CHEN, W. *et al.* Deciphering the mechanism of medium size anammox granular sludge driving better nitrogen removal performance. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 336, p. 125317, set. 2021.

CHEN, Y.; GUO, G.; LI, Y.-Y. A review on upgrading of the anammox-based nitrogen removal processes: Performance, stability, and control strategies. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 364, p. 127992, nov. 2022.

CHEN, Z. *et al.* Distinct granulation pathways of aerobic granular sludge under poly aluminum chloride enhancement. **Science of The Total Environment**, [s.l.], v. 807, p. 150829, fev. 2022b.

CHENG, Y.-F. *et al.* Response of the mainstream anammox process to the biodegradable carbon sources in the granule-based systems: The difference in self-stratification of the microbial community. **Science of The Total Environment**, [s.l.], v. 851, p. 158191, dez. 2022.

CHINI, A. *et al.* Recirculation and Aeration Effects on Deammonification Activity. **Water, Air, & Soil Pollution**, [s.l.], v. 227, n. 2, p. 67, fev. 2016.

CHINI, A. *et al.* Evaluation of deammonification reactor performance and microorganisms community during treatment of digestate from swine sludge CSTR biodigester. **Journal of Environmental Management**, [s.l.], v. 246, p. 19-26, 15 set. 2019.

CHOI, D.; CHO, S.; JUNG, J. Key operating parameters affecting nitrogen removal rate in single-stage deammonification. **Chemosphere**, [s.l.], v. 207, p. 357-364, set. 2018.

CRUZ, H. *et al.* Mainstream Ammonium Recovery to Advance Sustainable Urban Wastewater Management. **Environmental Science & Technology**, [s.l.], v. 53, n. 19, p. 11066–11079, out. 2019.

DADRASNIA, A. *et al.* Sustainable nutrient recovery from animal manure: A review of current best practice technology and the potential for freeze concentration. **Journal of Cleaner Production**, [s.l.], v. 315, p. 128106, set. 2021.

DAPENA-MORA, A. *et al.* Stability of the ANAMMOX process in a gas-lift reactor and a SBR. **Journal of Biotechnology**, [s.l.], v. 110, n. 2, p. 159-170, mai. 2004.

DE PRÁ, M. C. *et al.* Kinetic models for nitrogen inhibition in ANAMMOX and nitrification process on deammonification system at room temperature. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 202, p. 33-41, fev. 2016.

DEHESTANIATHAR, S. *et al.* Application of natural biodegradable fiber as biofilm medium and carbon source in DENitrifying AMmonium OXidation (DEAMOX) process for nitrogen removal from wastewater. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, [s.l.], v. 119, p. 108-114, fev. 2021.

DING, Z. *et al.* Role of extracellular polymeric substances (SPE) production in bioaggregation: application to wastewater treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 99, n. 23, p. 9883-9905, dez. 2015.

DU, R. *et al.* Partial denitrification providing nitrite: Opportunities of extending application for anammox. **Environment International**, [s.l.], v. 131, p. 105001, out. 2019.

GAJEWSKA, M. *et al.* Impact of influent wastewater quality on nitrogen removal rates in multistage treatment wetlands. **Environmental Science and Pollution Research**, [s.l.], v. 22, n. 17, p. 12840-12848, set. 2015.

GAO, M. *et al.* Enhancing anammox process at moderate temperature via employing anammox granular sludge reactor effluent addition. **Process Safety and Environmental Protection**, [s.l.], v. 182, p. 894-902, fev. 2024.

HOLLAS, C. E. *et al.* Modified Ludzack–Ettinger system role in efficient nitrogen removal from swine manure under high total suspended solids concentration. **International Journal of Environmental Science and Technology**, [s.l.], v. 16, n. 12, p. 7715-7726, dez. 2019.

HOLMES, D. E.; DANG, Y.; SMITH, J. A. Nitrogen cycling during wastewater treatment. Em: **Advances in Applied Microbiology**. [s.l.] Elsevier, 2019.

HOU, Z. *et al.* Achieving efficient anammox contribution and the enrichment of functional bacteria in partial denitrification/anammox system: Performance, microbial evolution and correlation analysis. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 416, p. 131792, jan. 2025.

IBRAHIM, M. *et al.* Enrichment of anaerobic ammonium oxidation (anammox) bacteria for short start-up of the anammox process: a review. **Desalination and Water Treatment**, [s.l.], v. 57, n. 30, p. 13958-13978, jun. 2016.

JARAMILLO, F. *et al.* Advanced strategies to improve nitrification process in sequencing batch reactors - A review. **Journal of Environmental Management**, [s.l.], v. 218, p. 154-164, jul. 2018.

JIANG, C. *et al.* Distinct membrane fouling characteristics of anammox MBR with low NO₂⁻-N/NH₄⁺-N ratio. **Science of The Total Environment**, [s.l.], v. 817, p. 152994, abr. 2022.

KALYUZHNYI, S. *et al.* New anaerobic process of nitrogen removal. **Water Science and Technology**, [s.l.], v. 54, n. 8, p. 163-170, out. 2006.

KUYPERS, M. M. M.; MARCHANT, H. K.; KARTAL, B. The microbial nitrogen-cycling network. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], v. 16, n. 5, p. 263-276, mai. 2018.

LI, D.; DANG, Z.; ZHANG, J. Study on two anammox start-up and operation strategies: Low-intensity direct current electric field and negative pressure. **Chemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 435, p. 134791, mai. 2022.

LIM, S. J.; KIM, T.-H. Applicability and trends of anaerobic granular sludge treatment processes. **Biomass and Bioenergy**, [s.l.], bv. 60, p. 189-202, jan. 2014.

LIN, L. *et al.* Enhanced sludge granulation and stable performance of an anammox expanded granular sludge bed (EGSB) reactor through the utilization of hydroxyapatite (HAP) particles. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 406, p. 131091, ago. 2024.

- LIU, C. *et al.* Rapid formation of granules coupling n-DAMO and anammox microorganisms to remove nitrogen. **Water Research**, [s.l.], v. 194, p. 116963, abr. 2021.
- LIU, W. *et al.* Enhancing the in-situ enrichment of anammox bacteria in aerobic granules to achieve high-rate CANON at low temperatures. **Chemosphere**, [s.l.], v. 278, p. 130395, set. 2021.
- LIU, Y. *et al.* Mechanisms and models for anaerobic granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactor. **Water Research**, [s.l.], v. 37, n. 3, p. 661-673, fev. 2003.
- LIU, Y. *et al.* Selection pressure-driven aerobic granulation in a sequencing batch reactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 67, n. 1, p. 26-32, abr. 2005.
- LIU, Y. *et al.* Deciphering effects of humic acid in landfill leachate on the simultaneous nitrification, anammox and denitrification (SNAD) system from performance, electron transfer and microbial community. **Science of The Total Environment**, [s.l.], v. 809, p. 151178, fev. 2022.
- MA, B. *et al.* Biological nitrogen removal from sewage via anammox: Recent advances. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 200, p. 981-990, jan. 2016.
- MA, D. *et al.* Zero-valent iron and biochar composite with high specific surface area via K₂FeO₄ fabrication enhances sulfadiazine removal by persulfate activation. **Chemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 408, p. 127992, mar. 2021.
- MANONMANI, U.; JOSEPH, K. Granulation of anammox microorganisms for autotrophic nitrogen removal from wastewater. **Environmental Chemistry Letters**, [s.l.], v. 16, n. 3, p. 881-901, set. 2018.
- MASSARA, T. M. *et al.* A review on nitrous oxide (N₂O) emissions during biological nutrient removal from municipal wastewater and sludge reject water. **Science of The Total Environment**, [s.l.], v. 596-597, p. 106-123, out. 2017.
- MILFERSTEDT, K. *et al.* Biogranules applied in environmental engineering. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s.l.], v. 42, n. 45, p. 27801-27811, nov. 2017.
- QIAN, F. *et al.* Effect of hydraulic selection pressure on the characteristics of partial nitrification/anammox granular sludge in a continuous-flow reactor. **Environmental Technology & Innovation**, [s.l.], v. 24, p. 102042, nov. 2021.
- RAVISHANKARA, A. R.; DANIEL, J. S.; PORTMANN, R. W. Nitrous Oxide (N₂O): The Dominant Ozone-Depleting Substance Emitted in the 21st Century. **Science**, [s.l.], v. 326, n. 5949, p. 123-125, out. 2009.
- ROCKSTRÖM, J. *et al.* A safe operating space for humanity. **Nature**, [s.l.], v. 461, n. 7263, p. 472-475, set. 2009.
- SHAW, D. R.; TERADA, A.; SAIKALY, P. E. Future directions in microbial nitrogen cycling in wastewater treatment. **Current Opinion in Biotechnology**, [s.l.], v. 88, p. 103163, ago. 2024.

- SHOUKAT, A. *et al.* Harnessing iron for enhanced biological nitrogen removal: Mechanisms, applications, and future directions. **Journal of Water Process Engineering**, [s.l.], v. 68, p. 106330, dez. 2024.
- SLIEKERS, A. Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite in one single reactor. **Water Research**, [s.l.], v. 36, n. 10, p. 2475-2482, mai. 2002.
- SLIEKERS, A. O. *et al.* CANON and Anammox in a gas-lift reactor. **FEMS Microbiology Letters**, [s.l.], v. 218, n. 2, p. 339-344, jan. 2003.
- SRI SHALINI, S.; JOSEPH, K. Combined SHARON and ANAMMOX processes for ammoniacal nitrogen stabilisation in landfill bioreactors. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 250, p. 723-732, fev. 2018.
- SRIVASTAVA, P. *et al.* Diversity of anaerobic ammonium oxidation processes in nature. **Chemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 483, p. 149257, mar. 2024.
- TANG, C.; ZHENG, P.; MAHMOOD, Q. The shear force amendments on the slugging behavior of upflow Anammox granular sludge bed reactor. **Separation and Purification Technology**, [s.l.], v. 69, n. 3, p. 262-268, out. 2009.
- TAO, M. *et al.* Partial nitrification-denitrification triggered the enhanced nitrogen removal in an integrated internal circulation aerated reactor. **Journal of Water Process Engineering**, [s.l.], v. 68, p. 106507, dez. 2024.
- TOMASZEWSKI, M.; CEMA, G.; ZIEMBIŃSKA-BUCZYŃSKA, A. Influence of temperature and pH on the anammox process: A review and meta-analysis. **Chemosphere**, [s.l.], v. 182, p. 203-214, set. 2017.
- TYAGI, V. K. *et al.* Anaerobic co-digestion of organic fraction of municipal solid waste (OFMSW): Progress and challenges. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 93, p. 380-399, out. 2018.
- VAN NIFTRIK, L. *et al.* Linking Ultrastructure and Function in Four Genera of Anaerobic Ammonium-Oxidizing Bacteria: Cell Plan, Glycogen Storage, and Localization of Cytochrome c Proteins. **Journal of Bacteriology**, [s.l.], v. 190, n. 2, p. 708-717, jan. 2008.
- VANDANA; PRIYADARSHANEE, M.; DAS, S. Bacterial extracellular polymeric substances: Biosynthesis and interaction with environmental pollutants. **Chemosphere**, [s.l.], v. 332, p. 138876, ago. 2023.
- VERMA, S.; DAVEREY, A. Anammox process: role of reactor systems for its application and implementation in wastewater treatment plants. *In*: VERMA, S.; DAVEREY, A. **Integrated and Hybrid Process Technology for Water and Wastewater Treatment**. [s.l.] Elsevier, 2021. p. 273-292.
- WANG, P. *et al.* Accelerating the granulation of anammox sludge in wastewater treatment with the drive of "micro-nuclei": A review. **Science of The Total Environment**, [s.l.], v. 860, p. 160238, fev. 2023.

WANG, S. *et al.* Robustness of anammox granular sludge treating low-strength sewage under various shock loadings: Microbial mechanism and little N₂O emission. **Journal of Environmental Sciences**, [s.l.], v. 86, p. 141-153, dez. 2019.

WINKLER, M. K.; STRAKA, L. New directions in biological nitrogen removal and recovery from wastewater. **Current Opinion in Biotechnology**, [s.l.], v. 57, p. 50-55, jun. 2019.

WITKABEL, P.; ABENDROTH, C. A systematic literature review of microbial anammox consortia in UASB/EGSB-reactors. **Chemosphere**, [s.l.], v. 367, p. 143630, nov. 2024.

XU, J. *et al.* Enhanced aerobic sludge granulation by applying carbon fibers as nucleating skeletons. **Chemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 373, p. 946-954, out. 2019.

XUE, H. *et al.* Deciphering the floatation reversibility of anammox sludge: A balance between sludge rheological intensity and external hydraulic shearing. **Science of The Total Environment**, [s.l.], v. 806, p. 151325, fev. 2022.

ZHANG, D. *et al.* High-rate partial-nitritation and efficient nitrifying bacteria enrichment/out-selection via pH-DO controls: Efficiency, kinetics, and microbial community dynamics. **Science of The Total Environment**, [s.l.], v. 692, p. 741-755, nov. 2019.

ZHANG, Z.-Z. *et al.* Behavior and fate of copper ions in an anammox granular sludge reactor and strategies for remediation. **Journal of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 300, p. 838-846, dez. 2015.

ZHAO, Z.-C. *et al.* A review of quorum sensing improving partial nitritation-anammox process: Functions, mechanisms and prospects. **Science of The Total Environment**, [s.l.], v. 765, p. 142703, abr. 2021.

ZHENG, M. *et al.* Inactivation kinetics of nitrite-oxidizing bacteria by free nitrous acid. **Science of The Total Environment**, [s.l.], v. 752, p. 141876, jan. 2021.

ZHOU, X. *et al.* Unravelling nitrogen removal and nitrous oxide emission from mainstream integrated nitrification-partial denitrification-anammox for low carbon/nitrogen domestic wastewater. **Journal of Environmental Management**, [s.l.], v. 270, p. 110872, set. 2020.

ZUBAIR, M. *et al.* Biological nutrient removal and recovery from solid and liquid livestock manure: Recent advance and perspective. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 301, p. 122823, abr. 2020.

5. ARTIGO 1: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E DESEMPENHO DE BACTÉRIAS ANAMMOX EM UM REATOR DE ESCALA PILOTO PARA O TRATAMENTO DE DIGESTATO DA SUINOCULTURA

RESUMO

A produção suinícola é uma das principais cadeias agropecuárias do Brasil, a qual contribui de forma significativa para a economia nacional. Contudo, a intensificação dessa atividade em larga escala resultou na geração de grandes volumes de dejetos, o que representa riscos ambientais consideráveis. A digestão anaeróbia surge como uma solução eficiente para a remoção de matéria orgânica desses resíduos, embora produza um digestato com altos níveis de nitrogênio amoniacal. Tal característica exige tratamentos adicionais para sua remoção, o que torna o processo anammox uma excelente alternativa, devido à baixa relação C/N do digestato e à estequiometria específica do anammox, que não utiliza carbono orgânico em sua reação metabólica. Nesse contexto, foi dimensionado e operado um sistema piloto anammox por 700 dias, com o objetivo de tratar efluentes provenientes da digestão anaeróbia de granjas suinícolas. O sistema consistiu em um reator de fluxo ascendente, com volume de 35 L, inoculado com 6 L de lodo anammox previamente aclimatado em meio de cultura sintético. Como fonte de nitrito, utilizou-se uma solução de nitrito de sódio, adicionada ao reator juntamente com o digestato, o que substituiu o uso de bactérias oxidadoras de amônia (BOA) e a aeração do sistema para a produção de nitrito. Durante a operação, a carga máxima de nitrogênio aplicada foi de $2,66 \text{ kg N m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, com uma eficiência média de remoção de 72%. Observou-se maior variabilidade nos coeficientes estequiométricos, o que sugere competição microbológica pelo substrato. A distribuição granulométrica realizada no lodo anammox ao longo do período de operação apontou uma maior concentração de grânulos em tamanhos de 1,41 e 0,7 mm, considerados tamanhos ideais para uma melhor performance dos microrganismos. Em termos de composição microbiana, nos primeiros 495 dias de operação, as bactérias anammox representaram 25,4% da população microbiana do sistema. Ao final do período experimental (700 dias), essa proporção foi reduzida para pouco mais de 2%. O sistema alimentado com digestato e solução de nitrito de sódio teve bons resultados e possibilitou a obtenção de uma eficiência média de remoção de nitrogênio de 70%.

Palavras-chave: Anammox. Morfologia. Grânulos. Digestato. Nitrogênio. Relação C/N.

5.1. Introdução

A digestão anaeróbia (DA) é amplamente reconhecida como uma tecnologia econômica e eficiente para a conversão da matéria orgânica presente em resíduos suinícolas em biogás, com destaque para a produção de metano (CH_4) (CHEN *et al.*, 2021). No entanto, o processo gera, como subproduto, o digestato, um efluente líquido caracterizado por altas concentrações de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K), além de apresentar uma baixa relação carbono/nitrogênio (C/N), frequentemente inferior a 3 ($\text{C/N} < 3$).

Embora o digestato possua potencial para aplicação como fertilizante agrícola, seu uso depende de diversos fatores, incluindo as características físico-químicas do solo receptor, métodos de armazenamento e transporte, bem como a forma de aplicação. Ademais, sua elevada concentração de nitrogênio amoniacal (NH_4^+) pode acarretar impactos ambientais negativos, como a contaminação de corpos hídricos e a eutrofização, quando não adequadamente manejado (Khoshnevisan; Bazgir, 2021; Mancuso *et al.*, 2024).

Diante dessas limitações, torna-se necessária a adoção de tecnologias de tratamento que permitam a remoção eficiente de nitrogênio antes da disposição final do digestato. No entanto, a baixa concentração de carbono orgânico nesse efluente dificulta a aplicação de processos biológicos convencionais, como a nitrificação e a desnitrificação.

Nesse contexto, o processo anammox (oxidação anaeróbia de amônio) surge como uma alternativa promissora para o tratamento de efluentes pós-digestão anaeróbia. Esse processo não requer carbono orgânico, utilizando o nitrito (NO_2^-) como acceptor de elétrons para oxidar amônio (NH_4^+) em nitrogênio gasoso (N_2). Além disso, o anammox apresenta vantagens, como baixos custos de implementação e operação, aliadas a altas eficiências na remoção de nitrogênio (Chen *et al.*, 2021b; Guo *et al.*, 2020; Qian *et al.*, 2022).

Apesar de seu potencial, a aplicação do processo anammox em larga escala enfrenta desafios significativos, como a manutenção de um fornecimento estável de nitrito (NO_2^-), o controle das condições ambientais necessárias para o cultivo de bactérias anaeróbias oxidantes de amônio (AnAOB) (Zhang *et al.*, 2022), além dos processos inibitórios por autocompetição com as BON, causados por concentrações residuais de carbono orgânico, presentes principalmente em efluentes após os processos de DA (relações C/N maiores que 2) (Bonassa *et al.*, 2021b).

Neste estudo, buscou-se operar e monitorar um sistema anammox utilizando efluente proveniente da digestão anaeróbia de resíduos da suinocultura, suplementado com nitrito de sódio (NaNO_2). Foram analisados o desempenho do sistema, a formação e a estabilidade dos grânulos de lodo, além das interações microbiológicas que foram favorecidas no processo.

5.2. Materiais e Métodos

5.2.1. Sistema experimental e operação

Os experimentos foram conduzidos na Estação de Tratamento de Dejetos Suínos (ETDS) e no Laboratório de Experimentação e Análises Ambientais (LEAA) da Embrapa Suínos e Aves, localizada em Concórdia, SC. Para este estudo, foi desenvolvido um sistema experimental dividido em três módulos principais (descrições detalhadas no Apêndice A).

5.2.2. Módulo 1 (M1): Preparação do Efluente

O primeiro módulo (M1) foi responsável pela preparação inicial do efluente que alimentaria o reator anammox. Nessa etapa, ocorreu a remoção do carbono orgânico residual proveniente do processo de digestão anaeróbia (DA), seguida pela diluição do efluente com água para atingir a concentração alvo de 100 mg L^{-1} de NH_4^+ . Esse módulo incluiu um reator UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) com aquecimento, de volume $1,41 \text{ m}^3$ (2,90 m de altura e 0,80 m de diâmetro), além de um sistema verticalizado (2,60 m de altura e 0,70 m de diâmetro) projetado para atuar como decantador e banho de aquecimento para o UASB. A disposição vertical otimizou o espaço físico da instalação.

O M1 também contava com um tanque pulmão, destinado ao armazenamento de digestato diluído, além de um sistema de suplementação de nitrito por meio de uma solução de nitrito de sódio (NaNO_2) a 2500 ppm. Essa suplementação era ajustada conforme a carga de nitrogênio aplicada (CNA) ao reator, sendo injetada no tanque misturador por uma bomba peristáltica. A Figura 5-1 apresenta o módulo 1 em operação.



Figura 5-1 Preparo do efluente para alimentação dos reatores em operação na estação de tratamento, onde: a) Reator UASB; b) Sistema verticalizado (vista frontal do sistema na imagem a direita); c) Tanque pulmão de digestato diluído.

5.2.3. Módulo 2 (M2): Mistura, Aquecimento e Reator Anammox

O segundo módulo (M2) combinava o tanque misturador, o sistema de aquecimento e o reator anammox. O tanque misturador, com volume de 134 L (diâmetro de 0,50 m e altura de 0,70 m), incluía, como função, homogeneizar o digestato e o nitrito antes de sua entrada no reator. Para garantir uma mistura eficaz, duas bombas de aquário submersas com vazão máxima de 2200 L.h⁻¹ foram instaladas no fundo do tanque, assegurando agitação e homogeneização contínuas.

Após a mistura, o efluente seguia para o reator anammox, um reator de fluxo ascendente em acrílico, com altura de 2,00 m e diâmetro de 0,150 m. A temperatura média do sistema foi mantida em $35,0 \pm 1,5$ °C, com aquecimento indireto realizado por serpentinas internas com circulação de água quente, impulsionada por uma bomba periférica (Foxlux, 64.04), e alimentado com o auxílio de uma bomba peristáltica (Masterflex easy L/S, modelo 77200-52). A Figura 5-2 dispõe uma imagem do módulo 2 em operação.



Figura 5-2 Reator anammox em operação. Onde: a) sistema de alimentação; b) dosagem de nitrito; c) sistema de aquecimento; d) reator de fluxo ascendente e) saída do sistema.

O sistema experimental foi operado por 700 dias, com Tempo de Retenção Hidráulica (TRH) inicial de 8,8 horas, vazão inicial de efluente de $3,96 \text{ L h}^{-1}$ e concentração de nitrogênio total (NT) de 200 mg L^{-1} . O aumento gradual da CNA ao sistema foi ajustado conforme o reator demonstrava a capacidade de consumir todo o nitrogênio disponível. Para controle da eficiência, amostras de $\text{NH}_4^+\text{-N}$, $\text{NO}_2^-\text{-N}$ e $\text{NO}_3^-\text{-N}$ eram coletadas semanalmente tanto na entrada quanto na saída do reator. Além disso, parâmetros operacionais, como oxigênio dissolvido (OD), pH e temperatura, foram monitorados diariamente, utilizando sondas portáteis (Hanna, modelo HI 8424, Portugal) e um medidor de OD (modelo 200A, Eco Sense, EUA).

5.2.4. Fonte de Inóculo

O reator foi inoculado com aproximadamente 6L de lodo anammox, fornecido pela Coleção de Microrganismos de Interesse para a Suinocultura e Avicultura (CMISEA) em Concórdia, Santa Catarina, Brasil (número de acesso: BRMSA 00323) (Viancelli *et al.*, 2011), equivalente a 17% do volume total do reator, e cultivada previamente em escala de bancada utilizando efluente sintético.

5.2.5. Caracterização do digestato

O efluente utilizado para alimentação do sistema piloto é proveniente de um sistema de DA composto por dois biodigestores anaeróbios do tipo UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) (Kunz *et al.*, 2009), localizados na Estação de Tratamento de Dejetos Suínos (ETDS) da Embrapa Suínos e Aves, em Concórdia, Santa Catarina, Brasil (27°18'S, 51°59'W).

A estação recebe os efluentes das granjas de suínos da unidade. O digestato utilizado possui como principais características físico-químicas: $10,08 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$ de sólidos totais (ST), $5,77 \pm 0,6 \text{ g L}^{-1}$ de sólidos voláteis (SV), $1,2 \pm 0,5 \text{ g L}^{-1}$ de N-NH₃, $4,40 \pm 0,20 \text{ g CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ de alcalinidade, pH médio de $8,30 \pm 0,01$ e carbono orgânico total (COT) de $3,96 \pm 0,15 \text{ g L}^{-1}$. Para ajuste da concentração de N-NH₃, o efluente foi diluído em um fator de 8 vezes.

5.2.6. Métodos Analíticos

Amostras coletadas das entradas e saídas dos reatores foram analisadas para N-NH₃, N-NO₂⁻, N-NO₃⁻, COT e alcalinidade (mg CaCO₃ L⁻¹). As taxas específicas de consumo de nitrogênio ($\mu\text{máx}$) foram determinadas a partir de ensaios cinéticos em batelada, segundo Bonassa *et al.* (2021a).

A quantificação dos parâmetros analíticos seguiu o protocolo descrito por APHA (2017) com todas as análises conduzidas em triplicata ou quadruplicata para garantir precisão e conformidade com as boas práticas laboratoriais e os padrões de qualidade.

Para as concentrações de N-NH₃, N-NO₃⁻ e N-NO₂⁻, utilizou-se o método colorimétrico, empregando um sistema de análise por injeção em fluxo (modelo 2500, Fialab Instruments, Seattle, EUA). A quantificação de N-NH₃ baseou-se no método colorimétrico de Berthelot, em que N-NH₃ reage com hipoclorito e salicilato de sódio em pH 12, formando um complexo cuja absorvância é medida a 650 nm. A determinação de N-NO₂⁻ foi realizada em meio ácido (pH entre 2,0 e 2,5), usando sulfanilamida e N-(1-naftil) etilenodiamina dicloridrato, o que produziu uma coloração azul-avermelhada, medida a 550 nm. A concentração de N-NO₃⁻ foi avaliada após redução a N-NO₂⁻ em uma coluna de cádmio e medição subsequente.

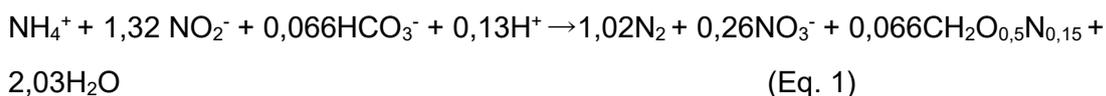
Para a quantificação do Carbono Orgânico Total (COT), foi empregado um analisador de COT (TOC-LCPH/CPN, Shimadzu, Kyoto, Japão), conforme as especificações do fabricante. As curvas de calibração foram geradas a partir de soluções padrão de biftalato de sódio (C₈H₅NaO₄), previamente secas a 105 °C, para obtenção

de soluções padrão de 1000 mg COT L⁻¹. A alcalinidade foi verificada usando uma solução de ácido sulfúrico 0,05 mol L⁻¹, padronizada contra Tris (Hidroximetil) Aminometano (Merck).

Para a alcalinidade, as medições foram feitas usando um titulador automático (modelo 848 Titrino plus, Metrohm, Herisau, Suíça). As soluções padrão para calibração das concentrações de N-NH₃ (2–10 mgN L⁻¹), N-NO₃⁻ (0,1–3 mgN L⁻¹) e N-NO₂⁻ (0,1–2,0 mgN L⁻¹) foram preparadas por diluição seriada a partir de padrões fornecidos pela Merck (Darmstadt, Alemanha).

5.2.7. Cálculo dos Coeficientes Estequiométricos

Os coeficientes estequiométricos do processo anammox (Equação 1) foram acompanhados e calculados com base no balanço de massa das espécies químicas envolvidas, conforme descrito por Strous *et al.* (1998) e, posteriormente, comparados com os valores reportados por Shi *et al.*, (2017).



5.2.8. Distribuição Grânulométrica

A análise da distribuição média de tamanho dos grânulos foi realizada utilizando uma série de peneiras do tipo Tyler, seguindo uma metodologia adaptada de Qian *et al.* (2022). Os diâmetros das peneiras utilizadas incluíram 2,38; 1,41; 0,70; 0,60; 0,30; 0,25; 0,21; 0,149 e 0,125 mm, respectivamente. Para realização das análises, uma alíquota de 1,5 L de lodo era retirada para a realização da análise.

5.2.9. Extração do DNA, quantificação das bibliotecas e sequenciamento

5.2.9.1. Procedimentos de Sequenciamento e Análise de Dados

Foram coletadas amostras (cerca de 5 g) no dia da inoculação dos reatores (dia 0) e nos dias 495 e 700 de operação para análise de comunidades microbianas por sequenciamento. Este estudo foi realizado utilizando-se a tecnologia de alto desempenho para as regiões V3/V4 do gene 16S rRNA. O preparo das bibliotecas foi conduzido seguindo um protocolo do laboratório responsável pelas análises (Neopropecta Microbiome Technologies (Florianópolis, Brasil)).

A amplificação foi realizada utilizando os primers 341F (CCTACGGGRRSGCAGCAG) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT), conforme descrito na literatura (Caporaso *et al.*, 2012; Wang; Qian, 2009). O sequenciamento foi efetuado no sistema MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., EUA), utilizando kits V2 com 500 ciclos em formato paired-end.

5.2.9.2. Controle de Qualidade e Análise Bioinformática

Os arquivos gerados no formato fastq foram submetidos a análises de qualidade de Phred (QP) utilizando o software FastQC v.0.11.8 (Thrash; Arick; Peterson, 2018). Sequências de baixa qualidade (QP < 20) e primers foram removidos utilizando um software proprietário construído em Python v.3.6, baseado nas funcionalidades do projeto BioPython (Cock *et al.*, 2009). Para dados paired-end, os pares de arquivos (R1 e R2) foram unidos em um único arquivo por meio do programa pandaseq v.2.11 (Masella *et al.*, 2012). Clusters com abundância inferior a 5 foram excluídos das análises para minimizar a interferência de sequências quiméricas (Smyth *et al.*, 2010).

A identificação taxonômica foi realizada por meio do programa blastn v.2.6.0+ (Altschul *et al.*, 1990), utilizando como referência um banco de dados público ou proprietário. A definição das espécies considerou 99% de identidade e seguiu critérios baseados em maior bit-score, menor e-value e representatividade taxonômica dos hits obtidos.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1. Comportamento e desempenho de remoção de Nitrogênio

As Cargas de Nitrogênio Aplicadas (CNA) ao sistema, além do consumo e eficiência de remoção de nitrogênio (ERN) do processo ao longo dos 700 dia de operação, estão mostrados na Figura 5-3.

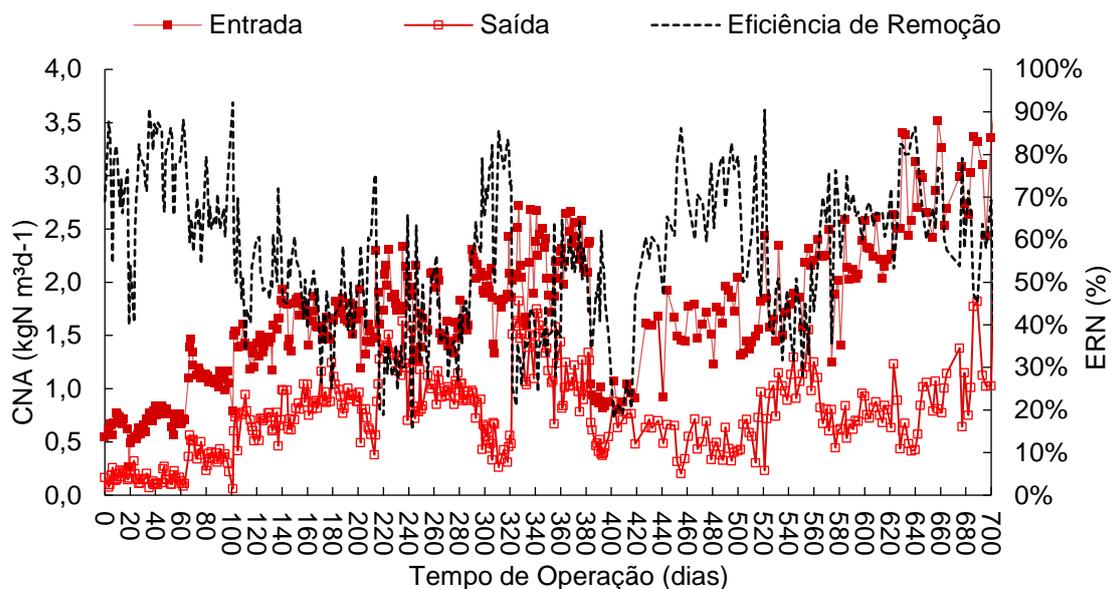


Figura 5-3 Cargas de Nitrogênio Aplicadas (CNA) e Eficiência de Remoção de Nitrogênio (ERN) durante os 700 dias de operação.

As progressões de CNA foram realizadas gradualmente, mediante o aumento controlado da vazão de alimentação, mantendo-se a concentração de nitrogênio total (NT) fixa em 200 mg L⁻¹. As vazões aplicadas variaram entre 66 mL min⁻¹ e 300 mL min⁻¹, resultando em uma CNA inicial de $0,61 \pm 0,06$ kg N m⁻³ d⁻¹ e final de $2,66 \pm 0,27$ kg N m⁻³ d⁻¹. As eficiências de remoção de nitrogênio (ERN) observadas foram de $75\% \pm 0,09$ no início e de $72 \pm 0,09\%$ ao término dos 700 dias de operação.

Observou-se que, ao longo de todo o período de operação, o sistema não foi capaz de remover integralmente a carga de nitrogênio disponível. Ainda assim, houve aumentos sucessivos da CNA no reator e, apesar de algumas intercorrências e períodos de instabilidade, o sistema apresentou ERN consideráveis. No total, foram realizados 11 aumentos de vazão. Após os primeiros 66 dias de operação, ocorreu o primeiro aumento de vazão de 66 para 88 mL min⁻¹, elevando a CNA para $0,84 \pm 0,06$ kg N m⁻³ d⁻¹ e resultando em uma leve redução na ERN para $67 \pm 0,06\%$. A partir do dia 100 de operação, uma nova CNA foi aplicada, aumentando a vazão para 120 mL min⁻¹, de forma que alcança $1,06 \pm 0,07$ kg N m⁻³ d⁻¹ e ERN de $52 \pm 0,06\%$.

Entre os dias 160 e 250, o reator apresentou instabilidades, com uma redução da ERN para valores próximos a 40%. Esse comportamento pode estar associado ao fato de que o lodo anammox utilizado na inoculação dos reatores estava anteriormente sendo alimentado com efluente sintético. Estudos prévios indicam que a presença de matéria orgânica residual proveniente do digestato pode exercer pressão seletiva para favorecer espécies mais tolerantes ao carbono, provocando a substituição de

Candidatus Jettenia por *Candidatus Brocadia* (Bonassa *et al.*, 2021b; Chini *et al.*, 2020). Embora tenha ocorrido uma queda significativa na ERN, não foi detectado nenhum processo inibitório, como acúmulo de amônia livre ou ácido nitroso.

A partir do dia 318, o sistema voltou a apresentar baixas eficiências. Novamente, sem sinais de inibição, foram realizados ajustes no reator para melhorar a distribuição do substrato, incluindo a substituição e limpeza das mangueiras de alimentação internas. Adicionalmente, foi inserida uma peneira com abertura de 0,3 mm na saída do reator, para minimizar a perda de flocos, sendo o lodo retido devolvido ao sistema diariamente. Contudo, as eficiências continuaram baixas, o que motivou a instalação de uma bomba periférica de alta vazão (Foxlux, 64.04) com um controlador de tempo, programado para ligar 2x ao dia por 3 segundos; isso visa otimizar a mistura do lodo e a distribuição do substrato no interior do reator.

No entanto, no dia 391, o controlador da bomba falhou, acionando a bomba por um período prolongado, o que resultou na moagem dos grânulos de lodo e no transbordamento do reator. Em consequência, a CNA do sistema, que estava em $2,24 \pm 0,23 \text{ kg N m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, foi reduzida para $0,94 \pm 0,09 \text{ kg N m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, ajustando a vazão para 100 mL min^{-1} , até que o sistema recuperasse sua estabilidade.

A partir do dia 440, observou-se uma melhora no consumo de nitrogênio, com aumento na eficiência de remoção para $63\% \pm 0,12$. Ao final do experimento, o reator operava com uma CNA de $2,66 \pm 0,27 \text{ kg N m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ e uma eficiência média de $7 \pm 0,09\%$.

Avaliando o comportamento do reator, nota-se que a eficiência foi relativamente baixa para reatores com atividade anammox. Nesse sistema, não houve o consórcio microbiológico entre as BOA com as anammox, além de não ter ocorrido o processo de nitrificação parcial e anammox (NP/A). Alguns valores da literatura também alcançaram eficiências baixas em processos anammox alimentados com efluente real: ERN: 66,6% e CNA: $1,2 \text{ g N m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ (Xu *et al.*, 2025), CNA – $1,19 \text{ g N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$; ERN – 50,0%, contudo, esses estudos utilizaram o consórcio de bactérias oxidadoras de amônia e anammox para remoção de nitrogênio. Alguns autores citam a importância da heterogeneidade do biofilme para a cooperação e melhoria na remoção de nitrogênio de reatores baseados em anammox, o que reduz a competição e aumenta a cooperação entre os grupos microbiológicos (Fernández *et al.*, 2008).

5.3.5. Coeficientes Estequiométricos

Um dos fatores chave de controle do processo e que determina a estabilidade operacional do anammox é a estequiometria; a mais conhecida e proposta inicialmente foi a de Strous *et al.* (1998). Os coeficientes estequiométricos das espécies químicas

envolvidas no processo anammox, ao longo dos 700 dias de operação, foram calculados para verificar a atividade biológica no reator (Figura 5-4).

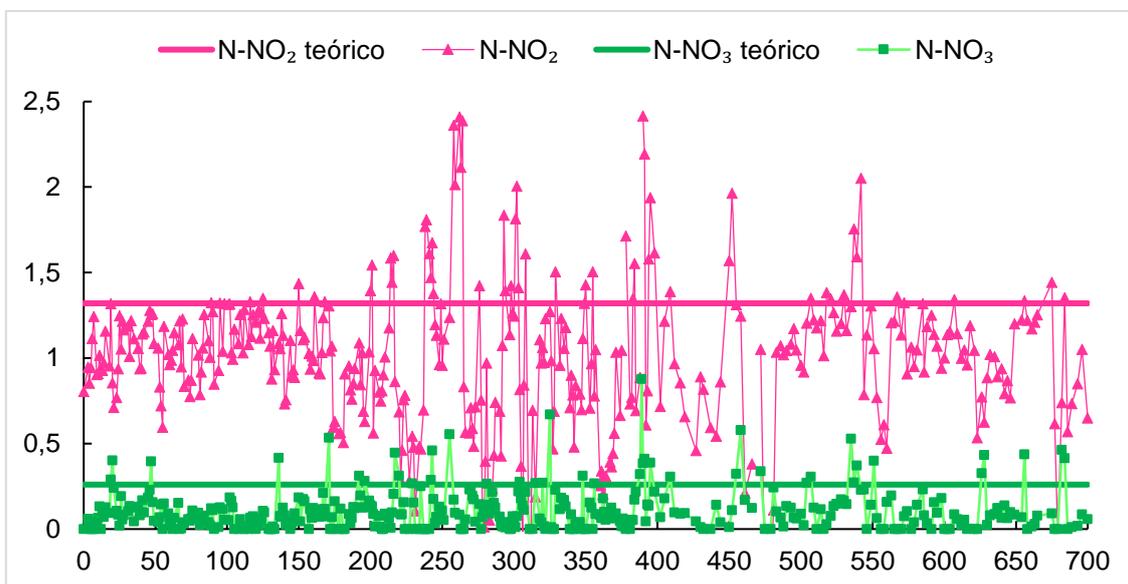


Figura 5-4 Coeficientes estequiométricos teóricos comparados aos coeficientes calculados durante os 700 dias de operação do reator.

Os coeficientes estequiométricos no sistema apresentaram instabilidade em dois períodos específicos: entre os dias 172 e 290 e 400 a 425, com valores médios de $1,06 \pm 0,39$ para nitrito (NO_2^-) e $0,07 \pm 0,07$ para nitrato (NO_3^-). Essa variabilidade sugere a possível contribuição de outros grupos microbiológicos competindo pelo substrato. Observa-se, em particular, a atividade de bactérias oxidantes de amônia (BOA), responsáveis pela conversão de amônia (NH_3) em nitrito (NO_2^-), via nitrificação, e de bactérias oxidantes de nitrito (BON), que promovem a conversão de NO_2^- em NO_3^- via nitratação.

Embora o reator não fosse aerado, a literatura documenta a prevalência de BOA, arqueas e até de organismos comammox (bactérias que realizam a conversão direta de amônia em nitrato) em sistemas com concentrações extremamente baixas de oxigênio dissolvido (com valores monitorados $<0,1 \text{ mg L}^{-1}$), o que pode explicar a presença dessas reações em um ambiente predominantemente anóxico (Kits *et al.*, 2017).

A concentração de nitrato no sistema foi inferior ao esperado segundo os coeficientes estequiométricos clássicos do processo Anammox ($0,26$ para NO_3^-). Esse desvio pode ser atribuído à presença de carbono orgânico residual do efluente da digestão anaeróbia, que potencialmente facilita a redução desassimilatória de nitrato ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$) e a desnitrificação autotrófica ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2$), realizada por bactérias heterotróficas presentes no sistema (Zhang *et al.*, 2018). A média de carbono orgânico total na entrada do reator durante todo o período foi de $16,4 \pm 3,46$; a saída foi de $15,02$

$\pm 3,24$, com uma relação C/N de $0,26 \pm 0,15$, o que proporciona pouco efeito antagônico ao processo anammox. Essas oscilações também podem indicar a ocorrência de processos endógenos no sistema ao longo dos 700 dias de operação.

Estudos recentes discutem a estequiometria ideal para o processo Anammox, destacando a importância da relação nitrito-amônia para a estabilidade e eficiência do sistema. A compreensão dessas relações é fundamental para o monitoramento e controle de reatores baseados em anammox (Adams; Issaka; Chen, 2025). Em alguns casos, o nitrito pode ser preferencialmente utilizado para desnitrificação de atalho na presença de uma fonte de carbono orgânico, limitando o substrato de nitrito para anammox (Su *et al.*, 2022).

Um modelo proposto por Zhang *et al.* (2018) sugere que a estequiometria do processo Anammox está correlacionada com a carga de nitrogênio aplicada (CNA), com coeficientes estequiométricos de 1,146, para NO_2^- , e 0,161, para NO_3^- . Segundo os autores, uma CNA elevada favorece um aumento na produção de biomassa, o que ocasiona o incremento na produção de nitrato. Modelos anteriores estabeleceram coeficientes para cargas de nitrogênio mais baixas ($<1,5 \text{ gN L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ - Lotti *et al.*, 2014) e muito altas ($>15 \text{ gN L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ - Strous *et al.*, 1998), o que reforça que o desempenho anammox é altamente dependente das condições de operação e da concentração de nitrogênio aplicada ao sistema.

5.3.6. Distribuição granulométrica e Atividade do lodo anammox

A distribuição granulométrica do lodo anammox é reconhecida como um parâmetro crítico que influencia diretamente o desempenho dos sistemas de remoção de N (Volcke *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2024). Análises granulométricas foram realizadas nos dias 0, 50, 100, 150, 200, 421, 495, 526 e 700 para monitorar a evolução das características do lodo durante o período de operação do reator (Figura 5-5).

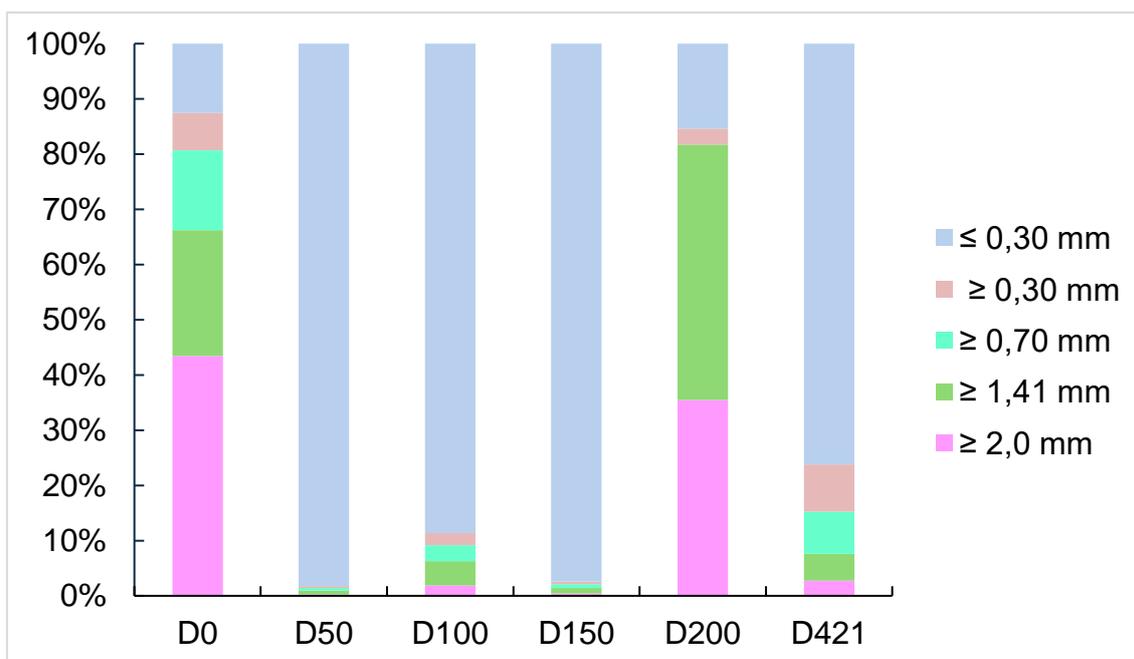


Figura 5-5 Distribuição granulométrica dos dias 50, 100, 150, 200 e 421 do reator.

Como é possível observar na Figura 4, o lodo anammox, utilizado para inoculação do reator (D0), apresentava 41,25% de grânulos com tamanho maior ou igual a 2,0 mm, além de aproximadamente 22,04% de grânulos com tamanho médio de 1,41 mm. Nota-se que 12,1% do lodo apresentavam característica floclulenta, ou seja, $\leq 0,3$ mm.

Entre D50 e D150, houve uma redução significativa no tamanho granular, com 96,5% do lodo tornando-se floclulento ($\leq 0,3$ mm). Essa alteração pode estar associada à substituição do efluente sintético pelo digestato da suinocultura suplementado com nitrito de sódio (NaNO_2), conforme relatado em outros estudos anteriores (Magrí *et al.*, 2012). A mudança na fonte de alimentação do reator, contendo matéria orgânica, promoveu a substituição de *Candidatus Jettenia* por *Candidatus Brocadia* (ver item 5.3.7), uma espécie mais tolerante a concentrações de carbono orgânico total (COT) características de efluentes de digestão anaeróbia (Chini *et al.*, 2020).

Em D200, o lodo começou a recuperar sua granulação, com 28% apresentando diâmetro médio de 2 mm, 36% com 1,41 mm e 12% floclulento ($\leq 0,3$ mm). Em D421 (ver item 5.2.3), a proporção de partículas $\leq 0,3$ mm aumentou para 76% (Figura 5) com um lodo de característica predominantemente floclulenta. A Figura 5-6 dispõe as distribuições granulométricas dos dias 495, 526 e 700 do reator.

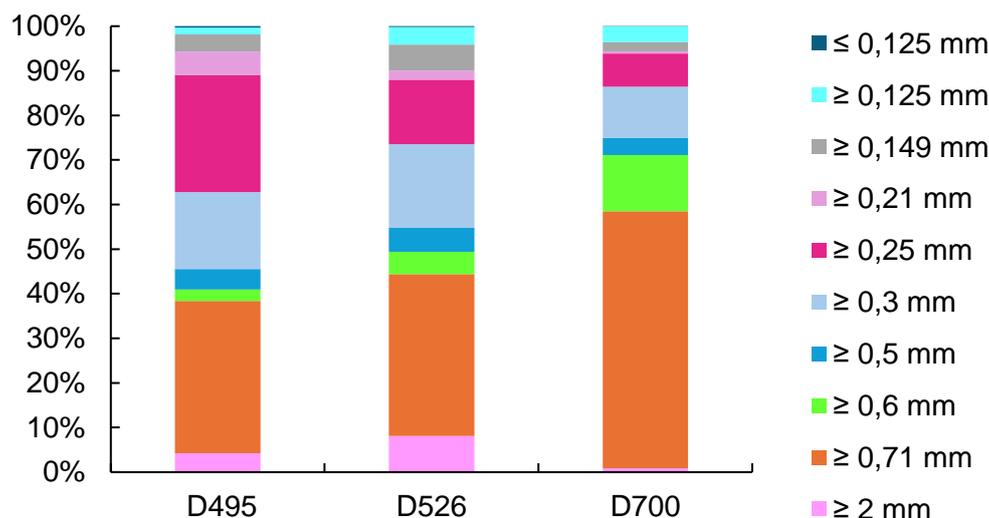


Figura 5-6 Distribuição granulométrica dos dias 495, 526 e 700 do reator.

Em D495, o lodo apresentou uma recuperação gradual, mantendo características semelhantes até D700. Durante esse período, houve um aumento na proporção de grânulos com tamanho médio de 0,7 mm, atingindo 57,7%, em D700, enquanto o percentual de partículas maiores (2 mm) reduziu de 8%, em D526, para 1%, em D700. As partículas menores também diminuíram: tamanhos de 0,25 mm caíram de 26% (D495) para 7,4% (D700) e 0,3 mm reduziram de 18,7% (D526) para 11% (D700).

O tamanho granular está diretamente relacionado à eficiência de sedimentação e transferência de massa, aspectos essenciais para a remoção de nitrogênio em processos anammox (Cavaler *et al.*, 2024). Estudos prévios demonstram que o tamanho dos grânulos impacta a estabilidade do sistema e a taxa de remoção de nitrogênio (Song *et al.*, 2023). Foi relatada uma redução na atividade anammox em grânulos menores que 0,2 mm ou maiores que 1,0 mm (Liu *et al.*, 2017), enquanto outros autores observaram impactos negativos em grânulos com tamanhos inferiores a 0,5 mm ou superiores a 0,9 mm (Zhu *et al.*, 2018).

As taxas específicas de consumo de amônia ($\mu\text{N-NH}_3$) corroboram a evolução da distribuição granulométrica. Aos 90 dias de operação, $\mu\text{N-NH}_3$ foi de $0,57 \text{ mgN gSSV}^{-1} \text{ h}^{-1}$, quando 79% do lodo eram flocculentos. Em D200, a taxa aumentou para $2,25 \text{ mgN gSSV}^{-1} \text{ h}^{-1}$, coincidente com o aumento de grânulos médios entre 2 mm e 1,41 mm (64%). Durante o incidente de moagem dos grânulos, a atividade caiu para $0,79 \text{ mgN gSSV}^{-1} \text{ h}^{-1}$, mas voltou a $1,4 \text{ mgN gSSV}^{-1} \text{ h}^{-1}$, em D483, em paralelo com a recuperação da granulação do sistema.

Embora o tamanho de partícula seja um parâmetro importante, o grânulo não é composto apenas por bactérias anammox. Faixas de grânulos com diâmetros de 0,5 a

25 mm apresentaram uma variabilidade de microrganismos, concentrando bactérias anammox apenas na camada externa (Zhu *et al.*, 2018).

5.3.7. Comunidade microbiana

O processo anammox não ocorre pela ação de um único microrganismo, mas sim por meio de interações complexas, como predação, competição e mutualismo, que permitem alcançar a remoção eficiente do nitrogênio. Portanto, a comunidade microbiológica do lodo é um parâmetro crucial para entender o comportamento do processo como um todo (Wang *et al.*, 2024). A Figura 5-7 apresenta os resultados obtidos para os dias 0, 495 e 700 de operação do reator, detalhando a distribuição das comunidades microbianas em nível de filo.

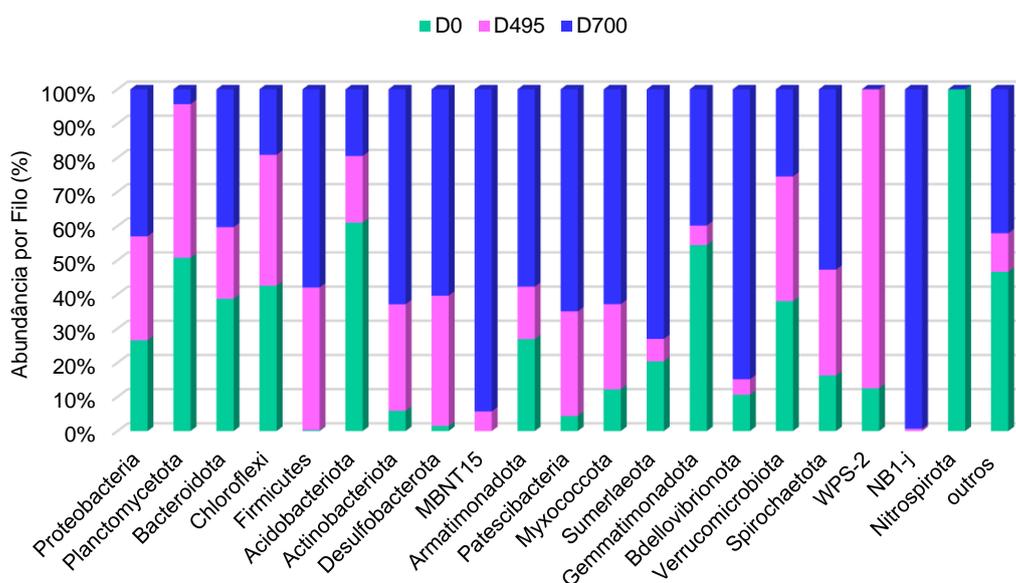


Figura 5-7 Abundância relativa dos microrganismos por filo durante os dias 495, 700 e no inóculo (D0).

Durante a operação do reator, observou-se que a composição microbiana manteve padrões consistentes entre o inóculo (D0) e o dia 495 (D495). Os filos predominantes foram *Planctomycetota* (32,4% em D0 e 28,72% em D495), *Proteobacteria* (19,52% em D0 e 22,4% em D495), *Bacteroidota* (19,52% em D0 e 10,6% em D495) e *Chloroflexi* (19,01% em D0 e 17,13% em D495). No dia 495, também foi observado um aumento na abundância de *Firmicutes*, que atingiu 13,71%.

Ao final do experimento (D700), a dinâmica microbiana apresentou mudanças significativas. *Proteobacteria* tornou-se o filo dominante, representando 31,64% da comunidade, seguido por *Bacteroidota* (20,36%), *Firmicutes* (19,04%), *Chloroflexi*

(8,57%) e *Actinobacteria* (3,51%). *Planctomycetota* reduziram-se significativamente, totalizando apenas 2,8% da abundância.

Os principais filos identificados desempenham papéis cruciais no ciclo do nitrogênio. *Proteobacteria*, *Planctomycetota* e *Bacteroidota* participam ativamente de todas as etapas das vias metabólicas, incluindo processos de desnitrificação e redução desassimilatória do nitrato. Além disso, *Bacteroidota*, *Actinobacteria* e *Chloroflexi* contribuem para a nitrificação completa e a redução assimilativa do nitrato (Fan; Sun, 2024).

A presença consistente desses filos ao longo do tempo destaca sua importância em reatores anammox. Mesmo diante de variações nas condições operacionais, nos tipos de efluentes e nas características do inóculo, essas comunidades microbianas demonstram uma notável capacidade de adaptação e resiliência (Cho *et al.*, 2010).

Proteobacterias eram abundantes em 19,5%, em D0, 22,34%, em D495, e aumentando gradualmente para 31,64%, em D700. As bactérias desse filo apresentam-se em forma de bastonetes, de maneira que realizam desnitrificação via nitrato, processo heterotrófico que é favorecido com a presença de matéria orgânica (Silveira *et al.*, 2021). Além disso, abundâncias maiores desse filo em reatores anammox aparentam ser benéficas ao processo, uma vez que essas bactérias possuem a função de sintetizar SPE (Hung *et al.*, 2022).

O filo *Chloroflexi* apresentou uma redução significativa ao longo do processo, diminuindo de 19,7%, em D0, para 8,57%, em D700. Já os *Bacteroidota*, mantiveram-se relativamente constantes, com abundância em torno de 20% nos dias iniciais e finais, embora tenham mostrado uma redução temporária para 10,6%, em D495. Ambos desempenham um papel crucial na granulação do lodo anammox, pois se associam às bactérias anammox, o que contribui para a absorção de material celular proveniente da decomposição de outras bactérias (Silveira *et al.*, 2021).

Firmicutes não foram detectadas no início do experimento (D0), mas surgiram em D495 com uma abundância de 13,7%, atingindo 19% em D700. Esse filo está relacionado à decomposição bacteriana por meio da acidificação hidrolítica, um processo relevante para a estabilidade do sistema anammox (Wang *et al.*, 2024).

Os resultados taxonômicos ao longo dos dias de operação corroboram o comportamento observado durante todo o período experimental do reator. Para complementar as análises em nível de filo, a Figura 5-8 apresenta a distribuição da abundância microbiana em nível de gênero.

Gênero	D0	D495	D700
<i>Denitratisoma</i>	8,21	16,88	7,65
<i>Candidatus_Brocadia</i>	0,31	25,85	0,85
<i>Candidatus_Jettenia</i>	31,84	2,64	1,49
<i>Clostridium_sensu_stricto_1</i>	0,00	7,19	9,54
<i>SJA-28_ge</i>	12,32	1,58	4,53
<i>SBR1031_ge</i>	11,29	4,17	1,07
<i>RBG-13-54-9_ge</i>	1,77	5,86	2,41
<i>Kapabacteriales_ge</i>	4,54	1,61	4,85
<i>Turcibacter</i>	0,01	3,62	3,09
<i>Anaerolineaceae_ge</i>	0,30	3,34	2,27
<i>Comamonadaceae_unclassified</i>	0,13	0,85	5,05
<i>Sphingobacteriales_unclassified</i>	0,00	1,50	3,01
<i>Limnobacter</i>	1,63	1,06	1,74
<i>AKYH767_ge</i>	1,36	1,81	0,21
<i>Desulfobacterota_ge</i>	0,00	1,42	2,12
<i>Subgroup_10</i>	3,68	0,22	0,01
<i>A4b_ge</i>	2,26	0,75	0,51
<i>OLB13</i>	1,27	1,40	0,36
<i>Nitrosomonas</i>	3,43	0,20	0,12
<i>Bacteroidetes_VC2.1_Bac22_ge</i>	0,00	0,63	2,57
<i>Outros</i>	15,65	17,42	46,55

Figura 5-8 Abundância relativa dos microrganismos por gênero durante os dias 0, 495 e 700 de operação do sistema. Vermelho indica maior abundância e verde menor abundância.

Nos primeiros 100 dias de operação, o reator apresentou instabilidades, como esperado, devido à adaptação do inóculo ao efluente suinícola. Durante essa fase, o gênero predominante era *Candidatus Jettenia*, com uma abundância de 31,84%. Esse gênero é conhecido na literatura por ser sensível a concentrações elevadas de carbono orgânico (Chini *et al.*, 2020), o que explica a transição para *Candidatus Brocadia*, que alcançou 25,85% em D495.

É necessário ressaltar que, em D421, o reator passou por um problema operacional, o que resultou na desintegração total da biomassa. Durante esse período, a proporção combinada de *Candidatus Jettenia* e *Candidatus Brocadia* foi reduzida a pouco mais de 4%.

A recuperação rápida da abundância do lodo anammox em apenas 70 dias foi um resultado surpreendente e positivo. Essa recuperação não apenas indicou a resiliência da comunidade microbiana, mas também foi acompanhada por melhorias na atividade anammox e na granulometria do lodo (ver item 5.3.3).

Ao final do experimento, a proporção de *Candidatus Brocadia* era de 0,85%, com 1,5% de *Candidatus Jettenia*. Apesar de oscilações nos coeficientes estequiométricos, e do consumo reduzido de nitrogênio do dia 500 ao dia 700, o sistema aparentava

estabilidade, não corroborando a redução abrupta de abundância anammox. Outros gêneros, como *Clostridium*, *Denitratisoma*, *Comamonadaceae* e *Kapabacteriales*, totalizavam 9,5%, 7,60%, 5,01% e 4,85%, respectivamente.

Comamonadaceae é geralmente detectada em tratamentos de águas residuais baseados em lodos ativados, em escala plena e em experimentos de laboratório, sendo conhecida por consumir uma ampla variedade de ácidos orgânicos, incluindo aminoácidos (Ge; Batstone; Keller, 2015). Pouco se sabe sobre as *kapabacteriales*, mas, em estudos anteriores, fora relatado que utilizam acetato por meio da via latente de glioxilato detectada pela análise genômica (Ding *et al.*, 2023). Ambas coexistem em processos biológicos de tratamento, juntamente com as anammox (Guo *et al.*, 2023).

Concentrações de matéria orgânica presentes em águas residuais favorecem e beneficiam o desenvolvimento de bactérias heterotróficas, desnitrificantes, como *Denitratisoma*, *Thauera* e *Pseudomonas*. Elas podem competir com as anammox por substrato (NO_2^-), além do tempo de duplicação menor, o que favorece o aumento da população heterotrófica (Witkabel; Abendroth, 2024). Neste estudo, há a presença de carbono orgânico residual oriundo ainda dos processos de DA (ver item 5.3.5); atrelada à presença desses grupos microbiológicos, corroboram a possível concorrência de bactérias heterotróficas e anammox por substrato.

Bactérias anammox, desnitrificantes e algumas heterotróficas podem formar sistemas simbióticos de degradação, o que facilita a remoção conjunta de nitrogênio e carbono. Essa interação sinérgica já foi documentada em estudos anteriores, de maneira que se destaca sua importância para a eficiência dos processos de tratamento de efluentes (Su *et al.*, 2022).

Os gêneros microbianos identificados neste estudo, como SJA-28, apresentaram correlação positiva com *Comamonadaceae* e *Thauera*, enquanto o gênero SJA-15 mostrou correlação positiva com *Limnobacter* e *Comamonadaceae*. Essas interações sugerem que bactérias heterotróficas utilizam fontes de carbono conforme a demanda das bactérias desnitrificantes, além de fornecer material orgânico biodegradável por meio da acidificação hidrolítica de materiais celulares e peptídeos extracelulares. Esse processo contribui para a redução de lodo no sistema e auxilia a formação de bioagregados, como grânulos, biofilmes e flocos, beneficiando o processo anammox (Yang *et al.*, 2020).

5.4. Conclusão

O reator demonstrou eficiência satisfatória na formação e produção de lodo granular, apresentando uma capacidade significativa de granulação ao longo do período

de operação. Os grânulos formados evidenciaram um diâmetro médio variando entre 0,7 a 2 mm, o que é considerado ideal para o processo; isso favorece a sedimentação e a retenção da biomassa. A formação de grânulos estáveis sugere uma interação eficaz entre as bactérias anammox e o meio, promovendo a coesão das partículas e contribuindo para a estabilidade operacional do sistema.

Apesar da intensa competição microbiológica, o sistema demonstrou um desempenho eficiente no processo anammox, alcançando uma abundância de 25% de *Candidatus Brocadia* após 495 dias de operação. A eficiência média global de remoção de nitrogênio foi de aproximadamente 70%, indicando uma performance significativa na redução dos compostos nitrogenados. Além disso, o sistema proporcionou uma capacidade máxima de consumo de nitrogênio amoniacal (CNA), de $2,66 \pm 0,27 \text{ kg N m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, evidenciando sua robustez e habilidade de adaptação ao longo do tempo. Esses resultados sugerem que o processo foi bem-sucedido em manter a dinâmica microbiológica necessária para uma eficiente remoção de nitrogênio, mesmo em condições competitivas.

As interações microbiológicas no sistema foram predominantemente mediadas por bactérias anammox, heterotróficas e desnitrificantes, visto que o reator não possuía uma fonte de oxigênio dissolvido, mas sim residuais de carbono orgânico. A ausência de oxigênio favoreceu a predominância de processos anaeróbios, inibindo a proliferação de bactérias oxidantes de amônia (BOA), que dependem da presença de oxigênio para a oxidação do amônio. Dessa forma, as condições ambientais do sistema favoreceram a seleção de microrganismos adaptados a ambientes com baixa disponibilidade de oxigênio, promovendo a desnitrificação e as reações anammox como principais vias metabólicas para a remoção de nitrogênio.

5.5. Referências

Apêndice A. Dados suplementares

Ao final das referências, constará o material suplementar apresentado para o artigo 1 (Tabela S1, Figura S1, Figura S2, Figura S3).

ADAMS, M.; ISSAKA, E.; CHEN, C. Anammox-based technologies: A review of recent advances, mechanism, and bottlenecks. **Journal of Environmental Sciences**, [s.l.], v. 148, p. 151-173, fev. 2025.

ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, [s.l.], v. 215, n. 3, p. 403-410, out. 1990.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 23rd edition ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2017.

BONASSA, G. *et al.* A new kinetic model to predict substrate inhibition and better efficiency in an airlift reactor on deammonification process. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 319, p. 124158, jan. 2021a.

BONASSA, G. *et al.* Organic carbon bioavailability: Is it a good driver to choose the best biological nitrogen removal process? **Science of The Total Environment**, [s.l.], v. 786, p. 147390, set. 2021b.

CAPORASO, J. G. *et al.* Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME Journal**, [s.l.], v. 6, n. 8, p. 1621-1624, 1 ago. 2012.

CAVALER, J. P. *et al.* Improvement of Anammox Particle Size Distribution in a Reactor Fed with Real Effluent Using Flow Rate as a Strategy for Loading Rate Increase. **Industrial Biotechnology**, [s.l.], v. 20, n. 4, p. 147-154, ago. 2024.

CHEN, Y. *et al.* Coupling anammox with denitrification in a full-scale combined biological nitrogen removal process for swine wastewater treatment. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 329, p. 124906, jun. 2021.

CHINI, A. *et al.* Process performance and anammox community diversity in a deammonification reactor under progressive nitrogen loading rates for swine wastewater treatment. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 311, p. 123521, 1 set. 2020.

CHO, S. *et al.* Nitrogen removal performance and microbial community analysis of an anaerobic up-flow granular bed anammox reactor. **Chemosphere**, [s.l.], v. 78, n. 9, p. 1129-1135, fev. 2010.

COCK, P. J. A. *et al.* Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 25, n. 11, p. 1422-1423, jun. 2009.

DING, J. *et al.* Long-term effect of acetate and biochar addition on enrichment and activity of denitrifying anaerobic methane oxidation microbes. **Chemosphere**, [s.l.], v. 338, p. 139642, out. 2023.

FAN, L.; SUN, F. Nitrogen metabolism potential in biofilm microbial communities: potential applications in the mariculture wastewater treatment. **Aquacultural Engineering**, [s.l.], v. 104, p. 102387, fev. 2024.

FERNÁNDEZ, I. *et al.* Biofilm and granular systems to improve Anammox biomass retention. **Biochemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 42, n. 3, p. 308-313, dez. 2008.

GUO, X. *et al.* Heterotrophic denitrification: An overlooked factor that contributes to nitrogen removal in n-DAMO mixed culture. **Environmental Research**, [s.l.], v. 216, p. 114802, jan. 2023.

HUNG, C.-M. *et al.* Ecological responses of coral reef to polyethylene microplastics in community structure and extracellular polymeric substances. **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 307, p. 119522, ago. 2022.

KHOSHNEVISAN, S.; BAZGIR, S. Treatment of dye wastewater by direct contact membrane distillation using superhydrophobic nanofibrous high-impact polystyrene membranes. **International Journal of Environmental Science and Technology**, [s.l.], v. 18, n. 6, p. 1513-1528, jun. 2021.

KITS, K. D. *et al.* Kinetic analysis of a complete nitrifier reveals an oligotrophic lifestyle. **Nature**, [s.l.], v. 549, n. 7671, p. 269-272, set. 2017.

LIU, T. *et al.* Evaluation of mainstream nitrogen removal by simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification (SNAD) process in a granule-based reactor. **Chemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 327, p. 973-981, nov. 2017.

LOTTI, T. *et al.* Physiological and kinetic characterization of a suspended cell anammox culture. **Water Research**, [s.l.], v. 60, p. 1-14, set. 2014.

MAGRÍ, A. *et al.* Partial Nitritation of Swine Wastewater in View of Its Coupling with the Anammox Process. **Journal of Environmental Quality**, [s.l.], v. 41, n. 6, p. 1989-2000, nov. 2012.

MANCUSO, G. *et al.* Comprehensive review of technologies for separate digestate treatment and agricultural valorisation within circular and green economy. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 409, p. 131252, out. 2024.

MASELLA, A. P. *et al.* PANDAseq: paired-end assembler for illumina sequences. **BMC Bioinformatics**, [s.l.], v. 13, n. 1, p. 31, dez. 2012.

QIAN, Y. *et al.* Control strategy and performance of simultaneous removal of nitrogen and organic matter in treating swine manure digestate using one reactor with airlift and micro-granule. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 355, p. 127199, jul. 2022.

SHI, Z.-J. *et al.* Mass transfer characteristics, rheological behavior and fractal dimension of anammox granules: The roles of upflow velocity and temperature. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 244, p. 117-124, 1 nov. 2017.

SILVEIRA, N. C. *et al.* Two-stage partial nitrification-Anammox process for nitrogen removal from slaughterhouse wastewater: Evaluation of the nitrogen loading rate and microbial community analysis. **Journal of Environmental Management**, [s.l.], v. 296, p. 113214, out. 2021.

SMYTH, R. P. *et al.* Reducing chimera formation during PCR amplification to ensure accurate genotyping. **Gene**, [s.l.], v. 469, n. 1-2, p. 45-51, dez. 2010.

SONG, Y. *et al.* Anammox-Mediated Hydroxyapatite Granules: Physicochemical Properties, 3D Hierarchy, and Biofilm Thickness. **Environmental Science & Technology**, [s.l.], v. 57, n. 28, p. 10242-10251, jul. 2023.

STROUS, M. *et al.* The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 50, n. 5, p. 589-596, nov. 1998.

SU, B. *et al.* Simultaneous partial nitrification, anammox, and denitrification in an upflow microaerobic membrane bioreactor treating middle concentration of ammonia nitrogen wastewater with low COD/TN ratio. **Chemosphere**, [s.l.], v. 295, p. 133832, mai. 2022.

THRASH, A.; ARICK, M.; PETERSON, D. G. Quack: A quality assurance tool for high throughput sequence data. **Analytical Biochemistry**, [s.l.], v. 548, p. 38-43, mai. 2018.

VIANCELLI, A. *et al.* Bacterial biodiversity from an anaerobic up flow bioreactor with ANAMMOX activity inoculated with swine sludge. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [s.l.], v. 54, n. 5, p. 1035-1041, out. 2011.

VOLCKE, E. I. P. *et al.* The granule size distribution in an anammox-based granular sludge reactor affects the conversion—Implications for modeling. **Biotechnology and Bioengineering**, [s.l.], v. 109, n. 7, p. 1629-1636, jul. 2012.

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**, [s.l.], v. 4, n. 10, p. e7401, out. 2009.

WANG, X. *et al.* Important role of Chloroflexi: Improved the cooperation of anammox community under PFOS stress. **Chemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 499, p. 155950, nov. 2024.

WITKABEL, P.; ABENDROTH, C. A systematic literature review of microbial anammox consortia in UASB/EGSB-reactors. **Chemosphere**, [s.l.], v. 367, p. 143630, nov. 2024.

XU, D. *et al.* Novel ellipsoid-like granules exhibit enhanced anammox performance compared to sphere-like granules. **Water Research X**, [s.l.], v. 25, p. 100270, dez. 2024.

XU, H. *et al.* Metatranscriptomics provides an in-depth perspective on the resistance and detoxification of anammox bacteria to dissolved oxygen in a pilot CANON process. **Water Research**, [s.l.], v. 268, p. 122613, jan. 2025.

YANG, Y. *et al.* Complex microbial nitrogen-cycling networks in three distinct anammox-inoculated wastewater treatment systems. **Water Research**, [s.l.], v. 168, p. 115142, jan. 2020.

ZHANG, X. *et al.* Culturing partial denitrification biofilm in side stream incubator with ordinary activated sludge as inoculum: One step closer to mainstream Anammox upgrade. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 347, p. 126679, mar. 2022.

ZHANG, Y. *et al.* Stoichiometric variation and loading capacity of a high-loading anammox attached film expanded bed (AAEEB) reactor. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 253, p. 130-140, abr. 2018.

ZHU, G. *et al.* Anammox granular sludge in low-ammonium sewage treatment: Not bigger size driving better performance. **Water Research**, [s.l.], v. 142, p. 147-158, out. 2018.

APÊNDICE A

Tabela S1 dimensões de todo o aparato experimental utilizado neste experimento.

Módulo	Reator	Volume (m ³)	Altura (m)	Diâmetro (m)
M1	UASB	1,41	2,90	0,80
	Módulo Vertical	-	2,60	0,70
	Reservatório de digestato diluído	1,56	2,50	0,95
M2	Anammox	0,035	2,00	0,015
	Misturador	0,134	0,70	0,50
	Banho aquecedor	0,134	0,70	0,50
	Nitrito de Sódio concentrado	0,019	0,050	0,027

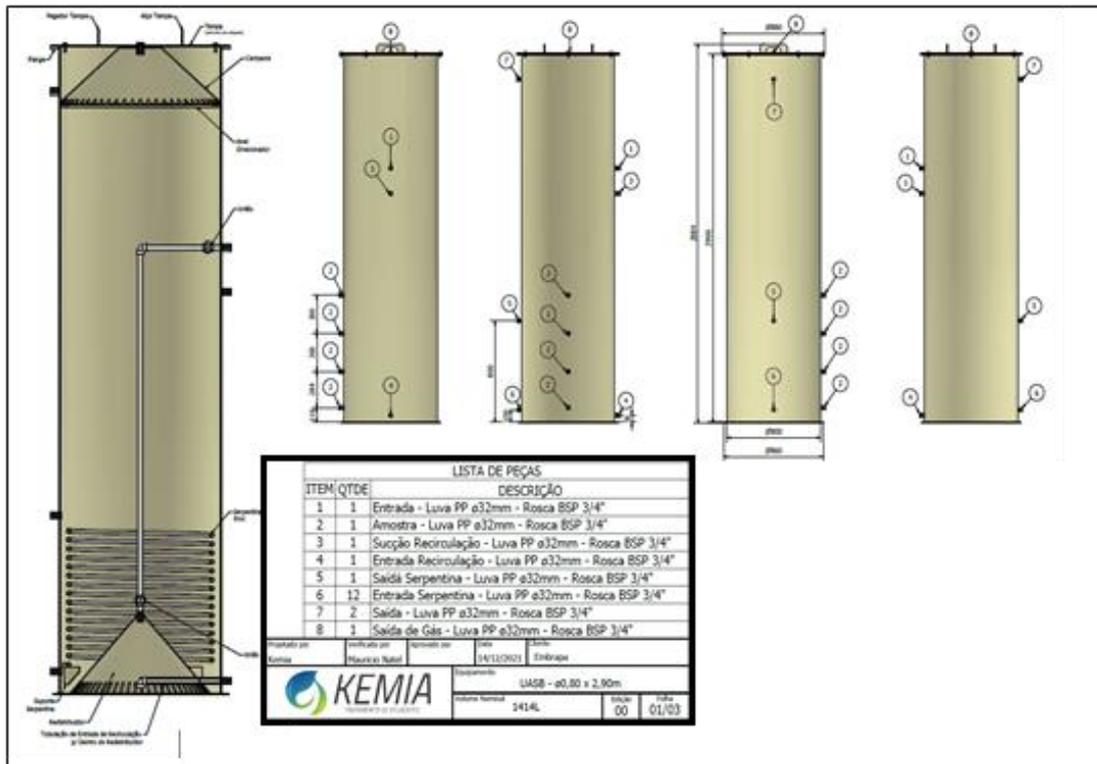


Figura S1 Projeto detalhado do reator UASB, desenvolvido pela empresa parceira do projeto.

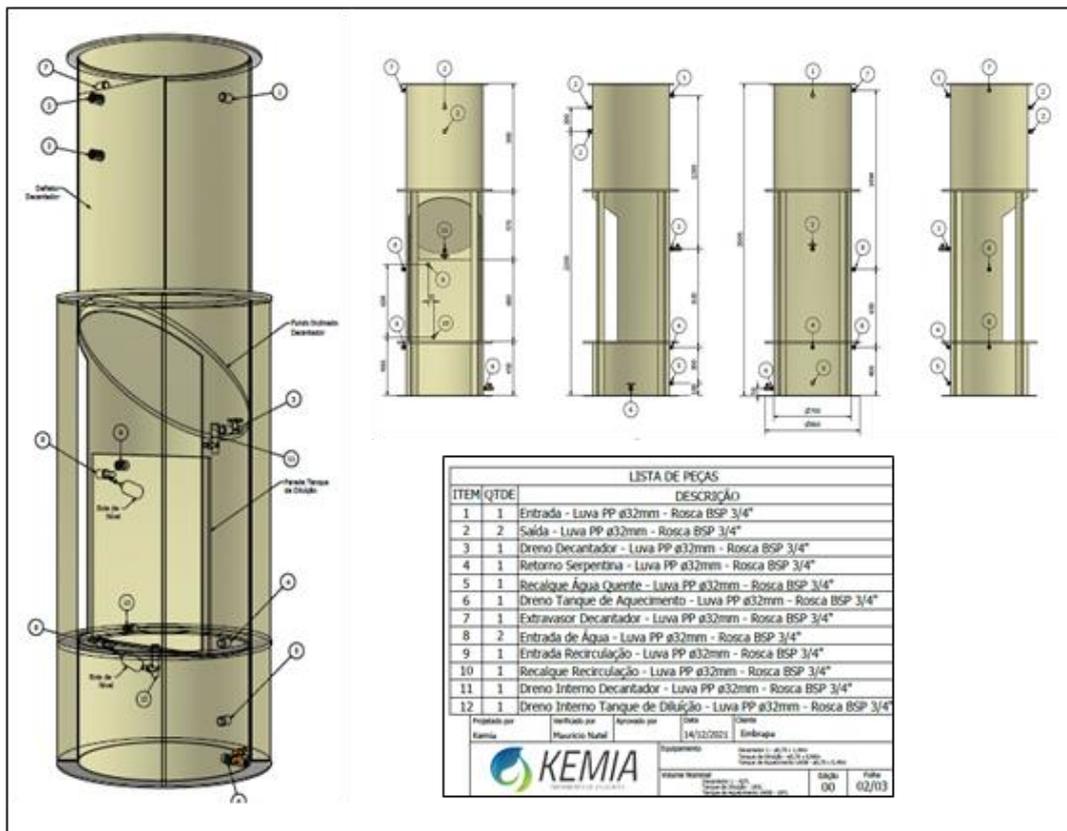


Figura S2 Projeto do sistema três em um, desenvolvido pela empresa parceira do projeto.

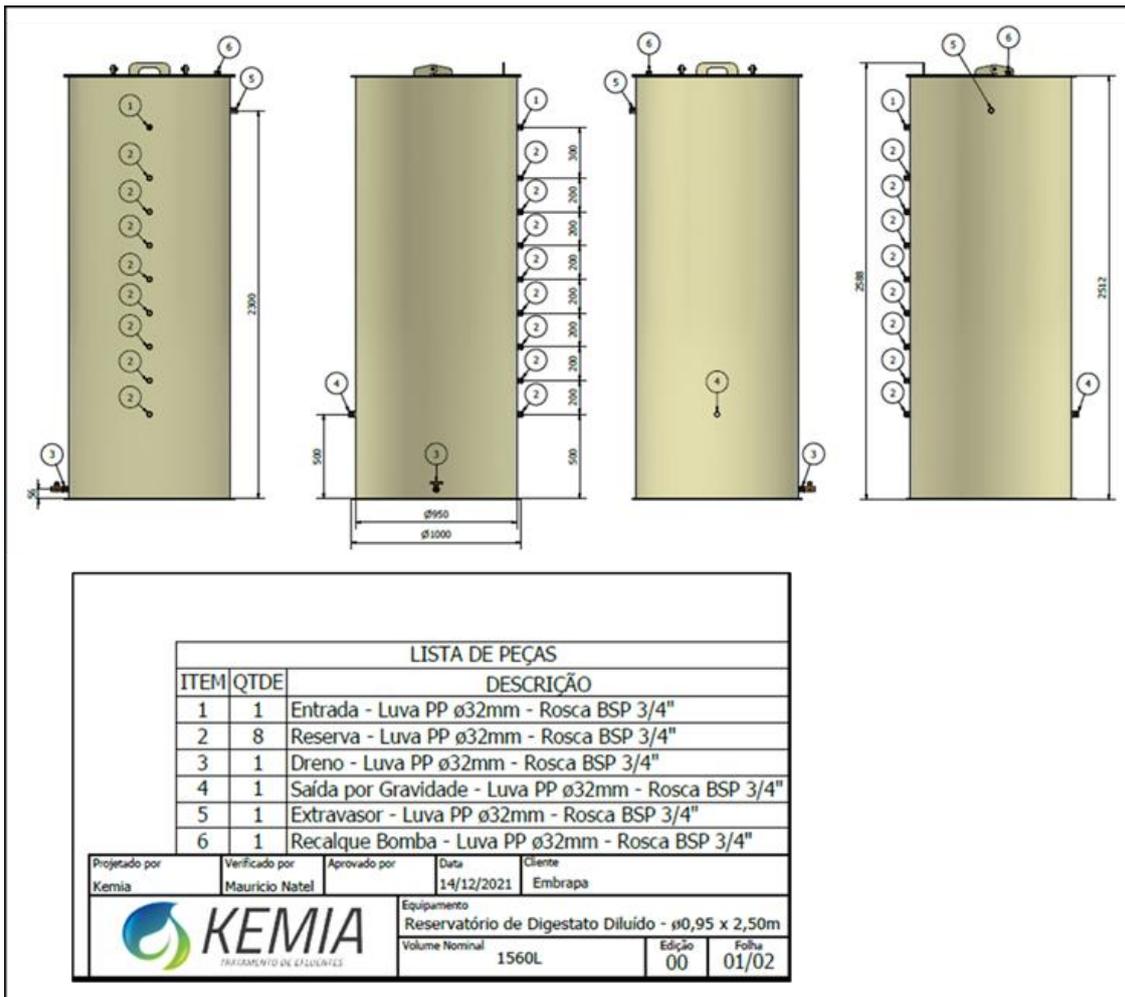


Figura S3 Projeto do tanque pulmão de digestato diluído desenvolvido pela empresa parceira do projeto.

6. ARTIGO 2: INFLUÊNCIA DO CONSÓRCIO MICROBIANO NA ESTABILIDADE E FORMAÇÃO DE GRÂNULOS ANAMMOX: DESAFIOS PARA A IMPLEMENTAÇÃO EM ESCALA REAL.

RESUMO

Este estudo investigou a interação microbiológica e o desempenho de sistemas baseados em anammox, alimentados com digestato da suinocultura. Os reatores RA e RD foram alimentados com digestato da suinocultura diluído em uma concentração de 200 mg L⁻¹ de nitrogênio total. RA foi inoculado com bactérias anammox já aclimadas com efluente real, além de suplementado com NaNO₂ como fonte de nitrito. Já RD, operou em sistema de nitrificação parcial em estágio único, também conhecido como desamonificação. Os dois sistemas demonstraram comportamentos distintos, mas com eficiência média de remoção de nitrogênio satisfatórias (85% em RA e 82% em RD). A distribuição granulométrica do lodo foi analisada ao longo de 260 dias de operação, em que RA formou grânulos e, em RD, ocorreu a formação de biofilmes aderidos às paredes do reator. No entanto, a carga de nitrogênio amoniacal aplicada foi consideravelmente menor no RA do que em RD. A composição da substância polimérica extracelular (SPE) indicou poucas variações na relação proteínas/polissacarídeos dos dois sistemas, evidenciando que, em ambos, o SPE influenciou a estabilidade dos grânulos e biofilmes. Além disso, a análise taxonômica revelou alterações na abundância de filos microbianos, com destaque para as bactérias anammox, que, apesar de apresentarem baixa abundância relativa nos dois processos, evidenciaram uma boa eficiência de remoção de nitrogênio também nos dois processos. A simbiose entre bactérias anammox e heterotróficas foi identificada, apontando a melhor adaptabilidade do reator RD aos aumentos de cargas devido a essa cooperação microbiológica.

Palavras-chave: Anammox. Biofilme. Granulação. Nitrogênio. Substâncias poliméricas extracelulares. Interação microbiana. Digestato de suinocultura.

6.1. Introdução

Em resposta à demanda global por soluções sustentáveis, a indústria de tratamento de águas residuais têm adotado práticas ambientalmente responsáveis e de baixo carbono (Guo *et al.*, 2024). Nesse contexto, o processo anammox destaca-se como uma biotecnologia promissora para a remoção de nitrogênio, superando métodos convencionais, a exemplo da nitrificação/desnitrificação, por apresentar vantagens, como baixo consumo de energia, menores emissões de gases de efeito estufa e a independência de fontes de carbono orgânico (Naufal; Wu, 2024).

A oxidação anaeróbia de amônio é uma reação quimiolitotrófica realizada por bactérias do filo *Planctomycetes*, que utilizam nitrito (NO₂⁻) comoceptor de elétrons, convertendo amônio (NH₄⁺) em nitrogênio gasoso (N₂) e nitrato (NO₃⁻) residual (Su; Zhang; Chen, 2025). Atualmente, sete gêneros de bactérias anammox foram identificados, incluindo *Candidatus Kuenenia*, *Brocadia* e *Jettenia* (Yang *et al.*, 2022).

Todavia, apesar do processo anammox apresentar elevado potencial para tratamento de efluentes com alto teor de nitrogênio amoniacal, desafios, como o lento crescimento das bactérias anammox e a perda de biomassa em reatores, dificultam a sua aplicação em larga escala (Yu *et al.*, 2020). Além disso, fatores, como a interação com outros grupos microbiológicos e as características físico-químicas do ambiente, também desempenham um papel crucial, mas ainda são pouco estudados.

Um fator importante para a estabilidade dos lodos anammox é a produção de substâncias poliméricas extracelulares (SPE), compostas principalmente por proteínas (PN) e polissacarídeos (PS) (Guo *et al.*, 2022b). Essas substâncias influenciam diretamente a estruturação dos lodos, bem como a formação dos grânulos com diferentes relações PN/os, as quais afetam a agregação microbiana e a atividade anammox (Hou; Liu; Zhang, 2015). SPE ligados, com maior concentração de proteínas, apresentam efeitos positivos na agregação celular, enquanto SPE fracamente ligados, ricos em polissacarídeos, podem prejudicar a sedimentabilidade (Shi *et al.*, 2017a).

Nesse contexto, estudos sobre SPE são essenciais para compreender a formação e as estratégias de agregação do lodo anammox, visando garantir a estabilidade estrutural do biofilme, além de sua resistência a fatores inibitórios (Wang; Wang, 2023). Porém, poucos estudos foram realizados avaliando o papel e comportamento do SPE na formação, estabilidade e resistência mecânica do lodo anammox em reatores operados sob diferentes condições.

O presente estudo investiga dois sistemas alimentados com efluente real: um contendo lodo anammox e outro com consórcio microbiológico em processo de desamonificação (anammox e bactérias oxidantes de amônia (BOA)), com o objetivo de avaliar e comparar a eficiência de remoção de nitrogênio dos dois sistemas. Além disso, visa identificar a contribuição do consórcio microbiológico para a estabilidade e morfologia do lodo anammox, bem como a produção de SPE, objetivando a sua adaptação para operações em larga escala.

6.2. Materiais e métodos

6.2.1. Sistema Experimental e Operação

Dois reatores de bancada, cada um com volume de 1 L, foram utilizados para os sistemas anammox (RA) e desamonificação (RD) (Figura 6-1). Ambos os reatores apresentavam uma relação altura/diâmetro de 12 (60 cm de altura e 5 cm de diâmetro) e estavam equipados com um sistema de separação trifásica, além de decantadores para recirculação da biomassa. A temperatura foi mantida constante em $35 \pm 1,0$ °C por

meio de banhos de água aquecidos, utilizando aquecedores de aquário (Hopar, modelo H-386, China).



Figura 6-1 Reatores RA e RD em operação, onde: a) a bomba peristáltica realiza a alimentação do reator RA; b) Reator RA em operação em banho aquecido a 35°C; c) RD operando em banho aquecido a 35°C; d) Decantador do reator RD; e) Bomba de recirculação do reator RD

O sistema RA contava com uma bomba peristáltica para alimentação (Milan, modelo 204, Brasil), mas não possuía um sistema de recirculação automática de lodo, o que exigiu o retorno manual de quaisquer grânulos que saíssem do sistema. O sistema RD utilizava duas bombas peristálticas (Easy-Load II, Masterflex), a saber, uma para alimentação e outra para recirculação de lodo, além de uma pedra porosa e um rotâmetro (Gilmont - BY-03230-12) para controle da vazão de ar fornecida ao sistema, realizada de forma contínua.

Os reatores foram operados por 260 dias, com condições de inicialização iguais, incluindo um Tempo de Retenção Hidráulica (TRH) inicial de 6 horas, vazão inicial de efluente de $0,2 \text{ L h}^{-1}$ e concentração de nitrogênio total (NT) de 200 g L^{-1} . A amônia para ambos os sistemas foi derivada de efluente real da digestão anaeróbia de resíduos da suinocultura, enquanto o nitrito foi fornecido por uma solução de nitrito de sódio (NaNO_2) a uma concentração de 100 g L^{-1} , preparada especificamente para o RA.

O aumento da carga de nitrogênio aplicada foi realizado de forma gradual à medida que os sistemas demonstravam consumo total do nitrogênio fornecido. Amostras de $\text{NH}_4^+\text{-N}$, $\text{NO}_2^-\text{-N}$ e $\text{NO}_3^-\text{-N}$ foram coletadas semanalmente nas entradas e saídas dos reatores. Oxigênio dissolvido (OD), pH e temperatura foram monitoradas diariamente com sondas portáteis (Hanna, modelo HI 8424, Portugal) e um medidor de OD (modelo 200A, Eco Sense, EUA).

6.2.2. Fonte de Inóculo

Os reatores foram inoculados com lodo anammox, de acordo com as normas da Coleção de Microrganismos de Interesse para a Suinocultura e Avicultura (CMISEA) em Concórdia, Santa Catarina, Brasil (número de acesso: BRMSA 00323)(Viancelli *et al.*, 2011). O lodo anammox foi obtido de um reator piloto anammox de 35 L, alimentado com efluente real da digestão anaeróbia de dejetos suínos, suplementado com nitrito de sódio, que estava em operação há aproximadamente 400 dias, com característica flocculenta.

O lodo nitrificante foi obtido de um reator nitrificante (P3) em escala de bancada; parte do processo modified Ludzack–Ettinger (MLE), para remoção de nitrogênio, foi efetivado conforme descrito por Hollas *et al.* (2019).

Os dois reatores foram inoculados com volume de lodo correspondente a 30% de seu volume total, sendo RA com 300 mL de lodo anammox e RD 200 mL de lodo anammox e 100 mL de lodo nitrificante.

6.2.3. Caracterização do digestato

O digestato utilizado foi coletado no sistema experimental de produção de suínos da Embrapa Suínos e Aves em Concórdia, Santa Catarina, Brasil (27°18'S, 51°59'W), e possui como principais características físico-químicas: $10,08 \pm 0,1$ g L⁻¹ de sólidos totais (ST); $5,77 \pm 0,6$ de sólidos voláteis (SV); $1,2 \pm 0,5$ g L⁻¹ N-NH₃; $4,40 \pm 0,20$ g CaCO₃ L⁻¹ Alcalinidade, pH médio $8,30 \pm 0,01$, carbono orgânico total (COT); $3,96 \pm 0,15$ g L⁻¹. Para ajuste de concentração de N-NH₃, o efluente foi diluído em um fator de 8 vezes, para a alimentação de RA, e 4 vezes, para RD.

6.2.4. Métodos analíticos

Todos os parâmetros analíticos foram quantificados conforme descrito por APHA (2017) e as análises foram realizadas em triplicata e/ou quadruplicata, seguindo protocolos padronizados que atendem às boas práticas de laboratório e à política de garantia de qualidade.

As concentrações de N-NH₃, N-NO₃⁻ e N-NO₂⁻ foram determinadas utilizando o método colorimétrico em um sistema de análise por injeção em fluxo (modelo 2500, Instrumento Fialab, Seattle, EUA). A quantificação de N-NH₃ foi realizada com base no método colorimétrico de Berthelot, em que o complexo amoniacal é formado pela reação de N-NH₃ com hipoclorito e salicilato de sódio em pH 12, sendo a absorbância medida

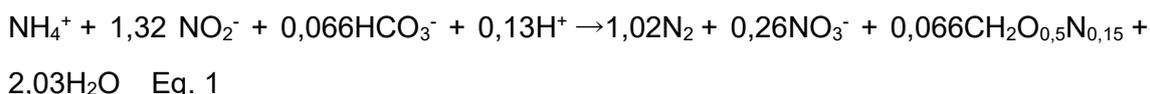
a 650 nm. A determinação de N-NO_2^- foi feita pelo método colorimétrico em pH 2,0-2,5, utilizando sulfanilamida e N-(1-naftil) etilenodiamina dicloridrato, que produz uma coloração azul-avermelhada, com a absorvância registrada a 550 nm. A concentração de N-NO_3^- foi obtida pelo mesmo método após sua redução a N-NO_2^- em uma coluna de cádmio. A alcalinidade foi monitorada no início e no final dos testes cinéticos utilizando um titulador automático (modelo 848 Titrino plus, Metrohm, Herisau, Suíça). As soluções padrão utilizadas para a calibração das curvas de N-NH_3 ($2 - 10 \text{ mgN L}^{-1}$), N-NO_3^- ($0,1 - 3 \text{ mgN L}^{-1}$) e N-NO_2^- ($0,1 - 2,0 \text{ mgN L}^{-1}$) foram preparadas por diluição em série a partir de soluções padrão da Merck (Darmstadt, Alemanha).

A determinação do Carbono Orgânico Total Dissolvido (COT) foi realizada utilizando um analisador de COT (TOC-LCPH/CPN, Shimadzu, Kyoto, Japão), conforme as instruções do fabricante. Para a calibração, foram preparadas curvas a partir de soluções estoque de biftalato de sódio ($\text{C}_8\text{H}_5\text{NaO}_4$) (Synth, São Paulo, Brasil), previamente secas a 105°C , o que resultou em soluções padrão de $1000 \text{ mg COT L}^{-1}$. As determinações de alcalinidade foram realizadas por meio de um titulador automático (modelo 848 Titrino plus, Metrohm, Herisau, Suíça), utilizando uma solução de ácido sulfúrico $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ padronizada por titulação com o padrão primário Tris, (Hidroximetil) Aminometano (Merck).

Amostras das entradas e saídas dos reatores foram coletadas para as determinações de N-NH_3 , N-NO_2^- , N-NO_3^- , COT e alcalinidade (expressa em $\text{mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$). As taxas específicas de consumo de nitrogênio ($\mu\text{N-NH}_3$) foram calculadas a partir de testes cinéticos em batelada, conforme descrito por Bonassa *et al.* (2021).

6.2.5. Cálculo dos Coeficientes estequiométricos

Os coeficientes estequiométricos para os processos anammox (Eq.1) e desamonificação (Eq. 2) foram calculados a partir do balanço de massa das espécies químicas envolvidas no processo (Strous *et al.*, 1998) e comparados aos determinados por Shi *et al.* (2017b).



6.2.6. Distribuição granulométrica

A distribuição granulométrica média de RA e RD foi realizada utilizando uma série de peneiras do tipo Tyler, de acordo com metodologia adaptada (Qian *et al.*, 2022). Os diâmetros de peneiras utilizadas foram 2,38; 1,41; 0,70; 0,60; 0,30; 0,25; 0,21; 0,149; 0,125 mm, respectivamente.

6.2.7. Substâncias poliméricas extracelulares (SPE)

O método de extração de substâncias polares extracelulares (SPE) aplicado às amostras de lodo coletadas nos dias 0, 30, 135 e 260 foi baseado na metodologia descrita por Lotti *et al.* (2019), específica para bactérias Anammox. Inicialmente, as amostras foram liofilizadas e a extração das SPE contidas no lodo foi realizada por meio da modificação do pH. Após a análise, os pellets foram descartados e as SPE foram extraídas, ficando contidas na fração líquida obtida ao final do processo. As concentrações de proteínas e polissacarídeos foram, então, determinadas.

A concentração de proteínas na fração líquida de SPE foi analisada utilizando o método do ácido bicinconínico (BCA), que emprega kits padrões da Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemanha). O princípio do ensaio colorimétrico BCA baseia-se na formação de um complexo entre a proteína e o íon Cu^{2+} em condições alcalinas, seguido pela redução do Cu^{2+} a Cu^{1+} . As absorbâncias foram medidas a 562 nm para quantificar as concentrações de proteínas nos extratos (Smith *et al.*, 1985).

Já a concentração de polissacarídeos, foi determinada por meio da metodologia espectrofotométrica de antrona. Durante a reação com antrona, que ocorre na presença de ácido sulfúrico concentrado, há uma ação hidrolítica e desidratante sobre os carboidratos. Nesse processo, ligações glicosídicas entre os carboidratos e o ácido sulfúrico são hidrolisadas, o que resulta na desidratação dos açúcares simples para formar furfural ou hidroximetilfurfural. Essas substâncias condensam-se com a antrona (9,10-dihidro-9-oxoantraceno), produzindo um complexo de coloração azul esverdeada, que é quantificado colorimetricamente entre 620 e 630 nm. Em resumo, esse método baseia-se na extração de carboidratos solúveis e na quantificação colorimétrica, comparando os resultados com uma curva de calibração obtida a partir de soluções padrão de glicose. Para a determinação dos polissacarídeos, reagentes analíticos da Sigma-Aldrich foram utilizados (Silva *et al.*, 2003).

6.2.8. Quantificação de genes de bactérias do ciclo do nitrogênio por qPCR

A técnica de qPCR foi utilizada para quantificar o número de cópias dos genes do RNAr 16S, bem como de genes funcionais relacionados ao ciclo do nitrogênio, com potencial impacto no processo anammox. Para a análise de DNA, as amostras de lodo foram centrifugadas para concentrar as células (5000 g por 5 minutos) e o sobrenadante foi descartado. A fração sólida obtida foi transferida para microtubos e armazenada a -20 °C até a extração do DNA. A extração foi realizada utilizando 0,25 g de lodo e o kit Qiagen DNeasy PowerSoil Pro, seguindo o protocolo padrão do fabricante. As concentrações de DNA foram medidas com um espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, EUA).

Os primers específicos para a amplificação dos genes-alvo estão listados na Tabela 6-1 e foram selecionados com base em estudos anteriores (Humbert; Zopfi; Tarnawski, 2012; Pereira; Araújo, 2022). A quantificação dos genes foi realizada utilizando qPCR em um termociclador de PCR, em tempo real, modelo 7500 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, EUA). Para a construção das curvas de calibração, foram utilizados fragmentos sintéticos (g-block) com os seguintes números de pares de base para os respectivos microrganismos: 437 para anammox, 352 para 16S Bacteria, 454 para nosZ, 491 para nitri-AmoA. As curvas de calibração foram construídas na faixa de 22,3 a $2,23 \times 10^6$ cópias/ μL .

O protocolo de amplificação seguiu as seguintes condições: 95 °C por 2 minutos na etapa inicial (holding stage), seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos e anelamento/extensão a 60 °C por 1 minuto. Ao final, foi realizada a curva de melting (dissociação) para avaliar a pureza dos produtos amplificados, com os seguintes parâmetros: 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C, 30 segundos a 95 °C e 15 segundos a 60 °C.

Tabela 6-1 Iniciadores utilizados na técnica de qPCR.

Par de iniciadores	Sequências 5' → 3'	Temperatura de anelamento	Referência
A438F_Anammox A684R_Anammox	5' -GTCRGGAGTTAD GAA ATG -3' 5' -ACC AGAAGTTCC ACT CTC -3'	57	Humbert <i>et al.</i> (2012)
RNAr 16S do domínio Bactéria	5'-ATGGCTGTCG TCAGCT - 3' 5'- ACGGGCGGTGT GTAC -3'	53	Ferris <i>et al.</i> (1996)
Enzima Amônia monoxigenase (AmoA) de BOA	5'- GGGGTTTCT ACTGGTGG-3' 5'- CCCCTCKGSA AAGCCTTCTTC-3'	57	Rotthauwe <i>et al.</i> (1997)
Enzima óxido nitroso redutase (nosZ) de bactérias desnitrificantes	5' - CGYTGTTCMTCGACAGC CAG -3' 5' - CGSACCTTSTTGCCSTYG CG -3'	55	Enwall <i>et al.</i> (2005)

6.2.9. Metodologia de Sequenciamento e Análise das Comunidades

Microbianas

A coleta de amostras foi realizada nos dias 0 (inoculação) e 260, totalizando 5 gramas para cada amostra. As análises de comunidades microbianas foram realizadas a partir do sequenciamento de alto desempenho, direcionado às regiões V3/V4 do gene 16S rRNA. O protocolo de preparo das bibliotecas foi desenvolvido pela Neopropecta Microbiome Technologies (Florianópolis, SC, Brasil). A amplificação do gene alvo foi realizada com os primers 341F (CCTACGGGRSGCAGCAG) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT), conforme descrito em estudos prévios (Caporaso *et al.*, 2012; Wang; Qian, 2009). O sequenciamento foi realizado no sistema MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., EUA), utilizando kits V2 de 500 ciclos em formato paired-end.

6.2.9.1. Pipeline de Controle de Qualidade e Processamento de Dados

A qualidade dos dados brutos foi avaliada por meio do software FastQC v.0.11.8 (Thrash; Arick; Peterson, 2018), considerando os valores de Phred (QP). Sequências com QP < 20 e primers foram removidas utilizando um software proprietário baseado no projeto BioPython (Cock *et al.*, 2009) desenvolvido em Python v.3.6. Para dados paired-end, os pares de arquivos fastq (R1 e R2) foram unidos em um único arquivo utilizando o pandaseq v.2.11 (Masella *et al.*, 2012). Sequências com clusters de abundância inferiores a 5 foram descartadas, considerando seu potencial (Smith *et al.*, 2010).

A identificação taxonômica foi realizada com o programa blastn v.2.6.0+ (Altschul *et al.*, 1990), utilizando bancos de dados públicos ou proprietários como referência. As espécies foram definidas com base em 99% de identidade, sendo priorizados os hits com maior bit-score, menor e-value e maior representação taxonômica.

6.3. Resultados e discussão

6.3.1. Desempenho da Remoção de N

As cargas aplicadas, removidas e as eficiências de remoção de nitrogênio (ERN) dos processos Anammox e Desamonificação são apresentadas na Figura 6-2.

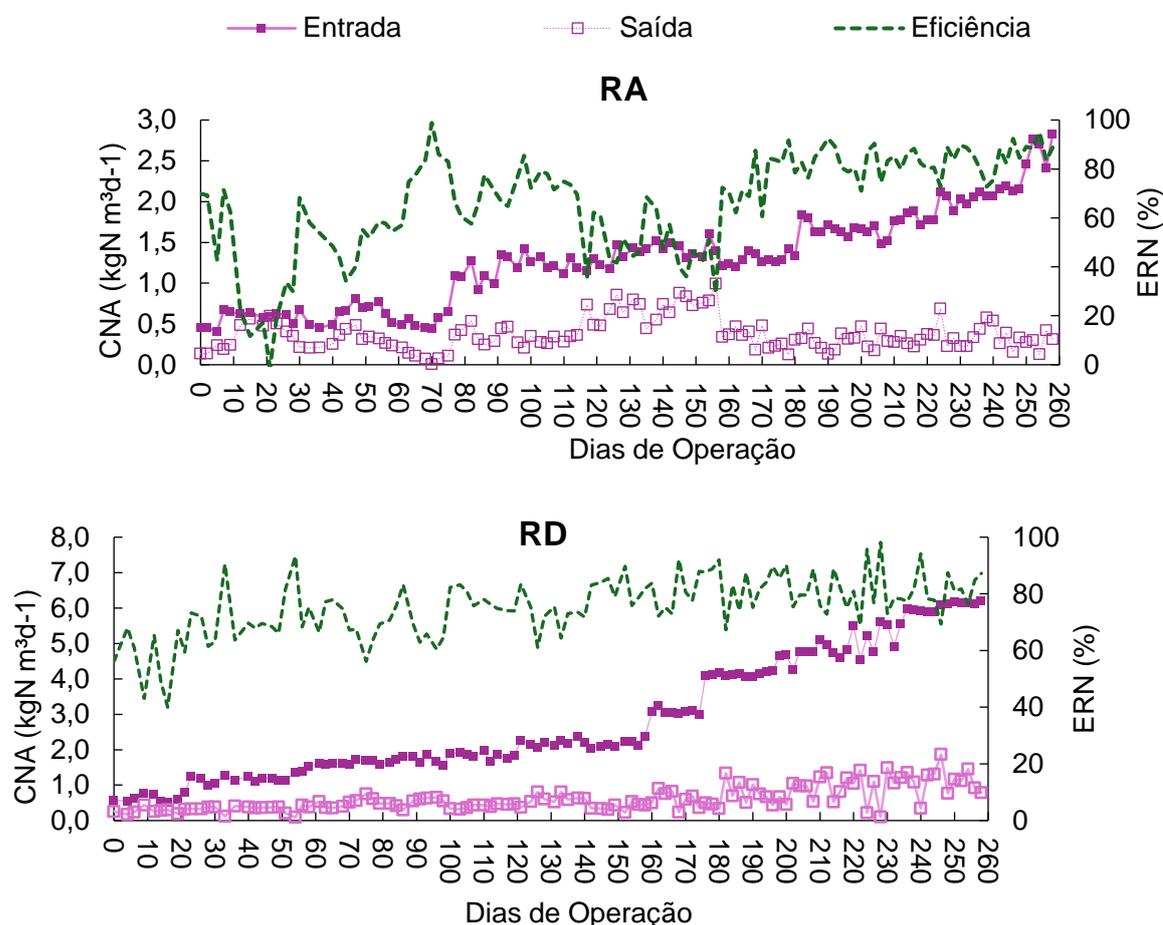


Figura 6-2 Carga de Nitrogênio Aplicadas durante os 260 dias de operação de RA e RD e eficiências de remoção de nitrogênio (ERN).

O aumento da carga de nitrogênio aplicada (CNA) realizou-se de forma gradual, não havendo a separação da operação dos reatores por fases, de maneira que foi ajustado conforme o consumo significativo de nitrogênio total (NT) observado ao longo

dos dias de operação do reator. As concentrações de NT em ambos os processos foram mantidas constantes ($200 \pm 20 \text{ mgL}^{-1}$), com o aumento da CNA realizado partir do aumento das vazões de alimentação.

Em RA, observou-se uma maior dificuldade no consumo de nitrogênio total (NT) durante os primeiros 150 dias de operação. Somente após o dia 160, as concentrações de nitrogênio no efluente começaram a reduzir para valores menores que 20 mg L^{-1} , indicando um consumo eficiente de nitrogênio e permitindo o aumento da carga aplicada.

A carga inicial de RA foi de $0,57 \pm 0,11 \text{ kgN m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, que ocorreu em um tempo médio de 72 dias, e com uma ERN de $52,16 \pm 17,7\%$. Posteriormente, a CNA foi aumentada para $1,23 \pm 0,10 \text{ kgN m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, permanecendo por aproximadamente 60 dias com uma ERN de $58,7 \pm 12,7\%$. Durante esse período, o reator apresentou dificuldade em consumir o nitrogênio disponibilizado. A ERN passou a apresentar valores de $82,89 \pm 5,09\%$ a partir do dia 180 de operação com uma CNA de $1,65 \pm 0,07 \text{ kgN m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Apesar dessa dificuldade identificada, nenhuma inibição por amônia livre e ácido nitroso livre foram detectados durante toda a operação dos reatores.

A carga máxima de nitrogênio amoniacal (CNA) alcançada nesse processo foi de $2,32 \pm 0,24 \text{ kgN m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, com uma eficiência global do sistema de $67,8 \pm 16\%$. Já para o período da última CNA aplicada, a ERN foi de $85,06 \pm 4,92\%$.

Em contraste, o reator RD apresentou uma operação mais estável desde os primeiros dias de operação, com um consumo eficiente de nitrogênio e uma eficiência global de remoção de $76 \pm 7,9\%$. O sistema de desamonificação demonstrou melhor estabilidade em termos de consumo de nitrogênio e aumento progressivo de carga aplicada. A CNA inicial aplicada em RD foi de $0,56 \pm 0,20 \text{ kgN m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, durante 28 dias com uma eficiência de $59,65 \pm 8,43\%$. A CNA máxima obtida em RD foi de $5,79 \pm 0,35 \text{ kg N m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, aproximadamente 2,5 vezes maior do que a observada em RA para o mesmo período, refletida na eficiência ($82,10 \pm 6,12\%$) do sistema que combinava bactérias oxidantes de amônia com anammox, em comparação ao sistema que utilizava apenas anammox.

Corroborando os resultados de ERN e CNA alcançados para os dois processos, as taxas de consumo específico de amônia ($\mu\text{N-NH}_3$) obtidas a partir dos testes cinéticos de consumo de substrato, realizadas nos dias 0, 30, 135 e 260, estão dispostas na Tabela abaixo.

Tabela 6-2 Atividades específicas de consumo de substrato ao longo dos 260 dias de operação.

Dia de Operação	$\mu(N-NH_3)$ (mgN gSSV ⁻¹ h ⁻¹)	
	RA	RD
0	0,8	0,8
30	1,5	1,9
135	3,4	4,7
260	4,7	7,8

O rápido aumento de $\mu N-NH_3$ nos dois processos é notório, principalmente ao observar que, em 30 dias, o consumo específico de N-NH₃ dobrou. Porém, RD sobressaiu-se e apresentou um intervalo de aumento maior que RA, alcançando 7,78 mgN gSSV⁻¹ h⁻¹, em 260 dias de operação, superando também em 1,7 vezes a $\mu N-NH_3$ obtida por Chini *et al.* (2019), que foi de $\mu N-NH_3$ – 4,50 mg N-NH₃ gSSV⁻¹ h⁻¹ em uma CNA de $1,19 \pm 0,07$ g N L⁻¹ d⁻¹ também com um processo de desamonificação alimentado com efluentes da suinocultura.

As ERN médias obtidas nas cargas finais dos dois sistemas são comparáveis e até superiores a outros estudos, com CNA semelhantes: CNA: 3,05 kgN m⁻³ d⁻¹; ERN: 93,4% (Wu *et al.*, 2024); 2,2 kgN m⁻³ d⁻¹; ERN: 98% (Yan *et al.*, 2024) 2,3 kgN m⁻³ d⁻¹; ERN: 90% (Deng *et al.*, 2024). Nota-se que a CNA máxima aplicada para RD é pouco comum em aplicações práticas para remoções biológicas de nitrogênio, porém, refletem a robustez do processo, principalmente considerando fatores, a saber, a rápida inicialização do sistema e uso de digestato da suinocultura como alimentação do sistema.

Ocasionalmente, em sistemas anammox, há uma queda momentânea da eficiência de remoção logo após o aumento da carga de nitrogênio aplicada, quando é ocasionada pelo aumento da concentração de NAT no sistema. Segundo Bonassa *et al.* (2022), isso ocorre por conta da aclimação da biomassa às novas condições impostas ao sistema de concentração de substrato e suplementação de oxigênio. É possível observar que, na estratégia deste estudo, de aumentar a CNA a partir da vazão de alimentação do sistema, os reatores não apresentaram reduções momentâneas na ERN.

6.3.2. Coeficientes estequiométricos

Os coeficientes estequiométricos das espécies químicas envolvidas nos processos anammox e desamonificação foram calculados para confirmar a atividade biológica nos reatores. Esses coeficientes são indicadores base da conformidade das

reações observadas com os valores teóricos esperados. Os valores para os 260 dias de operação estão dispostos na Figura 6-3 para RA e RD.

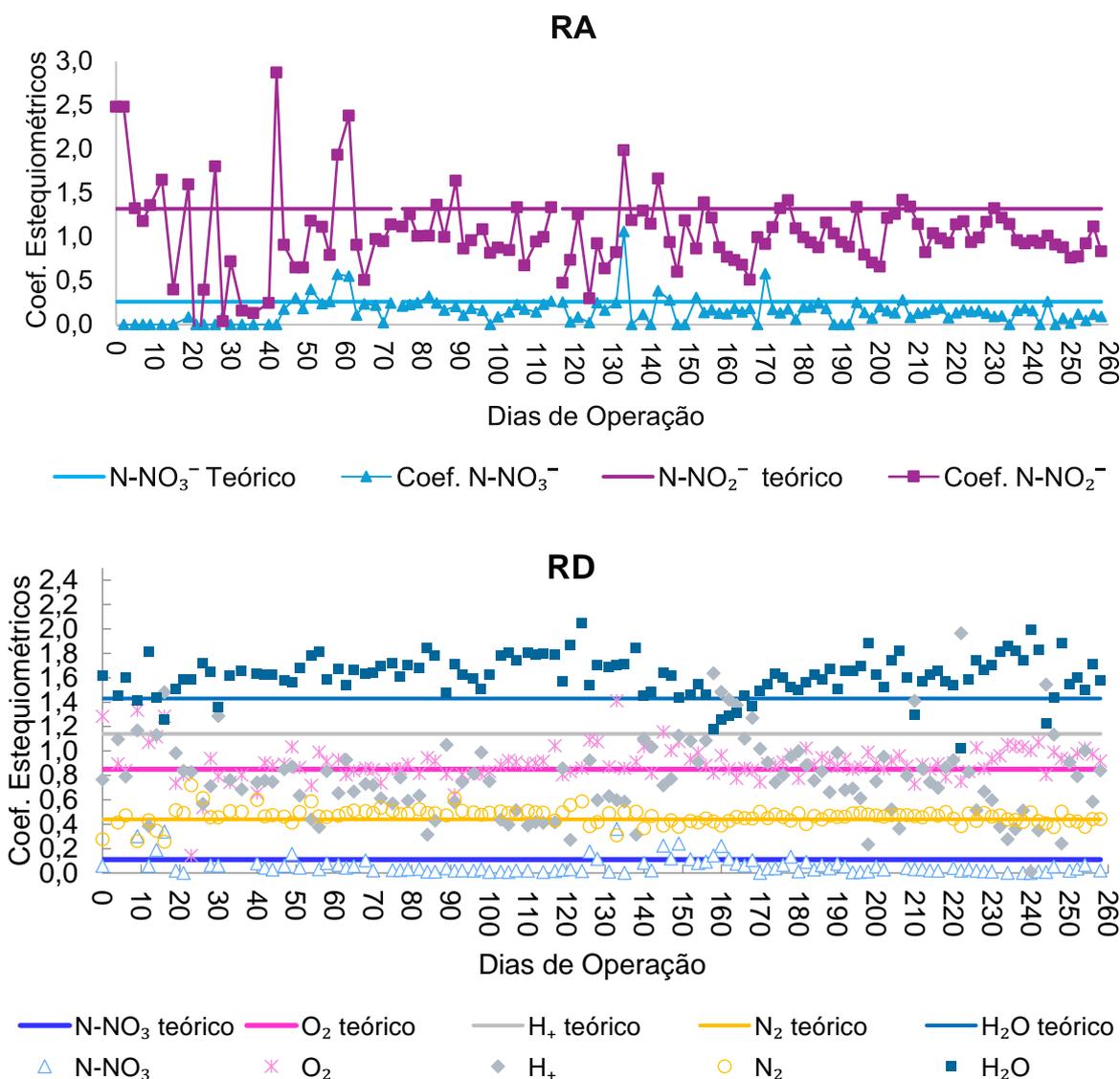


Figura 6-3 Coeficientes estequiométricos teóricos comparados aos coeficientes calculados durante os 260 dias de operação.

Em RA, os coeficientes estequiométricos avaliados foram apenas os do processo anammox. Durante os 260 dias de operação, houve algumas oscilações principalmente nos primeiros dias de operação. Apesar da biomassa utilizada já estar aclimatada, o reator necessitou de alguns dias para se ajustar às novas condições, apresentando uma certa estabilidade após o dia 60 de operação ($1,08 \pm 0,63$ para NO_2^- e $0,12 \pm 0,14$ para NO_3^-). Porém, a partir do dia 105, as oscilações principalmente do coeficiente de nitrito voltaram a ocorrer ($1,06 \pm 0,29$), apresentando instabilidades até o

dia 175. Apesar das instabilidades, durante todo o período experimental, os coeficientes de NO_2^- apresentaram-se próximos a $1,02 \pm 0,32$ e $0,15 \pm 0,1$ para NO_3^- .

Sabe-se que a razão estequiométrica de remoção de nitrito para amônia no processo anammox é de 1:1,32 (Eq.1). Quando essa relação está acima de 1,32, sugere a utilização desse nitrito por microrganismos de desnitrificação. Porém, em casos em que essa relação é menor que 1,32, parte da amônia pode ter sido utilizada por outros mecanismos, como crescimento celular (Ahn; Hwang; Min, 2004).

Em RD, os coeficientes estequiométricos do processo de desamonificação começaram a estabilizar e manter-se próximos aos da literatura após 30 dias de operação, exceto para os coeficientes de NO_3^- , que mantiveram valores médios de $0,04 \pm 0,05$ ao longo dos 260 dias de operação.

Como o reator foi operado com efluente real, possuía baixas concentrações de carbono orgânico presentes $30,81 \pm 8,83 \text{ mg L}^{-1}$, e uma eficiência média de remoção de $16,33 \pm 4,7 \%$ foi observada. A disponibilidade de carbono orgânico em efluentes após a digestão anaeróbia influencia a ocorrência da desnitrificação heterotrófica de maneira simultânea ao processo de desamonificação (Bonassa *et al.*, 2022).

Apesar da possibilidade de competição entre esses organismos, houve estabilidade na remoção de nitrogênio, com os processos ocorrendo simultaneamente, típico de um processo SNAD (nitritação parcial, Anammox e desnitrificação simultâneas) (Li *et al.*, 2020).

6.3.3. Distribuição granulométrica

As análises de distribuição granulométrica foram conduzidas nos dias 0, 30, 135 e 260 de operação em ambos os sistemas. Inicialmente, os reatores foram inoculados com a mesma biomassa anammox, o que resultou em uma distribuição granulométrica idêntica no tempo zero (T0). No entanto, o reator de lodo de semente enfrentou uma intercorrência que ocasionou a desestruturação completa dos grânulos, como evidenciado pela distribuição granulométrica inicial (Figura 6-4). Apenas 2,73% do volume total de lodo apresentava grânulos de aproximadamente 2 mm, enquanto 76,2% apresentavam características floculentas, com grânulos menores que 0,3 mm, que atravessaram a peneira utilizada na análise.

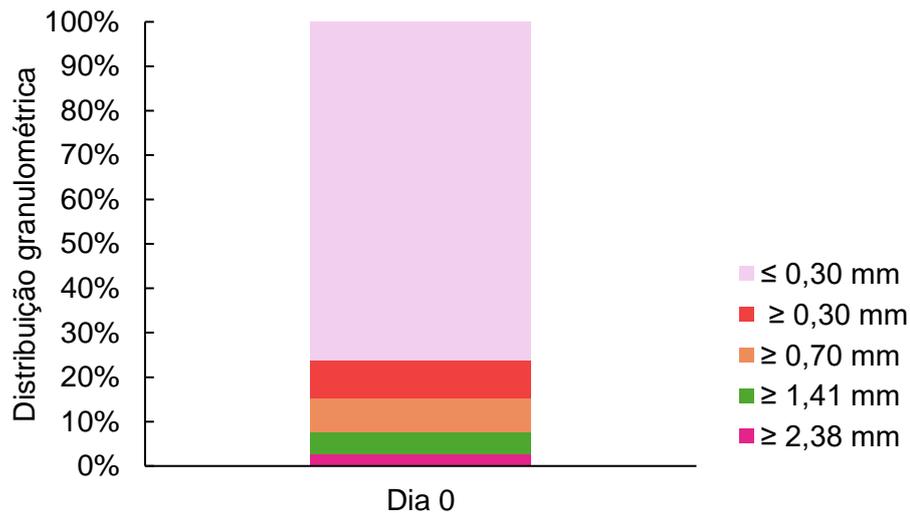
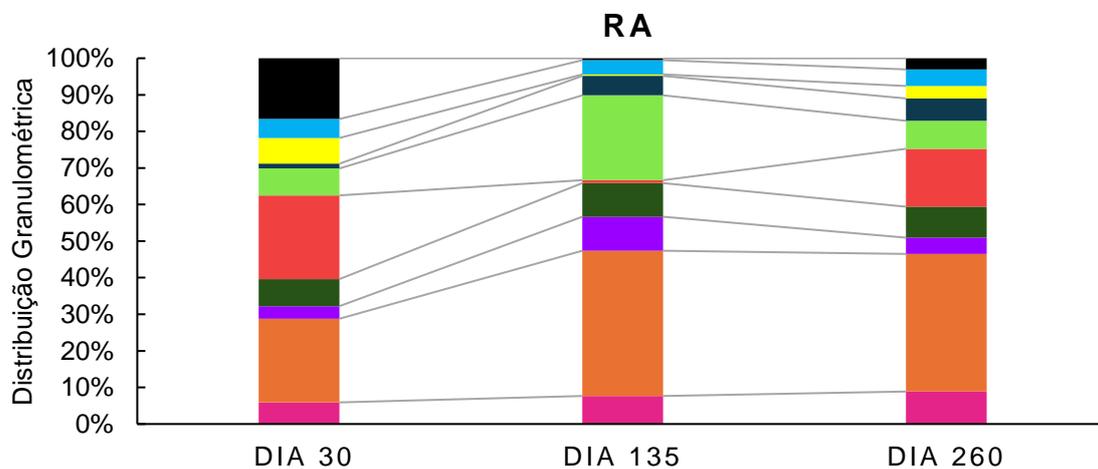


Figura 6-4 Distribuição granulométrica inicial do lodo anammox utilizado para inoculação dos reatores RA e RD no dia 0.

Do volume total de lodo utilizado para a determinação de granulometria, apenas 2,73% apresentaram grânulos com tamanho aproximado de 2 mm, enquanto 76,2% possuíam características completamente floculentas, com grânulos menores que 0,3 mm, transpassando a peneira. Novas análises de distribuição granulométrica foram realizadas nos dois reatores ao longo dos 260 dias de operação. As distribuições granulométricas dos reatores em 30, 135 e 260 dias podem ser observadas na Figura 6-5.



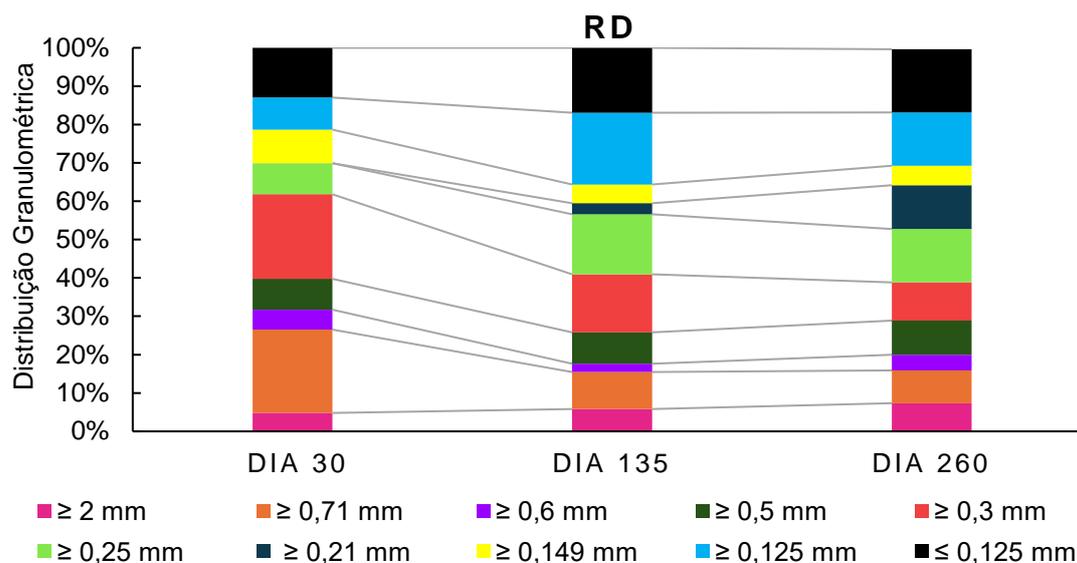


Figura 6-5 Distribuição granulométrica dos reatores RA e RD nos dias 30, 135 e 260 de operação.

Aos 30 dias, observou-se uma recuperação na morfologia do lodo em ambos os sistemas. No reator RA, 39% do lodo apresentavam estrutura granular, com tamanhos superiores ou iguais a 2 mm (6%), 0,7 mm (23%), 0,6 mm (3%) e 0,5 mm (7%). No reator RD, 40% do lodo apresentava granulação, sendo 5% de grânulos com tamanho igual ou superior a 2 mm, 22% com 0,7 mm, e 5% e 8% com grânulos de 0,6 e 0,5 mm, respectivamente. Essa recuperação estrutural foi rápida em ambos os sistemas.

Aos 135 dias de operação, o reator RA continuou a apresentar granulação significativa, com 66% do volume total de lodo composto por grânulos com tamanhos entre 2 e 0,5 mm. Em contraste, o reator RD começou a mostrar uma redução na proporção de lodo granular, com uma transição para formação de biofilme e uma redução de 18% na fração granular.

No dia 260, o reator RD manteve esse comportamento anterior, com variações mínimas entre as distribuições de grânulos. O reator RA, por sua vez, manteve a proporção de grânulos com tamanho igual ou superior a 2 mm, observada no dia 135, mas apresentou uma redução na fração de grânulos de 0,25 mm, acompanhada por um aumento da fração de 0,3 mm, o que indica o desenvolvimento contínuo de granulação. Além disso, flocos menores que 0,125 mm foram identificados, representando 3% do volume total.

A granulação do lodo anammox é um processo complexo influenciado por interações físicas, químicas e biológicas (Ye *et al.*, 2025). O tamanho dos grânulos de anammox é crucial para a estabilidade do lodo e o desempenho do processo.

Grânulos maiores tendem a ter uma capacidade de sedimentação melhorada, favorecendo a retenção de biomassa e otimizando a transferência de massa no biorreator. Assim, o diâmetro dos grânulos é um parâmetro fundamental para garantir a estabilidade operacional e otimizar o processo anammox (Huang *et al.*, 2020).

A comparação entre os resultados das análises de granulometria e as atividades específicas de consumo de substrato (ver item, tabela XX) revela uma correlação significativa entre a formação de grânulos e o aumento na atividade dos microrganismos. Esse fenômeno pode ser atribuído ao fato de que os flocos de bactérias anammox apresentam uma baixa densidade celular, resultando em uma atividade metabólica reduzida. Assim, à medida que ocorre a estruturação granular, observa-se um aumento na densidade celular, o que, por sua vez, eleva a atividade metabólica dos microrganismos (Oshiki *et al.*, 2020). A Figura 6-6 ilustra as distribuições granulométricas e a morfologia dos lodos nos reatores RA e RD ao longo dos 260 dias de operação.

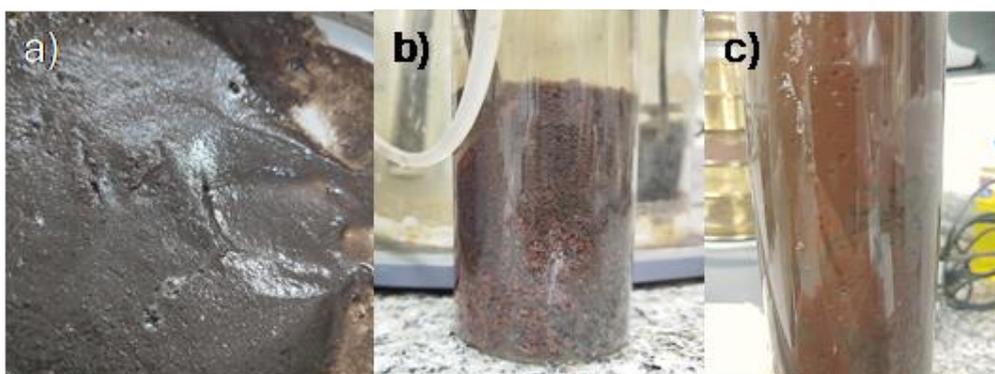


Figura 6-6 Características do lodo dos reatores em T0 (a) e RA (b) e RD (c) após 260 dias de operação.

Apesar da rápida melhoria na estruturação granular do lodo anammox no reator RA, a carga de nitrogênio amoniacal (CNA) aplicada ($2,32 \pm 0,24 \text{ kgN m}^{-3} \text{ d}^{-1}$) foi 2,5 vezes menor do que a observada no reator RD no mesmo período ($5,79 \pm 0,35 \text{ kgN m}^{-3} \text{ d}^{-1}$). No reator RD, a transformação do lodo, que inicialmente apresentava características floculentas, evoluiu para grânulos e, posteriormente, para a formação de biofilme. É importante salientar que o biofilme aderiu diretamente às paredes do reator, sem a necessidade de meio suporte ou carreadores para promover a agregação e retenção do lodo.

O biofilme anammox constitui um sistema microecológico complexo, cuja estabilidade interna é mantida pela comunicação e interação entre os microrganismos (Zheng *et al.*, 2022). A formação do biofilme anammox é descrita como um processo em múltiplos estágios, caracterizado por uma sucessão dinâmica e a interação de

processos estocásticos e determinísticos. Esse processo pode ser subdividido em três estágios de crescimento distintos: colonização, sucessão e maturação (Li *et al.*, 2020; Niederdorfer *et al.*, 2021). Os sistemas de tratamento de águas residuais que utilizam biofilmes apresentam vantagens, como uma retenção eficiente de biomassa e uma capacidade adaptativa significativa a variações nas condições ambientais (Blandin *et al.*, 2018).

É importante destacar que grânulos excessivamente grandes (superiores a 4 mm) podem reduzir a eficiência da transferência de massa devido à formação de zonas mortas dentro dos grânulos maiores, diminuindo a abundância de microrganismos anammox (Zhu *et al.*, 2018). Portanto, o tamanho ideal do grânulo é crucial para o desempenho do reator (Lu *et al.*, 2013). Vários estudos indicam que o tamanho ótimo de grânulos anammox varia entre 0,5-0,9 mm (Zhu *et al.*, 2018) e 1,0 a 1,5 mm, com melhor eficiência na remoção de nitrogênio e metabolismo energético (Chen *et al.*, 2021b).

Han *et al.* (2024) avaliaram a heterogeneidade de grânulos e biofilmes anammox e observaram um aumento da intensidade de interação microbiana durante o processo de formação do biofilme, além de que a estabilidade e atividade metabólica também apresentaram melhor performance. Concomitantemente a isso, comparando com diferentes bioagregados, bactérias anammox foram encontradas em maior abundância em biofilmes e em lodos com estrutura granular (Du *et al.*, 2017).

6.3.4. Substâncias Poliméricas Extracelulares (SPE)

As substâncias poliméricas extracelulares (SPE) são reconhecidas pelo seu desempenho crucial na formação de agregados microbianos em processos biológicos de tratamento (Li *et al.*, 2021); seu acúmulo pode ocorrer em rotas distintas, tais como excreção, secreção, lise celular e sorção (Flemming; Wingender, 2001). Logo, o SPE possui efeito direto no processo de granulação e estabilidade do processo anammox (Ye *et al.*, 2025)

A composição do SPE é basicamente proteínas (PN), polissacarídeos (PN) e componentes menores, como ácidos nucleicos, lipídios e substâncias húmicas, que, ao variar as concentrações, interferem na hidrofobicidade e na carga superficial do lodo, alterando a funcionalidade, estrutura do biofilme e do grânulo (Zhao *et al.*, 2018a).

A diversidade bacteriana e a atividade específica no tratamento de águas residuárias estão estreitamente ligadas às propriedades físico-químicas do lodo no processo. Em cenários nos quais a abundância de bactérias do filo Anammox é maior, é esperado que as concentrações de substâncias poliméricas extracelulares (SPE),

especialmente na razão proteínas/polissacarídeos (PN/PS), sejam mais elevadas. Esse acréscimo tende a coincidir com aumentos na atividade específica do reator e na eficiência de remoção de nitrogênio (ERN) (Bonassa *et al.*, 2022; Chen *et al.*, 2021a).

No início do experimento (T0), o lodo apresentou uma relação de proteínas e polissacarídeos (PN/PS) de 28,94. Após 30 dias de operação do reator anammox (RA), observou-se um aumento significativo nessa relação, alcançando o valor de 157,67.

Contudo, ao longo de 135 dias de operação, a relação PN/PS sofreu uma queda acentuada, reduzindo-se para 19,30. Em um período de 260 dias, houve um novo aumento, com a relação atingindo 43,18. Em contrapartida, no reator de desamonificação (RD), o comportamento da relação PN/PS manteve-se relativamente constante, variando de 43,33 no dia 30, 49,20 no dia 135 e 45,09 no dia 260. Os dados apresentados na Figura 6-7 demonstram a evolução das relações PN/PS ao longo do tempo.

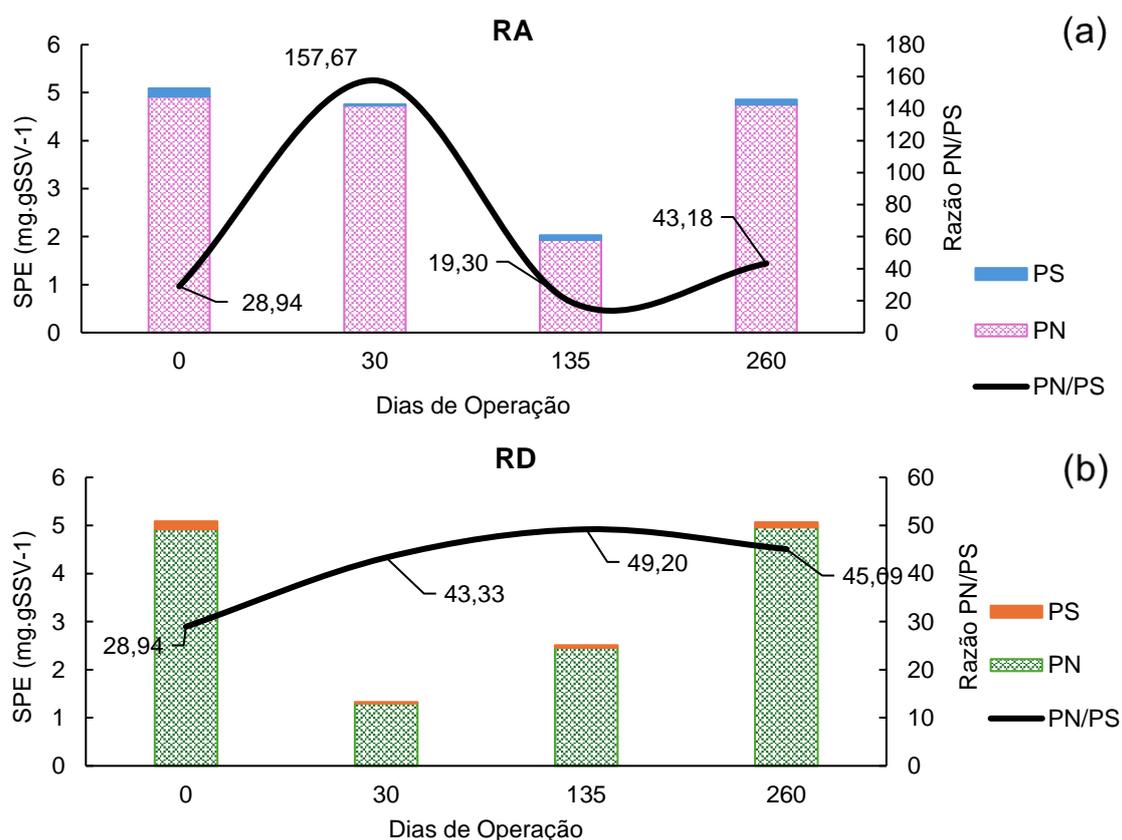


Figura 6-7 Conteúdo de SPE durante a operação dos reatores RA (a) e RD (b).

Estudos anteriores relataram que todos os processos anammox durante a inicialização sofrem alguma forma de lise celular e um período de fase de latência, em que o microrganismo se adapta às novas condições hidráulicas e físico-químicas do sistema (Qin *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2018). Com mudanças no ambiente, as bactérias

anammox gastam energia para adaptação e até mesmo proteção, secretando mais SPE (Henriques; Love, 2007).

A proteína (PN) excretada pelas células contribui para manter a estabilidade das bactérias e melhorar a atividade metabólica geral; já a quantidade de polissacarídeos excretada, contribui diretamente para a relação PN/PS e a sedimentabilidade dos grânulos (Feng *et al.*, 2021).

Independentemente do tipo de grânulo, as relações PN/PS geralmente apresentam-se como maiores que 1,0 nos estudos, indicando um comportamento interessante de excreções maiores de proteínas para formação e manutenção de grânulos e biofilmes anammox (Feng *et al.*, 2021; Mcswain *et al.*, 2005). Todavia, comparando essas relações com outros tipos de lodo (ativados e metanogênicos), os consórcios anammox são mais eficazes na excreção de SPE (Zhang *et al.*, 2016).

6.3.5. Comunidade microbiana

Como é sabido, os gêneros de bactérias anammox conhecidos não são culturas puras, o que evidencia a necessidade e ocorrência de interações simbióticas complexas com outros grupos microbianos para seu desenvolvimento. Trocas metabólicas importantes, como aminoácidos, polissacarídeos, cofatores e vitaminas, entre bactérias anammox e outros microrganismos simbióticos, estão sendo descobertas constantemente (Ya *et al.*, 2022). Na Figura 6-8, são apresentados os filós de maior abundância nos reatores RA e RD nos tempos 0 e 260.

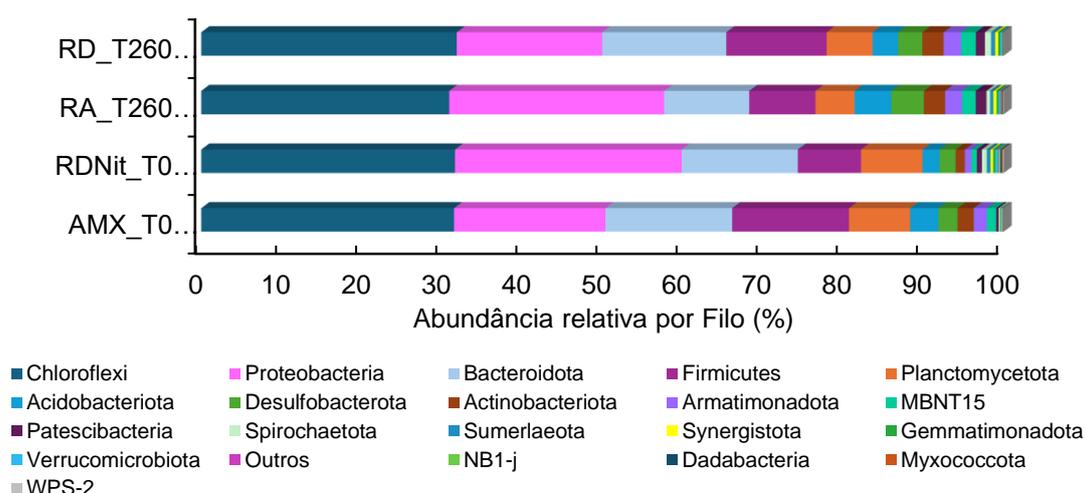


Figura 6-8 Abundâncias relativas por filo encontradas na metagenômica de amostras dos tempos 0 e 260 de RA e RD.

No tempo inicial (T0), os reatores foram inoculados com dois tipos distintos de lodo: o lodo anammox (AMX_T0), floculento, com volume de 300 mL em RA e 200 mL em RD, e o lodo nitrificante (RD_T0NIT), adicionado apenas ao reator de desamonificação RD (100 mL). A análise microbiológica apontou os filos de maior abundância nos dois lodos, sendo: *Chloroflexi* (31,51% em AMX_T0 e 31,64% em RD_T0NIT), *Firmicutes* (14,56% e 28,24%, respectivamente) e *Planctomycetota* (7,61% e 14,47%). Além disso, AMX_T0 apresentou predominância de *Proteobacteria*, enquanto RD_T0NIT destacou-se pelos filos *Synergistota* (7,87%) e *Sumerlaeota* (7,67%).

Após 260 dias de operação, a composição microbiana dos reatores passou por modificações. Em RA, os cinco filos mais abundantes foram *Bacteroidota* (30,91%), *Proteobacteria* (26,78%), *Firmicutes* (10,61%), *Chloroflexota* (8,26%) e MBNT15 (4,87%). No reator RD, os filos predominantes foram *Firmicutes* (31,85%), *Planctomycetota* (18,12%), *Chloroflexota* (15,46%), *Pseudomonadota* (12,51%) e *Bacteroidota* (5,72%).

O filo *Planctomycetota*, conhecido pelas bactérias anammox, apresentou comportamentos distintos nos dois sistemas: em RA, reduziu-se para 4,05%, enquanto, em RD, aumentou significativamente para 18,12%. As análises taxonômicas identificaram os gêneros dominantes de AnAOBs como *Candidatus Brocadia* e *Candidatus Jettenia*. No tempo inicial, *Candidatus Jettenia* apresentou a maior abundância relativa (4,15%). Ao final do experimento (T260), *Candidatus Brocadia* predominou em RA (2,99%), em comparação à RD (2,45%).

Apesar da baixa abundância de *Candidatus Brocadia* nos reatores, as $\mu\text{N-NH}_3$ e as ERN foram satisfatórias. Em RA, a taxa específica de consumo de amônia ($\mu\text{N-NH}_3$) foi de $4,7 \text{ mgN gSSV}^{-1} \text{ h}^{-1}$, com ERN de $85 \pm 4,92\%$; em RD, a $\mu\text{N-NH}_3$ foi de $7,8 \text{ mgN gSSV}^{-1} \text{ h}^{-1}$, com ERN de $82 \pm 6,12\%$. Bonassa *et al.* (2021) relataram uma abundância de 32,55% de *Candidatus Brocadia* em um sistema de nitrificação parcial-anammox de estágio único, obtendo uma ERN de 82,56% e uma $\mu\text{N-NH}_3$ de $40,7 \text{ mgN gSSV}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Os resultados taxonômicos corroboram a análise de qPCR (Figura 6-9 a e b), que quantificou genes do RNAr 16S, anammox e bactérias heterotróficas (nos-Z). Em T0_AMX, a quantificação apontou $1,02 \times 10^{10}$ cópias/g de lodo, enquanto, em RD_T0NIT, apresentou $5,74 \times 10^8$ cópias/g de lodo. Após 260 dias, RA obteve $1,1 \times 10^{10}$ cópias/g de lodo, e RD, $3,97 \times 10^{10}$ cópias/g de lodo. Os resultados confirmaram a baixa abundância relativa de anammox, também observada pelo sequenciamento.

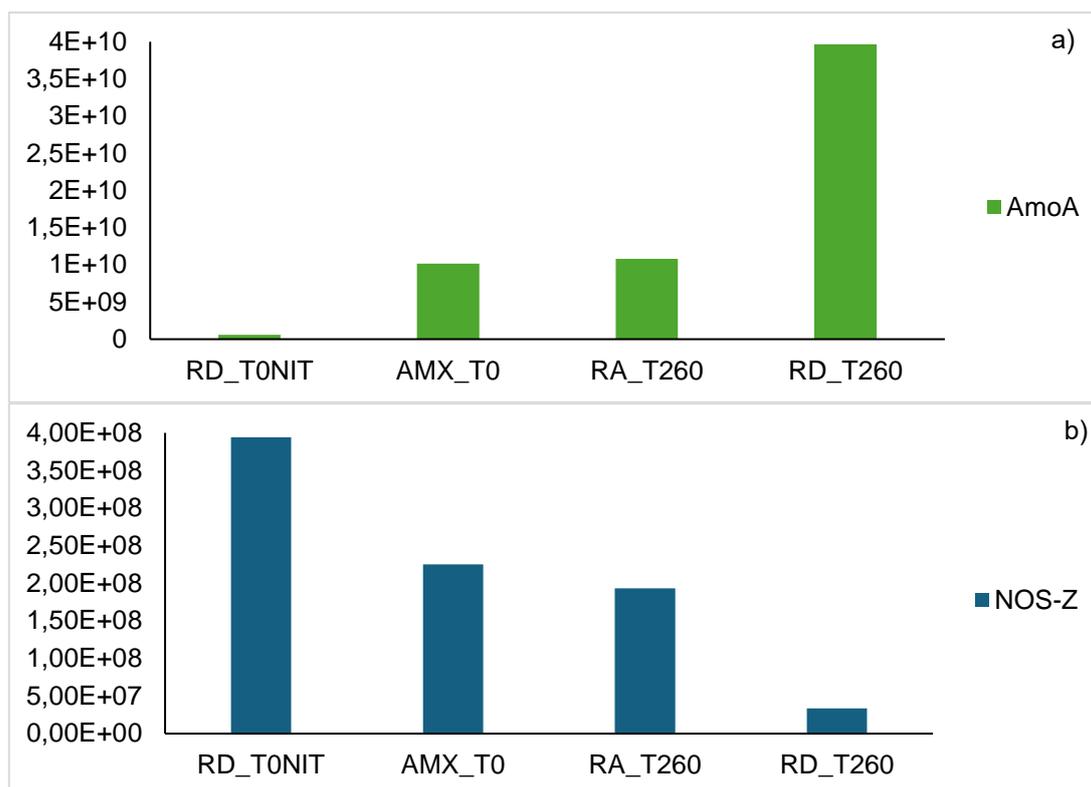


Figura 6-9 Abundância dos genes de bactérias do ciclo do nitrogênio realizados por q-PCR em amoA (a) e nosZ (b).

A análise de qPCR revelou uma abundância significativa de BOA (quantificadas utilizando o par de primers AmoA), no reator RD, cerca de 1000 vezes superior em relação ao reator RA.

É necessário ressaltar que a ERN não deve ser diretamente correlacionada à abundância relativa de bactérias anammox presentes em um reator. Estudos com comunidades em abundância de anammox superior a 44,22% não apresentam altas ERN. Porém, sistemas com < 5% de anammox em abundância registraram elevadas ERN, sugerindo novamente a atuação de outros grupos microbianos que desempenham papéis funcionais essenciais, contribuindo para o desempenho do sistema como um todo (Witkabel; Abendroth, 2024).

Filos, como *Proteobacteriota*, *Chloroflexota* e *Bacteroidota*, destacam-se pela adaptabilidade e resistência a variações ambientais, os quais são frequentemente encontrados em processos anammox (Guo *et al.*, 2022a; Ishimoto; Waki; Soda, 2021). Bactérias do filo *Bacteroidota*, por exemplo, que exercem funções, como fermentação e desnitrificação, foram representadas por gêneros como *Kapabacteriales* (11,66% em RA_T260) e *SJA-28* (8,03% em AMX_T0).

No filo *Pseudomonadota*, foram observadas as seguintes bactérias: *Limnobacter* (6,18% em AMX_T0; 1,09% em RA_T260; 4,45% em RD_T260), *Comamonadaceae* (4,06% em RA_T260; 5,00% em RD_T260), *Thauera* (5,90% em RA_T260) e

Denitratisoma (6,32% em AMX_T0; 6,81% em RA_T260; 1,05% em RD_T260). Esses microrganismos são únicos em realizar a oxidação quimiolitotrófica de NH_4^+ , além de desnitrificação utilizando NO_3^- e NO_2^- como aceptores de elétrons. Como autotróficos, prosperam em ambientes anóxicos, a exemplo do reator RA. No reator RD, que possuía aeração para promover a nitrificação parcial, esses microrganismos foram menos expressivos, explicando suas maiores concentrações em RA.

A granulação dos lodos anammox nos reatores RA e RD está diretamente relacionada aos gêneros microbianos presentes em cada sistema. O reator RD apresentou uma transição gradual, passando de flocos para grânulos e, ao final, formando um biofilme espesso aderido às paredes do reator, mesmo sem o uso de meio suporte. Estudos sugerem que sistemas híbridos, combinando biofilmes e flocos, podem alcançar taxas de remoção mais elevadas, o que mostra resultados promissores (Zhang *et al.*, 2022).

Embora o lodo granular ofereça vantagens importantes, como excelente capacidade de sedimentação e alta concentração de biomassa, pode enfrentar dificuldades frente a componentes mais complexos presentes em águas residuais, o que pode comprometer o desempenho do processo (Zuo *et al.*, 2023).

Estudos anteriores também identificaram a importância da simbiose entre bactérias anammox e heterotróficas. Grupos, como *OLB13*, *SJA-15*, *1-20*, *SBR1031* e *SJA-28*, evidenciaram contribuir para a estabilidade dos sistemas baseados em anammox de variações ambientais. Tal relação simbiótica também pode favorecer a coexistência de flocos e grânulos, promovendo um desempenho estável e robusto dos processos (Su *et al.*, 2022).

Bactérias do filo *Chlorofexi* também foram associadas à biossíntese de polissacarídeos com a cooperação de bactérias anammox na inicialização de reatores (Zhao *et al.*, 2018b), além da biossíntese de metabólitos secundários de folato (Ya *et al.*, 2022).

Bactérias heterotróficas desempenham papéis cruciais em sistemas anammox, especialmente por meio de processos, como a desnitrificação e a redução desassimilatória de nitrato amônio (DNRA). Esses microrganismos utilizam produtos da decomposição microbiana ou aminoácidos derivados de substâncias poliméricas extracelulares (SPE) produzidas por bactérias anammox como fonte de carbono, o que contribui para a remoção eficiente de nitrato (White *et al.*, 2025; Zhang; Wei; Wu, 2020).

Além disso, bactérias heterotróficas auxiliam a formação de agregados (apoiando a produção de SPE e a formação de lodo granular, além da agregação) celulares e a circulação de vitaminas, cofatores e metabólitos essenciais, suprindo vias biossintéticas deficientes em algumas espécies anammox (Cao; Du; Zhou, 2021; White

et al., 2023). Essas interações simbióticas promovem maior estabilidade estrutural do lodo e melhoram o desempenho geral do sistema anammox.

O aumento de SPE é considerado um efetivo indicador da resistência das Anammox ao processo de remoção de nitrogênio. Chen *et al.* (2021b) constataram que, com o aumento da relação PN/PS, uma maior abundância de *Planctomyces* estava presente no processo de desamonificação. O aumento da abundância de bactérias heterotróficas também pode ser explicado pelo aumento da excreção de SPE pelas bactérias anammox para a formação de grânulos (RA) e biofilme (RD), também já relatado por estudos anteriores (Zhang *et al.*, 2024).

Os resultados deste estudo evidenciam que a interação microbiológica entre bactérias anammox e outros microrganismos desempenha um papel crucial na performance do sistema. A formação de grânulos anammox no reator RA e o desenvolvimento de biofilmes no reator RD proporcionaram abordagens complementares para otimização do processo. Notou-se uma maior eficiência de remoção de nitrogênio no reator RD, destacando a importância das diferentes estruturas microbiológicas.

6.4. Conclusão

Este estudo destacou a importância das interações microbiológicas entre bactérias anammox e outros microrganismos presentes em efluentes no ciclo global do nitrogênio. A formação de biofilmes no processo de desamonificação, com altas taxas de remoção e estabilidade, ao longo de 260 dias de operação, evidencia a contribuição das BOA, BON e BHN para o desempenho robusto das bactérias anammox, garantindo uma remoção eficiente de nitrogênio.

As relações entre proteínas e polissacarídeos (PN/PS) das substâncias poliméricas extracelulares (SPE) tiveram um papel determinante na modulação da estrutura do lodo, contribuindo para a estabilidade dos grânulos e biofilmes formados. O reator RD apresentou uma capacidade máxima de consumo de nitrogênio amoniacal (CNA) de $5,79 \text{ kg N m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, com uma eficiência de remoção de nitrogênio (ERN) de 82%. Já o reator RA, atingiu uma CNA máxima de $2,32 \text{ kg N m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, com uma ERN de 85,6%.

Embora as eficiências globais sejam semelhantes, o reator RD demonstrou melhor desempenho na remoção de maiores cargas de nitrogênio, especialmente no processo de desamonificação. Esses resultados confirmam que a eficiência dos processos anammox no tratamento de águas residuárias depende não apenas da abundância de bactérias anammox, mas também das interações simbióticas com outros

microrganismos. Essas interações favorecem a resiliência e a robustez do sistema, especialmente em ambientes com alta carga orgânica, o que contribui para uma remoção mais eficiente e estável de nitrogênio.

6.5. Referências

AHN, Y.-H.; HWANG, I.-S.; MIN, K.-S. ANAMMOX and partial denitritation in anaerobic nitrogen removal from piggery waste. **Water Science and Technology**, [s.l.], v. 49, n. 5-6, p. 145-153, mar. 2004.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 23rd edition ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2017.

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, [s.l.], v. 215, n. 3, p. 403-410, out. 1990.

BLANDIN, G. *et al.* Retrofitting membrane bioreactor (MBR) into osmotic membrane bioreactor (OMBR): A pilot scale study. **Chemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 339, p. 268-277, mai. 2018.

BONASSA, G. *et al.* A new kinetic model to predict substrate inhibition and better efficiency in an airlift reactor on deammonification process. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 319, p. 124158, jan. 2021.

BONASSA, G. *et al.* Performance and microbial features of Anammox in a single-phase reactor under progressive nitrogen loading rates for wastewater treatment plants. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [s.l.], v. 10, n. 1, p. 107028, fev. 2022.

CAO, S.; DU, R.; ZHOU, Y. Coupling anammox with heterotrophic denitrification for enhanced nitrogen removal: A review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, [s.l.], v. 51, n. 19, p. 2260-2293, out. 2021.

CHEN, C. *et al.* Insight into the influence of particle sizes on characteristics and microbial community in the anammox granular sludge. **Journal of Water Process Engineering**, [s.l.], v. 39, p. 101883, fev. 2021a.

CHEN, W. *et al.* Deciphering the mechanism of medium size anammox granular sludge driving better nitrogen removal performance. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 336, p. 125317, set. 2021b.

COCK, P. J. A. *et al.* Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 25, n. 11, p. 1422-1423, jun. 2009.

DENG, Z. *et al.* Anaerobic treatment of nitrogenous industrial organic wastewater by carbon-neutral processes integrated with anaerobic digestion and partial nitrification/anammox: Critical review of current advances and future directions. **Bioresource Technology**, [s.l.], p. 131648, out. 2024.

DU, R. *et al.* Performance of partial-denitrification process providing nitrite for anammox in sequencing batch reactor (SBR) and upflow sludge blanket (USB) reactor. **International Biodeterioration & Biodegradation**, [s.l.], v. 122, p. 38-46, ago. 2017.

ENWALL, K.; PHILIPPOT, L.; HALLIN, S. Activity and Composition of the Denitrifying Bacterial Community Respond Differently to Long-Term Fertilization. **Applied and Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 71, n. 12, p. 8335-8343, dez. 2005.

FENG, C. *et al.* Extracellular biopolymers recovered as raw biomaterials from waste granular sludge and potential applications: A critical review. **Science of The Total Environment**, [s.l.], v. 753, p. 142051, jan. 2021.

FERRIS, M. J.; MUYZER, G.; WARD, D. M. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. **Applied and Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 62, n. 2, p. 340-346, fev. 1996.

FLEMMING, H.-C.; WINGENDER, J. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (SPEs) - Part I: Structural and ecological aspects. **Water Science and Technology**, [s.l.], v. 43, n. 6, p. 1-8, mar. 2001.

GUO, H. *et al.* Optimizing nitrogen removal in PD/A reactors: Effects of influent composition and temperature on system stability and microbial dynamics. **Science of The Total Environment**, [s.l.], v. 954, p. 176381, dez. 2024.

GUO, Y. *et al.* Treating the filtrate of mainstream anaerobic membrane bioreactor with the pilot-scale sludge-type one-stage partial nitritation/anammox process operated from 25 to 15 °C. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 351, p. 127062, mai. 2022a.

GUO, Y. *et al.* The main anammox-based processes, the involved microbes and the novel process concept from the application perspective. **Frontiers of Environmental Science & Engineering**, [s.l.], v. 16, n. 7, p. 84, jul. 2022b.

HAN, N.-N. *et al.* Biofilm-induced heterogeneity toward anammox bacteria distribution and metabolome. **Chemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 498, p. 155535, out. 2024.

HENRIQUES, I. D. S.; LOVE, N. G. The role of extracellular polymeric substances in the toxicity response of activated sludge bacteria to chemical toxins. **Water Research**, [s.l.], v. 41, n. 18, p. 4177-4185, out. 2007.

HOLLAS, C. E. *et al.* Modified Ludzack–Ettinger system role in efficient nitrogen removal from swine manure under high total suspended solids concentration. **International Journal of Environmental Science and Technology**, [s.l.], v. 16, n. 12, p. 7715-7726, dez. 2019.

HOU, X.; LIU, S.; ZHANG, Z. Role of extracellular polymeric substance in determining the high aggregation ability of anammox sludge. **Water Research**, [s.l.], v. 75, p. 51-62, maio 2015.

HUANG, S. *et al.* Analysis of N-Acy-L-homoserine lactones (AHLs) in wastewater treatment systems using SPE-LLE with LC-MS/MS. **Water Research**, [s.l.], v. 177, p. 115756, jun. 2020.

HUMBERT, S.; ZOPFI, J.; TARNAWSKI, S.-E. Abundance of anammox bacteria in different wetland soils. **Environmental Microbiology Reports**, [s.l.], v. 4, n. 5, p. 484-490, 2012.

ISHIMOTO, C.; WAKI, M.; SODA, S. Adaptation of anammox granules in swine wastewater treatment to low temperatures at a full-scale simultaneous partial nitrification, anammox, and denitrification plant. **Chemosphere**, [s.l.], v. 282, p. 131027, nov. 2021.

LI, J. *et al.* Insight into the impacts of organics on anammox and their potential linking to system performance of sewage partial nitrification-anammox (PN/A): A critical review. **Bioresource Technology**, v. 300, p. 122655, mar. 2020.

LI, J. *et al.* Spectroscopic investigation of the interaction between extracellular polymeric substances and tetracycline during sorption onto anaerobic ammonium-oxidising sludge. **Environmental Technology**, [s.l.], v. 42, n. 11, p. 1787-1797, mai. 2021.

LOTTI, T. *et al.* Extraction, recovery and characterization of structural extracellular polymeric substances from anammox granular sludge. **Journal of Environmental Management**, [s.l.], v. 236, p. 649-656, abr. 2019.

LU, H. *et al.* The morphological and settling properties of ANAMMOX granular sludge in high-rate reactors. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 143, p. 592-597, set. 2013.

MASELLA, A. P. *et al.* PANDAseq: paired-end assembler for illumina sequences. **BMC Bioinformatics**, [s.l.], v. 13, n. 1, p. 31, dez. 2012.

MCSWAIN, B. S. *et al.* Composition and Distribution of Extracellular Polymeric Substances in Aerobic Flocs and Granular Sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 71, n. 2, p. 1051-1057, fev. 2005.

NAUFAL, M.; WU, J.-H. Chemomixotrophy and stress adaptation of anammox bacteria: A review. **Water Research**, [s.l.], v. 257, p. 121663, jun. 2024.

NIEDERDORFER, R. *et al.* Distinct growth stages controlled by the interplay of deterministic and stochastic processes in functional anammox biofilms. **Water Research**, [s.l.], v. 200, p. 117225, jul. 2021.

OSHIKI, M. *et al.* Cell Density-dependent Anammox Activity of *Candidatus Brocadia sinica* Regulated by *N*-acyl Homoserine Lactone-mediated Quorum Sensing. **Microbes and Environments**, [s.l.], v. 35, n. 4, p. n/a, 2020.

PEREIRA, A. D.; ARAÚJO, J. C. D. Protocols for analysis and determinations in sewage samples Protocol 3 – Determination of bacteria and genes of the nitrogen cycle by qPCR. **Cadernos Técnicos Engenharia Sanitária e Ambiental**, [s.l.], v. 2, n. 4, p. 21-26, 2022.

QIAN, Y. *et al.* Control strategy and performance of simultaneous removal of nitrogen and organic matter in treating swine manure digestate using one reactor with airlift and micro-granule. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 355, p. 127199, jul. 2022.

QIN, Y. *et al.* Impact of substrate concentration on anammox-UBF reactors start-up. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 239, p. 422-429, set. 2017.

- ROTTTHAUWE, J. H.; WITZEL, K. P.; LIESACK, W. The ammonia monoxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. **Applied and Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 63, n. 12, p. 4704-4712, dez. 1997.
- SHI, Y. *et al.* Exploiting extracellular polymeric substances (SPE) controlling strategies for performance enhancement of biological wastewater treatments: An overview. **Chemosphere**, [s.l.], v. 180, p. 396-411, ago. 2017a.
- SHI, Z.-J. *et al.* Mass transfer characteristics, rheological behavior and fractal dimension of anammox granules: The roles of upflow velocity and temperature. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 244, p. 117-124, nov. 2017b.
- SILVA, R. D. N. *et al.* Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s.l.], v. 23, n. 3, p. 337-341, dez. 2003.
- SMITH, P. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, [s.l.], v. 150, n. 1, p. 76-85, out. 1985.
- SMYTH, R. P. *et al.* Reducing chimera formation during PCR amplification to ensure accurate genotyping. **Gene**, [s.l.], v. 469, n. 1-2, p. 45-51, dez. 2010.
- STROUS, M. *et al.* The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 50, n. 5, p. 589-596, nov. 1998.
- SU, B. *et al.* Simultaneous partial nitrification, anammox, and denitrification in an upflow microaerobic membrane bioreactor treating middle concentration of ammonia nitrogen wastewater with low COD/TN ratio. **Chemosphere**, [s.l.], v. 295, p. 133832, mai. 2022.
- SU, D.; ZHANG, W.; CHEN, Y. Advanced carrier materials for anammox in wastewater nitrogen removal. **Next Materials**, [s.l.], v. 7, p. 100380, abr. 2025.
- THRASH, A.; ARICK, M.; PETERSON, D. G. Quack: A quality assurance tool for high throughput sequence data. **Analytical Biochemistry**, [s.l.], v. 548, p. 38-43, mai. 2018.
- VIANCELLI, A. *et al.* Bacterial biodiversity from an anaerobic up flow bioreactor with ANAMMOX activity inoculated with swine sludge. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [s.l.], v. 54, n. 5, p. 1035-1041, out. 2011.
- WANG, W.; WANG, Y. Determining the mechanism for biomass segregation between granules and flocs in anammox granular system from the prospective of SPE. **Chemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 475, p. 146028, nov. 2023.
- WHITE, C. *et al.* Synergistic interactions between anammox and dissimilatory nitrate reducing bacteria sustains reactor performance across variable nitrogen loading ratios. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 14, p. 1243410, ago. 2023.
- WHITE, C. A. *et al.* Life history strategies determine response to SRT driven crash in anammox bioreactors. **Water Research**, [s.l.], v. 268, p. 122727, jan. 2025.
- WITKABEL, P.; ABENDROTH, C. A systematic literature review of microbial anammox consortia in UASB/EGSB-reactors. **Chemosphere**, [s.l.], v. 367, p. 143630, nov. 2024.

- WU, Y.-J. *et al.* Nitrogen removal strategy for real swine wastewater by combining partial nitrification-denitrification process with anammox. **Chemosphere**, [s.l.], v. 364, p. 143116, set. 2024.
- XU, X. *et al.* Effects of gibberellin on the activity of anammox bacteria. **Journal of Environmental Management**, [s.l.], v. 225, p. 104-111, nov. 2018.
- YA, T. *et al.* Metagenomic insights into the symbiotic relationship in anammox consortia at reduced temperature. **Water Research**, [s.l.], v. 225, p. 119184, out. 2022.
- YAN, Y. *et al.* Attaining superior nitrogen removal from integrated mature landfill leachate and kitchen waste digestion liquid via a two-stage partial nitrification/anammox (PN/A) process. **Chemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 480, p. 148352, jan. 2024.
- YANG, Y. *et al.* Discovery of a new genus of anaerobic ammonium oxidizing bacteria with a mechanism for oxygen tolerance. **Water Research**, [s.l.], v. 226, p. 119165, nov. 2022.
- YE, J. *et al.* Diversity and dynamic response of anaerobic ammonia oxidation granular sludge. **Journal of Environmental Sciences**, [s.l.], v. 152, p. 262-275, jun. 2025.
- YU, H. *et al.* In situ elimination of nitrite inhibition on AnAOB by acetate dosing in an up-flow granular anammox reactor. **Science of The Total Environment**, [s.l.], v. 741, p. 139738, nov. 2020.
- ZHANG, J.-F. *et al.* High ammonia loading rate and biofilm reattachment initiated partial nitrification and anammox in a membrane aerated biofilm reactor. **Journal of Water Process Engineering**, [s.l.], v. 58, p. 104829, fev. 2024.
- ZHANG, Q. *et al.* The mixed/mixotrophic nitrogen removal for the effective and sustainable treatment of wastewater: From treatment process to microbial mechanism. **Water Research**, [s.l.], v. 226, p. 119269, nov. 2022.
- ZHANG, T.; WEI, N.; WU, G. Autotrophic nitrogen removal and potential microbial interactions in anammox systems with different ammonia and organic carbon concentrations. **Journal of Water Process Engineering**, [s.l.], v. 37, p. 101493, out. 2020.
- ZHANG, Y. *et al.* Effects of substrate shock on extracellular polymeric substance (EPS) excretion and characteristics of attached biofilm anammox granules. **RSC Advances**, [s.l.], v. 6, n. 114, p. 113289-113297, 2016.
- ZHAO, Y. *et al.* Insight into the Aggregation Capacity of Anammox Consortia during Reactor Start-Up. **Environmental Science & Technology**, [s.l.], v. 52, n. 6, p. 3685–3695, 20 mar. 2018a.
- ZHAO, Y. *et al.* Genome-Centered Metagenomics Analysis Reveals the Symbiotic Organisms Possessing Ability to Cross-Feed with Anammox Bacteria in Anammox Consortia. **Environmental Science & Technology**, [s.l.], v. 52, n. 19, p. 11285-11296, 2 out. 2018b.

ZHENG, P. *et al.* Structural characteristics and microbial function of biofilm in membrane-aerated biofilm reactor for the biodegradation of volatile pyridine. **Journal of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 437, p. 129370, set. 2022.

ZHU, G. *et al.* Anammox granular sludge in low-ammonium sewage treatment: Not bigger size driving better performance. **Water Research**, [s.l.], v. 142, p. 147–158, out. 2018.

ZUO, F. *et al.* Resilience of anammox application from sidestream to mainstream: A combined system coupling denitrification, partial nitritation and partial denitrification with anammox. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 374, p. 128783, abr. 2023.

7. CONCLUSÕES GERAIS

➤ **Hipótese 1:**

A hipótese de que sistemas anammox suplementados com nitrito apresentam boa eficiência na remoção de nitrogênio e podem ser utilizados para a produção de lodo anammox não foi integralmente confirmada. O sistema apresentou uma eficiência média de remoção de nitrogênio de 72% e formou grânulos estáveis com diâmetro entre 0,7 a 2 mm, o que indica um desempenho promissor. No entanto, foram identificados desafios operacionais que comprometeram a estabilidade do processo, especialmente relacionados à competição microbológica por substrato.

Durante o período de operação, a análise dos coeficientes estequiométricos revelou flutuações na eficiência devido à competição entre bactérias anammox e outros microrganismos, como bactérias heterotróficas e desnitrificantes. A presença de resíduos de carbono orgânico, associada à ausência de oxigênio dissolvido, favoreceu a proliferação dessas bactérias concorrentes, o que impactou negativamente a eficiência global do sistema e dificultou a manutenção de altas capacidades de consumo de nitrogênio amoniacal (CNA).

Embora os grânulos anammox formados tenham demonstrado boa estabilidade estrutural, a capacidade máxima de CNA alcançada foi de $2,66 \pm 0,27 \text{ kg N m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, abaixo do esperado para um desempenho ideal em condições de alta carga. Isso indica que, para viabilizar a aplicação em larga escala, o processo anammox deve ser complementado por consórcios microbológicos mais robustos, como os presentes em sistemas de desamonificação, que combinam bactérias anammox (AnAOB) com bactérias oxidadoras de amônia (BOA). Esses consórcios favorecem a estabilidade operacional e a resiliência do sistema frente a variações de carga.

Portanto, a hipótese não foi totalmente comprovada, sugerindo que ajustes no sistema, incluindo a combinação de microrganismos e o controle rigoroso das condições operacionais, são necessários para garantir eficiência e estabilidade na remoção de nitrogênio em larga escala.

➤ **Hipótese 2:**

Os resultados do estudo confirmam que os consórcios microbológicos, especialmente a combinação entre bactérias anammox (AnAOB) e bactérias oxidadoras de amônia (BOA), conferem maior resiliência operacional a variações de carga, promovendo um desempenho mais estável a longo prazo. A comparação entre os reatores Anammox e Desamonificação revelou que o sistema de desamonificação apresentou maior estabilidade, atribuída, em grande parte, à presença e à interação entre diferentes microrganismos.

No reator de desamonificação, a relação entre proteínas e polissacarídeos (PN/PS) das substâncias poliméricas extracelulares (SPE) manteve-se em torno de 40, com flutuações mínimas ao longo do período analisado. Essa estabilidade sugere uma estrutura de lodo mais coesa e resistente, contribuindo para a formação e manutenção de biofilmes estáveis. Em contraste, o reator Anammox apresentou quedas acentuadas na relação PN/PS, indicando uma maior instabilidade no processo e menor resistência estrutural dos grânulos formados.

Além disso, o sistema de desamonificação demonstrou uma CNA máxima de $5,79 \text{ kg N m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, aproximadamente 2,5 vezes superior à aplicada ao sistema somente Anammox, que atingiu uma CNA máxima de $2,32 \text{ kg N m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Essa diferença destaca a robustez do sistema de desamonificação em lidar com cargas mais elevadas, reforçando o papel dos consórcios AnAOB-BOA na resiliência do processo. A presença de BOA no sistema favoreceu interações simbióticas, promovendo uma melhor adaptação a variações ambientais e maior eficiência na remoção de nitrogênio.

Esses fatores foram fundamentais para garantir a robustez do sistema em ambientes com alta carga orgânica, validando a hipótese de que consórcios anammox contribuem significativamente para a estabilidade e eficiência dos processos de tratamento de efluentes.

8. PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS

Com base nos resultados obtidos neste estudo, que investigou o comportamento e a morfologia dos lodos anammox alimentados com efluentes da suinocultura, recomenda-se para trabalhos futuros:

1. **Avaliação de Materiais Suporte para Biofilme:** Considerando a formação de biofilme observada no sistema de desamonificação, é interessante a investigação de materiais que possam vir a ser utilizados como suportes para o desenvolvimento e estabilização do biofilme. A busca por materiais economicamente viáveis, que favoreçam a adesão dos microrganismos, é fundamental para a aplicação em larga escala de processos biológicos de tratamento de águas residuárias.
2. **Inicialização de Processos Anammox com Lodos de Nitrificação/Desnitrificação:** A utilização de lodos provenientes de processos de nitrificação/desnitrificação, investigados previamente por determinações de biologia molecular, e que já contenham populações de bactérias anammox, como inóculo para a startup dos sistemas anammox, deve ser investigada. A avaliação do comportamento dos reatores sob essas condições pode oferecer *insights* importantes sobre a adaptação e a dinâmica dos consórcios microbiológicos, além de permitir uma redução do tempo de adaptação e uma maior eficiência no desempenho do sistema.