

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ELAINE CRISTINA LATOCHESKI

REMOÇÃO AUTOTRÓFICA DE NITROGÊNIO AMONÍACAL DE LIXIVIADO DE
ATERRO SANITÁRIO: ESTRATÉGIAS DE ENGENHARIA DE MICROBIOMAS

CURITIBA

2024

ELAINE CRISTINA LATOCHESKI

REMOÇÃO AUTOTRÓFICA DE NITROGÊNIO AMONÍACAL DE LIXIVIADO DE
ATERRO SANITÁRIO: ESTRATÉGIAS DE ENGENHARIA DE MICROBIOMAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito à obtenção do grau de Doutora em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental.

Orientadora: Prof.^a Maria Cristina Borba Braga,
PhD, DIC
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Carolina Vieira da
Rocha

CURITIBA

2024

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Latocheski, Elaine Cristina

Remoção autotrófica de nitrogênio amoniacal de lixiviado de aterro sanitário: estratégias de engenharia de microbiomas / Elaine Cristina Latocheski. – Curitiba, 2024.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental.

Orientador: Maria Cristina Borba Braga

Coorientador: Maria Carolina Vieira da Rocha

1. Aterro sanitário – Lixiviação. 2. Nitrificação. 3. Solos – Aeração. 4. Nitrogênio. I. Universidade Federal do Paraná. II. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental. III. Braga, Maria Cristina Borba. IV. Rocha, Maria Carolina Vieira da. V. Título.

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA DE RECURSOS HÍDRICOS E AMBIENTAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ELAINE CRISTINA LATOCHESKI** intitulada: **REMOÇÃO AUTOTRÓFICA DE NITROGÊNIO AMONÍACAL DE LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO: ESTRATÉGIAS DE ENGENHARIA DE MICROBIOMAS**, sob orientação da Profa. Dra. MARIA CRISTINA BORBA BRAGA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Novembro de 2024.

Assinatura Eletrônica

02/12/2024 11:56:26.0

MARIA CRISTINA BORBA BRAGA
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

02/12/2024 12:19:48.0

JULIO CESAR DE CARVALHO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

11/12/2024 13:44:37.0

CHIRLEI GLIENKE

Avaliador Externo (55001745)

Assinatura Eletrônica

09/12/2024 15:51:18.0

ANA CLAUDIA BARANA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA)

Assinatura Eletrônica

02/12/2024 13:20:08.0

MARIA CAROLINA VIEIRA DA ROCHA

Coorientador(a)

Assinatura Eletrônica

09/12/2024 11:29:13.0

CRISTOVÃO VICENTE SCAPULATEMPO FERNANDES

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

06/12/2024 16:28:42.0

JULIANA CALABRIA DE ARAÚJO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS)

Às famílias que por biologia ou afinidade fazem parte da minha jornada. A vocês, dedico este trabalho. Obrigada por serem meu refúgio, minha inspiração e minha força!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Cristina Braga, que, ao longo desses anos, me apoiou não apenas na construção desta tese, mas também em momentos desafiadores.

À minha coorientadora, Maria Carolina Vieira da Rocha, pelo incentivo e ideias que ajudaram no direcionamento da pesquisa.

Ao meu parceiro, Ricardo Gonçalves de Moraes, pelos conselhos.

Ao Sérgio Michelotto Braga, pelas viagens a São Bento do Sul, por realizar as coletas do lixiviado e por “salvar” os experimentos em momentos de apuros.

À Francielle Gonçalves, pelo cuidado e amizade.

Ao Serviço Autônomo Municipal de Água e Esgotos (SAMAE) de São Bento do Sul e à Transresíduos, em especial à Amanda Stiz de Carvalho e à Isabel Meneses Paul, por possibilitarem a realização desta pesquisa.

À Patrícia Beatriz Baréa, pela coleta do lodo.

Aos membros de banca, Professores Miguel Mansur Aisse, Chirlei Glienke, Cristovão Vicente Scapulatempo Fernandes, Júlio Cesar de Carvalho, Ana Cláudia Barana e Juliana Calábria de Araújo.

À equipe do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR e, em especial, à Sharon e à Flavia, pelas ideias e realização da microscopia eletrônica de varredura.

Ao Instituto Carlos Chagas (ICC/Fiocruz Paraná), em particular à equipe da Plataforma de Microscopia Confocal e Eletrônica, Lia, Anny, Ana e Bruna, pelas análises de microscopia eletrônica de transmissão.

Ao Valter Antônio de Baura, pela colaboração nas análises de sequenciamento e pelo aprendizado proporcionado.

À equipe da Neoprospecta Microbiome Biotechnologies, pela realização das análises de sequenciamento.

To Ferry J. Siemensma. Thank you, Ferry, for your availability and assistance in identifying the amoebae in my sludge samples.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro - Código de Financiamento 001.

If we view microbes (all those organisms invisible to the unaided eye) as mere “germs”, hence unworthy of our consideration as part of the biodiversity, we slight those organisms that provide our air and fertilize our soil, and we separate essential processes from the web of the life. We codify our ignorance and preclude learning to use the recycling and gas production skills of the so-called lower organisms. The old labels impede the spread of knowledge about the mutually dependent diversity of life and its importance to our well-being.

Lynn Margulis

RESUMO

O lixiviado de aterro sanitário é uma água residuária complexa e que exige tratamento para mitigar seu impacto ambiental. Neste estudo, o lixiviado apresentou elevada concentração de nitrogênio amoniacal total (NAT), superior a 600 mg N L^{-1} , e limitada disponibilidade de matéria orgânica biodegradável, estimada entre 26% e 39% da matéria orgânica total, características que favorecem o tratamento por bioprocessos autotróficos como a nitrificação parcial e o *anammox*. O lixiviado exerceu efeito inibitório ao crescimento das raízes de *Allium cepa*, o que sugere a sua potencial toxicidade. Para o tratamento do lixiviado, dois biorreatores aeróbios em escala de bancada, denominados R1 e R2, foram operados em bateladas sequenciais por 600 dias. Durante a operação de R1 e R2, três estratégias de engenharia de microbiomas foram avaliadas: aclimatação e enriquecimento da biomassa nitrificante, manipulação das condições operacionais e bioaumento. A aclimatação com meio mineral e baixa concentração de NAT afluyente (160 mg N L^{-1}) resultou em eficiência média de remoção do NAT de 90% para ambos os biorreatores, provavelmente devido à intensificação da atividade das bactérias oxidantes da amônia (BOA). A manipulação das condições de aeração e o controle da concentração de oxigênio dissolvido demonstraram ser eficazes na redução do consumo energético e na limitação da produção de lodo excedente. A mudança da aeração contínua para a intermitente não prejudicou a eficiência de remoção do NAT. Entretanto, o aumento da concentração do afluyente, de 160 mg N L^{-1} para 400 mg N L^{-1} , esteve associado à redução da eficiência de remoção do NAT para ambos os biorreatores, com variação entre 31% e 88% durante o tratamento do lixiviado. O bioaumento contribuiu para o maior acúmulo de nitrito, beneficiando bioprocessos autotróficos como a nitrificação parcial e o *anammox*. Durante a operação dos biorreatores, foram identificados desafios associados ao controle da atividade das bactérias oxidantes do nitrito (BON), que podem dificultar a implementação de alguns bioprocessos. Por exemplo, a concentração da amônia livre, que variou entre $3,1 \text{ mg N L}^{-1}$ e $108,3 \text{ mg N L}^{-1}$, e a aeração intermitente não provocaram a inibição significativa e duradoura desses organismos, contrariando estudos prévios. A caracterização da microbiota revelou a predominância dos gêneros *Nitrosomonas* e *Nitrospira* como os principais representantes de BOA e BON, respectivamente. Foram também identificadas sequências associadas a bactérias anaeróbias do gênero "*Candidatus Kuenenia*", o que sugere a formação de micronichos durante o adensamento dos flocos biológicos de R1 e R2. Apesar das condições associadas ao tratamento do lixiviado favorecerem os bioprocessos autotróficos, foram detectados gêneros de bactérias heterotróficas desnitrificantes, como *Denitratisoma*, que podem ter contribuído para a remoção do nitrogênio do lixiviado. Os resultados sugerem que as estratégias de engenharia de microbiomas podem favorecer a manutenção de grupos microbianos com capacidades metabólicas distintas em sistemas de tratamento de lixiviado. Finalmente, o conhecimento produzido nesta pesquisa pode contribuir para o desenvolvimento de abordagens mais eficientes e de menor custo para a remoção do nitrogênio amoniacal, auxiliando no cumprimento da legislação ambiental e redução dos impactos negativos causados pelo lixiviado de aterro sanitário.

Palavras-chave: lixiviado de aterro sanitário; nitrificação; *anammox*; desnitrificação; aeração intermitente; bioaumento.

ABSTRACT

Landfill leachate is a complex water matrix that requires treatment to mitigate its environmental impact. In this study, the leachate exhibited a high concentration of ammonia nitrogen (exceeding 600 mg N L^{-1}) and a low concentration of biodegradable organic matter, estimated to range between 26% and 39% of the total organic matter concentration. These characteristics favor treatment by autotrophic bioprocesses, such as partial nitrification and anammox. The leachate inhibited *Allium cepa* root growth, indicating potential toxicity. Two aerobic bench-scale bioreactors, labeled R1 and R2, were operated in sequential batch mode for a total of 600 days. Three microbiome engineering strategies were assessed during the operation of R1 and R2: acclimatization and enrichment of the nitrifying biomass, manipulation of operating conditions, and bioaugmentation. Acclimatization with a mineral medium and low influent total ammonia nitrogen (TAN) concentration (160 mg N L^{-1}) resulted in an average TAN removal efficiency of 90% in both bioreactors, likely due to enhanced activity of ammonia-oxidizing bacteria (AOB). Adjustments to the aeration conditions and dissolved oxygen levels proved to be effective in reducing energy consumption and limiting excess sludge production. The effectiveness of TAN removal was not affected when the aeration mode was changed from continuous to intermittent. However, when the influent TAN concentration increased from 160 mg N L^{-1} to 400 mg N L^{-1} , the TAN removal efficiency in both bioreactors decreased, ranging between 31% and 88% during the leachate treatment. Bioaugmentation increased nitrite accumulation, enhancing autotrophic bioprocesses such as partial nitrification and anammox. However, challenges appeared during bioreactor operations in controlling the activity of nitrite-oxidizing bacteria (NOB), which can hinder the implementation of certain bioprocesses. Free ammonia concentrations ranging from 3.1 mg N L^{-1} to $108.3 \text{ mg N L}^{-1}$ and intermittent aeration did not significantly inhibit these organisms, contradicting previous findings. Microbial characterization showed that *Nitrosomonas* and *Nitrospira* were the dominant genera of AOB and NOB, respectively. Additionally, sequences related to anaerobic bacteria of the genus “*Ca. Kuenenia*” were identified, indicating the formation of microniches within the biological flocs of R1 and R2. Even though the conditions were favorable for autotrophic bioprocesses, heterotrophic denitrifying bacteria, such as *Denitratisoma*, were also found and may have played a role in reducing nitrogen levels in the leachate. These findings indicate that microbiome engineering strategies could help maintain microbial groups with unique metabolic capabilities in leachate treatment systems. Finally, the knowledge gained from this research may aid in developing more efficient and cost-effective methods for ammonia nitrogen removal, thereby facilitating compliance with environmental regulations and reducing the negative impacts of landfill leachate.

Keywords: landfill leachate; nitrification; anammox; denitrification; intermittent aeration; bioaugmentation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1 – PRINCIPAIS REAÇÕES ASSOCIADAS À REMOÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO AMONÍACAL DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS	26
FIGURA 2.2 – PRINCIPAIS GRUPOS DE MICRO-ORGANISMOS NITRIFICANTES.....	30
FIGURA 2.3 – PRINCIPAIS GRUPOS TAXONÔMICOS DE BACTÉRIAS OXIDANTES DE AMÔNIA	30
FIGURA 2.4 – PRINCIPAIS GRUPOS TAXONÔMICOS DE BACTÉRIAS OXIDANTES DE NITRITO	34
FIGURA 2.5 – ESTRATÉGIAS DA ENGENHARIA DE MICROBIOMAS E APLICAÇÃO PARA A REMOÇÃO DO NITROGÊNIO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS.....	38
FIGURA 2.6 – ABORDAGENS DE “BAIXO PARA CIMA” E DE “CIMA PARA BAIXO” DA ENGENHARIA DE MICROBIOMAS	39
FIGURA 3.1 – ETAPAS PRINCIPAIS PARA A REALIZAÇÃO DA PESQUISA.....	52
FIGURA 3.2 – DISPOSIÇÃO DAS SEMENTES DE CEBOLA NAS PLACAS DE PETRI	57
FIGURA 3.3 – BIORREATOR E1 E INSTALAÇÕES.....	59
FIGURA 3.4 – PROCEDIMENTO REALIZADO PARA O PREPARO DA BIOMASSA PARA O BIOAUMENTO	61
FIGURA 3.5 – BIORREADORES R1 E R2 E INSTALAÇÕES.....	62
FIGURA 3.6 – CARACTERÍSTICAS E ESTRATÉGIAS DE ENGENHARIA DE MICROBIOMAS DAS FASES OPERACIONAIS PARA R1 E R2.....	64
FIGURA 4.1 – CONSUMO DO NAT EM FUNÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO .	75
FIGURA 4.2 – CONCENTRAÇÃO EFLUENTE DE NAT, NITRATO E NITRITO AO LONGO DA OPERAÇÃO DO BIORREATOR E1	79
FIGURA 4.3 – EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DO NITROGÊNIO E PAN AO LONGO DA OPERAÇÃO DO BIORREATOR E1	81
FIGURA 4.4 – CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO ORGÂNICO CONSUMIDO E NITROGÊNIO INORGÂNICO EFLUENTE AO LONGO DA OPERAÇÃO DO BIORREATOR E1	82
FIGURA 4.5 – PRINCIPAIS GÊNEROS MICROBIANOS IDENTIFICADOS NO BIORREATOR E1	83

FIGURA 4.6 – CONCENTRAÇÃO DE SÓLIDOS SUSPENSOS FIXOS E VOLÁTEIS PARA O BIORREATOR E1	87
FIGURA 4.7 – RELAÇÃO SSV/SST EM FUNÇÃO DO TEMPO	90
FIGURA 4.8 – IVL ₃₀ EM FUNÇÃO DO TEMPO	91
FIGURA 4.9 – MICROGRAFIAS ÓPTICAS DO LODO DE R1 E R2.....	93
FIGURA 4.10 – MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA DO LODO DE R1 E R2 – AUMENTO DE 5000-7000X	94
FIGURA 4.11 – MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA DO LODO DE R1 E R2 – AUMENTO DE 1500X	95
FIGURA 4.12 – MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE TRANSMISSÃO DO LODO DE R1: ASPECTO GERAL DA MATRIZ EXTRACELULAR.....	96
FIGURA 4.13 – MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE TRANSMISSÃO: AGRUPAMENTOS MICROBIANOS PRESENTES NOS FLOCOS BIOLÓGICOS DE R1	98
FIGURA 4.14 – MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE TRANSMISSÃO: MICRO-ORGANISMOS PRESENTES NOS FLOCOS BIOLÓGICOS DE R1	99
FIGURA 4.15 – MICROGRAFIAS ÓPTICAS DO LICOR MISTO DE R1 E R2: PROTOZOÁRIOS E METAZOÁRIOS.....	100
FIGURA 4.16 – EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE NAT, NITROGÊNIO INORGÂNICO E NITROGÊNIO TOTAL PARA R1 E R2	104
FIGURA 4.17 – PERCENTAGEM DE ACÚMULO DO NITRITO PARA R1 E R2....	105
FIGURA 4.18 – SÉRIE DE SÓLIDOS EM FUNÇÃO DO TEMPO.....	106
FIGURA 4.19 – EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DO NAT E PAN PARA R1 E R2 NA FASE IA-2	108
FIGURA 4.20 – CONCENTRAÇÃO DE NITRITO E NITRATO NO EFLUENTE DE R1 E R2 NA FASE IA-2	109
FIGURA 4.21 – NITROGÊNIO AMONÍACAL TOTAL CONSUMIDO E NITRITO E NITRATO PRODUZIDOS EM R1 E R2.....	110
FIGURA 4.22 – MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA DO LODO DE R1 E R2 – FASE IA-2.....	111
FIGURA 4.23 – EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DO NAT NAS FASES IA-2 E IB.....	112
FIGURA 4.24 – PERCENTAGEM DE ACÚMULO DO NITRITO E CONCENTRAÇÃO EFLUENTE DE NITRITO E NITRATO NAS FASES IA-2 E IB.....	114

FIGURA 4.25 – MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE TRANSMISSÃO: CÉLULAS SENESCENTES	115
FIGURA 4.26 – RESULTADOS PARA O ENSAIO EM BATELADA PARA AVALIAÇÃO DA ACLIMATAÇÃO DA MICROBIOTA DE R1 E R2	116
FIGURA 4.27 – EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DO NAT E PAN DURANTE AS FASES IB E II-1	118
FIGURA 4.28 – EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DO NAT E PAN DURANTE AS FASES II-1 E II-2	119
FIGURA 4.29 – EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DO NAT E PAN DURANTE AS FASES II-2 E III	120
FIGURA 4.30 – CONCENTRAÇÃO EFLUENTE DE NITRITO E NITRATO DURANTE AS FASES II-2 E III	122
FIGURA 4.31 – COMPRIMENTO DAS RAÍZES DE <i>A. cepa</i> APÓS EXPOSIÇÃO AOS AGENTES AVALIADOS	123
FIGURA 4.32 – PARÂMETROS DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE <i>A. cepa</i> APÓS EXPOSIÇÃO AOS AGENTES AVALIADOS	124
FIGURA 4.33 – EVOLUÇÃO TEMPORAL DA COMUNIDADE DE PROTOZOÁRIOS E METAZOÁRIOS DE R1 E R2	126
FIGURA 4.34 – CORRELOGRAMA ENTRE AS VARIÁVEIS E PARÂMETROS AVALIADOS DURANTE AS FASES IA-1 E IA-2 PARA R1 E R2 ..	128
FIGURA 4.35 – CORRELOGRAMA ENTRE AS VARIÁVEIS E PARÂMETROS AVALIADOS DURANTE A OPERAÇÃO DE R1 E R2	132
FIGURA 4.36 – CONCENTRAÇÃO DO NAT E AMÔNIA LIVRE DURANTE A OPERAÇÃO DE R1 E R2	133
FIGURA 4.37 – EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DO NAT PARA R1 E R2 DURANTE AS FASES II-2 E IV	139
FIGURA 4.38 – PORCENTAGEM DE ACÚMULO DO NITRITO PARA R1 E R2 COM ÊNFASE NAS FASES II-2 E IV	141
FIGURA 4.39 – CONCENTRAÇÃO DO NITRITO E NITRATO DURANTE A OPERAÇÃO DE R1 E R2	142
FIGURA 4.40 – PERFIL DE CONSUMO DO NAT E DE PRODUÇÃO DE NITRITO E NITRATO DURANTE UM CICLO OPERACIONAL DE R1	144
FIGURA 4.41 – ABUNDÂNCIA RELATIVA DOS GÊNEROS DETECTADOS NAS AMOSTRAS DOS BIORREATORES R1 E R2 NA FASE IV	146

FIGURA 4.42 – EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DO NAT, NITROGÊNIO INORGÂNICO E NITROGÊNIO TOTAL PARA R1 E R2 NAS FASES IV E V	151
FIGURA 4.43 – PERCENTAGEM DE ACÚMULO DO NITRITO PARA R1 E R2 DURANTE A FASE V.....	152
FIGURA 4.44 – CONCENTRAÇÃO DE NITRITO E NITRATO DURANTE A OPERAÇÃO DE R1 E R2	153
FIGURA 4.45 – DISTRIBUIÇÃO DOS GÊNEROS IDENTIFICADOS NAS AMOSTRAS DOS BIORREADORES E1, R1 E R2 ANTERIORMENTE AO BIOAUMENTO	155
FIGURA 4.46 – ABUNDÂNCIA RELATIVA DOS GÊNEROS DETECTADOS NAS AMOSTRAS DOS BIORREADORES E1, R1 E R2 ANTERIORMENTE AO BIOAUMENTO	157
FIGURA 4.47 – TAXA E EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DO NAT PARA R1 E R2 DURANTE AS FASES V E VI	159
FIGURA 4.48 – PERCENTAGEM DE ACÚMULO DO NITRITO PARA R1 E R2 DURANTE AS FASES V E VI	162
FIGURA 4.49 – CONCENTRAÇÃO DE NITRITO E NITRATO EFLUENTE EM R1 E R2 DURANTE A FASE VI	163
FIGURA 4.50 – PRINCIPAIS FILOS IDENTIFICADOS NAS AMOSTRAS DOS BIORREADORES R1 E R2 AO FINAL DAS FASES IV E VI.....	166
FIGURA 4.51 – CLASSES AFILIADAS AO FILO <i>PSEUDOMONADOTA</i> IDENTIFICADAS NAS AMOSTRAS DOS BIORREADORES R1 E R2 AO FINAL DAS FASES IV E VI	170
FIGURA 4.52 – DISTRIBUIÇÃO DOS GÊNEROS IDENTIFICADOS NAS AMOSTRAS DOS BIORREADORES R1 E R2 AO FINAL DAS FASES IV E VI.....	173
FIGURA 4.53 – ABUNDÂNCIA RELATIVA DOS GÊNEROS DETECTADOS NAS AMOSTRAS DOS BIORREADORES R1 E R2 AO FINAL DAS FASES IV E VI	174
FIGURA 4.54 – EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DA DQO PARA R1 E R2 ENTRE AS FASES IB E V	175
FIGURA 4.55 – COMPRIMENTO DAS RAÍZES DE <i>A. cepa</i> APÓS EXPOSIÇÃO AO AFLUENTE E EFLUENTE DE R1.....	188

LISTA DE QUADROS

QUADRO 2.1 – CONDIÇÕES ASSOCIADAS À PREVALÊNCIA DAS BON RELEVANTES PARA O TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS.....	36
QUADRO 2.2 – NÚMERO DE ESPÉCIES CARACTERIZADAS DE MICRO-ORGANISMOS NITRIFICANTES	50
QUADRO 3.1 – PARÂMETROS PARA A CARACTERIZAÇÃO DO LIXIVIADO.....	56
QUADRO 3.2 – CONDIÇÕES OPERACIONAIS PARA O BIORREATOR E1	59
QUADRO 3.3 – PARÂMETROS PARA O MONITORAMENTO DO BIORREATOR E1.....	60
QUADRO 3.4 – CONDIÇÕES PARA AS FASES OPERACIONAIS IA E IB.....	65
QUADRO 3.5 – CONDIÇÕES PARA AS FASES OPERACIONAIS II A VI.....	67
QUADRO 3.6 – PARÂMETROS PARA MONITORAMENTO DO AFLUENTE E EFLUENTE DOS BIORREADORES R1 E R2.....	68
QUADRO 3.7 – AMOSTRAS PROCESSADAS PARA ANÁLISE DOS MICROBIOMAS EM DIFERENTES FASES OPERACIONAIS	72
QUADRO 4.1 – ABUNDÂNCIA RELATIVA DE PROTOZOÁRIOS E METAZOÁRIOS EM R1 E R2.....	101
QUADRO 4.2 – PRINCIPAIS PARÂMETROS QUÍMICOS PARA LIXIVIADOS DE ATERRO SANITÁRIO E PADRÕES DE LANÇAMENTO EM CORPOS HÍDRICOS.....	183

LISTA DE TABELAS

TABELA 4.1 – RESULTADOS PARA A CONCENTRAÇÃO DE ST E SST DO LODO.....	74
TABELA 4.2 – CARACTERÍSTICAS DETERMINADAS PARA O LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO.....	76
TABELA 4.3 – CARACTERÍSTICAS DO AFLUENTE ALIMENTADO AO BIORREATOR E1.....	79
TABELA 4.4 – CARACTERÍSTICAS DO AFLUENTE DURANTE A OPERAÇÃO DE R1 E R2.....	129
TABELA 4.5 – GÊNEROS EXCLUSIVOS DA BIOMASSA DO BIORREATOR E1 .	156
TABELA 4.6 – CARACTERÍSTICAS DO EFLUENTE DURANTE A OPERAÇÃO DE R1	184
TABELA 4.7 – CARACTERÍSTICAS DO EFLUENTE DURANTE A OPERAÇÃO DE R2	185

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Al – alcalinidade intermediária

Anammox – *anaerobic ammonia oxidation* (oxidação anaeróbia da amônia)

AOA – arquea(s) oxidante(s) da amônia

AP – alcalinidade parcial

AT – alcalinidade total

BH – Benjamini e Hochberg (1995)

BOA – bactéria(s) oxidante(s) da amônia

BON – bactéria(s) oxidante(s) de nitrito

C – carbono

Ca. – *Candidatus* (latim)

cm – centímetros

Comammox – *complete ammonia oxidation* (oxidação completa da amônia)

CV – carga volumétrica

d – dia(s)

d. p. – desvio-padrão

DBO₅ – demanda bioquímica de oxigênio determinada em ensaio realizado a 20 °C e com duração de cinco dias

DNA – *deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

DQO – demanda química de oxigênio

Ed. – editor(a,es)

g – grama(s)

g – unidade de aceleração, com valor de 9,80665 m/s², aproximadamente igual à aceleração da gravidade na superfície da Terra

h – hora(s)

IVL – índice volumétrico de lodo

kg – quilograma

L – litro(s)

m – metro(s)

M – molar(es) (mol(s) L⁻¹)

m/v – massa por volume

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

mg – miligrama(s)
min – minuto(s)
mL – mililitro(s)
mm – milímetro(s)
mM – milimolar
mS – miliSiemens
N – nitrogênio
NAT – nitrogênio amoniacal total (soma da amônia e do íon amônio)
NT – nitrogênio total
OD – oxigênio dissolvido
OTU – *operational taxonomic unit* (unidade taxonômica operacional)
P – fósforo
PAN – percentagem de acúmulo do nitrito
PBS – *phosphate-buffered saline* (tampão salino de fosfato)
PCR – *polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)
pH – potencial hidrogeniônico
PNRS – Política Nacional de Resíduos Sólidos
RNA – *ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)
rpm – rotações por minuto
rRNA – ácido ribonucleico (RNA) ribossomal
RSU – resíduos sólidos urbanos
RTV – relação de troca volumétrica
SST – sólidos suspensos totais
SSV – sólidos suspensos voláteis
ST – sólidos totais
TDH – tempo de detenção hidráulica
v – volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	OBJETIVOS	20
1.1.1	Objetivo geral	20
1.1.2	Objetivos específicos.....	20
1.2	HIPÓTESE	21
2	REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1	LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO: GERAÇÃO E CARACTERÍSTICAS	22
2.1.1	Nitrogênio amoniacal total (NAT).....	24
2.2	INOVAÇÕES NOS BIOPROCESSOS DE REMOÇÃO DO NITROGÊNIO AMONIA- CAL DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS	25
2.3	ENGENHARIA DE MICROBIOMAS: APLICAÇÕES PARA A REMOÇÃO DO NITROGÊNIO AMONIA- CAL DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS	37
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	52
3.1	COLETA E CARACTERIZAÇÃO DO LODO E DO LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO	52
3.1.1	Coleta e caracterização do lodo inoculado aos biorreatores	52
3.1.1.1	Ensaio em batelada para a avaliação da atividade nitrificante do lodo.....	53
3.1.2	Coleta e caracterização do lixiviado de aterro sanitário.....	55
3.1.2.1	Avaliação da toxicidade do lixiviado por meio de ensaio com sementes de <i>Allium cepa</i>	56
3.2	PRODUÇÃO DE BIOMASSA ENRIQUECIDA PARA A REMOÇÃO AUTOTRÓFICA DE NITROGÊNIO AMONIA- CAL E BIOAUMENTO	58
3.3	MONTAGEM, OPERAÇÃO E MONITORAMENTO DOS BIORREACTORES PARA O TRATAMENTO DO LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO.....	62
3.3.1	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	70
3.3.2	Microscopia Eletrônica de Transmissão	71
3.3.3	Análise do microbioma dos biorreatores.....	71
3.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS E PRODUÇÃO DE GRÁFICOS	73
4	RESULTADOS	74
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO LODO E DO LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO	74
4.1.1	Caracterização do lodo aeróbio utilizado como inóculo.....	74

4.1.2	Caracterização do lixiviado de aterro sanitário	76
4.2	PRODUÇÃO DE BIOMASSA ENRIQUECIDA PARA A REMOÇÃO AUTOTRÓFICA DE NITROGÊNIO AMONIACAL	78
4.3	REMOÇÃO DE NITROGÊNIO DO LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO E IMPACTO DAS ESTRATÉGIAS DE ENGENHARIA DE MICROBIOMAS....	89
4.3.1	Enriquecimento da microbiota nitrificante e aclimação ao lixiviado	106
4.3.2	Manipulação das condições operacionais	117
4.3.2.1	Aeração intermitente.....	138
4.3.3	Bioaumento	151
4.3.3.1	Redução do tempo de detenção hidráulica (TDH).....	159
4.3.3.2	Composição da comunidade microbiana nas fases IV e VI.....	166
4.3.4	Avaliação da qualidade do efluente dos biorreatores R1 e R2.....	182
5	CONCLUSÃO.....	190
6	SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS.....	193
	REFERÊNCIAS	194

1 INTRODUÇÃO

O lixiviado é a água residuária resultante da decomposição dos resíduos sólidos orgânicos e inorgânicos depositados em aterros sanitários. Em função do potencial poluidor e com vistas à adequação às especificações legais para o lançamento em corpos receptores, o lixiviado requer tratamento para a remoção de matéria orgânica e nitrogênio amoniacal, entre outros componentes da complexa composição desta matriz aquosa.

O nitrogênio amoniacal é um componente do lixiviado e está associado a danos ambientais e à saúde humana e de outros organismos. A sua concentração, frequentemente elevada no lixiviado de aterro sanitário, na ordem de centenas a milhares de miligramas por litro, demanda tratamento para a mitigação dos seus potenciais impactos.

Os bioprocessos, baseados em reações bioquímicas promovidas por micro-organismos, estão entre as alternativas utilizadas para a remoção do nitrogênio amoniacal de águas residuárias. A remoção biológica do nitrogênio amoniacal é realizada por vários grupos microbianos e depende da conversão de espécies reativas de nitrogênio a nitrogênio molecular (N_2). Nesse sentido, a nitrificação, isto é, a oxidação do nitrogênio amoniacal a nitrato via nitrito, é a etapa intermediária comum a vários bioprocessos aplicados para a remoção deste poluente.

Na nitrificação, diversos grupos microbianos interagem entre si. Os principais grupos de micro-organismos nitrificantes são as arqueas e as bactérias oxidantes da amônia e as bactérias oxidantes do nitrito. Além de associados à nitrificação, alguns micro-organismos nitrificantes podem ser aplicados também ao desenvolvimento de tecnologias mais econômicas e menos poluentes, geralmente baseadas na combinação de bioprocessos autotróficos.

Os sistemas autotróficos, como aqueles que utilizam os bioprocessos de nitrificação ou oxidação anaeróbia da amônia (*anammox*), não requerem a adição externa de carbono orgânico e estão associados à menor produção de lodo excedente em comparação aos dependentes dos bioprocessos heterotróficos. Em função da elevada concentração de amônia e limitada quantidade de carbono orgânico biodegradável, a remoção autotrófica do nitrogênio pode ser particularmente vantajosa para o tratamento do lixiviado de aterro sanitário. No entanto, desafios persistem para a implementação desses bioprocessos, como, por

exemplo, o controle da comunidade microbiana e a necessidade de inibir certos organismos, como as bactérias oxidantes de nitrito.

Diante das limitações, a engenharia de microbiomas pode ser aplicada para viabilizar a remoção autotrófica do nitrogênio amoniacal do lixiviado de aterro sanitário. Por meio de estratégias como o enriquecimento e a aclimação da microbiota, o bioaumento e a manipulação das condições operacionais, micro-organismos específicos podem ser selecionados, resultando em maiores eficiências e menores custos para os sistemas de tratamento.

O estudo dos microbiomas pode contribuir para o desenvolvimento de sistemas de tratamento do lixiviado de aterro sanitário mais eficientes e de menor custo. Além disso, para maior controle dos bioprocessos, é necessário determinar as condições operacionais e ambientais associadas ao tratamento desta água residuária que interferem no desenvolvimento da comunidade microbiana.

Entretanto, a compreensão da diversidade e da ecofisiologia microbianas e o conhecimento dos fatores que moldam a comunidade microbiana em sistemas de tratamento de águas residuárias são limitados. Ademais, apesar da presença frequente em vários ambientes naturais e construídos, da diversidade filogenética e da versatilidade metabólica, ainda existe a necessidade de maior conhecimento e entendimento dos micro-organismos componentes do consórcio microbiano que realiza a remoção autotrófica do nitrogênio de águas residuárias.

Para ampliar o conhecimento sobre a prevalência, diversidade e ecofisiologia dos micro-organismos responsáveis pela remoção autotrófica do nitrogênio de águas residuárias, podem ser aplicadas técnicas moleculares, como o sequenciamento de genes e porções gênicas, consideradas atualmente o “padrão ouro” para a investigação de comunidades microbianas complexas.

Assim, o conhecimento produzido nesta pesquisa sobre a influência das estratégias de engenharia de microbiomas na comunidade microbiana pode ser aplicado para a obtenção de maiores eficiências de remoção autotrófica do nitrogênio amoniacal do lixiviado de aterro sanitário. Portanto, a partir dos resultados obtidos, pretende-se produzir efluentes com reduzido potencial poluidor, associados a menores riscos ambientais e à saúde humana.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Investigar a tratabilidade do lixiviado de aterro sanitário por bioprocessos autotróficos e sob limitação de oxigênio dissolvido mediante implementação de estratégias de engenharia de microbiomas.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a eficiência e a estabilidade da remoção autotrófica do nitrogênio amoniacal do lixiviado de aterro sanitário sob diferentes condições operacionais e ambientais;
- b) analisar a composição, a dinâmica populacional e o arranjo estrutural das populações microbianas associadas à remoção autotrófica do nitrogênio amoniacal do lixiviado de aterro sanitário sob diferentes condições operacionais e ambientais;
- c) identificar as condições operacionais e ambientais associadas ao enriquecimento de micro-organismos autotróficos durante o tratamento do lixiviado de aterro sanitário;
- d) determinar o efeito do regime de aeração sobre as populações microbianas associadas à remoção autotrófica do nitrogênio amoniacal do lixiviado de aterro sanitário;
- e) estudar os efeitos do bioaumento sobre a eficiência e a estabilidade da remoção do nitrogênio amoniacal do lixiviado de aterro sanitário sob limitação da concentração de oxigênio dissolvido.

1.2 HIPÓTESE

A remoção de nitrogênio amoniacal do lixiviado de aterro sanitário pode ser realizada por bioprocessos autotróficos e sob limitação de oxigênio dissolvido mediante implementação de estratégias de engenharia de microbiomas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Nesta seção, são apresentados os bioprocessos aplicados à remoção do nitrogênio amoniacal de águas residuárias, em particular do lixiviado de aterro sanitário. Também são apresentados o referencial teórico e o estado da arte das pesquisas sobre a engenharia de microbiomas, com destaque para suas aplicações em sistemas de remoção do nitrogênio.

2.1 LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO: GERAÇÃO E CARACTERÍSTICAS

De acordo com o relatório da Associação Brasileira de Resíduos e Meio Ambiente (Abrema), em 2023 foram geradas cerca de 81 milhões de toneladas de resíduos sólidos urbanos (RSU) no Brasil, das quais 93,4% foram coletadas (Abrema, 2024). Após a coleta, os RSU devem ser encaminhados para tratamento, destinação e disposição final, cujos procedimentos no país são orientados pela Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS), estabelecida pela Lei Federal nº 12.305 de 2010 (Brasil, 2010).

Segundo as diretrizes da PNRS, os RSU coletados devem ser adequadamente destinados para a disposição final em aterros sanitários (Brasil, 2010). Diferentemente de aterros controlados e de lixões, os aterros sanitários são projetados e construídos para minimizar riscos de danos à saúde pública e ao meio ambiente. Os aterros sanitários dispõem de infraestrutura apropriada para aterramento de resíduos, drenagem, coleta e tratamento efluentes e gases (O'leary; Tchobanoglous, 2002; Abunama *et al.*, 2021).

Apesar das diretrizes da PNRS, muitas cidades brasileiras ainda não atendem à legislação, dispendo inadequadamente seus resíduos sólidos. Em 2023, das 71 milhões de toneladas de RSU coletadas, 58,5% foram destinadas a aterros sanitários, enquanto 41,5% a aterros controlados, valas e lixões (Abrema, 2024). Observam-se também disparidades em relação às regiões brasileiras: as regiões Sudeste e Sul destinaram cerca de 70% dos RSU para aterros sanitários, enquanto no Centro-Oeste, Norte e Nordeste, o índice foi inferior a 45% (Abrema, 2024).

Além da necessidade de melhorar a conformidade com as diretrizes da PNRS e ampliar o número de aterros sanitários em todas as regiões do país, o gerenciamento adequado de resíduos enfrenta outros desafios significativos.

Embora sejam uma alternativa adequada para a disposição final de RSU, os aterros sanitários geram passivos ambientais. Nesse sentido, o lixiviado, ou chorume, efluente líquido dos aterros, é um dos passivos cujo gerenciamento requer maior atenção em função das suas características e do seu potencial poluidor. Mesmo após o encerramento de um aterro, o lixiviado continua a ser produzido por longos períodos, tipicamente 30 anos ou mais (O’leary; Tchobanoglous, 2002), exigindo tratamento contínuo.

O lixiviado resulta da mistura do líquido originado da decomposição dos resíduos aterrados e da água da chuva infiltrada pela camada de cobertura do aterro. À medida que é gerado, o lixiviado percola e infiltra através das células que contêm os resíduos aterrados, lixiviando e arrastando substâncias orgânicas e inorgânicas, que passam a fazer parte da sua composição.

O lixiviado de aterro sanitário oferece riscos ao ambiente e à saúde humana se não for adequadamente tratado, pois sua composição física e química é complexa e apresenta elevada carga poluidora. Além disso, o lixiviado de aterro sanitário pode apresentar efeito citotóxico, fitotóxico, mutagênico e genotóxico, tanto sobre humanos como outros organismos, e contaminar corpos hídricos e solos (Ernst *et al.*, 1994; Toufexi *et al.*, 2013; Baderna; Caloni; Benfenati, 2019; Anand; Palani, 2022).

A composição do lixiviado de aterro sanitário é heterogênea e variável e está sujeita à influência de diversos fatores como hábitos da população, composição dos resíduos sólidos aterrados, idade do aterro e fatores climáticos e hidrogeológicos (Renou *et al.*, 2008; Costa; Alfaia; Campos, 2019; Abunama *et al.*, 2021; Lebron *et al.*, 2021). Embora a concentração dos componentes do lixiviado possa variar entre diferentes aterros sanitários, a sua composição é geralmente caracterizada pela presença dos seguintes compostos (Christensen *et al.*, 2001; Kjeldsen *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2020; Teng *et al.*, 2021; Wijekoon *et al.*, 2022):

i) componentes inorgânicos e poluentes presentes em baixas concentrações, como íons de metais pesados (cádmio, chumbo, níquel, zinco, cobre, cromo, entre outros), hidrocarbonetos aromáticos, fenóis, pesticidas e resíduos de contaminantes de preocupação emergente como fármacos e produtos de cuidados pessoais;

ii) matéria orgânica dissolvida, subdividida nas frações biodegradável e recalcitrante, esta última composta principalmente por ácidos húmicos e fúlvicos;

iii) substâncias inorgânicas em elevadas concentrações, como os íons cálcio, magnésio, sódio, potássio, cloreto, sulfato e fosfato. Nessa categoria também está incluído o nitrogênio amoniacal total, um dos principais poluentes constituintes dos lixiviados de aterro sanitário.

2.1.1 Nitrogênio amoniacal total (NAT)

No interior das células de um aterro sanitário, a maior parte do nitrogênio orgânico dos resíduos aterrados sofre biodegradação e é convertida a espécies inorgânicas, sobretudo a nitrogênio amoniacal (Ehrig, 1989; Kjeldsen *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2017). O nitrogênio amoniacal total (NAT), composto pelo íon amônio (NH_4^+) e pela amônia livre (NH_3), representa, em média, entre 90 e 95% da concentração do nitrogênio total desta água residuária, enquanto espécies orgânicas de nitrogênio correspondem a apenas 5 ou 10% (Zhao *et al.*, 2017). Além disso, o NAT é um poluente persistente em longo prazo (décadas, por exemplo), e sua concentração tende a se manter estável independentemente da idade ou da fase operacional do aterro (Ehrig, 1989; Kjeldsen *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2017).

A concentração do NAT em lixiviados de aterros de diferentes países varia normalmente entre 500 e 2500 mg N L⁻¹ (Bove *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2017; Abunama *et al.*, 2021; Wijekoon *et al.*, 2022). Similarmente, em estudos brasileiros, a concentração do NAT em lixiviados, em geral, tem variado entre 150 e 2700 mg N L⁻¹ (Silva; Dezotti; Sant'anna, 2004; Rocha; Braga; Braga, 2017; Costa; Alfaia; Campos, 2019). Concentrações mais elevadas de NAT, entre 2900 e 4100 mg N L⁻¹, também já foram observadas em lixiviados de aterros sanitários brasileiros (Baettker *et al.*, 2020; Latocheski, 2020; Moraes, 2022).

O lançamento de águas residuárias ricas em NAT em corpos hídricos receptores pode levar à depleção do oxigênio dissolvido e, subsequentemente, à morte de organismos aquáticos. O NAT também está associado à eutrofização de corpos hídricos, que, por sua vez, pode resultar na proliferação excessiva de algas e cianobactérias produtoras de toxinas, perda da biodiversidade aquática e degradação da qualidade da água (Smith; Tilman; Nekola, 1999; Le Moal *et al.*, 2019). O NAT e, particularmente, a amônia livre (NH_3), pode ainda apresentar efeito tóxico sobre organismos aquáticos (Ernst *et al.*, 1994; Clément; Janssen; Le Dû-Delepierre, 1997; Silva; Dezotti; Sant'anna, 2004; Toufexi *et al.*, 2013).

Conforme a idade do aterro, o lixiviado pode ser classificado em jovem ou estabilizado. Os lixiviados jovens são caracterizados sobretudo pela presença de matéria orgânica de fácil biodegradação (Renou *et al.*, 2008; Costa; Alfaia; Campos, 2019). Por outro lado, os lixiviados estabilizados geralmente apresentam matéria orgânica predominantemente recalcitrante, composta principalmente por substâncias húmicas (Baettker *et al.*, 2020; Zanona; Barquilha; Braga, 2023; Luo *et al.*, 2024; Wang; Qiao, 2024). Além disso, os lixiviados estabilizados frequentemente contêm nitrogênio amoniacal em elevadas concentrações, da ordem de centenas a milhares de miligramas por litro (Kjeldsen *et al.*, 2002; Renou *et al.*, 2008).

Assim, devido ao potencial impacto à saúde humana e ambiental e considerando a concentração elevada frequentemente observada em lixiviados de aterros sanitários, principalmente os estabilizados, o nitrogênio amoniacal é um dos principais poluentes que devem ser removidos antes do seu lançamento em corpos hídricos receptores.

2.2 INOVAÇÕES NOS BIOPROCESSOS DE REMOÇÃO DO NITROGÊNIO AMONIACAL DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS

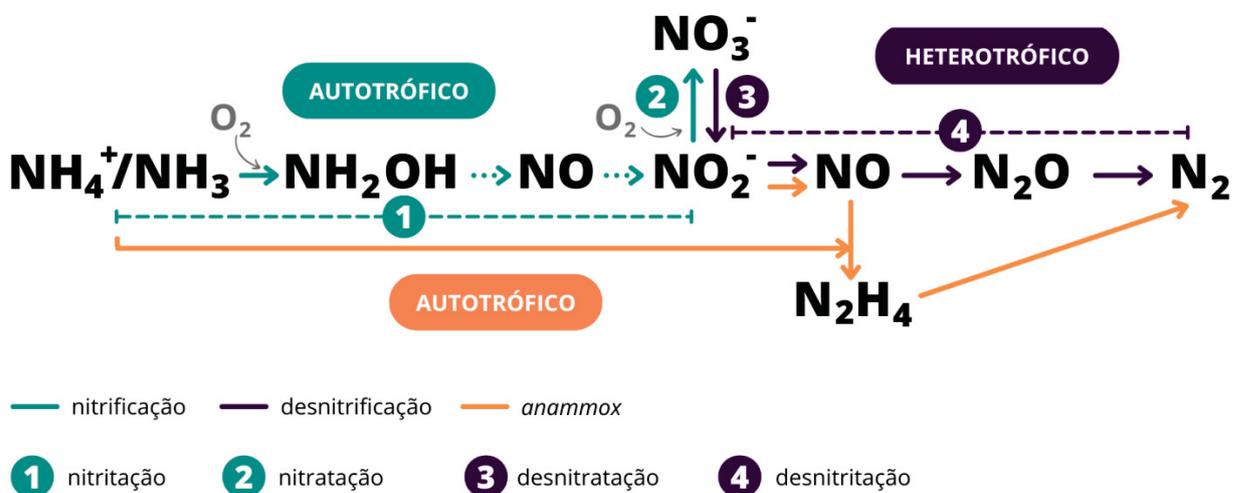
O aumento da geração de resíduos sólidos e a implementação de legislação ambiental mais rigorosa têm motivado o desenvolvimento de um número crescente de pesquisas que visam ao tratamento eficiente do lixiviado de aterro sanitário. Neste contexto, visando ao tratamento desta água residuária, nos últimos 45 anos, os bioprocessos estão entre as alternativas mais estudadas (Reshadi *et al.*, 2021).

Devido à composição complexa e variável, o lixiviado geralmente requer a combinação de diferentes métodos de tratamento como, por exemplo, os processos biológicos, físicos e/ou químicos (Renou *et al.*, 2008; Costa; Alfaia; Campos, 2019; Al-Hazmi *et al.*, 2024). Em geral, os bioprocessos de remoção do nitrogênio amoniacal apresentam menores custos comparados a alguns processos físicos ou químicos de tratamento, além de evitarem a adição de substâncias químicas potencialmente tóxicas e a geração de poluentes secundários (K. Wang *et al.*, 2018; Luo *et al.*, 2020; Rahimi; Modin; Mijakovic, 2020; Lebron *et al.*, 2021; Ilmasari *et al.*, 2022; Wijekoon *et al.*, 2022). Além disso, a combinação dos bioprocessos a estratégias de pré ou pós-tratamento pode acarretar redução geral dos custos para o tratamento do lixiviado (Kennedy; Lentz, 2000; Zayen; Schories; Sayadi, 2016).

A remoção biológica do nitrogênio amoniacal de águas residuárias envolve a ação conjunta de diferentes micro-organismos, que convertem espécies nitrogenadas em nitrogênio gasoso (N_2), substância inócua. O nitrogênio pode existir em diferentes estados de oxidação, e várias reações são utilizadas sucessiva ou simultaneamente para a sua remoção na forma de N_2 (FIGURA 2.1).

Em função da fonte de carbono utilizada, os bioprocessos para a remoção do nitrogênio amoniacal dividem-se em autotróficos e heterotróficos (FIGURA 2.1). Micro-organismos autotróficos utilizam carbono inorgânico (CO_2/HCO_3^-), enquanto os heterotróficos utilizam matéria orgânica carbonácea. A maioria dos micro-organismos participantes da remoção do nitrogênio conhecidos, incluindo as bactérias *anammox*, são autotróficos, enquanto os principais grupos microbianos associados à desnitrificação de águas residuárias apresentam metabolismo heterotrófico (FIGURA 2.1).

FIGURA 2.1 - PRINCIPAIS REAÇÕES ASSOCIADAS À REMOÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO AMONIACAL DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS



FONTE: a autora (2024)

NOTA: setas pontilhadas indicam reações hipotéticas; *anammox*: oxidação anaeróbia da amônia.

Em comparação aos bioprocessos heterotróficos, os autotróficos geram menos lodo excedente devido ao crescimento mais lento dos micro-organismos e não requerem a adição de carbono orgânico (Wang *et al.*, 2022; Al-Hazmi *et al.*, 2023). Estas características contribuem para a redução dos custos operacionais associados aos bioprocessos autotróficos, sobretudo quando considerados o manejo e a disposição final da biomassa excedente e a suplementação de matéria orgânica por meio da adição de fontes externas como glicose, metanol, etanol e acetato, que

podem encarecer o tratamento, estando associadas aos bioprocessos heterotróficos, como a desnitrificação (Bonassa *et al.*, 2021; Al-Hazmi *et al.*, 2022).

Apesar das vantagens, a escolha pelos bioprocessos autotróficos pode depender das características da água residuária. Um parâmetro comumente utilizado para avaliar a aplicabilidade dos bioprocessos autotróficos é a relação entre a concentração da demanda química de oxigênio (DQO), que reflete, indiretamente, a concentração de matéria orgânica, e a concentração do nitrogênio amoniacal (relação C/N). De acordo com alguns autores (Bonassa *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2022), a adoção de bioprocessos autotróficos pode ser justificada em função de valores da relação C/N inferiores a 3,5 g DQO/g N, que indicam a baixa quantidade de matéria orgânica em relação à de nitrogênio amoniacal, como frequentemente observado em lixiviados de aterros sanitários.

Os sistemas convencionais aplicadas para a remoção biológica do nitrogênio amoniacal de águas residuárias, como lodos ativados e lagoas de estabilização, dependem frequentemente da nitrificação autotrófica (reações 1 e 2, FIGURA 2.1) combinada à desnitrificação heterotrófica (reações 3 e 4, FIGURA 2.1), que podem ocorrer simultaneamente, em um único estágio, ou sucessivamente, em duas ou mais etapas. Na primeira etapa da nitrificação, o nitrogênio amoniacal é oxidado aerobicamente a nitrito, NO_2^- (nitritação, reação 1, FIGURA 2.1). Em seguida, o nitrito pode ser oxidado a nitrato (NO_3^-), também aerobicamente (nitração, reação 2, FIGURA 2.1). Finalmente, sob condições anóxicas, o nitrato pode ser transformado em gás nitrogênio (N_2) via desnitrificação, que compreende a desnitratação (reação 3, FIGURA 2.1) e a desnitratação (reação 4, FIGURA 2.1).

A combinação entre nitrificação e desnitrificação é utilizada principalmente para a remoção do nitrogênio de águas residuárias com elevadas concentrações de matéria orgânica biodegradável, representada indiretamente pela DQO, com relações C/N superiores a 3,5 g DQO/g N (Bonassa *et al.*, 2021; Al-Hazmi *et al.*, 2023). Dessa forma, pode ser adequada para lixiviados de aterros jovens, ou aqueles que ainda apresentam elevada concentração de carbono orgânico (Renou *et al.*, 2008; Costa; Alfaia; Campos, 2019). No entanto, à medida que as células de um aterro envelhecem, a matéria orgânica sofre biodegradação e a sua concentração no lixiviado diminui consideravelmente, inviabilizando os bioprocessos heterotróficos, como aqueles dependentes da desnitrificação.

Além disso, a necessidade de aeração para a nitrificação completa, um bioprocesso aeróbio, resulta em elevado consumo energético (Daigger, 2014; Rahimi; Modin; Mijakovic, 2020). Devido ao uso energético intensivo, as estações de tratamento de águas residuárias figuram entre os maiores consumidores de energia e maiores emissores globais de gases de efeito estufa (Kampschreur *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2016; Ramírez-Melgarejo; Stringer, 2024).

Para minimizar as limitações associadas aos sistemas convencionais, dependentes da nitrificação/desnitrificação, novos bioprocessos têm sido aplicados e combinados para o tratamento de águas residuárias. Esses bioprocessos baseiam-se no “encurtamento” da nitrificação autotrófica (FIGURA 2.1), com a interrupção da oxidação do nitrogênio amoniacal na etapa de nitritação, causando o acúmulo do nitrito (NO_2^-) no meio reacional (Bove *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016; Rahimi; Modin; Mijakovic, 2020; Ren *et al.*, 2020; Mai *et al.*, 2021). Por sua vez, o nitrito pode ser convertido a N_2 por micro-organismos desnitrificantes, bactérias *anammox* ou outros (Ren *et al.*, 2020; Mai *et al.*, 2021).

A nitrificação autotrófica parcial, interrompida na etapa de produção do nitrito, requer menos energia e oxigênio do que a nitrificação completa, resultando na redução dos custos operacionais e menor emissão de gases de efeito estufa (Daigger, 2014; Miao *et al.*, 2019). Exemplos de bioprocessos dependentes da nitrificação parcial são a nitritação associada ao processo *anammox* e a nitritação combinada à desnitrificação (reações 1 e 4, FIGURA 2.1). Comparada à nitrificação completa, a combinação nitrificação parcial/*anammox* pode reduzir até 65% dos custos com aeração e até 90% das emissões de gases de efeito estufa (Al-Hazmi *et al.*, 2023). Por outro lado, quando associada à desnitrificação, a nitrificação parcial reduz a demanda de carbono orgânico entre 40% e 60% (Bonassa *et al.*, 2021).

Outra alternativa aos bioprocessos convencionais é a desnitrificação parcial combinada ao processo *anammox*, sendo também dependente do acúmulo de nitrito. Na desnitrificação parcial, o nitrato é reduzido a nitrito, geralmente por micro-organismos desnitrificantes heterotróficos. O nitrito, por vez, é utilizado pelas bactérias *anammox* e transformado, juntamente com o nitrogênio amoniacal, em N_2 (FIGURA 2.1). A combinação desnitrificação parcial/*anammox* também implica na redução de custos para o tratamento de águas residuárias por envolver um bioprocessos autotrófico (*anammox*) e não necessitar de aeração (Al-Hazmi *et al.*,

2023; Hou *et al.*, 2024). Além disso, a quantidade de matéria orgânica necessária é menor em comparação com a desnitrificação completa (Du *et al.*, 2019).

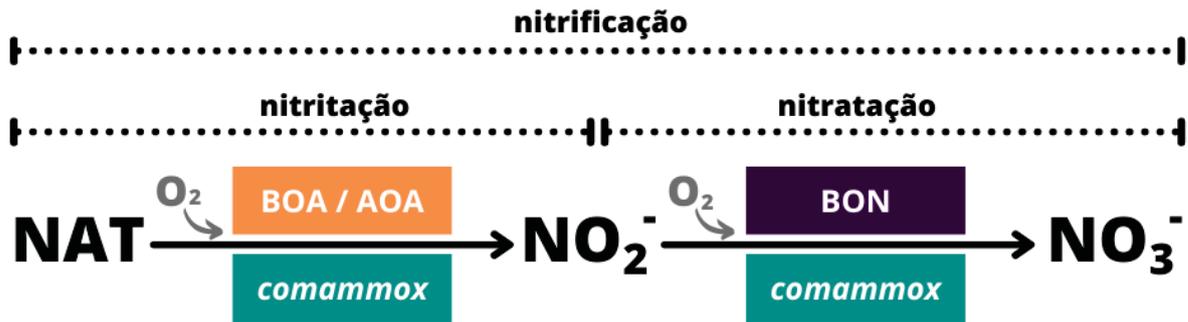
Combinações de bioprocessos como nitrificação parcial/*anammox*, nitrificação parcial/desnitrificação e desnitrificação parcial/*anammox* podem ocorrer em um único estágio ou em múltiplas etapas. Além disso, a tecnologia escolhida pode variar, e diversos sistemas têm sido aplicados, como os reatores em bateladas sequenciais, reatores de biofilme e biorreatores com biomassa granular.

Para a remoção do nitrogênio de lixiviado de aterro sanitário, por exemplo, Magrí e colaboradores (2021) avaliaram a combinação entre a nitrificação parcial e o processo *anammox* em dois reatores em bateladas sequenciais em série, tendo alcançado eficiência de remoção do nitrogênio superior a 85% ao longo de mais de 900 dias. Similarmente, Zhang e colaboradores (2022) obtiveram eficiência de remoção do nitrogênio superior a 99% após 200 dias de operação de três biorreatores em bateladas sequenciais em série combinando nitrificação parcial, fermentação de lodo associada à desnitrificação e processo *anammox*. Por sua vez, Wu e colaboradores (2024) utilizaram, simultaneamente, a nitrificação parcial, o processo *anammox* e a desnitrificação em um único reator de biofilme, tendo obtido valores próximos a 100% de eficiência na remoção do nitrogênio amoniacal.

Apesar das vantagens e do crescente interesse em relação aos bioprocessos que dependem do acúmulo do nitrito para a remoção do nitrogênio de águas residuárias, a sua aplicação em estações de tratamento ainda é limitada (Wang *et al.*, 2022). Um dos principais desafios para a implementação desses bioprocessos é assegurar a estabilidade na produção do nitrito e garantir sua concentração elevada no meio reacional (Al-Hazmi *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2022).

Para manter a concentração de nitrito necessária aos bioprocessos de remoção do nitrogênio amoniacal, é fundamental controlar a atividade dos diferentes micro-organismos envolvidos. Durante a nitrificação, o nitrogênio amoniacal é primeiramente oxidado a nitrito por bactérias (BOA) ou arqueas (AOA) oxidantes da amônia (FIGURA 2.2). Em seguida, o nitrito é oxidado a nitrato por bactérias oxidantes de nitrito (BON, FIGURA 2.2). Além disso, a comunidade nitrificante inclui micro-organismos capazes de oxidar completamente a amônia a nitrato via nitrito, as bactérias *comammox* (do inglês *complete ammonia oxidizers*, FIGURA 2.2).

FIGURA 2.2 – PRINCIPAIS GRUPOS DE MICRO-ORGANISMOS NITRIFICANTES

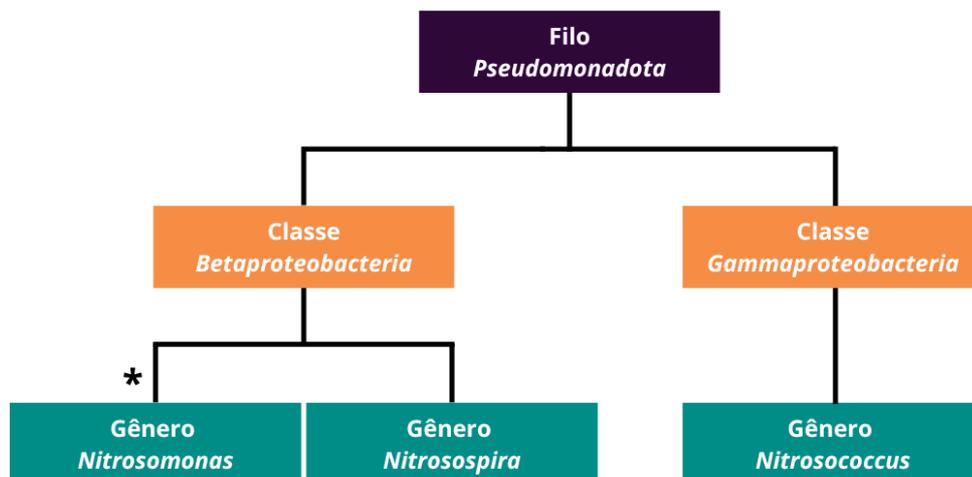


FONTE: a autora (2024)

NOTA: NAT: nitrogênio amoniacal total; BOA: bactérias oxidantes da amônia; AOA: arqueas oxidantes da amônia; BON: bactérias oxidantes de nitrito; *comammox*: *complete ammonia oxidizers* (oxidantes completas da amônia).

As bactérias oxidantes da amônia (BOA) foram descobertas há mais de 130 anos, diferentemente das AOA e das bactérias *comammox*, reconhecidas apenas no século XXI (Sedlacek, 2020). As principais BOA caracterizadas até o momento pertencem às classes *Betaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria* (FIGURA 2.3).

FIGURA 2.3 – PRINCIPAIS GRUPOS TAXONÔMICOS DE BACTÉRIAS OXIDANTES DE AMÔNIA



FONTE: a autora (2024), com base em Head e colaboradores (1993)

NOTA: o grupo de maior relevância para a remoção do nitrogênio amoniacal de águas residuárias é indicado por um asterisco (*). Para maior clareza, táxons intermediários foram omitidos da ilustração.

As BOA ocupam diversos habitats e são abundantes em ambientes aquáticos, terrestres e construídos (Koops; Pommerening-Röser, 2001; Kowalchuk; Stephen, 2001; Prosser; Head; Stein, 2014). As BOA pertencentes à classe *Gammaproteobacteria* são detectadas sobretudo em ambientes marinhos e salinos e não são frequentemente encontradas em sistemas de remoção do nitrogênio amoniacal (Koops; Pommerening-Röser, 2001; Kowalchuk; Stephen, 2001). As BOA

do gênero *Nitrosospira* também são prevalentes em ambientes marinhos (Prosser; Head; Stein, 2014).

Membros da classe *Betaproteobacteria*, particularmente do gênero *Nitrosomonas*, são as BOA mais abundantes em sistemas de tratamento de águas residuárias (Fan *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2020a; Zheng *et al.*, 2021). Em geral, as bactérias do gênero *Nitrosomonas* apresentam menor afinidade pela amônia comparadas a outros micro-organismos nitrificantes (Kits *et al.*, 2017; Jung *et al.*, 2021; Martinez-Rabert *et al.*, 2022). Por isso, são geralmente abundantes em ambientes eutróficos e podem tolerar elevadas concentrações de nitrogênio amoniacal, variando de centenas até milhares de miligramas por litro (Kowalchuk; Stephen, 2001; Prosser; Head; Stein, 2014).

Embora sejam as principais produtoras de nitrito em sistemas de tratamento, intermediário-chave para diversos bioprocessos de remoção do nitrogênio amoniacal, as BOA estão entre os maiores emissores de gases poluentes. Durante a oxidação aeróbia da amônia, essas bactérias liberam óxido nitroso (N_2O) e óxido nítrico (NO) como subprodutos metabólicos (Caranto; Lancaster, 2017; Han *et al.*, 2021). O N_2O é um dos principais gases de efeito estufa emitidos em estações de tratamento de águas residuárias, enquanto o NO contribui para a produção de ozônio troposférico e de chuva ácida (Kampschreur *et al.*, 2009; Law *et al.*, 2012).

Considerando as limitações associadas às BOA, estudos sobre outros micro-organismos nitrificantes têm se destacado, como o das arqueas oxidantes da amônia (AOA). O metabolismo desses micro-organismos pode ser aplicado em sistemas de remoção do nitrogênio amoniacal que apresentam vantagens como a menor emissão de gases poluentes.

Descobertas apenas em 2004, todas as AOA conhecidas pertencem à classe *Nitrososphaeria* do filo *Thermoproteota* (Alves *et al.*, 2018). As AOA figuram entre os micro-organismos oxidantes da amônia mais abundantes em ecossistemas marinhos e de água doce, sedimentos, solos e fontes geotermiais, podendo ser encontrados representantes acidófilos e termofílicos (Stahl; De La Torre, 2012; Limpiyakorn *et al.*, 2013; Alves *et al.*, 2018).

A maioria das AOA caracterizadas até o momento apresenta elevada afinidade por amônia e é adaptada a condições oligotróficas, colonizando ambientes em que a amônia está presente em baixas concentrações, de nano a micromoles por litro (Stahl; De La Torre, 2012; Limpiyakorn *et al.*, 2013; Straka *et al.*, 2019; Jung

et al., 2021). Por isso, as AOA são geralmente menos abundantes em sistemas aplicados à remoção do nitrogênio amoniacal do que as BOA (Mussmann *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2013; Spasov *et al.*, 2020; Zhou, X. *et al.*, 2021).

Devido à capacidade de oxidar a amônia em baixas concentrações de oxigênio dissolvido, isto é, inferiores a $1 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$, as AOA podem ser eficazes em sistemas de remoção de nitrogênio com aeração reduzida. Além disso, podem biotransformar e degradar compostos como pesticidas e fármacos, apresentando potencial para o tratamento avançado de águas residuárias e remoção de micropoluentes (Su *et al.*, 2021; Zhou, L. J. *et al.*, 2021). Também produzem quantidades significativamente menores de N_2O e NO comparadas às BOA (Kits *et al.*, 2019; Han *et al.*, 2021), o que torna as AOA particularmente interessantes para o desenvolvimento de bioprocessos menos poluentes.

Apesar de estarem presentes em diversos ambientes, poucas AOA foram isoladas e caracterizadas até o momento. Além disso, os fatores que influenciam a abundância e a atividade das AOA em sistemas aplicados à remoção do nitrogênio de águas residuárias são ainda pouco conhecidos. Enquanto a compreensão sobre as AOA é limitada, o avanço na identificação de novos grupos microbianos, como as bactérias *comammox*, também tem criado oportunidades para o desenvolvimento de bioprocessos mais econômicos e menos poluentes.

Até 2015, acreditava-se que a nitrificação exigia a ação de dois grupos microbianos: os oxidantes da amônia, que realizam a nitritação, e as bactérias oxidantes do nitrito, responsáveis pela nitratação. Porém, esse paradigma foi rompido com a identificação das bactérias *comammox* (oxidantes completas da amônia, do inglês *complete ammonia oxidizers*), capazes de realizar ambas as etapas da nitrificação (Daims *et al.*, 2015; Van Kessel *et al.*, 2015). As bactérias *comammox* pertencem à linhagem II do gênero *Nitrospira* e são encontradas em ambientes naturais e construídos, incluindo estações de tratamento de águas residuárias (Lawson; Lücker, 2018; Koch; Van Kessel; Lücker, 2019).

Estudos de cinética de oxidação da amônia sugerem que esses organismos são geralmente adaptados a condições oligotróficas. Culturas puras ou enriquecidas com bactérias *comammox* apresentaram elevada afinidade pela amônia, o que indica que esses organismos seriam favorecidos em ambientes com baixas concentrações desse substrato, da ordem de microgramas de nitrogênio por litro (Kits *et al.*, 2017; Sakoula *et al.*, 2020; Martinez-Rabert *et al.*, 2022).

Contudo, análises moleculares indicam que as bactérias *comammox* podem superar numericamente as BOA e AOA em ambientes que apresentem concentrações mais elevadas de amônia, variando entre dezenas a centenas de miligramas por litro, como estações de tratamento de efluentes (Wang, M. *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2019; Zheng *et al.*, 2019; Cotto *et al.*, 2020; Zhou, X. *et al.*, 2021), podendo, portanto, ser aplicadas para a remoção do nitrogênio de águas residuárias. Além disso, as bactérias *comammox* podem contribuir para a diminuição da poluição associada aos bioprocessos, com emissões de óxido nítrico (N₂O) e óxido nitroso (NO) menores em comparação com as BOA (Kits *et al.*, 2019; Han *et al.*, 2021).

As bactérias *comammox* também se destacam por sua adaptação a baixas concentrações de oxigênio dissolvido, isto é, inferiores a 1 mg O₂ L⁻¹. De acordo com Camejo e colaboradores (2017), as bactérias *comammox* foram os organismos oxidantes de amônia prevalentes em um biorreator operado sob concentração de oxigênio dissolvido inferior a 0,6 mg L⁻¹. Similarmente, um genoma associado a bactérias *comammox* foi recuperado de um tanque anaeróbio utilizado para o tratamento de águas residuárias, para o qual a concentração média de oxigênio dissolvido era de 0,02 mg L⁻¹ (Yang *et al.*, 2020b). A adaptação desses organismos a condições microaeróbias pode ser aproveitada em sistemas de remoção de nitrogênio amoniacal com aeração reduzida para diminuir a demanda energética (Roots *et al.*, 2019; Ren *et al.*, 2020; Wen; Lechevallier; Tao, 2020).

Além disso, sob condições microaeróbias, as bactérias *comammox* podem coexistir com micro-organismos sensíveis ao oxigênio, como os desnitrificantes e as bactérias *anammox* (Ren *et al.*, 2020; Gottshall *et al.*, 2021; Cui *et al.*, 2023). Por exemplo, eficiências de remoção de nitrogênio entre 70% e 99% foram obtidas para biorreatores de nitrificação parcial/*anammox* para tratamento de efluente da digestão de lodos (Wu *et al.*, 2019a) e de meio sintético (Shao; Wu, 2021). Em ambos os estudos, as bactérias *comammox* coexistiram com bactérias *anammox*. Similarmente, bactérias *comammox* foram cocultivadas com micro-organismos *anammox*, sendo que a coexistência desses grupos resultou na remoção quase completa do nitrogênio amoniacal do meio mineral utilizado para a incubação (Gottshall *et al.*, 2021).

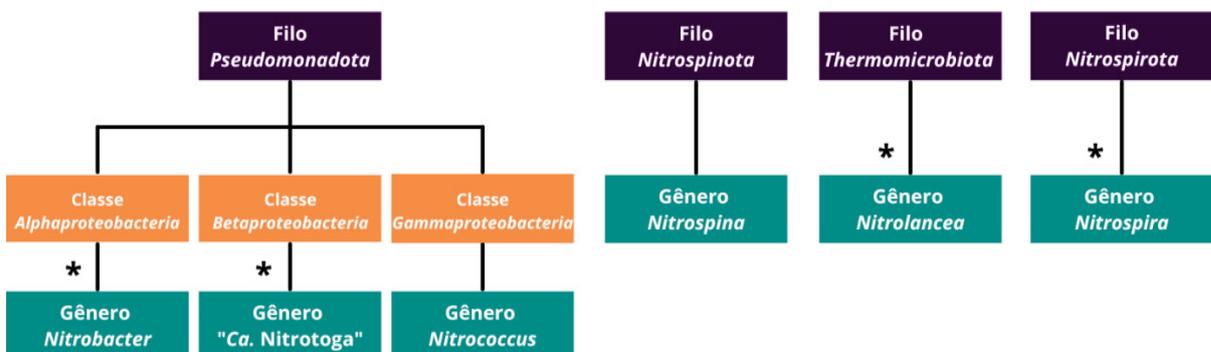
Outra aplicação potencial das bactérias *comammox* é a biotransformação de micropoluentes presentes em águas residuárias. Alguns autores reportam que as bactérias *comammox* foram capazes de biotransformar, por exemplo, fármacos e

pesticidas em concentrações comuns em estações de tratamento (Han *et al.*, 2019; Su *et al.*, 2021; Zhou, L. J. *et al.*, 2021). Recentemente, foi detectada a capacidade de utilização da guanidina como única fonte de energia e carbono por bactérias *comammox* (Palatinszky *et al.*, 2024). A guanidina é a base estrutural para a síntese do medicamento antidiabético metformina, considerado um contaminante de preocupação emergente. Assim, o metabolismo das bactérias *comammox* poderia ser aplicado para a degradação da metformina em estações de tratamento de águas residuárias e outros sistemas.

Para o sucesso dos bioprocessos que dependem do acúmulo de nitrito, é crucial estimular a atividade dos micro-organismos oxidantes da amônia, como as BOA, as AOA e as bactérias *comammox*, aproveitando ao máximo seu potencial metabólico. No entanto, a eficiência e a estabilidade dos sistemas de remoção do nitrogênio amoniacal também dependem do controle das bactérias oxidantes de nitrito (BON). Enquanto a atividade das BOA, das AOA e das bactérias *comammox* deve ser favorecida para promover o acúmulo de nitrito, as BON precisam ser inibidas para evitar a conversão do nitrito em nitrato.

Filogeneticamente, as BON são mais diversificadas que as bactérias e arqueas oxidantes da amônia e estão afiliadas a seis gêneros principais (FIGURA 2.4). Recentemente, cinco gêneros candidatos de BON foram também identificados: “*Candidatus Nitromaritima*”, “*Ca. Nitronauta*” e “*Ca. Nitrohelix*”, afiliados ao filo *Nitrospinota*, e “*Ca. Nitrotheca*” e “*Ca. Nitrocaldera*”, do filo *Chloroflexota*.

FIGURA 2.4 - PRINCIPAIS GRUPOS TAXONÔMICOS DE BACTÉRIAS OXIDANTES DE NITRITO



FONTE: a autora (2024), com base em Daims, Lücker e Wagner (2016)

NOTA: os grupos de maior relevância para a remoção do nitrogênio amoniacal de águas residuárias são indicados por um asterisco (*). Para maior clareza, táxons intermediários foram omitidos da ilustração; *Ca.*: *Candidatus*.

O gênero *Nitrococcus* e o filo *Nitrospinota* contemplam micro-organismos predominantes em ambientes marinhos e hipersalinos (Watson; Waterbury, 1971; Mueller *et al.*, 2021). Por sua vez, as BON dos gêneros candidatos pertencentes ao filo *Chloroflexota* (“*Ca. Nitrotheca*” e “*Ca. Nitrocaldera*”) foram identificadas em fontes termais e são extremófilas (Spieck *et al.*, 2020). Por outro lado, bactérias dos gêneros *Nitrobacter*, “*Candidatus Nitrotoga*”, *Nitrolancea* e *Nitrospira* estão presentes em ambientes aquáticos e terrestres e são frequentemente detectadas em estações de tratamento de águas residuárias (Daims; Lücker; Wagner, 2016).

Vários estudos das comunidades microbianas de sistemas de tratamento de águas residuárias indicam que *Nitrospira* é frequentemente o gênero prevalente de BON (Maixner *et al.*, 2006; Chao *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2019b; Kim; Behrens; Lapara, 2021). As BON do gênero *Nitrobacter* também são detectadas em sistemas de tratamento águas residuárias, embora geralmente em menor abundância que as do gênero *Nitrospira* (Coskuner; Curtis, 2002; Huang *et al.*, 2010; Winkler *et al.*, 2012; Antwi *et al.*, 2020).

Apesar da predominância de *Nitrospira* e *Nitrobacter* em sistemas de tratamento, outros gêneros de BON também são relevantes para os bioprocessos de remoção do nitrogênio de águas residuárias. Por exemplo, o gênero “*Candidatus Nitrotoga*”, ainda não completamente descrito, tem sido detectado em estações de tratamento de águas residuárias juntamente com *Nitrospira*, embora geralmente em menor abundância (Lücker *et al.*, 2015; Kitzinger *et al.*, 2018; Kim; Behrens; Lapara, 2021; Kim *et al.*, 2021). Bactérias do gênero *Nitrolancea* foram isoladas pela primeira vez em um biorreator aplicado à nitrificação (Sorokin *et al.*, 2012) e também podem competir com BON de outros gêneros em sistemas de tratamento.

Esses diferentes gêneros de BON relevantes para a remoção do nitrogênio amoniacal apresentam características fisiológicas e metabólicas distintas que lhes permitem ocupar nichos específicos em sistemas de tratamento de águas residuárias. Devido a sua diversidade e versatilidade metabólica, esses micro-organismos podem adaptar-se a variadas condições ambientais e operacionais. Essas condições, por sua vez, podem favorecer a seleção de certos gêneros de BON em detrimento de outros (QUADRO 2.1).

QUADRO 2.1 – CONDIÇÕES ASSOCIADAS À PREVALÊNCIA DAS BON RELEVANTES PARA O TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS

Gênero	Condições associadas à prevalência em sistemas de tratamento	Referências
<i>Nitrospira</i>	- Baixas concentrações de nitrito ($< 50 \text{ mg N L}^{-1}$) - Baixas concentrações de OD ($< 1 \text{ mg L}^{-1}$)	Blackburne <i>et al.</i> , 2007; Nowka; Daims; Spieck, 2015; Park; Park; Chandran, 2017; Ushiki <i>et al.</i> , 2017; Martinez-Rabert <i>et al.</i> , 2022
<i>Nitrobacter</i>	- Elevadas concentrações de nitrito ($\geq 50 \text{ mg N L}^{-1}$) - Elevadas concentrações de OD ($\geq 1 \text{ mg L}^{-1}$) - Tolerância a elevadas concentrações de amônia livre ($\geq 50 \text{ mg N L}^{-1}$) - Tolerância a elevadas concentrações de ácido nitroso ($\geq 1 \text{ mg N L}^{-1}$)	Blackburne <i>et al.</i> , 2007; Nowka <i>et al.</i> , 2015; Cao; Van Loosdrecht; Daigger, 2017; Ushiki <i>et al.</i> , 2017; Duan <i>et al.</i> , 2019; Wang <i>et al.</i> , 2020; Martinez-Rabert <i>et al.</i> , 2022
“Ca. Nitrotoga”	- Baixas temperaturas ($< 20 \text{ }^\circ\text{C}$) - Elevadas concentrações de nitrito ($\geq 50 \text{ mg N L}^{-1}$) - Elevadas concentrações de OD ($\geq 1 \text{ mg L}^{-1}$) - Tolerância a elevadas concentrações de amônia livre ($\geq 50 \text{ mg N L}^{-1}$) - Tolerância a elevadas concentrações de ácido nitroso ($\geq 1 \text{ mg N L}^{-1}$)	Alawi <i>et al.</i> , 2007; 2009; Lücker <i>et al.</i> , 2015; Ma <i>et al.</i> , 2017; Kitzinger <i>et al.</i> , 2018; Navada <i>et al.</i> , 2019; Wegen; Nowka; Spieck, 2019; Li <i>et al.</i> , 2020; Kim <i>et al.</i> , 2021; Spieck; Wegen; Keuter, 2021; Wang <i>et al.</i> , 2021
<i>Nitrolancea</i>	- Elevadas temperaturas ($> 37 \text{ }^\circ\text{C}$) - Elevadas concentrações de nitrito ($\geq 50 \text{ mg N L}^{-1}$) - Tolerância a elevadas concentrações de amônia livre ($\geq 50 \text{ mg N L}^{-1}$)	Sorokin <i>et al.</i> , 2012, 2014; Jiang <i>et al.</i> , 2021a

FONTE: a autora (2024), com base nas referências citadas

NOTA: Ca.: *Candidatus*; OD: oxigênio dissolvido.

Devido à diversidade e versatilidade metabólica, diversos gêneros de BON podem coexistir em sistemas de tratamento de águas residuárias. A coexistência resulta em redundância funcional, ou seja, a realização da mesma função metabólica, como a oxidação de nitrito a nitrato, por diferentes grupos taxonômicos. Por sua vez, a redundância funcional garante a estabilidade da função microbiana mesmo sob condições dinâmicas ou estressantes, pois micro-organismos com funções similares podem compensar as perdas de algumas populações microbianas (Louca *et al.*, 2018). Assim, a presença de BON com funções redundantes pode dificultar o controle da atividade desses micro-organismos, especialmente em sistemas que dependem da nitrificação parcial ou do acúmulo de nitrito.

Um dos principais entraves para a implementação dos bioprocessos dependentes do acúmulo do nitrito é promover a inibição efetiva e duradoura das BON, especialmente em sistemas de tratamento que operam com baixas concentrações de nitrogênio amoniacal ($< 50 \text{ mg N L}^{-1}$) (Wang *et al.*, 2022; Z. Su *et al.*, 2023). Portanto, além de estimular a atividade dos micro-organismos oxidantes da amônia, são necessárias abordagens eficazes para inibir a atividade das BON em sistemas de tratamento de águas residuárias. Nesse contexto, as estratégias de

engenharia de microbiomas podem oferecer soluções para garantir a eficiência e a estabilidade dos bioprocessos dependentes do acúmulo de nitrito.

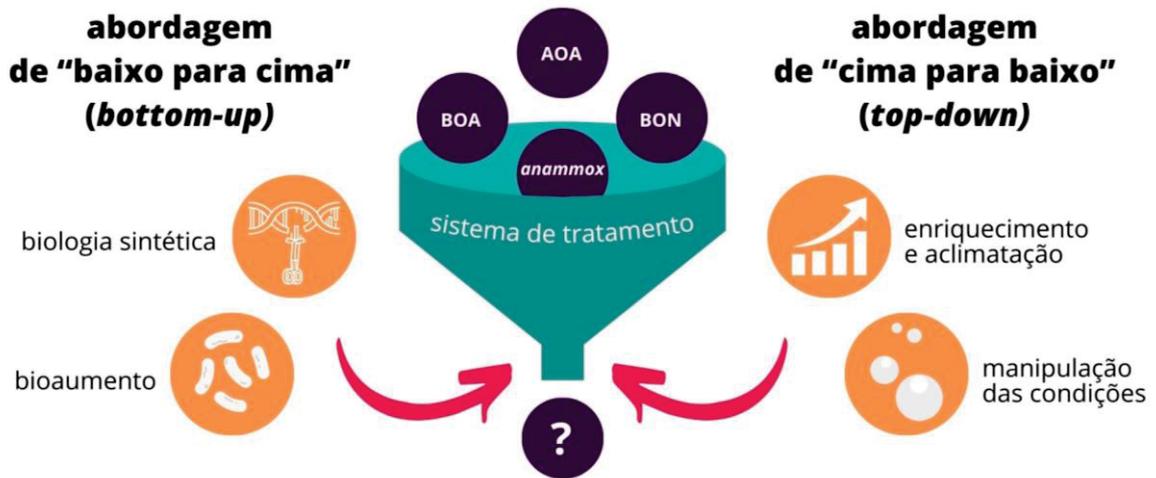
2.3 ENGENHARIA DE MICROBIOMAS: APLICAÇÕES PARA A REMOÇÃO DO NITROGÊNIO AMONIACAL DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS

Um microbioma pode ser definido como a comunidade microbiana presente em um habitat, com características físicas e químicas próprias (Berg *et al.*, 2020). Em um microbioma, as populações microbianas, compostas por múltiplas espécies de bactérias, arqueas, fungos, microalgas e pequenos protistas, interagem entre si e com o ambiente para realizar funções específicas. No saneamento, por exemplo, os microbiomas podem ser projetados e utilizados para desempenhar funções como a biotransformação e remoção de poluentes e a biorremediação de solos e corpos hídricos (Xiong *et al.*; 2024).

Para otimizar o desempenho de um sistema biológico ou direcionar as funções realizadas pela comunidade microbiana para atender a um objetivo específico, é possível alterar a composição dos microbiomas, processo conhecido como engenharia de microbiomas. As abordagens da engenharia de microbiomas são comumente divididas em “de baixo para cima” (*bottom-up*) e “de cima para baixo” (*top-down*) (Lawson, 2021; Albright *et al.*, 2022; Xiong *et al.*; 2024).

Cada abordagem dispõe de diversas estratégias para a engenharia do microbioma-alvo. Para a remoção do nitrogênio amoniacal de águas residuárias, essas estratégias podem ser utilizadas, por exemplo, para a seleção dos micro-organismos com funções desejadas, como as bactérias oxidantes da amônia (BOA), as bactérias *comammox* e as *anammox* (FIGURA 2.5). Também podem ser aplicadas para inibir seletivamente a atividade de certos micro-organismos, como as bactérias oxidantes do nitrito (BON), prejudiciais aos bioprocessos dependentes do acúmulo do nitrito.

FIGURA 2.5 – ESTRATÉGIAS DA ENGENHARIA DE MICROBIOMAS E APLICAÇÃO PARA A REMOÇÃO DO NITROGÊNIO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS



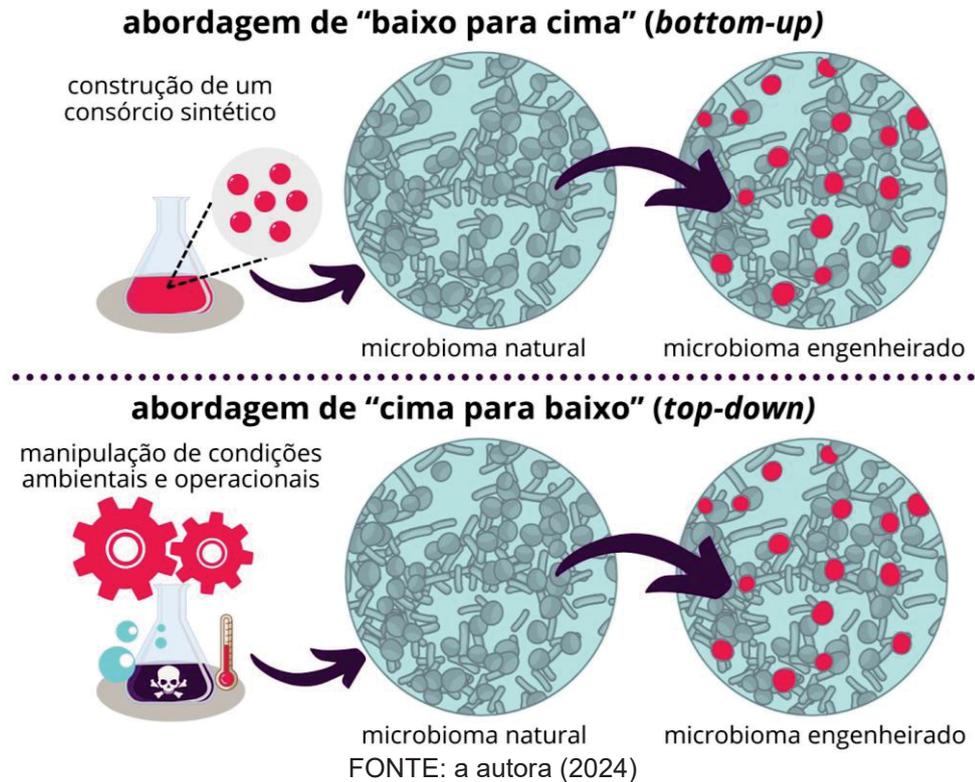
FONTE: a autora (2024)

NOTA: AOA: arqueas oxidantes da amônia; BOA: bactérias oxidantes da amônia; BON: bactérias oxidantes do nitrito; *anammox*: bactérias anaeróbias oxidantes da amônia.

Na abordagem “de baixo para cima”, um consórcio microbiano é construído artificialmente a partir da combinação de linhagens microbianas naturais ou modificadas geneticamente por meio da biologia sintética (FIGURA 2.6). Primeiramente, são selecionados os micro-organismos com características metabólicas e fisiológicas conhecidas. A seguir, o consórcio microbiano com a função desejada, como a remoção de um poluente, é artificialmente construído a partir da reunião dos micro-organismos selecionados. Finalmente, o consórcio microbiano sintético é introduzido no microbioma que se deseja manipular (Hu *et al.*; 2022; Silverstein; Segrè; Bhatnagar, 2023; Xiong *et al.*, 2024).

Nas estratégias “de baixo para cima” baseadas em biologia sintética, os genes ou genomas dos micro-organismos de interesse são modificados para reprogramar sequências regulatórias, modificar a expressão de genes-chave, ajustar vias metabólicas ou regular a comunicação entre os micro-organismos de uma comunidade (Zhang *et al.*, 2020). Estas estratégias permitem introduzir novas funções no microbioma, otimizar a eficiência dos bioprocessos ou até criar novos sistemas biológicos com funções inexistentes naturalmente (Lawson, 2021; Silverstein; Segrè; Bhatnagar, 2023; Jones *et al.*, 2024). Também é possível construir microbiomas capazes de degradar poluentes para os quais os microbiomas naturais não são eficientes, como pesticidas e outras substâncias orgânicas persistentes (Zhang *et al.*, 2020).

FIGURA 2.6 – ABORDAGENS DE “BAIXO PARA CIMA” E DE “CIMA PARA BAIXO” DA ENGENHARIA DE MICROBIOMAS



Apesar do potencial, as estratégias baseadas em biologia sintética são raramente aplicadas em sistemas de tratamento de águas residuárias em escala plena. Isso ocorre devido ao elevado custo, à falta de regulamentação sobre o uso de tecnologias de edição genética e ao risco de escape acidental dos microrganismos geneticamente modificados, o que poderia causar o desequilíbrio dos ecossistemas afetados (Hu *et al.*, 2022; Silverstein; Segrè; Bhatnagar, 2023; Jones *et al.*, 2024). Além disso, embora a construção de consórcios microbianos modificados geneticamente seja bem-sucedida sob condições laboratoriais controladas, essa estratégia frequentemente apresenta falhas em aplicações como o tratamento de águas residuárias sob condições dinâmicas reais (Herrero; Stuckey, 2015; Zhang *et al.*, 2020; Xiong *et al.*, 2024).

Diante dessas limitações, o bioaumento apresenta-se como uma das principais estratégias da abordagem “de baixo para cima” na engenharia de microbiomas aplicada para o tratamento de águas residuárias (Raper *et al.*, 2018; Lawson *et al.*, 2019). A estratégia do bioaumento é baseada na inoculação de microrganismos exógenos a um microbioma natural. O bioaumento pode ser realizado a

partir da inoculação de uma ou poucas espécies em um sistema, como um biorreator, ou da introdução de consórcios microbianos inteiros.

O bioaumento realizado a partir da inoculação de um consórcio microbiano no microbioma-alvo permite preservar as interações interespecíficas e a dinâmica de cooperação e competição necessárias para o funcionamento eficiente de diversos bioprocessos. Por isso, a inoculação de culturas puras, contendo uma única linhagem microbiana, tende a ser menos efetiva e mais suscetível à variabilidade das condições ambientais que o bioaumento realizado com um consórcio microbiano composto por múltiplas espécies, especialmente para o tratamento de águas residuárias de composição complexa (Raper *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2020; Albright *et al.*, 2022; Silverstein; Segrè; Bhatnagar, 2023).

O inóculo utilizado para o bioaumento pode ser composto para apresentar funções específicas. Em sistemas de tratamento de águas residuárias, o bioaumento está associado à maior estabilidade e eficiência dos bioprocessos de remoção de poluentes, melhor sedimentabilidade da biomassa, menores tempos de partida e maior resistência a choques devidos à variação das condições ambientais e operacionais (Herrero; Stuckey, 2015; Raper *et al.*, 2018). Diferentemente de outras estratégias da abordagem “de baixo para cima”, entre as principais vantagens do bioaumento está a simplicidade de implementação e o baixo custo, visto que não utiliza tecnologias onerosas como as da biologia sintética (Herrero; Stuckey, 2015; Raper *et al.*, 2018).

Para reduzir ainda mais os custos do bioaumento, o inóculo pode ser produzido a partir da biomassa de sistemas já operantes. A prática de selecionar micro-organismos nativos do próprio microbioma-alvo para o bioaumento é corriqueira, pois aumenta a chance de sobrevivência e adaptação da microbiota exógena (Raper *et al.*; 2018). Além disso, a biomassa excedente, que seria descartada, pode ser reaproveitada e utilizada para o bioaumento dos sistemas de tratamento. Quoc e colaboradores (2024), por exemplo, utilizaram o lodo descartado de um sistema de lodos ativados aplicado à nitrificação de esgoto sanitário para o bioaumento. Os autores observaram aumento na taxa de remoção do nitrogênio amoniacal no sistema bioaumentado.

Apesar das vantagens, assim como outras estratégias da abordagem “de baixo para cima”, o bioaumento apresenta como principal desafio o curto tempo de permanência dos micro-organismos exógenos no sistema-alvo, devido a sua

sensibilidade a perturbações ambientais e à competição com a microbiota nativa (Herrero; Stuckey, 2015; Raper *et al.*, 2018; Albright *et al.*, 2022). Estas limitações podem ser contornadas com o aumento da quantidade de biomassa inoculada e repetição periódica do bioaumento. Além disso, o bioaumento pode ser combinado com estratégias da abordagem “de cima para baixo”, como a aclimação prévia do inóculo e o enriquecimento dos micro-organismos adaptados às condições do sistema-alvo (Herrero, Stuckey, 2015; Raper *et al.*, 2018).

Devido às limitações da abordagem “de baixo para cima”, a abordagem “de cima para baixo” é mais comumente utilizada na engenharia de microbiomas aplicada ao tratamento de águas residuárias (Lawson *et al.*, 2019; Xiong *et al.*, 2024). A abordagem “de cima para baixo” baseia-se na manipulação do ambiente para direcionar o microbioma para a função desejada, partindo de um microbioma natural já estabelecido (FIGURA 2.6). Nesta abordagem, o microbioma com a função desejada é construído a partir da modificação da comunidade microbiana nativa por meio de estratégias como a aclimação da microbiota e a manipulação das condições operacionais e ambientais para selecionar populações específicas (Hu *et al.*; 2022; Silverstein; Segrè; Bhatnagar, 2023).

Na aclimação, uma das estratégias da abordagem “de cima para baixo”, a microbiota é exposta de maneira controlada a condições físicas e químicas específicas, resultando na adaptação do microbioma. Por sua vez, a adaptação do microbioma para a função desejada pode ocorrer por meio da seleção e enriquecimento, isto é, aumento populacional, dos micro-organismos tolerantes às condições impostas. ou por mecanismos adaptativos naturais da própria microbiota.

A aclimação pode ser especialmente útil para o tratamento de águas residuárias com elevada concentração de nitrogênio amoniacal, como o lixiviado de aterro sanitário. Elevadas concentrações de nitrogênio amoniacal (por exemplo, superiores a 50 mg N L^{-1}) podem inibir a microbiota e comprometer os bioprocessos dependentes da nitrificação. Contudo, a aclimação e exposição gradual da comunidade microbiana a concentrações crescentes de nitrogênio amoniacal podem resultar na seleção de micro-organismos tolerantes ou adaptados a grandes quantidades dessa substância (Wang *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2022).

Além disso, a aclimação da microbiota também pode favorecer a remoção do nitrogênio amoniacal de águas residuárias que apresentam elevada salinidade (Park *et al.*, 2022; Zhang, M. *et al.*, 2023; Wu; Lai; Zhao, 2024) ou sob baixas

temperaturas (por exemplo, inferiores a 15 °C), como as que ocorrem em estações de tratamento durante o inverno ou sob condições de elevada amplitude térmica (Gonzalez-Martinez *et al.*, 2016; Huo *et al.*, 2020).

A aclimatação também pode ser utilizada para favorecer o tratamento de águas residuárias industriais ou que sejam potencialmente tóxicas. Por exemplo, Hira e colaboradores (2018) obtiveram, por meio da aclimatação da microbiota do lodo de uma lagoa, o enriquecimento, isto é, o aumento populacional, de micro-organismos nitrificantes para o tratamento de lixiviado de aterro sanitário. Por sua vez, Zou e colaboradores (2020) realizaram a aclimatação da biomassa nitrificante de um sistema de lodos ativados ao 2,4,6-triclorofenol, um fenol clorado potencialmente tóxico encontrado em águas residuárias industriais. Como resultado, foi observado que a biomassa aclimatada apresentou taxa de nitrificação mais de duas vezes superior à da biomassa não aclimatada quando exposta ao poluente.

Apesar de ser uma alternativa de baixo custo devido à realização nos próprios sistemas de tratamento, a aclimatação pode demorar entre semanas e meses até produzir o efeito desejado nos microbiomas-alvo (Hou *et al.*, 2024; Xiong *et al.*, 2024). Além disso, em função do crescimento lento dos micro-organismos envolvidos, o tempo necessário até a adaptação microbiana pode ser ainda mais longo em sistemas de remoção autotrófica do nitrogênio amoniacal. Assim, devido às limitações, a aclimatação pode ser combinada a outras estratégias da engenharia de microbiomas para acelerar a partida e a estabilização dos sistemas de remoção do nitrogênio amoniacal.

Além da aclimatação, a seleção de micro-organismos com características específicas pode ser realizada a partir da manipulação das condições ambientais e operacionais, resultando no enriquecimento, isto é, no aumento, das populações microbianas desejadas. Por meio do enriquecimento, grupos microbianos especializados em determinadas funções são favorecidos a partir da exposição da comunidade microbiana nativa de um microbioma a condições seletivas como pH, temperatura e presença de nutrientes (Zhang *et al.*, 2020). O enriquecimento também pode contribuir para o aumento da abundância de micro-organismos raros ou desconhecidos, o que possibilita o aproveitamento de funções metabólicas do microbioma-alvo que, de outra forma, seriam negligenciadas (Silverstein; Segrè; Bhatnagar, 2023).

O enriquecimento é particularmente aplicável para a engenharia de microbiomas em que os diferentes grupos de micro-organismos apresentam diferenças fisiológicas significativas entre si (Lawson *et al.*, 2019). Quando os grupos microbianos apresentam características distintivas, como nos microbiomas associados à remoção do nitrogênio, o enriquecimento pode ajudar a selecionar os grupos mais adequados para uma função específica.

Por exemplo, a distinta capacidade das bactérias *comammox* para hidrolisar ureia e utilizá-la como fonte de nitrogênio e energia tem sido explorada para o enriquecimento destes organismos. Li e colaboradores (2021) realizaram o enriquecimento de bactérias *comammox* com urina, rica em ureia. Da mesma forma, Zhao e colaboradores (2021) observaram o aumento da população de bactérias *comammox* durante a incubação de amostras de biofilme de uma estação de tratamento de água com ureia. Em contrapartida, Cui e colaboradores (2023) enriqueceram as bactérias *comammox* a partir do estabelecimento de condições microaeróbias, aproveitando a sua capacidade de sobreviver sob baixas concentrações de oxigênio dissolvido ($< 1 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$). Esses micro-organismos, por vez, podem contribuir para bioprocessos de remoção do nitrogênio menos poluentes e mais econômicos, como discutido previamente.

De maneira análoga, Dan e colaboradores (2024) exploraram as diferenças na velocidade de consumo do oxigênio dissolvido pela microbiota nitrificante para enriquecer as bactérias oxidantes da amônia (BOA) em um sistema aplicado à nitrificação parcial de esgoto sanitário. As BOA apresentam, em geral, menores afinidades por oxigênio, consumindo-o mais rapidamente do que outros organismos nitrificantes quando sua concentração é elevada. Os autores aplicaram elevadas concentrações de oxigênio dissolvido, próximas à saturação, resultando no enriquecimento das BOA. O acúmulo de nitrito permaneceu elevado por mais de 200 dias e a eficiência média de remoção do nitrogênio amoniacal foi de 98,5%.

O enriquecimento também pode ser aplicado para viabilizar os bioprocessos dependentes do acúmulo de nitrito, cujo principal obstáculo é a presença das bactérias oxidantes do nitrito (BON). Para inibir as BON e reduzir sua taxa de crescimento, uma estratégia eficaz é estimular a competição com micro-organismos consumidores de nitrito, como as bactérias *anammox* e as desnitrificantes. (Wang *et al.*, 2022; Wei *et al.*, 2024). Ao promover o enriquecimento destes micro-organismos específicos, a disponibilidade de nitrito diminui. Assim, com menos nitrito disponível,

o crescimento celular das BON é retardado, resultando em menor oportunidade para a sua proliferação.

Em sistemas de tratamento de águas residuárias, o enriquecimento também pode ser utilizado para a produção de biomassa para o bioaumento ou para a partida de biorreatores. Alguns micro-organismos cruciais para os bioprocessos dependentes do acúmulo de nitrito, como as bactérias *anammox*, apresentam tempos de duplicação longos, que podem chegar a semanas (Strous *et al.*, 1999; Al-Hazmi *et al.*, 2022). Devido ao crescimento microbiano lento, a partida dos sistemas de tratamento pode demorar semanas a meses, tendo sido reportados períodos de até 200 dias (Bagchi; Biswas; Nandy, 2010; Hou *et al.*, 2024). Logo, a inoculação ou o bioaumento com biomassa previamente enriquecida pode acelerar o estabelecimento dos bioprocessos de remoção do nitrogênio.

Por exemplo, Su, Y. e colaboradores (2023) inocularam biomassa enriquecida em micro-organismos desnitrificantes em um sistema aplicado à desnitratação/*anammox* de água residuária sintética. Após a inoculação com a biomassa enriquecida, a desnitratação e o acúmulo de nitrito foram estabelecidos em 40 dias. Por sua vez, as bactérias *anammox* foram seletivamente enriquecidas no próprio biorreator e, após 79 dias, a desnitratação combinada com o processo *anammox* foi implementada com sucesso, resultando em eficiência de remoção do nitrogênio total de 90%.

Similarmente, Hou e colaboradores (2024) inocularam biomassa enriquecida em micro-organismos desnitrificantes e bactérias *anammox* em um sistema aplicado à desnitratação combinada ao processo *anammox* para tratamento de esgoto sanitário. A partida do sistema foi estabelecida após 30 dias e, depois da estabilização do sistema, a eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal foi superior a 95%.

Assim como a aclimação, o enriquecimento é uma estratégia de baixo custo e facilmente implementável, podendo ser realizada *in situ*, isto é, nos próprios sistemas de tratamento (Zhang *et al.*, 2020; Hu *et al.*, 2022). Contudo, o enriquecimento pode demorar meses ou anos até produzir os resultados desejados (Xiong *et al.*, 2024), o que pode restringir sua aplicação na engenharia de microbiomas associada à remoção do nitrogênio de águas residuárias. Para contornar esta limitação, outras estratégias podem ser combinadas com o

enriquecimento, como a aplicação de condições operacionais e ambientais que favoreçam o crescimento dos micro-organismos com as funções desejadas.

Além de promover o enriquecimento de micro-organismos específicos, a manipulação das condições ambientais e operacionais pode ser usada para inibir populações microbianas indesejadas, como as bactérias oxidantes de nitrito, especialmente em sistemas que dependem da nitrificação parcial e do acúmulo de nitrito. A repressão das BON geralmente depende de uma destas abordagens, que podem ser realizadas mediante manipulação das condições ambientais e operacionais: 1) aumento da taxa de decaimento e morte celular ou 2) diminuição da taxa de crescimento celular (Wang *et al.*, 2022; Al-Hazmi *et al.*, 2023).

Para aumentar a taxa de decaimento e morte celular das BON, uma abordagem comum é expor a comunidade microbiana a agentes biocidas, como a amônia livre (NH_3) e o ácido nitroso (HNO_2) (Duan *et al.*, 2019; Jiang *et al.*, 2021b; Wang *et al.*; 2022). Esta estratégia baseia-se na suposição de que as BOA são mais tolerantes a essas substâncias, enquanto as BON são mais sensíveis e, portanto, mais suscetíveis à inibição (Liu *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2021; Su, Z. *et al.*, 2023).

A exposição da microbiota à amônia livre ou ao ácido nitroso pode ser realizada *in-situ*. Esta estratégia é particularmente aplicável para águas residuárias com elevada concentração de nitrogênio, como o lixiviado de aterro sanitário, pois não requer a adição de fontes externas das substâncias inibitórias das BON e pode ser ajustada por meio da manipulação de condições como pH, carga volumétrica e temperatura (Wang *et al.*, 2022; Su, Z. *et al.*, 2023).

Para sistemas de tratamento de águas residuárias como o esgoto sanitário, em que a manutenção de concentrações elevadas de amônia livre ($\geq 50 \text{ mg N L}^{-1}$) ou de ácido nitroso ($\geq 1 \text{ mg N L}^{-1}$) não pode ser realizada naturalmente devido à baixa concentração de nitrogênio afluente, o tratamento *ex-situ*, isto é, fora do sistema de tratamento, é uma alternativa viável (Wang *et al.*, 2022). Nesta condição, uma porção da biomassa é retirada do biorreator, exposta à amônia livre ou ao ácido nitroso em um tanque de reação por até 24 horas e, em seguida, devolvida ao biorreator. Para o tratamento *ex-situ*, a biomassa é frequentemente colocada em contato com águas residuárias com elevada concentração de nitrogênio amoniacal, isto é, centenas a milhares de miligramas por litro, como efluente de digestores anaeróbios (Wang *et al.*, 2022).

No entanto, alguns gêneros de BON, particularmente *Nitrobacter*, “*Ca. Nitrotoga*” e *Nitrolancea*, podem apresentar tolerância à amônia livre e/ou ao ácido nítrico em elevadas concentrações (QUADRO 2.1). A exposição prolongada da microbiota a essas substâncias pode induzir a adaptação das BON a partir da emergência e seleção de espécies tolerantes (Duan *et al.*, 2019; Madill *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2022; Su, Z. *et al.*, 2023). A persistência de BON tolerantes pode causar falhas operacionais em sistemas de tratamento que dependem da nitrificação parcial ou do acúmulo de nitrito. Portanto, a combinação de diferentes abordagens é frequentemente necessária para o controle eficaz da nitrificação.

As estratégias baseadas na diminuição da taxa de crescimento celular das BON frequentemente envolvem a manipulação das condições operacionais dos sistemas de tratamento para desfavorecer a atividade das BON e, conseqüentemente, evitar a oxidação do nitrito formado a partir do metabolismo das BOA. Uma das abordagens de manipulação das condições operacionais mais utilizadas em sistemas de tratamento de águas residuárias é o controle da concentração de oxigênio dissolvido (Wang *et al.*, 2022; Su, Z. *et al.*; 2023).

A operação de biorreatores sob fornecimento limitado de oxigênio dissolvido supostamente favorece a dominância das bactérias e arqueas oxidantes da amônia em detrimento das BON (Lackner *et al.*, 2014; Mehrani *et al.*, 2020; Su, Z. *et al.*; 2023). A limitação da disponibilidade do oxigênio dissolvido pode ser controlada tanto pelo estabelecimento de baixas concentrações ($< 1 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$) como pelo regime de aeração intermitente.

A manutenção de baixas concentrações de oxigênio dissolvido ($< 1 \text{ mg L}^{-1}$) é uma estratégia comum em sistemas de tratamento para impedir que as BON se desenvolvam e para promover o acúmulo de nitrito no meio reacional (Lackner *et al.*, 2014; Mehrani *et al.*, 2020; Su, Z. *et al.*, 2023). Esta abordagem é baseada na maior afinidade por oxigênio dissolvido das BOA em comparação com as BON (Sinha; Annachhatre, 2007; Su, Z. *et al.*, 2023). Como as BOA, em geral, são mais eficientes em relação à utilização do oxigênio disponível do que as BON quando há limitação deste substrato, o oxigênio é mantido apenas na quantidade necessária para que as BOA realizem a oxidação da amônia a nitrito.

Entretanto, as BON podem persistir em sistemas de tratamento de águas residuárias mesmo sob baixa disponibilidade de oxigênio dissolvido. Por exemplo, em um sistema de lodos ativados com nitrificação parcial/*anammox*, a redução da

concentração do oxigênio dissolvido de 1,7 para 1,0 mg L⁻¹ resultou na redução populacional das BOA concomitantemente com o aumento da abundância das BON (Cao *et al.*, 2018).

A atividade persistente das BON é uma preocupação pois resulta na ruptura do acúmulo do nitrito e é devida, sobretudo, às bactérias do gênero *Nitrospira*, adaptadas a variadas concentrações de oxigênio dissolvido (Latocheski; Rocha; Braga, 2022; Su, Z. *et al.*, 2023). Bactérias do gênero *Nitrospira* foram detectadas como as BON predominantes em diversos sistemas de tratamento operados sob baixas concentrações de oxigênio dissolvido (Park; Noguera, 2008; Camejo *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2019; Wen; Lechevallier; Tao, 2020). Por isso, a manutenção de baixas concentrações de oxigênio dissolvido pode não ser suficiente para favorecer os bioprocessos dependentes do acúmulo do nitrito.

Entre as abordagens baseadas na manipulação das condições operacionais, a aeração intermitente tem se destacado como alternativa para controlar a nitrificação e favorecer os bioprocessos que dependem do acúmulo de nitrito, como a combinação da nitrificação parcial/*anammox* (Miao *et al.*, 2022; Su, Z. *et al.*, 2023). Sob o regime de aeração intermitente, o oxigênio é fornecido de forma cíclica, alternando entre períodos com aeração ligada e desligada.

No período sem aeração, as BOA e as BON coexistem sob baixa disponibilidade de oxigênio. Quando a aeração é acionada e estes micro-organismos são expostos novamente ao oxigênio, as BOA recuperam sua atividade mais rapidamente que as BON. Se a aeração for interrompida antes da recuperação completa das BON, sua atividade é inibida, resultando em menores taxas de crescimento celular comparadas às BOA nos ciclos subsequentes (Miao *et al.*, 2017; Miao *et al.*, 2022). Com o tempo, a população de BOA supera a de BON e o nitrito, que deixa de ser consumido pelas BON, acumula no meio reacional, passando a ser utilizado pelas bactérias *anammox* ou micro-organismos desnitrificantes durante os intervalos sem aeração.

A aeração intermitente permite a redução de custos com energia e está associada à menor produção de biomassa excedente e menores emissões de gases de efeito estufa comparada à aeração contínua (Miao *et al.*, 2022; Al-Hazmi *et al.*, 2023). Além disso, o regime de aeração intermitente pode ser aplicado em diversas configurações de sistemas de tratamento, como biorreatores de membrana, biorreatores em bateladas sequenciais e lodos ativados (Zhang *et al.*, 2022; Le *et al.*,

2023; Yilmaz *et al.*, 2023). Ainda, diversos parâmetros como a duração dos ciclos de aeração podem ser ajustados, resultando na otimização dos bioprocessos dependentes do acúmulo do nitrito (Al-Hazmi *et al.*, 2020; Chen, Y. *et al.*, 2022).

Apesar das vantagens e aplicações crescentes da aeração intermitente, seu impacto na remoção do nitrogênio amoniacal de águas residuárias ainda precisa de mais estudos. Embora a aeração intermitente seja mais eficaz que o estabelecimento de condições microaeróbias para inibir as BON, estes micro-organismos podem persistir e até recuperar a atividade no longo prazo em sistemas de tratamento (Al-Hazmi *et al.*, 2020; Chen, Y. *et al.*, 2022). Portanto, é necessário combinar estratégias adicionais da engenharia de microbiomas à aeração intermitente para assegurar a estabilidade e a eficiência dos bioprocessos que dependem do acúmulo de nitrito.

Independentemente da estratégia utilizada, a engenharia de microbiomas demanda métodos para avaliar sua eficácia na promoção da função desejada. Em geral, como muitos micro-organismos não são facilmente cultiváveis, a obtenção de material biológico de alta qualidade para análises filogenéticas, fisiológicas e cinéticas é restrita. Assim, técnicas moleculares independentes da cultura dos organismos são essenciais para estudar comunidades microbianas em ambientes complexos. A descoberta do ácido desoxirribonucleico (DNA) na década de 1950 permitiu a evolução de novas técnicas de identificação de micro-organismos. Impulsionada pelo desenvolvimento da reação em cadeia da polimerase (PCR) e pelas tecnologias de sequenciamento, a engenharia de microbiomas tem avançado significativamente nas últimas décadas (Berg *et al.*, 2020).

O desenvolvimento das técnicas moleculares tem possibilitado a identificação de muitos micro-organismos sem a necessidade de isolá-los de seus habitats naturais. Atualmente, as técnicas moleculares são consideradas, inclusive, como as mais confiáveis, sensíveis e acuradas para a exploração da ecologia microbiana em ambientes complexos como as estações de tratamento de águas residuárias (Sanz; Köchling, 2019; Zolti *et al.*, 2020; Chen, G. *et al.*, 2022).

Entre as ferramentas para a análise de microbiomas, destaca-se o sequenciamento, especialmente o de nova geração (Berg *et al.*, 2020). O sequenciamento do material genético dos micro-organismos de amostras ambientais fornece informações sobre a diversidade e a identidade microbiana. Esta técnica tem permitido a análise detalhada de comunidades microbianas em ambientes

complexos, superando as limitações das técnicas clássicas de microbiologia (Sanz; Köchling, 2019; Zolti *et al.*, 2020; Mai *et al.*, 2021; Chen, G. *et al.*, 2022).

Em associação ao sequenciamento, outro marco significativo para as análises moleculares independentes da cultura microbiana foi a utilização de marcadores filogenéticos, como o gene procariótico para o ácido ribonucleico ribossomal 16S (16S rRNA), a partir do final da década de 1970 (Berg *et al.*, 2020). Por meio do sequenciamento dos marcadores filogenéticos, tem sido possível identificar os micro-organismos em seus habitats naturais e analisar a composição de diversos microbiomas. Análises de microbiomas baseadas no sequenciamento do gene 16S rRNA têm sido utilizadas, por exemplo, para a investigação de comunidades microbianas em sistemas de tratamento de águas residuárias e têm ampliado o conhecimento sobre a diversidade, distribuição e dinâmica microbianas nestes habitats (Wu *et al.*, 2019b; Zhang, Y. *et al.*, 2023).

O gene 16S rRNA faz parte do material genético de todas as bactérias e arqueas e é o marcador taxonômico e filogenético mais comumente utilizado para a identificação desses organismos (Berg *et al.*, 2020; Zhang, Y. *et al.*, 2023). Este gene é amplamente utilizado na análise de microbiomas porque, embora apresente regiões conservadas (ou seja, quase idênticas) compartilhadas entre todas as bactérias e arqueas, é constituído também por regiões variáveis. Como as regiões variáveis do gene 16S rRNA são diferentes entre as espécies de bactérias e arqueas, como se fossem uma espécie de “código de barras” exclusivo de cada organismo, as sequências obtidas são comparadas com bancos de dados conhecidos e resultam na identificação desses micro-organismos.

Apesar das aplicações e do desenvolvimento das ferramentas de análise, a engenharia de microbiomas ainda enfrenta desafios. Um dos principais é o desconhecimento dos micro-organismos que compõem os microbiomas e suas funções. Além disso, ainda é necessário aprofundar a relação entre os dados obtidos a partir do sequenciamento do material genético microbiano e a capacidade funcional de um microbioma. O conhecimento é limitado pelo baixo número de micro-organismos isolados e caracterizados, que são a melhor fonte para estudos das funções microbianas (Lawson *et al.*, 2019; Lawson; 2021; Hu *et al.*, 2022). A obtenção e caracterização de isolados é, inclusive, essencial para confirmar as predições das funções microbianas obtidas a partir da análise de dados de sequenciamento (Berg *et al.*, 2020).

Uma pesquisa realizada com amostras de 269 estações de tratamento de águas residuárias de 23 países, baseada no sequenciamento do gene 16S rRNA, estimou que existem entre 1 e 2 bilhões de diferentes espécies de micro-organismos nesses habitats (Wu *et al.*, 2019b). No entanto, poucos micro-organismos foram identificados, isolados e devidamente caracterizados, sendo que a diversidade microbiana é apenas superficialmente conhecida. Resultados de meta-análise produzidos por Zhang, Y. e colaboradores (2023) permitiram afirmar que a maioria das bactérias e arqueas presentes em sistemas de tratamento de água residuária não foi ainda caracterizada.

A lacuna no conhecimento da diversidade também afeta os micro-organismos responsáveis pela remoção do nitrogênio, como sugere o pequeno número de grupos microbianos completamente caracterizados (QUADRO 2.2). Apesar da sua importância para o tratamento de águas residuárias, os micro-organismos envolvidos nos bioprocessos dependentes da nitrificação ainda são pouco conhecidos. A baixa taxa de crescimento e a dificuldade em manter culturas-estoque dificultam seu isolamento e caracterização, limitando ainda mais o entendimento da sua fisiologia e das funções que desempenham nos microbiomas.

QUADRO 2.2 – NÚMERO DE ESPÉCIES CARACTERIZADAS DE MICRO-ORGANISMOS NITRIFICANTES

Grupo	Gênero	Nº espécies reconhecidas ⁽¹⁾	Nº espécies não reconhecidas ⁽²⁾	Nº espécies caracterizadas ⁽³⁾
BOA	<i>Nitrosomonas</i>	3	11	14
AOA	<i>Nitrososphaera</i>	1	0	1
	<i>Nitrosopumilus</i>	4	3	7
	<i>Nitrosarchaeum</i>	1	1	2
Comammox	<i>Nitrospira</i>	0	4	4
BON	<i>Nitrospira</i>	1	9	10
	<i>Nitrobacter</i>	4	0	4
	“Ca. Nitrotoga”	0	2	2
	<i>Nitrolancea</i>	1	1	2

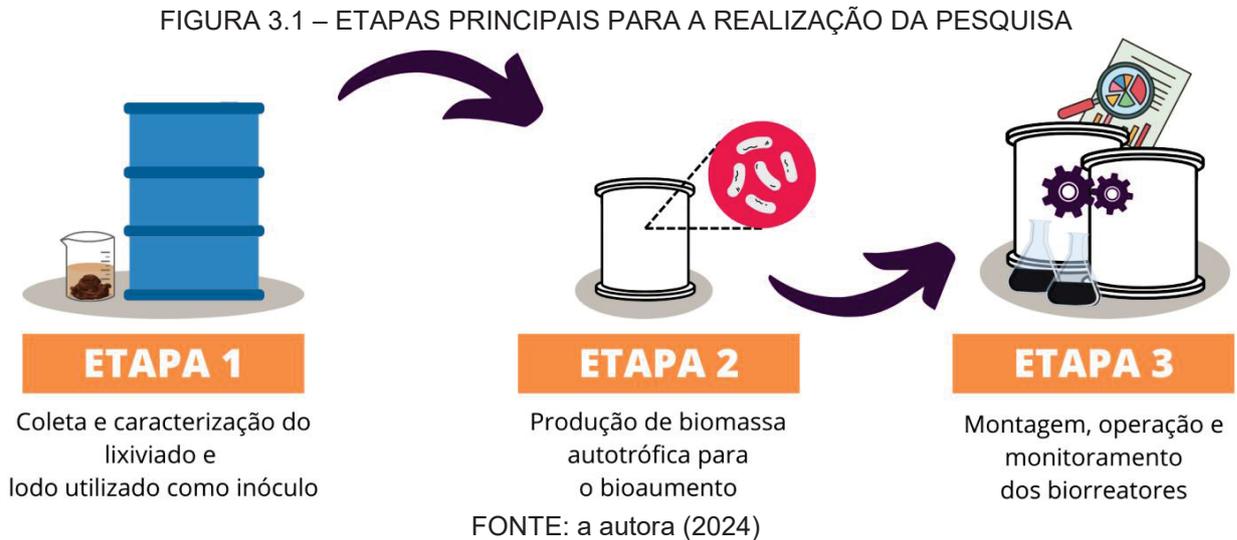
FONTE: a autora (2024)

NOTA: (1) espécies com nomes válidos na *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* (Parte *et al.*, 2020), acesso em 15 de agosto de 2024; (2) espécies com nomes não válidos na *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*, acesso em 15 de agosto de 2024; (3) soma das espécies com nomes válidos e não válidos.

Em síntese, a análise de microbiomas é fundamental para entender como os micro-organismos adaptam-se e desempenham funções específicas na remoção do nitrogênio amoniacal, especialmente em contextos complexos como o tratamento de lixiviados de aterros sanitários. A aplicação de técnicas moleculares pode auxiliar na compreensão sobre a composição e dinâmica das comunidades microbianas, permitindo a avaliação mais precisa das estratégias da engenharia de microbiomas. Este conhecimento, por sua vez, pode auxiliar na melhoria do controle e na implementação de bioprocessos mais eficientes, econômicos e menos poluentes em estações de tratamento de águas residuárias. Dessa forma, pode ser produzido um efluente de melhor qualidade e reduzida concentração de nitrogênio amoniacal, substância associada ao comprometimento da saúde ambiental e humana.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi dividida em três etapas principais (FIGURA 3.1), detalhadas a seguir.



3.1 COLETA E CARACTERIZAÇÃO DO LODO E DO LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO

Nesta etapa, foram coletados e caracterizados o líquido de aterro sanitário e o lodo aeróbio. Posteriormente, o lodo foi inoculado em dois biorreatores de bancada utilizados para a remoção do nitrogênio amoniacal de águas residuárias.

3.1.1 Coleta e caracterização do lodo inoculado aos biorreatores

O lodo utilizado como inóculo nos biorreatores foi coletado no tanque de aeração de um sistema de lodos ativados, em escala piloto, aplicado ao tratamento de esgoto sanitário. O lodo foi mantido sob refrigeração, entre 2 e 8 °C, até a realização das análises subsequentes.

Para a caracterização do lodo, foram determinadas as concentrações de sólidos totais (ST) e sólidos suspensos totais (SST), segundo procedimento padronizado (Rice *et al.* – Ed., 2012, método 2540), além do índice volumétrico de lodo (IVL), conforme procedimento descrito por Torfs e colaboradores (2016).

3.1.1.1 Ensaio em batelada para a avaliação da atividade nitrificante do lodo

Para avaliar a aplicabilidade do lodo coletado para a remoção autotrófica do nitrogênio amoniacal de águas residuárias, foi realizado um ensaio para determinar a atividade nitrificante da biomassa previamente à inoculação nos biorreatores.

Para este teste, foram utilizados frascos com volume total de 125 mL e volume de reação de 50 mL. Em cada frasco, foi adicionado lodo aeróbio recém-coletado em volume suficiente para atingir a concentração final de $3 \text{ g SST L}^{-1}_{\text{reação}}$. Esta condição foi similar àquela utilizada para a inoculação dos biorreatores aplicados para a remoção do nitrogênio amoniacal do lixiviado de aterro sanitário, isto é, concentração final do licor misto de $3 \text{ g SST L}^{-1}_{\text{reação}}$, produzida a partir da diluição do lodo aeróbio em meio mineral. Além disso, para que a concentração afluente do íon amônio fosse de aproximadamente $50 \text{ mg NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ ($\approx 40 \text{ mg N L}^{-1}$), também foi adicionada solução-estoque de NH_4Cl 500 mg N L^{-1} aos frascos de reação. O volume do *headspace* (aproximadamente 75 mL) foi calculado para que fosse garantida a quantidade de oxigênio dissolvido suficiente para a nitrificação completa nas condições do ensaio.

Aos frascos também foi adicionado meio mineral, preparado segundo recomendações de Lebedeva e colaboradores (2013). Para cada litro de meio mineral, foram utilizados 50 mg KH_2PO_4 ; 75 mg KCl , 50 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 584 mg NaCl ; 4 g CaCO_3 ; e 1 mL de solução de elementos-traço. O carbonato de cálcio (CaCO_3) não foi completamente dissolvido e foi utilizado como tamponante sólido. A solução de elementos-traço apresentou a seguinte composição (para 1 litro): 34 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 50 mg H_3BO_3 ; 43 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 37 mg $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 25 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 2,5 mL HCl 37% e 973 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Os frascos de reação inoculados com o lodo aeróbio recém-coletado foram mantidos sob agitação de aproximadamente 120 rpm, em *shaker* com movimento orbital (Novatecnica, modelo NT 715), com temperatura controlada em aproximadamente $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e ao abrigo da luz. Após 30 minutos, 16 h, 24 h, 32 h e 48 h de incubação, foram coletadas amostras para determinar as concentrações do nitrogênio amoniacal total (NAT) efluente, conforme procedimento padronizado (Rice *et al.*, Ed. – 2012, método 4500-NH₃ E), mediante utilização de um eletrodo seletivo para amônia da marca Oakton.

Para determinar a curva de remoção do NAT ao longo do tempo de incubação do lodo, a partir dos valores obtidos para as concentrações efluentes de nitrogênio amoniacal, foi construído um gráfico tempo *versus* concentração. Foram calculadas a atividade nitrificante específica (ANE) do lodo, utilizando a Equação 3.1, e a eficiência de remoção do NAT, conforme a Equação 3.6 (Seção 3.3).

$$ANE(\text{mg N g}_{\text{SST}}^{-1} \text{ h}^{-1}) = \frac{\text{NAT afluente (mg N L}^{-1}) - \text{NAT efluente (mg N L}^{-1})}{\text{Concentração SST lodo (g}_{\text{SST}} \text{ L}^{-1}) \cdot \text{tempo de incubação (h)}} \quad (3.1)$$

Após o início da operação dos biorreatores e aclimação da microbiota às condições operacionais, foi realizado um segundo teste em batelada para avaliar a atividade nitrificante do lodo e compará-la à atividade nitrificante do lodo recém-coletado. Para este segundo teste, o lodo foi coletado de R1 e R2 no 549º dia de operação (fase V). Foram utilizados frascos com volume total de 500 mL e volume de reação de 50 mL.

Anteriormente à inoculação do lodo aclimatado nos frascos de reação, a biomassa foi lavada em tampão salino de fosfato (PBS, pH 7,4) e recuperada após a sedimentação e o descarte do sobrenadante. Em cada frasco, foi adicionado volume de lodo coletado dos biorreatores R1 e R2 suficiente para que a concentração final fosse de aproximadamente $4 \text{ g SST L}^{-1}_{\text{reação}}$.

Para avaliar a atividade nitrificante frente a dois substratos distintos após a aclimação da microbiota, metade dos frascos recebeu lixiviado diluído, enquanto a outra metade recebeu meio mineral como substrato. Além disso, foram testadas duas concentrações de nitrogênio amoniacal afluente para cada substrato: 200 mg N L^{-1} e 400 mg N L^{-1} . Nos frascos que receberam o lixiviado, a concentração do afluente foi ajustada a partir da diluição do lixiviado puro. Por outro lado, aos frascos incubados com meio mineral foi adicionada uma solução-estoque de NH_4Cl 2000 mg N L^{-1} em volume suficiente para atingir a concentração afluente desejada após a diluição e adição dos demais componentes reacionais. Cada condição experimental foi avaliada em triplicata.

Para os frascos incubados com meio mineral, o preparo do afluente foi realizado conforme recomendações de Ehrich e colaboradores (1995) para micro-organismos nitrificantes (BOA e BON). Para cada litro de meio mineral foram adicionados 7 mg CaCO_3 ; 500 mg NaCl ; $50 \text{ mg MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $150 \text{ mg KH}_2\text{PO}_4$; e 1

mL de solução de elementos-traço. A solução de elementos-traço apresentou a seguinte composição (para 1 litro): 34 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 50 mg H_3BO_3 ; 43 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 37 mg $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 25 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 2,5 mL HCl 37% e 973 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Para assegurar concentração suficiente de alcalinidade para a realização da nitrificação nos frascos que continham o meio mineral, também foram adicionados 12 mL de solução-estoque de NaHCO_3 20 g L^{-1} a cada frasco.

Os frascos de reação inoculados com o lodo coletado de R1 e R2 foram mantidos sob agitação de aproximadamente 120 rpm em agitador magnético (IKA®, modelo RT 15), com temperatura controlada em 30 °C, ao abrigo da luz por 24 horas. Posteriormente, alíquotas foram coletadas dos frascos de reação para determinar as concentrações de NAT efluente, conforme procedimento padronizado (Rice *et al.*, Ed. – 2012, método 4500-NH₃ F). Para cada condição experimental, a atividade nitrificante específica (ANE) do lodo foi determinada a partir da aplicação da Equação 3.1.

3.1.2 Coleta e caracterização do lixiviado de aterro sanitário

O lixiviado foi coletado no aterro sanitário operado pelo Serviço Autônomo Municipal de Água e Esgoto (SAMAE) de São Bento do Sul, Santa Catarina (coordenadas geográficas: 26°15'46.3"S 49°20'05.8"W). Foram realizadas duas campanhas para a coleta do lixiviado, ocorridas em março e junho de 2023.

O lixiviado foi armazenado em recipientes plásticos de 30 L e mantido à temperatura ambiente até a utilização. A caracterização do lixiviado foi realizada em função dos parâmetros apresentados no QUADRO 3.1.

QUADRO 3.1 – PARÂMETROS PARA A CARACTERIZAÇÃO DO LIXIVIADO

Parâmetro	Método	Referência	Código do método
Alcalinidade total	Potenciométrico	Ripley, Boyle e Converse (1986)	-
Condutividade	Condutimétrico	Rice <i>et al.</i> - Editores (2012)	2510
DBO ₅	Respirométrico		5210 D
DQO	Refluxo fechado – Colorimétrico		5220 D
NAT	Titulométrico		4500-NH3 F
Nitrato	2,6-Dimetilfenol - Espectrométrico		Ramaswami <i>et al.</i> (2017)
Nitrito	Colorimétrico	Rice <i>et al.</i> - Editores (2012)	4500-NO ₂ ⁻ B
Nitrogênio total	Persulfato		4500-N C
Ortofosfato	Ácido ascórbico		4500-P E
pH	Potenciométrico		4500 H+
Salinidade	Condutividade elétrica		2520 B

FONTE: a autora (2024)

NOTA: DBO₅: demanda bioquímica de oxigênio determinada em ensaio realizado a 20 °C e duração de cinco dias; DQO: demanda química de oxigênio; NAT: nitrogênio amoniacal total.

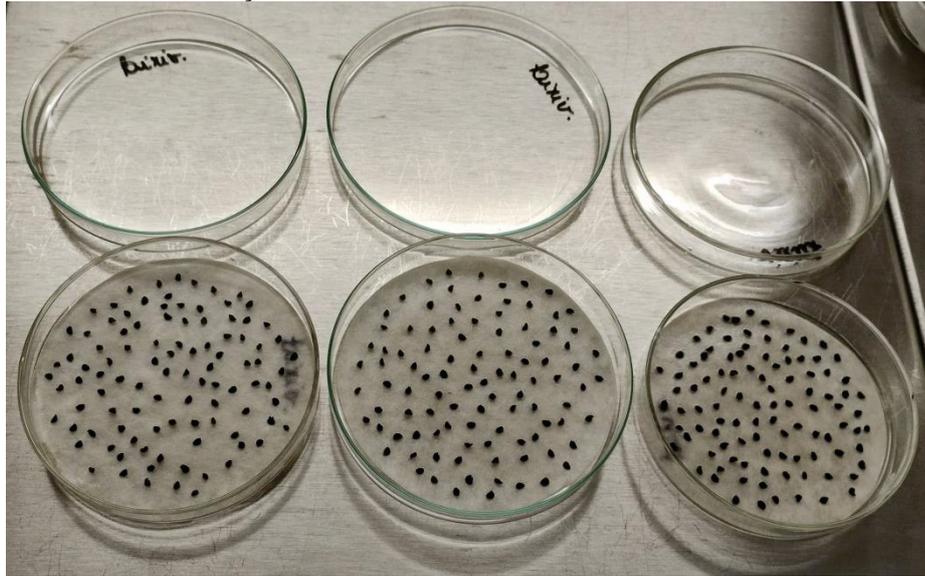
3.1.2.1 Avaliação da toxicidade do lixiviado por meio de ensaio com sementes de *Allium cepa*

O lixiviado de aterro sanitário foi caracterizado quanto a sua potencial toxicidade por meio de ensaio com sementes de *Allium cepa* (cebola).

As sementes de *A. cepa* foram submetidas à germinação diretamente nos agentes testados, a saber: controle negativo (água deionizada), controle positivo (solução de CuSO₄ 100 µM), lixiviado bruto (não diluído), lixiviado diluído duas vezes (concentração 400 mg N L⁻¹, como NAT), lixiviado diluído quatro vezes (concentração 200 mg N L⁻¹, como NAT) e efluente dos biorreatores R1 e R2 (coletados no 559º dia de operação).

O ensaio foi realizado para cada agente avaliado, no mínimo, em triplicata. Para cada replicata, foram separadas 100 sementes de *A. cepa*, variedade baia periforme (TopSeed, pureza: 99%, germinação: 81-85%). As sementes foram desinfetadas superficialmente por meio da imersão em solução de hipoclorito de sódio a 0,6% (v/v), sob agitação, por 10 minutos, conforme Gilbert, Diaz e Bregoff (2023). A seguir, as sementes foram enxaguadas em água deionizada esterilizada e dispostas em placas de Petri autoclavadas e forradas com papel filtro (FIGURA 3.2).

FIGURA 3.2 – DISPOSIÇÃO DAS SEMENTES DE CEBOLA NAS PLACAS DE PETRI



FONTE: a autora (2024)

Para cada agente testado, o papel filtro foi umedecido com a substância em avaliação. As placas de Petri com as sementes foram incubadas a 25 °C por 12 dias. A contagem das sementes germinadas em cada placa foi realizada diariamente. Consideraram-se germinadas as sementes que apresentaram protuberâncias maiores que 1 milímetro (mm). Ao final do ensaio, no 12º dia, o comprimento das raízes das sementes germinadas foi medido com o auxílio de um paquímetro.

Para a macroanálise da toxicidade dos agentes avaliados, foram determinados os seguintes parâmetros:

- comprimento das raízes após 12 dias de incubação;
- percentagem de germinação após 6 dias de incubação (PG, Equação 3.2);

$$PG (\%) = \frac{\text{n}^\circ \text{ sementes germinadas após 6 dias}}{\text{n}^\circ \text{ total de sementes incubadas}} \times 100 \quad (3.2)$$

- velocidade de germinação (VG, Equação 3.3);

$$VG (\text{n}^\circ \text{ sementes d}^{-1}) = \sum \frac{\text{n}^\circ \text{ novas sementes germinadas no dia } i}{i \text{ (dia)}} \quad (3.3)$$

- tempo médio de germinação (TMG, Equação 3.4);

$$\text{TMG (d)} = \frac{\sum(\text{n}^\circ \text{ novas sementes germinadas no dia } i) \times (i)}{\sum \text{n}^\circ \text{ total de sementes germinadas}} \quad (3.4)$$

Finalmente, a toxicidade dos agentes avaliados sobre *A. cepa* foi estabelecida pela comparação dos resultados obtidos para os parâmetros associados à germinação com aqueles obtidos para o controle negativo (água deionizada).

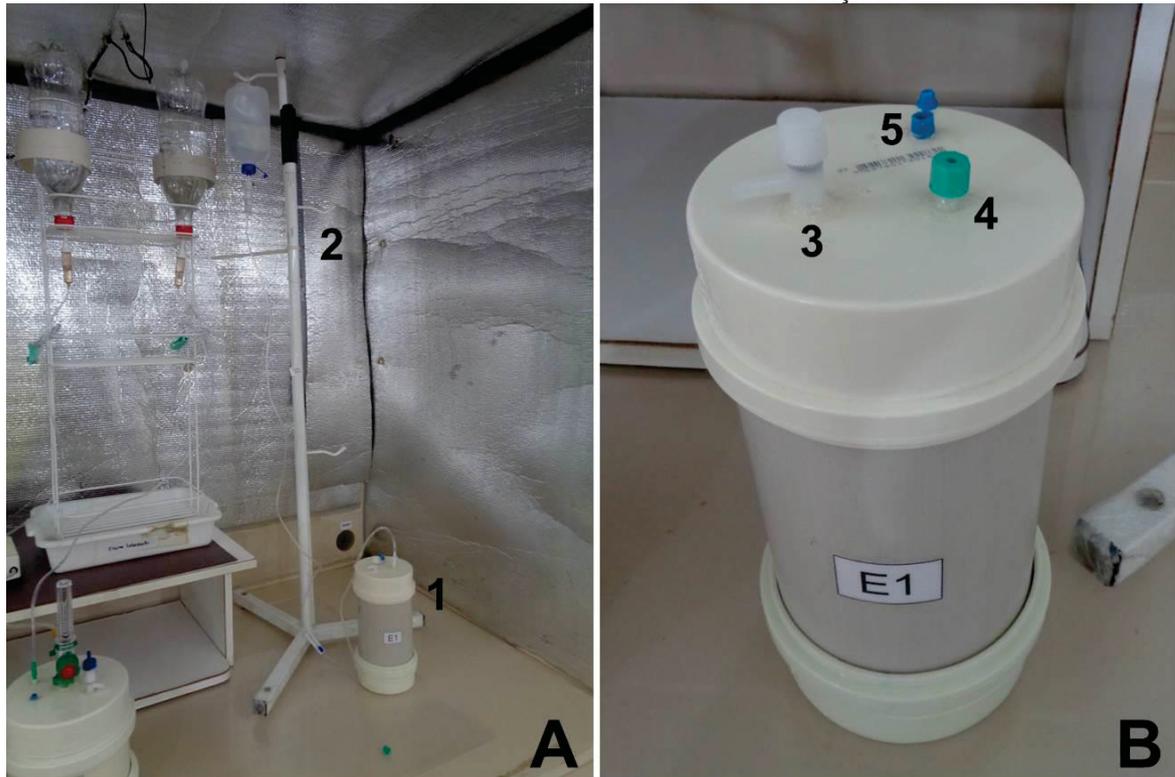
3.2 PRODUÇÃO DE BIOMASSA ENRIQUECIDA PARA A REMOÇÃO AUTOTRÓFICA DE NITROGÊNIO AMONÍACAL E BIOAUMENTO

Visando à produção de biomassa para o bioaumento dos biorreatores R1 e R2, utilizados, posteriormente, para tratamento do lixiviado de aterro sanitário, foi realizado o enriquecimento dos micro-organismos presentes no lodo aeróbio. Como essa etapa inicialmente visava estimular o aumento populacional de bactérias *comammox*, foi utilizado procedimento adaptado de Zhao e colaboradores (2021) específico para esses organismos, que consistiu na incubação da biomassa em meio contendo baixa concentração de ureia ($< 20 \text{ mg N L}^{-1}$) como única fonte de energia e nitrogênio e baixa concentração de oxigênio dissolvido ($< 1 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$).

Para o enriquecimento, um biorreator, denominado E1, foi construído em policloreto de vinila (PVC), com volume útil de 1 litro, diâmetro de 0,10 m e razão entre altura e diâmetro (H/D) de aproximadamente 2,0 (FIGURA 3.3). O biorreator E1 foi mantido em câmara térmica com temperatura controlada em $30 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e protegido da luz. Com o objetivo de manter baixas concentrações de oxigênio dissolvido no meio de cultura ($< 1 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$) e criar zonas anóxicas, o biorreator E1 não foi submetido a agitação mecânica nem aeração.

O biorreator E1 foi operado em regime de bateladas sequenciais por 390 dias. Cada ciclo de batelada teve duração de 24 horas, com a seguinte subdivisão: i) retirada do efluente, com duração de 30 minutos; ii) alimentação do afluente por gravidade, com duração de 30 minutos; e iii) reação em condições de baixa concentração de oxigênio dissolvido ($< 1 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$) por 23 horas. Outras condições adotadas para a operação são apresentadas no QUADRO 3.2.

FIGURA 3.3 – BIORREATOR E1 E INSTALAÇÕES



FONTE: a autora (2024)

NOTA: A: câmara térmica em que foi instalado o biorreator E1; B: detalhes da construção do biorreator; 1: biorreator E1; 2: aparato para alimentação do biorreator por gravidade; 3: válvula para retirada do efluente; 4: válvula para alimentação do afluente 5: respiro de segurança para a saída de gases.

QUADRO 3.2 – CONDIÇÕES OPERACIONAIS PARA O BIORREATOR E1

Parâmetro	Condições aplicadas
Concentração afluente de nitrogênio total	Etapa A: 10 mg N L ⁻¹ Etapa B: 20 mg N L ⁻¹ (a)
Concentração de oxigênio dissolvido	< 1,0 mg O ₂ L ⁻¹
Relação de troca volumétrica (RTV)	25%
Tempo de detenção hidráulica (TDH)	96 h

FONTE: a autora (2024)

NOTA: (a) inicialmente, visando à aclimação da microbiota do lodo inoculado em E1, a concentração afluente de nitrogênio era igual a 10 mg N L⁻¹ (etapa A). Posteriormente, depois de aproximadamente 4 meses, a concentração foi aumentada para 20 mg N L⁻¹ (etapa B).

O biorreator E1 foi inoculado com o mesmo lodo utilizado nos biorreatores R1 e R2, coletado no tanque de aeração de um sistema de lodos ativados em escala piloto aplicado ao tratamento de esgoto sanitário. A determinação da concentração de sólidos suspensos totais (SST), conforme procedimento padronizado (Rice *et al.* – Ed., 2012, método 2540), foi utilizada para a caracterização deste lodo. Para que a

concentração inicial do licor misto do biorreator E1, composto pelo meio líquido e pelo lodo em suspensão, fosse de aproximadamente $4 \text{ g}_{\text{SST}} \text{ L}^{-1}$, o volume de inóculo foi calculado com base na concentração média de SST do lodo.

O meio afluente ao biorreator E1 apresentou a seguinte composição (para 1 L): etapa A: 21,4 mg ureia / etapa B: 42,9 mg ureia; 120 mg NaHCO_3 ; 7 mg CaCO_3 ; 500 mg NaCl ; 50 mg $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 150 mg KH_2PO_4 ; e 1 mL de solução de elementos-traço. A solução de elementos-traço apresentou a seguinte composição (para 1 litro): 34 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 50 mg H_3BO_3 ; 43 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 37 mg $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 25 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 2,5 mL HCl 37% e 973 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Ao longo da operação de E1, foram coletadas alíquotas do afluente e do efluente. Estas amostras foram utilizadas para a determinação periódica dos parâmetros apresentados no QUADRO 3.3.

QUADRO 3.3 – PARÂMETROS PARA O MONITORAMENTO DO BIORREATOR E1

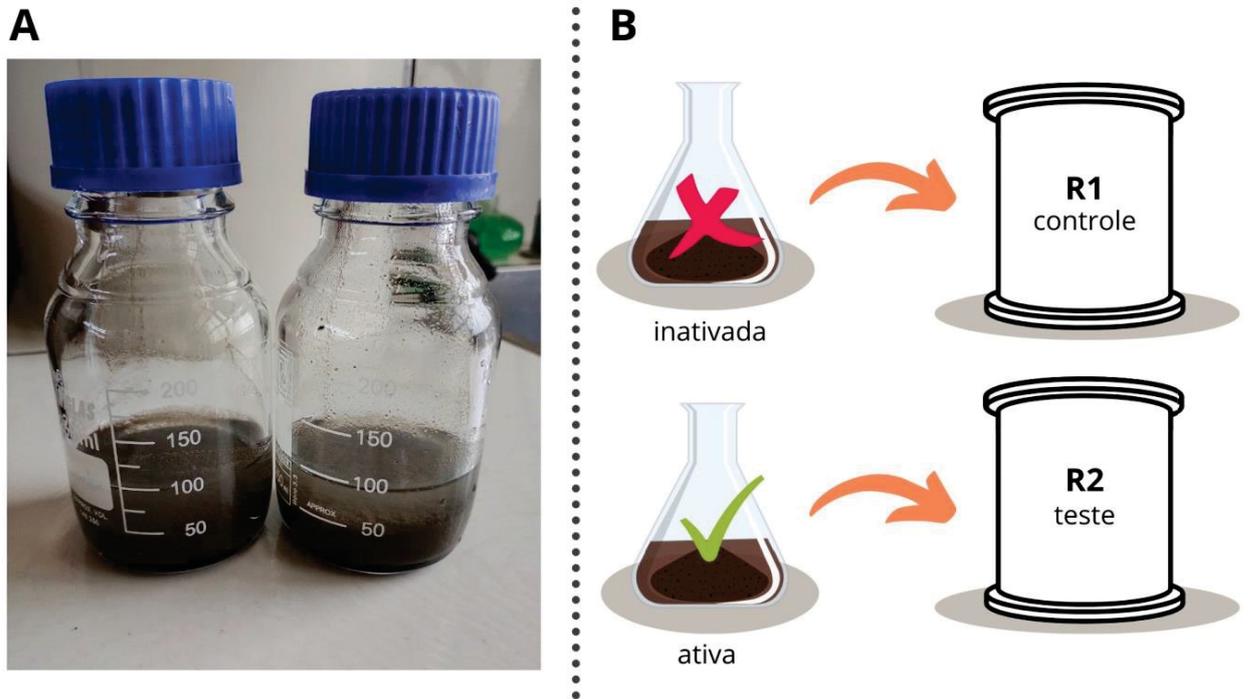
Parâmetro	Método	Referência	Código do método
NAT	Titulométrico	Rice <i>et al.</i> - Editores (2012)	4500-NH3 F
Nitrato	2,6-Dimetilfenol - Espectrométrico	Ramaswami <i>et al.</i> (2017)	DIN 38405-9
Nitrito	Colorimétrico	Rice <i>et al.</i> - Editores (2012)	4500- NO_2^- B
Nitrogênio total	Persulfato		4500-N C
pH	Potenciométrico		4500 H+

FONTE: a autora (2024)

No final da operação do biorreator E1, uma amostra de licor misto foi coletada e processada para análise do microbioma via sequenciamento de *amplicons* do gene 16S rRNA em plataforma Illumina MiSeq™, como apresentado na seção 3.3.3.1.

Após o enriquecimento dos micro-organismos no lodo do biorreator E1, a biomassa foi sedimentada e o sobrenadante removido. A biomassa foi lavada com tampão salino de fosfato (PBS, pH 7,4) estéril e deixada em repouso por 30 minutos para que a sedimentação ocorresse novamente. O sobrenadante foi removido e descartado, e a biomassa foi recuperada e dividida em duas partes iguais (FIGURA 3.4 A). Cada parte continha 80 mL de lodo, com concentração de sólidos suspensos totais (SST) de aproximadamente $15,6 \text{ g L}^{-1}$.

FIGURA 3.4 – PROCEDIMENTO REALIZADO PARA O PREPARO DA BIOMASSA PARA O BIOAUMENTO



FONTE: a autora (2024)

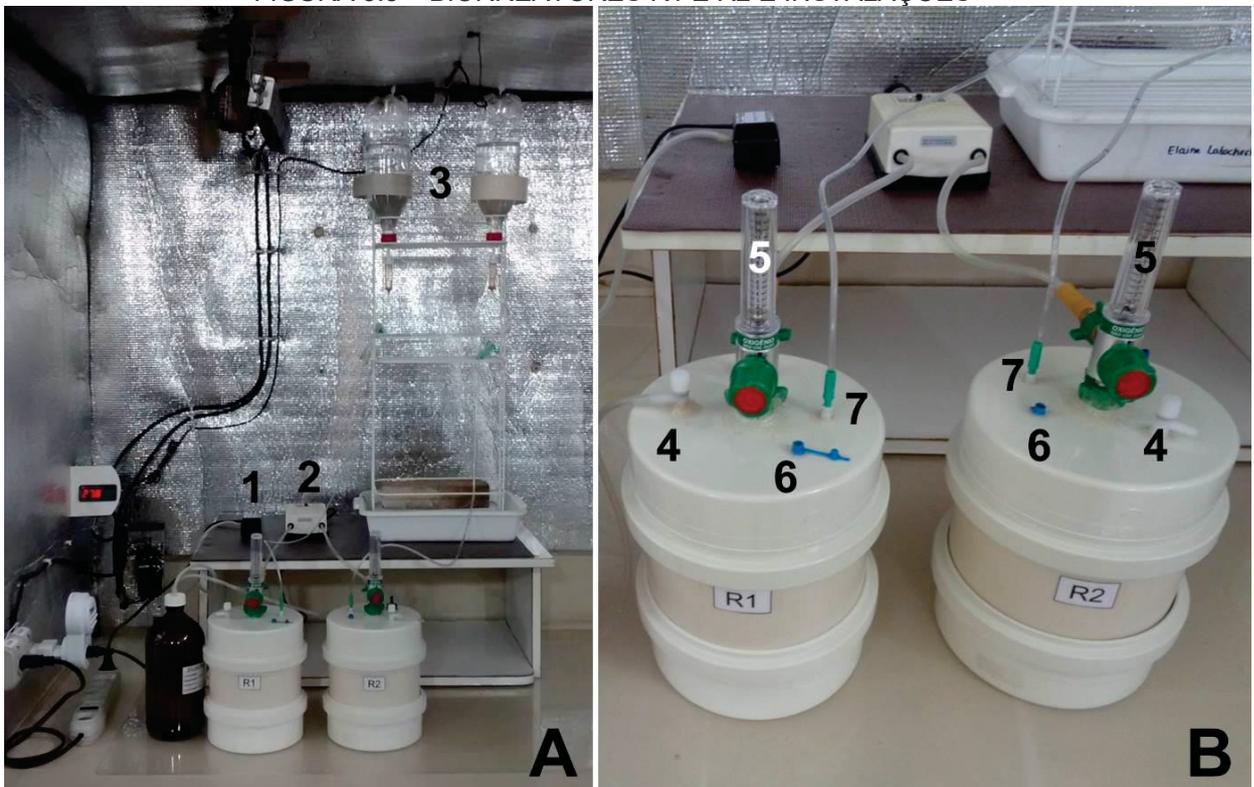
Uma das frações da biomassa recuperada de E1 foi inativada mediante esterilização em autoclave a 121 °C por 30 minutos e inoculada no biorreator R1, designado como controle a partir da fase V. A outra parte foi diretamente inoculada no biorreator R2, ou biorreator teste, no início da fase V (FIGURA 3.4 B). Esta abordagem foi realizada para minimizar a influência da adição de sólidos no biorreator teste (R2), garantindo que quaisquer diferenças observadas na eficiência e estabilidade pudessem ser atribuídas ao bioaumento em si e não à alteração na concentração de sólidos no meio reacional, que foi equilibrada pela adição da mesma quantidade de biomassa em R1. Foi introduzido em cada biorreator volume de lodo contendo aproximadamente 1,25 g de sólidos suspensos totais (SST), valor correspondente a 12,5% do total de SST presentes em R1 e R2.

Os biorreatores R1 (controle, inoculado com biomassa inativada) e R2 (teste, bioaumentado com biomassa enriquecida em micro-organismos autotróficos) foram mantidos em câmara térmica a 30 ± 2 °C e operados sob condições idênticas. Os efeitos do bioaumento no biorreator teste (R2) foram avaliados por meio dos parâmetros indicadores da eficiência e estabilidade do tratamento do lixiviado de aterro sanitário (Equações 3.6 a 3.9).

3.3 MONTAGEM, OPERAÇÃO E MONITORAMENTO DOS BIORREATORES PARA O TRATAMENTO DO LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO

Para a realização dos bioprocessos de remoção autotrófica do NAT do lixiviado de aterro sanitário, foram montados dois biorreatores aeróbios em escala de bancada, denominados R1 e R2 (FIGURA 3.5). Os biorreatores foram construídos em policloreto de vinila (PVC), ambos com volume total de 3 litros e volume útil de 2,5 litros, diâmetro de 0,15 m e razão entre altura e diâmetro (H/D) de aproximadamente 1,0.

FIGURA 3.5 – BIORREATORES R1 E R2 E INSTALAÇÕES



FONTE: a autora (2024)

NOTA: A: câmara térmica em que foram instalados os biorreatores R1 e R2; B: detalhes da construção dos biorreatores; 1: compressor de ar para aquário adaptado para funcionamento como bomba a vácuo para retirada do efluente dos biorreatores; 2: compressor de ar para aquário para aeração dos biorreatores 3: aparato para alimentação dos biorreatores por gravidade; 4: válvula para retirada de efluente; 5: fluxômetros para controle da vazão do ar comprimido; 6: respiro de segurança para a saída de gases; 7: válvula para alimentação do afluente.

Os biorreatores R1 e R2 foram inoculados com o lodo aeróbio previamente caracterizado. O volume de inóculo em cada biorreator foi determinado a partir da concentração média de SST do lodo, garantindo a concentração inicial aproximada de $3 \text{ g}_{\text{SST}} \text{ L}^{-1}$ para o licor misto, isto é, a mistura composta pelo meio líquido e o lodo

em suspensão. Ao longo da operação, foi realizado o descarte do lodo excedente por meio da retirada do licor misto dos biorreatores. A quantidade de biomassa excedente foi calculada para que a concentração do licor misto dos biorreatores fosse mantida entre 4 e 5 g SST L⁻¹, valor máximo recomendado para reatores em bateladas sequenciais (Tchobanoglous; Burton; Stensel, 2003).

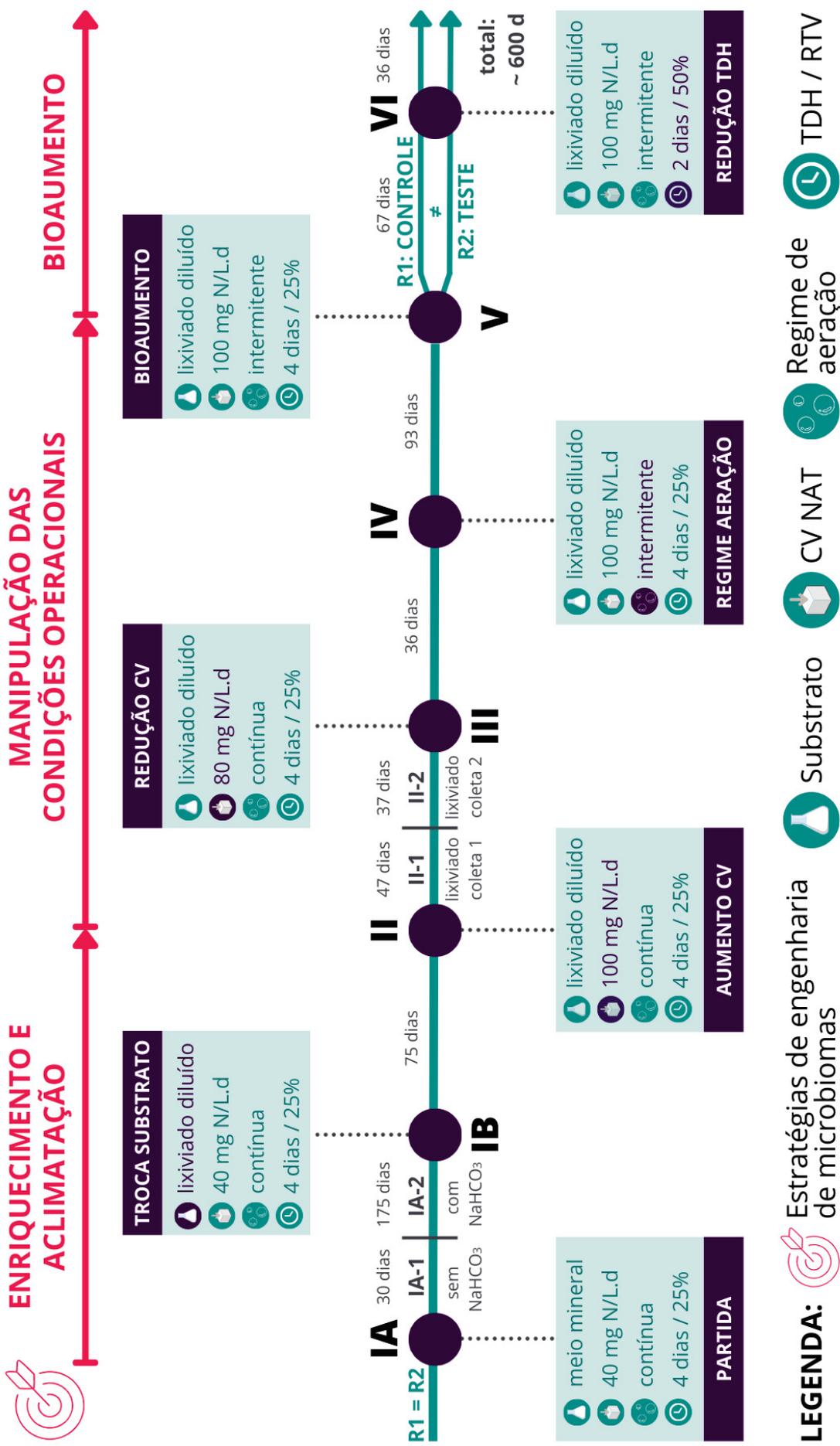
Os biorreatores foram mantidos em câmara térmica sob temperatura controlada de 30 ± 2 °C e ao abrigo da luz (FIGURA 3.5 A). Para garantir que a concentração de oxigênio dissolvido fosse suficiente para a manutenção do metabolismo microbiano durante a fase aeróbia, os biorreatores foram aerados por meio de bomba compressora para aquário marca Boyu, modelo SC-7500. A vazão do ar foi controlada por meio de fluxômetros instalados nos biorreatores (FIGURA 3.5 B) e mantida abaixo de 0,5 L min⁻¹.

Os biorreatores R1 e R2 foram operados em bateladas sequenciais. Cada batelada teve duração de 24 horas, divididas nas seguintes etapas: i) sedimentação da biomassa (1 h); ii) remoção do efluente (0,5 h); iii) alimentação/enchimento (0,5 h) e iv) reação (22 h). Por sua vez, a fase de reação foi subdividida em períodos aeróbios, com aeração ligada, e períodos sem aeração.

Para a remoção diária do efluente dos biorreatores, foi utilizado um compressor de ar para aquário Boyu, modelo U-2800, modificado para funcionar como bomba de vácuo (FIGURA 3.5 A). A alimentação do afluente aos biorreatores foi realizada por gravidade, por meio do aparato apresentado na FIGURA 3.5 A.

A operação dos biorreatores foi dividida em fases, caracterizadas pela implementação de diferentes estratégias de engenharia de microbiomas (FIGURA 3.6). Os biorreatores R1 e R2 foram operados sob as mesmas condições operacionais (duplicatas biológicas) até a fase V (FIGURA 3.6). A escolha por trabalhar com biorreatores em duplicata biológica foi baseada em limitações logísticas, como a necessidade de grande volume de lixiviado para alimentar múltiplos sistemas biológicos. Esta abordagem permitiu o equilíbrio entre a robustez dos resultados e a viabilidade do experimento, garantindo a execução nas condições práticas disponíveis.

FIGURA 3.6 – CARACTERÍSTICAS E ESTRATÉGIAS DE ENGENHARIA DE MICROBIOMAS DAS FASES OPERACIONAIS PARA R1 E R2



FONTE: a autora (2024)

NOTA: CV: carga volumétrica; NAT: nitrogênio amoniacal total; TDH: tempo de detenção hidráulica; RTV: relação de troca volumétrica.

A partir da fase V, em que o bioaumento foi realizado, os biorreatores deixaram de ser operados como replicatas (FIGURA 3.6). A partir desta etapa, R1 passou a ser o biorreator controle, enquanto R2 recebeu a biomassa enriquecida em micro-organismos autotróficos, produzida no biorreator E1 (Seção 3.2). Esta separação foi realizada para avaliar o efeito isolado do bioaumento no tratamento do lixiviado e minimizar potenciais interferências, o que permitiu a comparação direta entre o desempenho do biorreator com bioaumento (R2) e o controle (R1).

As fases IA e IB visaram à partida dos biorreatores, ao enriquecimento da microbiota nitrificante (sobretudo BOA e BON) e à aclimação microbiana ao lixiviado de aterro sanitário, que foram as estratégias de engenharia de microbiomas avaliadas durante estas etapas (FIGURA 3.6). As condições operacionais associadas às fases IA e IB são apresentadas no QUADRO 3.4.

QUADRO 3.4 – CONDIÇÕES PARA AS FASES OPERACIONAIS IA E IB

Fase	Duração (d)	Substrato afluente	CV NAT (mg N L ⁻¹ .d ⁻¹)	NAT afluente (mg N L ⁻¹)	Regime de aeração/ duração total da fase aeróbia
IA	205	Solução de NH ₄ Cl; meio mineral; solução de NaHCO ₃ ^(a)	40	160	Contínuo / 21 horas
IB	75	Lixiviado diluído de aterro sanitário ^(b)			

FONTE: a autora (2024)

NOTA: (a) a solução de NaHCO₃ passou a ser adicionada ao afluente a partir do 31º dia de operação; (b) o lixiviado foi diluído com água de torneira; CV: carga volumétrica; NAT: nitrogênio amoniacal total; N: nitrogênio.

A fase IA foi dividida em duas etapas, IA-1 e IA-2 (FIGURA 3.6). Em ambas, solução-estoque de NH₄Cl 1000 mg N L⁻¹ foi alimentada diariamente aos biorreatores visando ao enriquecimento de bactérias nitrificantes, isto é, oxidantes da amônia (BOA) e do nitrito (BON). O meio mineral, também utilizado para o preparo do afluente de R1 e R2 nesta fase, foi preparado de acordo com Ehrich e colaboradores (1995) para enriquecimento de BOA e BON e, para cada litro, apresentou a seguinte composição: 7 mg CaCO₃; 500 mg NaCl; 50 mg MgCl₂.6H₂O; 150 mg KH₂PO₄; e 1 mL de solução de elementos-traço. A solução de elementos-traço apresentou a seguinte composição (para 1 litro): 34 mg MnSO₄.H₂O; 50 mg H₃BO₃; 43 mg ZnSO₄.7H₂O; 37 mg (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O; 25 mg CuSO₄.5H₂O; 2,5 mL HCl 37% e 973 mg FeSO₄.7H₂O.

Em função da acidificação do meio de reação observada em R1 e R2 durante a fase IA-1, solução-estoque de NaHCO_3 na concentração de 10 g L^{-1} também foi adicionada ao afluente na fase IA-2. Nesta fase, a adição diária da solução de NaHCO_3 visou garantir a manutenção do pH do meio reacional entre 7,0 e 8,5, além de proporcionar efeito tamponante e fornecer bicarbonato como fonte de carbono inorgânico para o metabolismo microbiano autotrófico.

Após as fases IA e IB, destinadas ao enriquecimento da microbiota nitrificante e à aclimatação ao lixiviado, a operação dos biorreatores foi dividida nas fases II, III e IV (FIGURA 3.6). Nestas fases, a estratégia da engenharia de microbiomas implementada e avaliada envolveu a manipulação das condições operacionais, variando a carga volumétrica de nitrogênio amoniacal e a concentração do lixiviado (fases II e III) e o regime de aeração (fase IV).

Na fase V, foi realizado o bioaumento do biorreator R2 para avaliar o efeito dessa estratégia da engenharia de microbiomas no tratamento do lixiviado (FIGURA 3.6). Na fase VI, o efeito do bioaumento em R2 foi avaliado após a redução do tempo de detenção hidráulica (TDH) e aumento da relação de troca volumétrica (RTV). A redução do TDH, juntamente com a diminuição da concentração afluente do nitrogênio amoniacal, foi realizada para simular a variabilidade nas condições operacionais e ambientais frequentemente observadas durante a produção e tratamento do lixiviado em aterros sanitários.

Para as fases operacionais I a III, a aeração foi realizada em regime contínuo. A duração da fase aeróbia variou entre 20 horas, para as fases IA e IB (QUADRO 3.4), e 21 horas, para as fases II e III (QUADRO 3.5). Nas fases IV, V e VI foi aplicado o regime de aeração intermitente (QUADRO 3.5), dividido em 12 ciclos diários de 1 hora com a aeração ligada e 1 hora sem aeração. Sob o regime de aeração intermitente, a duração total da fase aeróbia foi de 12 horas por batelada. Para o controle dos ciclos de aeração sob o regime intermitente, foi utilizado um temporizador analógico Foxlux, modelo FX TBA.

As condições operacionais aplicadas aos biorreatores R1 e R2 entre as fases II e VI são detalhadas no QUADRO 3.5.

QUADRO 3.5 – CONDIÇÕES PARA AS FASES OPERACIONAIS II A VI

Fase	Duração (d)	Substrato afluente	CV NAT (mg N L ⁻¹ .d ⁻¹)	NAT afluente (mg N L ⁻¹)	TDH (d)	Regime de aeração/ duração da fase aeróbia
II	84	Lixiviado diluído de aterro sanitário ^(b)	100	400	4	Contínuo / 20 horas
III	36	Lixiviado diluído de aterro sanitário ^(b)	80	300		Contínuo / 20 horas
IV	93	Lixiviado diluído de aterro sanitário ^(b)	100	400		Intermitente / 12 horas
V	67	Lixiviado diluído de aterro sanitário, biomassa bioaumentada (R2)	100	400		Intermitente / 12 horas
VI	36	Lixiviado diluído de aterro sanitário, biomassa bioaumentada (R2)	100	200	2	Intermitente / 12 horas

FONTE: a autora (2024)

NOTA: (a) o lixiviado foi diluído com água de torneira; CV: carga volumétrica; NAT: nitrogênio amoniacal total; N: nitrogênio; TDH: tempo de detenção hidráulica.

A escolha de tempos de detenção hidráulica (TDH) de 4 dias e, posteriormente, 2 dias, foi motivada por limitações operacionais e logísticas intrínsecas à realização do estudo. Reduzir o TDH, embora pudesse aproximar os parâmetros operacionais aos observados em estações de tratamento em escala plena, demandaria grandes volumes de lixiviado. Entretanto, para o desenvolvimento desta pesquisa, a coleta e o armazenamento de grandes quantidades de lixiviado seriam inviáveis devido à disponibilidade limitada de material e restrições de espaço. Alternativamente, a construção de biorreatores menores reduziria o volume necessário para operação diária e permitiria a aplicação de TDH mais curtos. Por outro lado, poderia comprometer a obtenção da quantidade suficiente de efluente e de biomassa para a realização de análises laboratoriais representativas.

Assim, a configuração adotada, com dois biorreatores com capacidade de 2,5 L e TDH entre 2 dias e 4 dias, foi definida para equilibrar a viabilidade operacional com a obtenção consistente de dados, garantindo a operação em longo prazo e o alcance dos objetivos experimentais. Os TDH avaliados na pesquisa também foram selecionados de acordo com recomendações apresentadas por Al-Hazmi e colaboradores (2023), que indicam que TDH entre 2 dias e 5 dias são adequados para sistemas operados com biomassa em suspensão e aplicados à

remoção de nitrogênio amoniacal via nitrificação, desnitrificação e processo *anammox* simultâneos.

Para o monitoramento dos sistemas aplicados à remoção autotrófica do nitrogênio amoniacal do lixiviado de aterro sanitário, foram coletadas periodicamente amostras do afluente e efluente dos biorreatores R1 e R2. A partir destas amostras, foram determinados os parâmetros apresentados no QUADRO 3.6.

QUADRO 3.6 – PARÂMETROS PARA MONITORAMENTO DO AFLUENTE E EFLUENTE DOS BIORREATORES R1 E R2

Parâmetro	Método	Referência	Código do método
Alcalinidade total	Potenciométrico	Ripley, Boyle e Converse (1986)	-
Condutividade ^(a)	Condutimétrico	Rice <i>et al.</i> - Editores (2012)	2510
DQO	Refluxo fechado – Colorimétrico		5220 D
NAT	Titulométrico		4500-NH3 F
Nitrato	2,6-Dimetilfenol - Espectrométrico	Ramaswami <i>et al.</i> (2017)	DIN 38405-9
Nitrito	Colorimétrico	Rice <i>et al.</i> - Editores (2012)	4500-NO ₂ ⁻ B
Nitrogênio total	Persulfato		4500-N C
Ortofosfato ^(a)	Ácido ascórbico		4500-P E
pH	Potenciométrico		4500 H+
Salinidade ^(a)	Condutividade elétrica		2520 B

FONTE: a autora (2024)

NOTA: (a) parâmetros determinados apenas para o afluente dos biorreatores.

Com base nos resultados para a concentração do nitrogênio amoniacal total (NAT), temperatura e pH das amostras de afluente e efluente dos biorreatores R1 e R2, a concentração de amônia livre (NH₃) foi estimada por meio da Equação 3.5 (Anthonisen *et al.*, 1976):

$$\text{NH}_3 \text{ (mg N L}^{-1}\text{)} = \frac{\text{NAT (mg N L}^{-1}\text{)} \times 10^{\text{pH}}}{e^{\left(\frac{6344}{273 + T \text{ (}^\circ\text{C)}}\right)}} \quad (3.5)$$

A partir das concentrações de NAT, nitrato, nitrito, nitrogênio inorgânico, nitrogênio total (NT), demanda química de oxigênio (DQO) e alcalinidade total (AT), foram determinados os seguintes parâmetros indicadores da eficiência e estabilidade do tratamento do lixiviado de aterro sanitário: eficiência de remoção do

NAT (ER_{NAT} , Equação 3.6); eficiência de remoção do nitrogênio inorgânico (ER_{NI} , Equação 3.7); eficiência de remoção do nitrogênio total (ER_N , Equação 3.8); percentagem de acúmulo do nitrito (PAN, Equação 3.9); eficiência de remoção da DQO (ER_{DQO} , Equação 3.10); eficiência de consumo da alcalinidade total (ER_{AT} , Equação 3.11) e taxa de remoção do NAT (TR_{NAT} , Equação 3.12).

$$ER_{NAT} (\%) = \frac{\text{NAT afluente (mg N L}^{-1}) - \text{NAT efluente (mg N L}^{-1})}{\text{NAT afluente (mg N L}^{-1})} \times 100 \quad (3.6)$$

$$ER_{NI} (\%) = \frac{(\text{NAT} + \text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-) \text{ afluente (mg N L}^{-1}) - (\text{NAT} + \text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-) \text{ efluente (mg N L}^{-1})}{(\text{NAT} + \text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-) \text{ afluente (mg N L}^{-1})} \times 100 \quad (3.7)$$

$$ER_{NT} (\%) = \frac{\text{NT afluente (mg N L}^{-1}) - \text{NT efluente (mg N L}^{-1})}{\text{NT afluente (mg N L}^{-1})} \times 100 \quad (3.8)$$

$$\text{PAN} (\%) = \frac{\text{NO}_2^- \text{ efluente (mg N L}^{-1}) - \text{NO}_2^- \text{ afluente (mg N L}^{-1})}{(\text{NO}_3^- \text{ efluente} - \text{NO}_3^- \text{ afluente) (mg N L}^{-1}) + (\text{NO}_2^- \text{ efluente} - \text{NO}_2^- \text{ afluente) (mg N L}^{-1})} \times 100 \quad (3.9)$$

$$ER_{DQO} (\%) = \frac{\text{DQO afluente (mg L}^{-1}) - \text{DQO efluente (mg L}^{-1})}{\text{DQO afluente (mg L}^{-1})} \times 100 \quad (3.10)$$

$$ER_{AT} (\%) = \frac{\text{AT afluente (mg L}^{-1}) - \text{AT efluente (mg L}^{-1})}{\text{AT afluente (mg L}^{-1})} \times 100 \quad (3.11)$$

$$TR_{NAT} (\text{mg N L}^{-1} \text{ d}^{-1}) = \frac{\text{NAT afluente (mg N L}^{-1}) - \text{NAT efluente (mg N L}^{-1})}{\text{TDH (d)}} \quad (3.12)$$

Para avaliar as propriedades físicas do lodo inoculado aos biorreatores, as concentrações de sólidos suspensos totais (SST) e sólidos suspensos voláteis (SSV) do licor misto foram determinadas periodicamente, segundo procedimento padronizado (Rice *et al.* – Ed., 2012, método 2540). A partir dos resultados para a concentração de SST foi calculado o índice volumétrico de lodo (IVL), conforme procedimento descrito por Torfs e colaboradores (2016). A Equação 3.13 foi utilizada para o cálculo do IVL:

$$\text{IVL (mL g}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Volume do lodo após 30 minutos de sedimentação (mL L}^{-1}\text{)}}{\text{Concentração de SST do licor misto (g L}^{-1}\text{)}} \quad (3.13)$$

Para estimar a idade do lodo (IL) dos biorreatores R1 e R2, foi utilizada a Equação 3.14, adaptada de Tchobanoglous, Burton e Stensel (2003):

$$\text{IL (d)} = \frac{\text{Volume útil do biorreator (L)} \times \text{SST do licor misto (g L}^{-1}\text{)}}{\text{Vazão efluente (L d}^{-1}\text{)} \times \text{SST do efluente (g L}^{-1}\text{)}} \quad (3.14)$$

Para avaliar a maturação dos flocos biológicos do lodo dos biorreatores R1 e R2, foram realizadas análises mensais de microscopia óptica de campo claro. Para o preparo das amostras, uma gota do licor misto de cada biorreator foi colocada sobre uma lâmina de vidro e visualizada em microscópio óptico Olympus BX41. Os protozoários e metazoários visualizados nas amostras foram contados e classificados em grupos funcionais.

Para avaliar a formação e a evolução do arranjo estrutural microbiano, amostras de lodo dos biorreatores também foram processadas para análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e de Transmissão (MET).

3.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

Inicialmente, alíquotas de aproximadamente 1 mL de licor misto foram coletadas dos biorreatores e centrifugadas a 3400 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e a biomassa foi ressuspensa em tampão de fosfato 0,1 M (pH 7,4) por 10 minutos. As amostras foram fixadas por imersão em solução de glutaraldeído 2,5% v/v durante 2 horas em temperatura ambiente. A seguir, as amostras foram imersas em tampão de fosfato 0,1 M (pH 7,4) por 30 minutos para a lavagem, que foi repetida três vezes. As amostras lavadas foram imersas em solução de tetróxido de ósmio (10 g L⁻¹, dissolvido em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M) por 1 hora, para pós-fixação. Então, as amostras foram novamente lavadas com tampão de fosfato 0,1 M por três vezes de 30 minutos.

Após a lavagem, as amostras foram desidratadas por imersão em concentrações crescentes de solução de etanol (30%, 50%, 70%, 95% e 100%, percentagens em v/v). As amostras ficaram imersas durante 10 minutos em cada

solução de etanol entre 30% e 95%, e durante 2 vezes de 10 minutos na solução de etanol absoluto (100%). Em seguida, as amostras foram metalizadas com ouro e visualizadas sob microscópio eletrônico de varredura TESCAN, modelo VEGA3. A metalização, a visualização das amostras e a captura das imagens foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná (CME/UFPR, Curitiba, Paraná).

3.3.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Inicialmente, uma alíquota de aproximadamente 1 mL do licor misto do biorreator R1 foi centrifugada a 3400 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e a biomassa foi ressuspensa em tampão cacodilato de sódio 0,1 M. A amostra foi novamente centrifugada, sob as mesmas condições anteriores, e o sobrenadante descartado. A seguir, a biomassa foi fixada por imersão em solução de Karnovsky modificada (glutaraldeído 2,5% v/v, paraformaldeído 2% m/v e tampão cacodilato de sódio 0,1 M) durante 3 horas em temperatura ambiente.

As etapas seguintes foram realizadas pela equipe da plataforma de Microscopia Eletrônica do Instituto Carlos Chagas/Fundação Oswaldo Cruz (ICC/Fiocruz, Curitiba, Paraná). A amostra fixada foi lavada com tampão cacodilato de sódio 0,1 M e imersa em solução de tetróxido de ósmio (10 g/L) por 45 minutos, para a pós-fixação. Em seguida, a amostra foi novamente lavada com tampão cacodilato de sódio 0,1 M e desidratada mediante imersão por 10 minutos em concentrações crescentes de solução de acetona (70%, 80%, 90%, 95% e 100%).

Após a desidratação do material, foi realizada a embebição em resina EPON™. A seguir, foi realizada a ultramicrotomia para obtenção de cortes ultrafinos. O material foi submetido à contrastação com acetato de uranila e citrato de chumbo e finalmente visualizado em microscópio eletrônico de transmissão Jeol, modelo JEM-1400Plus.

3.3.3 Análise do microbioma dos biorreatores

Durante a operação dos biorreatores E1, R1 e R2, foram coletadas alíquotas de aproximadamente 10 mL do licor misto para a análise do microbioma em diferentes fases operacionais (QUADRO 3.7). Em função de limitações técnicas,

apenas uma replicata foi processada para cada amostra, o que não permitiu a realização posterior de análises estatísticas comparativas entre as amostras para os resultados do sequenciamento de *amplicons* do gene procariótico 16S do RNA ribossomal (rRNA).

QUADRO 3.7 – AMOSTRAS PROCESSADAS PARA ANÁLISE DO MICROBIOMA EM DIFERENTES FASES OPERACIONAIS

Amostra	Dia de operação e fase em que a amostra foi coletada
Biorreator E1	390º dia – encerramento de operação de E1 para a produção de biomassa para o bioaumento
R1 fase IV	493º dia, final da fase IV, previamente à realização do bioaumento
R2 fase IV	
R1 fase VI	593º dia, final da fase VI, após a realização do bioaumento e quando do encerramento de operação de R1 e R2
R2 fase VI	

FONTE: a autora (2024)

As amostras de licor misto foram centrifugadas a 3400 *g*, por 10 minutos. Visando à remoção de substâncias potencialmente inibidoras das etapas subsequentes, o sobrenadante foi descartado e o material precipitado e aderido ao fundo do tubo (*pellet*) foi ressuscitado e lavado em tampão salino de fosfato estéril (PBS, pH 7,4). Finalmente, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi mantido em *freezer* a -20 °C até o procedimento para a extração do DNA e o sequenciamento de *amplicons* do gene procariótico 16S rRNA.

Após a lavagem, as amostras congeladas, contendo aproximadamente 200 mg de lodo centrifugado, foram enviadas para sequenciamento de *amplicons* do gene 16S rRNA pela Neopropecta Microbiome Technologies (Florianópolis, Santa Catarina). O processamento das amostras e o sequenciamento foram realizados de acordo com procedimento apresentado por Christoff e colaboradores (2017).

O preparo das bibliotecas seguiu um protocolo proprietário (Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil). As regiões hipervariáveis três a quatro (V3-V4) do gene 16S rRNA foram amplificadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR) com os *primers* 341F (CCTACGGGRSGCAGCAG) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT). A seguir, os *amplicons*, isto é, os produtos da PCR, foram preparados em bibliotecas para sequenciamento em plataforma MiSeq™ (Illumina Inc., EUA), em formato *paired-end*, utilizando os kits V3 com 600 ciclos ou V2 com 500 ciclos.

Após o sequenciamento, os dados brutos foram submetidos à checagem da qualidade, remoção de adaptadores, pareamento de *reads*, correção de erros e

remoção de quimeras utilizando o *pipeline* Sentinel. A qualidade dos dados foi avaliada com base no parâmetro Phred por meio do programa FastQC v.0.11.8 (Andrews, 2010). Os dados *paired-end* foram reunidos utilizando pandaseq v.2.11 (Masella *et al.*, 2012). A seguir, os *primers* adaptadores e as sequências com baixa qualidade (Phred < 20) foram removidos por meio de *software* proprietário (Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil). Para a remoção de quimeras, as sequências com 100% de identidade foram agrupadas, e os grupos contendo menos de 5 sequências foram excluídos das análises subsequentes (Smyth *et al.*, 2010).

Posteriormente, as sequências processadas foram agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (OTU), definidas com base em um limiar de similaridade de 97%, e submetidas à classificação taxonômica. A classificação foi realizada utilizando o programa BLASTn v.2.6.0+ (Altschul *et al.*, 1990), com um banco de dados proprietário de sequências do gene 16S rRNA (NeoRefdb, Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil) como referência. Sequências com limiar de identidade igual ou superior a 99% em relação ao banco de dados de referência receberam atribuição taxonômica. A abundância relativa de cada grupo taxonômico foi determinada como a proporção percentual de sequências de cada OTU em relação ao total de sequências analisadas.

As sequências brutas geradas pelo sequenciamento de *amplicons* do gene 16S rRNA foram armazenadas no banco de dados *Sequence Read Archive* (SRA) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), sob o número de acesso PRJNA1224416.

3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS E PRODUÇÃO DE GRÁFICOS

As análises estatísticas e os gráficos apresentados neste trabalho foram produzidos mediante aplicação do *software* R (R Core Team, 2023).

4 RESULTADOS

Inicialmente, são apresentados os resultados da caracterização do lodo e do lixiviado de aterro sanitário e, em seguida, os resultados associados à produção de biomassa para o bioaumento. Por fim, após a implementação de diferentes estratégias da engenharia de microbiomas, são apresentados os resultados da operação dos biorreatores bem como da eficiência e estabilidade dos bioprocessos de remoção do nitrogênio amoniacal do lixiviado de aterro sanitário.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO LODO E DO LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO

A primeira etapa desta pesquisa envolveu a coleta e caracterização do lodo aeróbio e do lixiviado de aterro sanitário. O lodo foi utilizado como inóculo em três biorreatores (E1, R1 e R2) aplicados à remoção autotrófica do nitrogênio amoniacal, com foco no tratamento do lixiviado.

4.1.1 Caracterização do lodo aeróbio utilizado como inóculo

Os resultados para a concentração de sólidos totais (ST) e sólidos suspensos totais (SST) do lodo inoculado nos biorreatores E1, R1 e R2 são apresentados na TABELA 4.1.

TABELA 4.1 – RESULTADOS PARA A CONCENTRAÇÃO DE ST E SST DO LODO

ST ± d. p. (g L ⁻¹)	SST ± d. p. (g L ⁻¹)
12,28 ± 0,16	11,27 ± 0,17

FONTE: a autora (2024)

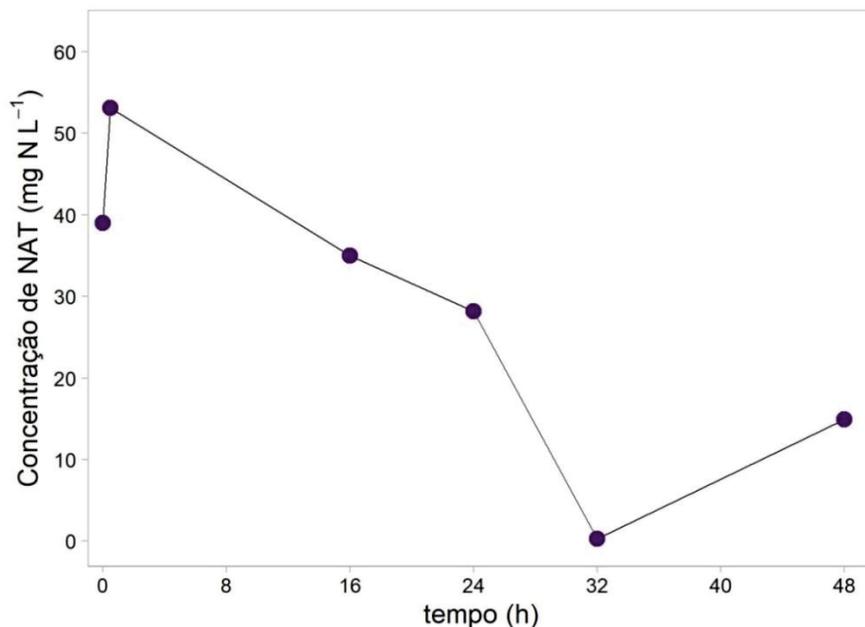
NOTA: d. p.: desvio-padrão.

A concentração de SST do lodo aeróbio foi utilizada como base para a determinação do índice volumétrico de lodo após 30 minutos de sedimentação (IVL₃₀), cujo valor resultou em 81 mL g⁻¹. Segundo Torfs e colaboradores (2016), valores típicos de IVL₃₀ para lodos ativados com boa sedimentabilidade variam entre 50 e 400 mL g⁻¹. Salienta-se que a sedimentabilidade do lodo apresenta relação inversamente proporcional ao valor do IVL₃₀. Dessa forma, o resultado obtido para o IVL₃₀ do lodo aeróbio, que se encontra na faixa do intervalo típico para lodos

ativados, sugere que a biomassa apresentou excelente capacidade de sedimentação. Isso é relevante para os sistemas de tratamento porque lodos com boa sedimentabilidade tendem a ter maior eficiência na retenção de biomassa nos biorreatores, reduzindo a saída de sólidos no efluente. Portanto, o valor obtido indica que o lodo inoculado aos biorreatores E1, R1 e R2 apresentava condições adequadas para suportar os processos de tratamento sem comprometer a clarificação, contribuindo para a eficiência do sistema.

Além da sedimentabilidade, o lodo aeróbio recém-coletado foi avaliado previamente à inoculação nos biorreatores quanto à atividade nitrificante. Este teste foi essencial para avaliar a capacidade do lodo para a nitrificação, principal bioprocessos utilizado durante o tratamento do lixiviado. A curva de consumo do nitrogênio amoniacal total (NAT) em função do tempo de incubação do lodo, produzida com base nos resultados do ensaio em batelada para a avaliação da atividade nitrificante, é apresentada na FIGURA 4.1.

FIGURA 4.1 – CONSUMO DO NAT EM FUNÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO



FONTE: a autora (2024)

A concentração do NAT após 30 minutos de incubação do lodo aeróbio aumentou de 40 mg N L⁻¹ para aproximadamente 53 mg N L⁻¹ (FIGURA 4.1). O aumento da concentração do NAT durante o período inicial da incubação do lodo foi provavelmente devido à liberação de nitrogênio amoniacal no meio de cultura, resultante do decaimento microbiano.

A eficiência de remoção do NAT foi de 27,7%, após 24 horas de incubação do lodo aeróbio, e 61,8%, após 48 horas, enquanto a atividade nitrificante específica resultou em média de $0,16 \text{ mg N h}^{-1} \text{ g}_{\text{SST}}^{-1}$. Observa-se que o lodo apresentou atividade de nitrificação, embora fosse originalmente aplicado para a remoção de carbono orgânico de esgoto sanitário, assegurando que continha biomassa ativa para o tratamento pretendido, com presença de populações microbianas nitrificantes. A partir destes resultados, o lodo aeróbio foi inoculado nos biorreatores E1, R1 e R2 visando ao aumento da população microbiana nitrificante.

4.1.2 Caracterização do lixiviado de aterro sanitário

Foram realizadas duas campanhas para a coleta do lixiviado de aterro sanitário, em março e junho de 2023. As características físicas e químicas determinadas para o lixiviado para cada coleta são apresentadas na TABELA 4.2.

TABELA 4.2 - CARACTERÍSTICAS DETERMINADAS PARA O LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO

Parâmetro	Unidade	Coleta 03/2023 média \pm d. p.	Coleta 06/2023 média \pm d. p.
Alcalinidade total (AT)	$\text{mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$	2819 ± 24	3589 ± 31
Alcalinidade parcial (AP)	$\text{mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$	2528 ± 56	3006 ± 154
Alcalinidade intermediária (AI)	$\text{mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$	291 ± 32	582 ± 126
Condutividade	mS cm^{-1} a 25°C	$11,80 \pm 0,04$	$13,81 \pm 0,06$
DBO ₅	$\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$	400 ± 0	333 ± 58
DQO	$\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$	1014 ± 8	1277 ± 0
Nitrogênio total (NT)	mg N L^{-1}	$675,1 \pm 1,6$	$886,3 \pm 1,9$
NAT	mg N L^{-1}	$666,7 \pm 0,0$	$840,8 \pm 17,2$
Nitrato	mg N L^{-1}	$4,8 \pm 0,1$	$7,3 \pm 0,1$
Nitrito	mg N L^{-1}	$< 0,1$	$< 0,1$
Nitrogênio orgânico	mg N L^{-1}	$3,6 \pm 1,6^{(a)}$	$38,1 \pm 17,3^{(a)}$
Ortofosfato (PO_4^{-3})	mg P L^{-1}	$0,4 \pm 0,0$	$5,8 \pm 0,0$
pH	-	$8,01 \pm 1,3\%^{(b)}$	$8,33 \pm 3,5\%^{(b)}$
Salinidade	-	$3,8 \pm 0,0$	$4,7 \pm 0,0$
DBO ₅ /DQO	-	$0,39 \pm 0,00^{(a)}$	$0,26 \pm 0,05^{(a)}$
DBO ₅ /NAT	$\text{mg O}_2/\text{mg N}$	$0,60 \pm 0,00^{(a)}$	$0,40 \pm 0,07^{(a)}$

FONTE: a autora (2024)

NOTA: d. p.: desvio-padrão; (a) calculado por meio de fórmulas de propagação de erros conforme Vuolo (1992); (b) o erro associado ao pH foi calculado como coeficiente de variação devido à escala logarítmica desse parâmetro.

Com exceção da demanda bioquímica de oxigênio (DBO), os resultados para todos os parâmetros avaliados apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre as duas coletas (teste de Mann-Whitney, $\alpha = 0,1$). Em geral, o lixiviado coletado em junho de 2023 apresentou concentrações mais elevadas de

nutrientes, como o nitrogênio em seus diversos estados de oxidação (NAT, nitrato e nitrogênio orgânico), fósforo e sais dissolvidos em comparação à campanha anterior.

Em ambas as campanhas, a concentração de alcalinidade total (AT) do lixiviado foi elevada, com valores de 2819 mg CaCO₃ L⁻¹ para a coleta de março e 3589 mg CaCO₃ L⁻¹ para junho de 2023. Em função das elevadas concentrações de alcalinidade parcial (AP), 2528 mg CaCO₃ L⁻¹, para a primeira coleta, e 3006 mg CaCO₃ L⁻¹, para a segunda, pode-se afirmar que a maior fração da AT do lixiviado é atribuída aos íons bicarbonato.

O lixiviado de aterro sanitário geralmente apresenta elevadas concentrações de alcalinidade total e parcial, conforme resultados corroborados por outros estudos (Baettker *et al.*, 2020; Latocheski, 2020; Morais, 2022). Essas condições sugerem que o lixiviado pode favorecer bioprocessos que dependam fortemente da manutenção do pH, como a nitrificação, pois o bicarbonato atua como tampão, estabilizando o pH nos sistemas de tratamento. Além disso, os íons bicarbonato, que contribuem para a elevada concentração da alcalinidade, podem servir também como fonte de carbono inorgânico para os bioprocessos autotróficos.

Por sua vez, a alcalinidade intermediária (AI) reflete indiretamente a concentração de ácidos orgânicos e somada à alcalinidade parcial resulta na alcalinidade total. Para este parâmetro, os valores obtidos de 291 mg CaCO₃ L⁻¹, para a primeira coleta, e 582 mg CaCO₃ L⁻¹, para a segunda, sugerem contribuição limitada dos ácidos orgânicos para a AT, característica de lixiviados estabilizados.

Em ambas as coletas, o lixiviado também apresentou valores elevados para a salinidade (3,8 para a coleta de março e 4,7 para a de junho de 2023) e para a condutividade (11,80 mS cm⁻¹ para março e 13,81 mS cm⁻¹ para junho de 2023). Estes parâmetros indicam a presença de íons e sais dissolvidos em grandes quantidades, o que pode comprometer a eficiência dos bioprocessos de remoção do nitrogênio amoniacal (Zhang, M. *et al.*, 2023; Wu; Lai; Zhao, 2024).

Além dos parâmetros apresentados, a relação DBO₅/DQO é frequentemente utilizada para caracterizar lixiviados e estimar sua biodegradabilidade (Ehrig, 1989; Renou *et al.*, 2008). Valores para a relação DBO₅/DQO iguais ou superiores a 0,4 são característicos de lixiviados de aterros considerados “jovens”, ricos em matéria orgânica biodegradável. Por outro lado, valores iguais ou inferiores a 0,1 são atribuídos a lixiviados estabilizados, de aterros “velhos”. O baixo valor da DBO₅ em

relação à DQO sugere que a maior parte da matéria orgânica biodegradável do lixiviado já foi consumida, restando a matéria orgânica recalcitrante (Ehrig, 1989).

De acordo com Renou e colaboradores (2008), o valor médio da relação DBO_5/DQO para a coleta de março de 2023 (0,39) indica que o lixiviado apresentava-se em fase de biodegradabilidade intermediária. Entretanto, a relação DBO_5/DQO obtida para a segunda coleta, de junho de 2023, foi de 0,26. Este valor indica que a matéria orgânica era majoritariamente recalcitrante à biodegradação e que o lixiviado da segunda campanha apresentava características similares às de lixiviados estabilizados.

O valor da razão entre a DBO_5 e a concentração do NAT (DBO_5/NAT) foi de 0,60 mg O_2 /mg N, para a primeira coleta, e de 0,40 mg O_2 /mg N, para a segunda. Esta relação é utilizada para avaliar a proporção entre as quantidades de carbono orgânico biodegradável e de nitrogênio disponíveis para a microbiota do tratamento. Para ambas as campanhas, o valor da relação DBO_5/NAT foi menor do que o valor limite de 5,8 mg O_2 /mg N, o que indica a baixa disponibilidade de carbono biodegradável em comparação à de nitrogênio (Bonassa *et al.*, 2021).

Devido à limitada concentração de carbono orgânico em relação ao nitrogênio amoniacal, os bioprocessos de remoção do nitrogênio dependentes do metabolismo microbiano heterotrófico, como a desnitrificação, são desfavoráveis para lixiviados com características semelhantes às deste estudo (Bonassa *et al.*, 2021). Assim, com base nas características físicas e químicas do lixiviado utilizado nesta pesquisa, os bioprocessos autotróficos são mais adequados para a remoção do nitrogênio, pois não requerem a adição de fontes externas de carbono orgânico.

4.2 PRODUÇÃO DE BIOMASSA ENRIQUECIDA PARA A REMOÇÃO AUTOTRÓFICA DE NITROGÊNIO AMONIACAL

Para a produção de biomassa destinada ao bioaumento, uma das estratégias da engenharia de microbiomas investigadas nesta pesquisa, foi realizado o enriquecimento de micro-organismos a partir do lodo aeróbio. Ao biorreator E1, utilizado para o enriquecimento, foi alimentado meio mineral sem carbono orgânico e com ureia como única fonte de nitrogênio. O processo foi realizado sob baixas concentrações de oxigênio dissolvido ($< 1 \text{ mg } O_2 \text{ L}^{-1}$) e dividido em duas etapas, A e B, que diferiram principalmente em relação à concentração de nitrogênio orgânico do

substrato afluente (TABELA 4.3). As condições experimentais foram estabelecidas visando ao enriquecimento de bactérias *comammox* do gênero *Nitrospira*. Estas bactérias apresentam atividade ureolítica e são adaptadas a baixas concentrações de nitrogênio ($< 50 \text{ mg N L}^{-1}$) e de oxigênio dissolvido ($< 1 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$) (Latocheski; Rocha; Braga, 2022).

TABELA 4.3 – CARACTERÍSTICAS DO AFLUENTE ALIMENTADO AO BIORREATOR E1

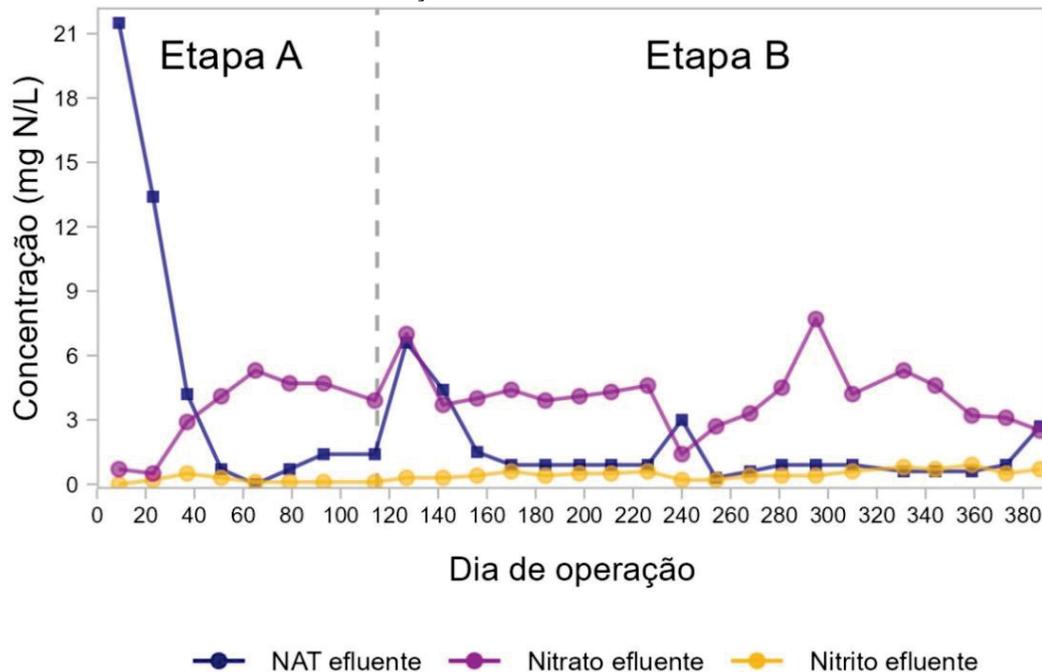
Parâmetro do afluente	Unidade	Resultados (média \pm d. p.)	
		Etapa A ^(a)	Etapa B ^(b)
NAT	mg N L^{-1}	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
Nitrato	mg N L^{-1}	$0,3 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$
Nitrito	mg N L^{-1}	$< 0,1$	$< 0,1$
Nitrogênio total	mg N L^{-1}	$13,1 \pm 0,8$	$24,1 \pm 1,3$
pH	-	$7,90 \pm 0,09$	$7,59 \pm 0,13$

FONTE: a autora (2024)

NOTA: d. p.: desvio-padrão; NAT: nitrogênio amoniacal total; (a) resultados obtidos para o período entre o primeiro e o 114º dia de operação; (b) resultados obtidos a partir do 115º dia de operação.

O enriquecimento dos micro-organismos do lodo aeróbio inoculado no biorreator E1 resultou na conversão do nitrogênio orgânico em nitrogênio amoniacal, além da produção de nitrito e nitrato, produtos das reações bioquímicas associadas à nitrificação (FIGURA 4.2).

FIGURA 4.2 – CONCENTRAÇÃO EFLUENTE DE NAT, NITRATO E NITRITO AO LONGO DA OPERAÇÃO DO BIORREATOR E1

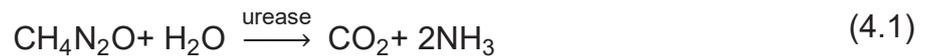


—●— NAT efluente —●— Nitrato efluente —●— Nitrito efluente

FONTE: a autora (2024)

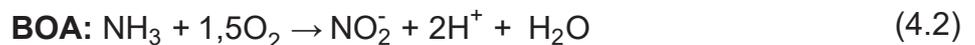
NOTA: NAT: nitrogênio amoniacal total.

Nos primeiros 30 dias de operação, foi observado acúmulo do nitrogênio amoniacal no biorreator E1, cuja concentração no efluente foi superior a 12 mg N L^{-1} (FIGURA 4.2). Como o substrato alimentado a E1 não continha nitrogênio amoniacal (TABELA 4.3), é provável que o acúmulo tenha ocorrido devido à conversão da ureia ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) em amônia (NH_3) por meio de uma reação microbiana catalisada pela enzima urease (Equação 4.1).



O acúmulo do nitrogênio amoniacal no biorreator E1, observado nos primeiros 30 dias do enriquecimento, pode ser explicado pela aclimação da microbiota, em particular das bactérias oxidantes da amônia, às novas condições operacionais. Vale destacar que o lodo aeróbio inoculado em E1 era originalmente destinado à oxidação do carbono orgânico, o que possivelmente exigiu a adaptação funcional da comunidade microbiana para a remoção autotrófica do nitrogênio.

Após 40 dias de operação, a concentração do nitrogênio amoniacal no efluente do biorreator E1 diminuiu para 4 mg N L^{-1} , aproximadamente. Simultaneamente, foi observada a produção e o acúmulo de nitrato (FIGURA 4.2). Este padrão sugere que parte do nitrogênio amoniacal produzido pela hidrólise da ureia (Equação 4.1) foi convertida em nitrito (NO_2^-) por bactérias oxidantes da amônia (BOA) (Equação 4.2) e, em seguida, em nitrato (NO_3^-) por bactérias oxidantes do nitrito (BON) (Equação 4.3).

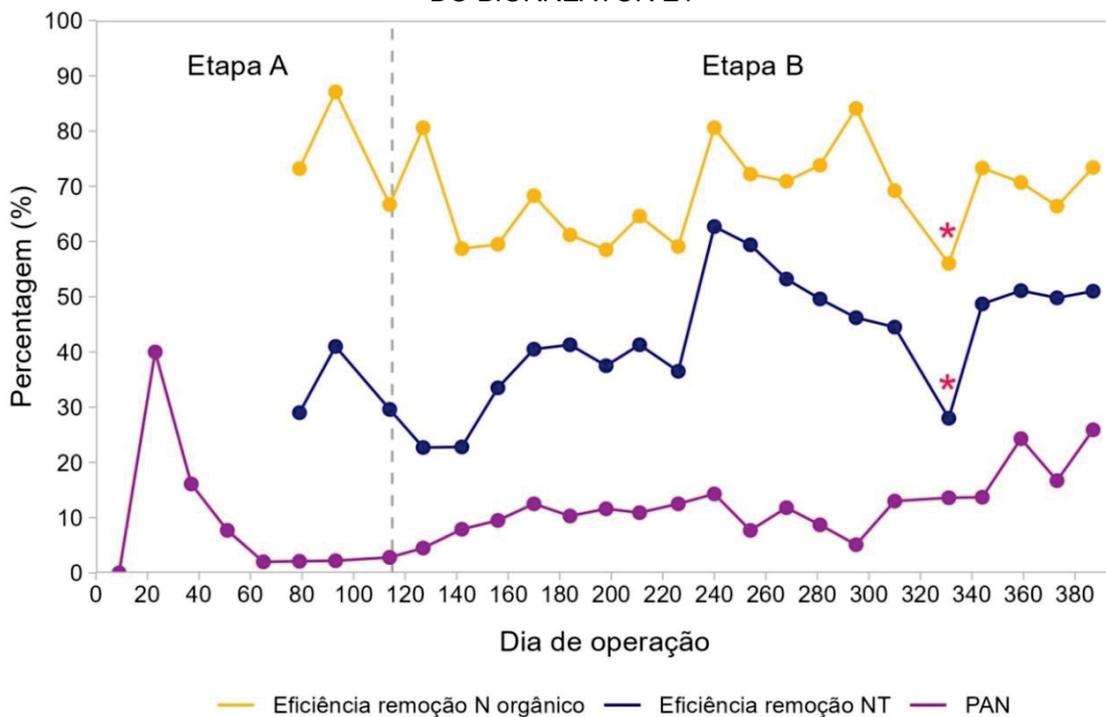


Após o aumento da concentração do nitrogênio orgânico no substrato alimentado ao biorreator, de 10 para 20 mg N L^{-1} na etapa B, as concentrações de nitrogênio amoniacal e de nitrato apresentaram picos (FIGURA 4.2), provavelmente em função do estresse da microbiota com a alteração das condições operacionais. Contudo, depois de aproximadamente 20 dias do início da etapa B, as concentrações de nitrogênio amoniacal e nitrato no efluente de E1 estabilizaram, indicando o restabelecimento do equilíbrio das reações bioquímicas associadas à

nitrificação. A concentração do nitrito no efluente, por outro lado, permaneceu abaixo de 1 mg N L^{-1} durante toda a operação (FIGURA 4.2), o que indica que esse íon foi quase completamente consumido pelas BON ou por outros micro-organismos.

Os resultados para os parâmetros indicadores da eficiência e estabilidade da remoção do nitrogênio (FIGURA 4.3) sugerem que o enriquecimento dos micro-organismos nitrificantes da biomassa foi bem-sucedido. A eficiência de remoção do nitrogênio orgânico variou entre 56,0% e 87,1%, com média de 69,5%. Por sua vez, a eficiência de remoção do nitrogênio total (NT), que inclui o nitrogênio orgânico e o inorgânico, variou de 22,7%, durante a aclimação da microbiota, a 56,0%, com média de 41,8%. A remoção do nitrogênio orgânico e do nitrogênio total (orgânico, amoniacal, nitrito e nitrato) pode ser majoritariamente atribuída à atividade metabólica da microbiota presente no biorreator E1 durante o enriquecimento.

FIGURA 4.3 – EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DO NITROGÊNIO E PAN AO LONGO DA OPERAÇÃO DO BIORREATOR E1



FONTE: a autora (2024)

NOTA: NT: nitrogênio total; PAN: porcentagem de acúmulo do nitrito; os asteriscos (*) indicam a redução das eficiências de remoção do nitrogênio orgânico e do NT devido à ausência de alimentação do biorreator E1 na semana precedente à coleta e análise do efluente.

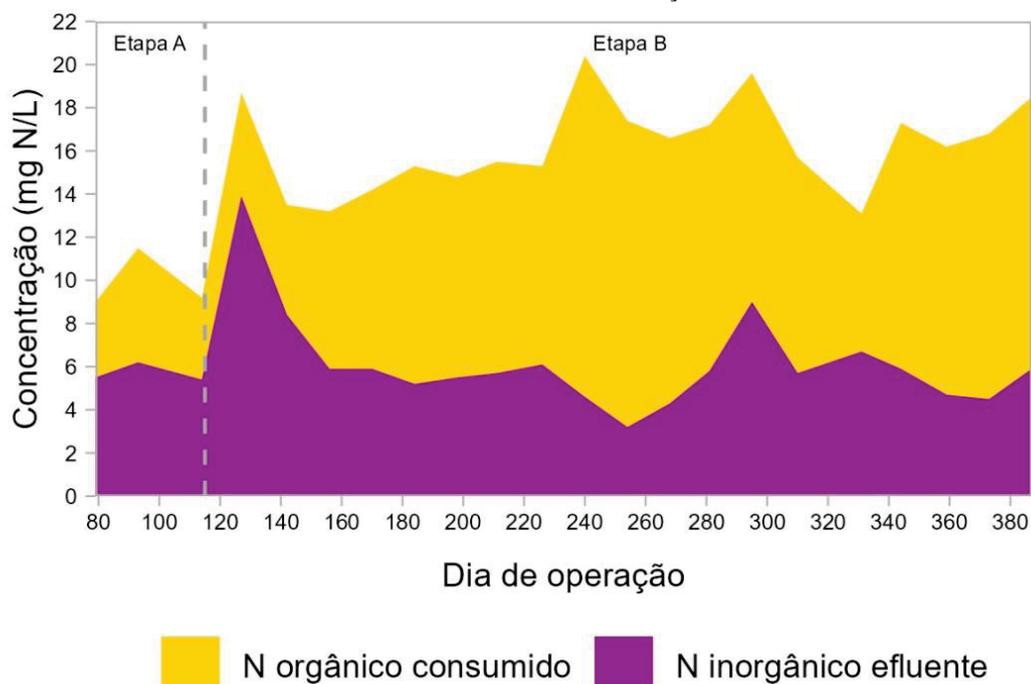
Na etapa A, com a concentração de 10 mg N L^{-1} de nitrogênio total afluente, a porcentagem de acúmulo do nitrito (PAN) aumentou gradualmente, atingindo o pico de 40% após 23 dias. Posteriormente, este valor diminuiu até próximo de zero

após 60 dias, aproximadamente, permanecendo estável até o final da etapa A, no 115º dia de operação (FIGURA 4.3).

Por outro lado, na etapa B, com a concentração do nitrogênio total afluente ajustada para 20 mg N L⁻¹, a PAN aumentou de 4% para 12% ao longo dos primeiros 40 dias (FIGURA 4.3). Após atingir o valor médio de 12%, a PAN manteve-se estável por mais de 170 dias. Contudo, entre o 344º e o 390º dia, a PAN voltou a aumentar e variou entre 14% e 26%. Os baixos valores registrados para a PAN, tanto na etapa A como na B, sugerem que a maior parte do nitrito produzido pelo consórcio microbiano não acumulou significativamente no meio reacional e foi transformada em nitrato, via nitratação pelas BON, ou convertida em outras formas de nitrogênio, como NO, N₂O e N₂, por outros grupos microbianos.

A elevada eficiência de remoção do nitrogênio orgânico (média de 69,5%), combinada com os baixos valores da PAN (média de 11,4%) e as reduzidas concentrações de nitrato produzido (< 8 mg N L⁻¹), sugere que a maior parte do nitrogênio alimentado ao biorreator E1 foi utilizada em processos distintos da nitrificação. Este resultado é corroborado por aqueles apresentados na FIGURA 4.4, que mostram a proporção entre as concentrações de nitrogênio orgânico consumido e nitrogênio inorgânico (NAT, nitrito e nitrato) produzido e acumulado no efluente.

FIGURA 4.4 – CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO ORGÂNICO CONSUMIDO E NITROGÊNIO INORGÂNICO EFLUENTE AO LONGO DA OPERAÇÃO DO BIORREATOR E1



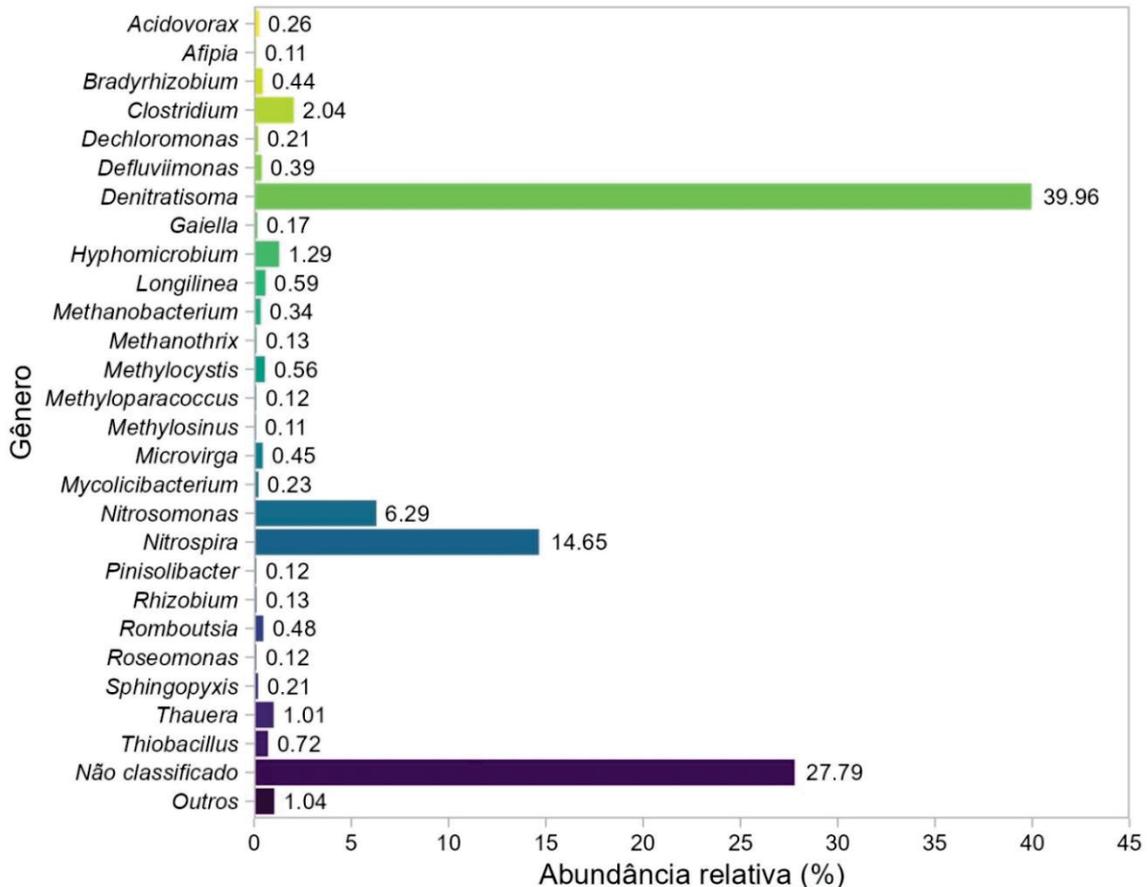
FONTE: a autora (2024)

Na FIGURA 4.4, é possível observar que, a partir do 150º dia de operação, a área correspondente ao nitrogênio inorgânico acumulado no efluente ocupou menos da metade da área associada ao nitrogênio orgânico consumido. Estes resultados indicam que o nitrogênio orgânico do substrato foi destinado apenas em parte à nitrificação, que teria resultado no acúmulo do nitrogênio inorgânico (nitrogênio amoniacal, nitrito e nitrato) no efluente de E1.

Parte do nitrogênio orgânico consumido pode ter sido utilizada em processos distintos da nitrificação, como a assimilação pelas células microbianas e a adsorção nos flocos biológicos do lodo. Além disso, o nitrito e o nitrato produzidos a partir da nitrificação do nitrogênio amoniacal pelas bactérias oxidantes da amônia (BOA) e do nitrito (BON) provavelmente foram consumidos em reações de desnitrificação.

A presença de micro-organismos desnitrificantes foi identificada a partir dos resultados para o sequenciamento do gene procariótico 16S rRNA. A atividade das bactérias desnitrificantes pertencentes a gêneros diversos (FIGURA 4.5) pode ter contribuído para a remoção do nitrogênio na forma gasosa como NO, N₂O e/ou N₂.

FIGURA 4.5 – PRINCIPAIS GÊNEROS MICROBIANOS IDENTIFICADOS NO BIORREATOR E1



FONTE: a autora (2024)

NOTA: os gêneros com abundância relativa inferior a 0,1% foram agrupados na categoria "Outros".

A partir do sequenciamento de segunda geração do gene 16S rRNA, foram identificados 50 gêneros microbianos, que representaram 72,17% das sequências detectadas na biomassa do biorreator E1. Entre eles, 24 gêneros apresentaram abundância relativa inferior a 0,1%, totalizando 1,04% das sequências. Além disso, 27,79% das sequências obtidas não puderam ser classificadas até o nível de gênero (FIGURA 4.5), provavelmente devido à limitação das bases de dados disponíveis para a comparação taxonômica.

Destaca-se a predominância de três gêneros bacterianos: i) *Denitratisoma* (39,96%), ii) *Nitrosomonas* (6,29%) e iii) *Nitrospira* (14,65%), que, em conjunto, somaram 60,9% das sequências identificadas na biomassa de E1 (FIGURA 4.5). Estes gêneros estão associados a bioprocessos essenciais para a remoção do nitrogênio de águas residuárias, como a nitrificação e a desnitrificação. A baixa diversidade observada, com apenas 50 gêneros procarióticos identificados, juntamente com a dominância de apenas três gêneros, reflete o enriquecimento e a seleção de micro-organismos adaptados às condições específicas do biorreator E1.

O gênero bacteriano *Denitratisoma* foi predominante na amostra do biorreator E1 após o enriquecimento, com abundância relativa de aproximadamente 40% (FIGURA 4.5). Este gênero é conhecido por realizar a desnitrificação, utilizando nitrato como acceptor de elétrons e produzindo nitrogênio gasoso (N₂), com acúmulo de nitrito como intermediário (Fahrbach *et al.*, 2006).

Os membros do gênero *Denitratisoma* são heterotróficos e, portanto, requerem compostos orgânicos como fonte de carbono e energia. Embora o meio mineral utilizado para o enriquecimento fosse isento de carbono orgânico, favorecendo populações microbianas autotróficas, o enriquecimento de *Denitratisoma* pode ser explicado pela capacidade deste gênero para utilizar fontes complexas de carbono, como restos celulares provenientes da decomposição microbiana. Este gênero tem sido frequentemente identificado em sistemas autotróficos de remoção de nitrogênio amoniacal, como o biorreator E1, e está associado à utilização da matéria orgânica liberada durante o decaimento celular como substrato para a desnitrificação (Xu *et al.*, 2021; Kang *et al.*, 2023).

Além de *Denitratisoma*, outros gêneros identificados na biomassa do biorreator E1 também podem realizar a desnitrificação em sistemas de tratamento de águas residuárias, como *Acidovorax* (0,26%), *Bradyrhizobium* (0,44%), *Dechloromonas* (0,21%), *Defluviimonas* (0,39%), *Hyphomicrobium* (1,29%), *Thauera*

(1,01%) e *Thiobacillus* (0,72%) (Dueholm *et al.*, 2024). A presença dessas bactérias heterotróficas sugere que a autodigestão da biomassa e o decaimento celular liberam para o meio reacional substrato orgânico em quantidade suficiente para a manutenção desses micro-organismos, aumentando a eficiência de remoção do nitrogênio via desnitrificação em sistemas autotróficos com elevados tempos de retenção de sólidos.

Em adição às bactérias desnitrificantes, os gêneros *Nitrosomonas* e *Nitrospira* também podem ter desempenhado papel fundamental na remoção do nitrogênio no biorreator E1. *Nitrosomonas* foi o único gênero de bactérias oxidantes da amônia (BOA) identificado na biomassa de E1, com abundância relativa de 6,29%. Em contrapartida, *Nitrospira* foi o único gênero de bactérias oxidantes do nitrito (BON) identificado em E1, com abundância relativa de 14,65%.

Ambos os gêneros, *Nitrosomonas* e *Nitrospira*, incluem espécies capazes de hidrolisar ureia (Koops; Pommerening-Röser, 2001; Daims *et al.*, 2015; Koch *et al.*, 2015), que foi o substrato utilizado para o enriquecimento. Portanto, sugere-se que *Nitrosomonas* e *Nitrospira* foram os principais responsáveis pela conversão da ureia em nitrogênio amoniacal e pelo processo de nitrificação autotrófica, resultando na produção de nitrito e nitrato, respectivamente.

Visando ao enriquecimento de bactérias *comammox* do gênero *Nitrospira*, conforme procedimento realizado por Li e colaboradores (2021) e Zhao e colaboradores (2021), nesta pesquisa, a ureia foi utilizada como fonte exclusiva de nitrogênio. Esta abordagem foi baseada na atividade ureolítica desses micro-organismos, cujas espécies candidatas conhecidas até o momento são “*Ca. N. inopinata*”, “*Ca. N. nitrosa*”, “*Ca. N. nitrificans*” e “*Ca. N. kreftii*” (Latocheski; Rocha; Braga, 2022).

Apesar da utilização de ureia como substrato seletivo para promover o enriquecimento das bactérias *comammox*, os resultados obtidos pelo sequenciamento de *amplicons* do gene 16S rRNA demonstraram a ausência desses organismos na biomassa do biorreator E1. Ao final do processo de enriquecimento, não foram detectadas sequências compatíveis com as espécies atualmente caracterizadas de bactérias *comammox* do gênero *Nitrospira*.

As únicas espécies afiliadas ao gênero *Nitrospira* detectadas na amostra do biorreator E1 foram “*Ca. N. defluvii*”, com abundância relativa de 14,32%, e “*N. lenta*”, com abundância relativa de 0,33%. Ambas as espécies pertencem ao grupo

das bactérias oxidantes do nitrito (BON) e, diferentemente das bactérias *comammox*, não são capazes de realizar a nitrificação completa, isto é, a oxidação do nitrogênio amoniacal a nitrato. Tanto “*Ca. N. defluvii*” como “*N. lenta*” foram caracterizadas e isoladas de sistemas de lodos ativados de estações de tratamento de esgoto sanitário, com concentrações de nitrogênio afluente inferiores a 50 mg N L⁻¹ (Spieck *et al.*, 2006; Nowka *et al.*, 2015), condição similar à aplicada ao biorreator E1. A espécie *N. defluvii* pertence à linhagem I do gênero *Nitrospira* e não apresenta atividade ureolítica (Lücker *et al.*, 2010; Palomo *et al.*, 2018). Por outro lado, *N. lenta* pertence à linhagem II, assim como as bactérias *comammox*, e codifica os genes para a enzima urease (Sakoula *et al.*, 2018).

Embora as condições experimentais tenham sido aplicadas para favorecer o enriquecimento seletivo das bactérias *comammox*, não foram identificadas sequências associadas a estes organismos na biomassa de E1 ao final da operação. Este resultado sugere que estas bactérias não estavam presentes no lodo utilizado como inóculo, coletado de um sistema de lodos ativados aplicado à remoção de matéria orgânica de esgoto sanitário, ou foram eliminadas pela competição com outros organismos nitrificantes.

Além de *Nitrosomonas* e *Nitrospira*, de acordo com Reimer e colaboradores (2022), outros gêneros identificados em baixas abundâncias relativas na biomassa de E1 são capazes de hidrolisar a ureia a partir da atividade da urease, como *Acidovorax* (0,26%), *Afipia* (0,11%), *Bradyrhizobium* (0,44%), *Clostridium* (2,04%), *Mycolicibacterium* (0,23%) e *Rhizobium* (0,13%). Embora de forma menos expressiva que *Nitrosomonas* e *Nitrospira*, estes gêneros também podem ter contribuído para a produção de nitrogênio amoniacal para a nitrificação a partir da hidrólise da ureia fornecida como substrato no biorreator E1.

Além da produção de biomassa enriquecida para o bioaumento em sistemas de tratamento, a capacidade de alguns micro-organismos para utilizar ureia como substrato para a nitrificação pode ser aplicada para a recuperação de nutrientes de águas residuárias, como a urina (Wang *et al.*, 2024). Por exemplo, Li e colaboradores (2021) realizaram o tratamento de urina humana a partir do enriquecimento seletivo de bactérias autotróficas *comammox* do gênero *Nitrospira*, resultando em nitrato como produto final.

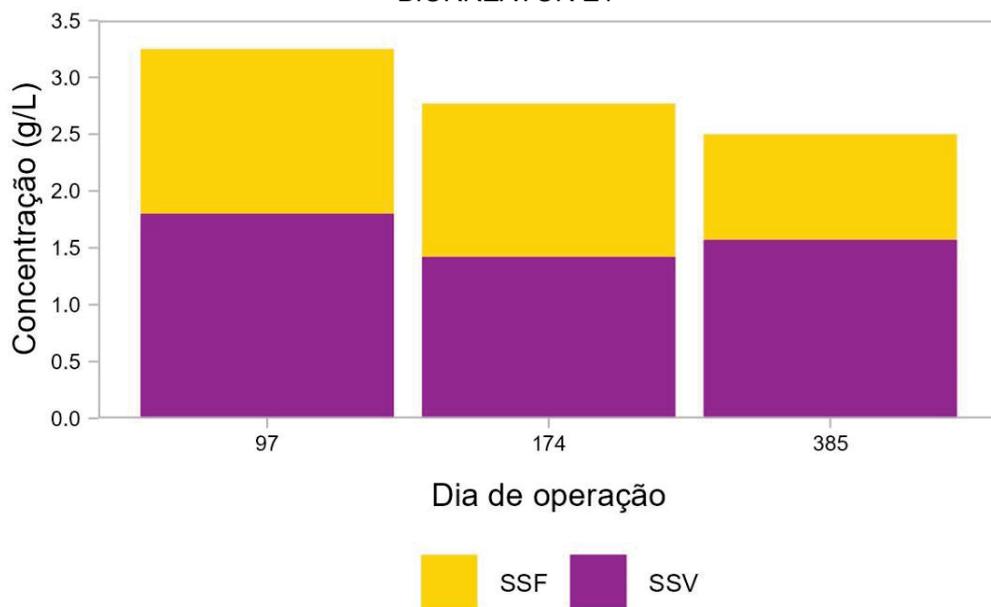
Por outro lado, Zuo e colaboradores (2023) observaram a produção de nitrato de amônio (NH₄NO₃) a partir de urina humana em um bioprocessamento de

nitrificação autotrófica dividido em dois estágios, o primeiro para nitritação e o segundo para nitratação do efluente. De forma semelhante, Pan e colaboradores (2024) reportaram a produção de nitrato de amônio a partir do tratamento de urina humana em um biorreator de membrana em escala de bancada, com a prevalência de bactérias *comammox* na comunidade microbiana.

Por sua vez, o efluente dos sistemas de tratamento enriquecidos com micro-organismos capazes de hidrolisar a ureia e convertê-la em nitrato, como o biorreator E1, pode ser aproveitado em processos industriais e comerciais. De acordo com Sato e colaboradores (2021), o nitrato produzido pela hidrólise da ureia e subsequente nitrificação da amônia pode servir como nutriente em fertilizantes líquidos. Estes autores relataram a produção de nitrato a partir da nitrificação de águas residuárias ricas em proteínas. O efluente da nitrificação foi utilizado para a fertilização de culturas hidropônicas. Em contrapartida, Heise e colaboradores (2021) utilizaram o efluente parcialmente nitrificado de um sistema de aquacultura, rico em amônia e nitrato, para a produção de vegetais via hidroponia.

Outra vantagem dos bioprocessos autotróficos para a remoção do nitrogênio de águas residuárias é a reduzida produção de biomassa excedente. Esta característica foi observada durante a operação do biorreator E1, conforme indicam os resultados para as concentrações de sólidos do licor misto (FIGURA 4.6).

FIGURA 4.6 – CONCENTRAÇÃO DE SÓLIDOS SUSPENSOS FIXOS E VOLÁTEIS PARA O BIORREATOR E1



FONTE: a autora (2024)

NOTA: SSF: sólidos suspensos fixos; SSV: sólidos suspensos voláteis.

Segundo Tchobanoglous, Burton e Stensel (2003), para reatores em bateladas sequenciais, como o biorreator E1, a concentração máxima recomendada de sólidos suspensos totais (SST) é de 5 g SST L⁻¹. De acordo com os resultados apresentados na FIGURA 4.6, a concentração de SST, dada pela soma dos sólidos suspensos fixos (SSF) e voláteis (SSV), não excedeu 3,5 g SST L⁻¹. Portanto, não foi necessária a retirada de biomassa excedente ao longo dos 390 dias de operação do biorreator E1.

Devido à baixa demanda por carbono orgânico, o crescimento celular dos micro-organismos autotróficos é mais lento em comparação com os heterotróficos. Por isso, a produção e o acúmulo de biomassa em biorreatores autotróficos, como o E1, são limitados e exigem períodos longos, de semanas a meses, conforme apresentado neste estudo. Em função da menor frequência de retirada e disposição do lodo excedente do que em sistemas em que há matéria orgânica para o crescimento celular, as culturas autotróficas estão associadas a menores custos.

Outra vantagem de sistemas como o biorreator E1 é a remoção do nitrogênio de águas residuárias sob baixas concentrações de oxigênio dissolvido (< 1 mg O₂ L⁻¹), o que resulta em economia de custos com aeração e energia. Após o enriquecimento, a microbiota do biorreator E1 apresentou sequências associadas a micro-organismos anaeróbios estritos, como bactérias do gênero *Longilinea* (0,59%) e arqueas metanogênicas dos gêneros *Methanothrix* (0,13%) e *Methanobacterium* (0,34%) (FIGURA 4.5). Embora em baixas abundâncias relativas, a presença destes organismos sugere a ocupação de diversos nichos e a formação de microambientes aeróbios e anóxicos nos flocos biológicos de E1. Ademais, condições anóxicas favorecem a atividade de micro-organismos relevantes para a remoção do nitrogênio amoniacal, como algumas bactérias desnitrificantes.

Em síntese, o enriquecimento do lodo com micro-organismos autotróficos, realizado sob baixas concentrações de oxigênio dissolvido e mediante utilização da ureia, resultou em elevadas eficiências para a remoção do nitrogênio orgânico e limitada produção de biomassa excedente. Além disso, a operação do biorreator E1 também permitiu a produção de biomassa metabolicamente ativa para o bioaumento de um dos biorreatores aplicados à remoção autotrófica do nitrogênio amoniacal do lixiviado de aterro sanitário.

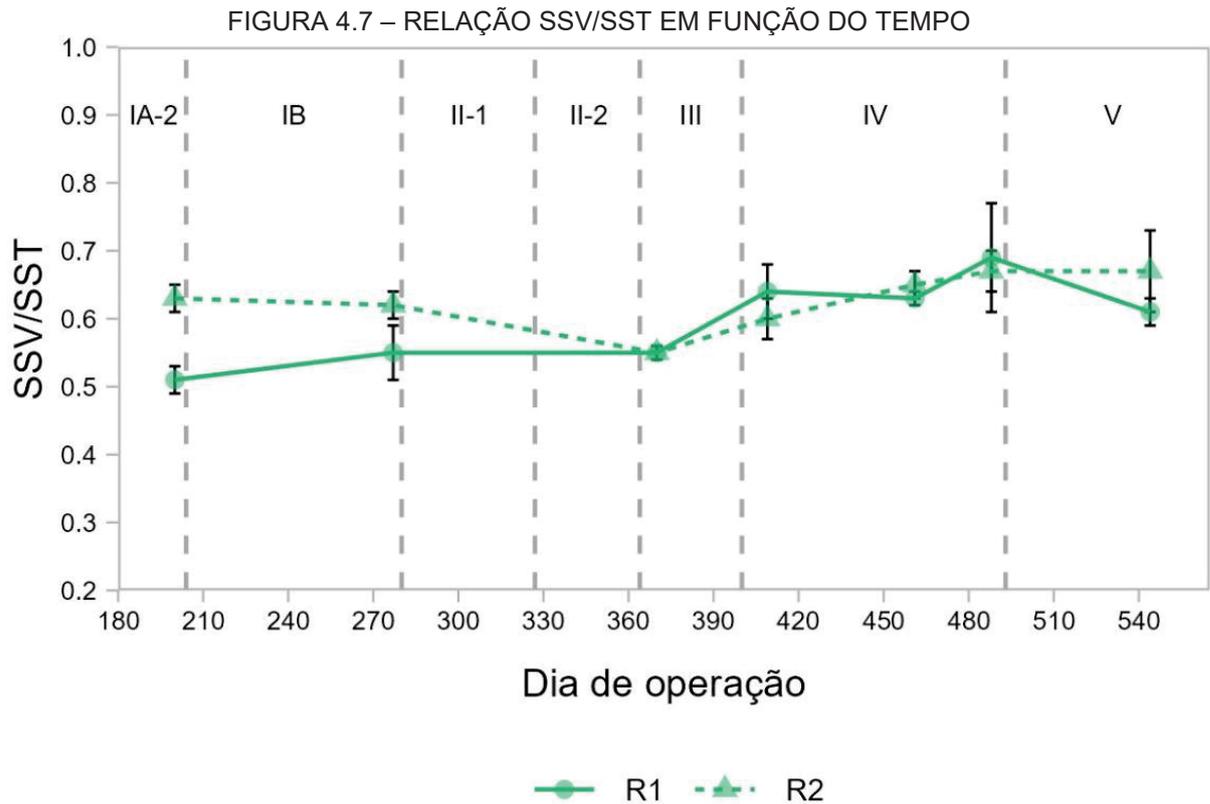
4.3 REMOÇÃO DE NITROGÊNIO DO LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO E IMPACTO DAS ESTRATÉGIAS DE ENGENHARIA DE MICROBIOMAS

O manejo de resíduos sólidos é um dos pilares do saneamento e, portanto, crucial para a saúde pública e garantia da qualidade de vida da população. Embora a legislação brasileira instrua os serviços de coleta, tratamento e destino final (Brasil, 2010), cerca de 40% da massa de resíduos sólidos urbanos (RSU) coletados no país ainda não recebe a disposição final em aterros sanitários, totalizando mais de 28 milhões de toneladas de RSU enviadas anualmente para lixões, aterros controlados e outros locais inadequados (Abrema, 2024).

Um dos principais passivos ambientais gerados em aterros sanitários é o lixiviado, cujo tratamento pode ser custoso devido à complexidade dessa água residuária. Por vez, os custos inerentes ao tratamento do lixiviado impactam diretamente a capacidade dos municípios de cumprir as exigências da Política Nacional de Resíduos Sólidos. Portanto, além da eficiência e estabilidade, os sistemas de tratamento do lixiviado devem ser economicamente viáveis, para que possam ser implementados em escala plena mesmo em municípios com menor disponibilidade de recursos financeiros.

O desenvolvimento de bioprocessos associados a menores custos operacionais, como os investigados nesta pesquisa, pode contribuir para a expansão do tratamento do lixiviado e melhor aproveitamento de recursos financeiros para a ampliação da cobertura dos serviços de manejo de resíduos sólidos. Nesse sentido, durante a operação dos biorreatores R1 e R2, foram observadas características que podem favorecer a redução dos custos operacionais para o tratamento do lixiviado, como a simplicidade dos sistemas de tratamento, a baixa produção de lodo excedente e a elevada sedimentabilidade da biomassa.

Durante a operação de R1 e R2, a idade de lodo elevada, superior a 100 dias, foi mantida. Por sua vez, a elevada idade de lodo esteve associada aos baixos valores obtidos para a relação entre a concentração de sólidos suspensos voláteis (SSV) e totais (SST), com variação de 0,51 a 0,69 (FIGURA 4.7). Estes resultados são inferiores aos tipicamente observados para lodos ativados convencionais (0,70 a 0,90) ou com aeração prolongada (0,60 a 0,75) (Tchobanoglous; Burton; Stensel, 2003; Von Sperling, 2012).



FONTE: a autora (2024)

NOTA: SSV: sólidos suspensos voláteis; SST: sólidos suspensos totais.

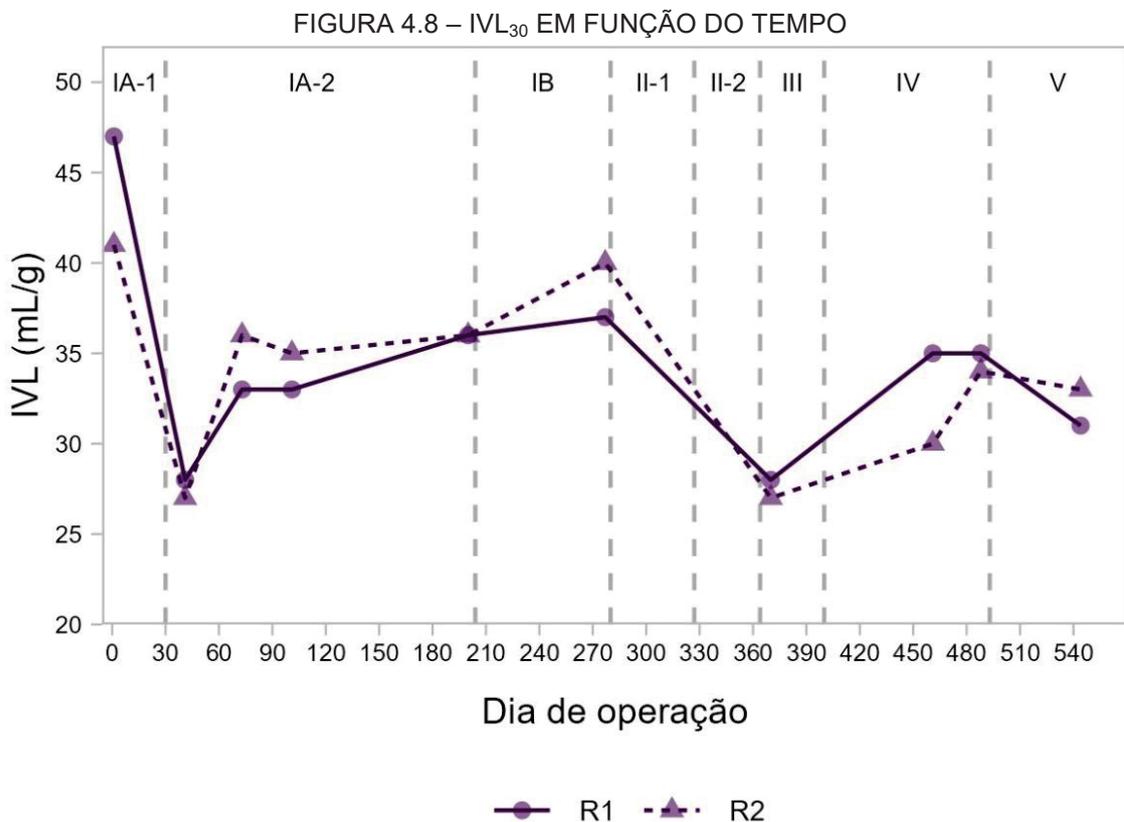
A retenção da biomassa associada a idades de lodo elevadas, como as observadas em R1 e R2, favorece a digestão do lodo excedente no próprio biorreator, sem a necessidade de decantadores ou unidades extras para a estabilização do material. Por sua vez, a autodigestão da biomassa, processo em que a matéria orgânica é oxidada a água e CO_2 no próprio biorreator, resulta na redução da razão SSV/SST, conforme observado nos biorreatores R1 e R2 em comparação a sistemas convencionais, operados com menores idades de lodo.

Idades de lodo elevadas (> 18 dias) são mantidas em sistemas de lodos ativados com aeração prolongada aplicados para a nitrificação de águas residuárias. Os biorreatores R1 e R2 compartilharam características com esses sistemas, como a elevada idade de lodo, superior a 100 dias durante toda a operação, a elevada retenção da biomassa e a finalidade de nitrificação do efluente. Logo, apresentaram as mesmas vantagens, como a simplicidade operacional e a eliminação da necessidade de unidades extras para a decantação e digestão do lodo excedente, além da robustez e estabilidade operacional (Von Sperling, 2012).

Apesar das vantagens, os sistemas convencionais aplicados para a nitrificação, como os lodos ativados com aeração prolongada, apresentam elevado

consumo energético devido à aeração, necessária para o suprimento de oxigênio para a autodigestão da biomassa. Por outro lado, nesta pesquisa, as limitações associadas aos sistemas convencionais foram contornadas mediante implementação do regime de aeração intermitente a partir da fase IV, o que permitiu reduzir o consumo de energia sem diminuição significativa da eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal do lixiviado, conforme discussão adiante.

Além da capacidade de autodigestão do lodo observada para os biorreatores R1 e R2, a biomassa desses sistemas apresentou elevada sedimentabilidade, como indicam os resultados para o índice volumétrico do lodo medido após 30 minutos de sedimentação (IVL_{30}) (FIGURA 4.8).



FONTE: a autora (2024)

NOTA: IVL : índice volumétrico do lodo.

No início da operação dos biorreatores, o IVL_{30} era igual a 47 mL g^{-1} para R1 e 41 mL g^{-1} para R2. Após 30 dias, o IVL_{30} diminuiu para 28 mL g^{-1} para R1 e 27 mL g^{-1} para R2. Posteriormente, a partir da fase IA-2, o valor do IVL_{30} para ambos os biorreatores variou entre 27 mL g^{-1} e 40 mL g^{-1} (FIGURA 4.8).

O IVL_{30} é utilizado para avaliar a sedimentabilidade da biomassa em sistemas de tratamento de águas residuárias. Valores baixos para o IVL_{30} indicam

maior capacidade de sedimentação do lodo, o que impacta positivamente na separação e recuperação da biomassa do efluente, reduzindo custos operacionais e aumentando a eficiência do tratamento. Para sistemas de lodos ativados, similares a R1 e R2, os valores recomendados para o IVL_{30} variam entre 50 e 400 mL g^{-1} (Torfs *et al.*, 2016). Valores de IVL_{30} entre 0 e 50 mL g^{-1} , como os observados para R1 e R2, indicam sedimentabilidade ótima e elevada capacidade de separação do lodo do licor misto, o que minimiza as perdas de biomassa metabolicamente ativa por arraste com o efluente (Von Sperling, 2012).

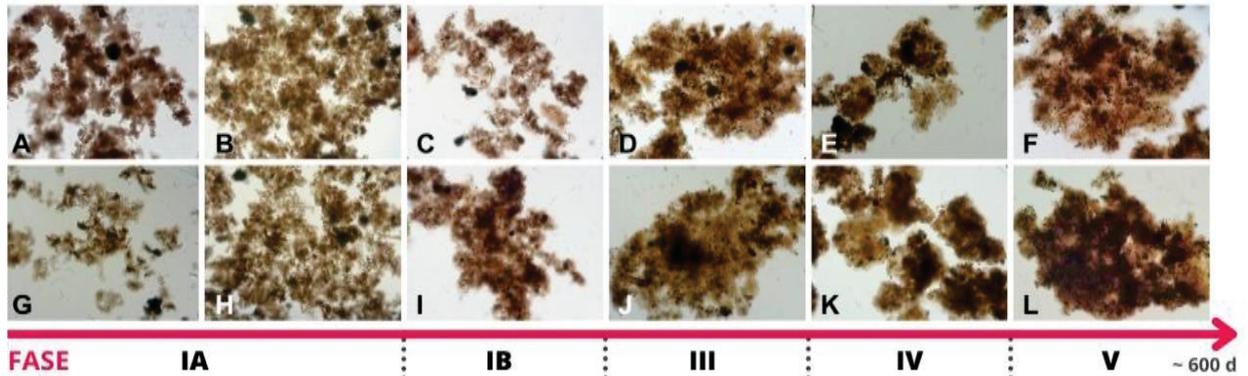
Outra medida utilizada para avaliar a qualidade da sedimentação da biomassa em bioprocessos de tratamento de águas residuárias é a relação entre os índices volumétricos de lodo determinados após 10 e 30 minutos (IVL_{10}/IVL_{30}). A relação IVL_{10}/IVL_{30} é, inclusive, aplicada para a avaliação da qualidade de lodos granulares. Valores para IVL_{10}/IVL_{30} próximos a 1 indicam que o processo de formação dos lodos granulares foi completado e estão associados à excelente sedimentabilidade da biomassa em sistemas de tratamento de águas residuárias.

Para o licor misto dos biorreatores, no 488º dia de operação, a relação IVL_{10}/IVL_{30} foi igual a 0,882 para R1 e 0,935 para R2, enquanto no 542º dia de operação foi igual a 0,906 para R1 e 0,909 para R2 no 542º dia. Estes resultados indicam que, embora o lodo tenha permanecido na forma flocular durante toda a operação, a biomassa apresentou características semelhantes às de lodos granulares para ambos os biorreatores.

Os valores para o IVL_{30} e IVL_{10}/IVL_{30} determinados nesta pesquisa são similares aos obtidos por Aqeel e colaboradores (2023), que investigaram a remoção autotrófica do nitrogênio de água residuária sintética em reatores de mistura completa. Na fase autotrófica, a concentração de amônia afluente variou entre 50 e 200 mg N L^{-1} , e nenhuma fonte de carbono orgânico foi adicionada. Nessa etapa, os autores obtiveram resultados para o IVL_{30} e IVL_{10}/IVL_{30} iguais a 29 mL g^{-1} e 0,88, respectivamente. Os mesmos autores relataram que a manutenção das condições autotróficas esteve associada ao crescimento e adensamento dos flocos biológicos e à melhoria da sedimentabilidade em comparação com o lodo utilizado como inóculo, cujo valor para o IVL_{30} era 160 mL g^{-1} . Por outro lado, ao adicionar carbono orgânico ao afluente, os autores observaram a diminuição da sedimentabilidade do lodo, evidenciada pela redução do IVL_{30} , que passou de 29 mL g^{-1} para 111 mL g^{-1} .

Similarmente, nesta pesquisa, ao longo da operação dos biorreatores sob condições estritamente autotróficas (fases IA-1 e IA-2) ou limitada disponibilidade de carbono orgânico biodegradável (fases IB a VI, em função da alimentação com lixiviado), também foi observado o aumento do tamanho e o adensamento dos flocos biológicos, conforme apresentado na FIGURA 4.9.

FIGURA 4.9 – MICROGRAFIAS ÓPTICAS DO LODO DE R1 E R2



FONTE: a autora (2024)

LEGENDA: A a F: flocos biológicos coletados de R1; G a L: flocos biológicos coletados de R2; as amostras de lodo foram coletadas dos biorreatores nestes dias de operação: A e G: 40° d; B e H: 129° d; C e I: 272° d; D e J: 368° d; E e K: 424° d; F e L: 515° d; aumento de 200x.

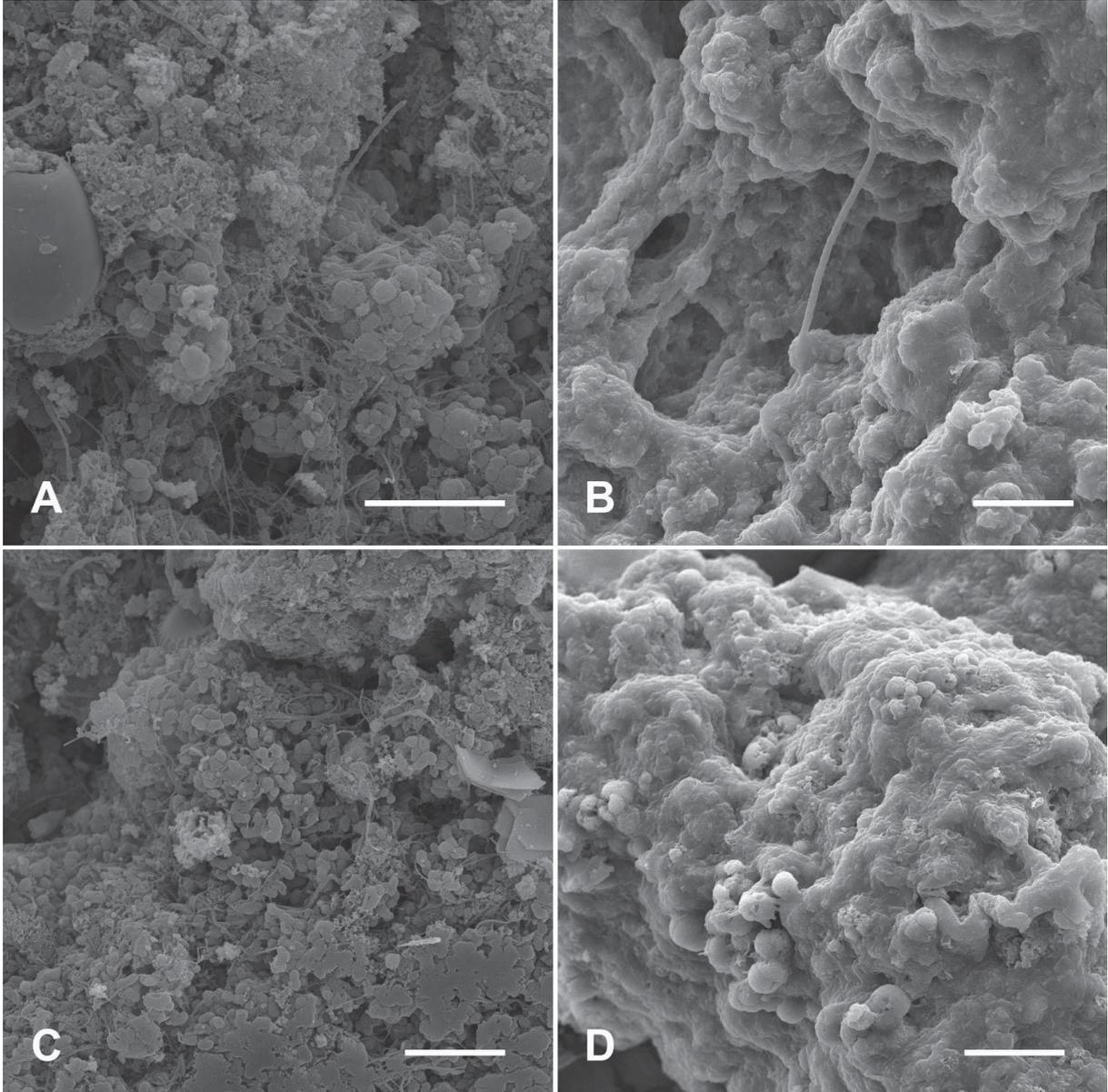
Neste estudo e naquele realizado por Aqeel e colaboradores (2023), a condição autotrófica e a baixa disponibilidade de carbono orgânico estiveram associadas ao adensamento dos flocos biológicos e à elevada capacidade de sedimentação do lodo. Portanto, os resultados de ambas as pesquisas indicam que os bioprocessos aplicados à remoção autotrófica do nitrogênio de águas residuárias podem apresentar como vantagens adicionais a manutenção de flocos biológicos densos nos sistemas de tratamento e a melhoria da sedimentabilidade da biomassa.

O adensamento do lodo observado durante a operação de R1 e R2, que contribuiu para o aumento da sedimentabilidade da biomassa, pode estar associado à produção de substâncias poliméricas extracelulares pelas células microbianas. As substâncias poliméricas extracelulares são compostas por diversas biomoléculas, como polissacarídeos, proteínas, lipídios, DNA extracelular e vesículas membranosas (Penesyan *et al.*, 2021; Flemming *et al.*, 2023). Elas promovem a agregação microbiana e permitem que os micro-organismos permaneçam unidos em biofilmes, colônias, flocos, grânulos ou outras estruturas (Flemming *et al.*, 2023).

Nas FIGURAS 4.10 e 4.11, são apresentadas micrografias eletrônicas de varredura dos flocos biológicos coletados de R1 e R2 em diferentes fases

operacionais, em aumentos de 5000x-7000x e 15000x, respectivamente. Nelas, são evidenciadas as substâncias poliméricas extracelulares recobrindo os flocos biológicos e compondo a matriz extracelular.

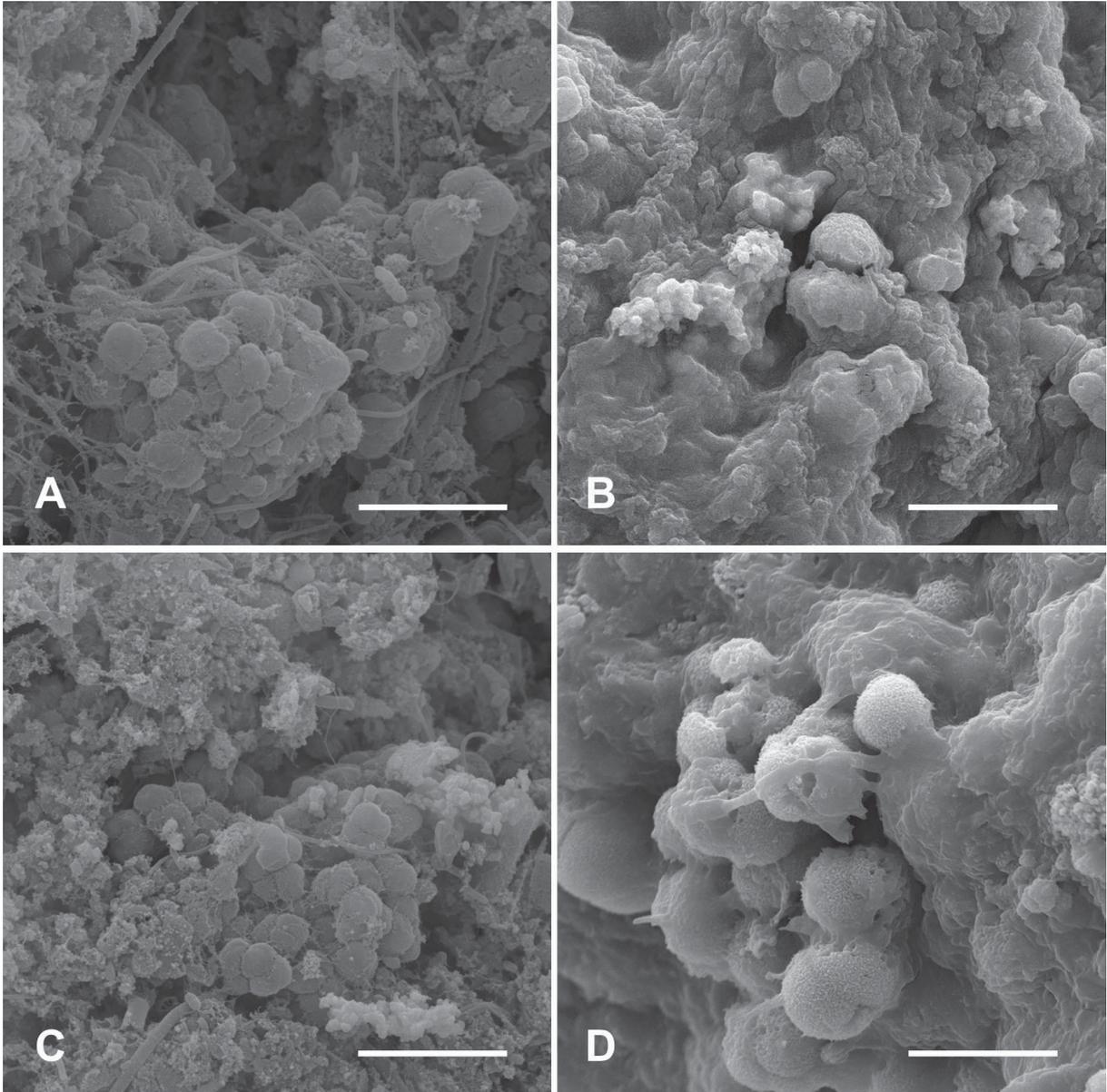
FIGURA 4.10 – MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA DO LODO DE R1 E R2 – AUMENTO DE 5000-7000X



FONTE: a autora (2024)

LEGENDA: A e C: flocos biológicos coletados na fase IA-1 (201° d); B e D: flocos biológicos coletados na fase V (521° d); aumento: A: 7000x; B, C e D: 5000x; a barra corresponde a 10 μm .

FIGURA 4.11 – MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA DO LODO DE R1 E R2 – AUMENTO DE 1500X



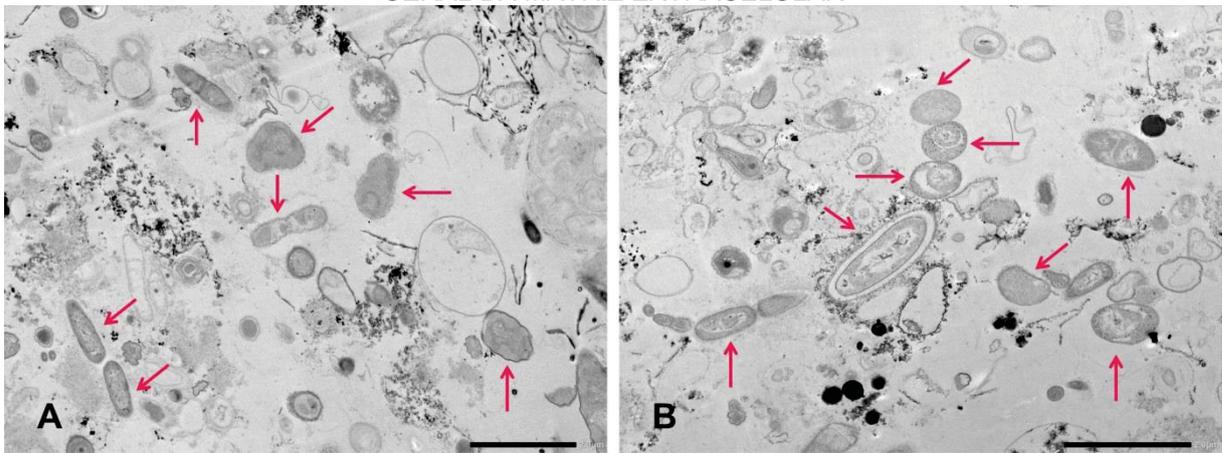
FONTE: a autora (2024)

LEGENDA: A e C: flocos biológicos coletados na fase IA-1; B e D: flocos biológicos coletados na fase V; aumento: 1500x; a barra corresponde a 5 μm .

No início da operação dos biorreatores (Fase IA-1, 201° d), foi possível observar células microbianas individualizadas compondo os flocos biológicos (FIGURA 4.10 e FIGURA 4.11, quadros A e C). Entretanto, próximo ao final da operação (Fase V, 521° d), os flocos biológicos apresentavam-se recobertos pela matriz extracelular, dificultando a visualização de células individuais (FIGURA 4.10 e FIGURA 4.11, quadros B e D).

Na FIGURA 4.12 são apresentadas micrografias eletrônicas de transmissão dos flocos biológicos coletados em R1 na fase VI (594º dia de operação). Nelas, é possível observar a matriz extracelular em torno de diversas estruturas, incluindo células e material inorgânico. A matriz extracelular pode ter contribuído para a coesão, o adensamento e a compacidade dos flocos biológicos dos biorreatores R1 e R2 ao longo da operação.

FIGURA 4.12 – MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE TRANSMISSÃO DO LODO DE R1: ASPECTO GERAL DA MATRIZ EXTRACELULAR



FONTE: a autora (2024)

NOTA: aumento: A: 5000x; B: 6000x; a barra corresponde a 2 µm; as setas apontam para supostas células de micro-organismos imobilizados na matriz extracelular formadora dos flocos biológicos.

Além de determinantes para a floculação e sedimentabilidade dos lodos biológicos, as substâncias poliméricas extracelulares, principalmente os polissacarídeos e as proteínas, podem ser consumidas pelos micro-organismos como fontes de carbono e energia (Huang *et al.*, 2022; Flemming *et al.*, 2023). Portanto, em função da espessa camada de matriz extracelular observada nas micrografias do lodo de R1 e R2 (FIGURAS 4.10 e 4.11), especialmente após a fase de enriquecimento (IA-2), sugere-se que as substâncias poliméricas extracelulares tenham servido como fonte de carbono orgânico e energia para os micro-organismos imobilizados na matriz extracelular, auxiliando na manutenção da atividade metabólica e na sobrevivência das células em R1 e R2 mesmo sob condições autotróficas e baixa disponibilidade de matéria orgânica biodegradável.

Além da produção da matriz extracelular, outros fatores podem afetar a arquitetura dos arranjos microbianos em biofilmes, como a hidrodinâmica do meio, os substratos disponíveis, a temperatura, a limitação de nutrientes e a concentração de oxigênio dissolvido. Conforme as condições do meio, os biofilmes podem

adaptar-se mecânica e estruturalmente de forma a criar um espaço protetivo para diferentes micro-organismos (Penesyanyan *et al.*, 2021; Flemming *et al.*, 2023). Sob estresse hidrodinâmico ou bioquímico, por exemplo, a produção de substâncias poliméricas extracelulares pode aumentar, resultando no maior adensamento dos biofilmes e na agregação celular (Huang *et al.*, 2022; Flemming *et al.*, 2023).

Esses fenômenos protetivos já foram observados para os micro-organismos responsáveis pela remoção do nitrogênio de águas residuárias. Nowka e colaboradores (2015), por exemplo, reportaram que uma cultura de *Nitrospira defluvii*, uma bactéria oxidante do nitrito (BON), aumentou a produção de substâncias poliméricas extracelulares quando exposta a elevadas concentrações de nitrito (30 mM NO₂⁻) e à acriflavina, um agente antimicrobiano. Também foi observado o aumento da secreção desses biopolímeros em culturas de *Nitrospira lenta*, outra BON, após a adição repetida de nitrito e o acúmulo de nitrato.

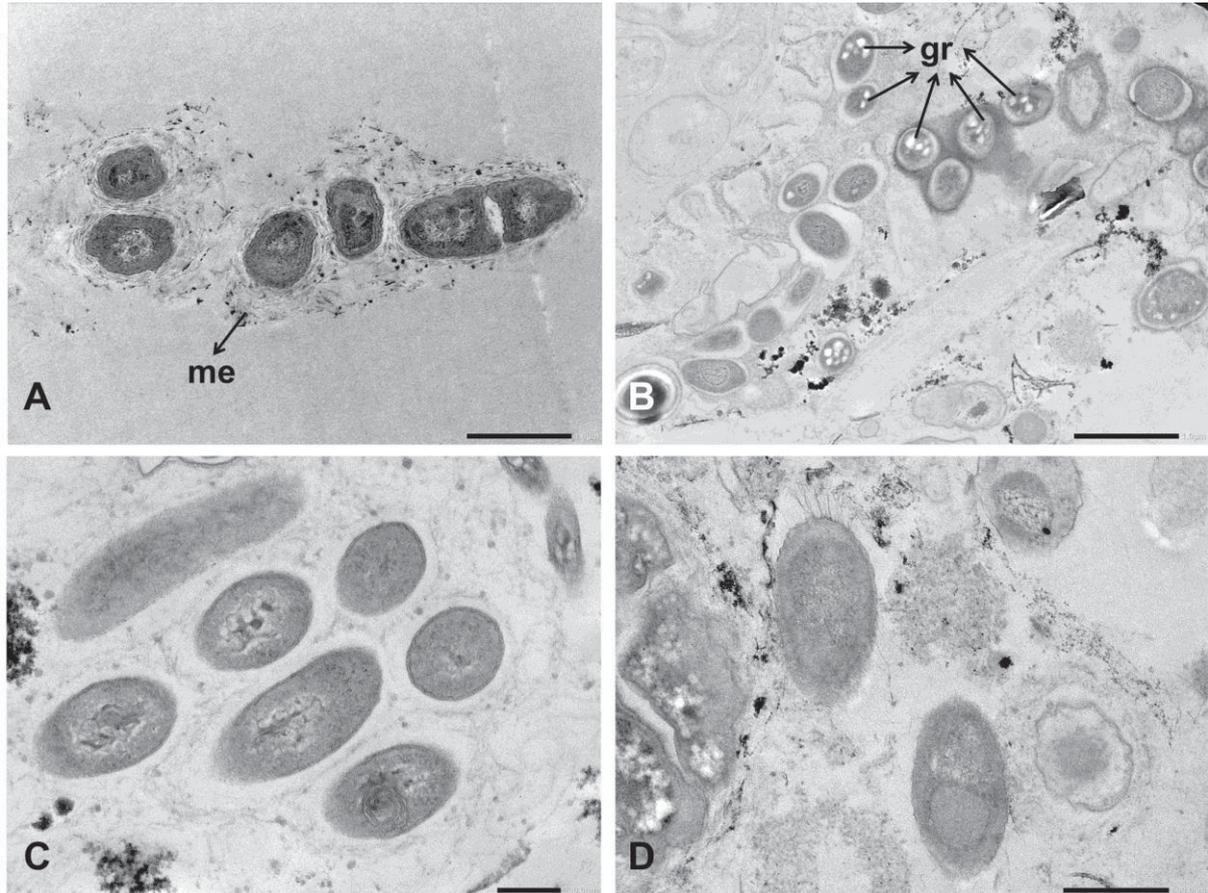
Por sua vez, Antwi e colaboradores (2020), ao estudar um sistema aplicado à nitrificação parcial/*anammox* de lixiviado de aterro sanitário, observaram o adensamento dos agregados celulares e o “envelopamento” das células microbianas na matriz extracelular, indicando um mecanismo protetivo contra a toxicidade associada à presença de metais pesados no lixiviado. De forma semelhante, nesta pesquisa, a abundância da matriz extracelular dos flocos biológicos sugere que ela ajudou a manter a atividade metabólica microbiana e a proteger as células em condições adversas, como o contato com o lixiviado potencialmente tóxico e a exposição a elevadas concentrações de nitrogênio amoniacal, nitrito e nitrato.

A estrutura dos flocos biológicos pode ser formada por vários microambientes, que propiciam condições para o crescimento de distintos grupos microbianos (Penesyanyan *et al.*, 2021). No interior dos flocos, pode ocorrer a estratificação e a formação de gradientes de substratos, como o nitrogênio e o oxigênio, criando nichos ocupáveis por micro-organismos com capacidades metabólicas diversificadas (Huang *et al.*, 2022; Flemming *et al.*, 2023). Em sistemas aplicados para a remoção do nitrogênio, a estratificação formada em biofilmes, flocos e grânulos cria nichos que podem ser ocupados simultaneamente por bactérias oxidantes da amônia (BOA) e do nitrito (BON), bactérias *anammox*, desnitrificantes, entre outros (Daims *et al.*, 2001; Maixner *et al.*, 2006).

Assim, a densa matriz polimérica extracelular também pode ter contribuído para a manutenção de diferentes grupos microbianos nos flocos de R1 e R2,

protegendo-os contra condições de estresse e criando microambientes diversos. Na FIGURA 4.13, são apresentadas micrografias eletrônicas de transmissão dos flocos biológicos de R1 ao final da operação (594° d, fase VI), mostrando distintos grupos de micro-organismos que possivelmente ocupavam diferentes nichos ecológicos.

FIGURA 4.13 – MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE TRANSMISSÃO: AGRUPAMENTOS MICROBIANOS PRESENTES NOS FLOCOS BIOLÓGICOS DE R1

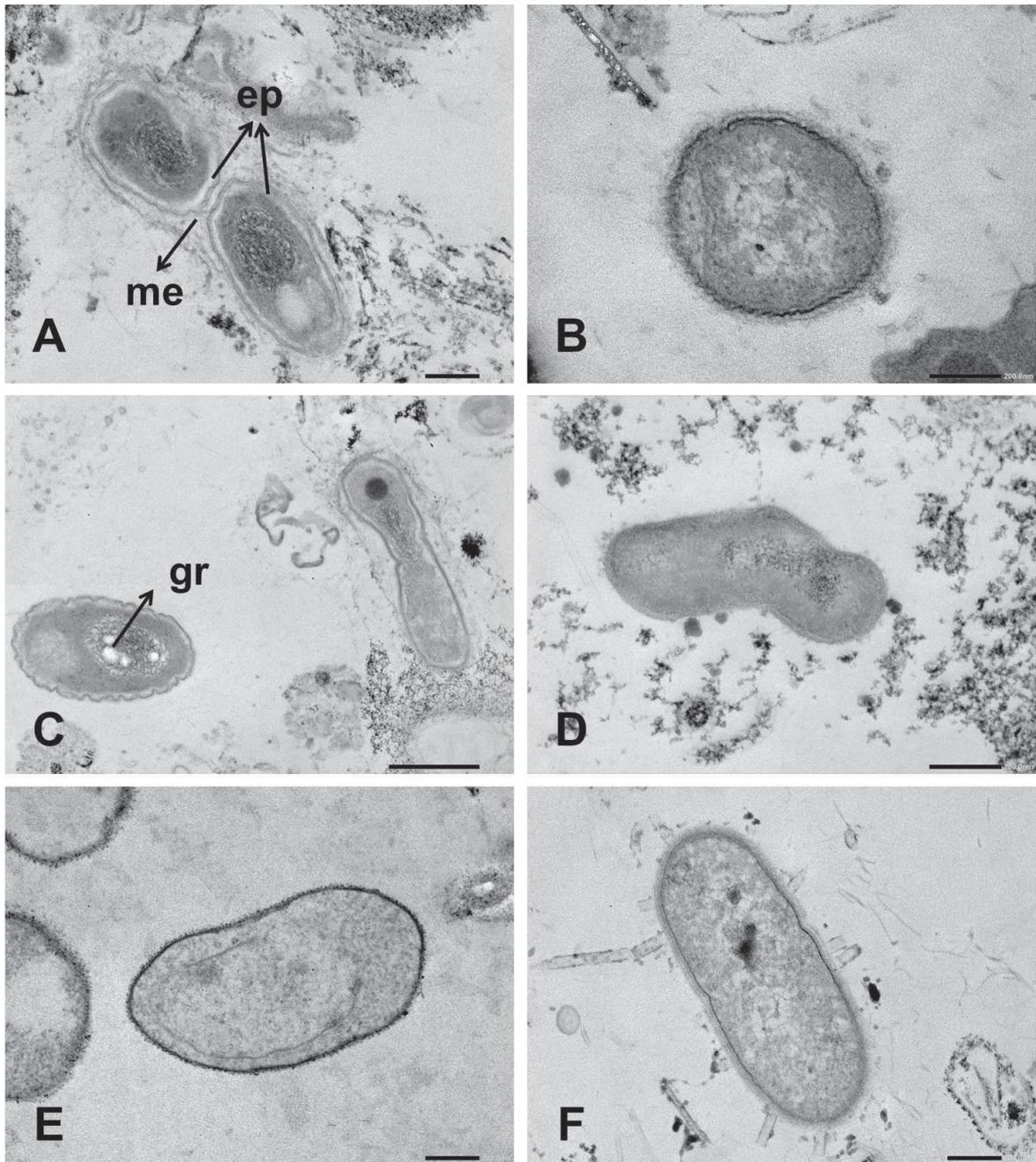


FONTE: a autora (2024)

NOTA: aumento: A e B: 10000x; C: 30000x; D: 20000x; a barra corresponde a: A e B: 1 μm ; C: 0,2 μm ; D: 0,5 μm ; me: matriz extracelular; gr: supostas inclusões granulares.

Na FIGURA 4.14, são apresentadas micrografias eletrônicas de transmissão de células e estruturas microbianas dos flocos biológicos de R1 ao final da operação (594° d, fase VI). Em A, é possível observar duas células em formato bacilar, envoltas por matriz extracelular. Em C, D, E e F, são visíveis bacilos, enquanto em B, uma célula cocoide pode ser observada.

FIGURA 4.14 – MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE TRANSMISSÃO: MICRO-ORGANISMOS PRESENTES NOS FLOCOS BIOLÓGICOS DE R1

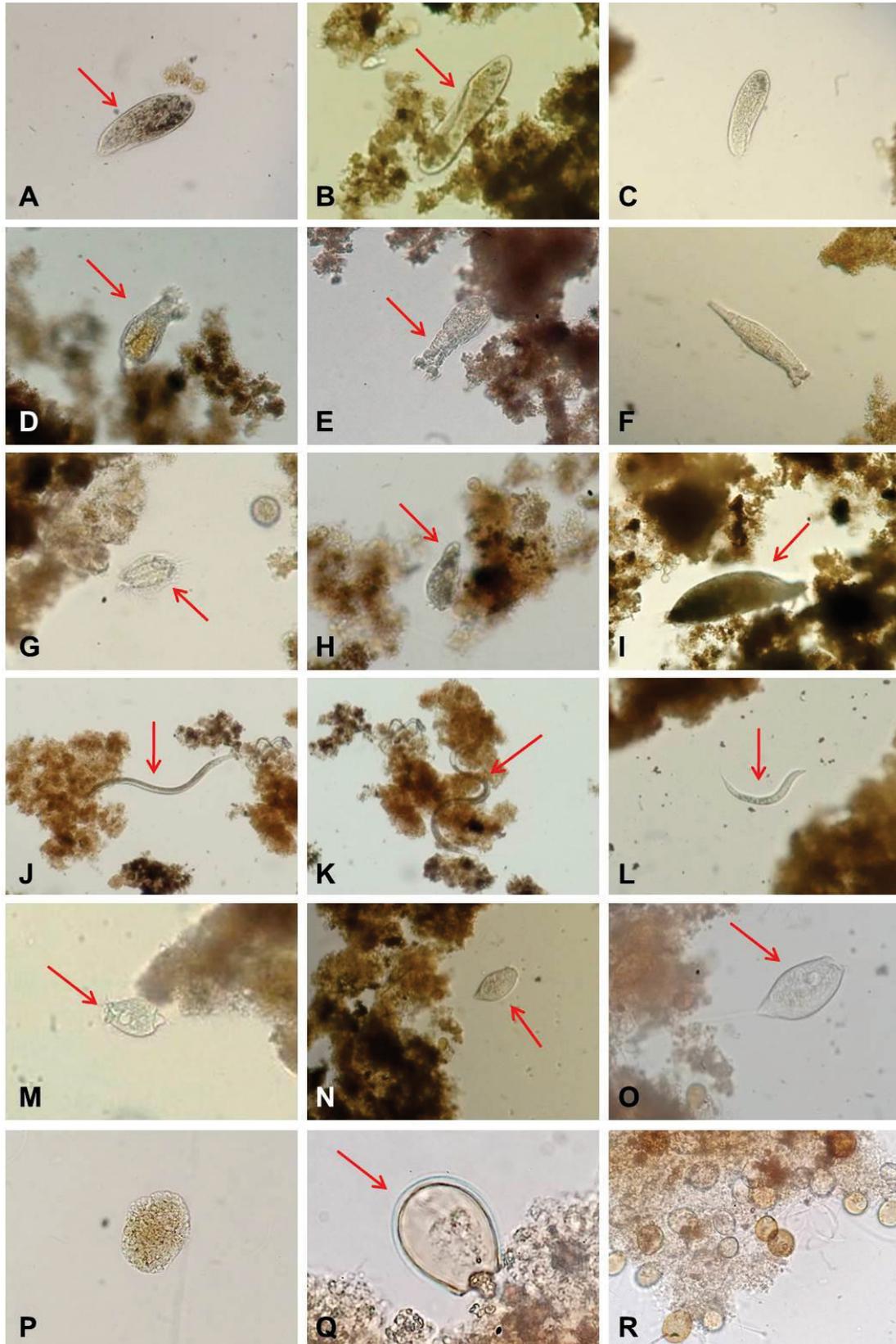


FONTE: a autora (2024)

NOTA: aumento: A, E e F: 30000x; B e D: 40000x; C: 20000x; a barra corresponde a 0,5 μm para C e 0,2 μm para as demais micrografias; ep: suposto espaço periplásmico alargado, característico de alguns gêneros como *Nitrospira*; me: matriz extracelular; gr: supostas inclusões granulares.

Além dos procariotos identificados mediante análises de microscopia eletrônica, foram observados também protozoários e metazoários no lodo de R1 e R2 (FIGURA 4.15). Em sistemas de tratamento biológico de águas residuárias, esses organismos alimentam-se das bactérias existentes e podem também participar da decomposição dos resíduos presentes no efluente (Madoni, 2010).

FIGURA 4.15 – MICROGRAFIAS ÓPTICAS DO LICOR MISTO DE R1 E R2: PROTOZOÁRIOS E METAZOÁRIOS



FONTE: a autora (2024)

LEGENDA: A, B e C: ciliados livres (protozoários); D, E e F: rotíferos (metazoários); G, H e I: ciliados rastejantes (protozoários); J, K e L: nematódeos (metazoários); M, N e O: ciliados fixos (protozoários); P: ameba “nua”; Q e R: amebas testáceas. As micrografias foram recortadas e ampliadas para dar ênfase aos organismos e, portanto, não mantêm a escala real.

Cada sistema de tratamento de águas residuárias apresenta, em geral, uma estrutura particular relativa à comunidade de protozoários e metazoários, e mudanças das condições operacionais ou ambientais são rapidamente refletidas em alterações dessas populações (Amaral *et al.*, 2018; Sobczyk *et al.*, 2021). Assim, a presença de grupos funcionais e a abundância de protozoários e metazoários podem ser utilizadas como indicadores do desempenho de um sistema de tratamento. Por isso, a abundância relativa desses grupos em amostras de licor misto de R1 e R2 foi monitorada ao longo da operação (QUADRO 4.1).

QUADRO 4.1 – ABUNDÂNCIA RELATIVA DE PROTOZOÁRIOS E METAZOÁRIOS EM R1 E R2

DATA	FASE	CILIADOS			AMEBAS		FLAG.	ROT.	NEMAT.
		Livres	Rastej.	Fixos	Testáceas	"Nuas"			
21/09/22	IA-2	++						+	
24/10/22					+++			++	
21/11/22					+++			+	
19/12/22		+			+++			+	
25/01/23		+			+++			+	
02/03/23		+			+++			+	
12/04/23	IB	++				+++		+	
11/05/23		++	+		+++			+	
13/06/23	II-1	++				++++			+
11/07/23	II-2	++			+	++++			
15/08/23	III	+++	+	++	++++				+
14/09/23		++	+		++++	+	++		
10/10/23	IV	++			+	++++		+++	
13/11/23		+++			+	++++	+	++	
13/12/23		+				++++		+++	
09/01/24	V	++				++++		+++	
07/02/24		++++	+		++++	+	++		

FONTE: a autora (2024)

NOTA: +: presente em baixa densidade populacional (1 organismo por lâmina); ++: presente em média densidade populacional (2 organismos por lâmina); +++: presente em elevada densidade populacional (entre 3 e 5 organismos por lâmina); ++++: presente em muito elevada densidade populacional (≥ 6 organismos por lâmina). Abreviaturas: Flag.: flagelados; Rot.: rotíferos; Nemat.: nematódeos; Rastej.: rastejantes.

Os ciliados geralmente predominam em sistemas de tratamento operados de forma adequada e equilibrada (Madoni, 2010; González; Salas; Gutiérrez, 2016). Estes organismos estão presentes quando a população bacteriana é numerosa e a concentração de oxigênio dissolvido suficiente para os processos aeróbios. Além disso, os ciliados são mais tolerantes a condições de estresse, como a baixa concentração de oxigênio dissolvido, em comparação com outros grupos, como os rotíferos (Madoni, 2010).

Conforme resultados apresentados no QUADRO 4.1, a densidade populacional dos ciliados, particularmente dos livres, permaneceu relativamente estável e elevada durante todas as fases operacionais de R1 e R2. Esta observação sugere que a concentração de oxigênio dissolvido foi adequada para a sua sobrevivência e, provavelmente, da população bacteriana aeróbia, mesmo após a implementação do regime de aeração intermitente na fase IV.

De acordo com as informações apresentadas no QUADRO 4.1, a densidade populacional de amebas testáceas, ou amebas com carapaça, foi elevada durante todas as fases operacionais. Estes organismos, comuns em solos e corpos hídricos (Siemensma, 2024), estão associados a elevadas idades de lodo, como aquelas observadas em R1 e R2, mantidas acima de 100 dias. Em sistemas de tratamento de águas residuárias que dependem da nitrificação, as amebas testáceas podem ser encontradas em elevadas densidades e estão geralmente associadas a elevadas eficiências de remoção do nitrogênio e à estabilidade dos bioprocessos (Amaral *et al.*, 2018; Azevedo *et al.*, 2021).

Diferentemente das amebas testáceas, alguns grupos funcionais de protozoários e metazoários foram observados apenas em algumas fases operacionais de R1 e R2. Nematódeos foram detectados apenas nas fases II e III, enquanto os ciliados fixos foram identificados somente nas fases III e IV (QUADRO 4.1). Ambos os grupos estão associados à estabilização dos bioprocessos de tratamento de águas residuárias e à maturação avançada dos flocos biológicos (González; Salas; Gutiérrez, 2016). Após o enriquecimento da microbiota nitrificante na fase IA-2, condições operacionais potencialmente estressantes, como a introdução do lixiviado e o aumento da carga volumétrica, podem ter desestabilizado os bioprocessos, levando ao desaparecimento desses organismos indicadores.

De acordo com vários autores (Petropoulos; Gilbride, 2005; Pogue; Gilbride, 2007; Burian *et al.*, 2022), em sistemas de lodos ativados utilizados para a remoção do nitrogênio, a presença de protozoários e metazoários está associada ao aumento da taxa de nitrificação. Os resultados das pesquisas destes autores também indicaram que a redução da eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal e da taxa de nitrificação, juntamente com a diminuição da atividade das BOA e BON, está relacionada à redução da população de protozoários e metazoários.

A relação entre a presença de metazoários e protozoários e a elevada eficiência dos sistemas de remoção do nitrogênio deve-se, provavelmente, à

liberação de excretas orgânicas e inorgânicas, que podem ser utilizadas pelos micro-organismos nitrificantes como fontes de energia ou nutrientes. O aumento da taxa de nitrificação, por sua vez, pode ser atribuído à predação dos micro-organismos heterotróficos de rápido crescimento por protozoários e metazoários. Esta condição limita a competição com os organismos nitrificantes autotróficos, que apresentam crescimento mais lento (Petropoulos; Gilbride, 2005; Burian *et al.*, 2022).

Além disso, os protozoários e metazoários podem produzir compostos que estimulam o crescimento bacteriano e afetam a agregação microbiana em flocos biológicos em sistemas de tratamento (Madoni, 2010). A presença de determinados grupos funcionais, como rotíferos (FIGURA 4.15) e alguns flagelados, está associada ao controle populacional de micro-organismos filamentosos, o que resulta na redução do índice volumétrico de lodo, melhorando a sedimentabilidade da biomassa (Sobczyk *et al.*, 2021).

A presença de protozoários e metazoários em sistemas de tratamento de águas residuárias também está associada a estratégias de proteção contra a predação devido à formação de matrizes extracelulares e ao estímulo à agregação microbiana em biofilmes (Seiler *et al.*, 2017; Flemming *et al.*, 2023). Estudos como os de Seiler e colaboradores (2017) sugerem que a formação e maturação dos biofilmes são favorecidas na presença de protozoários como os ciliados e os flagelados. Assim, a comunidade diversificada de protozoários e metazoários observados em R1 e R2 (QUADRO 4.1) pode ter contribuído para a maturação e adensamento dos flocos biológicos, o que resultou no aumento da capacidade de sedimentação da biomassa.

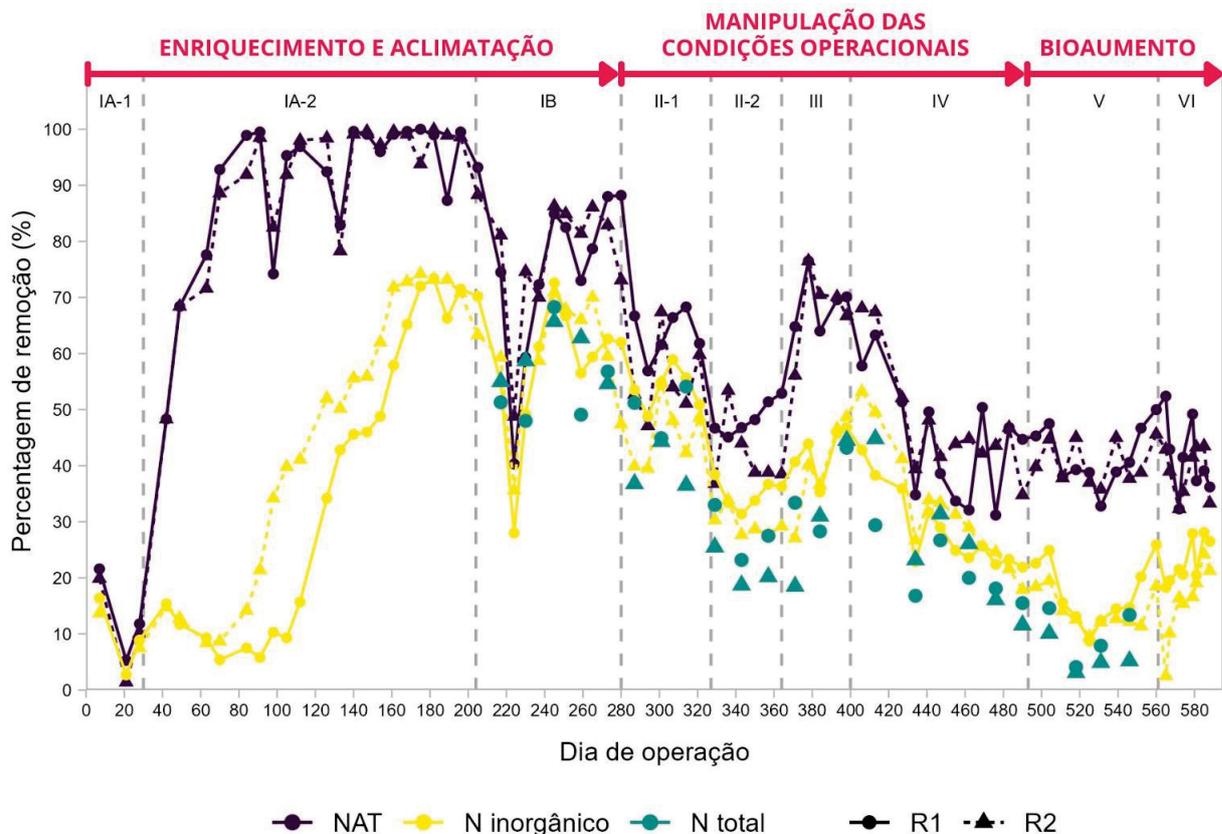
Em suma, a diversidade de protozoários e metazoários, o arranjo estrutural em flocos densos e a criação de micronichos nos flocos biológicos podem ter contribuído para a remoção do nitrogênio do lixiviado estudado nesta pesquisa. Além disso, essas condições podem ter permitido a manutenção da atividade metabólica de diversos grupos microbianos durante a operação de R1 e R2.

Além de favorecer a manutenção de nichos microbianos relevantes para a remoção do nitrogênio amoniacal, o desempenho dos sistemas de tratamento pode ser otimizado pela aplicação de estratégias da engenharia de microbiomas. Para esta pesquisa, foram utilizadas técnicas como o enriquecimento e a aclimação de micro-organismos especializados, o bioaumento e a manipulação controlada das

condições operacionais. Estas estratégias foram adotadas devido ao baixo custo e à facilidade de implementação em estações de tratamento de águas residuárias.

As estratégias da engenharia de microbiomas, aplicadas ao longo de seis fases operacionais, resultaram em variações significativas na eficiência de remoção de diferentes espécies de nitrogênio, como o nitrogênio amoniacal, o inorgânico e o total (FIGURA 4.16).

FIGURA 4.16 – EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE NAT, NITROGÊNIO INORGÂNICO E NITROGÊNIO TOTAL PARA R1 E R2

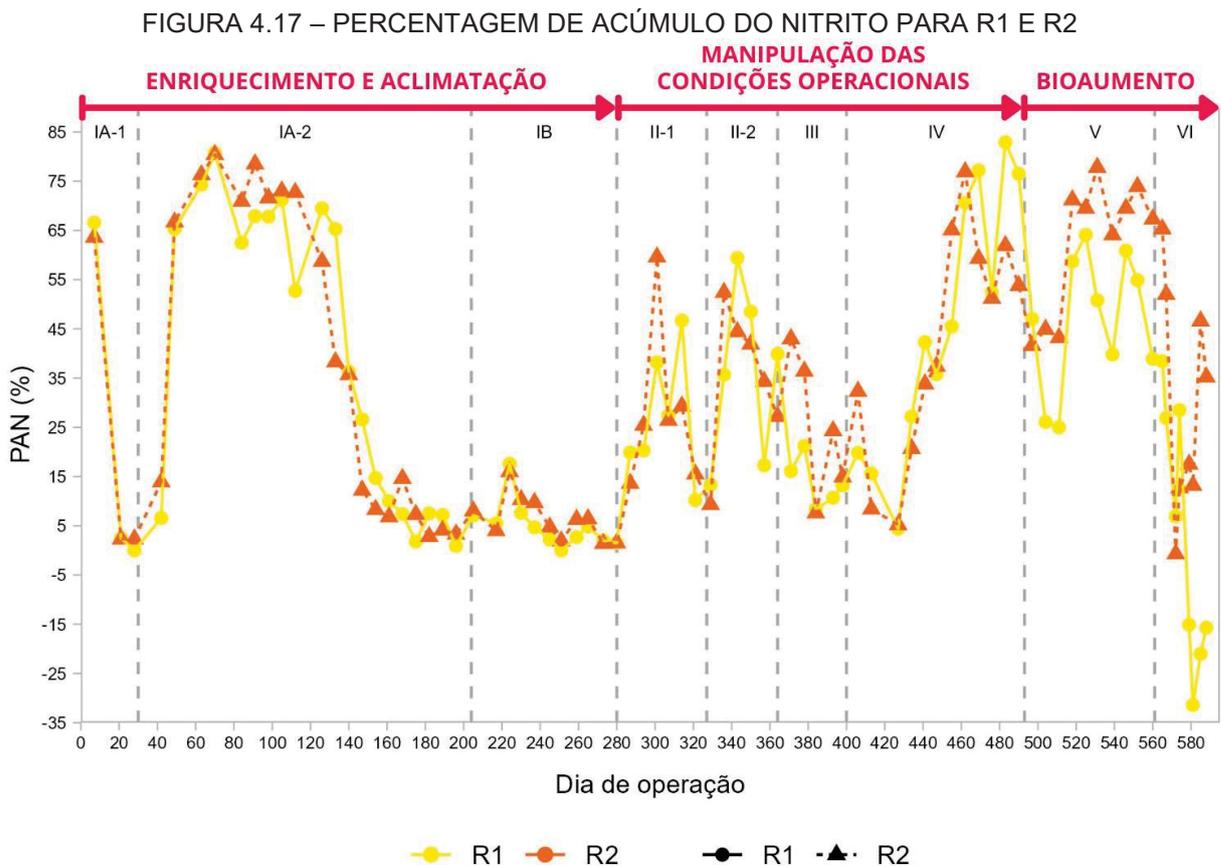


FONTE: a autora (2024)

NOTA: NAT: nitrogênio amoniacal total; N: nitrogênio.

Ao longo da operação de R1 e R2 sob a aplicação de diferentes estratégias da engenharia de microbiomas, a eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal variou entre 1,4% (fase IA-1) e 100% (fase IA-2), conforme FIGURA 4.16. As eficiências de remoção de outras formas de nitrogênio também apresentaram variações significativas durante a operação, de -1,5% (fase IA-1) a 74,2% (fase IA-2) para o nitrogênio inorgânico, e de 3,1% (fase V) a 68,3% (fase IB) para o nitrogênio total (FIGURA 4.16). Estas variações sugerem que as estratégias influenciaram de formas distintas na atividade da microbiota de R1 e R2.

Além da eficiência de remoção do nitrogênio, a aplicação de diferentes estratégias da engenharia de microbiomas também impactou a atividade dos microorganismos consumidores do nitrito, como sugerem os resultados para a porcentagem de acúmulo do nitrito (PAN) durante a operação de R1 e R2 (FIGURA 4.17). Ao longo de 600 dias de operação, a PAN variou entre -31,4% (fase VI) e 82,9% (fase IV).



FONTE: a autora (2024)

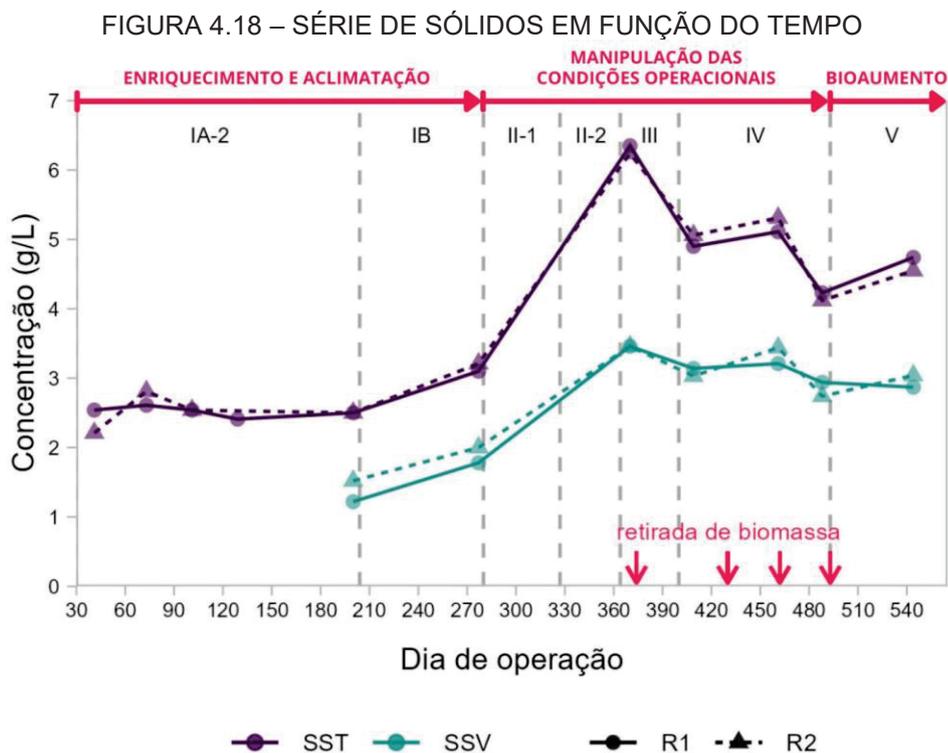
NOTA: PAN: porcentagem de acúmulo do nitrito.

Em função das variações observadas na eficiência e estabilidade dos bioprocessos de remoção do nitrogênio amoniacal do lixiviado, os resultados relacionados à aplicação de cada estratégia da engenharia de microbiomas são apresentados separadamente a seguir.

4.3.1 Enriquecimento da microbiota nitrificante e aclimação ao lixiviado

A primeira estratégia da engenharia de microbiomas avaliada foi o enriquecimento da microbiota nitrificante no lodo inoculado nos biorreatores, seguido pela aclimação ao lixiviado, realizados nas fases IA e IB, respectivamente. Para ambas as fases, a concentração de nitrogênio amoniacal total (NAT) do afluente era de 160 mg N L^{-1} , enquanto a carga volumétrica era igual a $40 \text{ mg N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. As fases diferiram apenas em relação ao afluente alimentado a R1 e R2, que foi meio mineral, para IA, e lixiviado diluído, para IB.

Um dos primeiros efeitos observados durante as etapas de enriquecimento e aclimação da microbiota do lodo inoculado em R1 e R2 foi a baixa taxa de crescimento celular. A quantidade de lodo inoculado em R1 e R2 foi calculada para obter concentração inicial de sólidos suspensos totais (SST) de aproximadamente 3 g L^{-1} no licor misto. Contudo, durante as fases IA e IB, foi observada a redução da concentração de SST, que permaneceu abaixo de 3 g L^{-1} (FIGURA 4.18) e esteve possivelmente associada à degradação celular da biomassa inoculada. A concentração de SST ultrapassou 3 g L^{-1} somente após 270 dias de operação, no final da fase de aclimação ao lixiviado (IB).



FONTE: a autora (2024)

NOTA: SST: sólidos suspensos totais; SSV: sólidos suspensos voláteis.

Além da concentração de SST no licor misto de R1 e R2, a concentração de sólidos suspensos voláteis (SSV) também foi monitorada ao longo da operação (FIGURA 4.18). Como os sólidos voláteis são compostos por células microbianas e matéria orgânica, a sua concentração reflete indiretamente a densidade celular da biomassa durante a operação dos biorreatores. O perfil de variação dos sólidos suspensos voláteis apresentou padrão semelhante ao dos sólidos suspensos totais, sugerindo forte correlação entre os dois parâmetros e reforçando a baixa taxa de crescimento celular observada durante a aclimação da biomassa.

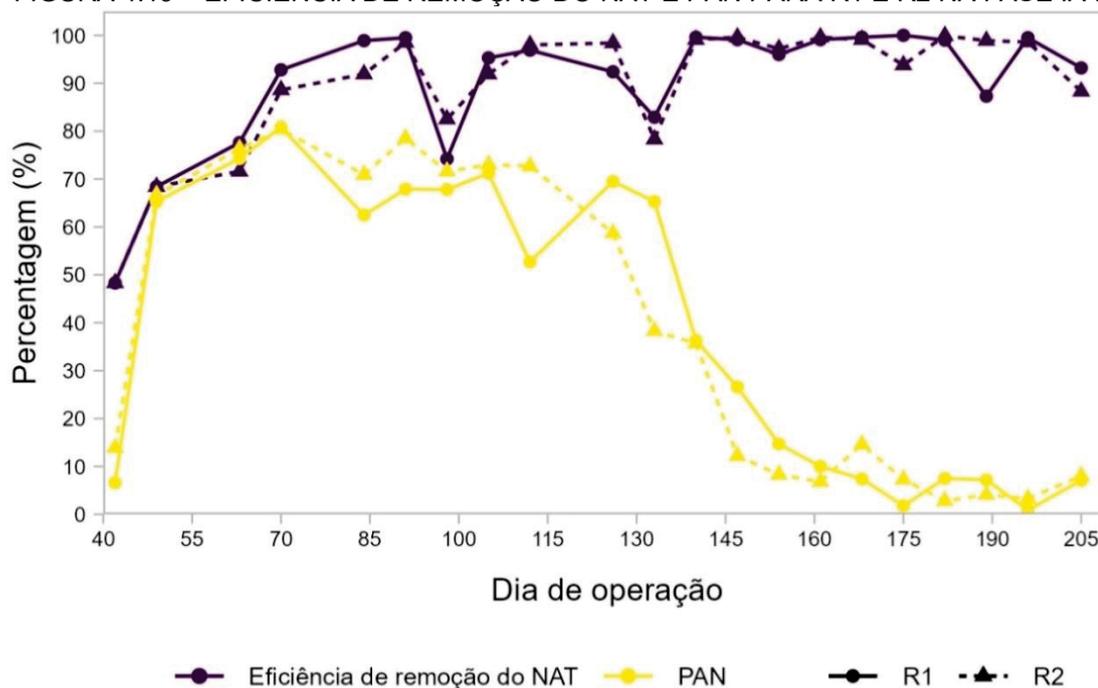
Com base na concentração de sólidos suspensos totais (SST), foi estimada a velocidade de produção de SST ao longo da operação dos biorreatores. Durante a fase IB, correspondente à aclimação da microbiota ao lixiviado, a velocidade de produção de SST foi igual a $0,008 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ para R1 e $0,009 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ para R2. Já no intervalo entre as fases II-1 e II-2, após a aclimação da microbiota, a velocidade aumentou para $0,035 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ para R1 e $0,032 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ para R2, valores 3,5 a 4,5 vezes superiores aos determinados na fase de aclimação ao lixiviado (IB).

A baixa taxa de crescimento celular observada durante o enriquecimento e aclimação da microbiota sugere a adaptação gradual da biomassa às novas condições ambientais em R1 e R2. Cabe ressaltar que o lodo inoculado nos biorreatores não foi previamente aclimatado às condições operacionais aplicadas, o que pode ter contribuído para o prolongado período de adaptação.

Apesar da reduzida taxa de crescimento celular e baixa produção de sólidos, o enriquecimento da microbiota, realizado durante a fase IA-2 com a alimentação de meio mineral isento de carbono orgânico, resultou em elevadas eficiências para a remoção do nitrogênio amoniacal (FIGURA 4.19).

Para o biorreator R1, a eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal (NAT) variou entre 48,3% e 100,0%, e a média foi de 90,4%. Resultados semelhantes foram obtidos para R2, com a eficiência de remoção do NAT variando entre 48,3% e 99,9%, e média igual a 90,0%. Para ambos os biorreatores, valores próximos a 90% de eficiência de remoção do NAT foram alcançados após aproximadamente 30 dias de operação na fase IA-2 (FIGURA 4.19), período que provavelmente correspondeu ao enriquecimento e aclimação das bactérias oxidantes da amônia (BOA) às condições operacionais.

FIGURA 4.19 – EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DO NAT E PAN PARA R1 E R2 NA FASE IA-2



FONTE: a autora (2024)

NOTA: NAT: nitrogênio amoniacal total; PAN: porcentagem de acúmulo do nitrito.

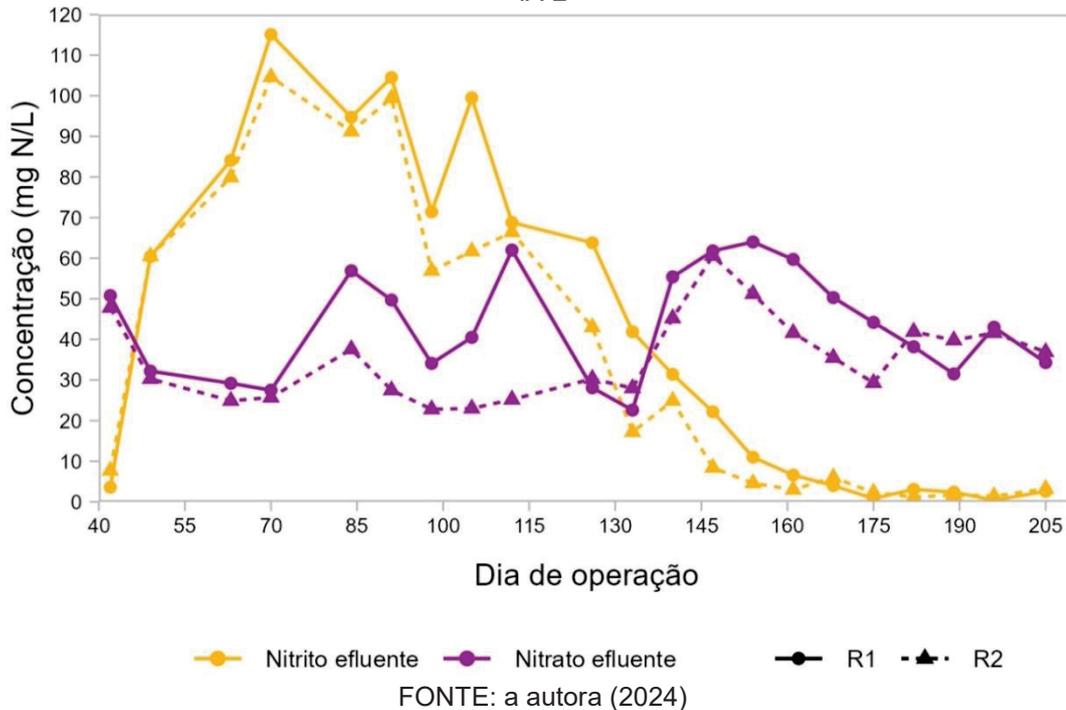
Durante o enriquecimento da microbiota nitrificante (fase IA-2), para ambos os biorreatores, a porcentagem de acúmulo do nitrito (PAN) apresentou tendência de aumento entre os primeiros 30 a 40 dias (FIGURA 4.19). Para R1, a PAN aumentou de 6,6% para 80,8% após aproximadamente 30 dias. De forma semelhante, para R2, a PAN aumentou de 13,9% para 80,4% no mesmo período. O aumento da PAN coincidiu com a elevação da eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal. Esta observação sugere que o nitrito acumulado no efluente dos biorreatores nos primeiros 30 dias da fase IA-2 foi produzido pela oxidação do nitrogênio amoniacal pelas BOA, cuja atividade metabólica provavelmente intensificou devido à aclimação às condições operacionais.

Após o aumento da PAN nos primeiros 30 dias da fase de enriquecimento da microbiota, os valores para ambos os biorreatores mantiveram-se relativamente estáveis e acima de 58% por aproximadamente 60 dias. Contudo, a partir do 126º dia de operação, a PAN diminuiu progressivamente até que fossem observados valores inferiores a 10% (FIGURA 4.19).

A tendência observada para a PAN ao longo do enriquecimento da microbiota foi semelhante à da concentração de nitrito no efluente dos biorreatores (FIGURA 4.20). Tanto para R1 quanto para R2, a concentração de nitrito aumentou progressivamente durante os primeiros 30 dias do enriquecimento, até atingir os

valores máximos de 115 mg N L^{-1} para R1 e 105 mg N L^{-1} para R2. No entanto, entre 110 e 120 dias após o início da fase IA-2, a concentração do nitrito diminuiu e permaneceu inferior a 10 mg N L^{-1} (FIGURA 4.20).

FIGURA 4.20 – CONCENTRAÇÃO DE NITRITO E NITRATO NO EFLUENTE DE R1 E R2 NA FASE IA-2

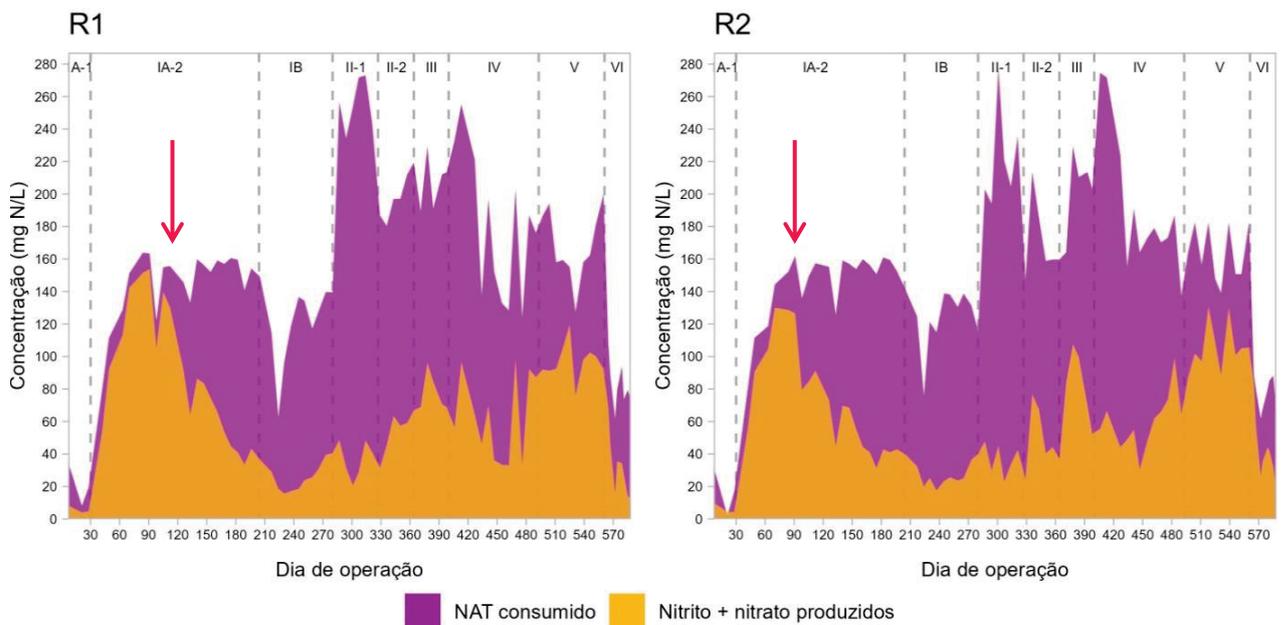


Os resultados para a PAN e para a concentração de nitrito indicam que o nitrito acumulado no efluente de R1 e R2 durante os primeiros 40 dias da fase IA-2 foi quase completamente consumido até o final da etapa de enriquecimento da microbiota. Em contraste, a concentração de nitrato no efluente, resultante do metabolismo das bactérias oxidantes do nitrito (BON), não apresentou tendência clara ao longo da fase IA-2, ora aumentando, ora diminuindo (FIGURA 4.20).

A produção de nitrato nos biorreatores, que variou entre 23 e 64 mg N L^{-1} durante o enriquecimento da microbiota na fase IA-2 (FIGURA 4.20), indica que as BON estavam metabolicamente ativas e aclimatadas às condições operacionais aplicadas. Este resultado está de acordo com o obtido por Miao e colaboradores (2017), que investigaram a remoção de nitrogênio de esgoto doméstico via combinação da nitrificação parcial e do processo *anammox*. Os autores observaram que o regime de aeração contínuo, como o aplicado durante a fase IA-2 deste estudo, esteve associado ao enriquecimento e aclimação das BON e à produção de elevadas concentrações de nitrato no efluente a partir do seu metabolismo.

Apesar dos resultados para a concentração de nitrito e nitrato no efluente de R1 e R2 indicarem que as BOA e BON estavam metabolicamente ativas, sugere-se que a maior parte do nitrogênio amoniacal afluente tenha sido convertida a diferentes espécies de nitrogênio por processos distintos da nitrificação no final da fase IA-2. Se a nitrificação estivesse ocorrendo pela ação conjunta das BOA e BON, o nitrogênio amoniacal consumido seria majoritariamente convertido em nitrito e nitrato, que seriam acumulados no efluente dos biorreatores. Este comportamento foi de fato observado nos primeiros 70 a 100 dias de operação (FIGURA 4.21), o que sugere que, durante este período, a nitrificação predominou sobre outros bioprocessos e o nitrogênio amoniacal do substrato foi quase completamente convertido a nitrito e nitrato.

FIGURA 4.21 – NITROGÊNIO AMONIAICAL TOTAL CONSUMIDO E NITRITO E NITRATO PRODUZIDOS EM R1 E R2



FONTE: a autora (2024)

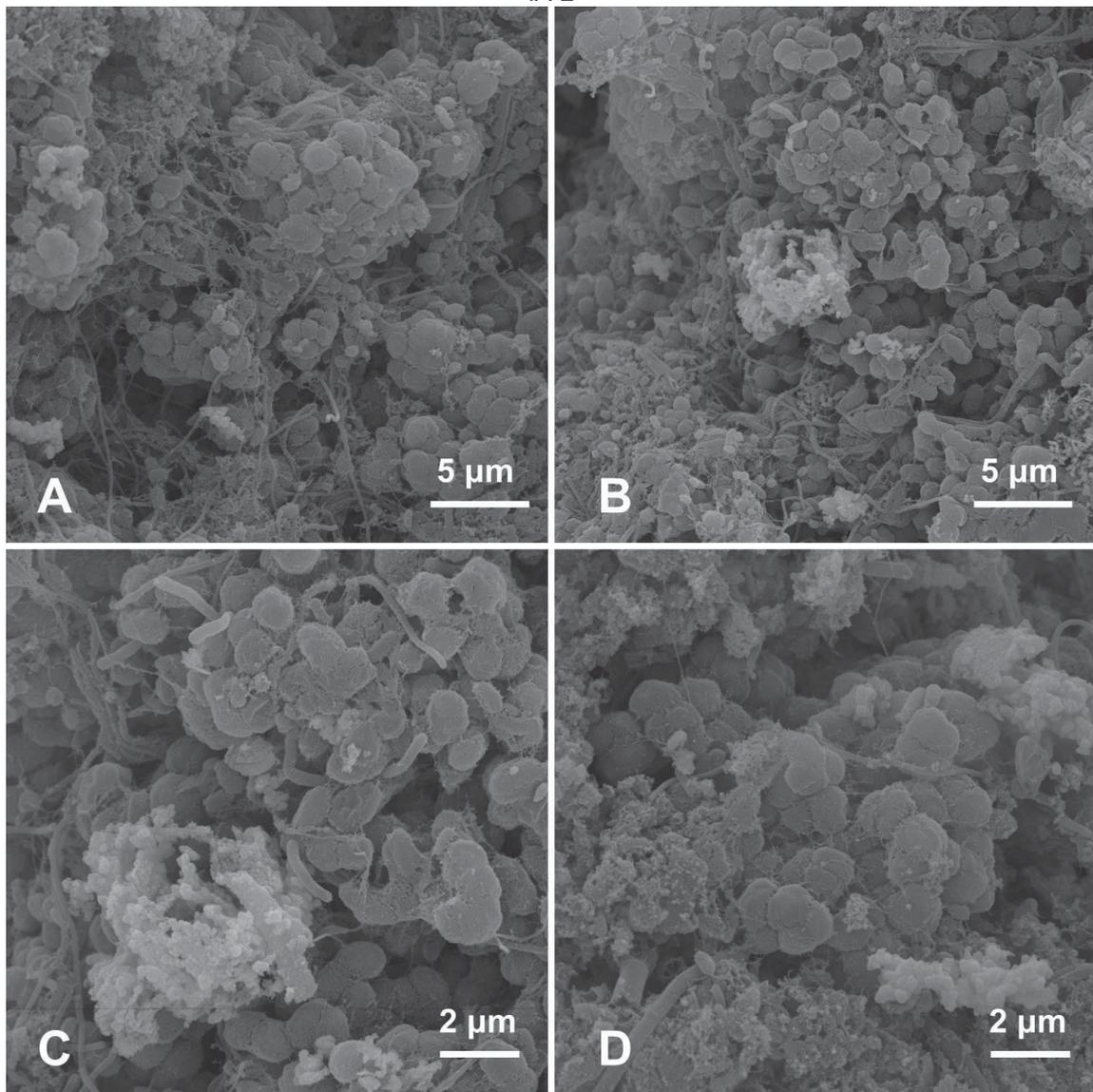
NOTA: NAT: nitrogênio amoniacal total; as setas apontam para o início do declínio acentuado da produção do nitrito e nitrato em comparação com o NAT consumido nos biorreatores.

Entretanto, após aproximadamente 100 dias da operação de R1 e 70 dias de R2, as concentrações de nitrito e nitrato produzidos diminuíram acentuadamente em comparação à concentração do nitrogênio amoniacal consumido (FIGURA 4.21). Este padrão, observado a partir da segunda metade da fase de enriquecimento (IA-2), sugere que outros bioprocessos além da nitrificação, como a desnitrificação, podem ter contribuído para a redução da concentração de nitrito e de nitrato no

efluente de R1 e R2. Também é possível que parte do nitrogênio amoniacal afluente tenha sido convertida em nitrogênio orgânico e assimilada pelas células microbianas, adsorvida nos flocos biológicos ou volatilizada como amônia.

O enriquecimento, realizado com meio mineral sem carbono orgânico e concentração relativamente baixa de NAT (160 mg N L^{-1}), resultou na colonização dos flocos biológicos por grupos morfológicamente diversos e abundantes de microorganismos (FIGURA 4.22). Estes resultados, juntamente com a elevada eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal observada durante a fase IA-2, sugerem que o enriquecimento da biomassa foi bem-sucedido.

FIGURA 4.22 – MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA DO LODO DE R1 E R2 – FASE IA-2

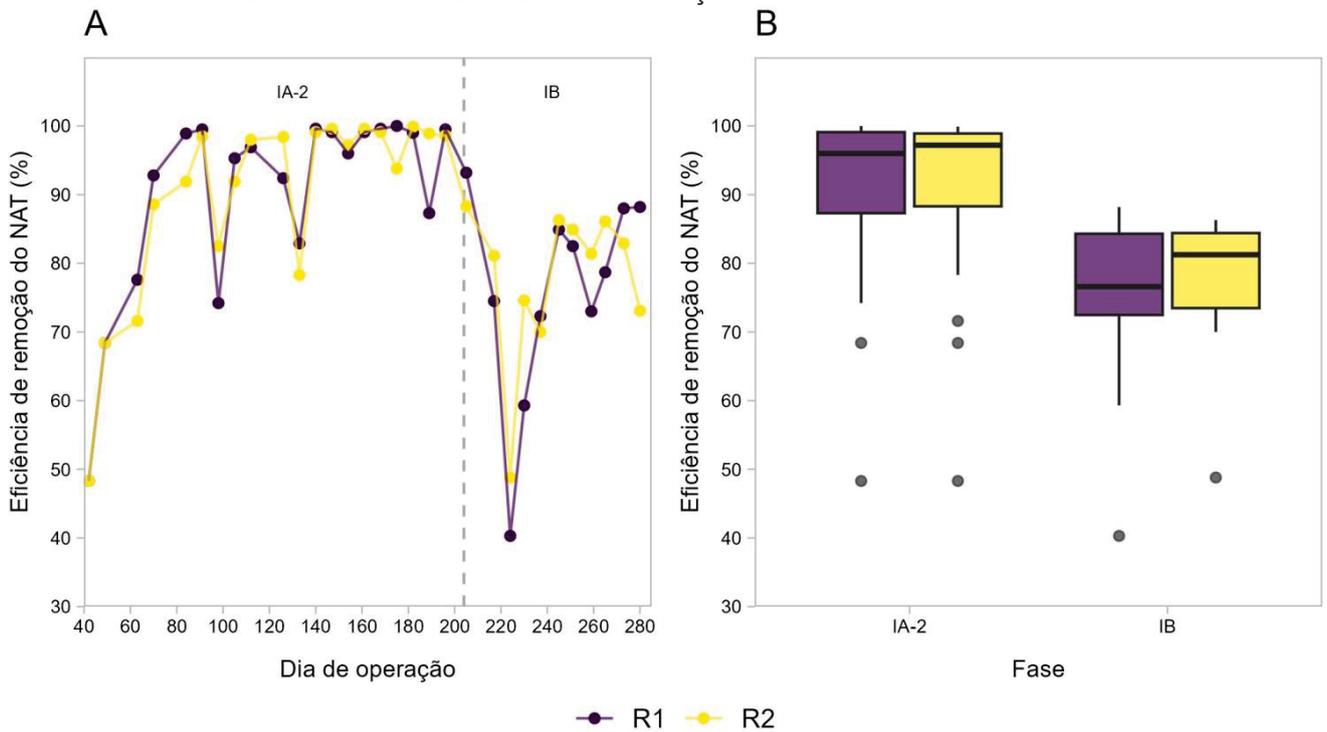


FONTE: a autora (2024)

LEGENDA: A: flocos biológicos coletados de R1 na fase IA-2 (201º d); B, C e D: flocos biológicos coletados de R2 na fase IA-2 (201º d); aumento: A e B: 10000x; C e D: 20000x.

O enriquecimento da microbiota e a colonização dos flocos biológicos por micro-organismos diversos (FIGURA 4.22) podem ter contribuído para a adaptação microbiana ao lixiviado diluído na fase seguinte (IB), como sugerem os resultados referentes à eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal (FIGURA 4.23). Na fase IB, para atingir a concentração afluente desejada para o NAT (160 mg N L^{-1}), o lixiviado foi diluído cerca de quatro vezes, isto é, uma parte de lixiviado para três partes de água de torneira.

FIGURA 4.23 – EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DO NAT NAS FASES IA-2 E IB



FONTE: a autora (2024)
NOTA: NAT: nitrogênio amoniacal total.

Devido à mudança do substrato, isto é, do meio mineral (fase IA-2) para o lixiviado diluído (fase IB - aclimação da microbiota ao lixiviado), a eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal diminuiu acentuadamente nos primeiros 20 dias de operação desta fase (FIGURA 4.23 A). Isso pode ser atribuído à inibição temporária da atividade das bactérias oxidantes da amônia após a exposição ao lixiviado. Salienta-se que a eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal aumentou novamente após cerca de 40 dias do início da fase IB e permaneceu relativamente estável por mais 40 dias, até o encerramento dessa etapa, o que sugere a aclimação das BOA às novas condições operacionais.

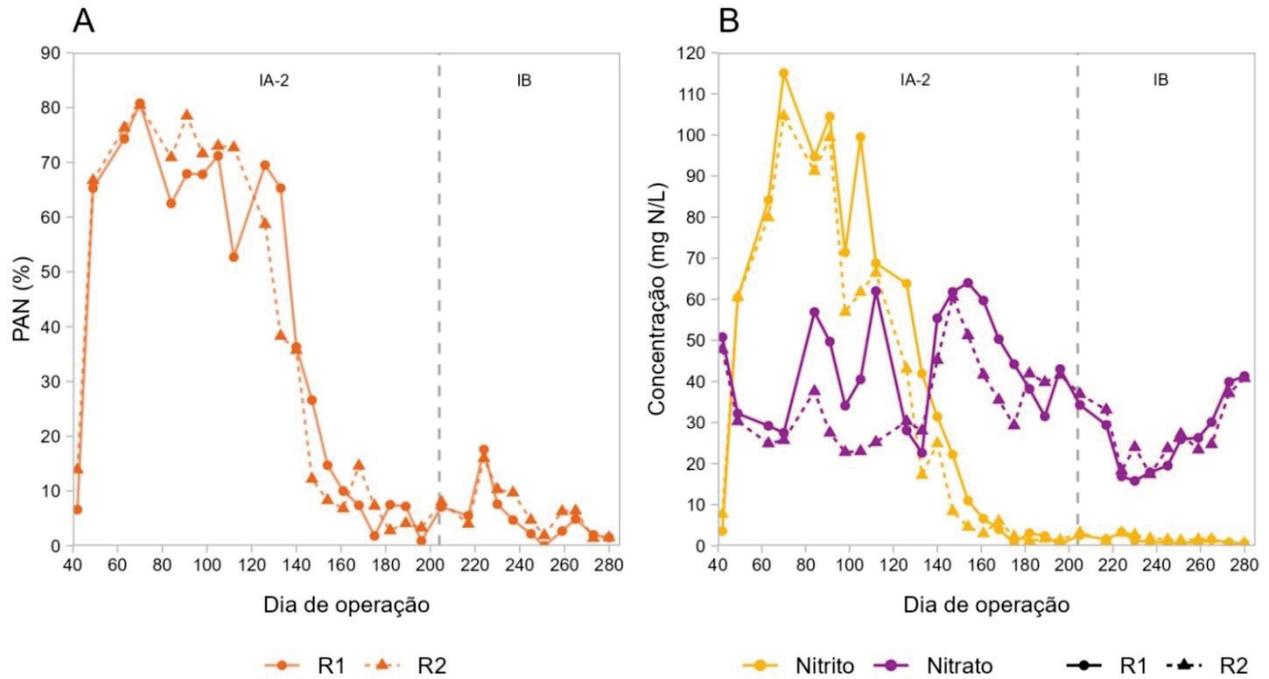
Durante a fase IB, a eficiência de remoção do NAT em R1 variou entre 40,3% e 88,2%, com média igual a 74,2% (FIGURA 4.23 B). Já para R2, a eficiência de remoção do NAT variou entre 48,8% e 86,3%, com média de 76,9% (FIGURA 4.23 B). Para ambos os biorreatores, os resultados da eficiência de remoção do NAT foram significativamente diferentes daqueles obtidos na fase anterior, IA-2 (Teste de Kruskal-Wallis com correção de Benjamini e Hochberg - BH, $p \leq 0,05$). A redução significativa da eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal pode ser atribuída à inibição da microbiota, causada pela substituição do substrato, isto é, meio mineral por lixiviado, diluído cerca de quatro vezes, na fase IB.

Magrí e colaboradores (2021) observaram efeitos inibitórios similares aos identificados neste estudo ao substituir água residuária sintética por lixiviado de aterro sanitário em um reator em bateladas sequenciais em escala piloto aplicado ao processo *anammox*. A atividade específica das bactérias *anammox* frente ao lixiviado diminuiu mais de 10 vezes em comparação à operação com meio mineral. A redução da atividade microbiana foi associada às características químicas do lixiviado e à presença de diversas substâncias potencialmente interferentes.

Durante a aclimação da microbiota ao lixiviado na fase IB, a porcentagem de acúmulo do nitrito variou entre 0% e 17,6% para R1, e entre 1,4% e 16,0% para R2 (FIGURA 4.24 A). Neste mesmo período, a concentração de nitrito no efluente variou entre 0,6 mg N L⁻¹ e 1,3 mg N L⁻¹ para R1, e entre 0,5 mg N L⁻¹ e 3,2 mg N L⁻¹ para R2 (FIGURA 4.24 B). Os baixos valores obtidos para a PAN e para a concentração de nitrito no efluente, semelhantes aos do final da fase IA-2, sugerem que a atividade das BON e outros consumidores do nitrito não foi significativamente afetada pela operação dos biorreatores com lixiviado diluído na fase IB.

A manutenção da atividade metabólica das BON durante a aclimação ao lixiviado na fase IB foi evidenciada também pela produção e acúmulo do nitrato no efluente dos biorreatores (FIGURA 4.24 B). Embora a concentração de nitrato tenha diminuído nos primeiros 30 dias da fase IB, possivelmente devido à inibição temporária das BON pelo lixiviado, a nitratação foi gradualmente retomada após este período. A concentração do nitrato durante a fase IB em R1 variou entre 15,8 mg N L⁻¹ e 41,3 mg N L⁻¹, com média de 26,3 mg N L⁻¹, enquanto em R2 a concentração do nitrato variou entre 17,4 mg N L⁻¹ e 40,8 mg N L⁻¹, com média de 27,0 mg N L⁻¹.

FIGURA 4.24 – PERCENTAGEM DE ACÚMULO DO NITRITO E CONCENTRAÇÃO EFLUENTE DE NITRITO E NITRATO NAS FASES IA-2 E IB



FONTE: a autora (2024)

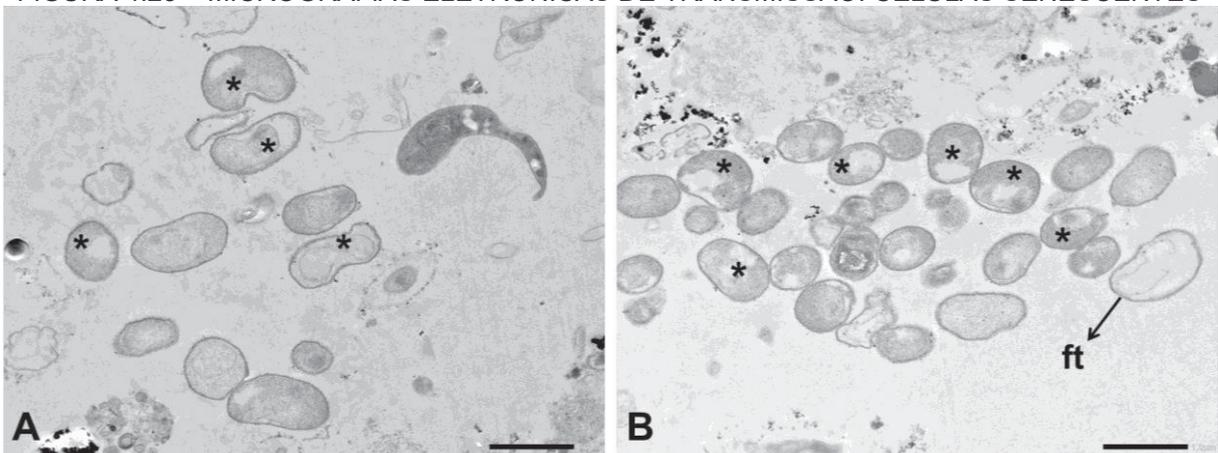
NOTA: PAN: percentagem de acúmulo do nitrito.

Assim como na fase IA-2, a elevada eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal (média superior a 74% na fase IB, para ambos os biorreatores), associada às baixas concentrações de nitrito e nitrato no efluente, sugere que processos distintos da nitrificação possam ter ocorrido em R1 e R2. O nitrogênio amoniacal do lixiviado pode ter sido assimilado pelas células microbianas em crescimento, convertido em nitrogênio orgânico, ou perdido por volatilização. Além disso, a desnitrificação e o processo *anammox* também podem ter ocorrido, resultando na remoção do NAT, nitrito e nitrato ao transformá-los em gases como NO, N₂O e/ou N₂.

A desnitrificação heterotrófica, que contribui para a remoção do nitrito e do nitrato, requer carbono orgânico, que pode ter sido suprido pela matéria orgânica presente no lixiviado. O lixiviado utilizado na fase IB apresentou relação DBO₅/DQO de 0,39, indicando que cerca de 39% da DQO total era biodegradável. Nesta fase, a eficiência média de remoção da DQO total foi igual a 37,1% para R1 e 39,0% para R2. Estes resultados sugerem que mais de 95% da matéria orgânica biodegradável do lixiviado foi removida em ambos os biorreatores, podendo ter sido consumida por micro-organismos desnitrificantes.

Juntamente com a matéria orgânica do lixiviado, o decaimento celular pode ter fornecido o carbono orgânico necessário para a desnitrificação. Nas micrografias eletrônicas de transmissão apresentadas na FIGURA 4.25, podem ser observadas células com citoplasma translúcido e descolado da parede celular, além de "células-fantasma", isto é, células em estágio de morte, com a parede celular intacta, mas sem conteúdo citoplasmático. Estas características indicam o envelhecimento e morte celular, comuns em sistemas de tratamento com elevada idade de lodo, como R1 e R2. As células em decomposição podem fornecer carbono e nutrientes, favorecendo a ocupação de diferentes nichos microbianos.

FIGURA 4.25 – MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE TRANSMISSÃO: CÉLULAS SENESCENTES



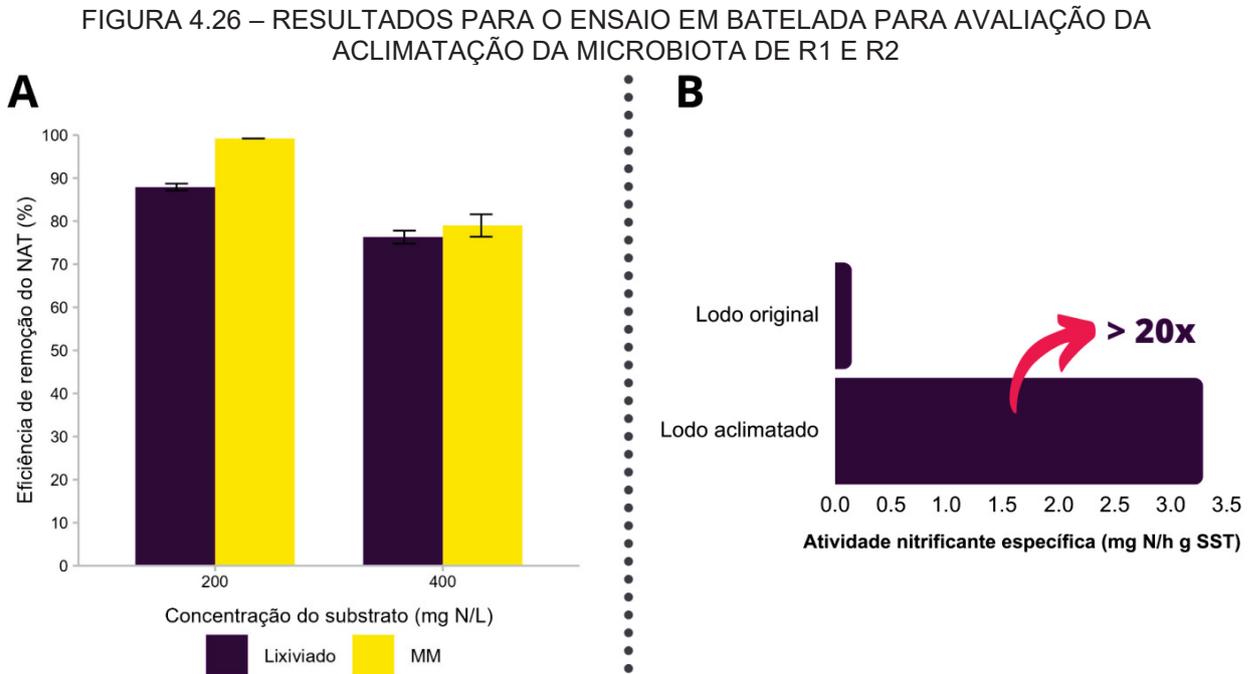
FONTE: a autora (2024)

NOTA: aumento: A e B: 8000x; a barra corresponde a 1 μm ; os descolamentos citoplasmáticos, característicos de células senescentes, são indicados por asteriscos (*); ft: célula-fantasma.

Para avaliar o efeito da aclimação da microbiota de R1 e R2 sobre a eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal, foi realizado um ensaio em batelada para a determinação do consumo de NAT após 24 horas de incubação (FIGURA 4.26 A). A atividade nitrificante foi avaliada para dois substratos distintos, ambos com a mesma concentração inicial de nitrogênio (200 mg N L^{-1} e 400 mg N L^{-1}), isto é, meio mineral e lixiviado de aterro sanitário. O lodo utilizado nos experimentos foi retirado dos biorreatores na fase V (no 549º dia de operação), após o processo de enriquecimento e aclimação da microbiota ao lixiviado.

Quando a concentração do nitrogênio amoniacal afluyente era de aproximadamente 200 mg N L^{-1} , foram obtidas eficiências médias de remoção do NAT após 24 horas de incubação de 87,9% para o lixiviado diluído e 99,2% para o meio mineral. Por outro lado, para a concentração afluyente de 400 mg N L^{-1} , a

eficiência média de remoção do NAT resultou em 76,3% para o lixiviado e 79,0% para o meio mineral (FIGURA 4.26), também após 24 horas.



FONTE: a autora (2024)

NOTA: MM: meio mineral; NAT: nitrogênio amoniacal total.

Comparativamente, antes do enriquecimento e aclimação do lodo nos biorreatores R1 e R2, a eficiência de remoção do NAT após 24 horas para um ensaio em batelada utilizando meio mineral como substrato foi igual a 27,2% (Seção 4.1). Portanto, para o mesmo lodo, após o enriquecimento e aclimação da microbiota, a eficiência de remoção do NAT do meio mineral utilizado como substrato foi cerca de três vezes superior àquela obtida para o lodo antes da realização desses processos.

A atividade nitrificante específica da microbiota, estimada a partir da velocidade de consumo do NAT e da quantidade de biomassa, foi comparada àquela determinada na etapa de caracterização do lodo inoculado em R1 e R2 (Seção 4.1.1). Para aquele caso, a atividade nitrificante específica quando o meio mineral foi utilizado como substrato foi de $0,15 \text{ mg N h}^{-1} \text{ g}_{\text{SST}}^{-1}$. Em contrapartida, após o enriquecimento e a aclimação da microbiota, a atividade nitrificante específica aumentou para $3,29 \text{ mg N h}^{-1} \text{ g}_{\text{SST}}^{-1}$, valor 22 vezes superior ao obtido para o lodo não enriquecido e não aclimatado (FIGURA 4.26 B).

Ressalta-se ainda que a concentração afluyente do nitrogênio amoniacal em um dos experimentos pós-aclimação era igual a 400 mg N L^{-1} , 10 vezes superior àquela utilizada no ensaio para a caracterização do lodo ($\approx 40 \text{ mg N L}^{-1}$). Assim, a biomassa aclimatada não apenas apresentou maior atividade específica de consumo do NAT como também tolerou cargas maiores de nitrogênio amoniacal em comparação com a biomassa antes da inoculação nos biorreatores R1 e R2.

A tolerância a elevadas concentrações de nitrogênio amoniacal devido à aclimação da microbiota foi também observada por Wang e colaboradores (2010). Estes autores utilizaram dois lodos com a mesma origem, previamente aclimatados a concentrações de NAT de 60 mg N L^{-1} e 500 mg N L^{-1} , para tratar água residuária sintética com as concentrações de nitrogênio amoniacal variando entre 59 e 1152 mg N L^{-1} . O lodo previamente aclimatado a elevadas concentrações de nitrogênio amoniacal apresentou maiores taxas de remoção do NAT, além de maior resistência à inibição por amônia livre quando comparado com o lodo não aclimatado.

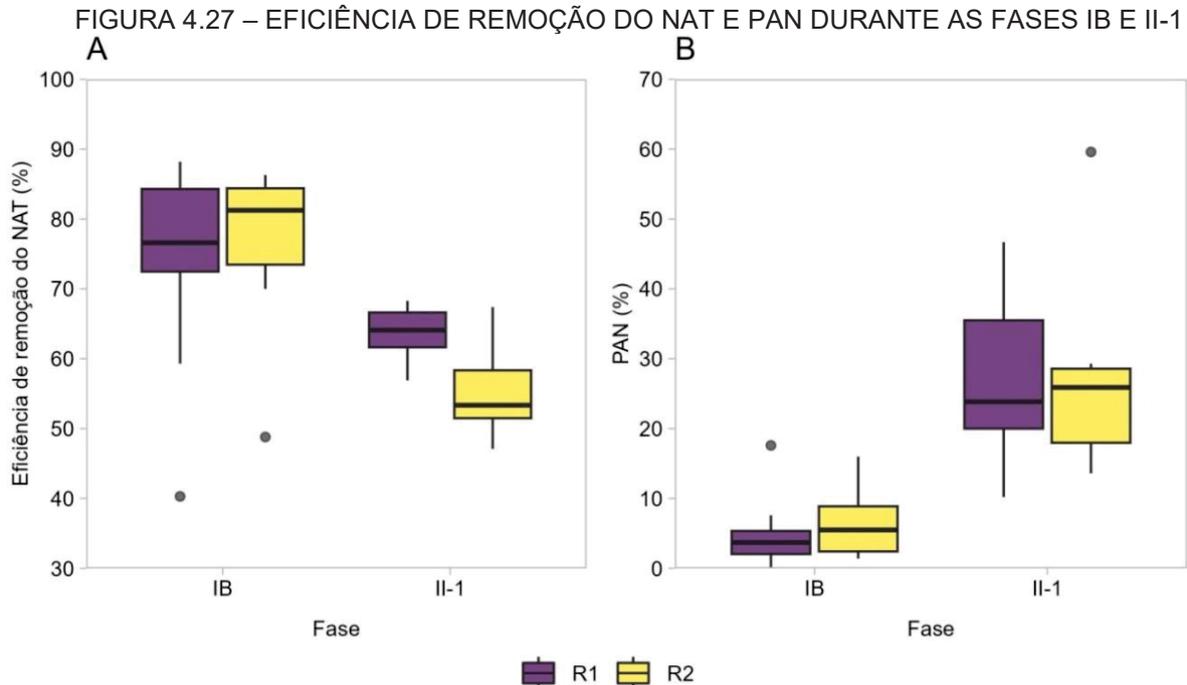
Em resumo, os resultados obtidos nesta pesquisa, juntamente com aqueles obtidos por outros autores, evidenciam a importância das etapas de enriquecimento e aclimação da microbiota para garantir a eficiência dos bioprocessos aplicados à remoção do nitrogênio amoniacal de águas residuárias, especialmente daquelas que apresentam composição complexa, como o lixiviado de aterro sanitário. Para lixiviados estabilizados, a aclimação pode contribuir para o aumento da tolerância dos micro-organismos às substâncias tóxicas presentes, facilitando a implementação de bioprocessos como a nitrificação parcial e o processo *anammox* (Fernandes; Madeira; de Araújo, 2022).

Além dessas estratégias da engenharia de microbiomas, a manipulação das condições operacionais também foi realizada com o objetivo de avaliar o seu efeito sobre a eficiência e a estabilidade da remoção do nitrogênio do lixiviado.

4.3.2 Manipulação das condições operacionais

A fase II iniciou após o enriquecimento e aclimação da microbiota de R1 e R2. Nesta fase, as condições operacionais foram modificadas, isto é, a carga volumétrica foi aumentada de $40 \text{ mg N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ para $100 \text{ mg N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, com a concentração afluyente do nitrogênio amoniacal tendo sido ajustada de 160 mg N L^{-1} para 400 mg N L^{-1} a partir da diluição do lixiviado com água de torneira em

proporção de, aproximadamente, 1:1. Foi observado que estas mudanças operacionais resultaram na redução da eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal e no aumento da PAN para ambos os biorreatores (FIGURA 4.27).



FONTES: a autora (2024)

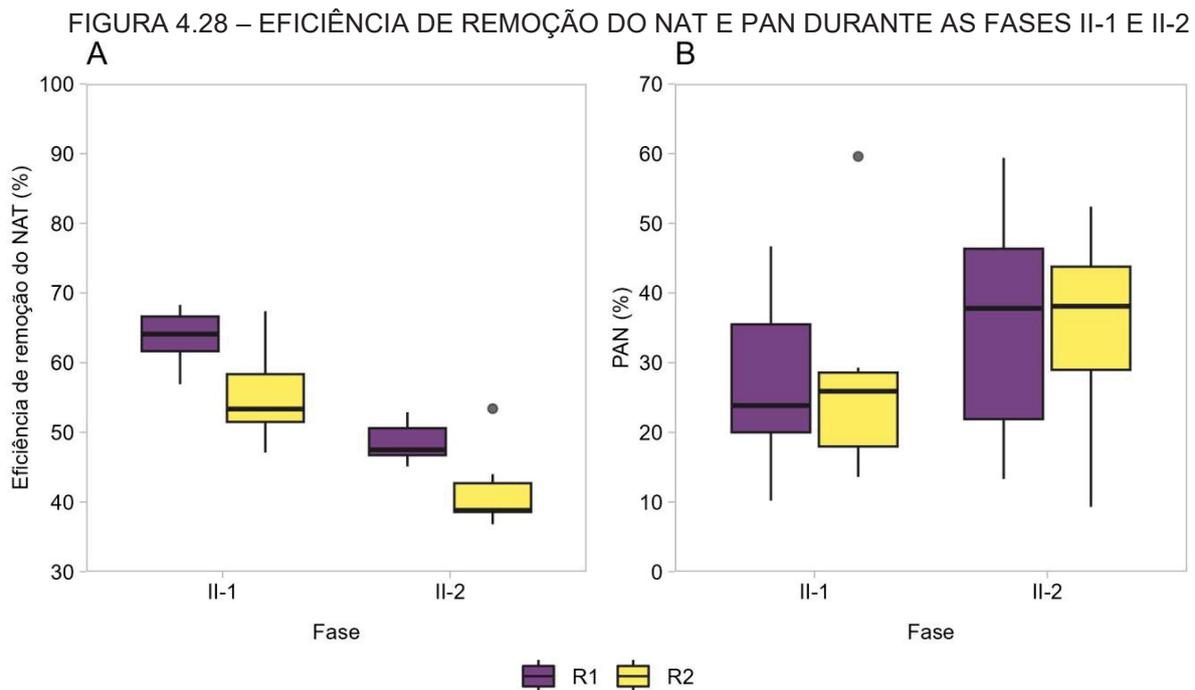
NOTA: NAT: nitrogênio amoniacal total; PAN: percentagem de acúmulo do nitrito.

Na fase II-1, a eficiência média de remoção do nitrogênio amoniacal foi de 63,6% para R1 e 55,4% para R2 (FIGURA 4.27 A). Os resultados para esta fase são significativamente diferentes daqueles obtidos na fase anterior, IB, de aclimatação ao lixiviado (Teste de Kruskal-Wallis com correção de BH, $p \leq 0,05$). A redução significativa da eficiência de remoção do NAT na fase II-1 sugere a inibição parcial da atividade das bactérias oxidantes da amônia devido ao aumento da concentração do lixiviado afluente e da carga volumétrica aplicada a ambos os biorreatores.

O aumento da carga volumétrica e da concentração do lixiviado também esteve associado a diferenças na PAN (FIGURA 4.27 B). Na fase II-1, a média da PAN foi de 27,1% para R1 e 28,3% para R2, valores maiores do que os obtidos na fase anterior, IB (4,8% para R1 e 6,2% para R2). Estes resultados indicam que o aumento da carga volumétrica e da concentração do lixiviado levou ao maior acúmulo de nitrito e à menor produção de nitrato, o que resultou no aumento da PAN. A análise estatística permitiu confirmar que os resultados da PAN são significativamente diferentes daqueles obtidos na fase IB, de aclimatação ao lixiviado

(Teste de Kruskal-Wallis com correção de BH, $p \leq 0,05$). O aumento da PAN durante a fase II-1 sugere ainda a inibição parcial das BON, que produzem nitrato a partir da oxidação do nitrito, devido a alterações nas condições operacionais.

Além da concentração do lixiviado alimentado aos biorreatores, as características físicas e químicas dessa água residuária podem ter interferido na atividade microbiana, como sugerem os resultados do desempenho de R1 e R2 na fase II-2 (FIGURA 4.28). Na fase II-1, foi utilizado como substrato o lixiviado coletado em março de 2023, enquanto na fase II-2 foi utilizado o lixiviado coletado em junho de 2023. As condições operacionais foram mantidas constantes em ambas as fases, sem alteração da carga volumétrica ou concentração do afluente. No entanto, devido às diferenças significativas no desempenho dos biorreatores com o lixiviado da segunda coleta, as etapas II-1 e II-2 foram analisadas separadamente.



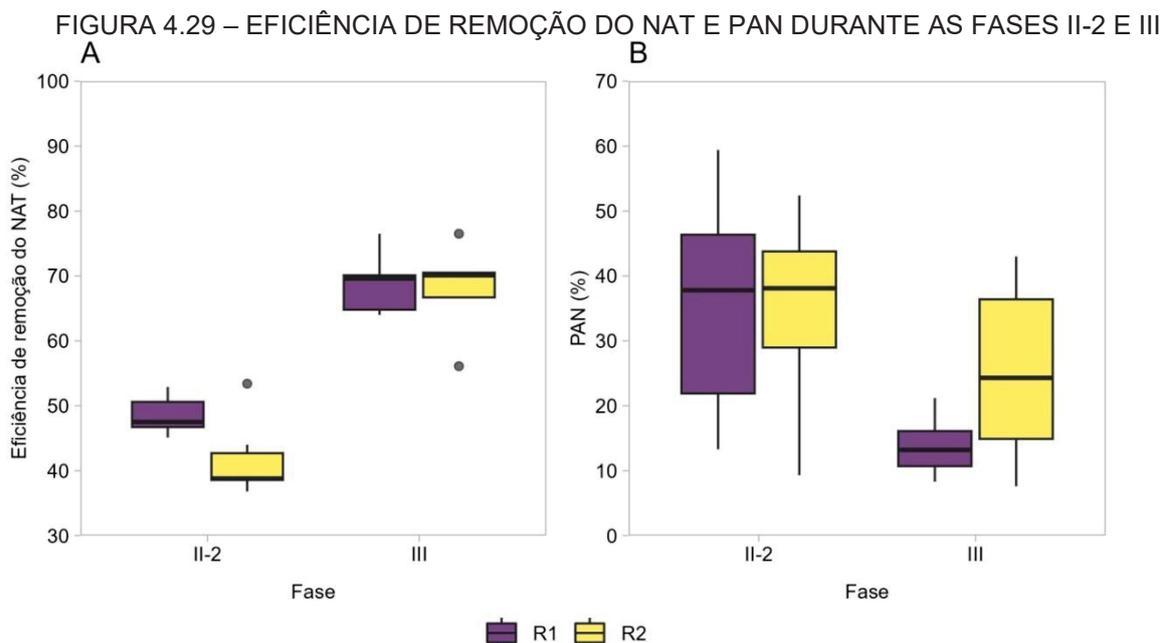
FONTE: a autora (2024)

NOTA: NAT: nitrogênio amoniacal total; PAN: percentagem de acúmulo do nitrito.

Em comparação à fase anterior (II-1), a eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal foi significativamente menor na fase II-2, para ambos os biorreatores (Teste de Kruskal-Wallis com correção de BH, $p \leq 0,05$) (FIGURA 4.28 A). Na fase II-2, com a utilização do lixiviado da segunda coleta, a eficiência média de remoção do NAT foi igual a 48,5% para R1 e 41,7% para R2.

Na fase II-2, a média obtida para a porcentagem de acúmulo do nitrito foi igual a 35,7% para R1 e 34,9% para R2 (FIGURA 4.28 B). Nas fases II-1 e II-2, diferentemente da eficiência de remoção do NAT, os resultados referentes à PAN não podem ser considerados significativamente diferentes entre si (Teste de Kruskal-Wallis com correção de BH, $p > 0,05$). Na fase II-2, a redução da eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal indica que as características do lixiviado estiveram associadas à inibição parcial da atividade das BOA tanto em R1 quanto em R2. Por outro lado, como não houve alteração significativa no acúmulo do nitrito, o efeito das características do substrato sobre as BON e outros consumidores do nitrito pode ter sido menos pronunciado do que sobre as BOA.

Devido à redução da eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal ocasionada pela troca do lixiviado na fase II-2, a carga volumétrica aplicada aos biorreatores e a concentração do afluente foram reduzidas. Assim, visando à reaclimação da microbiota ao lixiviado da segunda coleta, na fase III a carga volumétrica foi diminuída de $100 \text{ mg N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ para $80 \text{ mg N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, enquanto a concentração de NAT do lixiviado foi ajustada para 300 mg N L^{-1} mediante diluição de três vezes do lixiviado, isto é, uma parte de lixiviado para duas partes de água de torneira. Por sua vez, em ambos os biorreatores, essas mudanças operacionais estiveram associadas ao aumento significativo da eficiência de remoção do NAT em comparação à fase anterior (FIGURA 4.29).



FONTE: a autora (2024)

NOTA: NAT: nitrogênio amoniacal total; PAN: porcentagem de acúmulo do nitrito.

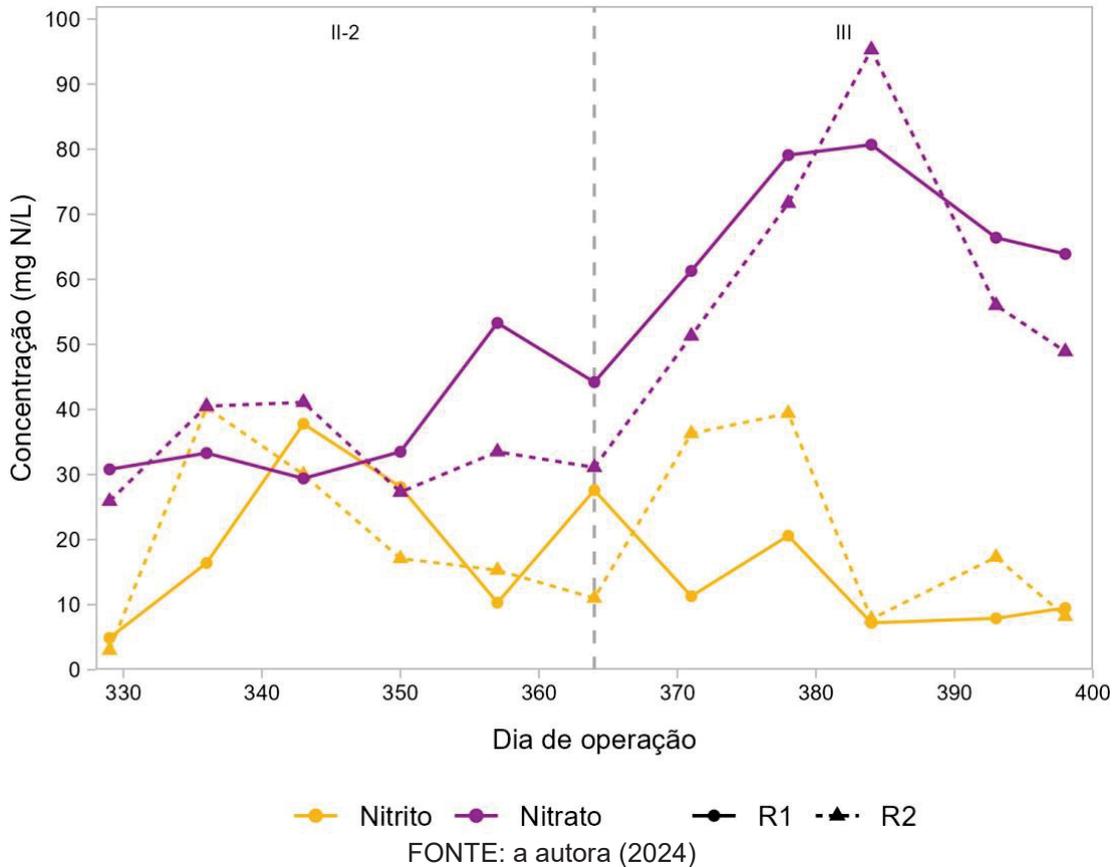
Com a redução da concentração do lixiviado alimentado aos biorreatores e, conseqüentemente, da carga volumétrica, a eficiência média de remoção do NAT aumentou para 69,0% para R1 e 68,0% para R2 (FIGURA 4.29 A). Na fase III, os resultados obtidos para a eficiência de remoção do NAT são significativamente diferentes daqueles obtidos para a fase II-2, em que o lixiviado da segunda coleta passou a ser alimentado aos biorreatores (Teste de Kruskal-Wallis com correção de BH, $p \leq 0,05$).

O aumento significativo da eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal após a redução da concentração do lixiviado sugere que a microbiota, especialmente as BOA, readaptou-se às condições operacionais da fase III. Os resultados para a eficiência de remoção do NAT nesta fase são, inclusive, semelhantes àqueles obtidos na fase IB, que consistiu na aclimação da microbiota ao lixiviado (74,2% para R1 e 76,9% para R2). Isto indica que a atividade das BOA pode ter sido recuperada e equiparada à observada na fase de adaptação ao substrato com baixa carga volumétrica.

A redução da concentração do lixiviado e da carga volumétrica também pode ter contribuído para o aumento da atividade das BON, como indicam os resultados da PAN na fase III (FIGURA 4.29 B). Nessa fase, a média para a PAN foi de 13,9% para R1 e 25,4% para R2. Apesar de não serem significativamente diferentes (Teste de Kruskal-Wallis com correção de BH, $p > 0,05$), estes resultados são inferiores aos obtidos na fase II-2 (35,7% para R1 e 34,9% para R2). A diminuição da PAN para ambos os biorreatores sugere que houve redução da concentração do nitrito acumulado no efluente, provavelmente devido ao aumento da produção de nitrato pelas BON em R1 e R2 durante a fase III.

O aumento da concentração do nitrato no efluente de R1 e R2 durante a fase III (FIGURA 4.30) também indica a recuperação da atividade das BON em função da redução da carga volumétrica e da concentração de NAT do lixiviado, de 400 mg N L⁻¹ para 300 mg N L⁻¹. Na fase anterior, II-2, a concentração média do nitrato foi igual a 37,4 mg N L⁻¹ para R1 e 33,2 mg N L⁻¹ para R2. Em contrapartida, na fase III, a concentração média de nitrato foi igual a 70,3 mg N L⁻¹ para R1 e 64,6 mg N L⁻¹ para R2, valores duas vezes maiores do que aqueles determinados na fase anterior, em que o lixiviado alimentado aos biorreatores era mais concentrado.

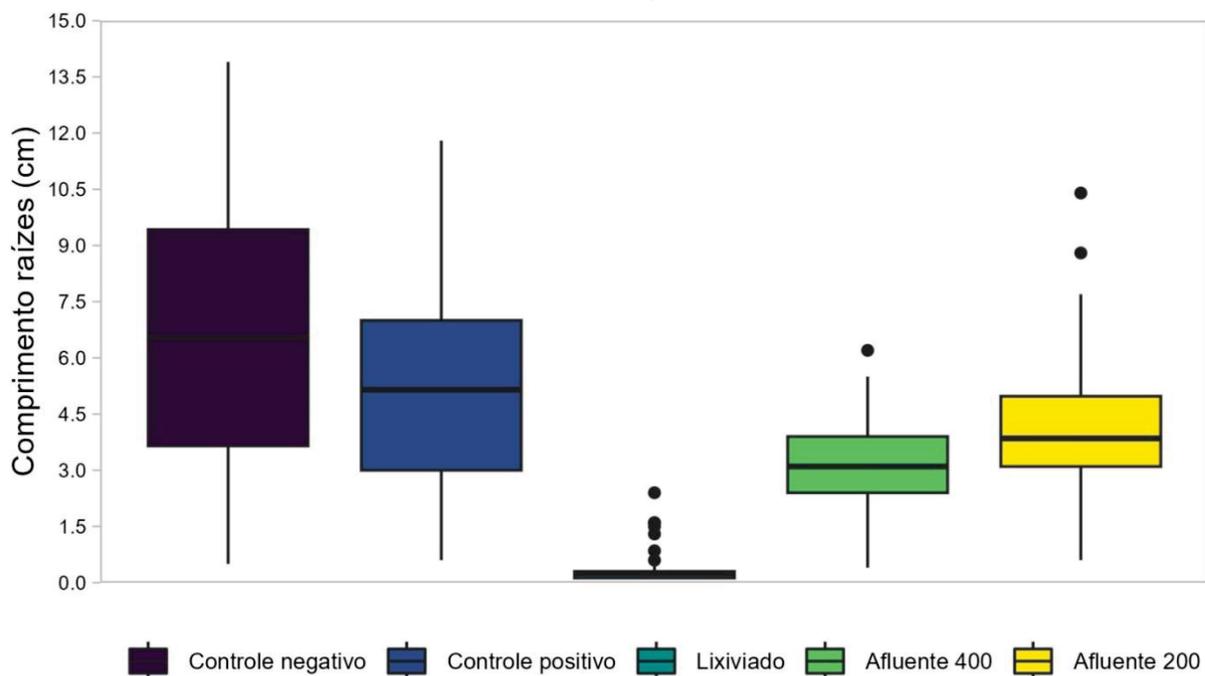
FIGURA 4.30 – CONCENTRAÇÃO EFLUENTE DE NITRITO E NITRATO DURANTE AS FASES II-2 E III



A redução da atividade microbiana associada ao aumento da concentração do lixiviado, especialmente o coletado em junho de 2023, pode ser atribuída à sua potencial toxicidade, avaliada a partir dos resultados para o ensaio com sementes de *Allium cepa* (FIGURA 4.31).

A exposição das sementes de *A. cepa* ao lixiviado não diluído resultou em menor comprimento das raízes em comparação ao controle negativo (FIGURA 4.31). A média do comprimento das raízes expostas ao lixiviado não diluído foi igual a 0,4 cm, enquanto para o controle negativo, foi igual a 6,7 cm. Além disso, os resultados associados à exposição das sementes de *A. cepa* ao lixiviado não diluído apresentaram diferenças estatisticamente significativas em comparação a todos os outros grupos analisados (Teste *t* de Welch com correção de Bonferroni, $p \leq 0,05$), o que indica o efeito tóxico acentuado do lixiviado sem diluição sobre o crescimento das raízes de *A. cepa* em comparação com os demais agentes avaliados.

FIGURA 4.31 – COMPRIMENTO DAS RAÍZES DE *A. cepa* APÓS EXPOSIÇÃO AOS AGENTES AVALIADOS



FONTE: a autora (2024)

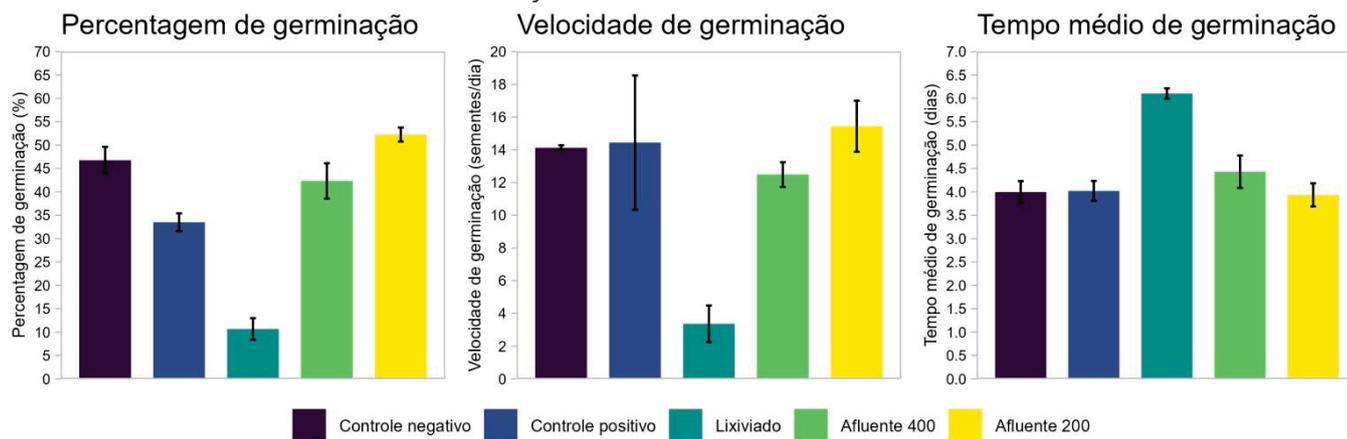
NOTA: Afluente 400: lixiviado diluído para concentração final de 400 mg N L⁻¹; Afluente 200: lixiviado diluído para concentração final de 200 mg N L⁻¹.

Para avaliar o efeito da diluição do lixiviado sobre o crescimento das raízes de *A. cepa*, foram testadas duas concentrações além do lixiviado bruto: i) lixiviado diluído quatro vezes (proporção entre lixiviado e água de 1:3), com concentração final de NAT de 200 mg N L⁻¹, e ii) lixiviado diluído duas vezes (proporção entre lixiviado e água de 1:1), com concentração final de NAT de 400 mg N L⁻¹. O comprimento médio das raízes de *A. cepa* após 12 dias de exposição ao lixiviado diluído quatro vezes foi igual a 4,0 cm, enquanto a exposição ao lixiviado diluído duas vezes resultou em comprimento médio de 3,0 cm.

As diferenças entre os comprimentos das raízes de *A. cepa* após a exposição ao lixiviado diluído quatro e duas vezes (afluente 200 mg N L⁻¹ e 400 mg N L⁻¹ como NAT, respectivamente) são estatisticamente significativas (Teste *t* de Welch com correção de Bonferroni, $p \leq 0,05$). Além disso, para ambas as diluições do lixiviado, os resultados para o comprimento das raízes de *A. cepa* são significativamente diferentes daqueles obtidos para o controle negativo (Teste *t* de Welch com correção de Bonferroni, $p \leq 0,05$). Os resultados indicam que o lixiviado apresentou potencial significativo de inibição ao crescimento das raízes de *A. cepa*, e este efeito foi diretamente proporcional à concentração desta água residuária.

Além da redução significativa no comprimento das raízes de *A. cepa*, a exposição ao lixiviado também impactou outros parâmetros utilizados como biomarcadores de toxicidade, incluindo a porcentagem, a velocidade e o tempo médio de germinação das sementes (FIGURA 4.32).

FIGURA 4.32 – PARÂMETROS DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE *A. cepa* APÓS EXPOSIÇÃO AOS AGENTES AVALIADOS



FONTE: a autora (2024)

NOTA: Afluentes 400: lixiviado diluído para concentração final de 400 mg N L⁻¹; Afluentes 200: lixiviado diluído para concentração final de 200 mg N L⁻¹.

Em geral, os resultados para os parâmetros associados à germinação das sementes de *A. cepa* (FIGURA 4.32) seguiram a mesma tendência observada para o comprimento das raízes. A exposição das sementes ao lixiviado não diluído resultou na redução da porcentagem e da velocidade de germinação, além do aumento do tempo médio de germinação, em comparação com as outras substâncias avaliadas, inclusive o controle negativo. Contudo, diferentemente do observado para o comprimento das raízes, as diferenças entre os grupos estudados não são estatisticamente significativas (Teste t de Welch com correção de Bonferroni, $p > 0,05$). Estes resultados podem ser atribuídos à maior sensibilidade das raízes de *A. cepa* a diversos contaminantes, o que resulta na maior confiabilidade do ensaio para determinação do crescimento das raízes em comparação com aqueles que avaliam os parâmetros de germinação (Wdowczyk; Szymańska-Pulikowska, 2021).

As mudanças morfológicas das raízes, como o comprimento médio em comparação ao controle, e as alterações dos parâmetros associados à germinação ocorrem em resposta à exposição do organismo-teste a contaminantes, indicando a toxicidade da substância em avaliação (Camilo-Cotrim *et al.*, 2022). Portanto, os

resultados obtidos indicam que o lixiviado utilizado nesta pesquisa apresentou toxicidade sobre o organismo avaliado (*A. cepa*) e potencial poluidor elevado.

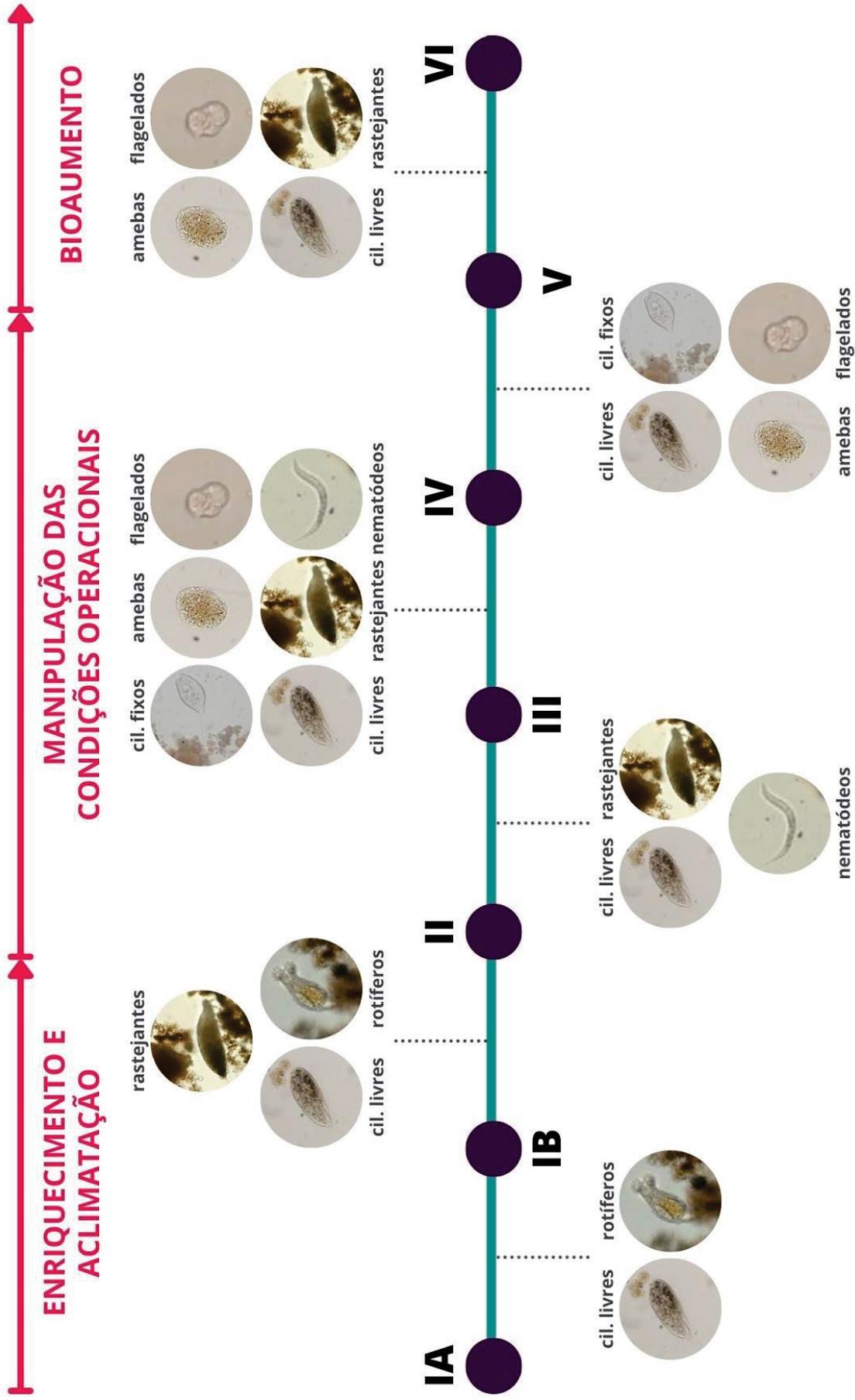
Cabe destacar que os resultados para o ensaio de toxicidade indicam que a exposição ao lixiviado de aterro sanitário causou efeitos significativos somente sobre o crescimento das raízes e a germinação das sementes de *A. cepa*, organismo-teste utilizado nesta pesquisa. Contudo, *A. cepa* é reconhecido como um bioindicador de poluição ambiental, e os resultados de toxicidade associados a este organismo geralmente apresentam elevada correlação com os obtidos para outros sistemas biológicos (Leme; Marin-Morales, 2009; Camilo-Cotrim *et al.*, 2022).

Para a avaliação específica da toxicidade de lixiviados, ensaios com *A. cepa* têm mostrado resultados comparáveis com os de métodos estabelecidos que utilizam outros organismos bioindicadores, incluindo bactérias (Bortolotto *et al.*, 2009; Kwasniewska *et al.*, 2012; Garaj-Vrhovac *et al.*, 2013; Wdowczyk; Szymańska-Pulikowska, 2021). Além disso, o ensaio com sementes de *A. cepa* apresenta baixo custo e simplicidade metodológica, consistindo em uma alternativa para a avaliação da potencial toxicidade de águas residuárias complexas como o lixiviado.

Assim, com base nos resultados obtidos, sugere-se que o efeito tóxico do lixiviado utilizado nesta pesquisa sobre a espécie vegetal *A. cepa* possa ser extrapolado para a microbiota presente em R1 e R2. O lixiviado pode ter causado a inibição parcial de alguns grupos de micro-organismos, como os nitrificantes, o que resultou na redução da eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal nas fases em que foi alimentado em elevadas concentrações aos biorreatores.

Outra evidência da potencial toxicidade do lixiviado é o desaparecimento dos organismos metazoários (rotíferos e nematódeos) e o surgimento de flagelados e amebas “nuas” nas amostras de R1 e R2 nas fases operacionais em que a concentração do lixiviado foi aumentada (FIGURA 4.33).

FIGURA 4.33 – EVOLUÇÃO TEMPORAL DA COMUNIDADE DE PROTOZOÁRIOS E METAZOÁRIOS DE R1 E R2



FONTE: a autora (2024)

NOTA: cil.: ciliado; rastejantes: ciliados rastejantes.

Rotíferos foram observados nas amostras de licor misto de R1 e R2 durante as fases IA-2 e IB, entretanto, não foram identificados nas fases seguintes (FIGURA 4.33). Esses organismos geralmente exigem elevadas concentrações de oxigênio dissolvido, o que pode explicar a sua ausência nas amostras dos biorreatores a partir da fase II, quando a carga volumétrica foi aumentada e a vazão de ar nos biorreatores foi reduzida. Além disso, metazoários como os rotíferos e os nematódeos são geralmente mais suscetíveis a condições adversas e à toxicidade de diversos poluentes em comparação a outros organismos, sendo, inclusive, utilizados como bioindicadores em análises ecotoxicológicas (Dahms; Hagiwara; Lee, 2011; Hägerbäumer *et al.*, 2015). Portanto, o desaparecimento desses organismos a partir da fase II pode estar associado à toxicidade inerente ao lixiviado.

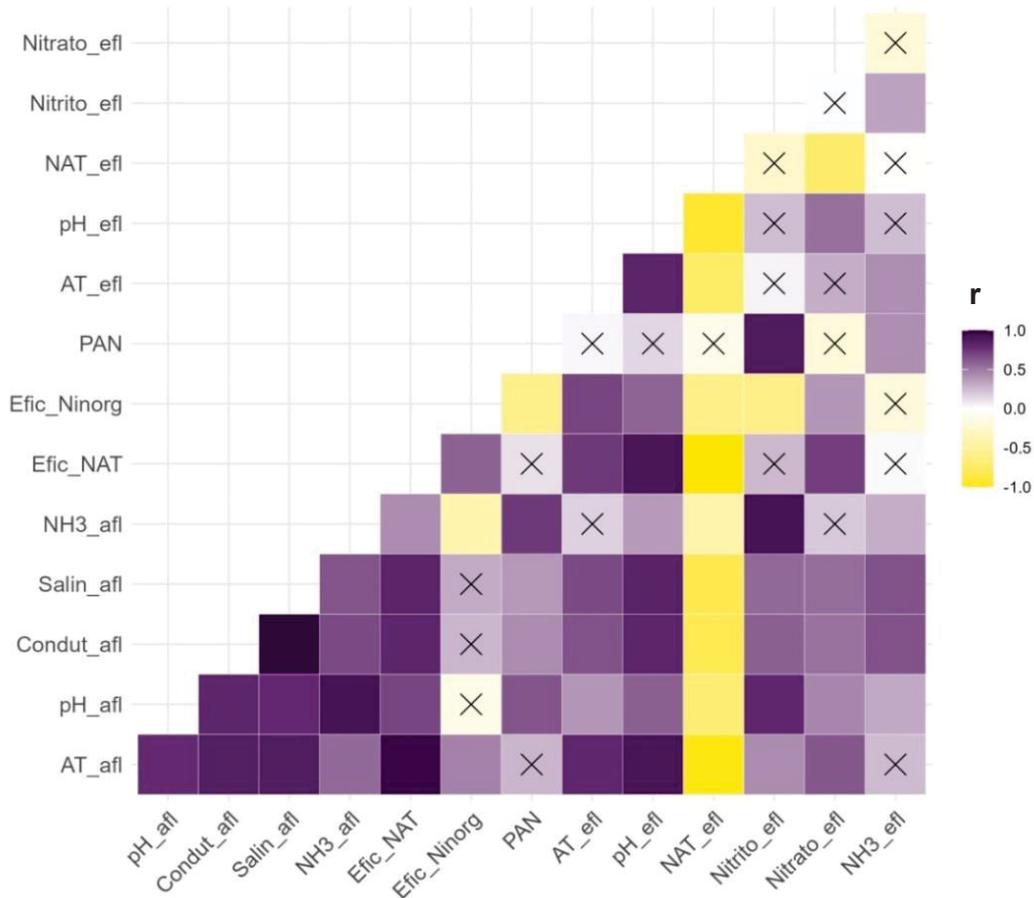
O aumento da abundância de ciliados flagelados e amebas “nuas” ocorre geralmente durante a partida de biorreatores ou em função de choques decorrentes da introdução de condições estressantes em sistemas biológicos (Madoni, 2010; González; Salas; Gutiérrez, 2016; Amaral *et al.*, 2018). Os flagelados e as amebas “nuas” também são indicadores de condições de baixa concentração de oxigênio dissolvido e elevadas cargas de poluentes (Sobczyk *et al.*, 2021). Assim, a presença desses grupos de organismos pode indicar o desequilíbrio dos bioprocessos aplicados ao tratamento de águas residuárias e consequente redução da eficiência do tratamento (Amaral *et al.*, 2018).

A partir da fase III, foi observado aumento da densidade populacional dos protozoários flagelados (FIGURA 4.33). Simultaneamente, foram identificadas amebas “nuas” nas amostras de licor misto dos biorreatores, embora em densidades inferiores às dos flagelados. Estes resultados sugerem, portanto, a possível ruptura do equilíbrio dos bioprocessos realizados em R1 e R2 em decorrência das mudanças operacionais realizadas ao longo do tratamento, isto é, aumento da carga volumétrica e, conseqüentemente, da concentração dos componentes do lixiviado.

Além de afetarem diretamente o desempenho dos biorreatores, as mudanças nas condições operacionais podem ter provocado alterações de parâmetros ambientais associados ao tratamento do lixiviado, como a concentração de amônia livre. Para avaliar o impacto dessas variáveis na eficiência e estabilidade dos bioprocessos, analisaram-se os dados do afluente e efluente dos biorreatores ao longo de todas as fases operacionais, bem como sua correlação com a eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal.

Os biorreatores R1 e R2 foram operados por aproximadamente 600 dias, divididos em seis fases operacionais. Ao longo das fases, as características físicas e químicas do afluente sofreram variações, conforme resultados apresentados na TABELA 4.4. Cabe salientar que as alterações das condições operacionais ao longo das seis fases de operação e a mudança das características físicas e químicas do afluente alimentado aos biorreatores podem estar correlacionadas a variações nos parâmetros de eficiência e estabilidade dos bioprocessos de remoção do nitrogênio do lixiviado (FIGURA 4.34 e FIGURA 4.35), como discutido a seguir.

FIGURA 4.34 – CORRELOGRAMA ENTRE AS VARIÁVEIS E PARÂMETROS AVALIADOS DURANTE AS FASES IA-1 E IA-2 PARA R1 E R2



FONTE: a autora (2024)

NOTA: as correlações não significativas ($p > 0,05$, correlação de Pearson) estão marcadas com "X"; parâmetros terminados em "_afl" correspondem ao afluente; parâmetros terminados em "_efl" correspondem ao efluente de R1 e R2; r: coeficiente de correlação de Pearson; correlações fortes: $|r| \geq 0,6$; correlações moderadas: $0,6 > |r| \geq 0,4$; correlações fracas: $|r| < 0,4$; abreviaturas: NAT: nitrogênio amoniacal total; AT: alcalinidade total; PAN: percentagem de acúmulo do nitrito; Efic: eficiência de remoção; Ninorg: nitrogênio inorgânico; Salin: salinidade; Conduct: condutividade.

TABELA 4.4 – CARACTERÍSTICAS DO AFLUENTE DURANTE A OPERAÇÃO DE R1 E R2

Parâmetro do afluente	Unidade	Fase IA (média ± d. p.)		Fase IB (média ± d. p.)	Fase II (média ± d. p.)		Fase III (média ± d. p.)	Fase IV (média ± d. p.)	Fase V (média ± d. p.)	Fase VI (média ± d. p.)
		IA-1 ^(a)	IA-2 ^(b)		II-1 ^(c)	II-2 ^(d)				
AT	mg CaCO ₃ L ⁻¹	38,5 ± 3,0	911,8 ± 34,4	714,7 ± 9,2	1825,6 ± 18,0	1747,6 ± 27,9	1275,6 ± 7,8	1709,2 ± 75,4	1841,4 ± 16,8	n. d.
Condutividade a 25 °C	mS cm ⁻¹	3033 ± 84	4842 ± 194	2791 ± 264	6902 ± 176	7072 ± 104	5302 ± 65	6950 ± 143	7211 ± 154	n. d.
DQO	mg O ₂ L ⁻¹	n. d.	n. d.	216 ± 9	626 ± 77	581 ± 27	406 ± 8	507 ± 22	538 ± 27	n. d.
NAT	mg N L ⁻¹	158,0 ± 6,7	161,5 ± 3,2	159,8 ± 3,4	402,0 ± 11,2	409,4 ± 10,2	298,9 ± 4,6	400,7 ± 10,3	402,2 ± 10,1	198,5 ± 6,7
NH ₃ livre	mg N L ⁻¹	3,5 ± 0,5	28,9 ± 16,4	20,7 ± 3,6	60,9 ± 17,3	52,5 ± 5,9	39,3 ± 10,0	57,3 ± 20,2	58,0 ± 23,0	31,5 ± 1,2
Nitrato	mg N L ⁻¹	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	1,5 ± 0,3	4,8 ± 3,6	3,9 ± 0,3	3,4 ± 0,5	4,8 ± 1,0	6,4 ± 2,9	8,1 ± 1,8
Nitrito	mg N L ⁻¹	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,3	0,3 ± 0,1	1,9 ± 2,2	3,8 ± 4,2	13,7 ± 5,8
NT	mg N L ⁻¹	n. d.	n. d.	164,6 ± 3,3	409,8 ± 19,6	453,0 ± 15,1	305,0 ± 7,2	406,6 ± 10,8	406,0 ± 22,0	n. d.
Ortofosfato	mg P L ⁻¹	30,9 ± 2,9	30,5 ± 0,5	0,4 ± 0,2	0,2 ± 0,1	5,4 ± 0,7	3,1 ± 0,0	3,9 ± 0,3	3,2 ± 0,9	n. d.
pH	-	7,44 ± 0,06	8,38 ± 0,27	8,26 ± 0,08	8,34 ± 0,13	8,26 ± 0,05	8,26 ± 0,10	8,29 ± 0,15	8,30 ± 0,18	8,37 ± 0,03
Salinidade	-	1,0 ± 0,0	1,6 ± 0,0	0,9 ± 0,0	2,3 ± 0,1	2,4 ± 0,1	1,8 ± 0,0	2,3 ± 0,1	2,4 ± 0,1	n. d.

FONTE: a autora (2024)

NOTA: AT: alcalinidade total; DQO: demanda química de oxigênio; NAT: nitrogênio amoniacal total; NT: nitrogênio total; d. p.: desvio-padrão; n. d.: não determinado; (a) resultados obtidos para o período entre o primeiro e o 30º dia de operação dos biorreatores; (b) resultados obtidos entre o 31º e o 204º dia de operação, quando a solução de NaHCO₃ foi adicionada ao afluente alimentado diariamente aos biorreatores; (c) resultados obtidos para o período entre o 281º e o 327º dia de operação, quando o afluente era composto por lixiviado coletado em março de 2023; (d) resultados obtidos para o período entre o 328º e o 364º dia de operação, quando o afluente era composto por lixiviado coletado em junho de 2023.

Primeiramente, foram avaliadas as características operacionais e ambientais que influenciaram a atividade microbiana durante o enriquecimento da microbiota na fase IA, dividida em duas etapas: IA-1 e IA-2. Em ambas as etapas (IA-1 e IA-2), o enriquecimento da microbiota nitrificante foi realizado com meio mineral como substrato e concentração de NAT afluente igual a 160 mg N L^{-1} . A composição do meio mineral era idêntica para as duas fases, com exceção da suplementação de NaHCO_3 , exclusiva da fase IA-2. Com base nos resultados obtidos para a caracterização do afluente e efluente e desempenho dos biorreatores ao longo das etapas IA-1 e IA-2, inicialmente foi realizada a análise de correlação entre as variáveis apenas para essas fases (FIGURA 4.34).

A análise da correlação entre as variáveis determinadas para as fases IA-1 e IA-2 (FIGURA 4.34) mostrou que a eficiência de remoção do NAT apresentou correlação diretamente proporcional, significativa (correlação de Pearson, $p \leq 0,05$) e forte com o pH afluente e, principalmente, com a alcalinidade total (AT) afluente.

Na fase IA-1, o pH médio do afluente foi igual a 7,44, enquanto a concentração média da alcalinidade total (AT) foi igual a $38,5 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ (TABELA 4.4). Já para a fase IA-2, em que o meio mineral utilizado como substrato foi suplementado com NaHCO_3 , os valores médios para o pH e AT foram iguais a 8,38 e $911,8 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$, respectivamente (TABELA 4.4). Os resultados para o pH e AT afluentes nas fases IA-1 e IA-2 são significativamente diferentes entre si (Teste de Wilcoxon, $p \leq 0,05$).

Na fase IA-1, em que meio mineral sem correção da alcalinidade era o substrato, a eficiência média de remoção do NAT foi igual a 12,9% para R1 e 10,5% para R2. Já na fase IA-2, em que a concentração da AT no meio mineral era significativamente maior, a eficiência média de remoção do NAT foi de 90,4% para R1 e 90,0% para R2. Para ambos os biorreatores, a eficiência de remoção do NAT foi significativamente diferente entre as fases IA-1 e IA-2 (Teste de Wilcoxon, $p \leq 0,05$). Esses resultados reforçam a correlação observada durante o enriquecimento da microbiota nitrificante entre o pH e a alcalinidade do afluente com a eficiência de remoção do NAT.

A nitrificação, especialmente a nitritação, depende do tamponamento do meio reacional em função da produção de íons H^+ durante a oxidação do NAT a nitrito, sendo necessários $7,1 \text{ mg}$ de CaCO_3 para cada 1 mg de nitrogênio amoniacal oxidado (Von Sperling, 2012). A redução do pH, causada pelo aumento da

concentração dos íons H^+ , pode levar à inibição da microbiota nitrificante. Nesse sentido, como sugerem os resultados para a correlação entre as variáveis e o desempenho dos biorreatores, o tamponamento do meio reacional e a elevada concentração da alcalinidade total do afluente foram relevantes para o controle da nitrificação durante o enriquecimento da microbiota.

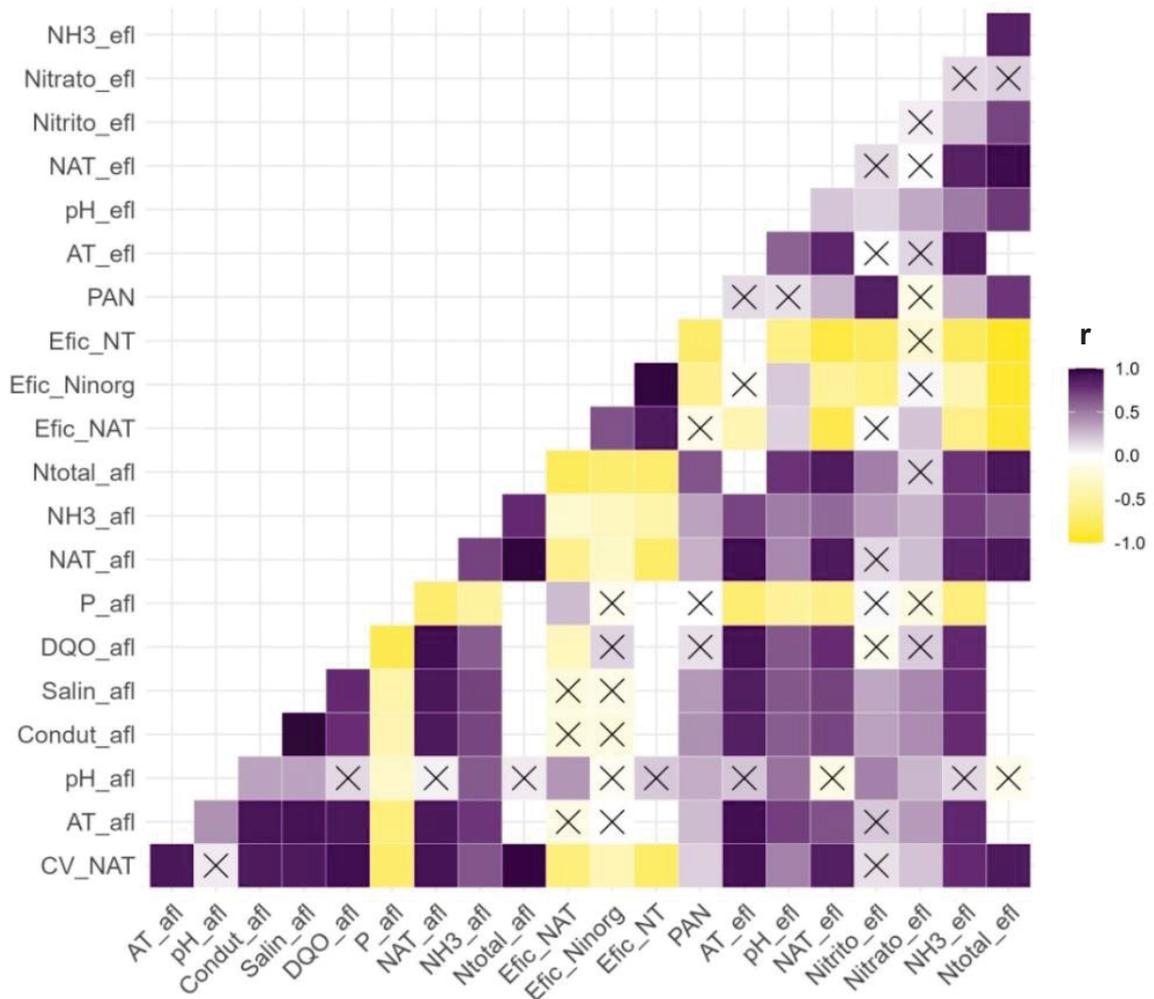
A eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal nas fases IA-1 e IA-2 também apresentou correlação positiva, forte e significativa ($p \leq 0,05$, correlação de Pearson) com o pH efluente (FIGURA 4.34). Na fase IA-1, o valor médio para o pH do efluente foi de 6,11 para R1 e 5,88 para R2. Por outro lado, na fase IA-2, o pH médio do efluente foi de 7,98 para R1 e 8,07 para R2. Esses resultados sugerem que a adição de $NaHCO_3$ para correção da alcalinidade, realizada exclusivamente na fase IA-2, esteve associada ao efeito tamponante e à manutenção do pH na faixa ótima para as reações de oxidação do NAT, que varia entre 7,0 e 8,5 para a maioria dos micro-organismos nitrificantes (Kits *et al.*, 2017; Wegen; Nowka; Spieck, 2019; Sun *et al.*, 2022).

Diferentemente da eficiência de remoção do NAT, a eficiência de remoção do nitrogênio inorgânico nas fases IA-1 e IA-2 não apresentou correlação significativa com o pH do afluente (correlação de Pearson, $p > 0,05$) (FIGURA 4.34). Além disso, a correlação entre a eficiência de remoção do nitrogênio inorgânico com a AT do afluente e o pH do efluente variou entre fraca e moderada, diferentemente do constatado para a correlação entre esses mesmos parâmetros e a eficiência de remoção do NAT. Similarmente, as correlações entre a concentração de nitrito e nitrato no efluente com o pH e a AT do afluente variaram entre fracas e moderadas.

As correlações fracas e moderadas entre a eficiência de remoção do nitrogênio inorgânico e o pH e a AT do afluente sugerem que esses parâmetros exerceram efeito mais acentuado sobre a nitritação do que sobre a nitratação durante o enriquecimento da microbiota nitrificante. As correlações fracas e moderadas entre esses parâmetros e as concentrações do nitrito e nitrato no efluente de R1 e R2 reforçam essa observação e indicam que os efeitos do pH e da alcalinidade do afluente foram mais significativos sobre a atividade das BOA que das BON. Isso possivelmente ocorreu devido à maior sensibilidade das BOA, que realizam a nitritação, às variações de pH e à disponibilidade de alcalinidade em comparação com as BON, responsáveis pela produção do nitrato.

Após o enriquecimento da microbiota nitrificante com meio mineral na fase IA, o lixiviado foi utilizado como substrato entre as fases IB e VI. Para avaliar o efeito das características químicas dessa água residuária sobre a eficiência dos bioprocessos de remoção do NAT, foi determinada a correlação entre as variáveis monitoradas durante todas as fases operacionais de R1 e R2 (FIGURA 4.35).

FIGURA 4.35 – CORRELOGRAMA ENTRE AS VARIÁVEIS E PARÂMETROS AVALIADOS DURANTE A OPERAÇÃO DE R1 E R2



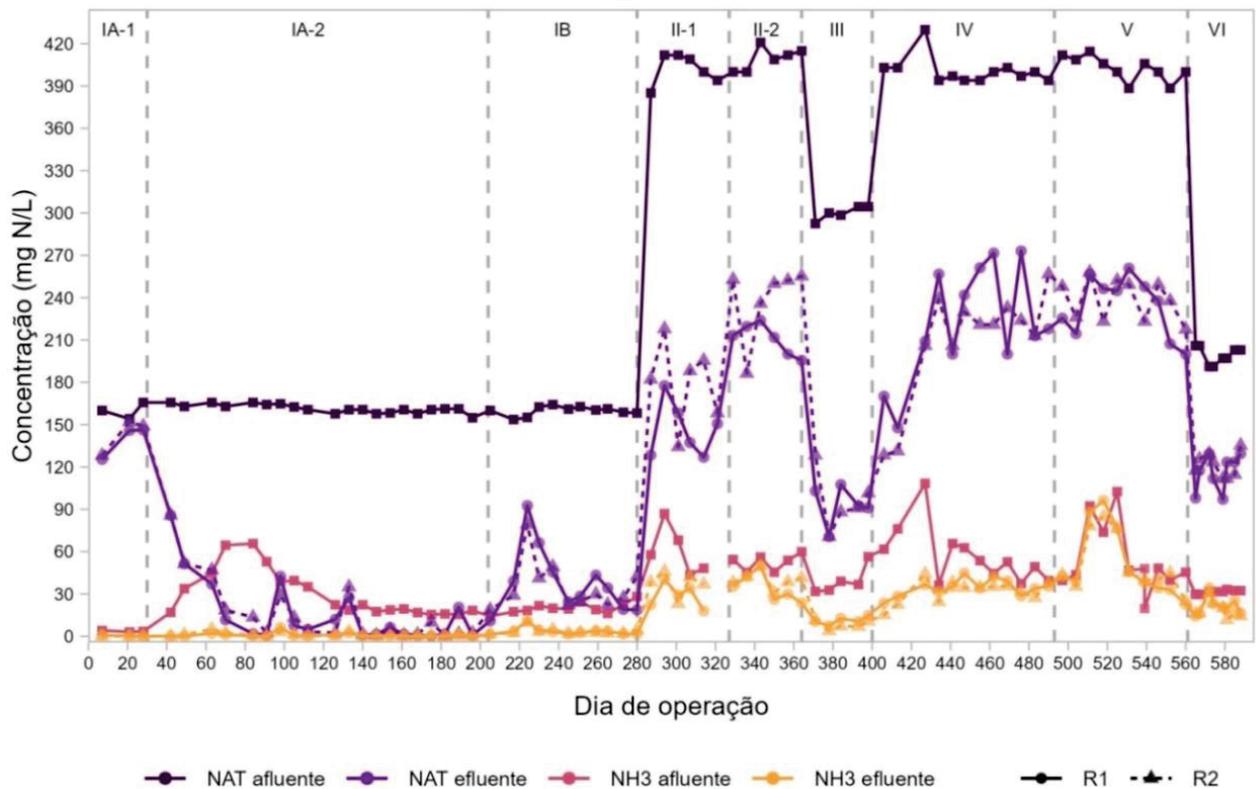
FONTE: a autora (2024)

NOTA: as correlações não significativas ($p > 0,05$, correlação de Pearson) estão marcadas com "X"; parâmetros terminados em "_afl" correspondem ao afluente; parâmetros terminados em "_efl" correspondem ao efluente de R1 e R2; r: coeficiente de correlação de Pearson; correlações fortes: $|r| \geq 0,6$; correlações moderadas: $0,4 > |r| \geq 0,4$; correlações fracas: $|r| < 0,4$; abreviaturas: NAT: nitrogênio amoniacal total; AT: alcalinidade total; PAN: percentagem de acúmulo do nitrito; Efic: eficiência de remoção; NT: nitrogênio total; Ninorg: nitrogênio inorgânico; Ntotal: nitrogênio total; P: ortofosfato; DQO: demanda química de oxigênio; Salin: salinidade; Conduct: condutividade; CV: carga volumétrica.

A concentração de amônia livre (NH_3) pode ser apontada como um dos principais parâmetros interferentes nos bioprocessos de remoção do nitrogênio.

Neste estudo, a concentração de amônia livre aumentou ao longo do tratamento do lixiviado, tendo variado entre 3,1 mg N L⁻¹ (fase IA-1) e 108,3 mg N L⁻¹ (fase IV) (FIGURA 4.36). Contudo, quando avaliadas as correlações entre este parâmetro e o desempenho dos biorreatores (FIGURA 4.35), a concentração da amônia livre não teve impacto relevante sobre a atividade dos micro-organismos nitrificantes.

FIGURA 4.36 – CONCENTRAÇÃO DO NAT E AMÔNIA LIVRE DURANTE A OPERAÇÃO DE R1 E R2



FONTE: a autora (2024)

NOTA: NAT: nitrogênio amoniaco total; NH3: amônia livre.

A correlação entre a concentração da amônia livre af luente e a eficiência de remoção do nitrogênio amoniaco foi fraca (FIGURA 4.35, $r = -0,25$), o que indica que a microbiota oxidante da amônia presente em R1 e R2 não sofreu inibição significativa em função do aumento da concentração de amônia livre. Estes resultados estão de acordo com os obtidos em outros estudos, nos quais foi observado que as bactérias oxidantes da amônia (BOA) podem apresentar tolerância ou adaptação a elevadas concentrações de amônia, da ordem de dezenas ou centenas de miligramas por litro (Li *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2021).

Durante a fase IV, por exemplo, foi observado o segundo maior valor para a média da concentração de amônia livre af luente entre todas as fases operacionais,

57,3 mg N L⁻¹, com variação entre 36,4 mg N L⁻¹ e 108,3 mg N L⁻¹ (FIGURA 4.36). No final desta fase, os dados do sequenciamento do gene 16S rRNA indicaram a presença dominante do gênero *Nitrosomonas* entre as BOA, com elevada abundância relativa (25,33% para R1 e 20,18% para R2). No final da fase IV, o gênero *Nitrospira* também foi identificado, porém em baixas abundâncias relativas (0,08% para R1 e 0,39% para R2).

O gênero *Nitrosomonas* é comumente detectado em sistemas de tratamento de águas residuárias operados sob elevadas concentrações de amônia livre e nitrogênio amoniacal (≥ 50 mg N L⁻¹) (Fan *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2020a; Zheng *et al.*, 2021). Assim como observado nesta pesquisa, *Nitrosomonas* foi identificado em elevadas abundâncias relativas como o gênero dominante entre as BOA em sistemas aplicados para a remoção do nitrogênio amoniacal de lixiviados estabilizados via nitrificação parcial/processo *anammox*/desnitrificação simultâneos (Wang *et al.*, 2019), processo *anammox* (Li; Kechen; Yongzhen, 2018; Podder; Reinhart; Goel, 2020) e nitrificação parcial/desnitrificação. Esses resultados sugerem que o gênero *Nitrosomonas* é tolerante e pode ser enriquecido sob as condições associadas ao tratamento de lixiviados estabilizados como, por exemplo, elevadas concentrações de amônia livre.

A adição de amônia ou o aumento da sua concentração via alteração do pH e/ou da temperatura do afluente são estratégias comumente utilizadas para a inibição das bactérias oxidantes do nitrito e, por conseguinte, da produção do nitrato (Philips; Laanbroek; Verstraete, 2002; Feng *et al.*, 2017; Duan *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020; Jiang *et al.*, 2021b). Estas estratégias são particularmente utilizadas em bioprocessos que dependam do acúmulo do nitrito, como a nitrificação parcial, o processo *anammox* e desnitrificação parcial, sendo baseadas na suposição que as BON são mais sensíveis à amônia livre do que as BOA (Le *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2021).

Le e colaboradores (2020), por exemplo, ao investigar o comportamento de um sistema aplicado à nitrificação parcial de esgoto sanitário sob baixa concentração de oxigênio dissolvido (0,3 mg L⁻¹), obtiveram valores para a percentagem de acúmulo do nitrito superiores a 87%, para concentração de amônia livre de aproximadamente 20 mg N L⁻¹. Da mesma forma, Sun e colaboradores (2021) observaram o acúmulo de nitrito e a diminuição da abundância das BON durante o tratamento de água residuária sintética sob concentrações de amônia livre

iguais a 10 e 15 mg N L⁻¹. Em ambos os estudos, o acúmulo do nitrito foi associado à inibição bem-sucedida das BON e à interrupção da produção do nitrato.

Por outro lado, nesta pesquisa, a manutenção de elevadas concentrações de amônia livre nos biorreatores (média geral de 39,5 mg N L⁻¹, com variação entre 3,1 mg N L⁻¹ e 108,3 mg N L⁻¹) não esteve associada ao acúmulo acentuado de nitrito, avaliado por meio da PAN, como sugere a fraca correlação entre estes parâmetros (FIGURA 4.35, $r = 0,35$). A concentração de amônia livre afluenta também não esteve fortemente correlacionada com as concentrações de nitrito ($r = 0,37$) e nitrato ($r = 0,28$) no efluente dos biorreatores R1 e R2 ao longo da operação (FIGURA 4.35). Estes resultados indicam que as BON não sofreram inibição significativa devido à elevada concentração da amônia livre associada ao lixiviado.

Ao término da fase IV, com concentração média de amônia livre afluenta de 57,3 mg N L⁻¹, foram detectadas sequências associadas a BON dos gêneros *Nitrospira* (0,74% para R1 e 1,20% para R2) e *Nitrobacter* (0,17% para R1 e 0,09% para R2). Ainda que as abundâncias relativas tenham sido baixas, estes gêneros de BON provavelmente persistiram nos biorreatores R1 e R2, mesmo sob elevadas concentrações de amônia livre.

Para alguns gêneros de BON, como *Nitrospira*, estudos de outros autores indicam sensibilidade elevada à amônia livre, com inibição da nitratação em concentrações variando de 0,04 mg N L⁻¹ a 16 mg N L⁻¹ (Blackburne *et al.*, 2007; Courtens *et al.*, 2016; Ushiki *et al.*, 2017; Fujitani *et al.*, 2020). Bactérias do gênero *Nitrospira* são consideradas mais sensíveis à amônia livre do que os outros gêneros conhecidos de BON, como *Nitrobacter*, *Nitrolancea* e “*Ca. Nitrotoga*” (Ma *et al.*, 2017; Duan *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020; Shao; Wu, 2021). No entanto, nesta pesquisa, o gênero *Nitrospira* foi detectado como aquele predominante de BON, mesmo sob concentrações de amônia livre superiores a 30 mg N L⁻¹.

A persistência de *Nitrospira* em sistemas de tratamento com elevadas concentrações de amônia livre pode ser atribuída à diferenciação entre nichos observada em nível de linhagem para este gênero (Latocheski; Rocha; Braga, 2022). De acordo com Madill e colaboradores (2021), algumas linhagens de *Nitrospira* podem tolerar elevadas concentrações de amônia livre. Estes autores observaram a aclimação da biomassa de um sistema de lodos ativados após tratamento com amônia livre em concentração aproximada de 200 mg N L⁻¹. A aclimação da microbiota foi acompanhada por mudanças nas variantes de sequências

predominantes do gene 16S rRNA associadas ao gênero *Nitrospira*, o que, de acordo com os autores, indicou o surgimento de populações tolerantes à amônia.

Portanto, em um sistema de tratamento de águas residuárias, as linhagens e espécies microbianas mais tolerantes à amônia livre podem predominar, levando à redundância funcional e à aclimação da microbiota como um todo. A adaptação da microbiota, por sua vez, pode tornar ineficaz a estratégia de manutenção de elevadas concentrações de amônia livre em sistemas de tratamento de águas residuárias. Assim, para o controle efetivo da nitrificação, esta estratégia não deve ser praticada isoladamente, mas em combinação com outros parâmetros.

Assim como observado para a concentração da amônia livre, o pH e a alcalinidade total do afluente também não correlacionaram de maneira significativa e forte com a eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal e do nitrogênio total durante o tratamento do lixiviado (FIGURA 4.35). Após a introdução do lixiviado como substrato alimentado a R1 e R2 na fase IB, o pH afluente apresentou variação limitada, entre 8,2 e 8,4 (TABELA 4.4), o que poderia explicar a fraca correlação com os parâmetros associados ao desempenho e estabilidade dos biorreatores.

Apesar da variação considerável dos valores da alcalinidade total do afluente durante a operação de R1 e R2 com lixiviado (de 715 mg CaCO₃ L⁻¹ a 1840 mg CaCO₃ L⁻¹), esta condição foi suficiente para tamponar o meio reacional e manter o pH ideal para a microbiota nitrificante. Devido ao efeito tamponante causado pela elevada alcalinidade do lixiviado, o pH do efluente de R1 e R2 apresentou pequena variação durante os 600 dias de operação, entre 7,9 e 8,9. A partir da fase IB, a eficiência de consumo da alcalinidade variou entre 10% e 71%. Portanto, durante a alimentação com lixiviado, não houve depleção da alcalinidade nos biorreatores, tendo sido suficiente para manter o pH em níveis adequados para a nitrificação.

Ao avaliar a correlação entre as eficiências de remoção do NAT e do nitrogênio total com outras características do afluente, como a salinidade, a condutividade, a concentração de DQO e a concentração de fósforo, os valores não foram significativos ou resultaram em correlações fracas e moderadas (FIGURA 4.35). Estes resultados sugerem que a influência destes parâmetros químicos e físicos sobre os bioprocessos para a remoção do nitrogênio do lixiviado foi menos significativa em comparação a outras condições operacionais e ambientais.

Quando consideradas todas as fases operacionais no cálculo da correlação entre as variáveis, a eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal apresentou

correlação significativa (correlação de Pearson, $p \leq 0,05$), forte e negativa, ou seja, inversamente proporcional, à carga volumétrica (CV) e à concentração de nitrogênio total afluente (FIGURA 4.35). A mesma observação pode ser aplicada à eficiência de remoção do nitrogênio total, que também apresentou correlação significativa, forte e negativa com a carga volumétrica e com as concentrações afluentes de nitrogênio amoniacal e total. Estes resultados sugerem que o aumento da CV e das concentrações de nitrogênio no afluente afetou negativamente a atividade das bactérias oxidantes da amônia, reduzindo significativamente a eficiência de remoção de nitrogênio do lixiviado.

A carga volumétrica e as concentrações afluentes de nitrogênio amoniacal e nitrogênio total estão diretamente relacionadas à concentração do lixiviado, alimentado aos biorreatores a partir da fase IB, pois a diluição do lixiviado em cada fase operacional foi calculada com base na fixação dos valores desejados para estes parâmetros. Dessa forma, pode-se inferir que as eficiências de remoção do NAT e do nitrogênio total apresentaram correlação forte e negativa com a concentração do lixiviado utilizado como substrato ao longo das diferentes fases.

Os resultados apresentados contradizem aqueles de outros estudos que sugerem que as bactérias oxidantes da amônia são mais tolerantes a elevadas concentrações de nitrogênio amoniacal e outras condições ambientais em comparação às bactérias oxidantes do nitrito (Kowalchuk; Stephen, 2001; Prosser; Head; Stein, 2014). A redução significativa da eficiência de remoção do nitrogênio, proporcional ao aumento da concentração do NAT afluente e, conseqüentemente, do lixiviado, pode ser atribuída à toxicidade dessa água residuária, conforme discutido anteriormente. Portanto, pode ser considerado que as BOA possam ter sofrido maior inibição devido à exposição aos contaminantes do lixiviado do que as BON, apesar de geralmente serem consideradas mais tolerantes a diversas condições ambientais.

Diferentemente das eficiências de remoção do nitrogênio amoniacal e nitrogênio total, a eficiência de remoção do nitrogênio inorgânico (soma do NAT, nitrito e nitrato) não apresentou correlação forte com nenhum parâmetro operacional ou físico e químico do afluente (FIGURA 4.35). Similarmente, a porcentagem de acúmulo do nitrito e as concentrações efluentes de nitrito e de nitrato também não apresentaram correlações fortes com nenhum parâmetro operacional ou inerente ao afluente. Estes resultados sugerem que a atividade das bactérias oxidantes do

nitrito, responsáveis pela produção de nitrato, foi menos impactada pela concentração do lixiviado e suas características físicas e químicas em comparação com as BOA, participantes da nitrificação.

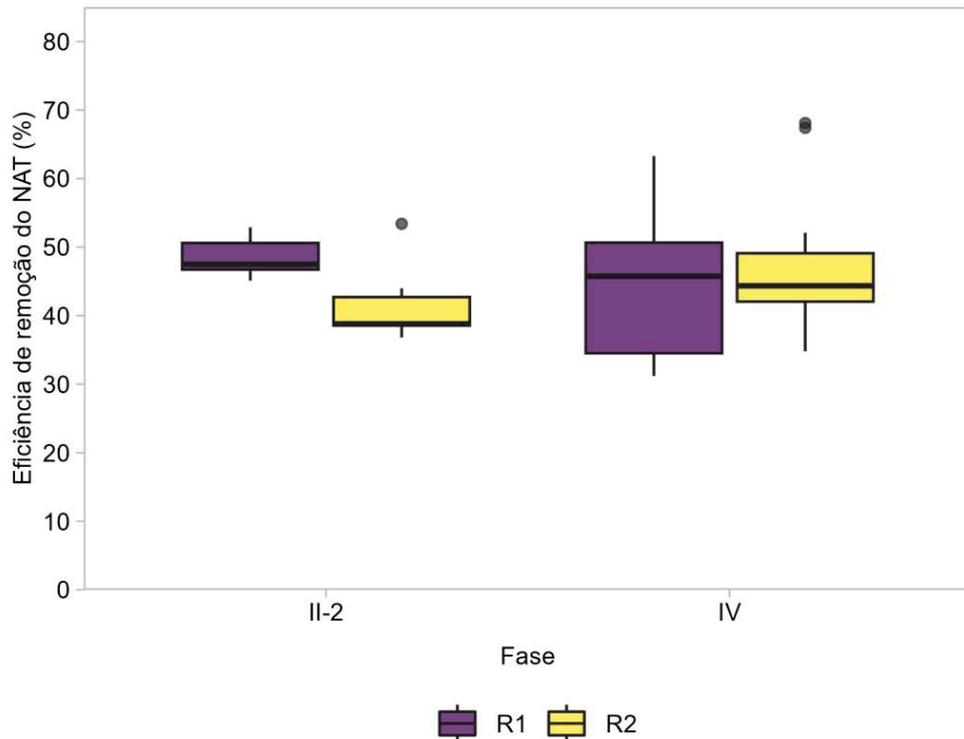
Apesar da potencial toxicidade do lixiviado e da forte correlação com a inibição da atividade das BOA, após a estabilização dos parâmetros de desempenho dos biorreatores na fase III, foi aplicada aeração intermitente para avaliar seu efeito sobre a remoção do nitrogênio. Com isso, teve início a fase IV, em que o regime de aeração foi alterado de contínuo para intermitente, com ciclos de 1 hora com aeração e 1 hora sem aeração. Além disso, a carga volumétrica associada ao lixiviado foi novamente aumentada para $100 \text{ mg N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, e a concentração do NAT do substrato afluente foi fixada em 400 mg N L^{-1} a partir da diluição de cerca de duas vezes do lixiviado, isto é, uma parte de lixiviado para uma parte de água de torneira.

4.3.2.1 Aeração intermitente

Assim como a concentração da amônia livre, cuja influência sobre o desempenho de R1 e R2 foi apresentada previamente, o regime de aeração é um parâmetro operacional utilizado para o controle da nitrificação. Baixas concentrações de oxigênio dissolvido, abaixo de $1 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$, são consideradas desfavoráveis para a atividade e crescimento das BON (Lackner *et al.*, 2014; Mehrani *et al.*, 2020; Miao *et al.*, 2022). A limitação de fornecimento de oxigênio, associada à aeração intermitente, é utilizada como estratégia para o controle metabólico das BON e da nitrificação, sem causar interferência significativa na atividade das BOA e na nitrificação. As BOA são consideradas mais tolerantes à limitação de oxigênio do que as BON e são capazes de manter taxas de nitrificação elevadas mesmo sob baixas concentrações de oxigênio dissolvido (Feng *et al.*, 2017, Miao *et al.*, 2022).

Nesta pesquisa, foram comparadas duas condições de aeração: i) contínua e ii) intermitente (FIGURA 4.37). As fases II-2 e IV foram realizadas sob as mesmas condições operacionais, exceto pelo regime de aeração, contínuo na primeira e intermitente na segunda. Em ambas as fases, a carga volumétrica aplicada foi de $100 \text{ mg N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e a concentração de NAT do afluente de 400 mg N L^{-1} , obtida a partir da diluição de cerca de duas vezes do lixiviado, isto é, uma parte de lixiviado para uma parte de água de torneira.

FIGURA 4.37 – EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DO NAT PARA R1 E R2 DURANTE AS FASES II-2 E IV



FONTE: a autora (2024)

NOTA: NAT: nitrogênio amoniacal total.

A eficiência média de remoção do nitrogênio amoniacal sob aeração contínua (fase II-2) foi de 48,5% para R1 e 41,7% para R2 (FIGURA 4.37). Já sob aeração intermitente, com ciclos de 1 hora com aeração e 1 hora sem aeração (fase IV), as médias para este parâmetro foram de 44,5% para R1 e 47,7% para R2. Para ambos os biorreatores, os resultados para a eficiência de remoção do NAT nas fases II-2 e IV não são significativamente diferentes entre si (Teste de Kruskal-Wallis com correção de BH, $p \leq 0,05$). Isto permite afirmar que o regime de aeração, único parâmetro operacional modificado entre as fases avaliadas, não interferiu significativamente na eficiência de remoção do NAT.

Nesta pesquisa, o regime de aeração não teve impacto significativo na eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal, o que corrobora observações do estudo de Pan e colaboradores (2013). Estes autores compararam o desempenho de dois reatores em bateladas sequenciais para a remoção de nitrogênio de efluente sintético, cuja concentração era de $31,4 \text{ mg N L}^{-1}$. Ambos os reatores foram submetidos ao mesmo período total de aeração (180 minutos), entretanto, um foi operado sob aeração contínua (1 ciclo de 180 minutos), enquanto o outro sob aeração intermitente (3 ciclos de 60 minutos seguidos por 35 minutos sem aeração).

Em ambos os reatores, a eficiência de remoção do NAT foi próxima a 100%, indicando que o regime de aeração não teve impacto significativo sobre este parâmetro.

Da mesma forma, Elad e colaboradores (2023) compararam os regimes de aeração contínua e intermitente em reatores de biofilme por membrana aerada para tratamento de efluente sintético com concentração média de NAT de 50 mg N L^{-1} . Os autores observaram que o regime de aeração não interferiu na taxa de nitrificação, que variou entre 2,6 e $2,8 \text{ g N m}^{-2} \text{ d}^{-1}$. Além disso, quando avaliada a estrutura populacional microbiana, a abundância relativa das BOA foi similar em ambos os regimes de aeração, variando entre 35% e 40% do total de sequências. Contudo, houve mudança no grupo de BOA predominante: *Nitrosomonas europaea* sob aeração contínua e *Nitrospira* sp. sob aeração intermitente. Estes resultados sugerem que a adaptação das BOA às condições de aeração é devida principalmente a mudanças populacionais relacionadas à redundância funcional, como a substituição da espécie predominante.

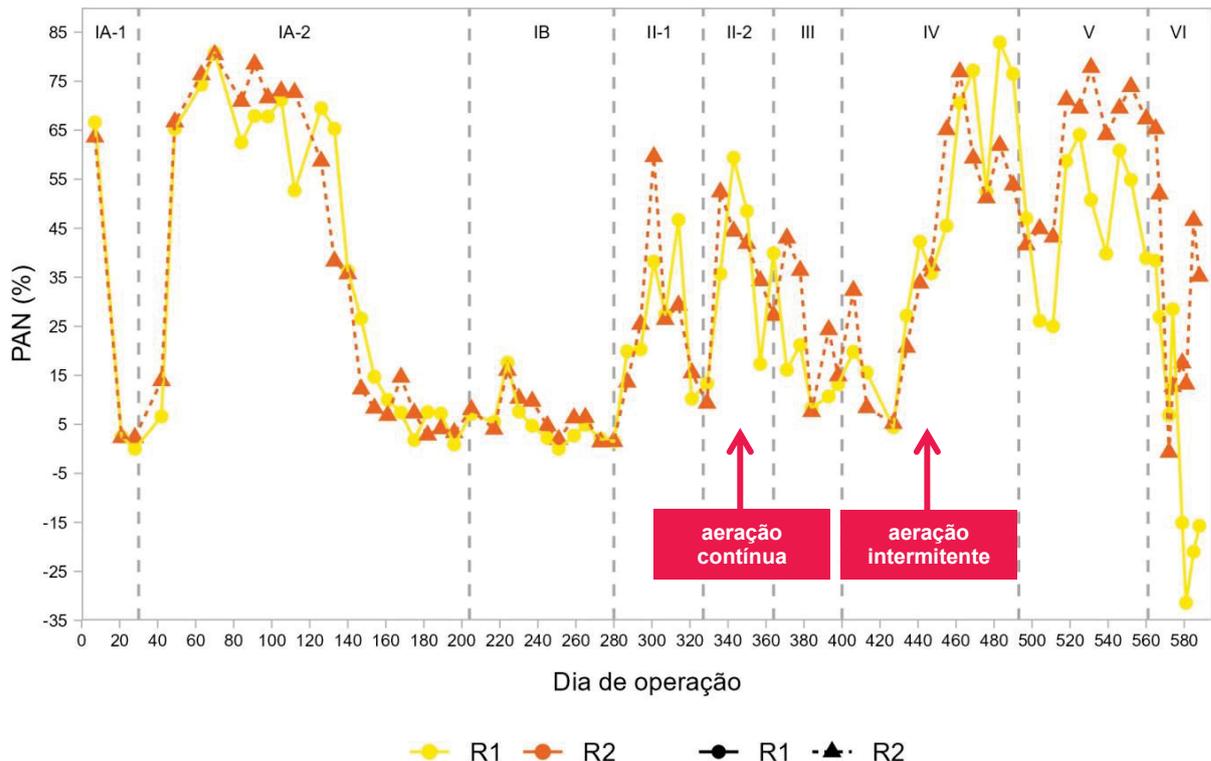
O enriquecimento das BOA mesmo sob condições de baixas concentrações de oxigênio dissolvido, como as associadas à aeração intermitente, foi reportado também por Deng e colaboradores (2024). Neste estudo foram comparados dois sistemas de lodos ativados, alimentados com efluente sintético, um operado sob elevadas concentrações de oxigênio dissolvido ($> 5 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$) e o outro sob condições microaeróbias. Os autores observaram que a nitrificação ocorreu mesmo sob concentrações de oxigênio dissolvido extremamente baixas ($< 0,1 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$), tendo sido obtidas eficiências de remoção do nitrogênio amoniacal superiores a 98%. Sob condições microaeróbias, a abundância relativa das BOA do gênero *Nitrosomonas* foi cinco vezes maior do que no biorreator operado sob elevada concentração de oxigênio dissolvido.

Outros autores obtiveram resultados semelhantes quando a aeração intermitente foi aplicada ao tratamento de águas residuárias reais. Por exemplo, Yilmaz e colaboradores (2023) desenvolveram estudos com biorreatores de membrana com aeração contínua e intermitente e avaliaram a remoção de nitrogênio amoniacal do efluente da indústria têxtil, cuja concentração média era de 51 mg N L^{-1} . A eficiência de remoção de NAT foi de 100% sob aeração contínua, enquanto sob aeração intermitente, a eficiência variou de 72% a 99%, dependendo da duração das fases aeróbia e anóxica.

Por sua vez, Rodriguez-Sanchez e colaboradores (2024) aplicaram a aeração intermitente a um reator em escala piloto para o tratamento de efluente da indústria de laticínios. Foram praticados ciclos de aeração de 12 horas, divididos em subciclos com 60 minutos de aeração e 100 minutos sem aeração. Ao longo de cinco meses de operação, os autores reportaram resultados para a eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal superiores a 95%, o que sugere que as BOA não sofreram inibição em função da aeração intermitente. Estes resultados estão de acordo com os observados nesta pesquisa cuja água residuária real foi o lixiviado de aterro sanitário.

Diferentemente do sugerido para as BOA, o regime de aeração intermitente pode ter interferido no metabolismo das bactérias oxidantes do nitrito e, conseqüentemente, no acúmulo do nitrito nos biorreatores, como indica a comparação entre os resultados para a PAN nas fases II-2 e IV (FIGURA 4.38).

FIGURA 4.38 – PERCENTAGEM DE ACÚMULO DO NITRITO PARA R1 E R2 COM ÊNFASE NAS FASES II-2 E IV



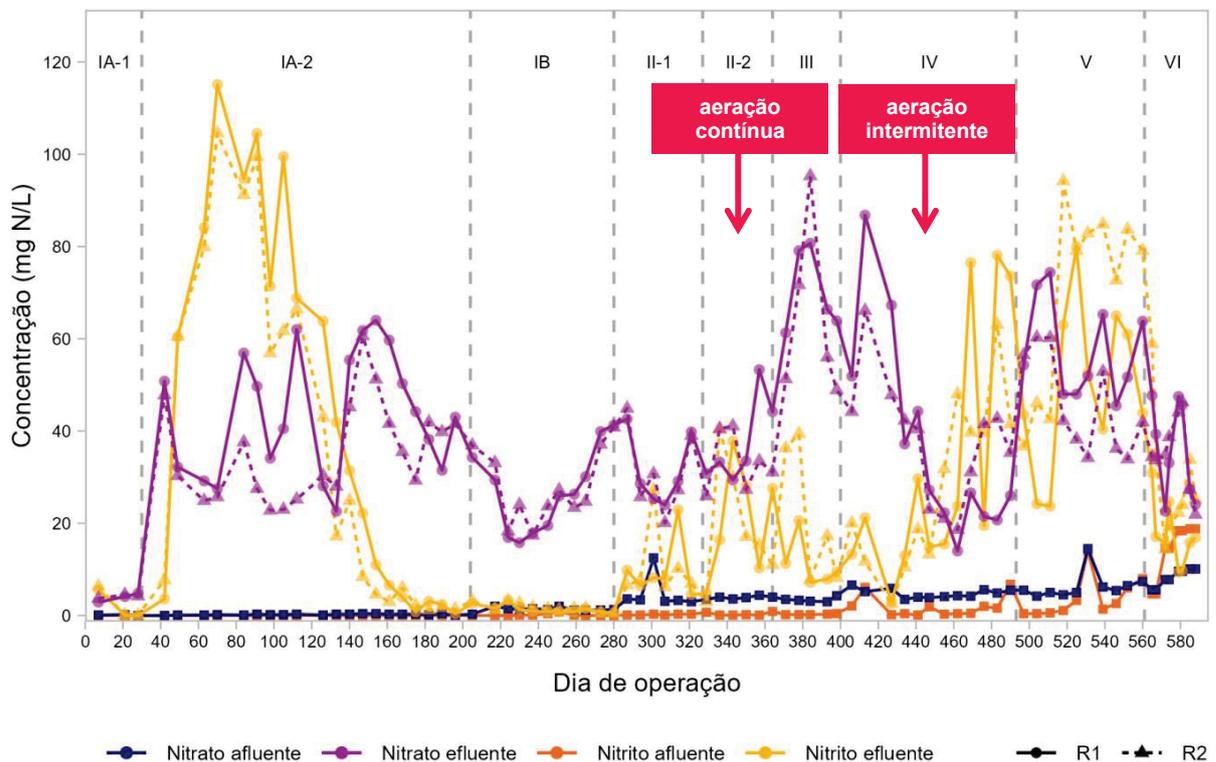
FONTE: a autora (2024)

NOTA: PAN: porcentagem de acúmulo do nitrito. A aeração contínua era mantida durante 20 horas na fase II-2; A partir da fase IV, a aeração intermitente foi realizada em 12 ciclos diários, consistindo de 1 hora com aeração seguida por 1 hora sem aeração.

Para a fase IV (aeração intermitente com 12 ciclos diários de 1 hora de aeração, seguida por 1 hora sem aeração), em relação à PAN, foi observada tendência oposta à da fase II-2. No início da fase IV, a PAN era de 19,8% para R1 e 32,3% para R2 (FIGURA 4.38). Após 21 dias, a PAN diminuiu para 4,4% para R1 e 5,2% para R2. Nos 35 dias seguintes, a PAN aumentou novamente, superando 70%, e manteve-se estável entre 54% e 70% até o final da fase IV (FIGURA 4.38). O aumento da PAN observado entre o 35º e o 84º dias após o início da fase IV indica que ocorreu o acúmulo do nitrito e a diminuição da produção do nitrato nos biorreatores devido à implementação do regime de aeração intermitente.

As alterações na PAN durante as fases II-2 e IV também estiveram associadas a variações nas concentrações de nitrito e nitrato no efluente dos biorreatores (FIGURA 4.39).

FIGURA 4.39 – CONCENTRAÇÃO DO NITRITO E NITRATO DURANTE A OPERAÇÃO DE R1 E R2



FONTE: a autora (2024)

NOTA: a aeração contínua era mantida durante 20 horas na fase II-2; A partir da fase IV, a aeração intermitente foi realizada em 12 ciclos diários, consistindo de 1 hora com aeração seguida por 1 hora sem aeração.

Durante a fase II-2 (aeração contínua por 20 horas), a concentração do nitrato no efluente de R1 e R2 aumentou, variando entre 26 mg N L⁻¹ (329º d) e 53 mg N L⁻¹ (357º d) (FIGURA 4.39). O aumento da concentração do nitrato coincidiu

com a diminuição da concentração do nitrito no efluente de ambos os biorreatores, de 38 mg N L^{-1} (336º d) para 10 mg N L^{-1} (364º d) (FIGURA 4.39). A diminuição da PAN, juntamente com o aumento da concentração do nitrato e redução da concentração do nitrito, sugere a aclimatação das BON às condições operacionais ao longo da fase II-2.

Por outro lado, durante a fase IV (aeração intermitente com 12 ciclos diários de 1 hora de aeração, seguida por 1 hora sem aeração), ocorreu a diminuição da concentração do nitrato no efluente de ambos os biorreatores (FIGURA 4.39). Os valores para este parâmetro variaram entre 87 mg N L^{-1} (413º d) e 14 mg N L^{-1} (462º d) para R1, e entre 66 mg N L^{-1} (413º d) e 19 mg N L^{-1} (462º d) para R2. Simultaneamente, a concentração do nitrito no efluente de R1 e R2 aumentou, variando de 3 mg N L^{-1} (427º d) a 78 mg N L^{-1} (483º d) para R1 e de 2 mg N L^{-1} (427º d) a 63 mg N L^{-1} (483º d) para R2 (FIGURA 4.39). O aumento da PAN, juntamente com a diminuição da concentração do nitrato e acúmulo do nitrito, sugere que a aeração intermitente pode estar associada ao distúrbio metabólico das BON e, por conseguinte, da nitratação, ao longo dos 93 dias investigados da fase IV.

Outros autores estudaram a relação entre a aeração intermitente e a inibição da nitratação em sistemas de remoção de nitrogênio de águas residuárias. Por exemplo, Al-Hazmi e colaboradores (2020) compararam a remoção do nitrogênio de água residuária sintética em um reator em bateladas sequenciais sob aeração contínua ($0,3 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$) e intermitente. Os autores observaram que, embora o regime contínuo sob baixa concentração de oxigênio dissolvido tenha favorecido a atividade das BOA, a inibição das BON não foi eficiente, tendo resultado na produção de nitrato. Por outro lado, o regime de aeração intermitente esteve associado a maiores eficiências para a remoção do NAT e menores concentrações de nitrato no efluente, o que indica que houve inibição parcial da atividade das BON.

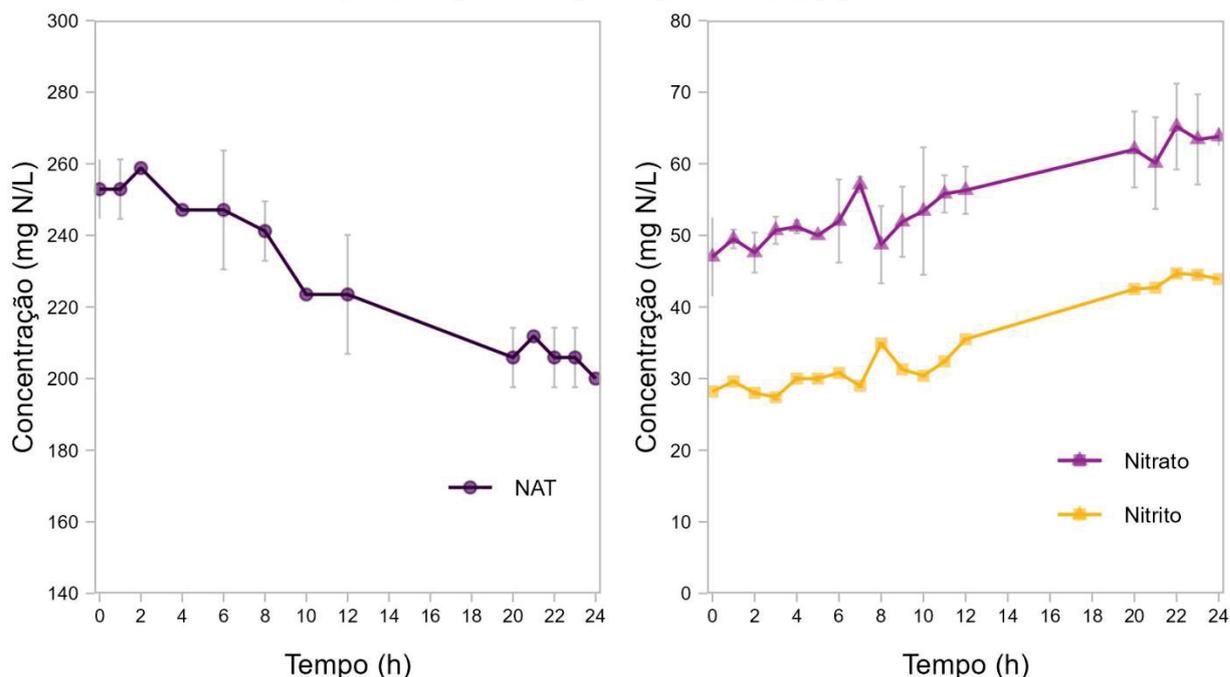
Por sua vez, Zhang e colaboradores (2022) operaram um reator em bateladas sequenciais destinado à nitrificação parcial de lixiviado de aterro sanitário sob regime de aeração intermitente. Para carga volumétrica de $360 \text{ mg N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, foram reportados resultados para a eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal do lixiviado superiores a 99%, concomitantemente à elevada PAN, que atingiu valor igual a 96,1%. Estes resultados indicam que, sob regime de aeração intermitente, o nitrogênio amoniacal do lixiviado foi transformado quase completamente em nitrito,

que passou a acumular no efluente, provavelmente em função da inibição da atividade das BON.

Similarmente, visando à remoção de nitrogênio de água residuária sintética sob aeração intermitente, Le e colaboradores (2023) avaliaram a combinação entre nitrificação parcial e processo *anammox* em um único estágio em um reator de biofilme. Para concentração afluente de 50 mg N L^{-1} e carga volumétrica variável entre $120 \text{ mg N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e $160 \text{ mg N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, a eficiência de remoção do nitrogênio total (NT) foi superior a 80%. Os autores atribuíram a elevada eficiência de remoção do NT à aeração intermitente, que ocasionou a inibição das BON, e à estrutura do biofilme, que permitiu o estabelecimento de micronichos e a manutenção da atividade das BOA e das bactérias *anammox*.

Apesar da relação observada entre a implementação da aeração intermitente e o acúmulo do nitrito no efluente de R1 e R2 durante os 93 dias de duração da fase IV, a nitratação não foi completamente inibida, conforme resultados para o perfil de consumo do nitrogênio amoniacal e da produção de nitrito e nitrato durante um ciclo operacional (FIGURA 4.40). O ciclo de batelada foi monitorado durante a operação do biorreator R1 sob regime de aeração intermitente, com 1 hora de duração para a fase aeróbia seguida por 1 hora sem aeração.

FIGURA 4.40 – PERFIL DE CONSUMO DO NAT E DE PRODUÇÃO DE NITRITO E NITRATO DURANTE UM CICLO OPERACIONAL DE R1



FONTE: a autora (2024)

NOTA: NAT: nitrogênio amoniacal total.

Durante um ciclo de batelada de 24 horas sob regime de aeração intermitente, o NAT do lixiviado foi consumido linearmente (FIGURA 4.40), com taxa média de consumo de $2,20 \text{ mg N L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Simultaneamente, foi observado que as concentrações de nitrito e de nitrato aumentaram no efluente do biorreator R1, indicando a produção destas substâncias via nitritação e nitratação, respectivamente (FIGURA 4.40). Ao longo do ciclo operacional investigado, durante os períodos em que não houve aeração, não foram observados platôs para o consumo de NAT nem para a produção de nitrito e nitrato. Este comportamento indica que, mesmo sob regime de aeração intermitente, havia oxigênio dissolvido suficiente para a realização tanto da nitritação quanto da nitratação.

Assim como o consumo do NAT, a produção de nitrito e de nitrato também apresentou perfil linear (FIGURA 4.40), com taxas médias de produção de $0,65 \text{ mg N L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para o nitrito, e $0,70 \text{ mg N L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para o nitrato. A taxa de produção do nitrato foi ligeiramente superior à do nitrito, indicando que a nitratação não sofreu inibição significativa, mesmo sob aeração intermitente.

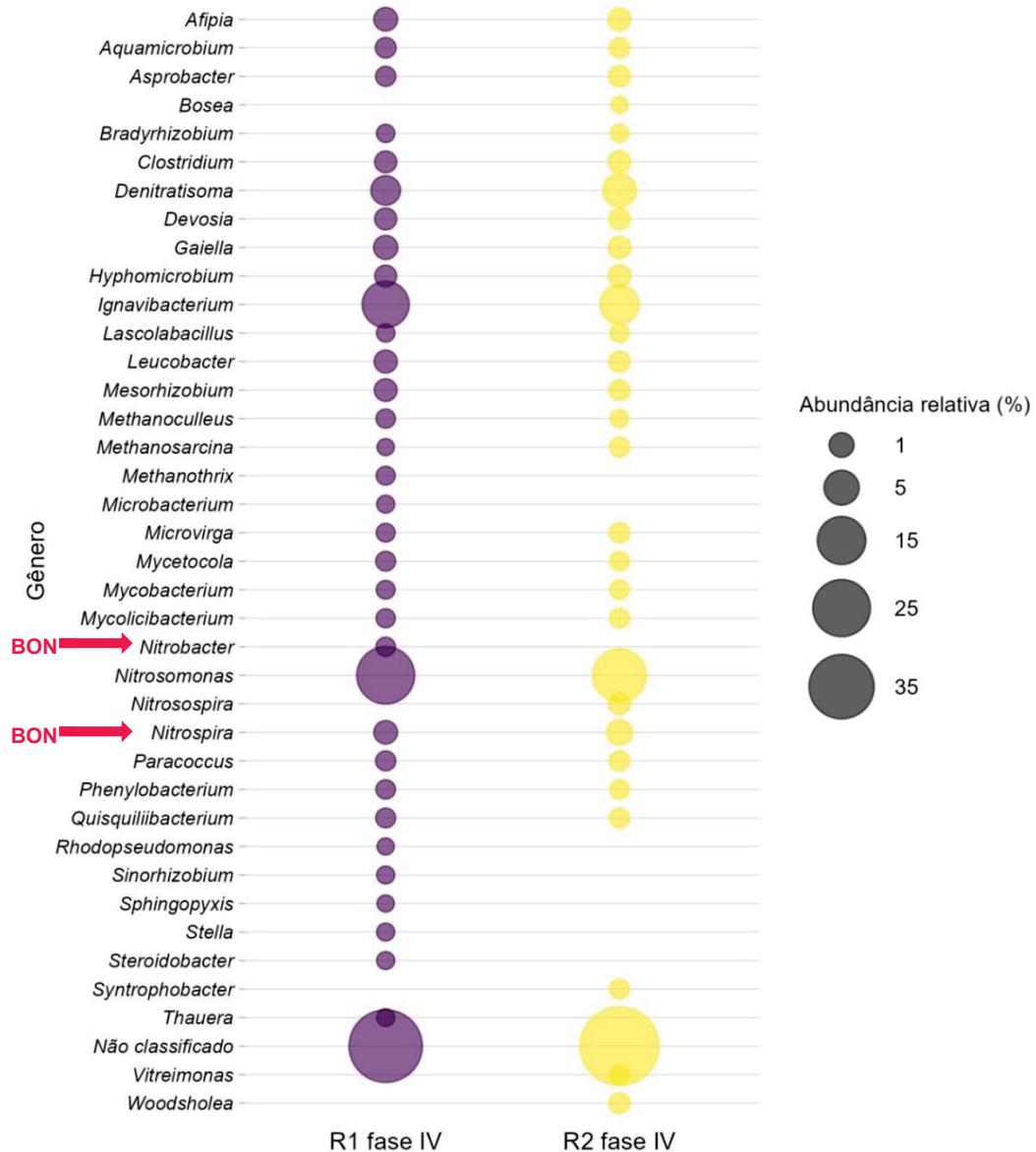
Os resultados para a PAN e para a concentração do nitrito e nitrato no efluente do biorreator R1 durante a fase V (FIGURA 4.39) confirmam que a produção de nitrato não sofreu inibição significativa, mesmo com a continuidade da aeração intermitente. Para o biorreator R1, a concentração média de nitrito efluente na fase IV foi de $31,8 \text{ mg N L}^{-1}$. Entretanto, para a fase V, para o mesmo biorreator, a concentração média de nitrito efluente foi de $49,7 \text{ mg N L}^{-1}$. Para a PAN, o valor médio foi de 45,9% na fase IV e 46,6% na fase V. Estes resultados indicam que o acúmulo de nitrito observado na fase IV foi mantido na fase V, mesmo sob o regime de aeração intermitente.

Contudo, a concentração do nitrato no efluente de R1 aumentou ao longo da fase V em comparação com a fase IV (FIGURA 4.39). No final da fase IV, a concentração do nitrato no efluente de R1 era de $26,0 \text{ mg N L}^{-1}$. Posteriormente, durante a fase V, a concentração de nitrato efluente aumentou, variando entre 48,0 e $74,4 \text{ mg N L}^{-1}$. A manutenção dos valores da PAN e o aumento da concentração do nitrato na fase V para R1 sugerem a recuperação da atividade metabólica das BON, mesmo sob regime de aeração intermitente, resultando no restabelecimento da nitratação e, conseqüentemente, da produção de nitrato.

Embora consideradas suscetíveis a baixas concentrações de oxigênio dissolvido (OD), as BON podem aclimatar-se à aeração intermitente. A aeração

intermitente e as baixas concentrações de OD podem ainda favorecer a seleção de BON mais tolerantes a estas condições. Neste estudo, após o encerramento da fase IV, realizada sob regime de aeração intermitente, foram detectadas sequências afiliadas a dois gêneros de BON (FIGURA 4.41), *Nitrospira* (0,74% para R1 e 1,20% para R2) e *Nitrobacter* (0,17% para R1 e 0,09% para R2). Estes resultados sugerem que mesmo com a limitação do oxigênio associada à aeração intermitente, as BON não foram completamente eliminadas dos biorreatores R1 e R2 e podem ter contribuído para a manutenção da nitratação.

FIGURA 4.41 – ABUNDÂNCIA RELATIVA DOS GÊNEROS DETECTADOS NAS AMOSTRAS DOS BIORREADORES R1 E R2 NA FASE IV



FONTE: a autora (2024)

NOTA: apenas os gêneros com abundância relativa igual ou superior a 0,1% foram representados. As setas apontam para os dois únicos gêneros de bactérias oxidantes do nitrito (BON) identificados nas amostras sequenciadas, *Nitrobacter* e *Nitrospira*.

Similarmente, Cao e colaboradores (2018) observaram que, ao reduzir a concentração de OD de $1,7 \text{ mg L}^{-1}$ para $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ em um sistema de lodos ativados dependente de nitrificação parcial, a atividade e a abundância relativa das BON aumentaram, enquanto a abundância relativa das BOA diminuiu 30 vezes. Além disso, ocorreu a mudança do gênero predominante de BON após a redução da concentração de OD, de *Nitrobacter* para *Nitrospira*, mais tolerante a condições microaeróbias. Por sua vez, Chen, Y. e colaboradores (2022) reportaram a persistência das BON, particularmente do gênero *Nitrospira*, após 200 dias de operação de um biorreator contínuo de fluxo pistão aplicado ao tratamento de esgoto sanitário sob aeração intermitente. Sob o regime de aeração intermitente, a abundância relativa das BON do gênero *Nitrospira*, inclusive, foi superior à das BOA.

Deng e colaboradores (2024) também observaram a persistência das BON mesmo sob condições microaeróbias ($< 0,1 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$). Estes autores compararam o desempenho dos micro-organismos nitrificantes sob duas condições: i) elevadas concentrações ($> 5 \text{ mg L}^{-1}$) e ii) baixas concentrações ($< 0,1 \text{ mg L}^{-1}$) de oxigênio dissolvido. Em ambos os sistemas, o gênero de BON predominante foi *Nitrospira*, porém sua abundância relativa no biorreator operado sob condições microaeróbias foi quatro vezes superior àquela obtida para o sistema com elevada concentração de oxigênio dissolvido. Mesmo sob condições microaeróbias, não foi observado acúmulo de nitrito no meio reacional, o que sugere que as BON se aclimataram às baixas concentrações de oxigênio dissolvido.

Além do acúmulo de nitrito associado ao distúrbio temporário do metabolismo das BON e, conseqüentemente, da nitratação, sugere-se que o nitrito também foi produzido em R1 e R2 na fase IV via desnitrificação parcial do lixiviado de aterro sanitário. De fato, foram identificados gêneros de bactérias desnitrificantes na biomassa de R1 e R2 (FIGURA 4.41), tendo sido *Denitratisoma* detectado em maior abundância relativa (2,49% para R1 e 4,15% para R2).

Ao investigar o efeito da aeração intermitente sobre a eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal de efluente da digestão de resíduos da suinocultura, Mota e colaboradores (2005) observaram que longos períodos sem aeração (> 3 horas por ciclo) favoreceram a ocorrência da desnitrificação parcial, resultando no acúmulo de nitrito. Lim e colaboradores (2007) obtiveram resultados similares ao estudar um reator de membrana aplicado ao tratamento de água residuária sintética operado sob aeração intermitente. Ao avaliar diferentes condições de tempo, estes autores

observaram que, quando o período sem aeração ultrapassava 70 minutos por ciclo, o nitrato era transformado em nitrogênio gasoso por meio da desnitrificação completa. Em contrapartida, para tempos inferiores, como o utilizado nesta pesquisa (1 hora sem aeração por ciclo), a desnitrificação parcial predominava, levando ao acúmulo do nitrito no meio reacional.

Sob regime de aeração intermitente, os micro-organismos desnitrificantes começam a reduzir o nitrato assim que a aeração cessa, pois a nitrito redutase, primeira enzima envolvida na desnitrificação, é pouco sensível ao oxigênio que está eventualmente presente no meio reacional (Krul; Veeningen, 1977; Baumann *et al*, 1997). Entretanto, quando a aeração é interrompida por períodos curtos, isto é, inferiores a 1,5 hora, a maioria dos organismos desnitrificantes não consegue sintetizar todo o conjunto de enzimas necessário para reduzir o nitrito a nitrogênio gasoso, pois as enzimas envolvidas são sensíveis ao oxigênio remanescente (Krul; Veeningen, 1977; Baumann *et al*, 1997), o que pode levar ao acúmulo de nitrito no meio reacional, também observado neste estudo.

Portanto, com base nos resultados desta pesquisa e na comparação com estudos anteriores, sugere-se que o regime operacional adotado (1 hora sem aeração seguida de 1 hora com aeração por ciclo) permitiu a ocorrência da desnitrificação parcial do lixiviado. Estas condições também promoveram a manutenção da atividade das BOA e a inibição temporária das BON, o que resultou no acúmulo de nitrito e na redução da concentração do nitrato em R1 e R2 ao longo da fase IV. Visando à inibição mais efetiva e duradoura das BON, os dados também indicam que as condições operacionais poderiam ser otimizadas, o que contribuiria para menor produção de nitrato no efluente.

Resultados do estudo de Miao e colaboradores (2017) indicam que, para promover o consumo do nitrito por outros micro-organismos, como as bactérias *anammox* e as desnitrificantes, e prevenir a produção do nitrato em sistemas que visam à nitrificação parcial e utilizam a aeração intermitente, a aeração deve ser desligada antes do restabelecimento da atividade das BON. Entretanto, nesta pesquisa, durante o acompanhamento de um ciclo operacional (FIGURA 4.40), foi observada a produção contínua do nitrato no biorreator R1, mesmo durante os períodos sem aeração. Estes resultados indicam que melhorias no regime de aeração são necessárias para maior controle da nitratação.

Outras pesquisas demonstraram que a nitratação pode ser inibida mediante ajustes nos parâmetros associados à aeração intermitente, como a duração dos ciclos, a frequência de aeração e a relação entre a duração das fases aeróbia e anóxica. Por exemplo, Carvalho e colaboradores (2021) testaram três configurações para o ciclo de aeração intermitente para um reator de leito estruturado aplicado ao tratamento de esgoto sanitário: i) 4 h com aeração ligada/2 h com aeração desligada; ii) 2 h com aeração ligada/1 h com aeração desligada; e iii) 2 h com aeração ligada/2 h com aeração desligada. Os autores observaram que estas condições estiveram associadas a diferenças no desempenho do sistema de tratamento, sendo que a condição com o menor tempo sem aeração (2h com aeração ligada/1 h com aeração desligada) foi aquela que resultou na maior média para a eficiência de remoção do nitrogênio total (67%), para carga volumétrica aplicada de $100 \text{ mg N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

Similarmente, Al-Hazmi e colaboradores (2020) e Chen, Y. e colaboradores (2022) avaliaram várias configurações para a aeração intermitente e sua influência na inibição da nitratação. Em ambos os estudos, algumas estratégias provocaram a inibição das BON, enquanto outras resultaram na manutenção da atividade desses micro-organismos e, conseqüentemente, na falha dos bioprocessos dependentes do controle da nitratação e do acúmulo do nitrito.

Alguns estudos mostraram que o aumento da frequência (número de ciclos de aeração por hora) e a diminuição da razão entre o tempo de aeração e o tempo sem aeração podem ser mais efetivos para a inibição das BON. Por exemplo, Li e colaboradores (2013) implementaram ciclos curtos de aeração intermitente (1,5 min com aeração ligada/0,7 min com aeração desligada) em um sistema aplicado à nitrificação parcial de lixiviado de aterro sanitário. Após 15 dias da transição da aeração contínua para a intermitente, o nitrito começou a acumular no efluente. Para uma carga volumétrica de $710 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, a eficiência média de remoção do nitrogênio do lixiviado foi de 63%. A inibição das BON provavelmente ocorreu em função da elevada concentração de amônia livre e da limitação da concentração do oxigênio associada à aeração intermitente realizada em ciclos curtos.

Em contrapartida, Al-Hazmi e colaboradores (2020) observaram que, em um reator em bateladas sequenciais aplicado ao tratamento de água residuária sintética, o aumento da frequência de aeração e a redução da razão entre a duração da fase aerada e da fase não aerada estiveram associados ao aumento da atividade das

BOA e à inibição das BON. Resultados similares foram obtidos por Yilmaz e colaboradores (2023) tratando efluente da indústria têxtil. Estes autores compararam a operação de biorreatores de membrana sob condições diversas para a aeração intermitente. Para diferentes configurações, a eficiência de remoção do nitrogênio total variou entre 29 a 51%. Os autores relataram que a variação da eficiência de remoção do nitrogênio esteve associada às diferenças nas relações entre a duração da fase aerada e da fase não aerada.

Por sua vez, Carvalho e colaboradores (2024) obtiveram eficiência média de remoção do nitrogênio amoniacal de 68% para um reator em bateladas sequenciais aplicado à nitrificação parcial/*anammox* de esgoto doméstico pré-tratado anaerobicamente, sob aeração intermitente em ciclos curtos (7 minutos com aeração ligada/14 minutos com aeração desligada). Os autores reportaram que esta condição de aeração esteve associada ao aumento populacional de bactérias *anammox*, o que favoreceu a remoção autotrófica do nitrogênio.

Em sistemas de tratamento dependentes da inibição da nitratação, como os baseados na nitrificação parcial e no processo *anammox*, é desejável o acúmulo do nitrito, pois ele é o substrato para as reações bioquímicas associadas à remoção do nitrogênio. Por isso, a persistência das BON, consumidoras do nitrito, é desfavorável nesses sistemas, e diversas estratégias são utilizadas para controle desses micro-organismos, como, por exemplo, a manipulação das condições operacionais.

Contudo, para o tratamento de lixiviado, a manipulação de condições como o regime de aeração e a concentração de amônia livre pode ser desafiadora devido à variabilidade local e temporal da composição e volume de produção desta água residuária. A concentração afluyente de amônia livre, por exemplo, pode diminuir esporadicamente e levar à ruptura das estratégias dependentes da inibição das BON. Analogamente, a vazão e a concentração dos componentes do lixiviado podem variar, o que demanda ajuste constante dos parâmetros de aeração.

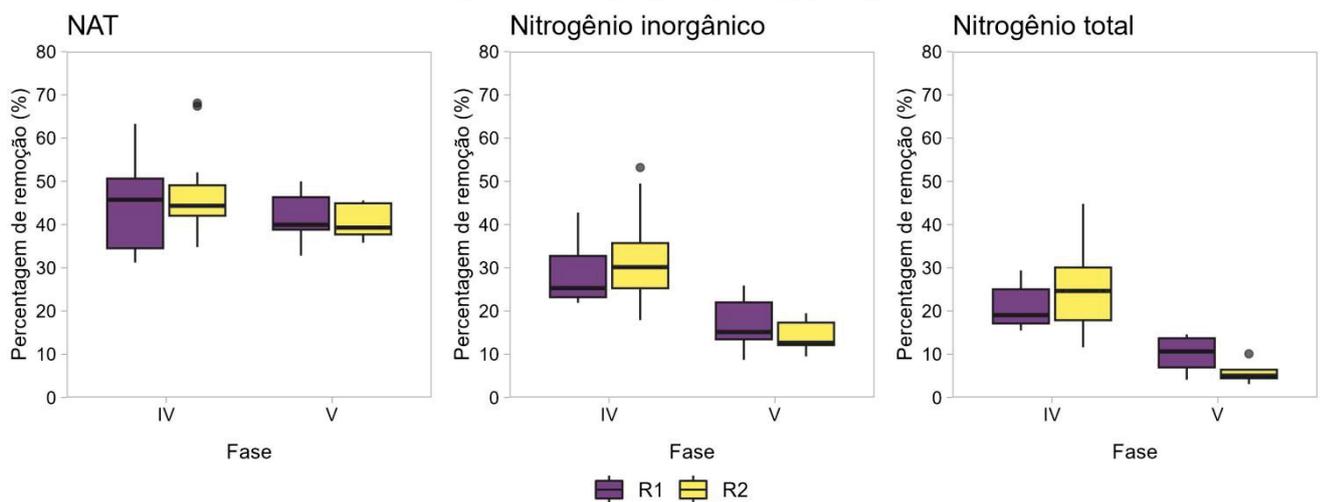
Assim, é possível combinar diferentes estratégias da engenharia de microbiomas para controlar mais efetivamente a nitrificação e favorecer o acúmulo do nitrito. Para tanto, nesta pesquisa, a manipulação das condições operacionais foi combinada ao bioaumento, realizado com a inoculação de biomassa enriquecida em micro-organismos nitrificantes e desnitrificantes.

4.3.3 Bioaumento

Para avaliar os efeitos do bioaumento sobre a eficiência e a estabilidade dos bioprocessos de remoção do nitrogênio do lixiviado, na fase V, o biorreator R2 foi inoculado com biomassa ativa. O biorreator R1 serviu como controle e recebeu biomassa inativada, na mesma concentração de R2. Nesta fase, assim como na anterior (IV), a concentração de NAT do afluente era de 400 mg N L^{-1} , enquanto a carga volumétrica era igual a $100 \text{ mg N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

Para R2, que recebeu a biomassa ativa, a eficiência média de remoção do nitrogênio amoniacal foi de 47,7% na fase IV e 40,7% na fase V, após o bioaumentamento (FIGURA 4.42). Os resultados para a eficiência de remoção do NAT em R2 nas fases IV (pré-bioaumentamento) e V (pós-bioaumentamento) não são significativamente diferentes entre si (Teste de Kruskal-Wallis com correção de BH, $p > 0,05$), indicando que o bioaumentamento de R2 não teve efeito significativo sobre a eficiência de remoção do NAT em comparação com a fase anterior.

FIGURA 4.42 – EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DO NAT, NITROGÊNIO INORGÂNICO E NITROGÊNIO TOTAL PARA R1 E R2 NAS FASES IV E V



FONTE: a autora (2024)

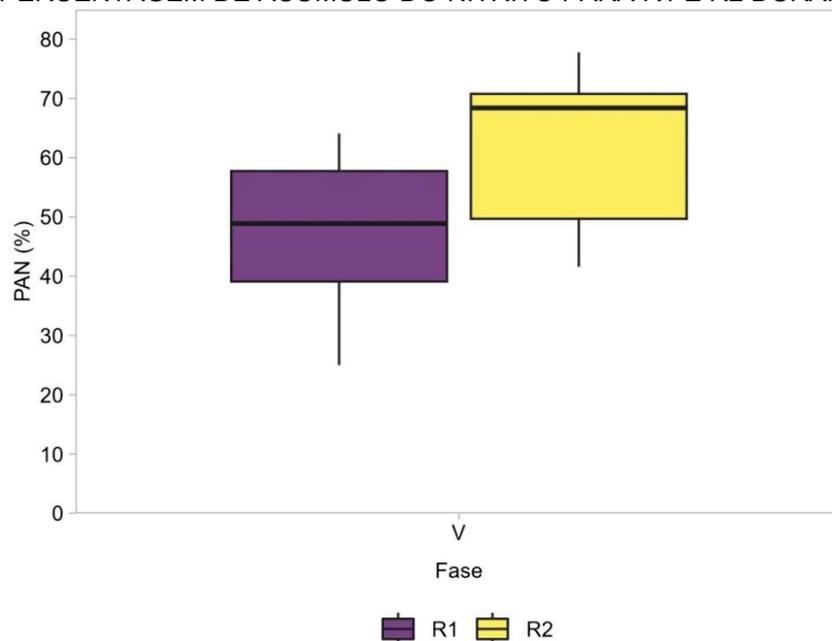
NOTA: NAT: nitrogênio amoniacal total; fase IV: pré-bioaumentamento; fase V: pós-bioaumentamento; R1: biorreator controle; R2: biorreator bioaumentado.

Quando comparados, o biorreator R2, que recebeu o bioaumentamento, e R1, o controle, não apresentaram diferença estatisticamente significativa quanto à eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal (Teste de Wilcoxon, $p > 0,05$). Estes resultados sugerem que a introdução da biomassa exógena em R2 não causou impacto significativo sobre as BOA em comparação com o controle.

Assim como observado para a eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal, na fase V, o bioaumento de R2, em comparação com o controle, não esteve associado a impactos nas eficiências de remoção do nitrogênio inorgânico nem do total (FIGURA 4.42). Na fase V, pós-bioaumento, a eficiência média de remoção do nitrogênio inorgânico foi de 17,3% para R1 (controle) e 14,1% para R2 (bioaumentado), sendo que não houve diferença significativa entre os resultados. Similarmente, na fase V, não houve diferença significativa entre os resultados obtidos para R1 e R2 em relação à eficiência de remoção do nitrogênio total (Teste de Wilcoxon, $p > 0,05$), com médias de 10,0% para R1 e 5,8% para R2.

Diferentemente do observado para as eficiências de remoção do NAT, nitrogênio inorgânico e total, na fase V, o bioaumento de R2 exerceu efeito significativo sobre a percentagem de acúmulo do nitrito em comparação com o biorreator controle (R1) (FIGURA 4.43).

FIGURA 4.43 – PERCENTAGEM DE ACÚMULO DO NITRITO PARA R1 E R2 DURANTE A FASE V



FONTE: a autora (2024)

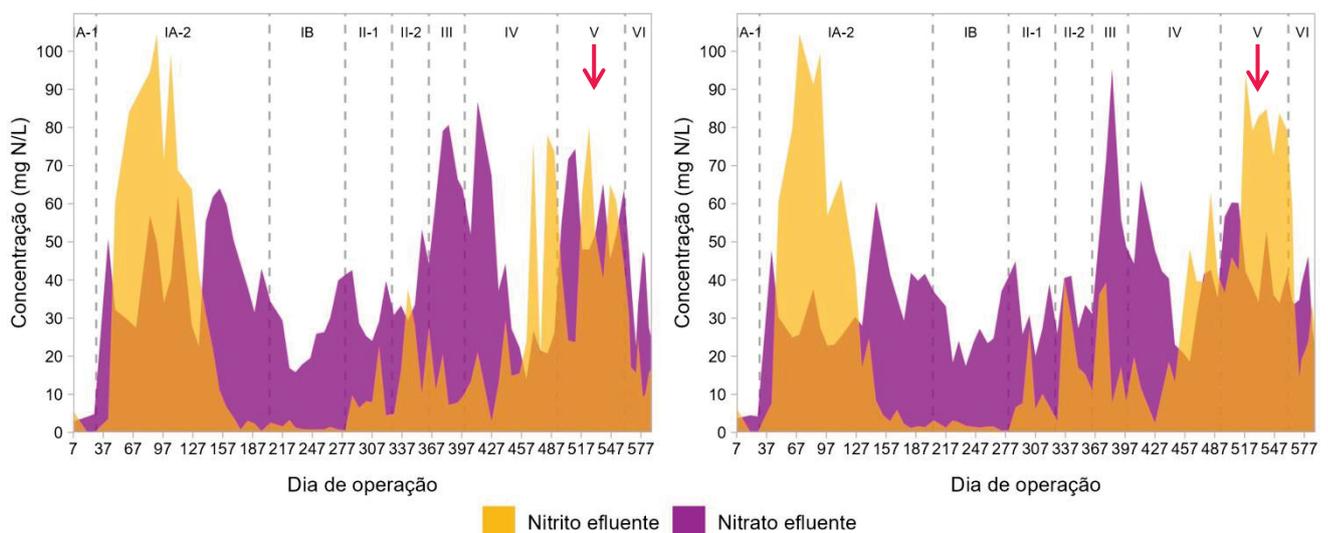
NOTA: PAN: percentagem de acúmulo do nitrito; R1: biorreator controle; R2: biorreator bioaumentado.

Na fase IV (pré-bioaumento), o valor médio da PAN foi de 45,9% para R1 e 42,2% para R2, com diferenças não significativas entre os biorreatores (Teste de Wilcoxon, $p > 0,05$). Este resultado indica que a concentração do nitrito acumulado era similar em ambos os biorreatores antes do bioaumento. Contudo, na fase V, o valor médio da PAN aumentou para 62,3% para R2 (bioaumentado), enquanto para

R1 (controle), a média foi de 46,6%. A diferença significativa entre os valores da PAN para R1 e R2 na fase V (Teste de Wilcoxon, $p \leq 0,05$) sugere que o bioaumento esteve associado ao maior acúmulo de nitrito em R2.

O maior acúmulo do nitrito no biorreator R2, em comparação com o controle (R1), foi confirmado pelos resultados para a concentração de nitrito no efluente após o bioaumento (FIGURA 4.44). Na fase IV, anterior ao bioaumento, a concentração média do nitrito no efluente de R2 era de $28,4 \text{ mg N L}^{-1}$. Na fase V, após o bioaumento, a concentração média aumentou para $70,2 \text{ mg N L}^{-1}$, valor 2,5 vezes maior do que aquele obtido na fase anterior. Em contraste, para o biorreator controle (R1), a concentração média de nitrito aumentou apenas 1,5 vezes, de $31,8 \text{ mg N L}^{-1}$ na fase IV para $49,7 \text{ mg N L}^{-1}$ na fase V.

FIGURA 4.44 – CONCENTRAÇÃO DE NITRITO E NITRATO DURANTE A OPERAÇÃO DE R1 E R2



FONTE: a autora (2024)

R1: biorreator controle; R2: biorreator bioaumentado.

Além do maior acúmulo de nitrito no efluente de R2, o bioaumento também esteve associado à menor produção de nitrato em comparação com o biorreator controle (R1) (FIGURA 4.44). Na fase V, após o bioaumento em R2, o nitrito predominou sobre o nitrato nesse biorreator. Por outro lado, para o biorreator R1, mantido como controle, as concentrações de nitrito e de nitrato no efluente foram similares entre si, não tendo predomínio significativo de um íon sobre o outro.

Adicionalmente, na fase V, o aumento da concentração do nitrato no efluente de R2 foi menor do que em R1. Para o biorreator controle (R1), as concentrações

médias de nitrato no efluente foram de 37,2 mg N L⁻¹ na fase IV (pré-bioaumentação) e 57,5 mg N L⁻¹ na fase V (pós-bioaumentação), o que representa aumento de 55% entre as fases. Por sua vez, para o biorreator R2, o aumento foi de 21%, com concentrações médias de nitrato no efluente iguais a 37,8 mg N L⁻¹ na fase IV e 45,7 mg N L⁻¹ na fase V.

Na fase V, os resultados para o bioaumentação sugerem que a biomassa bioaumentada em R2 pode ter realizado a desnitratação parcial, isto é, parte do nitrato produzido foi convertida em nitrito pelas BON. A realização da desnitratação parcial pela microbiota bioaumentada em R2 é compatível com a menor concentração de nitrato e maior acúmulo de nitrito no efluente deste biorreator em comparação com o controle, sem causar diferença significativa na remoção do nitrogênio inorgânico e total.

Embora a desnitratação seja um processo heterotrófico, o lixiviado apresentava baixa concentração de matéria orgânica biodegradável que poderia ser utilizada pela microbiota desnitrificante. A relação DBO₅/DQO igual a 0,26, indicando que até 26% da matéria orgânica poderia ser biodegradada. Por outro lado, durante a fase V, a eficiência média de remoção da DQO foi igual a 15,5% para R1 e 14,2% para R2, valores próximos à percentagem estimada para a DQO biodegradável em relação à DQO total (26%). Estes resultados indicam que a maior parte da matéria orgânica biodegradável do lixiviado foi consumida pela microbiota dos biorreatores durante a fase V.

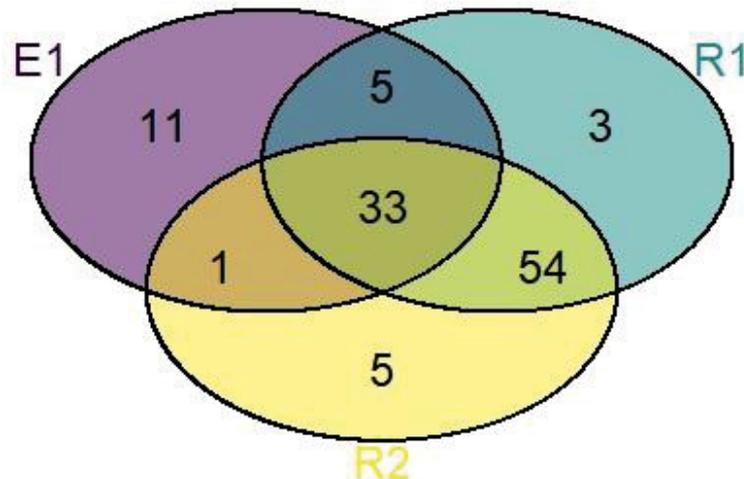
O carbono orgânico para a desnitratação pode ter sido disponibilizado pelo decaimento celular. Em sistemas com elevadas idades de lodo, como R1 e R2, o decaimento celular pode representar fonte não desprezível de matéria orgânica e de nutrientes para a manutenção da atividade metabólica microbiana (Bonassa *et al.*, 2021; Al-Hazmi *et al.*, 2023).

O maior acúmulo de nitrito e a possível desnitratação parcial ocorrida em R2 após o bioaumentação podem ser explicados pela composição da comunidade microbiana da biomassa inoculada neste biorreator na fase V. A biomassa para o bioaumentação foi produzida previamente no biorreator E1 (Seção 4.2) e tinha sido enriquecida com micro-organismos nitrificantes e desnitrificantes. A atividade desses micro-organismos pode ter contribuído para as diferenças observadas entre o biorreator bioaumentado (R2) e o controle (R1).

Para comparar a composição da comunidade microbiana na biomassa utilizada para o bioaumento (biorreator E1) com as amostras dos biorreatores R1 e R2 antes do bioaumento, foi realizado o sequenciamento de *amplicons* do gene 16S rRNA. Ressalta-se que a comparação entre os resultados é exclusivamente qualitativa, pois não foi possível realizar análise estatística para verificação da significância dos resultados devido à limitação amostral.

Dos gêneros identificados nas três amostras (E1, R1 e R2), 54 (48%) foram detectados apenas em R1 e R2. Além disso, outros 33 gêneros estavam presentes também na amostra de E1, além de R1 e R2 (FIGURA 4.45). Portanto, foram identificados 88 gêneros (78%) em comum entre R1 e R2, o que sugere um núcleo microbiano compartilhado entre os dois biorreatores antes do bioaumento.

FIGURA 4.45 – DISTRIBUIÇÃO DOS GÊNEROS IDENTIFICADOS NAS AMOSTRAS DOS BIORRETORES E1, R1 E R2 ANTERIORMENTE AO BIOAUMENTO



FONTE: a autora (2024)

Na amostra do biorreator E1, em que a biomassa para o bioaumento foi produzida, foram identificados 50 gêneros procarióticos. Destes, 33 gêneros (29% do total) foram detectados também nas amostras dos biorreatores R1 e R2 logo antes do bioaumento (FIGURA 4.45). Onze gêneros (10%) foram observados exclusivamente na biomassa de E1 (TABELA 4.5).

Além da presença de grupos detectados exclusivamente na biomassa do biorreator E1, foram identificadas diferenças na abundância relativa de alguns gêneros procarióticos entre as amostras coletadas em E1, R1 e R2 antes do bioaumento (FIGURA 4.46).

TABELA 4.5 – GÊNEROS EXCLUSIVOS DA BIOMASSA DO BIORREATOR E1

Gênero	Abundância relativa (%)	Função principal
<i>Acidovorax</i>	0,26	Desnitrificante
<i>Thiobacillus*</i>	0,72	
<i>Nocardia</i>	0,05	
<i>Pinisolibacter</i>	0,12	Heterótrofo: degradação da matéria orgânica
<i>Pseudonocardia</i>	0,05	
<i>Roseomonas</i>	0,12	
<i>Serratia</i>	0,04	
<i>Zooglea</i>	0,05	
<i>Methylobacterium</i>	0,09	Metilotrófico
<i>Methyloparacoccus</i>	0,12	
<i>Methylosarcina</i>	0,05	

FONTE: a autora (2024)

NOTA: (*): apenas algumas espécies pertencentes ao gênero apresentam a função citada.

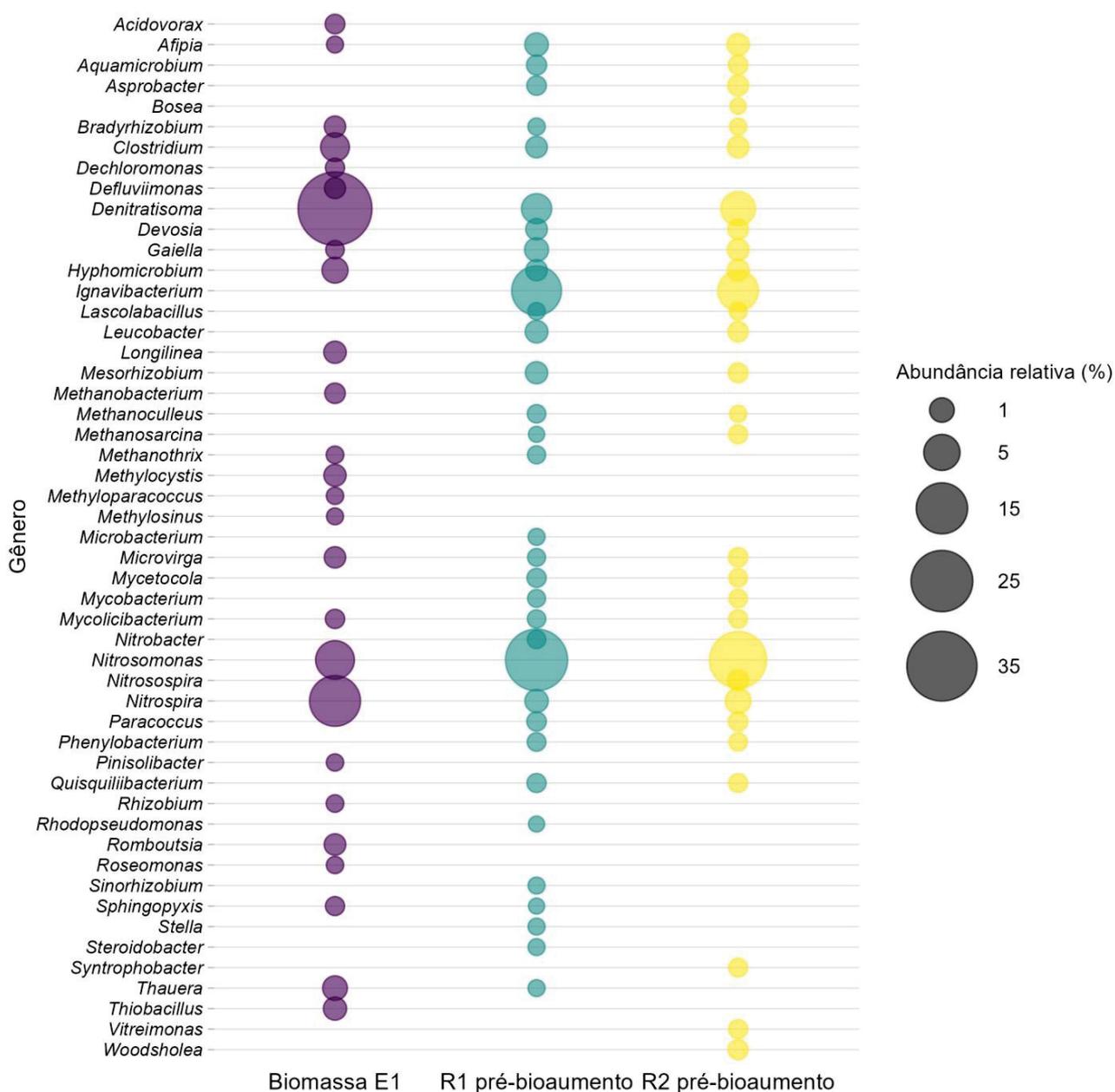
As amostras de R1 e R2, coletadas antes do bioaumento, continham gêneros ausentes em E1 (FIGURA 4.46). Entre eles, os que apresentaram maior abundância relativa foram *Aquamicrobium* (R1: 0,29%; R2: 0,23%), *Ignavibacterium* (R1: 13,63%; R2: 7,32%), *Mycetocola* (R1: 0,21%; R2: 0,16%), *Mycobacterium* (R1: 0,14%; R2: 0,16%), *Paracoccus* (R1: 0,23%; R2: 0,23%), *Phenylobacterium* (R1: 0,18%; R2: 0,16%), *Quisquiliibacterium* (R1: 0,21%; R2: 0,19%) e *Sinorhizobium* (R1: 0,11%; R2: 0,09%). Todos estes gêneros contêm espécies heterótroficas (Dueholm *et al.*, 2024) e podem, portanto, estar associados à degradação da matéria orgânica do lixiviado alimentado em R1 e R2.

Além da ausência dos gêneros mencionados, a amostra do biorreator E1 apresentou menor abundância relativa de alguns gêneros em comparação com R1 e R2 (FIGURA 4.46). A maioria desses gêneros, como *Afipia*, *Asprobacter*, *Devosia*, *Leucobacter*, *Mesorhizobium* e *Gaiella*, inclui bactérias heterotróficas (Dueholm *et al.*, 2024). A maior abundância observada em R1 e R2 pode ser atribuída à alimentação dos biorreatores com lixiviado, que, muito provavelmente, continha matéria orgânica necessária para o metabolismo heterotrófico, ao contrário do meio mineral utilizado para a produção de biomassa em E1.

Nitrosomonas e *Nitrospira* foram os únicos gêneros de BOA identificados nas amostras dos biorreatores antes do bioaumento (FIGURA 4.46). *Nitrospira* foi detectado nas amostras de R1 (0,08%) e R2 (0,39%) e não esteve presente no biorreator E1. Em contraste, *Nitrosomonas* foi encontrado nas amostras dos três biorreatores, com abundâncias relativas entre três e quatro vezes maiores em R1 (25,33%) e R2 (20,18%) do que em E1 (6,29%). Esta diferença pode ser atribuída às elevadas concentrações de nitrogênio amoniacal em R1 e R2 (aproximadamente

400 mg N L⁻¹ na fase IV) em comparação com E1 (nitrogênio total afluente igual a 20 mg N L⁻¹). As BOA dos gêneros *Nitrosospira* e *Nitrosomonas* apresentam baixa afinidade pela amônia (Kits *et al.*, 2017; Jung *et al.*, 2021; Martinez-Rabert *et al.*, 2022), o que favorece o seu crescimento em condições de elevada concentração desse substrato, como em R1 e R2.

FIGURA 4.46 – ABUNDÂNCIA RELATIVA DOS GÊNEROS DETECTADOS NAS AMOSTRAS DOS BIORREATORES E1, R1 E R2 ANTERIORMENTE AO BIOAUMENTO



FONTE: a autora (2024)

NOTA: foram representados apenas os gêneros com abundância relativa igual ou superior a 0,1%. A soma dos gêneros com abundância relativa inferior a 0,1% resultou em 1,04% para E1; 2,31% para R1 pré-bioaumentação e 2,46% para R2 pré-bioaumentação.

Quanto aos gêneros de BON identificados, *Nitrobacter* esteve ausente na amostra de E1, enquanto sua abundância relativa foi igual a 0,17% para R1 e 0,09% para R2 antes do bioaumento. Por outro lado, a abundância relativa de *Nitrospira* em E1 (14,65%) foi entre 12 e 20 vezes maior do que em R1 (0,74%) e R2 (1,20%). A ausência de *Nitrobacter* e a maior abundância relativa de *Nitrospira* em E1 podem ser atribuídas às características ecofisiológicas desses gêneros. Em geral, o gênero *Nitrospira* predomina sobre *Nitrobacter* sob condições oligotróficas, com baixas concentrações de nitrogênio e nitrito (Blackburne *et al.*, 2007; Nowka; Daims; Spieck, 2015; Martinez-Rabert *et al.*, 2022), como as observadas no biorreator E1 (nitrogênio total afluente: 20 mg N L⁻¹).

A biomassa do biorreator E1 também apresentou maior abundância relativa de diversos gêneros capazes de realizar a desnitrificação, quando comparada com R1 e R2, como *Acidovorax*, *Bradyrhizobium*, *Dechloromonas*, *Defluviimonas*, *Hyphomicrobium*, *Thauera* e *Thiobacillus* (Dueholm *et al.*, 2024) (FIGURA 4.46). Além disso, a principal diferença observada entre as amostras de E1, R1 e R2 foi a abundância relativa do gênero *Denitratisoma*, também associado à desnitrificação. Na amostra do biorreator E1, foi identificado que a abundância relativa deste gênero era de 39,96%, valor entre 10 e 16 vezes maior do que o determinado para R1 (2,49%) e R2 (4,15%) antes do bioaumento.

Assim, como a biomassa de E1 foi inoculada em R2 para o bioaumento, sugere-se que, na fase V, o maior acúmulo de nitrito observado em R2 pode ser atribuído à abundância elevada de gêneros bacterianos capazes de realizar a desnitrificação, sobretudo *Denitratisoma*. Os micro-organismos presentes na biomassa de E1 e que apresentaram capacidade de realizar a desnitrificação podem ter utilizado a matéria orgânica do lixiviado para a redução do nitrato a nitrito, que teria acumulado no meio reacional de R2 após o bioaumento. Como consequência, a PAN em R2 foi significativamente superior à observada em R1 após o bioaumento com a biomassa enriquecida em micro-organismos desnitrificantes.

Apesar do maior acúmulo de nitrito em R2 após o bioaumento ser favorável para os bioprocessos dependentes da nitrificação, como a nitrificação parcial e o processo *anammox*, a elevada concentração de nitrato no efluente deste biorreator (média igual a 45,7 mg N L⁻¹ na fase V) indica que ainda havia atividade expressiva das BON. Durante a fase V, além de receber o bioaumento, o biorreator R2 foi operado sob regime de aeração intermitente e com concentração média de amônia

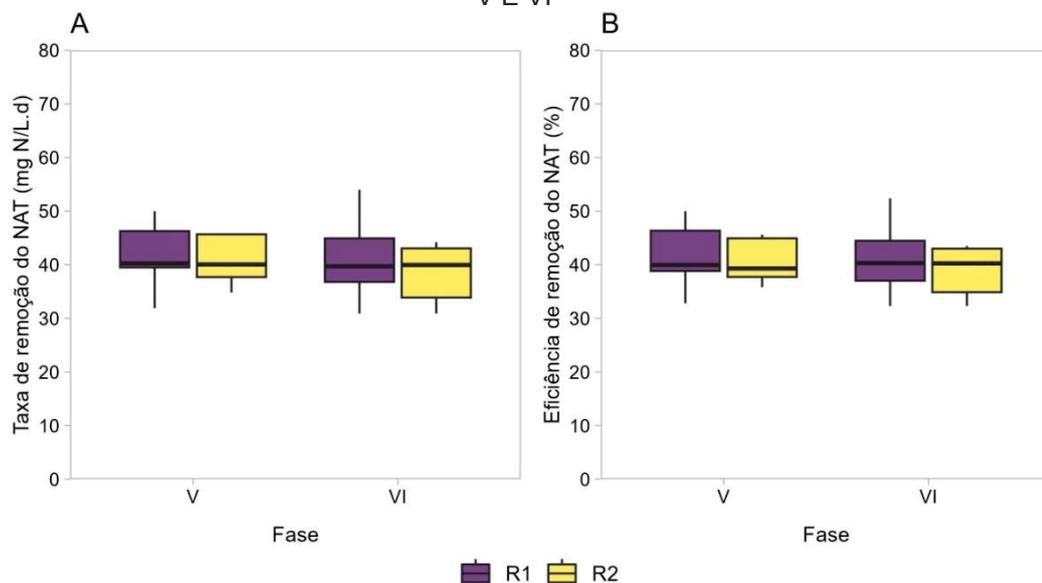
livre afluente de 55,2 mg N L⁻¹. Logo, mesmo com a combinação de estratégias visando ao controle da nitratação, a atividade metabólica das BON não foi completamente inibida.

4.3.3.1 Redução do tempo de detenção hidráulica (TDH)

Para avaliar o efeito do bioaumento frente à variabilidade de condições ambientais frequentemente observada durante o tratamento de lixiviados, na fase VI, o tempo de detenção hidráulica foi reduzido de 4 dias para 2 dias. A concentração de NAT do afluente diminuiu de 400 mg N L⁻¹ para 200 mg N L⁻¹ a partir da diluição de quatro vezes do lixiviado (uma parte de lixiviado para três partes de água de torneira), e a carga volumétrica foi mantida em 100 mg N L⁻¹ d⁻¹. Estas condições operacionais foram ajustadas para simular as variações temporais inerentes à produção de lixiviado em aterros sanitários, que frequentemente impõem desafios ao tratamento em função do desequilíbrio que podem causar nos bioprocessos associados. Também visou à avaliação do efeito da redução do TDH sobre o desempenho dos bioprocessos realizados em R1 e R2.

Conforme resultados para a taxa de remoção do nitrogênio amoniacal (FIGURA 4.47 A), as mudanças realizadas na fase VI não implicaram em diferenças significativas nos desempenhos de R1 (controle) e de R2 (bioaumentado).

FIGURA 4.47 – TAXA E EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DO NAT PARA R1 E R2 DURANTE AS FASES V E VI



FONTE: a autora (2024)

NOTA: NAT: nitrogênio amoniacal total; R1: biorreator controle; R2: biorreator bioaumentado.

Na fase V, a taxa média de remoção do NAT foi de 42 mg N L⁻¹ d⁻¹ para R1 e 41 mg N L⁻¹ d⁻¹ para R2 (FIGURA 4.47 A). Já na fase VI, após as mudanças operacionais (redução do TDH para 2 dias e da concentração de NAT do afluente para 200 mg N L⁻¹), a taxa média de remoção do NAT foi de 41 mg N L⁻¹ d⁻¹ para R1 e 39 mg N L⁻¹ d⁻¹ para R2 (FIGURA 4.47 A). Os resultados entre as fases V e VI não são significativamente diferentes entre si, para ambos os biorreatores (Teste de Kruskal-Wallis com correção de BH, $p > 0,05$). Durante a fase VI, também não foram identificadas diferenças significativas entre as taxas de remoção no biorreator controle (R1) e no biorreator bioaumentado (R2) (Teste de Wilcoxon, $p > 0,05$).

Durante a fase VI, a eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal também não foi significativamente afetada pela variação das condições operacionais e ambientais (FIGURA 4.47 B). Na fase VI, a eficiência média de remoção do NAT foi de 41,4% para R1 e 38,9% para R2, sem diferença significativa em relação à fase V para ambos os biorreatores (Teste de Kruskal-Wallis com correção de BH, $p > 0,05$). Além disso, os resultados determinados na fase VI não são significativamente diferentes entre os biorreatores R1 (controle) e R2 (bioaumentado). Estes resultados sugerem que a redução do tempo de detenção hidráulica para 2 dias e a manutenção da carga volumétrica na fase VI (100 mg N L⁻¹) não impactaram significativamente a nitrificação ou a atividade das BOA em nenhum dos biorreatores.

Embora não tenha sido observado efeito significativo sobre a eficiência de remoção do NAT, a redução do TDH pode comprometer a eficiência de outros bioprocessos, sobretudo de remoção de poluentes complexos e matéria orgânica refratária. Para águas residuárias que contêm elevada concentração de matéria orgânica recalcitrante, como o lixiviado utilizado neste estudo, TDH longos (> 24 horas) são mais indicados. Enquanto TDH curtos podem aumentar a capacidade de tratamento, eles tendem a causar instabilidade e reduzir a eficiência dos bioprocessos aplicados ao lixiviado estabilizado. Por outro lado, TDH longos promovem maior degradação de poluentes, embora impliquem em custos operacionais mais elevados e menor capacidade de tratamento.

Nuansawan e colaboradores (2016) observaram que a mudança do TDH de 5 dias para 2,5 dias resultou na redução da eficiência de remoção tanto da matéria orgânica (de 92,2% para 81,0%, avaliada por meio da DQO) como do nitrogênio amoniacal (de 87,3% para 80,8%) em um reator aeróbio de membranas aplicado para o tratamento de lixiviado de aterro sanitário. Por vez, Liu e colaboradores

(2018) reportaram que, para um biorreator de membrana de dois estágios (anóxico/aeróbio/anóxico/aeróbio) tratando lixiviado de aterro sanitário, as maiores eficiências de remoção da matéria orgânica (82,4%, medida como DQO), nitrogênio amoniacal (99,1%) e nitrogênio total (75,3%) foram obtidas para um TDH de 7 dias. Os autores avaliaram também TDH de 5 dias, para o qual foi observada a degradação incompleta da matéria orgânica (eficiência de remoção da DQO de 72%), provavelmente em função do tempo insuficiente para a decomposição dos compostos orgânicos refratários do lixiviado.

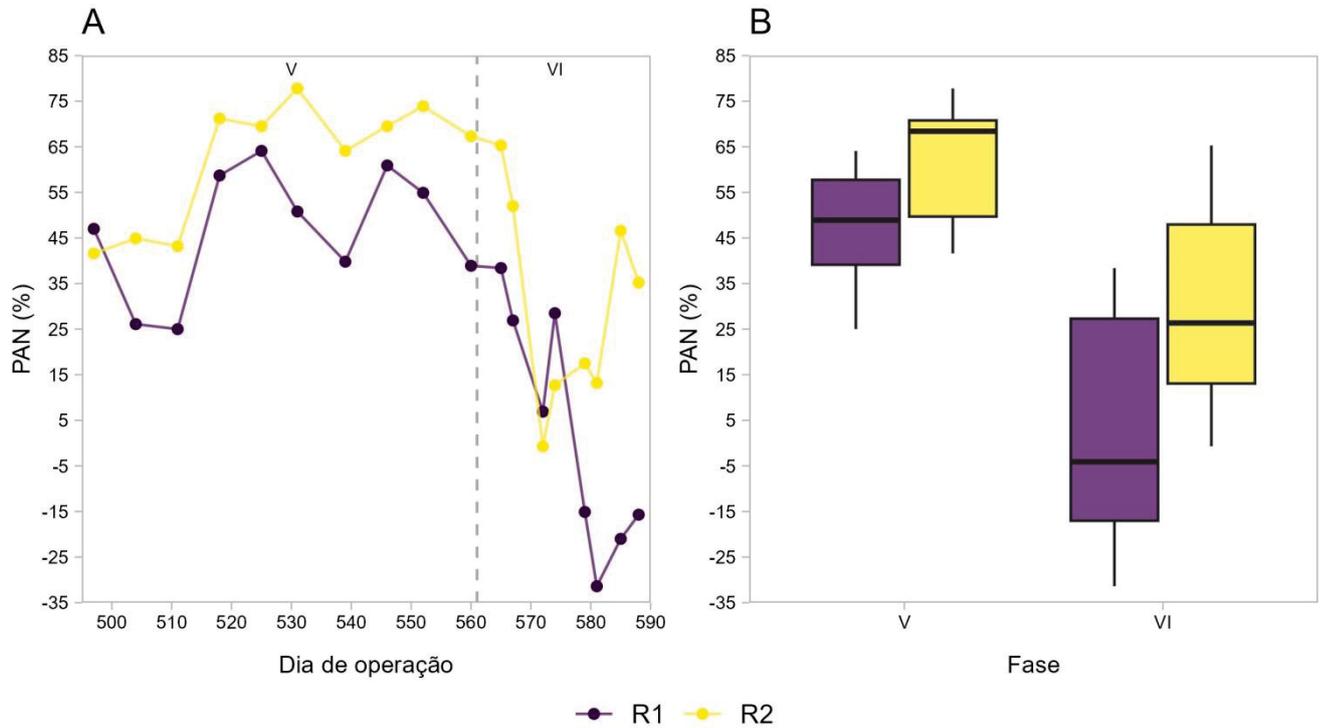
O TDH pode afetar também os bioprocessos heterotróficos que contribuem para a remoção do nitrogênio amoniacal, como a desnitrificação, como observado por Yan e colaboradores (2018). Estes autores avaliaram a desnitrificação de lixiviado estabilizado misturado a um efluente da fermentação de resíduos orgânicos. O aumento do TDH de 7 dias para 14 dias resultou em melhor qualidade do efluente, com menor concentração de nitrato. Esses resultados sugerem que maiores TDH possibilitaram a degradação da matéria orgânica recalcitrante, que pode então ser utilizado pela microbiota desnitrificante e contribuir para a remoção do nitrogênio do lixiviado. Portanto, dada a relevância da desnitrificação para a remoção do NAT do lixiviado, recomenda-se, em estudos futuros, que o TDH seja otimizado para que exista balanço entre a eficiência do tratamento e a viabilidade econômica.

A relação entre o aumento do TDH e a maior eficiência de remoção de poluentes foi reportada também por Boonnorat e colaboradores (2019). Estes autores avaliaram o desempenho de um sistema de lodos ativados para a remoção de micropoluentes do lixiviado. Para isso, o lixiviado foi misturado a efluente agrícola, o que resultou em uma água residuária contendo fenóis, ftalatos e fármacos (como carbamazepina e diclofenaco). Os autores observaram a redução significativa da eficiência de remoção da maioria dos micropoluentes investigados quando o TDH foi reduzido de 24 horas para 12 horas. Em função dos resultados, os autores recomendaram a aplicação de um TDH mínimo de 24 horas para o tratamento de águas residuárias complexas, como o lixiviado de aterro sanitário, o que garante a remoção de compostos orgânicos refratários e micropoluentes e previne a liberação dessas substâncias em corpos hídricos receptores, o que pode causar impactos ambientais.

Apesar de não terem exercido efeito significativo sobre a eficiência de remoção do NAT, as mudanças operacionais realizadas na fase VI (redução do TDH

de 4 dias para 2 dias e da concentração de NAT do afluente de 400 mg N L⁻¹ para 200 mg N L⁻¹) estiveram associadas à interrupção do acúmulo do nitrito e à redução da PAN, particularmente no biorreator R1 (FIGURA 4.48).

FIGURA 4.48 – PERCENTAGEM DE ACÚMULO DO NITRITO PARA R1 E R2 DURANTE AS FASES V E VI



FONTE: a autora (2024)

NOTA: PAN: percentagem de acúmulo do nitrito; R1: biorreator controle; R2: biorreator bioaumentado.

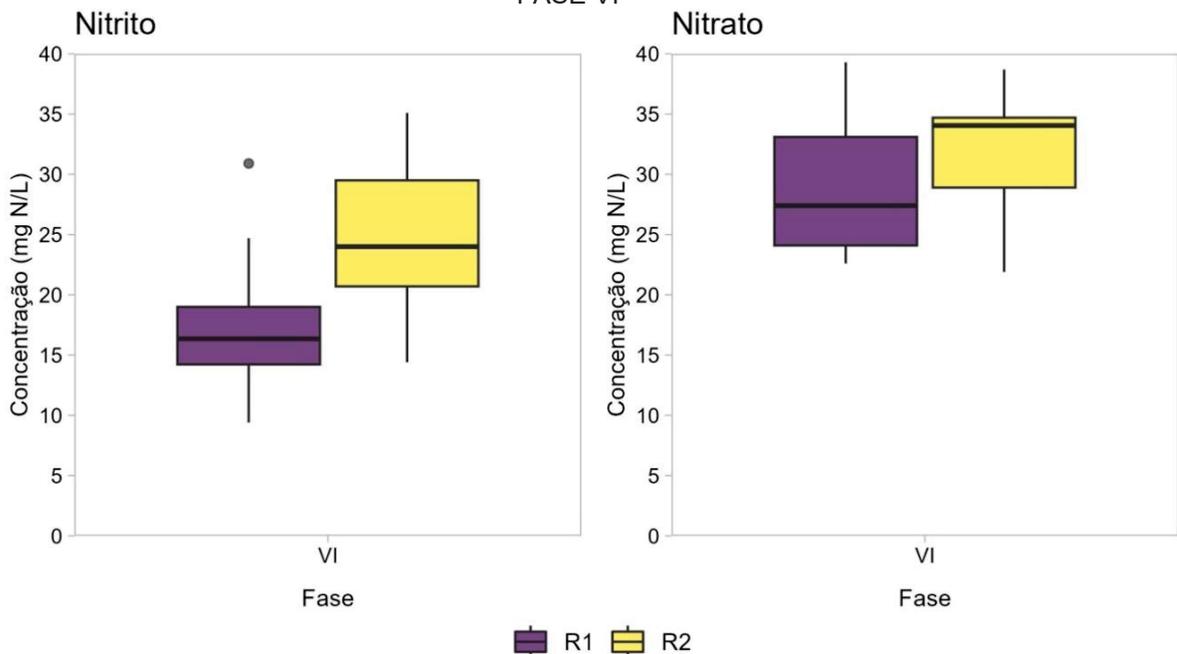
Na fase VI, a PAN diminuiu e o seu valor médio foi igual a 2,2% para R1 (controle) e 30,2% para R2 (FIGURA 4.48), resultados significativamente diferentes daqueles obtidos na fase V para ambos os biorreatores (Teste de Kruskal-Wallis com correção de BH, $p \leq 0,05$). Na fase VI, apesar das mudanças operacionais terem afetado a PAN em ambos os biorreatores, a redução do valor deste parâmetro foi menor para o biorreator R2, que havia recebido o bioaumento, em comparação com o controle (FIGURA 4.48 B).

A percentagem de acúmulo do nitrito para R1 variou entre 38,4%, no início da fase VI, e -15,7%, no final da operação dos biorreatores, tendo sido atingido o valor mínimo (-31,4%) após 20 dias (FIGURA 4.48 A). Os valores negativos para a PAN indicam que a concentração do nitrito no efluente era inferior à do afluente. Por vez, para R2, a PAN variou de 67,3%, no início da fase VI, a -0,7%, valor mínimo

obtido após 12 dias. Após este período, o nitrito voltou a acumular em R2 e a PAN aumentou progressivamente até o final da operação, quando foi igual a 35,2%.

A diferença entre o comportamento dos biorreatores controle (R1) e bioaumentado (R2) também foi determinada para a concentração do nitrito efluente (FIGURA 4.49). Na fase VI, a concentração média do nitrito foi igual a 17,5 mg N L⁻¹ para R1 (controle) e 29,1 mg N L⁻¹ para R2, com resultados significativamente diferentes entre os biorreatores (Teste de Wilcoxon, $p \leq 0,05$). Em contrapartida, a concentração do nitrato efluente durante a fase VI (FIGURA 4.49) não apresentou diferenças significativas entre os biorreatores (Teste de Wilcoxon, $p > 0,05$), com valores médios de 35,9 mg N L⁻¹ para R1 e 35,2 mg N L⁻¹ para R2.

FIGURA 4.49 – CONCENTRAÇÃO DE NITRITO E NITRATO EFLUENTE EM R1 E R2 DURANTE A FASE VI



FONTE: a autora (2024)

Durante a fase VI, a redução observada na percentagem de acúmulo do nitrito, associada às concentrações elevadas de nitrato no efluente de ambos os biorreatores, sugere a recuperação da atividade metabólica das BON após as mudanças das condições operacionais. Embora a carga volumétrica tenha sido mantida igual à da fase precedente e possa ser considerada relativamente elevada (100 mg N L⁻¹ d⁻¹), a redução da concentração do nitrogênio amoniacal afluente (de 400 mg N L⁻¹ para 200 mg N L⁻¹) pode ter favorecido a retomada da nitratação.

Juntamente com a concentração do nitrogênio afluente, a concentração da amônia livre diminuiu na fase VI, com média igual a 31,5 mg N L⁻¹. A menor concentração da amônia livre em relação às fases anteriores pode ter ocasionado a reaclimação das BON às novas condições operacionais, visto que esta substância é considerada inibitória para estes organismos quando em elevadas concentrações.

Wei e colaboradores (2024) reportaram resultados similares durante a operação de um reator *airlift* aplicado à nitrificação parcial e ao processo *anammox* simultâneos para o tratamento de água residuária sintética. Os autores observaram que o regime de aeração intermitente e a presença de amônia livre em concentração média de 35 mg N L⁻¹ produziram efeitos inibitórios desprezíveis sobre as BON. Ao longo da operação, foi observado aumento repentino da população das BON, o que prejudicou a nitrificação parcial/*anammox*. A atividade das BON foi controlada somente após a realização do bioaumento com biomassa enriquecida em bactérias *anammox*, que passaram a competir com as BON pelo nitrito acumulado, resultando no aumento da eficiência de remoção do nitrogênio total, de 32% para 80%.

Ainda que a produção de nitrato a partir da oxidação do nitrito pelas BON tenha ocorrido em R1 e R2 durante a fase VI, o bioaumento de R2 contribuiu para a manutenção de concentrações mais elevadas de nitrito no efluente deste biorreator em comparação com o controle. O bioaumento também esteve associado à recuperação mais rápida do acúmulo do nitrito no biorreator R2 (bioaumentado) em relação ao controle (FIGURA 4.48 A).

Para o biorreator controle (R1), a recuperação da PAN não foi observada durante os 36 primeiros dias da fase VI, tendo sido obtidos, inclusive, valores negativos no final da operação. Em contraste, para o biorreator R2, a redução da PAN ocorreu nos primeiros 12 dias sob as novas condições operacionais. Após este período, a PAN aumentou progressivamente até o encerramento da operação, depois de aproximadamente 30 dias do início da fase VI (FIGURA 4.48 A). Assim, pode ser sugerido que o bioaumento tenha auxiliado na manutenção da produção do nitrito e resultado na rápida recuperação do acúmulo do nitrito após os distúrbios provocados pela mudança das condições operacionais.

O maior acúmulo do nitrito em R2 após o bioaumento (fases V e VI) pode estar relacionado às condições operacionais e ambientais aplicadas durante o processo de enriquecimento da biomassa exógena inoculada neste biorreator. Durante a operação do biorreator E1, utilizado para a produção de biomassa para o

bioaumentação, a concentração de oxigênio dissolvido (OD) no licor misto manteve-se inferior a $0,5 \text{ mg L}^{-1}$. Além disso, o meio mineral não continha carbono orgânico.

Similarmente, Bian e colaboradores (2024) realizaram o enriquecimento de lodo nitrificante sob baixa concentração de OD (aproximadamente $0,7 \text{ mg L}^{-1}$) e sem adição de carbono orgânico. Paralelamente, realizaram o enriquecimento da biomassa nitrificante sob elevada concentração de OD (aproximadamente 3 mg L^{-1}). Ao comparar o desempenho da nitrificação parcial da água residuária sintética, os autores observaram maior acúmulo do nitrito no sistema inoculado com o lodo enriquecido sob baixa concentração de OD, com PAN igual a 82,1%, contra 44,8% para o lodo enriquecido sob elevada concentração de OD. Portanto, estes resultados, assim como os desta pesquisa, indicam que a produção de biomassa para o bioaumentação sob baixas concentrações de oxigênio dissolvido pode favorecer os bioprocessos dependentes da nitrificação parcial e do acúmulo de nitrito.

A prática do bioaumentação para melhorar a eficiência e a estabilidade dos bioprocessos dependentes da nitrificação parcial e do acúmulo do nitrito foi investigada também por outros autores. Miao e colaboradores (2017), por exemplo, realizaram o bioaumentação de um biorreator aplicado ao tratamento de esgoto doméstico via nitrificação parcial e processo *anammox* simultâneos, sob regime de aeração intermitente. A biomassa utilizada para o bioaumentação, realizado mensalmente, apresentava elevada abundância de BOA e baixa abundância de BON. Os autores observaram que a combinação da aeração intermitente, realizada em ciclos curtos (8 minutos ligada/21 minutos desligada), com o bioaumentação resultou no aumento da eficiência de remoção do nitrogênio total, de 29% para 70%.

Estes autores avaliaram também outro processo de bioaumentação, este com biomassa nitrificante, que apresentava elevada abundância tanto de BOA quanto de BON. Embora de maneira menos expressiva, o bioaumentação com esta biomassa também resultou no aumento da eficiência de remoção do nitrogênio total do esgoto doméstico, de 38,5% para 65,4%. A melhoria no desempenho do tratamento foi atribuída à inibição da atividade das BON em função da aeração intermitente e da competição pelo nitrito com os micro-organismos introduzidos pelo bioaumentação, além do aumento da atividade e da densidade populacional das BOA.

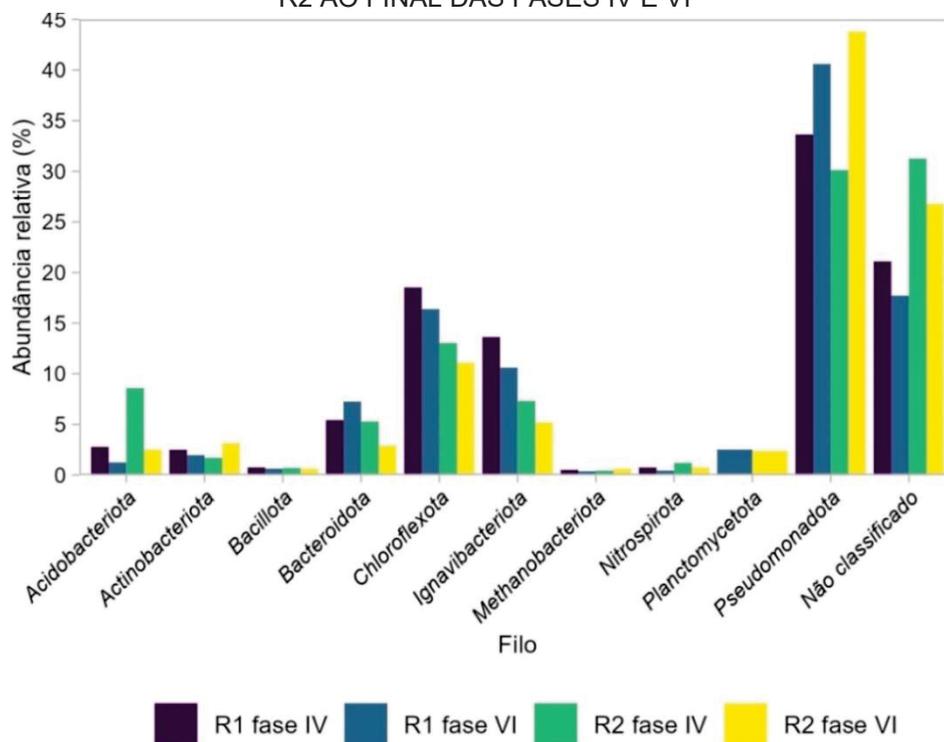
Por sua vez, Quoc e colaboradores (2024) utilizaram biomassa excedente de um sistema de lodos ativados para o bioaumentação de um sistema de tratamento de esgoto doméstico em escala plena. O lodo utilizado para o bioaumentação apresentava

elevada abundância de bactérias *comammox* e foi adicionado no estágio de remoção do carbono para melhorar a capacidade de nitrificação do esgoto. O bioaumento resultou no incremento de três vezes da taxa de remoção do nitrogênio amoniacal e do nitrogênio orgânico no sistema de tratamento.

4.3.3.2 Composição da comunidade microbiana nas fases IV e VI

Para avaliar as mudanças na comunidade microbiana causadas pelo bioaumento e seus efeitos no desempenho dos biorreatores R1 e R2, foi realizado o sequenciamento de *amplicons* do gene 16S rRNA para amostras coletadas ao final das fases IV (pré-bioaumento) e VI (após o encerramento da operação). É importante salientar que a comparação entre os resultados do sequenciamento das amostras coletadas nas fases IV e VI é exclusivamente qualitativa, pois não foi realizada a análise estatística para a determinação da significância dos resultados em função do número limitado de replicatas. Os principais filos identificados nas amostras são apresentados na FIGURA 4.50.

FIGURA 4.50 – PRINCIPAIS FILOS IDENTIFICADOS NAS AMOSTRAS DOS BIORREACTORES R1 E R2 AO FINAL DAS FASES IV E VI



FONTE: a autora (2024)

NOTA: foram representados apenas os filos com abundância relativa igual ou superior a 0,1%. A soma dos filos com abundância relativa inferior a 0,1% resultou em 0,01% para R1 na fase IV; 0,04% para R2 na fase IV; 0,05% para R1 na fase VI; e 0,05% para R2 na fase VI.

O filo *Chloroflexota* foi detectado nas amostras de R1 e R2 em elevadas abundâncias relativas nas fases IV e VI, variando entre 11,10% e 18,53% (FIGURA 4.50). Em sistemas de tratamento de águas residuárias, micro-organismos afiliados a *Chloroflexota* são associados à utilização do carbono orgânico e à degradação da matéria orgânica, sendo geralmente encontrados em elevadas abundâncias (Gonzalez-Martinez *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2021; Sheng *et al.*, 2024). Este filo também inclui micro-organismos desnitrificantes, importantes para os sistemas de remoção do nitrogênio (Podder *et al.*, 2020; Jiang *et al.*, 2023).

Membros do filo *Chloroflexota* são também conhecidos por degradar matéria orgânica complexa e recalcitrante. Esta capacidade pode, inclusive, ser aproveitada para a remoção simultânea de matéria orgânica recalcitrante e nitrogênio de lixiviados estabilizados, como o utilizado nesta pesquisa. Wang e colaboradores (2019), por exemplo, obtiveram eficiências de remoção do nitrogênio amoniacal superior a 98% e de compostos orgânicos refratários entre 46% e 68% em um sistema aplicado à realização simultânea da nitrificação parcial, processo *anammox* e desnitrificação para lixiviado estabilizado. Os autores observaram a elevada abundância de sequências afiliadas a *Chloroflexota* (21,32%), e a análise metagenômica indicou que este filo pode ter sido um dos responsáveis pela degradação da matéria orgânica recalcitrante do lixiviado.

Similarmente, Jiang e colaboradores (2023) obtiveram eficiências de remoção do nitrogênio total e do carbono orgânico total de 94,5% e 27,1%, respectivamente, para um sistema autotrófico de tratamento de lixiviado estabilizado baseado na combinação da nitrificação parcial, processo *anammox* e desnitrificação. Os autores reportaram ainda que a matéria orgânica refratária do lixiviado estabilizado pode ter sido utilizada para a desnitrificação, o que favoreceu a remoção simultânea do nitrogênio total e da matéria orgânica, mesmo sob elevada carga volumétrica de nitrogênio (2400 mg N L⁻¹ d⁻¹). Ao longo do tratamento do lixiviado, a abundância relativa do filo *Chloroflexota* aumentou de 14,09% para 56,66%, permanecendo estável entre 46,83% e 58,38% ao final do processo.

Nas amostras dos biorreatores, também foram detectados os filios *Acidobacteriota* (fase IV – R1: 2,78%; R2: 8,59%; fase VI – R1: 1,25%; R2: 2,52%) e *Ignavibacteriota* (fase IV – R1: 13,63%; R2: 7,32%; fase VI – R1: 10,61%; R2: 5,20%). Estes dois filios, assim como *Chloroflexota*, estão presentes em sistemas de tratamento de águas residuárias e são apontados como participantes do ciclo do

carbono, realizando a degradação da matéria orgânica (Gonzalez-Martinez *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2019). Além disso, micro-organismos de *Acidobacteria* foram identificados em sistemas aplicados à desnitrificação e podem contribuir para a remoção simultânea da matéria orgânica e do nitrogênio (Antwi *et al.*, 2020).

Além dos anteriormente mencionados, o filo *Bacteroidota* também é frequentemente encontrado em amostras provenientes de estações de tratamento de águas residuárias e está associado à degradação da matéria orgânica e à desnitrificação heterotrófica (Wu *et al.*, 2019b; Antwi *et al.*, 2020; Jiang *et al.*, 2023). Nesta pesquisa, entre as fases IV e VI, a abundância relativa de *Bacteroidota* variou entre 2,91% e 7,26%, valores similares aos obtidos por Antwi e colaboradores (2020) para um sistema de nitrificação parcial/*anammox* para o tratamento de lixiviado sob condições microaeróbias. Podder e colaboradores (2020) também identificaram *Bacteroidota* como um dos filios dominantes em um sistema aplicado à nitrificação parcial/*anammox* de lixiviado, com abundância relativa variando entre 6% e 39%.

Ao final das fases IV e VI, juntamente com *Bacteroidota*, os filios *Actinobacteriota*, com abundância relativa entre 1,70% e 3,16%, e *Bacillota*, entre 0,62% e 0,75%, foram identificados nas amostras de R1 e R2. Estes filios também estão associados à degradação da matéria orgânica de águas residuárias (Antwi *et al.*, 2020; Luo *et al.*, 2024; Gao *et al.*, 2024) e podem ter contribuído, ainda que de maneira menos expressiva do que outros grupos, para a degradação dos compostos orgânicos presentes no lixiviado.

Embora não tenha sido adicionado carbono orgânico aos biorreatores e o lixiviado fosse recalcitrante, a presença de diversos filios bacterianos associados ao metabolismo heterotrófico sugere que esses micro-organismos apresentam potencial para degradar compostos orgânicos complexos. Isso indica que sistemas de tratamento de lixiviado podem ser fontes para prospecção e isolamento de micro-organismos com capacidade para o bioaumento visando à degradação de poluentes recalcitrantes, como hidrocarbonetos aromáticos. Além disso, alguns desses organismos, identificados em sistemas de tratamento de lixiviados estabilizados, podem degradar compostos refratários, como ácidos húmicos (Wang *et al.*, 2019; Jiang *et al.*, 2023), ampliando seu valor para aplicações relacionadas ao tratamento de águas residuárias refratárias.

Entre as fases IV e VI, foi também observado o aumento da abundância relativa do filo *Planctomycetota* (R1: de 0,08% para 2,52%; R2: de 0,09% para

2,38%), embora esses resultados não tenham sido submetidos à análise de significância estatística. O filo *Planctomycetota* é geralmente detectado em sistemas de tratamento que utilizam o processo *anammox* para a remoção autotrófica do nitrogênio de águas residuárias, inclusive do lixiviado (Wang *et al.*, 2019; Antwi *et al.*, 2020; Podder *et al.*, 2020; Liu, J. *et al.*, 2024; Luo *et al.*, 2024). Todas as bactérias *anammox* conhecidas pertencem a este filo (Kuenen, 2008; van Niftrik; Jetten, 2012).

Simultaneamente, nas fases IV e VI, o filo *Nitrospirota* foi detectado em baixas abundâncias relativas (R1: 0,44% a 0,74%; R2: 0,74% a 1,20%) Este filo está associado à oxidação do nitrito e seu principal representante é o gênero *Nitrospira*, que abrange diversas BON abundantes em sistemas de tratamento (Wu *et al.*, 2019b; Antwi *et al.*, 2020). Como as bactérias *anammox* e as BON competem pelo nitrito, os micro-organismos afiliados a *Planctomycetota* podem ter consumido esse substrato e reduzido a sua disponibilidade para as BON do filo *Nitrospirota*.

Ao final das fases IV e VI, sequências afiliadas ao filo *Methanobacteriota* (antigo “*Euryarchaeota*”) foram identificadas nas amostras de R1 e R2, ainda que em abundâncias relativas baixas (0,37% a 0,60%) (FIGURA 4.50). Este filo inclui as arqueas metanogênicas, micro-organismos estritamente anaeróbios, capazes de degradar alguns poucos compostos orgânicos e inorgânicos relativamente simples (Garrity; Holt, 2001).

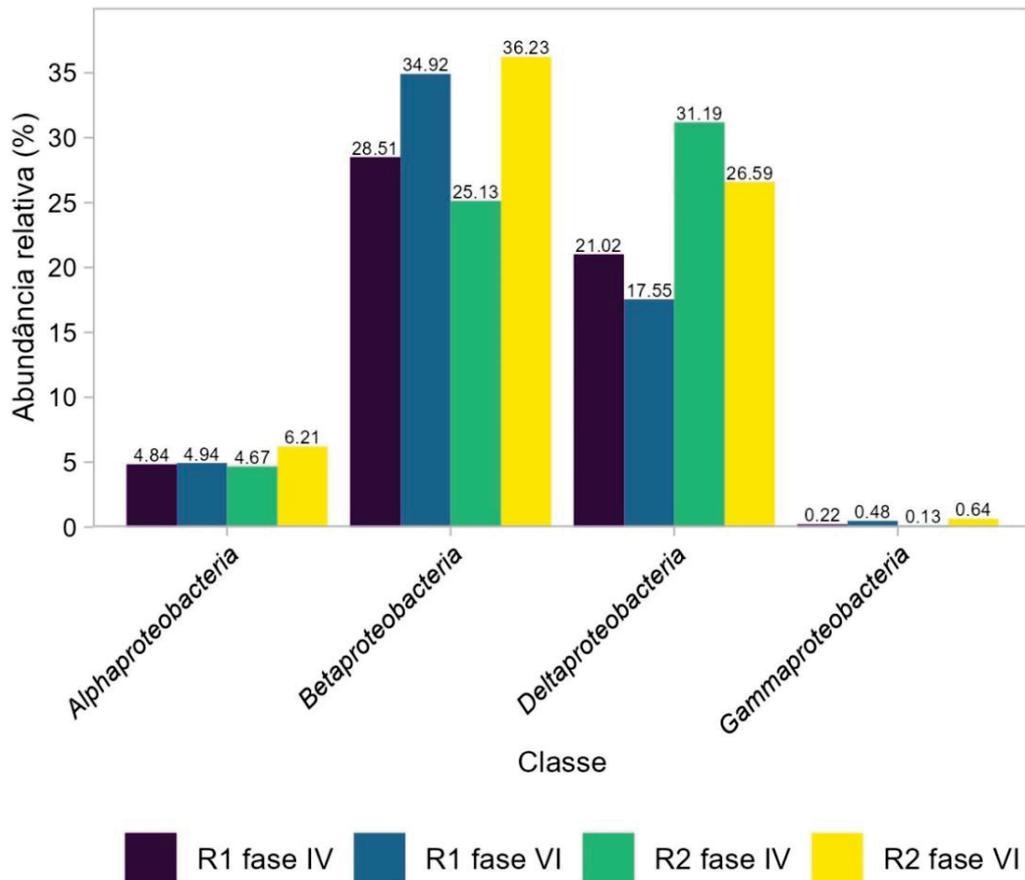
A presença destes organismos estritamente anaeróbios em biorreatores aeróbios, como R1 e R2, pode ter sido facilitada pelo adensamento dos flocos biológicos. Conforme discussão prévia, os flocos envoltos em espessa camada de substâncias poliméricas extracelulares, observados em R1 e R2, podem ter favorecido a criação de micronichos, ocupados inclusive por micro-organismos anaeróbios estritos. A estrutura densa dos flocos biológicos cria uma barreira física que impede a penetração de oxigênio em seu interior, gerando zonas anaeróbias onde as arqueas metanogênicas podem sobreviver, mesmo em um ambiente com elevada concentração de oxigênio dissolvido. A aeração intermitente também pode ter contribuído para variações temporais na concentração do oxigênio, permitindo que esses micronichos anaeróbios se estabelecessem.

O filo *Pseudomonadota* (antigo “*Proteobacteria*”) foi dominante em todas as amostras de R1 e R2 coletadas no final das fases IV e VI, com abundância relativa superior a 30% (FIGURA 4.50). A análise de 1200 amostras coletadas de sistemas

de lodos ativados de 269 estações de tratamento, distribuídas em 23 países, revelou que, nesses sistemas, *Pseudomonadota* também era o filo predominante (Wu *et al.*, 2019b). Em estudos de sistemas aplicados à remoção autotrófica do nitrogênio de águas residuárias, inclusive de lixiviados estabilizados, *Pseudomonadota* também foi aquele que apresentou a maior abundância relativa (Hira *et al.*, 2018; Antwi *et al.*, 2020; Deng *et al.*, 2024; Gao *et al.*, 2024; Hou *et al.*, 2024; Sheng *et al.*, 2024).

O filo *Pseudomonadota* divide-se em cinco classes principais (*Alpha-*, *Beta-*, *Delta-*, *Epsilon-* e *Gammaproteobacteria*), que abrangem micro-organismos com capacidades metabólicas diversificadas. Destas, as classes *Alpha-*, *Beta-*, *Delta* e *Gammaproteobacteria* foram identificadas nas amostras de R1 e R2 ao final das fases IV e VI, em diferentes proporções (FIGURA 4.51).

FIGURA 4.51 – CLASSES AFILIADAS AO FILO *PSEUDOMONADOTA* IDENTIFICADAS NAS AMOSTRAS DOS BIORREACTORES R1 E R2 AO FINAL DAS FASES IV E VI



FONTE: a autora (2024)

A classe *Gammaproteobacteria* foi aquela que apresentou a menor abundância relativa, inferior a 1%, para todas as amostras avaliadas, seguida por *Alphaproteobacteria*, com abundâncias relativas variáveis entre 4,67% e 6,21%

(FIGURA 4.51). Membros de *Gammaproteobacteria* apresentam versatilidade metabólica e podem atuar tanto como aeróbios obrigatórios quanto como anaeróbios facultativos. A esta classe estão afiliados micro-organismos capazes de realizar diversas funções metabólicas relevantes para os sistemas de tratamento de águas residuárias, como a oxidação da amônia e do nitrito e a biotransformação de poluentes (Reimer *et al.*, 2022). *Alphaproteobacteria* também inclui bactérias capazes de realizar diferentes processos metabólicos, como a fotossíntese, a fixação de nitrogênio, a oxidação do nitrito e a desnitrificação, e conta com membros autotróficos e heterotróficos (Brenner *et al.*, 2005; Reimer *et al.*, 2022).

A classe *Betaproteobacteria* apresentou a maior abundância relativa para todas as amostras de R1 e R2 coletadas no final das fases IV e VI, com variação entre 25,13% e 36,23% (FIGURA 4.51). A predominância da classe *Betaproteobacteria* em sistemas de tratamento de águas residuárias em relação às outras classes do filo *Pseudomonadota* é corroborada por resultados de outros autores (Wu *et al.*, 2019b; Podder *et al.*, 2020; Luo *et al.*, 2024).

A classe *Betaproteobacteria* é fenotipicamente, metabolicamente e funcionalmente diversa, abrangendo micro-organismos aeróbios estritos e anaeróbios facultativos e de metabolismo autotrófico e heterotrófico (Brenner *et al.*, 2005). Os membros dessa classe são comuns em ambientes aquáticos e solos (Brenner *et al.*, 2005). Além disso, micro-organismos de importância para a remoção do nitrogênio de águas residuárias estão afiliados a essa classe, como as BOA dos gêneros *Nitrosomonas* e *Nitrospira* e as BON do gênero candidato “*Ca. Nitrotoga*” (Parte *et al.*, 2020).

Destaca-se a elevada abundância relativa da classe *Deltaproteobacteria*, que variou entre 17,55% e 31,19% para as amostras de R1 e R2 coletadas no final das fases IV e VI (FIGURA 4.51). Hira e colaboradores (2018) também identificaram *Deltaproteobacteria* como um dos principais grupos presentes em amostras coletadas em um sistema aplicado para a aclimação da microbiota nitrificante a lixiviado de aterro sanitário.

A classe *Deltaproteobacteria* inclui micro-organismos com crescimento aeróbio ou anaeróbio estrito. A maioria das bactérias anaeróbias desta classe utiliza aceptores de elétrons inorgânicos em seu metabolismo energético, o que a distingue de outras classes do filo *Pseudomonadota* (Brenner *et al.*, 2005). Os principais aceptores de elétrons utilizados são o enxofre (nas formas elementar, sulfato,

tiosulfato, sulfito e polissulfeto, geralmente reduzidas a sulfeto) e o ferro férrico (Fe^{+3} , reduzido a Fe^{+2}) e, por isso, esta classe abrange a maioria das bactérias redutoras de enxofre e de ferro conhecidas (Brenner *et al.*, 2005).

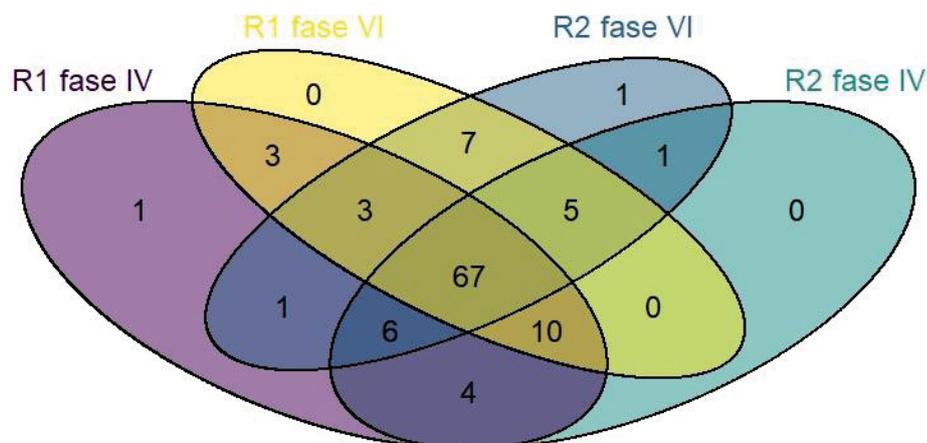
Alguns membros da classe *Deltaproteobacteria* podem, ainda, reduzir nitrato a amônia ou a nitrogênio gasoso, o que os torna relevantes também para os bioprocessos aplicados à remoção do nitrogênio. Outra característica distintiva de alguns representantes aeróbios da classe *Deltaproteobacteria* é a capacidade de predarem e se alimentarem de outras bactérias, o que contribui para moldar a composição da comunidade microbiana e controlar as populações de micro-organismos (Brenner *et al.*, 2005).

Cabe salientar que, nesta pesquisa, as concentrações de enxofre e de ferro no lixiviado e no efluente de R1 e R2 não foram determinadas. Além disso, devido a limitações do sequenciamento e informações insuficientes nos bancos de dados de referência para a identificação taxonômica, não foi possível identificar os membros da classe *Deltaproteobacteria* em nível de gênero. Contudo, considerando a elevada abundância desta classe nas amostras avaliadas, que inclui redutores de enxofre e ferro, sugere-se que estes micro-organismos tenham contribuído expressivamente para o tratamento do lixiviado, especialmente em relação à remoção da matéria orgânica via utilização de aceptores inorgânicos de elétrons, como o ferro, o enxofre em diferentes formas ou o nitrato, produzido em R1 e R2 pela nitrificação.

Além disso, a eventual presença de membros aeróbios da classe *Deltaproteobacteria* pode ter contribuído para o controle da produção da biomassa excedente nos biorreatores R1 e R2. Assim, estudos futuros poderiam ser conduzidos visando à investigação mais profunda do papel desses micro-organismos no tratamento de lixiviados e efluentes industriais e à determinação das suas potenciais aplicações biotecnológicas, como, por exemplo, o bioaumento em sistemas de tratamento.

No final das fases IV e VI, além da classificação em nível de filo, as sequências obtidas para as amostras de R1 e R2 foram agrupadas em gêneros. Entre os 109 gêneros identificados, 67 (61%) estavam presentes em todas as amostras (FIGURA 4.52). Este resultado sugere a existência de um núcleo microbiano comum nas amostras de R1 e R2 ao longo da operação, com a presença dos mesmos grupos microbianos.

FIGURA 4.52 – DISTRIBUIÇÃO DOS GÊNEROS IDENTIFICADOS NAS AMOSTRAS DOS BIORREATORES R1 E R2 AO FINAL DAS FASES IV E VI



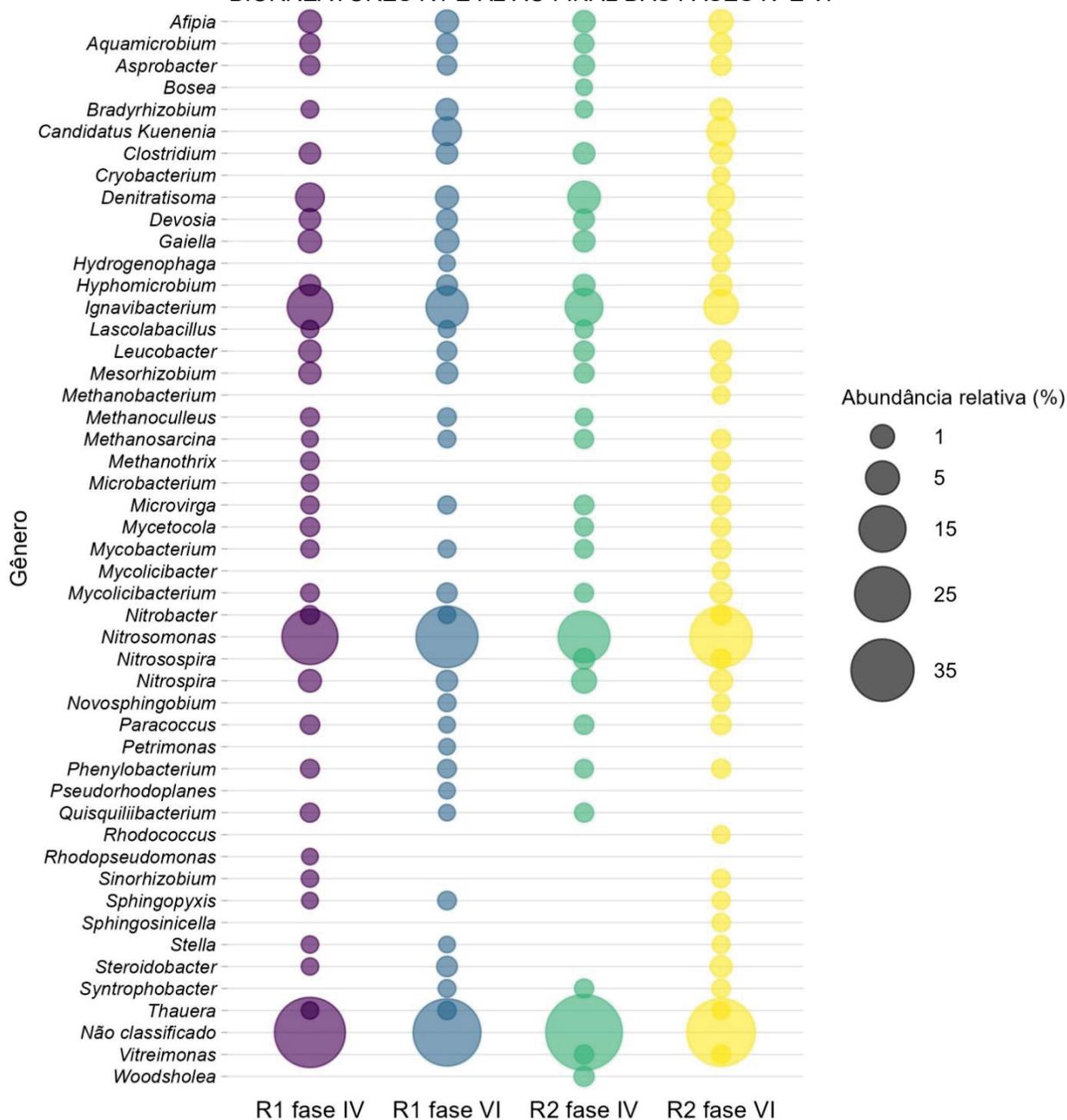
FONTE: a autora (2024)

Apesar da presença de micro-organismos em comum nas amostras de R1 e R2, a modificação das condições operacionais entre as fases IV e VI pode ter impactado a composição da comunidade microbiana, como indicam os resultados apresentados na FIGURA 4.53.

Quanto às BON, os únicos gêneros detectados nas amostras dos biorreatores nas fases IV e VI foram *Nitrobacter* (0,09%-0,31%) e *Nitrospira* (0,44%-1,20%). De maneira similar, apenas dois gêneros de BOA foram identificados nas amostras de R1 e R2, *Nitrosospira* (0,05%-0,39%) e *Nitrosomonas* (20,18%-33,59%). Enquanto *Nitrosospira* está associado a ambientes marinhos (Prosser; Head; Stein, 2014), *Nitrosomonas* é frequentemente o gênero de BOA predominante em sistemas de remoção do nitrogênio dependentes da nitrificação parcial e do acúmulo do nitrito (Li; Kechen; Yonhzhen, 2018; Wang *et al.*, 2019; Gao *et al.*, 2024; Luo *et al.*, 2024).

Entre as fases IV e VI, a abundância de *Nitrosomonas* variou entre 25,33% e 33,59%, para R1, e 20,18% e 33,73%, para R2. A elevada abundância relativa nas amostras de R1 e R2 indica que as BOA do gênero *Nitrosomonas* se aclimataram às condições operacionais e ambientais associadas ao lixiviado e foram enriquecidas, mesmo sob elevadas concentrações de amônia livre (entre 31,5 mg N L⁻¹ e 57,3 mg N L⁻¹) e de nitrogênio amoniacal (entre 200 mg N L⁻¹ e 400 mg N L⁻¹) e aeração intermitente. Outros estudos também observaram o enriquecimento e predomínio do gênero *Nitrosomonas* como representante das BOA em sistemas de tratamento de lixiviado estabilizado dependentes da nitrificação parcial e do acúmulo do nitrito (Li; Kechen; Yongzhen, 2018; Wang *et al.*, 2019; Antwi *et al.*, 2020; Luo *et al.*, 2024).

FIGURA 4.53 – ABUNDÂNCIA RELATIVA DOS GÊNEROS DETECTADOS NAS AMOSTRAS DOS BIORREATORES R1 E R2 AO FINAL DAS FASES IV E VI

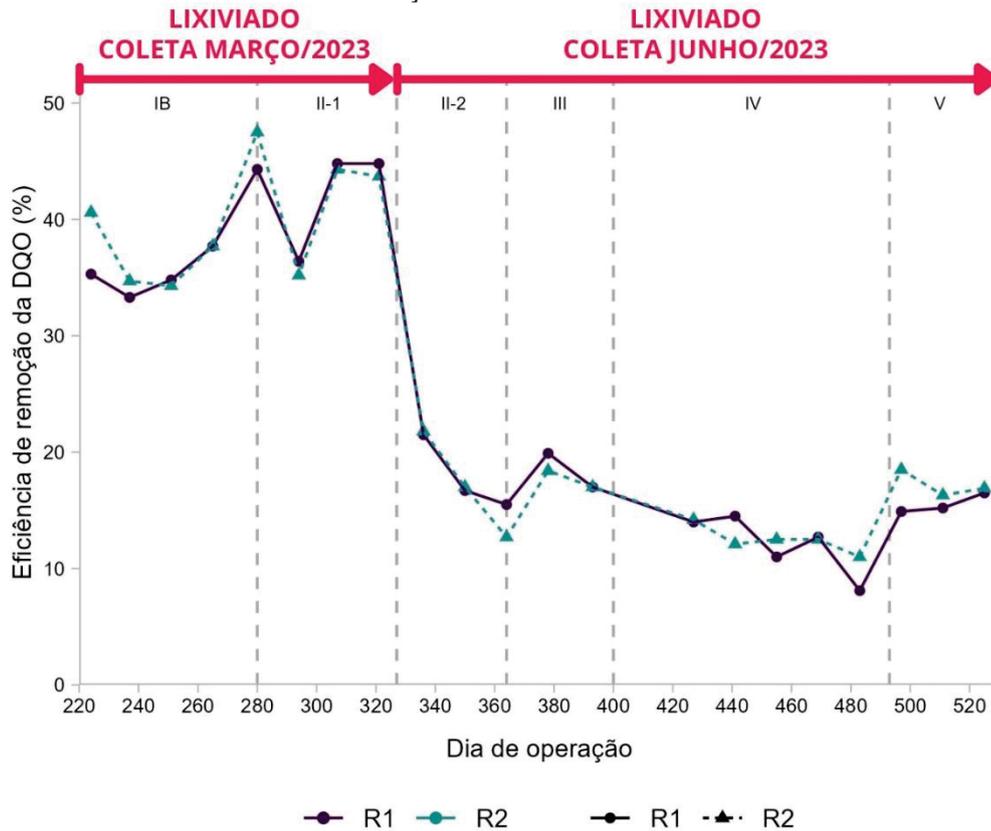


NOTA: foram representados apenas os gêneros com abundância relativa igual ou superior a 0,1%. A soma dos gêneros com abundância relativa inferior a 0,1% resultou em 2,31% para R1 na fase IV; 1,97% para R1 na fase VI; 2,46% para R2 na fase IV; e 2,12% para R2 na fase VI.

Para as amostras de R1 e R2 nas fases IV e VI, foram identificados diversos gêneros de bactérias heterotróficas associadas à degradação da matéria orgânica, como *Afipia* (0,55%-0,92%), *Clostridium* (0,45%-0,54%), *Cryobacterium* (0,01%-0,11%), *Gaiella* (0,50%-0,92%), *Lascolabacillus* (0,05%-0,14%), *Leucobacter* (0,24%-0,63%), *Mycolicibacterium* (0,16%-0,47%), *Sphingopyxis* (0,07%-0,15%) e *Stella* (0,07%-0,13%). É possível que, mesmo em baixas concentrações, a matéria

orgânica biodegradável do lixiviado tenha contribuído para a manutenção desses organismos em R1 e R2. Por sua vez, a atividade metabólica destes gêneros pode ter resultado na remoção da matéria orgânica do lixiviado, avaliada por meio da eficiência de remoção da demanda química de oxigênio (DQO), que variou entre 8,1% e 47,5% durante a operação dos biorreatores (FIGURA 4.54).

FIGURA 4.54 – EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DA DQO PARA R1 E R2 ENTRE AS FASES IB E V



—●— R1 —▲— R2
 FONTE: a autora (2024)
 NOTA: DQO: demanda química de oxigênio.

Além da fração biodegradável, a presença de alguns gêneros nas amostras de R1 e R2 sugere que a matéria orgânica recalcitrante do lixiviado também foi degradada. Os gêneros *Mycobacterium* (0,12%-0,27%), *Novosphingobium* (0,09%-0,13%), *Phenylbacterium* (0,16%-0,20%), e *Steroidobacter* (0,06%-0,52%) já foram detectados em sistemas de tratamento de águas residuárias e incluem espécies capazes de degradar substâncias complexas, como compostos heterocíclicos, hidrocarbonetos aromáticos e esteroides (Dueholm *et al.*, 2024).

Outro gênero identificado nas amostras de R1 e R2, *Quisquiliibacterium* (0,10%-0,21%), também apresenta metabolismo heterotrófico. A primeira espécie descrita deste gênero foi coletada de um sistema de lodos ativados aplicado ao

tratamento de lixiviado (Felföldi *et al.*, 2017), o que indica que tais sistemas podem ser fontes para o isolamento de espécies microbianas com potencial biotecnológico. Esses microrganismos podem ser aplicados, por exemplo, em processos de biorremediação de solos e corpos hídricos contaminados.

Entre os gêneros de micro-organismos heterotróficos identificados nas amostras dos biorreatores, *Ignavibacterium* foi aquele que apresentou a maior abundância relativa (FIGURA 4.53), com valores de 13,63% para R1 e 7,32% para R2, na fase IV, e 10,61% para R1 e 5,2% para R2, na fase VI. Nos estudos de Wang e colaboradores (2019) e Antwi e colaboradores (2020) sobre sistemas de remoção do nitrogênio de lixiviados estabilizados, *Ignavibacterium* também foi um dos gêneros predominantes de bactérias heterotróficas. Em ambos os estudos, evidências sugeriram a capacidade de algumas espécies afiliadas a *Ignavibacterium* para degradar substâncias húmicas e matéria orgânica refratária, o que pode justificar o enriquecimento desses micro-organismos em sistemas de tratamento de lixiviados estabilizados, como o avaliado nesta pesquisa.

Além disso, a coexistência de *Ignavibacterium* com outros gêneros microbianos, como as bactérias desnitrificantes e *anammox*, pode resultar na remoção do nitrogênio amoniacal de águas residuárias via desnitrificação parcial acoplada a outros bioprocessos dependentes do acúmulo do nitrito. Dong e colaboradores (2024), por exemplo, identificaram o gênero *Ignavibacterium* (abundância relativa entre 5,22% e 6,30%) em associação com desnitrificantes em um sistema aplicado à desnitrificação parcial/*anammox* de água residuária sintética com baixa relação C/N (0,75). O enriquecimento do gênero *Ignavibacterium* foi correlacionado à degradação de compostos orgânicos complexos e a produção de substrato para as bactérias desnitrificantes, sobretudo dos gêneros *Thauera*, “*Ca. Competibacter*”, *Denitratisoma* e *Hyphomicrobium*. Estes organismos, por sua vez, realizaram a desnitrificação parcial, produzindo nitrito, que pode ter sido consumido pelas bactérias *anammox* juntamente com o NAT disponível.

De maneira similar, Wang, Y. e colaboradores (2024) detectaram a presença simultânea de *Ignavibacterium* e dos gêneros de bactérias desnitrificantes *Thauera* e *Denitratisoma* em um reator de leito de lodo granular expandido aplicado à desnitrificação parcial/*anammox* de água residuária sintética. A eficiência média de remoção do nitrogênio amoniacal variou entre 65% e 84%. Além desses organismos, foram identificadas bactérias *anammox* do gênero “*Ca. Kuenenia*”, com abundância

relativa variando entre 4,23% e 12,51% para diferentes zonas do reator. Os resultados para os gêneros microbianos presentes, que são similares aos obtidos nesta pesquisa, sugerem que a interação entre organismos *anammox*, heterotróficos e desnitrificantes pode contribuir significativamente para a remoção do nitrogênio amoniacal de águas residuárias.

Em relação à desnitrificação, *Denitratisoma* foi o gênero de micro-organismos desnitrificantes detectado em maior abundância nas amostras de R1 e R2 no final das fases IV e VI (FIGURA 4.53). Na fase IV, a abundância relativa foi de 2,49% para R1 e 4,15% para R2. Por vez, na fase VI, a abundância relativa diminuiu para ambos os biorreatores (resultados não submetidos à análise de significância estatística), tendo sido obtidos os valores de 0,76% para R1 e 1,79% para R2. Assim como nesta pesquisa, vários estudos demonstraram o predomínio de *Denitratisoma* entre os gêneros associados à desnitrificação em sistemas aplicados à remoção do nitrogênio de águas residuárias, incluindo os autotróficos, dependentes de bioprocessos como a nitrificação parcial e o processo *anammox* (Li; Kechen; Yongzhen, 2018; Carvalho *et al.*, 2021; Gao *et al.*, 2024; Liu, H. *et al.*, 2024).

Membros do gênero *Denitratisoma* são capazes de degradar fontes complexas de matéria orgânica e utilizar carbono orgânico proveniente do decaimento celular (Fahrbach *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2024). Por isso, sua presença e atividade podem ser relevantes para o tratamento avançado de águas residuárias com baixas concentrações de matéria orgânica biodegradável, como o lixiviado utilizado nesta pesquisa, contribuindo para a remoção do nitrito e nitrato residuais produzidos pelos bioprocessos autotróficos.

Nas fases IV e VI, outros gêneros de bactérias desnitrificantes também foram detectados em menores abundâncias relativas nas amostras de R1 e R2 como *Aquamicrobium* (0,23%-0,42%), *Bradyrhizobium* (0,11%-0,56%), *Devosia* (0,24%-0,46%), *Hydrogenophaga* (0,07%-0,13%), *Hyphomicrobium* (0,36%-0,52%), *Paracoccus* (0,10%-0,29%), *Sinorhizobium* (0,05%-0,15%), *Syntrophobacter* (0,07%-0,19%) e *Thauera* (0,09%-0,15%). Como não houve suplementação de carbono orgânico durante a operação dos biorreatores, e o lixiviado apresentou baixas concentrações de matéria orgânica biodegradável, os micro-organismos heterotróficos desnitrificantes possivelmente sobreviveram por meio do consumo de produtos microbianos solúveis e substâncias poliméricas extracelulares secretadas pela microbiota ou pela degradação de restos resultantes do decaimento celular.

Os gêneros desnitrificantes podem desempenhar papéis essenciais na desnitrificação e degradação da matéria orgânica e têm sido identificados em vários sistemas aplicados à remoção do nitrogênio amoniacal de águas residuárias (Podder *et al.*, 2020; Zou *et al.*, 2020; Gao *et al.* 2024; Sheng *et al.*, 2024). Os resultados desta pesquisa indicam, ainda, que mesmo em sistemas projetados para operar sob condições predominantemente autotróficas, como R1 e R2, as bactérias desnitrificantes podem ser enriquecidas e auxiliar micro-organismos como as BOA e as bactérias *anammox* na remoção do nitrogênio amoniacal.

A cooperação entre organismos desnitrificantes e bactérias *anammox*, por exemplo, pode permitir o desenvolvimento de sistemas de remoção de nitrogênio amoniacal que combinem desnitrificação parcial com o processo *anammox*. Esta combinação apresenta vantagens como redução de até 50% no consumo energético e de até 79% na quantidade de matéria orgânica necessária em comparação aos sistemas convencionais aplicados à nitrificação/desnitrificação completas (Du *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2023). Além disso, a produção de nitrito via desnitrificação parcial/*anammox* é mais estável do que via nitrificação parcial/*anammox*, pois não exige estratégias integradas e complexas para o controle das BON (Du *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2023).

Além dos micro-organismos desnitrificantes, mesmo com o regime de aeração intermitente entre as fases IV e VI e a manutenção de elevadas concentrações de oxigênio dissolvido ($\geq 1 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$), foram identificadas sequências associadas a bactérias *anammox*, em particular do gênero candidato “*Ca. Kuenenia*”, com abundâncias relativas variáveis entre 0,01% e 2,33% (FIGURA 4.53). As bactérias *anammox* são anaeróbias estritas. Contudo, podem crescer também sob condições aeróbias, e evidências recentes sugerem que são mais bem adaptadas à presença de oxigênio dissolvido do que outros anaeróbios estritos, graças a mecanismos adaptativos como a regulação positiva de vias metabólicas e a produção de enzimas antioxidantes como as bacterioferritinas (Sun *et al.*, 2024).

Os resultados desta pesquisa são similares àqueles obtidos por Gao e colaboradores (2024). Estes autores realizaram a otimização da aeração de um sistema de lodos ativados com biofilme fixo integrado aplicado à nitrificação parcial e processo *anammox* simultâneos de efluente da suinocultura pré-tratado por digestão anaeróbia. A estratégia operacional foi composta por estágios anaeróbio-aeróbio-anóxico. Durante o estágio aeróbio, um modo de controle duplo da vazão da

aeração foi implementado para combinar períodos sob baixas concentrações de oxigênio dissolvido ($< 0,4 \text{ mg L}^{-1}$) com períodos curtos sob elevadas concentrações de oxigênio dissolvido ($0,6 \text{ a } 1,2 \text{ mg L}^{-1}$). O gênero predominante de bactérias *anammox* foi “*Ca. Kuenenia*”, com abundâncias relativas variáveis entre 0,3 % e 2%, mesmo sob elevadas concentrações de oxigênio dissolvido.

O gênero “*Ca. Kuenenia*” é geralmente predominante em sistemas de tratamento que operam sob elevadas concentrações de nitrogênio amoniacal, isto é, superiores a 50 mg N L^{-1} (Gao *et al.*, 2024), como os biorreatores R1 e R2. Similarmente ao observado nesta pesquisa, outros estudos também identificaram “*Ca. Kuenenia*” como o principal organismo *anammox* em sistemas aplicados à remoção autotrófica do nitrogênio amoniacal de lixiviados estabilizados (Li; Kechen; Yongzhen, 2018; Antwi *et al.*, 2020; Luo *et al.*, 2024). Estes resultados sugerem que o gênero “*Ca. Kuenenia*” pode ser o mais bem adaptado e menos sensível às condições operacionais e ambientais associadas ao tratamento do lixiviado de aterro sanitário estabilizado.

Na fase IV, a abundância relativa de “*Ca. Kuenenia*”, único gênero de bactérias *anammox* identificado em R1 e R2 nas fases IV e VI, foi de 0,03% para R1 e 0,01% para R2, enquanto na fase VI, a abundância relativa aumentou para 2,49% para R1 e 2,33% para R2 (resultados não submetidos à análise de significância estatística). O aumento da abundância relativa de “*Ca. Kuenenia*” pode ser atribuído à redução da concentração de nitrogênio afluente entre as fases IV e VI, de 400 mg N L^{-1} para 200 mg N L^{-1} , com a consequente redução da concentração média de amônia livre, de $57,3 \text{ mg N L}^{-1}$ para $31,5 \text{ mg N L}^{-1}$.

Luo e colaboradores (2024) estudaram um sistema de lodo granular aplicado à nitrificação parcial e processo *anammox* de lixiviado estabilizado, e observaram a redução da abundância relativa de “*Ca. Kuenenia*”, de 24,53% para 13,57%. A diminuição foi atribuída ao aumento da concentração da amônia livre, substância inibitória das bactérias *anammox*. Além disso, outros fatores apontados pelos autores como inibitórios de “*Ca. Kuenenia*” foram o aumento da concentração de substâncias húmicas e a elevada salinidade característica do lixiviado.

Em contrapartida, Liu, J. e colaboradores (2024) observaram a inibição da atividade e redução da abundância das bactérias *anammox*, especialmente “*Ca. Kuenenia*”, com o aumento da concentração de matéria orgânica em um sistema híbrido de biomassa suspensa e biofilme fixo para nitrificação parcial/*anammox*

simultâneos de água residuária sintética. Quando a relação C/N do afluente foi aumentada de 1,0 para 3,5 a partir do aumento da concentração do carbono orgânico, a abundância relativa de “*Ca. Kuenenia*” diminuiu de 0,74% para 0,12%, na biomassa suspensa, e de 0,60% para 0,48%, no biofilme. Similarmente, sugere-se que, nesta pesquisa, a redução da concentração do lixiviado, rico em substâncias húmicas e matéria orgânica, contribuiu para o aumento da abundância relativa de “*Ca. Kuenenia*” entre as fases IV e VI.

Por sua vez, na fase VI, o aumento da abundância relativa de “*Ca. Kuenenia*” e a presença de bactérias desnitrificantes, como as do gênero *Denitratisoma*, podem ter contribuído para a redução significativa da percentagem de acúmulo do nitrito em R1 e R2, visto que esses grupos microbianos podem consumir o nitrito e reduzir seu acúmulo no meio reacional. Estes organismos também podem estar associados à remoção do nitrogênio inorgânico (NAT, nitrito e nitrato) devido à capacidade de convertê-lo em nitrogênio gasoso.

Corroborando os resultados obtidos nesta pesquisa nas fases IV e VI, Zhou e colaboradores (2023) identificaram a coexistência de bactérias desnitrificantes do gênero *Denitratisoma* com bactérias *anammox* do gênero “*Ca. Kuenenia*” em um sistema aplicado à desnitrificação parcial/*anammox* de água residuária sintética com baixa relação C/N (aproximadamente 0,75). Os autores observaram que a interação entre esses dois grupos microbianos resultou na remoção concomitante do nitrogênio amoniacal e do nitrato, com eficiência média de remoção do NAT superior a 99%. As substâncias poliméricas extracelulares produzidas pelas bactérias *anammox* podem ter sido utilizadas pelos micro-organismos desnitrificantes como fonte de carbono para a desnitrificação parcial (Zhou *et al.*, 2023). Por sua vez, as bactérias desnitrificantes forneceram nitrito para as bactérias *anammox*.

Por outro lado, Sun e colaboradores (2025) observaram o efeito sinérgico entre BOA, BON, bactérias *anammox*, desnitrificantes e micro-organismos hidrolíticos em um biorreator de estágio único aplicado para a nitrificação parcial/*anammox* de esgoto sanitário com baixa relação C/N (aproximadamente 0,76) e sob regime de aeração intermitente. Estes resultados concordam com os obtidos nesta pesquisa, os principais gêneros de BOA, bactérias *anammox* e desnitrificantes identificados foram, respectivamente, *Nitrosomonas*, “*Ca. Kuenenia*” e *Denitratisoma*. A interação entre esses grupos microbianos resultou em elevadas eficiências de remoção do nitrogênio amoniacal, superiores a 73%.

Similarmente, Fan e colaboradores (2025) atribuíram a elevada eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal (aproximadamente 97%) e de matéria orgânica (90% de remoção de DQO) de esgoto sanitário à interação entre grupos microbianos com capacidades funcionais distintas. Em um reator de biofilme com leito móvel operando em três estágios (anóxico-anóxico-aeróbio), foram identificados gêneros de BOA (*Nitrosomonas*), BON (*Nitrospira*), bactérias *anammox* (“*Ca. Brocadia*” e “*Ca. Kuenenia*”), desnitrificantes (com predominância de *Denitratisoma*) e bactérias heterotróficas (com destaque para *Ignavibacterium*). Os resultados sugerem que os micro-organismos heterotróficos, como os do gênero *Ignavibacterium*, foram capazes de hidrolisar compostos orgânicos complexos do esgoto sanitário, disponibilizando substrato para os micro-organismos desnitrificantes. Por sua vez, as bactérias desnitrificantes podem ter realizado a desnitrificação parcial, produzindo nitrito, que foi consumido pelas bactérias *anammox*.

Em síntese, a integração entre a atividade das BOA, bactérias *anammox* e desnitrificantes identificadas em R1 e R2 pode ter permitido o estabelecimento da nitrificação parcial, oxidação anaeróbia da amônia (*anammox*) e desnitrificação parcial simultâneas para a remoção do nitrogênio amoniacal do lixiviado de aterro sanitário. Além disso, o enriquecimento de micro-organismos heterotróficos e, potencialmente, de bactérias redutoras de enxofre e ferro, pode ter contribuído para o tratamento do lixiviado, sobretudo para a remoção da matéria orgânica recalcitrante característica de lixiviados estabilizados.

Finalmente, cabe destacar que, para todas as amostras analisadas, a abundância relativa de sequências que não puderam ser atribuídas a nenhum gênero conhecido foi superior a 40% (FIGURA 4.53). Em estudos de microbiomas de sistemas de tratamento de águas residuárias baseados no sequenciamento do gene 16S rRNA, a percentagem das sequências não classificadas em nível de gênero frequentemente atinge valores similares (Sun *et al.*, 2021; Zhang, Y. *et al.*, 2023). A elevada percentagem de gêneros não classificados é devida, sobretudo, à limitação dos bancos de referência utilizados para a comparação das sequências e à diversidade microbiana que não é adequadamente representada nas bases de dados atuais. Além disso, a dificuldade para cultivar muitos desses organismos também torna desafiadora a sua correta classificação e identificação.

Na meta-análise realizada por Zhang, Y. e colaboradores (2023), considerando amostras de diferentes sistemas de tratamento de águas residuárias,

a proporção mediana de grupos taxonômicos microbianos identificados variou entre 28,5% e 34,5%. Isso significa que parte significativa dos micro-organismos membros dos microbiomas desses sistemas não foi identificada, sugerindo a presença de uma grande “matéria escura microbiana”, composta por micro-organismos não classificados e cujos genomas permanecem descaracterizados.

Esses micro-organismos não identificados podem desempenhar funções importantes nos sistemas de tratamento de águas residuárias e na degradação de poluentes. Portanto, é necessário aprofundar o conhecimento sobre sua diversidade e ecofisiologia. Além disso, a ampliação do conhecimento sobre os microbiomas dos sistemas de tratamento pode fomentar aplicações biotecnológicas, como a utilização do metabolismo microbiano para a degradação de poluentes específicos e o desenvolvimento de bioprocessos mais econômicos e menos poluentes.

4.3.4 Avaliação da qualidade do efluente dos biorreatores R1 e R2

Após o tratamento, o lixiviado de aterro sanitário é, frequentemente, lançado diretamente em corpos hídricos receptores, como rios, desde que obedeça às condições estabelecidas pela legislação pertinente. No Brasil, as exigências mínimas que devem ser atendidas para a disposição desta água residuária em corpos hídricos são estabelecidas pela Resolução CONAMA n° 430/2011, cujos principais padrões são apresentados no QUADRO 4.2.

Durante a operação dos biorreatores R1 e R2, aplicados para o tratamento do lixiviado de aterro sanitário, foram determinados os parâmetros químicos apresentados nas TABELAS 4.6 e 4.7, respectivamente. Os resultados para o efluente dos biorreatores foram comparados aos padrões estabelecidos pela Resolução CONAMA n° 430/2011.

Durante todas as fases de operação de R1 e R2, a média para o pH efluente dos biorreatores (TABELA 4.6 e TABELA 4.7) esteve em conformidade com as exigências estabelecidas pela Resolução CONAMA 430/2011 (QUADRO 4.2). Ainda que a nitrificação, isto é, a reação bioquímica de oxidação do NAT a nitrito, possa ter produzido quantidades elevadas de íons H^+ , podendo acarretar a redução drástica do pH do meio reacional, os efluentes de R1 e R2 apresentaram concentrações elevadas de alcalinidade total (AT) residual (TABELAS 4.6 e 4.7). Os íons bicarbonato, que contribuem para a AT e eram abundantes no lixiviado utilizado

nesta pesquisa, provocaram efeito tamponante, neutralizando os íons H^+ produzidos durante o tratamento em R1 e R2 e resultando na manutenção do pH do efluente em conformidade com os limites legais.

QUADRO 4.2 – PRINCIPAIS PARÂMETROS QUÍMICOS PARA LIXIVIADOS DE ATERRO SANITÁRIO E PADRÕES DE LANÇAMENTO EM CORPOS HÍDRICOS

Parâmetro	CONAMA nº 430/2011	Possível efeito ambiental caso a concentração ultrapasse o padrão estabelecido
pH	5 - 9	Toxicidade à biota aquática, alteração dos ciclos biogeoquímicos e degradação da qualidade da água.
Nitrogênio amoniacal	20 mg/L	Eutrofização; depleção do oxigênio em corpos hídricos; a amônia livre (NH_3), constituinte do NAT, pode ser tóxica à biota aquática.
DBO ₅ (parâmetro indicador da concentração de matéria orgânica)	Remoção mínima de 60%	Depleção do oxigênio em corpos hídricos, podendo levar ao sufocamento e à morte de organismos.
Cádmio total	0,2 mg Cd L ⁻¹	Íons de metais pesados, quando dissolvidos e absorvidos por organismos aquáticos, podem exercer efeitos tóxicos agudos ou crônicos. Pode ocorrer ainda o acúmulo de metais ao longo da teia alimentar, contaminando outros animais e até mesmo humanos.
Chumbo total	0,5 mg Pb L ⁻¹	
Cobre dissolvido	1,0 mg Cu L ⁻¹	
Cromo hexavalente	0,1 mg Cr ⁺⁶ L ⁻¹	
Cromo trivalente	1,0 mg Cr ⁺³ L ⁻¹	
Ferro dissolvido	15,0 mg Fe L ⁻¹	
Manganês dissolvido	1,0 mg Mn L ⁻¹	
Merúrio total	0,01 mg Hg L ⁻¹	
Níquel total	2,0 mg Ni L ⁻¹	
Zinco total	5,0 mg Zn L ⁻¹	

FONTE: adaptado de CONAMA (2011)

Por outro lado, a concentração média do NAT do efluente de R1 (TABELA 4.6) e R2 (TABELA 4.7) entre as fases IB e VI, quando ocorreu o tratamento do lixiviado, excedeu o limite legal para disposição em corpos hídricos, igual a 20 mg N L⁻¹. Para R1, a concentração média do efluente entre as fases em que foi realizado o tratamento do lixiviado (IB a VI) variou entre 41,2 mg N L⁻¹ e 234,1 mg N L⁻¹, enquanto para R2, a variação foi de 36,8 mg N L⁻¹ a 238,7 mg N L⁻¹. A concentração média de amônia livre (NH_3) do efluente, componente do NAT, também foi elevada durante o tratamento do lixiviado, para ambos os biorreatores. Para R1, a variação foi de 3,7 mg N L⁻¹ a 51,6 mg N L⁻¹, enquanto para R2, a variação foi de 3,6 mg N L⁻¹ a 51,3 mg N L⁻¹.

TABELA 4.6 – CARACTERÍSTICAS DO EFLUENTE DURANTE A OPERAÇÃO DE R1

Parâmetro do afluente	Unidade	Fase IA (média ± d. p.)		Fase IB (média ± d. p.) lixiviado	Fase II (média ± d. p.)		Fase III (média ± d. p.) lixiviado	Fase IV (média ± d. p.) lixiviado	Fase V (média ± d. p.) lixiviado	Fase VI (média ± d. p.) Lixiviado-
		IA-1 ^(a) meio mineral	IA-2 ^(b) meio mineral		II-1 ^(c) lixiviado	II-2 ^(d) lixiviado				
AT	mg CaCO ₃ L ⁻¹	11,6 ± 12,1	240,8 ± 109,6	316,8 ± 105,3	1010,3 ± 71,7	1014,2 ± 86,9	448,6 ± 93,8	1016,9 ± 109,7	1281,4 ± 331,3	n. d.
DQO	mg O ₂ L ⁻¹	n. d.	n. d.	136 ± 11	361 ± 24	473 ± 14	331 ± 1	446 ± 19	454 ± 30	n. d.
NAT	mg N L ⁻¹	139,2 ± 11,9	15,6 ± 22,1	41,2 ± 23,1	146,5 ± 19,6	210,7 ± 11,0	92,9 ± 14,3	221,9 ± 40,0	234,1 ± 21,2	116,3 ± 12,9
NH ₃ livre	mg N L ⁻¹	0,3 ± 0,3	0,9 ± 1,4	3,7 ± 2,8	28,8 ± 8,9	34,5 ± 10,1	9,1 ± 5,8	34,5 ± 6,0	51,6 ± 25,5	21,3 ± 6,4
Nitrato	mg N L ⁻¹	3,9 ± 1,0	43,6 ± 13,1	26,3 ± 9,1	31,6 ± 7,8	37,4 ± 9,4	70,3 ± 9,0	37,2 ± 21,8	57,5 ± 10,5	35,9 ± 10,5
Nitrito	mg N L ⁻¹	1,9 ± 3,2	42,5 ± 40,7	1,2 ± 0,8	10,0 ± 6,6	20,9 ± 12,4	11,3 ± 5,4	31,8 ± 27,5	49,7 ± 18,1	17,5 ± 7,2
NT	mg N L ⁻¹	n. d.	n. d.	74,5 ± 13,4	204,7 ± 24,5	326,9 ± 31,7	198,6 ± 26,6	320,9 ± 23,3	365,3 ± 28,4	n. d.
pH	-	6,11 ± 0,80	7,98 ± 0,70	8,07 ± 0,10	8,47 ± 0,10	8,37 ± 0,10	8,22 ± 0,10	8,36 ± 0,10	8,50 ± 0,20	8,43 ± 0,10

FONTE: a autora (2024)

NOTA: AT: alcalinidade total; DQO: demanda química de oxigênio; NAT: nitrogênio amoniacal total; NT: nitrogênio total; d. p.: desvio-padrão; n. d.: não determinado; (a) resultados obtidos para o período entre o primeiro e o 30º dia de operação dos biorreatores; (b) resultados obtidos entre o 31º e o 204º dia de operação, quando a solução de NaHCO₃ foi adicionada ao afluente alimentado diariamente aos biorreatores; (c) resultados obtidos para o período entre o 281º e o 327º dia de operação, quando o afluente era composto por lixiviado coletado em março de 2023; (d) resultados obtidos para o período entre o 328º e o 364º dia de operação, quando o afluente era composto por lixiviado coletado em junho de 2023.

TABELA 4.7 – CARACTERÍSTICAS DO EFLUENTE DURANTE A OPERAÇÃO DE R2

Parâmetro do afluente	Unidade	Fase IA (média ± d. p.)		Fase IB (média ± d. p.) lixiviado	Fase II (média ± d. p.)		Fase III (média ± d. p.) lixiviado	Fase IV (média ± d. p.) lixiviado	Fase V (média ± d. p.) lixiviado	Fase VI (média ± d. p.) lixiviado
		IA-1 ^(a) meio mineral	IA-2 ^(b) meio mineral		II-1 ^(c) lixiviado	II-2 ^(d) lixiviado				
AT	mg CaCO ₃ L ⁻¹	6,8 ± 4,2	288,4 ± 110,8	319,9 ± 78,6	1152,8 ± 63,4	1068,9 ± 196,0	440,8 ± 93,8	1039,9 ± 56,6	1010,0 ± 187,4	n. d.
DQO	mg O ₂ L ⁻¹	n. d.	n. d.	132 ± 11	366 ± 23	477 ± 6	334 ± 4	444 ± 17	445 ± 25	n. d.
NAT	mg N L ⁻¹	143,1 ± 13,0	16,3 ± 22,2	36,8 ± 17,6	179,4 ± 29,4	238,7 ± 26,6	95,9 ± 21,3	209,1 ± 39,6	238,4 ± 14,7	121,2 ± 8,6
NH ₃ livre	mg N L ⁻¹	0,1 ± 0,0	1,1 ± 1,3	3,6 ± 2,4	37,3 ± 8,7	40,1 ± 6,2	8,0 ± 3,0	31,8 ± 8,0	51,3 ± 20,6	18,6 ± 6,1
Nitrato	mg N L ⁻¹	4,1 ± 0,4	35,6 ± 10,3	27,0 ± 7,7	31,3 ± 9,1	33,2 ± 6,5	64,6 ± 19,3	37,8 ± 13,2	45,7 ± 10,7	35,2 ± 8,1
Nitrito	mg N L ⁻¹	2,2 ± 3,6	35,5 ± 36,9	1,6 ± 0,8	10,8 ± 8,2	19,5 ± 13,5	21,8 ± 15,2	28,4 ± 18,3	70,2 ± 20,4	29,1 ± 13,9
NT	mg N L ⁻¹	n. d.	n. d.	66,9 ± 8,0	248,8 ± 17,1	355,9 ± 25,3	209,8 ± 42,6	302,8 ± 48,8	382,1 ± 23,0	n. d.
pH	-	5,88 ± 0,20	8,07 ± 0,50	8,11 ± 0,10	8,49 ± 0,10	8,40 ± 0,10	8,03 ± 0,10	8,34 ± 0,10	8,50 ± 0,21	8,33 ± 0,15

FONTE: a autora (2024)

NOTA: AT: alcalinidade total; DQO: demanda química de oxigênio; NAT: nitrogênio amoniacal total; NT: nitrogênio total; d. p.: desvio-padrão; n. d.: não determinado; (a) resultados obtidos para o período entre o primeiro e o 30º dia de operação dos biorreatores; (b) resultados obtidos entre o 31º e o 204º dia de operação, quando a solução de NaHCO₃ foi adicionada ao afluente alimentado diariamente aos biorreatores; (c) resultados obtidos para o período entre o 281º e o 327º dia de operação, quando o afluente era composto por lixiviado coletado em março de 2023; (d) resultados obtidos para o período entre o 328º e o 364º dia de operação, quando o afluente era composto por lixiviado coletado em junho de 2023.

A não conformidade dos efluentes de R1 e R2 em relação aos limites legais estabelecidos pela Resolução CONAMA 430/2011 para a concentração de NAT indica que, isoladamente, os bioprocessos podem não ser suficientes para o tratamento de lixiviado de aterro sanitário. Os resultados evidenciam a necessidade de estratégias complementares para tratamento de águas residuárias complexas, como o lixiviado, como a otimização das condições operacionais dos biorreatores, a implementação de etapas adicionais de pré- ou pós-tratamento ou, ainda, a utilização de tecnologias híbridas que associem processos biológicos e físico-químicos. Exemplos de tecnologias que podem ser utilizadas em conjunto com os bioprocessos visando à maior qualidade do efluente incluem a adsorção do NAT e o arraste da amônia por ar (*air stripping*) (Renou *et al.*, 2008; Wang; Qiao, 2024).

A Resolução CONAMA 430/2011 estabelece que, para o lançamento em corpos hídricos, a eficiência de remoção mínima da matéria orgânica, representada pela demanda bioquímica de oxigênio (DBO₅), seja de 60%. No entanto, neste estudo, a avaliação foi realizada com base na demanda química de oxigênio (DQO), que reflete indiretamente a concentração de matéria orgânica total presente no lixiviado. A concentração média da DQO efluente entre as fases IB e VI, correspondentes ao tratamento do lixiviado, foi elevada para ambos os biorreatores, variando entre, aproximadamente, 130 mg O₂ L⁻¹ e 480 mg O₂ L⁻¹. Estes resultados podem ser atribuídos principalmente à predominância de compostos orgânicos recalcitrantes no lixiviado de aterro sanitário utilizado na pesquisa, que provavelmente não sofreram degradação pela microbiota de R1 e R2 e persistiram no efluente ao longo da operação.

Os resultados para a DQO efluente indicam que os bioprocessos podem não ser suficientes para atingir os limites legais de qualidade do efluente também para a matéria orgânica, além do NAT, especialmente para águas residuárias que contêm compostos orgânicos refratários, como o lixiviado. A integração de estratégias complementares, como processos de precipitação, coagulação, oxidação avançada, adsorção ou tecnologias de membranas, pode potencializar a remoção de matéria orgânica recalcitrante e outros contaminantes persistentes do lixiviado (Renou *et al.*, 2008; Costa; Alfaia; Campos, 2019; Wang; Qiao, 2024).

Embora não tenham sido determinadas as concentrações de metais no lixiviado utilizado ao longo desta pesquisa, o que impede a comparação com os limites estabelecidos pela Resolução CONAMA 430/2011 (QUADRO 4.2), os

resultados de toxicidade realizados com sementes de *Allium cepa* (Seção 4.3.2) sugerem que essa água residuária apresentou efeito potencialmente tóxico, que pode estar associado à presença de metais, inclusive pesados, frequentemente detectados em lixiviados de aterros sanitários (Costa; Alfaia; Campos, 2019; Yu *et al.*, 2020; Teng *et al.*, 2021; Wijekoon *et al.*, 2022; Wang; Qiao, 2024).

Adicionalmente, a toxicidade observada para o lixiviado utilizado nesta pesquisa pode ser resultado de interações entre metais e outros compostos presentes, como ácidos húmicos e substâncias orgânicas recalcitrantes, que podem influenciar a mobilidade dos metais e outros componentes potencialmente tóxicos (Iubel; Braga; Braga, 2021). Apesar da ausência de dados quantitativos sobre a presença de metais neste estudo, a resposta toxicológica detectada sobre as sementes de *A. cepa* reforça a necessidade da caracterização química mais abrangente do lixiviado em investigações futuras, especialmente para avaliar os riscos ambientais e à saúde humana e a eficiência dos bioprocessos para o tratamento desta água residuária.

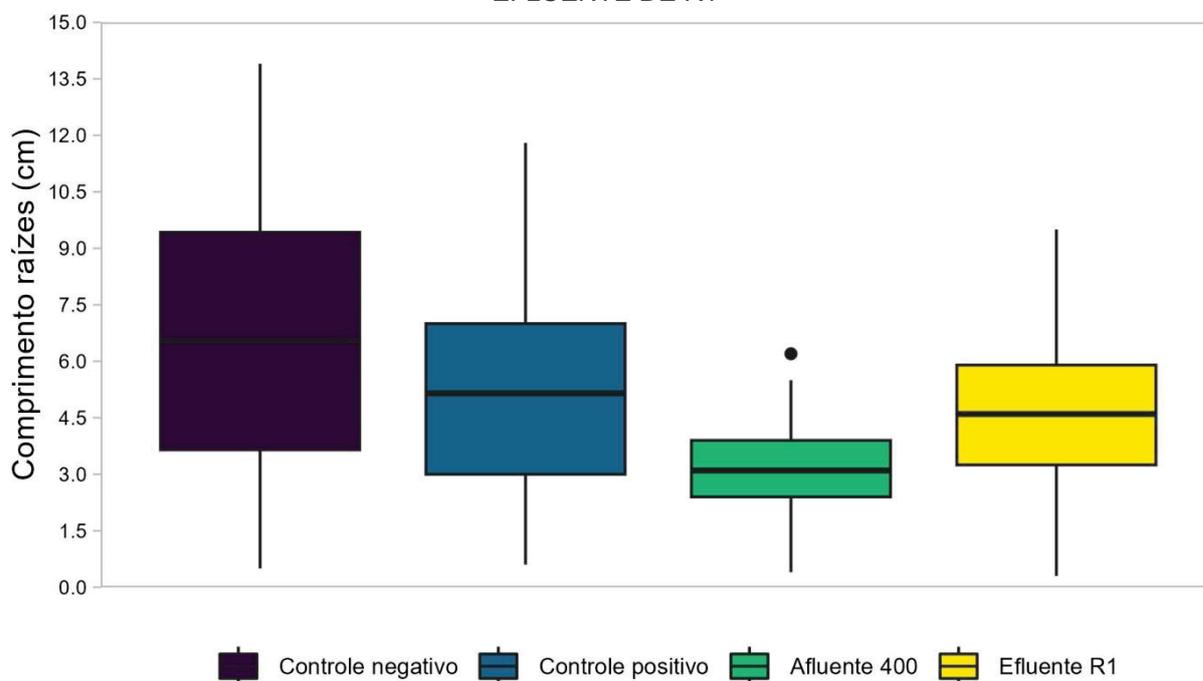
Apesar de não existir limite legal, outras substâncias presentes nos efluentes de R1 e R2 poderiam causar impactos ambientais caso não houvesse tratamento complementar previamente à disposição do efluente em corpos hídricos. O nitrito e nitrato, por exemplo, são compostos nitrogenados que, quando presentes em elevadas concentrações, como as observadas para os efluentes de R1 e R2 (TABELAS 4.6 e 4.7), podem desencadear a eutrofização, associada ao crescimento excessivo de algas e plantas aquáticas (Murphy, 1991). Este fenômeno resulta na redução do oxigênio dissolvido na água, afetando negativamente a biota aquática (Smith; Tilman; Nekola, 1999; Le Moal *et al.*, 2019).

Além disso, o nitrito é tóxico para muitos organismos aquáticos, pois interfere no transporte de oxigênio em sistemas biológicos, enquanto o nitrato pode acumular em águas subterrâneas, tornando-as impróprias para o consumo humano devido ao risco de metahemoglobinemia, especialmente em crianças (Murphy, 1991; Philips; Laanbroek; Verstraete, 2002; Parvizishad *et al.*, 2017). Os riscos indicam a necessidade de combinar os bioprocessos utilizados com estratégias adicionais para remoção mais eficiente e redução da concentração desses íons no efluente. Nesse sentido, o efluente dos biorreatores poderia ser destinado ao pós-tratamento via processo *anammox* e desnitrificação biológica, adsorção, resinas de troca iônica ou

mediante utilização de tecnologias de membranas, como a osmose reversa (Murphy, 1991; Parvizishad *et al.*, 2017; Wang; Qiao, 2024).

Apesar do efluente dos biorreatores R1 e R2 não atender aos parâmetros legais para lançamento em corpos hídricos receptores, os bioprocessos investigados nesta pesquisa contribuíram para a redução significativa do potencial poluidor do lixiviado, como indicam os resultados do ensaio realizado com sementes de *Allium cepa* (FIGURA 4.55). As sementes foram expostas ao afluente da fase V, preparado a partir da diluição do lixiviado até a concentração de 400 mg N L⁻¹ como NAT, e ao efluente dos biorreatores desta mesma fase, após o tratamento em R1 e R2.

FIGURA 4.55 – COMPRIMENTO DAS RAÍZES DE *A. cepa* APÓS EXPOSIÇÃO AO AFLUENTE E EFLUENTE DE R1



FONTE: a autora (2024)

Efluente R1: efluente coletado de R1 durante a fase V. Resultados similares foram obtidos para o efluente de R2 na mesma fase, mas foram omitidos devido à semelhança com os do efluente de R1.

O comprimento médio das raízes de *A. cepa* expostas ao efluente dos biorreatores, representado pela amostra coletada de R1 na fase V, foi de 4,6 cm. Este valor é significativamente diferente do obtido para o comprimento das raízes expostas ao afluente desta mesma fase, cuja média foi de 3,0 cm (Teste *t* de Welch com correção de Bonferroni, $p \leq 0,05$). Estes resultados indicam que o tratamento do lixiviado nos biorreatores R1 e R2, para a concentração afluente de 400 mg N L⁻¹, esteve associado à redução da toxicidade dessa água residuária. Por sua vez, a

redução do potencial poluidor do lixiviado por meio de bioprocessos, como os investigados nesta pesquisa, destaca a importância do tratamento desta água residuária previamente ao seu lançamento em corpos hídricos.

Contudo, apesar da redução da toxicidade do lixiviado após o tratamento em R1 e R2, os efluentes dos biorreatores na fase V ainda apresentaram maior efeito inibitório sobre as raízes de *A. cepa* em comparação ao controle negativo (água destilada), com resultados significativamente diferentes entre si (Teste *t* de Welch com correção de Bonferroni, $p \leq 0,05$). Estes resultados sugerem que, mesmo após o tratamento em R1 e R2, o efluente pode ter apresentado potencial toxicidade, o que reforça a necessidade de combinar diferentes processos, como os biológicos, os físicos e os químicos, para a mitigação dos impactos ambientais associados ao descarte do lixiviado tratado em corpos hídricos receptores.

Finalmente, em função dos resultados obtidos, pode-se afirmar que os bioprocessos destacam-se como alternativa aplicável para a remoção parcial de poluentes, como o nitrogênio amoniacal, contribuindo para a redução dos custos gerais do tratamento quando comparados a tecnologias químicas ou físicas mais dispendiosas. Entretanto, sua aplicação isolada pode não ser suficiente para atender aos padrões legais de qualidade do efluente, sendo necessária a integração com estratégias complementares, como processos físico-químicos ou tecnologias avançadas, para assegurar a conformidade ambiental e a proteção dos corpos hídricos receptores. Por sua vez, a combinação de tecnologias complementares com os bioprocessos, que, em geral, apresentam simplicidade operacional e baixos custos, pode tornar o tratamento do lixiviado mais viável economicamente, favorecendo a instalação dos aterros sanitários.

5 CONCLUSÃO

A geração de lixiviado em aterros sanitários pode representar ameaça à saúde ambiental, especialmente devido à presença de nitrogênio amoniacal, poluente frequentemente identificado em elevadas concentrações, na ordem de centenas a milhares de miligramas por litro. A gestão inadequada desta água residuária pode levar a impactos negativos ao meio ambiente e à saúde pública e, por isso, são necessários métodos eficazes para a redução do seu potencial poluidor. Entre os tratamentos disponíveis, os bioprocessos destacam-se por serem economicamente vantajosos. Porém, frente ao aumento das exigências regulatórias, torna-se fundamental otimizar o tratamento do lixiviado. Nesse contexto, a engenharia de microbiomas oferece estratégias para potencializar o desempenho dos sistemas de tratamento.

Neste estudo, inicialmente foi realizada a caracterização do lixiviado, cujos resultados revelaram características que influenciaram na escolha e impactaram o desempenho dos bioprocessos aplicados. O lixiviado, coletado em duas campanhas, apresentou elevadas concentrações de nitrogênio amoniacal (superiores a 600 mg N L⁻¹), além de baixa concentração de matéria orgânica biodegradável, estimada entre 26% e 39% da matéria orgânica total. Essas características, correspondentes a lixiviados estabilizados, favorecem os processos autotróficos dependentes do acúmulo do nitrito, como a nitrificação parcial e a oxidação anaeróbia da amônia (*anammox*). O lixiviado também apresentou efeito inibitório do crescimento das raízes de *Allium cepa*, o que sugere a potencial toxicidade dessa água residuária.

Ao longo do tratamento do lixiviado, foram aplicadas e avaliadas três estratégias da engenharia de microbiomas: (a) aclimatação e enriquecimento da biomassa nitrificante; (b) manipulação das condições operacionais e (c) bioaumento com biomassa enriquecida. Os resultados sugerem que a aclimatação e o enriquecimento dos micro-organismos nitrificantes foram bem-sucedidos, resultando em uma comunidade microbiana que apresentou elevada eficiência na remoção do nitrogênio amoniacal. A manipulação das condições operacionais, especialmente o controle da concentração de oxigênio dissolvido e a aeração intermitente, mostrou-se eficaz para reduzir o consumo energético e limitar a produção de biomassa excedente. O bioaumento, por sua vez, esteve associado ao maior acúmulo de

nitrito, o que favorece bioprocessos autotróficos como a nitrificação parcial e o processo *anammox*.

Os resultados deste estudo indicam que a remoção do nitrogênio amoniacal do lixiviado pode ser realizada em biorreatores em bateladas sequenciais via bioprocessos autotróficos com limitação da concentração de oxigênio dissolvido. Contudo, mesmo com as estratégias implementadas, como a exposição da microbiota a elevadas concentrações de amônia livre, aeração intermitente e realização do bioaumento, a atividade das bactérias oxidantes do nitrito não foi completamente controlada e a nitratação foi apenas parcialmente inibida.

Como a persistência das bactérias oxidantes do nitrito pode ser desfavorável para bioprocessos dependentes da inibição da nitratação, como a nitrificação parcial e o processo *anammox*, as condições operacionais devem ser manipuladas para garantir maior controle das populações microbianas. Em função dos resultados obtidos, para contornar os mecanismos de adaptação das comunidades microbianas e garantir a estabilidade e a eficiência dos bioprocessos, deve ser enfatizada a necessidade de combinar diversas estratégias operacionais para o tratamento de águas residuárias via bioprocessos, como as realizadas neste estudo.

Nos biorreatores estudados, além das bactérias oxidantes do nitrito como as do gênero *Nitrospira*, foram identificadas sequências de diversos micro-organismos com capacidades metabólicas distintas, incluindo bactérias oxidantes da amônia, *anammox* e desnitrificantes, com prevalência dos gêneros *Nitrosomonas*, “*Ca. Kuenenia*” e *Denitratisoma*, respectivamente. A interação entre estes organismos pode ter contribuído para a estabilidade e a eficiência dos bioprocessos estudados.

Os resultados desta pesquisa permitem concluir que os bioprocessos autotróficos são alternativas para a remoção do nitrogênio amoniacal de lixiviados de aterros sanitários, tendo contribuído para a redução do potencial poluidor e da toxicidade dessa água residuária. No entanto, o efluente tratado não atendeu plenamente aos parâmetros estabelecidos pela Resolução CONAMA 430/2011 para disposição em corpos hídricos, especialmente devido à persistência de elevadas concentrações de nitrogênio amoniacal, nitrito, nitrato e compostos orgânicos recalcitrantes. Esta limitação reforça a necessidade de aplicação de estratégias complementares que combinem os bioprocessos a tecnologias de pré- ou pós-tratamento, como a oxidação química, a adsorção ou a utilização de sistemas de

membranas, para garantir a qualidade do efluente e a conformidade com as exigências regulatórias.

Os bioprocessos investigados destacam-se como ferramenta para o tratamento integrado do lixiviado, reduzindo de forma econômica a carga de nitrogênio amoniacal e a toxicidade desta água residuária. Seu menor custo em comparação a tecnologias mais sofisticadas tornam os bioprocessos uma alternativa atrativa, especialmente em regiões onde recursos financeiros e infraestrutura de saneamento são limitados. Como parte das estratégias de tratamento do lixiviado, os bioprocessos podem melhorar a qualidade do efluente, permitindo que etapas complementares sejam aplicadas de forma mais eficiente e menos onerosa.

Em síntese, os biorreatores em bateladas sequenciais, operados sob regime de aeração intermitente e baixa relação entre carbono e nitrogênio (C/N) apresentaram versatilidade operacional e estiveram associados à reduzida produção de lodo excedente e baixo consumo energético para o tratamento do lixiviado de aterro sanitário. Em função da simplicidade operacional, os sistemas investigados são escalonáveis e podem ser integrados a sistemas híbridos para tratar águas residuárias complexas, como lixiviado, efluentes industriais e águas poluídas de corpos hídricos.

Além disso, as estratégias da engenharia de microbiomas aqui exploradas podem ser utilizadas para o controle de cargas poluidoras em corpos hídricos eutrofizados e outros sistemas ambientais. A aplicação em estações de tratamento em escala plena também pode ser viabilizada com adaptações tecnológicas baseadas no conhecimento gerado sobre as condições seletivas para o controle de micro-organismos chave, como as bactérias oxidantes da amônia e do nitrito, as desnitrificantes e as *anammox*.

Por fim, os resultados desta pesquisa reforçam a importância da ampliação dos estudos de microbiomas em sistemas para o tratamento de águas residuárias, como o lixiviado. A aplicação de técnicas de sequenciamento de marcadores filogenéticos, como o gene 16S rRNA, e a análise da comunidade microbiana possibilitam a compreensão mais profunda das interações entre os organismos e dos impactos das condições operacionais e ambientais sobre a sua atividade. Por sua vez, este conhecimento pode levar ao desenvolvimento de sistemas de tratamento mais eficientes e de menor custo, auxiliando no cumprimento de metas regulatórias e na preservação da saúde ambiental.

6 SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS

Em função das conclusões obtidas e visando à complementação dos resultados deste estudo, a seguir são apresentadas recomendações para pesquisas futuras:

- avaliar condições operacionais e ambientais, como a origem do inóculo, que resultem no enriquecimento de bactérias *comammox* visando à sua aplicação na remoção autotrófica do nitrogênio amoniacal e no tratamento avançado de águas residuárias;
- realizar ensaios para a otimização dos parâmetros associados à aeração intermitente, como a frequência e a duração dos ciclos;
- otimizar o tempo de detenção hidráulica (TDH) para tratamento de lixiviado estabilizado de aterro sanitário visando à remoção concomitante de nitrogênio amoniacal e de matéria orgânica recalcitrante;
- analisar os efeitos do bioaumento no médio e no longo prazo;
- determinar a frequência de realização do bioaumento para manter a sua efetividade e a quantidade de biomassa a ser inoculada para aumento significativo da eficiência de remoção do nitrogênio do lixiviado;
- investigar as condições operacionais e ambientais associadas ao enriquecimento de micro-organismos desnitrificantes heterotróficos capazes de degradar matéria orgânica recalcitrante;
- aprofundar o estudo sobre a interação entre diferentes grupos microbianos e a competição por nichos em sistemas de tratamento de águas residuárias;
- realizar estudos metagenômicos, que apresentam maior cobertura que a análise de microbiomas via sequenciamento de *amplicons* do gene 16S rRNA, visando à predição das funções microbianas e identificação taxonômica.

REFERÊNCIAS

- ABUNAMA, T. *et al.* Variability of Leachate Quality and Polluting Potentials in Light of Leachate Pollution Index (LPI) – A Global Perspective. **Chemosphere**, v. 282, p. 131119, nov. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131119>. Acesso em: 5 set. 2021.
- ALAWI, M. *et al.* Cultivation of a Novel Cold-Adapted Nitrite Oxidizing *Betaproteobacterium* from the Siberian Arctic. **The ISME Journal**, v. 1, n. 3, p. 256–264, jul. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.34>. Acesso em: 12 out. 2021.
- ALAWI, M. *et al.* Temperature Influences the Population Structure of Nitrite-Oxidizing Bacteria in Activated Sludge. **Environmental Microbiology Reports**, v. 1, n. 3, p. 184–190, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00029.x>. Acesso em: 18 jan. 2021.
- ALBRIGHT, M. B. N. *et al.* Solutions in microbiome engineering: prioritizing barriers to organism establishment. **The ISME Journal**, v. 16, n. 2, p. 331-338, fev. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41396-021-01088-5>. Acesso em: 23 ago. 2024.
- AL-HAZMI, H. E. *et al.* Integrating conventional nitrogen removal with anammox in wastewater treatment systems: Microbial metabolism, sustainability and challenges. **Environmental Research**, v. 215, n. 3, p. 114432, dez. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114432>. Acesso em: 19 ago. 2024.
- AL-HAZMI, H. E. *et al.* Optimization of the Aeration Strategies in a Deammonification Sequencing Batch Reactor for Efficient Nitrogen Removal and Mitigation of N₂O Production. **Environmental Science and Technology**, v. 55, n. 2, p. 1218-1230, dez. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c04229>. Acesso em: 2 jul. 2024.
- AL-HAZMI, H. E. *et al.* Sustainable nitrogen removal in anammox-mediated systems: Microbial metabolic pathways, operational conditions and mathematical modelling. **Science of The Total Environment**, v. 868, p.161633, abr. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.161633>. Acesso em: 12 ago. 2024.
- AL-HAZMI, H. E. *et al.* Technological solutions to landfill management: Towards recovery of biomethane and carbon neutrality. **Journal of Environmental Management**, v. 354, p. 120414, mar. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.120414>. Acesso em: 9 set. 2024.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403- 410, 1990. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2). Acesso em: 22 ago. 2024.
- ALVES, R. J. E. *et al.* Unifying the Global Phylogeny and Environmental Distribution of Ammonia-Oxidising Archaea Based on AmoA Genes. **Nature Communications**,

v. 9, n. 1, p. 1517, 17 abr. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03861-1>. Acesso em: 20 set. 2021.

AMARAL, A. L. *et al.* Use of chemometric analyses to assess biological wastewater treatment plants by protozoa and metazoa monitoring. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 190, n. 497, ago. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10661-018-6882-1>. Acesso em: 24 jun. 2024.

ANAND, N.; PALANI, S. G. A comprehensive investigation of toxicity and pollution potential of municipal solid waste landfill leachate. **Science of The Total Environment**, v. 838, n. 1, p. 155891, set. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155891>. Acesso em: 9 set. 2024.

ANDREWS, S. **FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data**. 2010. Disponível em: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>. Acesso em: 22 ago. 2024.

ANTHONISEN, A. C. *et al.* Inhibition of Nitrification by Ammonia and Nitrous Acid. **Journal of The Water Pollution Control Federation**, v. 48, n. 5, p. 835-852, mai. 1976. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/25038971>. Acesso em: 28 out. 2022.

ANTWI, P. *et al.* Nitrogen Removal from Landfill Leachate by Single-Stage Anammox and Partial-Nitritation Process: Effects of Microaerobic Condition on Performance and Microbial Activities. **Journal of Water Process Engineering**, v. 38, p. 101572, dez. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101572>. Acesso em: 28 jan. 2021.

AQEEL, H. *et al.* *Nitrospira* dominant pin-point flocs with granule-like settleability in stirred tank reactors with oxic/hypoxic/oxic zones. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, dez. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1307727>. Acesso em: 10 jun. 2024.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE RESÍDUOS E MEIO AMBIENTE (ABREMA). **Panorama dos Resíduos Sólidos no Brasil 2024**. São Paulo: ABREMA, 2024, 84 p. Disponível em: <https://www.abrema.org.br/panorama/>. Acesso em: 29 dez. 2024.

AZEVEDO, C. S. *et al.* Aeration and non-aeration cycles (AE/NA) time: influence in combined organic matter and nitrogen removal and features of biofilm. **Environmental Technology**, v. 43, n. 16, p. 2443–2456, fev. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09593330.2021.1882583>. Acesso em 30 set. 2024.

BADERNA, D.; CALONI, F.; BENFENATI, E. Investigating Landfill Leachate Toxicity in Vitro: A Review of Cell Models and Endpoints. **Environment International**, v. 122, p. 21–30, jan. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.11.024>. Acesso em: 31 ago. 2021.

BAETTKER, E. C. *et al.* Applicability of Conventional and Non-Conventional Parameters for Municipal Landfill Leachate Characterization. **Chemosphere**, v. 251,

p. 126414, jul. 2020. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126414>. Acesso em: 16 abr. 2021.

BAGCHI, S.; BISWAS, R.; NANDY T. Start-up and stabilization of an Anammox process from a non-acclimatized sludge in CSTR. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 9, p. 943–952, set. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0743-4>. Acesso em: 28 ago. 2024.

BASSIN, J. P. *et al.* Ammonium adsorption in aerobic granular sludge, activated sludge and anammox granules. **Water Research**, v. 45, n. 16, p. 5257-5265, out. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.07.034>. Acesso em: 14 jun. 2024.

BAUMANN, B. *et al.* Development of stable denitrifying cultures during repeated aerobic-anaerobic transient periods. **Water Research**, v. 31, n. 8, p. 1947-1954, ago. 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(97\)00053-5](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(97)00053-5). Acesso em: 26 jan. 2025.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of the Royal Statistical Society - Series B**, v. 57, n. 1, p. 289-300, 1995.

BERG, G. *et al.* Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. **Microbiome**, v. 8, n. 103, jun. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>. Acesso em: 26 ago. 2024.

BIAN, Y. *et al.* Effect of different dissolved oxygen enrichment incubation conditions on the realization of partial nitrification under microaerobic condition. **Journal of Water Process Engineering**, v. 63, n. 105481, jun. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2024.105481>. Acesso em: 24 mai. 2024.

BLACKBURNE, R. *et al.* Kinetic Characterisation of an Enriched *Nitrospira* Culture with Comparison to *Nitrobacter*. **Water Research**, v. 41, n. 14, p. 3033–3042, jul. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.01.043>. Acesso em: 21 dez. 2020.

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**, v. 10, p. 147390, set. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147390>. Acesso em: 18 jul. 2024.

BOONNORAT, J. *et al.* Effect of hydraulic retention time on micropollutant biodegradation in activated sludge system augmented with acclimatized sludge treating low-micropollutants wastewater. **Chemosphere**, v. 230, p. 606-615, set. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.039>. Acesso em: 18 jan. 2025.

BORTOLOTTI, T. *et al.* Evaluation of the toxic and genotoxic potential of landfill leachates using bioassays. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 28,

n. 2, p. 288-293, set. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2009.05.007>. Acesso em: 9 set. 2024.

BOVE, D. *et al.* A Critical Review of Biological Processes and Technologies for Landfill Leachate Treatment. **Chemical Engineering & Technology**, v. 38, n. 12, p. 2115–2126, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ceat.201500257>. Acesso em: 5 jul. 2020.

BRASIL. Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos; altera a Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998; e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 3 ago. 2010. Seção 1, p. 2. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2010/lei/l12305.htm. Acesso em: 31 ago. 2021.

BRENNER, D. *et al.* **Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Two The Proteobacteria Part C The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria.** Second Edition Boston, Massachusetts: Bergey's Manual Trust, 2005. Ebook. v.: digital. Biomedical and Life Sciences (Springer-11642; ZDB-2-SBL). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/0-387-29298-5>. Acesso em: 2 out. 2024.

BURIAN, A. *et al.* Predation increases multiple components of microbial diversity in activated sludge communities. **The ISME Journal**, v. 16, n. 4, p. 1086-1094, abr. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41396-021-01145-z>. Acesso em: 19 jun. 2024.

CAMEJO, P. Y. *et al.* Genome-Enabled Insights into the Ecophysiology of the Comammox Bacterium “*Candidatus Nitrospira Nitrosa*”. **mSystems**, v. 2, n. 5, out. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mSystems.00059-17>. Acesso em: 12 nov. 2020.

CAMILO-COTRIM, C. F. *et al.* What can the *Allium cepa* test say about pesticide safety? A review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, p. 48088-48104, mai. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-022-20695-z>. Acesso em: 15 jul. 2024.

CAO, Y. *et al.* The influence of dissolved oxygen on partial nitrification/anammox performance and microbial community of the 200,000 m³/d activated sludge process at the Changi water reclamation plant (2011 to 2016). **Water Science & Technology**, v. 78, n. 3, p. 634–643, jul. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2166/wst.2018.333>. Acesso em: 2 jul. 2024.

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**, v. 101, n. 4, p. 1365–1383, fev. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8058-7>. Acesso em: 21 dez. 2020.

CARANTO, J. D.; LANCASTER, K. M. Nitric Oxide Is an Obligate Bacterial Nitrification Intermediate Produced by Hydroxylamine Oxidoreductase. **Proceedings**

of the National Academy of Sciences, v. 114, n. 31, p. 8217–8222, ago. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1704504114>. Acesso em: 2 mar. 2021.

CARVALHO, B. G. P. *et al.* Aeration strategies and temperature effects on the partial nitrification/anammox process for nitrogen removal: performance and bacterial community assessment. **Environmental Technology**, v. 43, n. 22, p. 3473–3485, jun. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09593330.2021.1923817>. Acesso em: 30 set. 2024.

CARVALHO, B. G. P. *et al.* Partial nitrification/anammox applied to real anaerobically pretreated domestic sewage under subtropical climate: aeration strategies and nitrogen cycle bacteria. **Environmental Technology**, p. 1–11, jan. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09593330.2023.2298666>. Acesso em: 30 set. 2024.

CHAO, Y. *et al.* Novel Nitrifiers and Comammox in a Full-Scale Hybrid Biofilm and Activated Sludge Reactor Revealed by Metagenomic Approach. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 18, p. 8225–8237, set. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7655-9>. Acesso em: 12 nov. 2020.

CHEN, G. *et al.* Application of metagenomics to biological wastewater treatment. **Science of the Total Environment**, v. 807, p. 150737, fev. 2022. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150737>. Acesso em: 25 jul. 2022.

CHEN, Y. *et al.* A novel control strategy to strengthen nitrogen removal from domestic wastewater through eliminating nitrite oxidizing bacteria in a plug-flow process. **Bioresource Technology**, v. 350, n. 126856, abr. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126856>. Acesso em: 2 jul. 2024.

CHRISTENSEN, T. H. *et al.* Biogeochemistry of Landfill Leachate Plumes. **Applied Geochemistry**, v. 16, n. 7, p. 659–718, jun. 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0883-2927\(00\)00082-2](https://doi.org/10.1016/S0883-2927(00)00082-2). Acesso em: 31 ago. 2021.

CHRISTOFF, A. P. *et al.* **Bacterial identification through accurate library preparation and high-throughput sequencing**. Florianópolis: Neopropecta Microbiome Technologies, 2017. Disponível em: <https://neopropecta.s3.amazonaws.com/docs/Neopropecta+-+White+Paper+-+Bacterial+NGS+sequencing+2017.pdf>. Acesso em: 2 jan. 2025.

CLÉMENT, B.; JANSSEN, C. R.; LE DÛ-DELEPIERRE, A. Estimation of the hazard of landfills through toxicity testing of leachates: 2. Comparison of physico-chemical characteristics of landfill leachates with their toxicity determined with a battery of tests. **Chemosphere**, v. 35, n. 11, p. 2783–2796, dez. 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(97\)00332-9](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00332-9). Acesso em: 4 jan. 2025.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). Resolução n° 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução n° 357, de 17 março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 92, 16 de mai. 2011, p. 89. Disponível em:

<https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=16/05/2011&jornal=1&pagina=89&totalArquivos=132>. Acesso em: 28 dez. 2024.

COSKUNER, G.; CURTIS, T. p. In Situ Characterization of Nitrifiers in an Activated Sludge Plant: Detection of *Nitrobacter* spp. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, n. 3, p. 431–437, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01715.x>. Acesso em: 27 set. 2021.

COSTA, A. M.; ALFAIA, R. G. de S. M.; CAMPOS, J. C. Landfill Leachate Treatment in Brazil – An Overview. **Journal of Environmental Management**, v. 232, p. 110–116, fev. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.11.006>. Acesso em: 31 ago. 2021.

COTTO, I. *et al.* Long Solids Retention Times and Attached Growth Phase Favor Prevalence of Comammox Bacteria in Nitrogen Removal Systems. **Water Research**, v. 169, p. 115268, fev. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115268>. Acesso em: 18 jan. 2021.

COURTENS, E. N. *et al.* A robust nitrifying community in a bioreactor at 50 °C opens up the path for thermophilic nitrogen removal. **The ISME Journal**, v. 10, n. 9, p. 2293–2303, set. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.8>. Acesso em: 7 mai. 2024.

CUI, H. *et al.* Enrichment of comammox bacteria in anammox-dominated low-strength wastewater treatment system within microaerobic conditions: Cooperative effect driving enhanced nitrogen removal. **Chemical Engineering Journal**, v. 453, n. 2, p. 139851, fev. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.139851>. Acesso em: 6 set. 2024.

DAHMS, HU.; HAGIWARA, A.; LEE, JS. Ecotoxicology, ecophysiology, and mechanistic studies with rotifers. **Aquatic Toxicology**, v. 101, n. 1, p. 1-12, jan. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.09.006>. Acesso em: 21 ago. 2024.

DAIGGER, G. T. Oxygen and Carbon Requirements for Biological Nitrogen Removal Processes Accomplishing Nitrification, Nitritation, and Anammox. **Water Environment Research**, v. 86, n. 3, p. 204–209, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.2175/106143013X13807328849459>. Acesso em: 8 jul. 2021.

DAIMS, H. *et al.* Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. **Nature**, v. 528, n. 7583, p. 504–509, dez. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature16461>. Acesso em: 12 nov. 2020.

DAIMS, H.; LÜCKER, S.; WAGNER, M. A New Perspective on Microbes Formerly Known as Nitrite-Oxidizing Bacteria. **Trends in Microbiology**, v. 24, n. 9, p. 699–712, set. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.05.004>. Acesso em: 13 nov. 2020.

DAN, Q. *et al.* Saturated dissolved oxygen-driven high-rate and ultrastable partial nitrification in municipal wastewater. **Bioresource Technology**, v. 413, p. 131470,

dez. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.131470>. Acesso em: 13 set. 2024.

DENG, J. *et al.* Genome-resolved metagenomics reveals the nitrifiers enrichment and species succession in activated sludge under extremely low dissolved oxygen. **Water Research**, v. 266, p. 122420, nov. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2024.122420>. Acesso em: 5 out. 2024.

DONG, G. *et al.* Increasing biomass concentration facilitates simultaneous nitrogen removal and sludge reduction under low C/N conditions. **Bioresource Technology**, v. 413, p. 131532, dez. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.131532>. Acesso em: 12 jan. 2025.

DU, R. *et al.* Partial denitrification providing nitrite: Opportunities of extending application for anammox. **Environment International**, v. 131, p. 105001, out. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105001>. Acesso em: 14 ago. 2024.

DUAN, H. *et al.* Overcoming Nitrite Oxidizing Bacteria Adaptation through Alternating Sludge Treatment with Free Nitrous Acid and Free Ammonia. **Environmental Science & Technology**, v. 53, n. 4, p. 1937–1946, fev. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b06148>. Acesso em: 2 jun. 2021.

DUEHOLM, M. K. D. *et al.* MiDAS 5: Global diversity of bacteria and archaea in anaerobic digesters. **Nature Communications**, v. 15, p. 5361, jun. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-024-49641-y>. Acesso em: 14 set. 2024.

EHRICH, S. *et al.* A new obligately chemolithoautotrophic, nitrite-oxidizing bacterium, *Nitrospira moscoviensis* sp. nov. and its phylogenetic relationship. **Archives of Microbiology**, v. 164, p. 16-23, jul. 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF02568729>. Acesso em: 14 jul. 2022.

EHRIG, H. J. Water and element balances of landfills. In: Baccini P. (Ed.). *The Landfill*. Lecture Notes in Earth Sciences, v. 20, p. 83-115. Berlin: Springer, 1989.

ELAD, T. *et al.* Exploring the effects of intermittent aeration on the performance of nitrifying membrane-aerated biofilm reactors. **Science of The Total Environment**, v. 891, n. 164329, set. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164329>. Acesso em: 17 mai. 2024.

ERNST, W. R. *et al.* Characterization of the Chemical Constituents and Toxicity to Aquatic Organisms of a Municipal Landfill Leachate. **Water Quality Research Journal**, v. 29, n. 1, p. 89–102, fev. 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.2166/wqrj.1994.006>. Acesso em: 3 set. 2021.

FAHRBACH, M. *et al.* *Denitratisoma oestradiolicum* gen. nov., sp. nov., a 17 β -oestradiol-degrading, denitrifying betaproteobacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 7, jul. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63672-0>. Acesso em: 22 ago. 2024.

FAN, F. *et al.* Functional characteristics and mechanisms of microbial community succession and assembly in a long-term moving bed biofilm reactor treating real municipal wastewater. **Environmental Research**, v. 267, p. 120602, fev. 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2024.120602>. Acesso em: 12 jan. 2025.

FAN, XY. *et al.* Temporal Dynamics of Bacterial Communities and Predicted Nitrogen Metabolism Genes in a Full-Scale Wastewater Treatment Plant. **RSC Advances**, v. 7, n. 89, p. 56317–56327, dez. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C7RA10704H>. Acesso em: 9 fev. 2021.

FELFÖLDI, T. *et al.* *Quisquiliibacterium transsilvanicum* gen. nov., sp. nov., a novel betaproteobacterium isolated from a waste-treating bioreactor. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 11, p. 4742-4746, nov. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002368>. Acesso em: 24 set. 2024.

FENG, Y. *et al.* An overview of the strategies for the deammonification process start-up and recovery after accidental operational failures. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 16, p. 541-568, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11157-017-9441-2>. Acesso em: 10 jun. 2024.

FERNANDES, L. de A.; MADEIRA, C. L.; de ARAÚJO, J. C. Nitrogen removal based on anammox-based processes applied to mature landfill leachate diluted with domestic wastewater: a review. **Environmental Technology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 243–265, dez. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21622515.2022.2147452>. Acesso em: 30 set. 2024.

FLEMMING, HC. *et al.* The biofilm matrix: multitasking in a shared space. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, p. 70-86, fev. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00791-0>. Acesso em: 13 jun. 2024.

FUJITANI, H. *et al.* Genomic and Physiological Characteristics of a Novel Nitrite-Oxidizing *Nitrospira* Strain Isolated From a Drinking Water Treatment Plant. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.545190>. Acesso em: 29 jan. 2021.

GAO, C. *et al.* Enhancing nitrogen removal from digested swine wastewater by anammox with aeration optimization coupling real-time control strategy. **Bioresource Technology**, v. 414, p. 131554, dez. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.131554>. Acesso em: 4 out. 2024.

GAO, JF. *et al.* Quantitative Analyses of the Composition and Abundance of Ammonia-Oxidizing Archaea and Ammonia-Oxidizing Bacteria in Eight Full-Scale Biological Wastewater Treatment Plants. **Bioresource Technology**, v. 138, p. 285–296, jun. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.176>. Acesso em: 20 set. 2021.

GARAJ-VRHOVAC, V. *et al.* Toxicological characterization of the landfill leachate prior/after chemical and electrochemical treatment: A study on human and plant cells.

Chemosphere, v. 93, n. 6, p. 939-945, out. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.059>. Acesso em: 9 set. 2024.

GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. Phylum All. Euryarchaeota *phy. nov.* In: BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W. (Ed.). **Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology**, 2nd ed. New York: Springer, 2001. v. 1: The *Archaea* and the Deeply Branching and Phototrophic *Bacteria*.

GILBERT, G. S.; DIAZ, A.; BREGOFF, H. A. Seed Disinfestation Practices to Control Seed-Borne Fungi and Bacteria in Home Production of Sprouts. **Foods**, v. 12, n. 4, p. 747, fev. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods12040747>. Acesso em: 16 jul. 2024.

GONZÁLEZ, E. C.; SALAS, L. D. M.; GUTIÉRREZ, A. C. A practical procedure for the microbiological monitoring of activated sludge plant functioning. **Water and Environment Journal**, v. 30, n. 3-4, p. 182–189, set. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/wej.12189>. Acesso em: 24 jun. 2024.

GONZALEZ-MARTINEZ, A. *et al.* Performance and bacterial community dynamics of a CANON bioreactor acclimated from high to low operational temperatures. **Chemical Engineering Journal**, v. 287, p. 557-567, mar. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.11.081>. Acesso em: 30 ago. 2024.

GOTTSHALL, E. Y. *et al.* Sustained Nitrogen Loss in a Symbiotic Association of Comammox *Nitrospira* and Anammox Bacteria. **Water Research**, v. 202, p. 117426, set. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117426>. Acesso em: 20 jul. 2021.

HÄGERBÄUMER, A. *et al.* Experimental Studies with Nematodes in Ecotoxicology: An Overview. **Journal of Nematology**, v. 47, n. 1, p. 11-27, mar. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4388576/>. Acesso em: 21 ago. 2024.

HAN, P. *et al.* N₂O and NO_y Production by the Comammox Bacterium *Nitrospira inopinata* in Comparison with Canonical Ammonia Oxidizers. **Water Research**, v. 190, p. 116728, fev. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116728>. Acesso em: 15 abr. 2021.

HAN, P. *et al.* Specific Micropollutant Biotransformation Pattern by the Comammox Bacterium *Nitrospira inopinata*. **Environmental Science & Technology**, v. 53, n. 15, p. 8695–8705, ago. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b01037>. Acesso em: 26 dez. 2020.

HEAD, I. M. *et al.* The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences. **Microbiology**, v. 139, n. 6, p. 1147–1153, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/00221287-139-6-1147>. Acesso em: 5 jan. 2021.

HEISE, J. *et al.* Ammonium Removal in Aquaponics Indicates Participation of Comammox *Nitrospira*. **Current Microbiology**, v. 78, p. 894-903, fev. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02358-3>. Acesso em: 9 out. 2024.

HERRERO, M.; STUCKEY, D. C. Bioaugmentation and its application in wastewater treatment: A review. **Chemosphere**, v. 140, p. 119-128, dez. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.10.033>. Acesso em: 29 mai. 2024.

HIRA, D. *et al.* Impact of aerobic acclimation on the nitrification performance and microbial community of landfill leachate sludge. **Journal of Environmental Management**, v. 209, p. 188-194, mar. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.12.056>. Acesso em: 29 ago. 2024.

HOU, Z. *et al.* Rapid start-up of mainstream partial denitrification /anammox and enhanced nitrogen removal through inoculation of precultured biofilm for treating low-strength municipal sewage. **Bioresource Technology**, v. 411, p. 131320, nov. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.131320>. Acesso em: 26 ago. 2024.

HU, H. *et al.* Guided by the principles of microbiome engineering: Accomplishments and perspectives for environmental use. **mLife**, v. 1, n. 4, p. 382-398, dez. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mlf2.12043>. Acesso em: 27 ago. 2024.

HUANG, L. *et al.* A Review of the Role of Extracellular Polymeric Substances (EPS) in Wastewater Treatment Systems. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 19, p. 12191, set. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijerph191912191>. Acesso em: 13 jun. 2024.

HUANG, Z. *et al.* Influence of Physicochemical and Operational Parameters on *Nitrobacter* and *Nitrospira* Communities in an Aerobic Activated Sludge Bioreactor. **Water Research**, v. 44, n. 15, p. 4351–4358, ago. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.05.037>. Acesso em: 21 dez. 2020.

HUO, T. *et al.* Metabolic acclimation of anammox consortia to decreased temperature. **Environment International**, v. 143, p. 105915, out. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105915>. Acesso em: 30 ago. 2024.

ILMASARI, D. *et al.* Future trends and patterns in leachate biological treatment research from a bibliometric perspective. **Journal of Environmental Management**, v. 318, p. 115594, set. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115594>. Acesso em: 12 jul. 2022.

IUBEL, J. P. G.; BRAGA, S. M.; BRAGA, M. C. B. The importance of organic carbon as a coadjutant in the transport of pollutants. **Water Science & Technology**, v. 84, n. 7, p. 1557-1565, set. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.2166/wst.2021.351>. Acesso em: 29 dez. 2024.

JIANG, H. *et al.* Efficient and Advanced Nitrogen Removal from Mature Landfill Leachate via Combining Nitritation and Denitritation with Anammox in a Single Sequencing Batch Biofilm Reactor. **Bioresource Technology**, v. 333, p. 125138,

ago. 2021a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125138>. Acesso em: 28 abr. 2021.

JIANG, H. *et al.* Novel Insights into Overcoming Nitrite Oxidation Bacteria Acclimatization Problem in Treatment of High-Ammonia Wastewater through Partial Nitrification. **Bioresource Technology**, v. 336, p. 125254, set. 2021b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125254>. Acesso em: 26 maio. 2021.

JIANG, M. *et al.* Exploiting refractory organic matter for advanced nitrogen removal from mature landfill leachate via anammox in an expanded granular sludge bed reactor. **Bioresource Technology**, v. 371, p. 128594, mar. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128594>. Acesso em: 17 set. 2024.

JONES, E. M. *et al.* Synthetic microbiology in sustainability applications. **Nature Reviews Microbiology**, v. 22, p. 345-359, jan. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41579-023-01007-9>. Acesso em: 26 ago. 2024.

JUNG, M.-Y. *et al.* Ammonia-Oxidizing Archaea Possess a Wide Range of Cellular Ammonia Affinities. **The ISME Journal**, p. 1–12, jul. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41396-021-01064-z>. Acesso em: 20 set. 2021.

KAMPSCHREUR, M. J. *et al.* Nitrous oxide emission during wastewater treatment. **Water Research**, v. 43, n. 17, p. 4093-4103, set. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.03.001>. Acesso em: 27 ago. 2024.

KANG, D. *et al.* Linking morphological features to anammox communities in a partial nitrification and anammox (PN/A) biofilm reactor. **Journal of Environmental Management**, v. 341, p. 118038, set. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.118038>. Acesso em: 26 ago. 2024.

KENNEDY, K. J.; LENTZ, E. M. Treatment of landfill leachate using sequencing batch and continuous flow upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. **Water Research**, v. 34, n. 14, p. 3640-3656, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00114-7](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00114-7). Acesso em: 2 mar. 2020

KIM, T.; BEHRENS, S.; LAPARA, T. Different engineering designs have profoundly different impacts on the microbiome and nitrifying bacterial populations in municipal wastewater treatment bioreactors. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 87, n. 18, p. 1-12, set. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.01044-21>. Acesso em: 9 jul. 2021.

KIM, T. *et al.* Dissolved oxygen concentrations affect the function but not the relative abundance of nitrifying bacterial populations in full-scale municipal wastewater treatment bioreactors during cold weather. **Science of the Total Environment**, v. 781, n. 146719, ago. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146719>. Acesso em: 14 out. 2021.

KITS, K. D. *et al.* Kinetic analysis of a complete nitrifier reveals an oligotrophic lifestyle. **Nature**, v. 549, n. 7671, p. 269–272, set. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature23679>. Acesso em: 12 nov. 2020.

KITS, K. D. *et al.* Low Yield and Abiotic Origin of N₂O Formed by the Complete Nitrifier *Nitrospira inopinata*. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1–12, abr. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09790-x>. Acesso em: 26 dez. 2020.

KITZINGER, K. *et al.* Characterization of the First “*Candidatus Nitrotoga*” Isolate Reveals Metabolic Versatility and Separate Evolution of Widespread Nitrite-Oxidizing Bacteria. **mBio**, v. 9, n. 4, p. 1-16, jul./ago. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mBio.01186-18>. Acesso em: 7 jul. 2021.

KJELDSEN, P. *et al.* Present and Long-Term Composition of MSW Landfill Leachate: A Review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 32, n. 4, p. 297–336, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10643380290813462>. Acesso em: 31 ago. 2021.

KOCH, H. *et al.* Expanded metabolic versatility of ubiquitous nitrite-oxidizing bacteria from the genus *Nitrospira*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 112, n. 36, p. 11371–11376, ago. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1506533112>. Acesso em: 14 set. 2024.

KOCH, H.; VAN KESSEL, M. A. H. J.; LÜCKER, S. Complete Nitrification: Insights into the Ecophysiology of Comammox *Nitrospira*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 1, p. 177–189, jan. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9486-3>. Acesso em: 12 nov. 2020.

KOOPS, H.-P.; POMMERENING-RÖSER, A. Distribution and Ecophysiology of the Nitrifying Bacteria Emphasizing Cultured Species. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 37, n. 1, p. 1–9, ago. 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(01\)00137-4](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(01)00137-4). Acesso em: 22 jan. 2021.

KOWALCHUK, G. A.; STEPHEN, J. R. Ammonia-Oxidizing Bacteria: A Model for Molecular Microbial Ecology. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 485–529, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.485>. Acesso em: 5 jan. 2021.

KRUL, J. M.; VEENINGEN, R. The synthesis of the dissimilatory nitrate reductase under aerobic conditions in a number of denitrifying bacteria, isolated from activated sludge and drinking water. **Water Research**, v. 11, n. 1, p. 39-43, 1977. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(77\)90179-8](https://doi.org/10.1016/0043-1354(77)90179-8). Acesso em: 26 jan. 2025.

KUENEN, J. G. Anammox bacteria: from discovery to application. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 320-326, abr. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1857>. Acesso em: 4 out. 2024.

KWASNIEWSKA, J. *et al.* An assessment of the genotoxic effects of landfill leachates using bacterial and plant tests. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 75, p. 55-62, jan. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.08.020>. Acesso em: 9 set. 2024.

LACKNER, S. *et al.* Full-Scale Partial Nitritation/Anammox Experiences – An Application Survey. **Water Research**, v. 55, p. 292–303, maio 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.02.032>. Acesso em: 8 jul. 2021.

LATOCHESKI, E. C. **Avaliação da aclimação de lodos anaeróbios a lixiviado de aterro sanitário**. 189 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental) - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2020. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/69320>. Acesso em: 7 set. 2021.

LATOCHESKI, E. C., da ROCHA, M. C. V.; BRAGA, M. C. B. *Nitrospira* in wastewater treatment: applications, opportunities and research gaps. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 21, p. 905–930, out. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11157-022-09634-z>. Acesso em: 19 ago. 2024.

LAW, Y. *et al.* Nitrous oxide emissions from wastewater treatment processes. **Philosophical Transactions of The Royal Society B**, v. 367, p. 1265–1277, mai. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0317>. Acesso em: 19 jul. 2022.

LAWSON, C. E. *et al.* Common principles and best practices for engineering microbiomes. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, p. 725–741, set. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0255-9>. Acesso em: 23 ago. 2024.

LAWSON, C. E. Retooling Microbiome Engineering for a Sustainable Future. **mSystems**, v. 6, n. 4, ago. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/msystems.00925-21>. Acesso em: 27 ago. 2024.

LAWSON, C. E.; LÜCKER, S. Complete Ammonia Oxidation: An Important Control on Nitrification in Engineered Ecosystems? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 50, p. 158–165, abr. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.01.015>. Acesso em: 12 nov. 2020.

LE MOAL, M. *et al.* Eutrophication: A New Wine in an Old Bottle? **Science of The Total Environment**, v. 651, p. 1–11, fev. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.139>. Acesso em: 7 set. 2021.

LE, LT *et al.* Improve nitrogen removal of the biofilm single-stage PN/A process by optimizing the intermittent aeration strategy. **Environmental Technology & Innovation**, v. 30, n. 103078, mai. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2023.103078>. Acesso em: 20 mai. 2024.

LE, LT *et al.* Suppression of nitrite-oxidizing bacteria under the combined conditions of high free ammonia and low dissolved oxygen concentrations for mainstream partial nitritation. **Environmental Technology & Innovation**, v. 20, n. 101135, nov. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101135>. Acesso em: 20 mai. 2024.

- LEBEDEVA, E. V. *et al.* Enrichment and Genome Sequence of the Group I.1a Ammonia-Oxidizing Archaeon “*Ca. Nitrosotenuis uzonensis*” Representing a Clade Globally Distributed in Thermal Habitats. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. e80835, nov. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080835>. Acesso em: 14 jul. 2022.
- LEBRON, Y. A. R. *et al.* A Survey on Experiences in Leachate Treatment: Common Practices, Differences Worldwide and Future Perspectives. **Journal of Environmental Management**, v. 288, p. 112475, jun. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112475>. Acesso em: 7 abr. 2021.
- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71-81, jul.-ago. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.06.002>. Acesso em: 15 jul. 2024.
- LI, H. *et al.* Partial nitrification of landfill leachate with varying influent composition under intermittent aeration conditions. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 91, n. 4, p. 285-294, jul. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.psep.2012.05.009>. Acesso em: 20 mai. 2024.
- LI, J. *et al.* Selective enrichment and metagenomic analysis of three novel comammox *Nitrospira* in a urine-fed membrane bioreactor. **ISME Communications**, v. 1, n. 7, mar. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s43705-021-00005-3>. Acesso em: 25 jul. 2022.
- LI, S. *et al.* Adaptation of Nitrifying Community in Activated Sludge to Free Ammonia Inhibition and Inactivation. **Science of The Total Environment**, v. 728, p. 138713, ago. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138713>. Acesso em: 2 jun. 2021.
- LI, Z.; KECHEN, X.; YONGZHEN, P. Composition characterization and transformation mechanism of refractory dissolved organic matter from an ANAMMOX reactor fed with mature landfill leachate. **Bioresource Technology**, v. 250, p. 413-421, fev. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.007>. Acesso em: 17 set. 2024.
- LIM, B. S. *et al.* Effects of operational parameters on aeration on/off time in an intermittent aeration membrane bioreactor. **Desalination**, v. 202, n. 1-3, p. 77-82, jan. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.desal.2005.12.041>. Acesso em: 19 jan. 2025.
- LIMPIYAKORN, T. *et al.* AmoA-Encoding Archaea in Wastewater Treatment Plants: A Review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 4, p. 1425–1439, fev. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4650-7>. Acesso em: 21 set. 2021.
- LINDAMULLA, L. M. L. K. B. Treatment of mature landfill leachate in tropical climate using membrane bioreactors with different configurations. **Chemosphere**, v. 307, p.

136013, nov. 2022. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136013>. Acesso em: 26 jan. 2025.

LIU, J. *et al.* Denitrification of landfill leachate under different hydraulic retention time in a two-stage anoxic/oxic combined membrane bioreactor process: Performances and bacterial community. **Bioresource Technology**, v. 250, p. 110-116, fev. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.026>. Acesso em: 19 jan. 2025.

LIU, J. *et al.* Responses of suspended sludge and biofilm in a SNAD system under C/N elevation: Microbial activity, nitrogen conversion flux and molecular ecological network. **Science of The Total Environment**, v. 954, p. 176236, dez. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.176236>. Acesso em: 21 set. 2024.

LIU, W. *et al.* Functional and Compositional Characteristics of Nitrifiers Reveal the Failure of Achieving Mainstream Nitritation under Limited Oxygen or Ammonia Conditions. **Bioresource Technology**, v. 275, p. 272–279, mar. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.065>. Acesso em: 9 fev. 2021.

LIU, Y. *et al.* The roles of free ammonia (FA) in biological wastewater treatment processes: A review. **Environmental International**, v. 123, p. 10-19, fev. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.11.039>. Acesso em: 12 nov. 2021.

LOUCA, S. *et al.* Function and functional redundancy in microbial systems. **Nature Ecology & Evolution**, v. 2, p. 936-943, jun. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0519-1>. Acesso em: 27 ago. 2024.

LÜCKER, S. *et al.* A Nitrospira metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 20, p. 13479-13484, jul. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1003860107>. Acesso em: 4 jan. 2025.

LÜCKER, S. *et al.* *Nitrotoga*-like Bacteria Are Previously Unrecognized Key Nitrite Oxidizers in Full-Scale Wastewater Treatment Plants. **The ISME Journal**, v. 9, n. 3, p. 708–720, mar. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.158>. Acesso em: 18 jan. 2021.

LUO, H. *et al.* Recent Advances in Municipal Landfill Leachate: A Review Focusing on Its Characteristics, Treatment, and Toxicity Assessment. **Science of The Total Environment**, v. 703, p. 135468, fev. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135468>. Acesso em: 7 set. 2021.

LUO, Z. *et al.* Insight into continuous-flow partial nitrification granular sludge system: Long-term performance, formation mechanism, and partial nitrification granular sludge/Anammox coupled system for mature landfill leachate treatment. **Bioresource Technology**, v. 413, p. 131501, dez. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.131501>. Acesso em: 21 set. 2024.

MA, B. *et al.* Inactivation and Adaptation of Ammonia-Oxidizing Bacteria and Nitrite-Oxidizing Bacteria When Exposed to Free Nitrous Acid. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1266–1270, dez. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.074>. Acesso em: 2 jun. 2021.

MADILL, M. B. W. *et al.* Activity-Based Cell Sorting Reveals Resistance of Functionally Degenerate *Nitrospira* during a Press Disturbance in Nitrifying Activated Sludge. **mSystems**, v. 6, n. 4, p. e00712-21, jul. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mSystems.00712-21>. Acesso em: 19 ago. 2024.

MADONI, P. Protozoa in wastewater treatment processes: A minireview. **Italian Journal of Zoology**, v. 78, n. 1, p. 3–11, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/11250000903373797>. Acesso em: 19 jun. 2024.

MAGRÍ, A. *et al.* Scaling-Up and Long-Term Operation of a Full-Scale Two-Stage Partial Nitrification-Anammox System Treating Landfill Leachate. **Processes**, v. 9, n. 5, mai. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pr9050800>. Acesso em: 28 mai. 2024.

MAI, W. *et al.* Advances in Studies on Microbiota Involved in Nitrogen Removal Processes and Their Applications in Wastewater Treatment. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. 746293, p. 1-9, set. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.746293>. Acesso em: 12 nov. 2021.

MAIXNER, F. *et al.* Nitrite Concentration Influences the Population Structure of *Nitrospira*-like Bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 8, p. 1487–1495, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01033.x>. Acesso em: 21 dez. 2020.

MARGULIS, LYNN. Power to protocists. In: MARGULIS, L.; SAGAN, D. **Slanted Truths – Essays on Gaia, symbiosis, and evolution**. New York: Springer-Verlag, 1997.

MARTINEZ-RABERT, E. *et al.* Biochemistry shapes growth kinetics of nitrifiers and defines their activity under specific environmental conditions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 119, n. 5, p. 1290-1300, mai. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bit.28045>. Acesso em: 19 jul. 2022.

MASELLA, A. P. *et al.* PANDAseq: paired-end assembler for Illumina sequences. **BMC Bioinformatics**, v. 13, n. 31, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-31>. Acesso em: 22 ago. 2024.

MEHRANI, MJ. *et al.* The Occurrence and Role of *Nitrospira* in Nitrogen Removal Systems. **Bioresource Technology**, v. 303, p. 122936, maio 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122936>. Acesso em: 21 dez. 2020.

MIAO, L. *et al.* Recent Advances in Nitrogen Removal from Landfill Leachate Using Biological Treatments – A Review. **Journal of Environmental Management**, v. 235, p. 178–185, abr. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.01.057>. Acesso em: 13 nov. 2020.

MIAO, Y. *et al.* Application of intermittent aeration in nitrogen removal process: development, advantages and mechanisms. **Chemical Engineering Journal**, v. 430, n. 133184, fev. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.133184>. Acesso em: 20 mai. 2024.

MIAO, Y. *et al.* Enhancing ammonium oxidizing bacteria activity was key to single-stage partial nitrification-anammox system treating low-strength sewage under intermittent aeration condition. **Bioresource Technology**, v. 231, p. 36-44, mai. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.045>. Acesso em: 21 mai. 2024.

MORAIS, R. G. de. **Comportamento dinâmico de reatores anaeróbios de leito fluidizado sob condições de estresse hidráulico, térmico e bioquímico**. 235 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental) - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2022. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/75642>. Acesso em: 2 ago. 2023.

MOTA, C. *et al.* Effects of Aeration Cycles on Nitrifying Bacterial Populations and Nitrogen Removal in Intermittently Aerated Reactors. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, dez. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8565-8572.2005>. Acesso em: 19 jan. 2025.

MUELLER, A. J. *et al.* Genomic and kinetic analysis of novel *Nitrospinae* enriched by cell sorting. **The ISME Journal**, v. 15, n. 3, p. 732–745, mar. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00809-6>. Acesso em: 16 ago. 2024.

MURPHY, A. P. Chemical removal of nitrate from water. **Nature**, v. 350, p. 223-225, mar. 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/350223a0>. Acesso em: 29 dez. 2024.

MUSSMANN, M. *et al.* Thaumarchaeotes Abundant in Refinery Nitrifying Sludges Express AmoA but Are Not Obligate Autotrophic Ammonia Oxidizers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 40, p. 16771–16776, out. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1106427108>. Acesso em: 20 set. 2021.

NAVADA, S. *et al.* Influence of rate of salinity increase on nitrifying biofilms. **Journal of Cleaner Production**, v. 238, n. 117835, nov. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.117835>. Acesso em: 21 jul. 2022.

NOWKA, B. *et al.* Improved isolation strategies allowed the phenotypic differentiation of two *Nitrospira* strains from widespread phylogenetic lineages. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 91, n. 3, mar. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/femsec/fiu031>. Acesso em: 18 dez. 2020.

NOWKA, B.; DAIMS, H.; SPIECK, E. Comparison of Oxidation Kinetics of Nitrite-Oxidizing Bacteria: Nitrite Availability as a Key Factor in Niche Differentiation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 2, p. 745–753, jan. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.02734-14>. Acesso em: 21 dez. 2020.

NUANSAWAN, N. *et al.* Effect of hydraulic retention time and sludge recirculation on greenhouse gas emission and related microbial communities in two-stage membrane bioreactor treating solid waste leachate. **Bioresource Technology**, v. 210, p. 35-42, jun. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.109>. Acesso em: 18 jan. 2025.

O'LEARY, P. R.; TCHOBANOGLIOUS, G. Landfilling. In: TCHOBANOGLIOUS, G.; KREITH, F. (Ed.). **Handbook of Solid Waste Management**. 2nd ed. [S.l.]: McGraw-Hill, 2002. p. 14.1-14.93.

PALATINSZKY, M. *et al.* Growth of complete ammonia oxidizers on guanidine. **Nature**, ago. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07832-z>. Acesso em: 16 ago. 2024.

PALOMO, A. *et al.* Comparative genomics sheds light on niche differentiation and the evolutionary history of comammox *Nitrospira*. **The ISME Journal**, v. 12, n. 7, p. 1779–1793, mar. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0083-3>. Acesso em: 4 jan. 2025.

PAN, J. *et al.* Complete ammonia oxidation (comammox) at pH 3–4 supports stable production of ammonium nitrate from urine. **Water Research**, v. 257, n. 121686, jun. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2024.121686>. Acesso em: 7 mai. 2024.

PAN, M. *et al.* Assessment of nitrogen and phosphorus removal in an intermittently aerated sequencing batch reactor (IASBR) and a sequencing batch reactor (SBR). **Water Science & Technology**, v. 68, n. 2, p. 400-405, jul. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.2166/wst.2013.190>. Acesso em: 16 mai. 2024.

PARK, H.-D.; NOGUERA, D. *Nitrospira* community composition in nitrifying reactors operated with two different dissolved oxygen levels. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 1470–1474, set. 2008.

PARK, MR.; PARK, H.; CHANDRAN, K. Molecular and Kinetic Characterization of Planktonic *Nitrospira* spp. Selectively Enriched from Activated Sludge. **Environmental Science & Technology**, v. 51, n. 5, p. 2720–2728, mar. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05184>. Acesso em: 21 dez. 2020.

PARK, S. *et al.* Improved insights into the adaptation and selection of *Nitrosomonas* spp. for partial nitritation under saline conditions based on specific oxygen uptake rates and next generation sequencing. **Science of The Total Environment**, v. 822, p. 153644, mai. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153644>. Acesso em: 29 ago. 2024.

PARTE, A. C. *et al.* List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 11, p. 5607–5612, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004332>. Acesso em: 20 jul. 2021.

PARVIZISHAD, M. *et al.* A Review of Adverse Effects and Benefits of Nitrate and Nitrite in Drinking Water and Food on Human Health. **Health Scope**, v. 6, n. 3, p. e14164, jun. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.5812/jhealthscope.14164>. Acesso em: 29 dez. 2024.

PENESYAN, A. *et al.* Three faces of biofilms: a microbial lifestyle, a nascent multicellular organism, and an incubator for diversity. **npj Biofilms Microbiomes**, v. 7, n. 80, nov. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41522-021-00251-2>. Acesso em: 13 jun. 2024.

PETROPOULOS, P.; GILBRIDE, K. A. Nitrification in activated sludge batch reactors is linked to protozoan grazing of the bacterial population. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 9, p. 791–799, set. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/w05-069>. Acesso em: 22 jun. 2024.

PHILIPS, S.; LAANBROEK, H. J.; VERSTRAETE, W. Origin, causes and effects of increased nitrite concentrations in aquatic environments. **Reviews in Environmental Science & Bio/Technology**, v. 1, p. 115-141, jun. 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/A:1020892826575>. Acesso em: 19 jan. 2025.

PODDER, A.; REINHART, D.; GOEL, R. Nitrogen management in landfill leachate using single-stage anammox process-illustrating key nitrogen pathways under an ecogenomics framework. **Bioresource Technology**, v. 312, p. 123578, set. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123578>. Acesso em: 17 set. 2024.

POGUE, A. J.; GILBRIDE, K. A. Impact of protozoan grazing on nitrification and the ammonia- and nitrite-oxidizing bacterial communities in activated sludge. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 5, p. 559-571, mai. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/W07-027>. Acesso em: 22 jun. 2024.

PROSSER, J. I.; HEAD, I. M.; STEIN, L. Y. The Family *Nitrosomonadaceae*. In: ROSENBERG, E. *et al.* (Ed.). **The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria**. Berlin, Heidelberg: Springer, 2014. p. 901–918.

QUOC, B. N. *et al.* Case study: Bioaugmenting the comammox dominated biomass from B-stage to enhance nitrification in A-stage at Blue Plains AWWTP. **Water Environment Research**, v. 96, n. 3, p. e11005, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/wer.11005>. Acesso em: 28 mai. 2024.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2023. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 30 abr. 2024.

RAHIMI, S.; MODIN, O.; MIJAKOVIC, I. Technologies for Biological Removal and Recovery of Nitrogen from Wastewater. **Biotechnology Advances**, v. 43, p. 107570, jun. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107570>. Acesso em: 15 jun. 2020.

RAMASWAMI, S. *et al.* Measuring nitrate concentration in wastewaters

with high chloride content. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 97, n. 1, p. 56-70, jan. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/03067319.2016.1277215>. Acesso em: 13 jul. 2022.

RAMÍREZ-MELGAREJO, M.; STRINGER, T. Wastewater treatment, energy consumption, and greenhouse gas emissions: An operational approach to comparing Barcelona and Mexico City. **Journal of Environmental Management**, v. 353, p. 120175, fev. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.120175>. Acesso em: 19 ago. 2024.

RAPER, E. *et al.* Industrial wastewater treatment through bioaugmentation. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 118, p. 178-187, ago. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.psep.2018.06.035>. Acesso em: 27 ago. 2024.

REIMER, L. C. *et al.* BacDive in 2022: the knowledge base for standardized bacterial and archaeal data. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. D1, p. D741–D746, jan. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkab961>. Acesso em: 18 set. 2024.

REN, Y. *et al.* New Perspectives on Microbial Communities and Biological Nitrogen Removal Processes in Wastewater Treatment Systems. **Bioresource Technology**, v. 297, p. 122491, fev. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122491>. Acesso em: 25 fev. 2021.

RENOU, S. *et al.* Landfill Leachate Treatment: Review and Opportunity. **Journal of Hazardous Materials**, v. 150, n. 3, p. 468–493, fev. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.09.077>. Acesso em: 31 ago. 2021.

RESHADI, M. A. M. *et al.* The Evolving Trends of Landfill Leachate Treatment Research over the Past 45 Years. **Environmental Science and Pollution Research**, jul. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14274-x>. Acesso em: 9 jul. 2021.

RICE, E. W. *et al.* (Ed.). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 22nd ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2012.

RIPLEY, L. E.; BOYLE, W. C.; CONVERSE, J. C. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. **Journal of The Water Pollution Control Federation**, v. 58, n. 5, p. 406-411, 1986. Disponível em: www.jstor.org/stable/25042933. Acesso em: 3 ago. 2019.

ROCHA, M. C. V.; BRAGA, S. M.; BRAGA, M. C. B. Evaluation of the Effects of Bioaugmentation on the Efficiency of Anaerobic Treatment of Landfill Leachate. **The Journal of Solid Waste Technology and Management**, v. 43, n. 2, p. 91–101, maio 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.5276/JSWTM.2017.91>. Acesso em: 7 set. 2021.

RODRIGUEZ-SANCHEZ, A. *et al.* Treatment of dairy wastewater using intermittent-aeration sequencing batch reactor at pilot-scale. **Bioresource Technology Reports**,

n. 101864, mai. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2024.101864>. Acesso em: 17 mai. 2024.

ROOTS, P. *et al.* Comammox *Nitrospira* Are the Dominant Ammonia Oxidizers in a Mainstream Low Dissolved Oxygen Nitrification Reactor. **Water Research**, v. 157, p. 396–405, jun. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.03.060>. Acesso em: 21 dez. 2020.

SAKOULA, D. *et al.* Enrichment and Physiological Characterization of a Novel Comammox *Nitrospira* Indicates Ammonium Inhibition of Complete Nitrification. **The ISME Journal**, p. 1–15, nov. 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41396-020-00827-4>. Acesso em: 21 dez. 2020.

SAKOULA, D. *et al.* The draft genome sequence of “*Nitrospira lenta*” strain BS10, a nitrite oxidizing bacterium isolated from activated sludge. **Environmental Microbiome**, v. 13, n. 32, nov. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40793-018-0338-7>. Acesso em: 5 jan. 2025.

SANZ, J. L.; KÖCHLING, T. Next-generation sequencing and waste/wastewater treatment: a comprehensive overview. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 18, p. 635–680, set. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11157-019-09513-0>. Acesso em: 25 jul. 2022.

SATO, Y. *et al.* Efficient conversion of organic nitrogenous wastewater to nitrate solution driven by comammox *Nitrospira*. **Water Research**, v. 197, n. 117088, jun. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117088>. Acesso em: 7 mai. 2024.

SEDLACEK, C. J. It Takes a Village: Discovering and Isolating the Nitrifiers. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, ago. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01900>. Acesso em: 7 jan. 2021.

SEILER, C. *et al.* Grazing resistance of bacterial biofilms: a matter of predators’ feeding trait. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, n. 9, set. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/femsec/fix112>. Acesso em: 20 jun. 2024.

SHAO, YH.; WU, JH. Comammox *Nitrospira* Species Dominate in an Efficient Partial Nitrification–Anammox Bioreactor for Treating Ammonium at Low Loadings. **Environmental Science & Technology**, v. 55, n. 3, p. 2087–2098, jan. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c05777>. Acesso em: 17 jan. 2021.

SHENG, B. *et al.* Microbial community dynamics in different floc size aggregates during nitrogen removal process upgrading in a full-scale landfill leachate treatment plant. **Bioresource Technology**, v. 413, p. 131484, dez. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.131484>. Acesso em: 17 set. 2024.

SIEMENSMA, F. J. **Microworld, world of amoeboid organisms**. Kortenhoef, Holanda, 2024. Disponível em: <https://arcella.nl/>. Acesso em: 8 jul. 2024.

SILVA, A. C.; DEZOTTI, M.; SANT'ANNA, G. L. Treatment and Detoxification of a Sanitary Landfill Leachate. **Chemosphere**, v. 55, n. 2, p. 207–214, abr. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2003.10.013>. Acesso em: 7 set. 2021.

SILVERSTEIN, M. R.; SEGRÈ, D.; BHATNAGAR, J. M. Environmental microbiome engineering for the mitigation of climate change. **Global Change Biology**, v. 29, n. 8, p. 2050-2066, jan. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/gcb.16609>. Acesso em: 28 ago. 2024.

SINHA, B., ANNACHHATRE, A. P. Partial nitrification—operational parameters and microorganisms involved. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 6, p. 285–313, out. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11157-006-9116-x>. Acesso em: 19 ago. 2024.

SMITH, V. H.; TILMAN, G. D.; NEKOLA, J. C. Eutrophication: Impacts of Excess Nutrient Inputs on Freshwater, Marine, and Terrestrial Ecosystems. **Environmental Pollution**, v. 100, n. 1–3, p. 179–196, jan. 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(99\)00091-3](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(99)00091-3). Acesso em: 7 set. 2021.

SMYTH, R. P. *et al.* Reducing chimera formation during PCR amplification to ensure accurate genotyping. **Gene**, v. 469, p. 45–51, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2010.08.009>. Acesso em: 22 ago. 2024.

SOBCZYK, M. *et al.* Multivariate analysis of activated sludge community in full-scale wastewater treatment plants. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 3579-3589, jan. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10684-5>. Acesso em: 20 jun. 2024.

SOROKIN, D. Y. *et al.* Nitrification Expanded: Discovery, Physiology and Genomics of a Nitrite-Oxidizing Bacterium from the Phylum *Chloroflexi*. **The ISME Journal**, v. 6, n. 12, p. 2245–2256, dez. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.70>. Acesso em: 13 jan. 2021.

SOROKIN, D. Y. *et al.* *Nitrolancea hollandica* gen. nov., sp. nov., a chemolithoautotrophic nitrite-oxidizing bacterium isolated from a bioreactor belonging to the phylum *Chloroflexi*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. Pt_6, p. 1859–1865, jun. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.062232-0>. Acesso em: 7 jul. 2021.

SPASOV, E. *et al.* High Functional Diversity among *Nitrospira* Populations That Dominate Rotating Biological Contactor Microbial Communities in a Municipal Wastewater Treatment Plant. **The ISME Journal**, v. 14, n. 7, p. 1857–1872, jul. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0650-2>. Acesso em: 9 fev. 2021.

SPIECK, E. *et al.* Extremophilic nitrite-oxidizing *Chloroflexi* from Yellowstone hot springs. **The ISME Journal**, v. 14, n. 2, p. 364-379, fev. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0530-9>. Acesso em: 16 ago. 2024.

SPIECK, E. *et al.* Selective enrichment and molecular characterization of a previously uncultured Nitrospira-like bacterium from activated sludge. **Environmental Microbiology**, v. 8, p. 405–415, fev. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00905.x>. Acesso em: 4 jan. 2025.

SPIECK, E.; WEGEN, S.; KEUTER, S. Relevance of *Candidatus Nitrotoga* for nitrite oxidation in technical nitrogen removal systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, p. 7123–7139, set. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11487-5>. Acesso em: 21 jul. 2022.

STAHL, D. A.; DE LA TORRE, J. R. Physiology and Diversity of Ammonia-Oxidizing Archaea. **Annual Review of Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 83–101, set. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150128>. Acesso em: 26 dez. 2020.

STRAKA, L. L. *et al.* Affinity Informs Environmental Cooperation between Ammonia-Oxidizing Archaea (AOA) and Anaerobic Ammonia-Oxidizing (Anammox) Bacteria. **The ISME Journal**, v. 13, n. 8, p. 1997–2004, ago. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0408-x>. Acesso em: 20 set. 2021.

STROUS, M. *et al.* Missing lithotroph identified as new planctomycete. **Nature**, v. 400, p. 446–449, jul. 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/22749>. Acesso em: 26 ago. 2024.

SU, Q. *et al.* Role of Ammonia Oxidation in Organic Micropollutant Transformation during Wastewater Treatment: Insights from Molecular, Cellular, and Community Level Observations. **Environmental Science & Technology**, v. 55, n. 4, p. 2173–2188, fev. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c06466>. Acesso em: 26 fev. 2021.

SU, Y. *et al.* Rapid enrichment of anammox bacteria and transformation to partial denitrification/anammox with nitrification/denitrification sludge. **Science of The Total Environment**, v. 856, n. 1, p. 158973, jan. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158973>. Acesso em: 26 ago. 2024.

SU, Z. *et al.* Nitrite Oxidation in Wastewater Treatment: Microbial Adaptation and Suppression Challenges. **Environmental Science & Technology**, v. 57, n. 34, p. 12557-12570, ago. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.est.3c00636>. Acesso em: 15 ago. 2024.

SUN, H. *et al.* Response of substrate kinetics and biological mechanisms to various pH constrains for cultured *Nitrobacter* and *Nitrospira* in nitrifying bioreactor. **Journal of Environmental Management**, v. 307, p. 114499, abr. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.114499>. Acesso em: 2 ago. 2022.

SUN, H. *et al.* Understanding the effect of free ammonia on microbial nitrification mechanisms in suspended activated sludge bioreactors. **Environmental Research**, v. 200, p. 111737, set. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111737>. Acesso em: 9 set. 2024.

SUN, J. *et al.* Potential Growth of Anammox Bacteria under Aerobic Conditions. **Environmental Science & Technology**, v. 58, n. 41, p. 18244-18254, out. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.est.4c06413>. Acesso em: 2 out. 2024.

SUN, Y. *et al.* Nitrogen removal performance and changes in microbial community structure of a single-stage partial nitrification-anammox (PNA) process for treating municipal wastewater with an extremely low carbon-to-nitrogen ratio. **Journal of Water Process Engineering**, v. 70, p. 106931, fev. 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2025.106931>. Acesso em: 12 jan. 2025.

TCHOBANOGLIOUS, G.; BURTON, F. L.; STENSEL, H. D. Suspended Growth Biological Treatment Processes. In: _____. **Wastewater Engineering: Treatment and Reuse**. 4th ed. Boston: McGraw-Hill, 2003. p. 661-886.

TENG, C. *et al.* Characterization and Treatment of Landfill Leachate: A Review. **Water Research**, v. 203, p. 117525, set. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117525>. Acesso em: 15 ago. 2021.

TORFS, E. *et al.* Settling Tests. In: VAN LOOSDRECHT, M. C. M. *et al.* (Ed.). **Experimental Methods In Wastewater Treatment**. London: IWA Publishing, 2016. p. 235-262.

TOUFEXI, E. *et al.* Environmental and Human Risk Assessment of Landfill Leachate: An Integrated Approach with the Use of Cytotoxic and Genotoxic Stress Indices in Mussel and Human Cells. **Journal of Hazardous Materials**, v. 260, p. 593–601, set. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.05.054>. Acesso em: 3 set. 2021.

USHIKI, N. *et al.* Nitrite Oxidation Kinetics of Two *Nitrospira* Strains: The Quest for Competition and Ecological Niche Differentiation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 123, n. 5, p. 581–589, maio 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.12.016>. Acesso em: 21 dez. 2020.

VAN KESSEL, M. A. H. J. *et al.* Complete Nitrification by a Single Microorganism. **Nature**, v. 528, n. 7583, p. 555–559, dez. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature16459>. Acesso em: 12 nov. 2020.

VAN NIFTRIK, I.; JETTEN, M. S. Anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: unique microorganisms with exceptional properties. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 76, n. 3, p. 585-596, set. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mmb.05025-11>. Acesso em: 2 out. 2024.

VON SPERLING, M. **Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias**. 3^a ed. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2012. v. 4: Lodos ativados.

VUOLO, J. H. Propagação de erros. In: VUOLO, J. H. **Fundamentos da teoria de erros**. São Paulo: Blucher, 1992.

WANG, F. *et al.* Biological nitrification-based nutrient recovery technologies for source-separated urine treatment: A critical review. **Desalination**, v. 591, p. 118027,

dez. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.desal.2024.118027>. Acesso em: 9 set. 2024.

WANG, F. *et al.* Effect of high-strength ammonia nitrogen acclimation on sludge activity in sequencing batch reactor. **Journal of Environmental Sciences**, v. 22, n. 11, p. 1683-1688, nov. 2010. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(09\)60306-5](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(09)60306-5). Acesso em: 29 ago. 2024.

WANG, H. *et al.* Comparative analysis of energy intensity and carbon emissions in wastewater treatment in USA, Germany, China and South Africa. **Applied Energy**, v. 184, p. 873-881, dez. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.07.061>. Acesso em: 27 ago. 2024.

WANG, J.; QIAO, Z. A comprehensive review of landfill leachate treatment technologies. **Frontiers in Environmental Science**, v. 12, set. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fenvs.2024.1439128>. Acesso em: 29 dez. 2024.

WANG, K. *et al.* Treatment of Landfill Leachate Using Activated Sludge Technology: A Review. **Archaea**, v. 2018, p. 1039453, p. 1-10, set. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2018/1039453>. Acesso em: 16 set. 2021.

WANG, M. *et al.* Newly Designed Primer Pair Revealed Dominant and Diverse Comammox AmoA Gene in Full-Scale Wastewater Treatment Plants. **Bioresource Technology**, v. 270, p. 580–587, dez. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.089>. Acesso em: 21 dez. 2020.

WANG, Y. *et al.* Simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification (SNAD) process for nitrogen and refractory organic compounds removal from mature landfill leachate: Performance and metagenome-based microbial ecology. **Bioresource Technology**, v. 294, p. 122166, dez. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122166>. Acesso em: 17 set. 2024.

WANG, Y. *et al.* Spatial difference in nitrogen removal pathways and microbial functional diversity in an EGSB reactor during the start-up of PD/Anammox. **Science of The Total Environment**, v. 907, p. 168004, jan. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.168004>. Acesso em: 18 jan. 2025.

WANG, Z. *et al.* A 20-Year Journey of Partial Nitritation and Anammox (PN/A): from Sidestream toward Mainstream. **Environmental Science & Technology**, v. 56, n. 12, p. 7522-7531, jun. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c06107>. Acesso em: 12 ago. 2024.

WANG, Z. *et al.* Nitrite Accumulation in Comammox-Dominated Nitrification-Denitrification Reactors: Effects of DO Concentration and Hydroxylamine Addition. **Journal of Hazardous Materials**, v. 384, p. 121375, fev. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121375>. Acesso em: 21 dez. 2020.

WANG, Z. *et al.* Unravelling adaptation of nitrite-oxidizing bacteria in mainstream PN/A process: Mechanisms and counter-strategies. **Water Research**, v. 200, n.

117239, jul. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117239>. Acesso em: 7 mai. 2024.

WATSON, S. W.; WATERBURY, J. B. Characteristics of Two Marine Nitrite Oxidizing Bacteria, *Nitrospina gracilis* nov. gen. nov. sp. and *Nitrococcus mobilis* nov. gen. nov. sp. **Archiv für Mikrobiologie**, v. 77, n. 3, p. 203–230, set. 1971. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00408114>. Acesso em: 6 jan. 2021.

WDOWCZYK, A.; SZYMAŃSKA-PULIKOWSKA, A. Comparison of Landfill Leachate Properties by LPI and Phytotoxicity-A Case Study. **Frontiers in Environmental Science**, v. 9, p. 693112, jun. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fenvs.2021.693112>. Acesso em: 9 set. 2024.

WEGEN, S.; NOWKA, B.; SPIECK, E. Low Temperature and Neutral pH Define “*Candidatus Nitrotoga* sp.” as a Competitive Nitrite Oxidizer in Coculture with *Nitrospira defluvii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85, n. 9, mai. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.02569-18>. Acesso em: 4 out. 2021.

WEI, Y. *et al.* Competitive bio-augmentation overcoming unusual direct inhibitor inefficacy in mainstream nitrite-oxidizing bacteria suppression: Unveiling the underpinnings in microbial and nitrogen metabolism aspects. **Science of The Total Environment**, v. 926, n. 171900, mai. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.171900>. Acesso em: 21 mai. 2024.

WEN, J.; LECHEVALLIER, M. W.; TAO, W. Nitrification Kinetics and Microbial Communities of Activated Sludge as a Full-Scale Membrane Bioreactor Plant Transitioned to Low Dissolved Oxygen Operation. **Journal of Cleaner Production**, v. 252, p. 119872, abr. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119872>. Acesso em: 9 fev. 2021.

WIJEKOON, P. *et al.* Progress and Prospects in Mitigation of Landfill Leachate Pollution: Risk, Pollution Potential, Treatment and Challenges. **Journal of Hazardous Materials**, v. 421, p. 126627, jan. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126627>. Acesso em: 7 set. 2021.

WINKLER, M. K. H. *et al.* Unravelling the Reasons for Disproportion in the Ratio of AOB and NOB in Aerobic Granular Sludge. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, n. 6, p. 1657–1666, jun. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4126-9>. Acesso em: 21 dez. 2020.

WU, L. *et al.* Cooperation between Partial-Nitrification, Complete Ammonia Oxidation (Comammox), and Anaerobic Ammonia Oxidation (Anammox) in Sludge Digestion Liquid for Nitrogen Removal. **Environmental Pollution**, v. 254, p. 112965, 2019a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.112965>. Acesso em: 21 dez. 2020.

WU, L. *et al.* Global diversity and biogeography of bacterial communities in wastewater treatment plants. **Nature Microbiology**, v. 4, p. 1183-1195, 2019b.

Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0426-5>. Acesso em: 16 ago. 2024.

WU, L. *et al.* Nitrogen removal and carbon reduction of mature landfill leachate under extremely low dissolved oxygen conditions by simultaneous partial nitrification anammox and denitrification. **Bioresource Technology**, v. 401, n. 130704, jun. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.130704>. Acesso em: 24 mai. 2024.

WU, Z. C.; LAI, C. Y.; ZHAO, H. P. Salinity acclimation of nitrifying microorganisms: Nitrification performance, microbial community, osmotic adaptation strategies. **Journal of Hazardous Materials Advances**, v. 15, p. 100448, ago. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.hazadv.2024.100448>. Acesso em: 29 ago. 2024.

XIONG, F. *et al.* Global WWTP Microbiome-based Integrative Information Platform: From experience to intelligence. **Environmental Science and Ecotechnology**, v. 20, p. 100370, jul. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ese.2023.100370>. Acesso em: 27 ago. 2024.

XU, D. *et al.* A novel SAD process: Match of anammox and denitrification. **Water Research**, v. 193, p. 116874, abr. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.116874>. Acesso em: 16 set. 2024.

YAN, F. *et al.* Biological denitrification from mature landfill leachate using a food-waste-derived carbon source. **Journal of Environmental Management**, v. 214, p. 184-191, mai. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.03.003>. Acesso em: 18 jan. 2025.

YAN, L. *et al.* Simultaneous nitrification and denitrification by EPSs in aerobic granular sludge enhanced nitrogen removal of ammonium-nitrogen-rich wastewater. **Bioresource Technology**, v. 202, p. 101-106, fev. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.088>. Acesso em: 14 jun. 2024.

YANG, Y. *et al.* Complex Microbial Nitrogen-Cycling Networks in Three Distinct Anammox-Inoculated Wastewater Treatment Systems. **Water Research**, v. 168, p. 115142, jan. 2020a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115142>. Acesso em: 9 fev. 2021.

YANG, Y. *et al.* Activity and Metabolic Versatility of Complete Ammonia Oxidizers in Full-Scale Wastewater Treatment Systems. **mBio**, v. 11, n. 2, abr. 2020b. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mBio.03175-19>. Acesso em: 26 dez. 2020.

YILMAZ, T. *et al.* Impact of aeration on/off duration on the performance of an intermittently aerated MBR treating real textile wastewater. **Journal of Water Process Engineering**, v. 54, n. 103886, ago. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2023.103886>. Acesso em: 20 mai. 2024.

YU, X. *et al.* Municipal solid waste landfills: An underestimated source of PPCPs in the water environment. **Environmental Science & Technology**, v. 54, n. 16, p.

9757–9768, jun. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c00565>. Acesso em: 30 jun. 2020.

ZANONA, V. R. C. M.; BARQUILHA, C. E. R.; BRAGA, M. C. B. Removal of recalcitrant organic matter of landfill leachate by adsorption onto biochar from sewage sludge: A quali-quantitative analysis. **Journal of Environmental Management**, v. 344, p. 118387, out. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.118387>. Acesso em: 19 set. 2024.

ZAYEN, A.; SCHORIES, G.; SAYADI, S. Incorporation of an anaerobic digestion step in a multistage treatment system for sanitary landfill leachate. **Waste Management**, v. 53, p. 32–39, 2016. Disponível em: doi.org/10.1016/j.wasman.2016.04.030. Acesso em: 26 fev. 2020.

ZHANG, D. *et al.* Microbes in Biological Processes for Municipal Landfill Leachate Treatment: Community, Function and Interaction. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 113, p. 88–96, set. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.02.013>. Acesso em: 5 jul. 2020.

ZHANG, F. *et al.* An Innovative Process for Mature Landfill Leachate and Waste Activated Sludge Simultaneous Treatment Based on Partial Nitrification, In Situ Fermentation, and Anammox (PNFA). **Environmental Science & Technology**, v. 56, n. 2, p. 1310-1320, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c06049>. Acesso em: 28 mai. 2024.

ZHANG, M. *et al.* A review of microbial nitrogen transformations and microbiome engineering for biological nitrogen removal under salinity stress. **Chemosphere**, v. 341, p. 139949, nov. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.139949>. Acesso em: 26 ago. 2024.

ZHANG, Y. *et al.* Emerging investigator series: Emerging biotechnologies in wastewater treatment: from biomolecular engineering to multiscale integration. **Environmental Science: Water Research & Technology**, v. 6, p. 1967-1985, jun. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/D0EW00393J>. Acesso em: 7 ago. 2024.

ZHANG, Y. *et al.* The microbial dark matter and “wanted list” in worldwide wastewater treatment plants. **Microbiome**, v. 11, p. 59, mar. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40168-023-01503-3>. Acesso em: 28 ago. 2024.

ZHAO, R. *et al.* Evolution of Nitrogen Species in Landfill Leachates under Various Stabilization States. **Waste Management**, v. 69, p. 225–231, nov. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.07.041>. Acesso em: 31 ago. 2021.

ZHAO, Y. *et al.* The long-term effects of using nitrite and urea on the enrichment of comammox bacteria. **Science of The Total Environment**, v. 755, p. 142580, fev. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142580>. Acesso em: 25 jul. 2022.

ZHAO, Z. *et al.* Abundance and Community Composition of Comammox Bacteria in Different Ecosystems by a Universal Primer Set. **Science of The Total**

Environment, v. 691, p. 146–155, nov. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.131>. Acesso em: 21 dez. 2020.

ZHENG, M. *et al.* Transcriptional Activity and Diversity of Comammox Bacteria as a Previously Overlooked Ammonia Oxidizing Prokaryote in Full-Scale Wastewater Treatment Plants. **Science of The Total Environment**, v. 656, p. 717–722, mar. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.435>. Acesso em: 21 dez. 2020.

ZHENG, M. *et al.* Active Ammonia-Oxidizing Bacteria and Archaea in Wastewater Treatment Systems. **Journal of Environmental Sciences**, v. 102, p. 273–282, abr. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jes.2020.09.039>. Acesso em: 2 mar. 2021.

ZHOU, L. J. *et al.* Biotransformation of Lincomycin and Fluoroquinolone Antibiotics by the Ammonia Oxidizers AOA, AOB and Comammox: A Comparison of Removal, Pathways, and Mechanisms. **Water Research**, v. 196, p. 117003, mai. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117003>. Acesso em: 15 jun. 2021.

ZHOU, X. *et al.* Temperature Influenced the Comammox Community Composition in Drinking Water and Wastewater Treatment Plants. **Microbial Ecology**, mar. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01724-9>. Acesso em: 8 mar. 2021.

ZHOU, Y. *et al.* Deciphering the partial denitrification function of companion bacteria in mixotrophic anammox systems under different carbon/nitrogen ratios. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 11, n. 6, p. 111232, dez. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.111232>. Acesso em: 12 jan. 2025.

ZOLTI, A. *et al.* The microbiome as a biosensor: functional profiles elucidate hidden stress in hosts. **Microbiome**, v. 8, n. 71, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00850-9>. Acesso em: 25 mai. 2020.

ZOU, S. *et al.* Nitrifying biomass can retain its acclimation to 2,4,6-trichlorophenol. **Water Research**, v. 185, p. 116285, out. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116285>. Acesso em: 29 ago. 2024.

ZUO, Z. *et al.* The advantage of a two-stage nitrification method for fertilizer recovery from human urine. **Water Research**, v. 235, n. 119932, mai. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.119932>. Acesso em: 7 mai. 2024.