



ALINE DOS REIS SOUZA

**AVALIAÇÃO DA REMOÇÃO DE NITROGÊNIO
E DA COMUNIDADE MICROBIANA EM
SISTEMAS BIOLÓGICOS PARA O PÓS-
TRATAMENTO DE EFLUENTE DE CANIL**

**LAVRAS - MG
2019**

ALINE DOS REIS SOUZA

**AVALIAÇÃO DA REMOÇÃO DE NITROGÊNIO E DA COMUNIDADE
MICROBIANA EM SISTEMAS BIOLÓGICOS PARA O PÓS-
TRATAMENTO DE EFLUENTE DE CANIL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos em Sistemas Agrícolas, área de concentração em Saneamento Ambiental, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Ronaldo Fia
Orientador

Prof. ^a Dr.^a Luciene Alves Batista Sinicalchi
Coorientadora

**LAVRAS - MG
2019**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Souza, Aline dos Reis.

Avaliação da remoção de nitrogênio e da comunidade microbiana em sistemas biológicos para o pós-tratamento de efluente de canil / Aline dos Reis Souza. - 2019.

204 p. : il.

Orientador(a): Ronaldo Fia.

Coorientador(a): Luciene Alves Batista Siniscalchi.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Desnitrificação. 2. Filtro Biológico Aerado Submerso. 3. Nitrificação. I. Fia, Ronaldo. II. Siniscalchi, Luciene Alves Batista. III. Título.

ALINE DOS REIS SOUZA

**AVALIAÇÃO DA REMOÇÃO DE NITROGÊNIO E DA COMUNIDADE
MICROBIANA EM SISTEMAS BIOLÓGICOS PARA O PÓS-
TRATAMENTO DE EFLUENTE DE CANIL**

**EVALUATION OF NITROGEN REMOVAL AND MICROBIAN
COMMUNITY IN BIOLOGICAL SYSTEMS FOR KENNEL EFFLUENT
POST-TREATMENT**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos em Sistemas Agrícolas, área de concentração em Saneamento Ambiental, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 16 de agosto de 2019.

Dr. ^a Luciene Alves Batista Sinicalchi	UFLA
Dr. ^a Camila Silva Franco	UFLA
Dr. ^a Fátima Resende Luiz Fia	UFLA
Dr. ^a Alyne Duarte Pereira	UFMG

Prof. Dr. Ronaldo Fia
Orientador
Prof.^a Dr.^a Luciene Alves Batista Sinicalchi
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2019**

*Aos meus pais, pelo apoio para que eu continuasse meus estudos.
Dedico*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas oportunidades, pela presença e orientação espiritual em minha vida, o que me ajudou a superar as dificuldades desta etapa.

À UFLA, especialmente ao DRS e ao PPGRHSA, à FAPEMIG, CAPES e CNPQ pela concessão das bolsas e apoio financeiro ao longo do meu doutorado.

Em destaque, aos professores Ronaldo e Luciene, pela confiança, atenção, disposição e paciência, elementos que foram essenciais para a execução do experimento e elaboração deste trabalho. Agradeço pela oportunidade de aprendizagem com ambos, por meio das experiências distintas, que foram complementares para a minha formação. Quero também agradecer pela amizade que construímos ao longo desses anos.

Ao Parque Francisco de Assis, coordenadores e funcionários, por terem me acolhido no período do experimento. Agradeço principalmente à Camila, Agulúcia, Patrícia, Lenilce, Edmar e Paulo, pela colaboração. E, especialmente, pela oportunidade de contribuir e aprender com o admirável trabalho realizado no Parque.

Aos alunos colaboradores do experimento, Caio, Gilmar, Guilherme, Gustavo, Isabelly, Karina, Lara, Larissa, Maria Júlia, Marilane, Wislei, Letícia, Katarina, Giovanna, Ana Beatriz, Layla, Eduardo e Matheus, e aos membros do NEMASA.

À Juliana, técnica dos laboratórios da Engenharia Ambiental, aos técnicos do LAADeg, Marcos e Wesley, ao Isael e Diego do DMA, e aos técnicos da ETA-UFLA, pelo importantíssimo auxílio no desenvolvimento do experimento. Aos professores e colegas do DRS e PPGRHSA, secretária e coordenadores do programa, Luiza, Gilberto e Marcelo.

Ao laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME) do Departamento de Fitopatologia da UFLA e ao laboratório de Microbiologia de Água e Esgoto do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Minas Gerais-DESA/UFMG, especialmente à professora Juliana e à técnica Cíntia.

Aos amigos da UFLA, Jacineumo, Bruna, Jaíza, Lucas e Fernando por compartilhar as alegrias e problemas da vida de pós-graduandos. Agradeço especialmente ao meu namorado Mateus, pelo companheirismo, amor, carinho, e por toda a ajuda, incentivo, paciência, compreensão e apoio no meu doutorado. À minha família, pai Airton, mãe Hortência, pelo incentivo e amor, e, principalmente, à minha irmã Líliam, pelos conselhos.

Por fim, agradeço aos professores membros da banca, Luciene, Camila, Fátima e Alyne.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

A remoção de nitrogênio (N) é limitada em tratamentos anaeróbios, por isso foi necessária a instalação do pós-tratamento, do efluente de cães, na estação de tratamento de efluentes do canil Parque Francisco de Assis (ETE-PFA). Foram inseridos, em série, após o tanque séptico-filtro anaeróbio, um filtro biológico aerado submerso (FBAS), decantadores secundários (DS) e sistemas alagados construídos. Assim, neste trabalho, objetivou-se avaliar a influência do pós-tratamento e do tempo de aeração no FBAS na remoção de N. Foram monitoradas diferentes fases: F1 com 7 horas diárias de aeração ininterruptas, com taxa de aplicação de oxigênio (TAO) de $0,00196 \text{ kg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, F2 com 5 horas diárias de aeração ininterruptas, com TAO de $0,00140 \text{ kg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, e F3 com aeração diária intermitente, a cada 2 horas, com TAO de $0,00336 \text{ kg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Foram coletadas amostras semanais em cada reator, para análises como: demanda química de oxigênio (DQO), nitrogênio total Kjeldahl (NTK), nitrito e nitrato; detecção por *Polymerase chain reaction* (PCR) e quantificação de bactérias oxidadoras de amônia e nitrito (BOA e BON), bactérias desnitrificantes (BD) e microrganismos patogênicos; além da detecção e avaliação de similaridade (PCR/DGGE- *Denaturing gradient gel electrophoresis*) de microrganismos do domínio bactéria. Para inferir sobre o efeito de saturação de oxigênio, foi realizado um experimento em biorreatores (FBAS) de bancada, em triplicata, alimentando-os com efluente e lodo da ETE-PFA, submetidos a aeração constante diária, com TAO de $0,192 \text{ kg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, por três dias. As coletas ocorreram a cada duas horas, durante 10 horas diárias, com determinação de oxigênio dissolvido (OD), nitrito, nitrato, quantificação de BOA e BON. A introdução do pós-tratamento resultou em aumento da remoção de N no ETE-PFA, alcançando eficiências nas três fases, respectivamente, de 21, 17 e 35% de NTK. A F3 apresentou significativa nitrificação, com maiores concentrações de nitrato ($3,0 \text{ mg L}^{-1}$) no FBAS e maiores eficiências de remoção de DQO. A saturação de oxigênio nos biorreatores em escala de bancada (OD: $9,7 \text{ mg L}^{-1}$) não resultou em concentração de nitrato ($2,7 \text{ mg L}^{-1}$) significativamente superior à F3 ($p < 0,05$). Por outro lado, foi verificada maior densidade de BOA ($4,9 \times 10^6 \text{ NMP } 100 \text{ mL}^{-1}$), BON ($3,6 \times 10^6 \text{ NMP } 100 \text{ mL}^{-1}$) e desnitrificantes ($3,1 \times 10^{23} \text{ NMP } 100 \text{ mL}^{-1}$) no FBAS na F3, em comparação com as demais fases avaliadas. Nos biorreatores de bancada foi observada densidade de BOA e de BON ainda maiores ($1,4 \times 10^{12}$ e $9,2 \times 10^{14} \text{ NMP } 100 \text{ mL}^{-1}$), em função da maior TAO. Foram detectadas, com *primers* específicos para cada grupo, BOA, BON (gênero *Nitrobacter*), BD e os patógenos *Giardia* e *Cryptosporidium*, em todas as fases e unidades de tratamento. Com *primer* de domínio bactéria, os gêneros predominantes na F1 foram *Clostridium* e *Bacillus*, com 96% e 93% de similaridade, enquanto nas demais fases foi o gênero

Thauera, com 99% de similaridade, relacionada à desnitrificação. Concluiu-se que o pós-tratamento elevou a capacidade de depuração do efluente e remoção de N por nitrificação e desnitrificação. Recomenda-se que a operação do FBAS seja semelhante à fase F3, condição que permite aliar eficiência e economia energética.

Palavras-chave: Aeração. Desnitrificação. Filtro Biológico Aerado Submerso. Nitrificação. Sistemas Alagados Construídos.

ABSTRACT

Nitrogen removal (N) is limited in anaerobic treatments, reason why it was required to install a post-treatment of dog effluent at the Parque Francisco de Assis Kennel Wasterwater Treatment Plant (PFA-WWTP). After the anaerobic septic-filter tank, were inserted in series, a submerged biological aerated filter (SBAF), secondary decanters (SD) and constructed wetlands. Thus, the objective of this work was to evaluate the influence of post-treatment and aeration time on SBAF on N removal. Different phases were monitored: F1 with 7 uninterrupted daily aeration hours, with oxygen application rate (OAR) of $0,00196 \text{ kg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$; F2 with 5 uninterrupted daily aeration hours, with OAR of $0.00140 \text{ kg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$; and F3 with intermittent daily aeration, every each 2 hours, with OAR of $0.00336 \text{ kg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Weekly samples were collected from the reactors for analyzes such as chemical oxygen demand (COD), total nitrogen Kjeldahl (TNK), nitrite and nitrate; Polymerase chain reaction (PCR) detection and quantification of ammonia and nitrite oxidizing bacteria (AOB and NOB), denitrifying bacteria (DB) and pathogenic microorganisms; besides the detection and similarity assessment (PCR/DGGE- Denaturing gradient gel electrophoresis) bacterium domain. In order to infer the effect of oxygen saturation, an experiment was performed in bench bioreactors (SBAF), in triplicate, feeding them with PFA-WWTP effluent and sludge, submitted to constant daily aeration, with a OAR of $0.192 \text{ kg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, for three days. The collections occurred every two hours for 10 hours daily, with determination of dissolved oxygen (DO), nitrite, nitrate, quantification of AOB and NOB. The introduction post-treatment resulted in N removal in PFA-WWTP, achieving efficiencies in the three phases, respectively, of 21, 17 and 35% of TNK. F3 showed significant nitrification, with higher nitrate concentrations (3.0 mg L^{-1}) in SBAF and higher COD removal efficiencies. Oxygen saturation in bench-scale bioreactors (OD: 9.7 mg L^{-1}) did not result in nitrate concentration (2.7 mg L^{-1}) significantly higher than F3 ($p < 0.05$). However, it was verified a higher density of BOA ($4.9 \times 10^6 \text{ MPN } 100 \text{ mL}^{-1}$), BON ($3.6 \times 10^6 \text{ MPN } 100 \text{ mL}^{-1}$) and denitrifying ($3.1 \times 10^{23} \text{ MPN } 100 \text{ mL}^{-1}$) in SBAF in F3 comparing with the other evaluated phases. In the bench bioreactors, even higher AOB and NOB density (1.4×10^{12} and $9.2 \times 10^{14} \text{ MPN } 100 \text{ mL}^{-1}$) were observed, as a function of higher OAR. AOB, NOB (genus *Nitrobacter*), DB and *Giardia* and *Cryptosporidium* pathogens were detected with specific primers for each group in all phases and treatment units. With primer of bacterial domain, the predominant genera in F1 were *Clostridium* and *Bacillus*, with 96% and 93% similarity, while in the other phases was the genus *Thauera*, with 99% similarity, related to denitrification. It was concluded that the post-treatment increased the capacity of effluent depuration and N removal by nitrification and denitrification. It is recommended

that the operation of SBAF be similar to phase F3, a condition that allows combining efficiency and energy savings.

KEY WORDS: Aeration. Denitrification. Submerged Biological Aerated Filter. Nitrification. Constructed Wetlands.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Conceito de sistema convencional de tratamento de esgotos.....	36
Figura 2 - a) Filtro Biológico Aerado Submerso (FBAS) e b) Sistemas Alagados Construídos da ETE do Parque Francisco de Assis de Lavras-MG.	107
Figura 3 - Diagrama esquemático do sistema de tratamento da água residuária gerada na lavagem das baias dos cães do Parque Francisco de Assis de Lavras-MG, com os pontos de coleta e monitoramento.....	108
Figura 4 - Valores médios e desvio padrão de pH, DQO, DBO, ST, SS, PT e NTK, médias geométricas com desvio padrão de CTerm, das unidades ETE-PFA, nas diferentes fases de aeração.	111
Figura 5 - Valores médios e desvio padrão de nitrito, nitrato e NT no pós- tratamento por (FBAS, DS e SAC), nas diferentes fases de aeração, da ETE-PFA.....	118
Figura 6 - Diagrama esquemático do sistema de tratamento da água residuária gerada na lavagem das baias dos cães do Parque Francisco de Assis de Lavras-MG.....	138
Figura 7 - NMP de BOA, BON, BD, concentração de nitrito e nitrato no FBAS, DS e SAC nas diferentes fases de aeração da ETE-PFA e comparação de diferença estatística entre as fases.....	146
Figura 8 - Gel de DGGE corado com Sybr-Gold contendo fragmento de DNA ribossomal 16S amplificado com primers universais para Bacteria.	153
Figura 9 - Dendrograma baseado no perfil de bandas do DGGE.	154
Figure 10 - Schematic diagram of the laboratory-scale bioreactors representing the trio with effluent from the SBAF (E) and the trio with nitrite- calcium carbonate medium for growth of NOB (M).	176

Figure 11 - Average concentration of ammonia, nitrite, and nitrate in the bioreactor trios with effluent and culture medium.....	184
Figure 12 - Average values of pH, temperature, and dissolved oxygen of the bioreactor trios with effluent and culture medium.....	185
Figure 13 - Correlation matrix between the variables. Sub-index (1) represents the variables of the trio with effluent and (2) represents the trio with culture medium	186
Figure 14 - Images obtained by scanning electron microscopy showing bacterial cells embedded in a polysaccharide matrix. A (2300x, bar – 10 µm) / B (7000x, bar – 2 µm) / C (8500x, bar – 2 µm), D (13730x, bar – 1 µm).....	191
Figure 15 - DGGE gel stained with Sybr-Gold containing a 16S ribosomal DNA fragment amplified with universal primers for bacteria. (La) molecular weight marker (Ladder Express); (1) sludge from the laboratory-scale bioreactors with effluent; (2) sludge from the laboratory-scale bioreactors with culture medium.....	192
Figure 16 - Phylogenetic tree showing gene sequences from excised DGGE bands. Bootstrap values are indicated in the tree. The classified taxa refer to sequences retrieved from the NCBI genBank. <i>Nitrobacter vulgaris</i> was used as outgroup.	194

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo das etapas realizadas nos artigos da tese.....	30
Tabela 2 - Valores médios encontrados na caracterização física, química, bioquímica e microbiológica de águas residuárias provenientes de canis.	33
Tabela 3 - Eficiência de remoção de poluentes de esgoto doméstico por tipo de tratamento.	37
Tabela 4 - Eficiências típicas de remoção de poluentes por processos biológicos.	40
Tabela 5 - Normas e recomendações de projeto de Biofiltros Aerados Submersos (BAS).....	46
Tabela 6 - Concentrações típicas de nitrogênio total (NT) em algumas águas residuárias.....	57
Tabela 7 - Tempo de aeração, período de monitoramento e taxa de aplicação de oxigênio das fases analisadas.....	109
Tabela 8 - Eficiências médias e desvio padrão de remoção de DQO, DBO, ST, SS, PT, NTK e CTerm nos sistemas tratamento anaeróbio A e B (TS-FAN), da ETE-PFA.	114
Tabela 9 - Eficiências médias de remoção de DQO, DBO, ST, SS, PT, NTK, NT; NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ e CTerm no pós-tratamento (FBAS, DS e SAC), da ETE-PFA, nas diferentes fases de aeração.	118
Tabela 10 – Resultados PCR's com primers específicos para <i>Giardia</i> e <i>Cryptosporidium</i> nos diferentes pontos amostrais da estação de tratamento de efluentes do canil.	123
Tabela 11 - Eficiências médias de remoção e desvio padrão de DQO, DBO, ST, SS, PT, NTK, CTerm e NT na ETE-PFA, nas diferentes fases de aeração.	124

Tabela 12 - Tempo de aeração, período de monitoramento e taxa de aplicação de oxigênio no filtro biológico aerado submerso utilizado no tratamento de efluente de canil, nas fases analisadas.....	139
Tabela 13 - Médias geométricas e desvio padrão de BOA, BON e BD no FBAS, DS e SAC nas diferentes fases de aeração da ETE-PFA.	143
Tabela 14 - Médias e desvio padrão de DQO e relação DQO:NT efluente das etapas de tratamento nas diferentes fases de aeração da ETE-PFA.	147
Tabela 15 - Resultados das PCR's com primers específicos para bactérias do ciclo do nitrogênio nos diferentes pontos amostrais da estação de tratamento de efluentes do canil.	152
Tabela 16 - Bandas de DGGE (gel mostrado na Figura 9) associadas ao gene RNAr 16S.	157
Table 17 - Average ammonia, nitrite, and nitrate concentrations measured in the trios of bioreactors with effluent (E) and with culture medium (M) over a three-day sampling period.....	182
Table 18 - Results of PCRs with specific primers for nitrogen cycle bacteria in the effluent (E) and culture medium (M) bioreactor sludge samples.	187
Table 19 - Sequences obtained from the bands with the programs RDP Classifier and Blast.	193

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
%	Por cento
θc	Tempo de retenção celular
A/M	Relação alimento e microrganismo (do inglês, <i>food to microorganism ratio</i>)
Anammox	Oxidação anaeróbia da amônia (do inglês, <i>anaerobic ammonium oxidation</i>)
Atm	Atmosfera
ASE	Área superficial específica
B	Tanque de bombeamento
B1	Filtro biológico aerado submerso fase 1
B2	Filtro biológico aerado submerso fase 2
B3	Filtro biológico aerado submerso fase 3
BAS	Biofiltro aerado submerso
BD	Bactérias desnitrificantes (do inglês, <i>Denitrifying bacteria-DB</i>)
BF	Biofiltro
BLAST	Ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local (do inglês, <i>Basic local alignment search tool</i>)
BOA	Bactérias oxidadoras de amônia (do inglês, <i>ammonia oxidizing bacteria-AOB</i>)
BON	Bactérias oxidadoras de nitrito (do inglês, <i>nitrite oxidizing bacteria-NOB</i>)
BR	Brasil

BRNi	Bactérias redutoras de nitrito
C/N	Relação Carbono/Nitrogênio
Ca.	Candidatus
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CaCO ₃	Carbonato de cálcio
CANON	Remoção completamente autotrófica de amônio até nitrito (do inglês, <i>Completely Autotrophic Nitrogen Removal Over Nitrite</i>)
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CERH	Conselho estadual de recursos hídricos
CN	Controle negativo
CNP	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CNS	Carga de nitrogênio aplicada
CO ₂	Dióxido de carbono
COB	Carga orgânica (do inglês, <i>biological organic load-BOL</i>)
Comammo x	Completa oxidação da amônia (do inglês, <i>complete ammonia oxidation</i>)
CONAMA	Conselho nacional de meio ambiente
COPAM	Conselho de políticas ambientais
COS	Carga orgânica superficial
COV	Carga orgânica volumétrica
CT	Coliformes totais
Cterm	Coliformes termotolerantes
Cu	Cobre
d	Dia
D1	Decantador secundário fase 1
D2	Decantador secundário fase 2
D3	Decantador secundário fase 3
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio (do inglês, <i>Biochemical oxygen</i>

	<i>demand -BOD)</i>
DBO/N	Relação entre Demanda bioquímica de oxigênio e Nitrogênio
DCD	Dicianodiamida
DEMON	Deamonificação (do inglês, <i>Deammonification</i>)
DESA	Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental
DGGE	Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (do inglês, <i>Denaturing gradient gel electrophoresis</i>)
DMA	Departamento de meio ambiente
DMPP	Dimetilpirazol
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DQO	Demanda química de oxigênio (do inglês, <i>chemical oxygen demand-COD</i>)
DQO/N	Relação entre Demanda química de oxigênio e Nitrogênio
DQO/DBO	Relação entre Demanda química de oxigênio e Demanda bioquímica de oxigênio
Dr. ^a	Doutora
Dr.	Doutor
DRS	Departamento de recursos hídricos e saneamento
DS	Decantador secundário (do inglês, <i>Secondary clarifiers-SC</i>)
E	Biorreator com efluente
EHSS	Escoamento horizontal subsuperficial
ES	Escoamento superficial
ETA	Estação de tratamento de água
ETE	Estação de tratamento de efluente (do inglês, <i>Waster water treatment plant-WWTP</i>)
EV	Escoamento vertical
F1	Fase 1
F2	Fase 2

F3	Fase 3
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
FBAS	Filtro biológico aerado submerso (do inglês, <i>Submerged biological aerated filter-SBAF</i>)
FBP	Filtro biológico percolador
FeSO ₄	Sulfato de ferro
FISH	Hibridação in situ fluorescente (do inglês, <i>Fluorescent in situ hybridization</i>)
g	Gramma
h	Hora
h	Altura
H ⁺	Íon H ⁺
H ₂ O	Água
K ₂ HPO ₄	Fosfato dipotássico
kg	Kilograma
km	Quilômetro
KNO ₂	Nitrito de potássio
L	Litro
LADEG	Laboratório de análise de água do departamento de engenharia
LAs	Lodos ativados
LD	Ladder
LME	Laboratório de microscopia eletrônica e análise ultraestrutural
Log	Logarítmicas
m ³	Metro cúbico
M	Biorreator com meio de cultura
M	Molaridade
MEV	Microscopia eletrônica de varredura (do inglês, <i>Scanning electron microscope-SEM</i>)

mg	Miligrama
MG	Minas Gerais
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
Min	Minuto (do inglês, <i>minute</i>)
mL	Mililitro
N	Nitrogênio (do inglês, Nitrogen)
N ₂ O	Óxido nitroso
N ₂	Dinitrogênio (Nitrogênio gasoso)
NA	Nitrogênio amoniacal
Namon	Nitrogênio amoniacal
NaCl	Cloreto de sódio
NaClO	Hipoclorito de sódio
NaClO ₃	Clorato de sódio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato dissódico
NaH ₂ PO ₄	Fosfato monossódico
NAT	Nitrogênio amoniacal total
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica (do inglês, <i>National Center for Biotechnology Information</i>)
NDS	Nitrificação e desnitrificação simultânea (do inglês, <i>Simultaneous nitrification and denitrification-SND</i>)
NEMASA	Núcleo de estudos em microbiologia aplicada ao saneamento ambiental
Ng	Nanograma
NH ₃	Amônia
NH ₄ ⁺	Íon amônio
Nm ₃	Normais metros cúbicos
NMP	Número mais provável (do inglês, <i>Most probable number-MPN</i>)
NO	Óxidos nítricos

NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
N _{org}	Nitrogênio orgânico
NT	Nitrogênio total
NTK	Nitrogênio total Kjeldahl (do inglês, <i>Total Kjeldahl nitrogen-TKN</i>)
O ₂	Oxigênio
OD	Oxigênio Dissolvido (do inglês, <i>dissolved oxygen-DO</i>)
OLAND	Nitrificação e desnitrificação autotrófica limitada pelo oxigênio (do inglês, <i>Oxygen Limited Autotrophic Nitrification Denitrification</i>)
OH	Hidroxila
P	Fósforo
p	p-valor
P	Tanque de passagem
P1A	Ponto de coleta efluente do gradeamento de cima
P1B	Ponto de coleta efluente do gradeamento de baixo
P2A	Ponto de coleta efluente do tanque séptico-filtro anaeróbico de cima
P2B	Ponto de coleta efluente do tanque séptico-filtro anaeróbico de baixo
P3	Ponto de coleta efluente do tanque de bombeamento
P4	Ponto de coleta efluente do filtro biológico aerado submerso
P5	Ponto de coleta efluente do decantador secundário
P6	Ponto de coleta efluente do sistema alagado submerso
PBS	Tampão fosfato-salino (do inglês, <i>Phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês, <i>Polymerase chain reaction</i>)
pH	Potencial hidrogeniônico

PPGRHSA	Programa de pós-graduação em recursos hídricos em sistemas agrícolas
PFA	Parque Francisco de Assis
RDP	Ribossomal database project (do inglês, <i>Projeto de banco de dados ribossomal</i>)
RNA	Ácido ribonucleico
RNAr 16S	Ácido ribonucleico ribossomal 16S
Prof. ^a	Professora
Prof.	Professor
PT	Fósforo total
R	Representativo de um radical orgânico
s	Segundo
S	Sul
S1	Sistemas alagados construídos fase 1
S2	Sistemas alagados construídos fase 2
S3	Sistemas alagados construídos fase 3
SAC	Sistemas alagados construídos (do inglês, <i>Constructed wetlands-CW</i>)
SHARON	Reator em sistema único para elevada remoção de amônio até nitrito (do inglês, <i>Single reactor system for high ammonium removal over nitrite</i>)
SS	Sólidos suspensos
ST	Sólidos totais (do inglês, <i>total solids-TS</i>)
SV	Sólidos voláteis
SVT	Sólidos voláteis totais (do inglês, <i>total volatile solids-TVS</i>)
T	Temperatura
TA	Taxa de aeração
TAH	Taxa de aplicação hidráulica

TAO	Taxa de aplicação de oxigênio (do inglês, <i>Oxygen application rate-OAR</i>)
TAr	Taxa de aplicação de ar
TCMP	Triclorometilpiridina
TDH	Tempo de detenção hidráulica (do inglês, <i>Hydraulic retention time-HRT</i>)
TE	Tampão Tris-EDTA (do inglês, <i>Tris-EDTA buffer</i>)
Tr	Taxa de retrolavagem
TS-FAN	Tanque Séptico-Filtro Anaeróbio
UASB	Reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (do inglês, <i>Upflow anaerobic sludge blanket</i>)
UFLA	Universidade Federal de Lavras
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UPGMA	Grupo de pares não ponderados com médias matemáticas (do inglês, <i>Unweighted pair group with mathematical averages</i>)
V	Volts
W	Oeste
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	27
2	OBJETIVOS.....	31
2.1	OBJETIVO GERAL.....	31
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	32
3.1	Águas residuárias de canil.....	32
3.2	Parque Francisco de Assis (PFA)	34
3.3	Tratamento de águas residuárias	35
3.3.1	Tratamento anaeróbio.....	38
3.3.2	Tratamento aeróbio	39
3.3.2.1	Filtros Biológicos Aerados Submersos (FBAS)	41
3.3.2.1.1	Condições de operação	44
3.3.2.1.2	Tipo de meio suporte	44
3.3.2.1.3	Aeração	47
3.3.2.1.4	Vantagens e desvantagens do uso de FBAS	47
3.3.3	Sistemas Alagados Construídos (SACs).....	48
3.3.3.1	Configurações.....	49
3.3.3.2	Espécies de plantas.....	50
3.3.3.3	Tipo de meio suporte	52
3.3.3.4	Outras variáveis de influência	53
3.4	Importância de remoção de nitrogênio	53
3.5	Remoção biológica de nitrogênio.....	55
3.5.1	Amonificação.....	57
3.5.3	Desnitrificação.....	62
3.5.4	Rota alternativa de remoção biológica de nutrientes	64

3.5.5	Outros mecanismos de remoção de nitrogênio em águas residuárias	65
3.5.6	Fatores de influência na remoção de nitrogênio em biofiltros	66
3.5.7	Fatores de influência na remoção de nitrogênio em SACs	68
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
	REFERÊNCIAS	73
	ARTIGO I – PÓS-TRATAMENTO DE EFLUENTE DE CANIL EM FILTRO BIOLÓGICO AERADO SUBMERSO, COM DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE AERAÇÃO, SEGUIDO POR SISTEMAS ALAGADOS CONSTRUÍDOS PARA REMOÇÃO DE NITROGÊNIO	101
1	INTRODUÇÃO	103
2	MATERIAL E MÉTODOS	105
2.1	Descrição da água residuária e do sistema de tratamento	105
2.2	Fases de aeração e monitoramento do sistema	108
2.3	Análises físicas, químicas e microbiológicas	109
2.4	Extração de DNA e análise molecular por PCR para detecção de Giardia e Cryptosporidium	110
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	111
3.1	Sistema anaeróbio A e B	113
3.2	Pós-tratamento do efluente	117
3.3	Avaliação completa da ETE-PFA	123
4	CONCLUSÕES	125
	REFERÊNCIAS	126
	ARTIGO II - AVALIAÇÃO DA REMOÇÃO DE NITROGÊNIO E DA COMUNIDADE MICROBIANA EM FILTRO BIOLÓGICO AERADO SUBMERSO, COM DIFERENTES FASES DE AERAÇÃO, E SISTEMAS ALAGADOS	

	CONSTRUÍDOS COMO PÓS TRATAMENTO DE EFLUENTE DE CANIL	133
1	INTRODUÇÃO.....	135
2	MATERIAL E MÉTODOS	137
2.1	Sistema de tratamento	137
2.2	Fases de aeração e monitoramento.....	138
2.3	Análises físicas e químicas.....	139
2.4	Análise microbiológica: técnica dos tubos múltiplos	140
2.5	Métodos moleculares para detecção de microrganismos	140
2.5.1	Detecção de microrganismos do ciclo do nitrogênio por PCR..	141
2.5.2	Análise do perfil da comunidade microbiana por PCR/DGGE	141
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	143
3.1	Remoção de nitrogênio	143
3.2	Análises moleculares por PCR e PCR-DGGE.....	152
3.2.1	Detecção por PCR de bactérias nitrificantes, desnitrificantes e Anammox.....	152
3.2.2	Perfil da Comunidade Microbiana por DGGE	153
4	CONCLUSÕES	159
	REFERÊNCIAS.....	160
	ARTICLE III - STUDY OF NITRATATION IN PILOT-SCALE BIOREACTORS FED WITH AN EFFLUENT FROM A SUBMERGED BIOLOGICAL AERATED FILTER USED IN THE TREATMENT OF DOG WASTEWATER	171
1	INTRODUCTION	173
2	MATERIALS AND METHODS	175
2.1	SLUDGE AND EFFLUENT SAMPLING.....	175
2.2	Bioreactor characteristics and operating conditions	175
2.3	Applied biological organic load	176

2.4	Monitoring of laboratory-scale bioreactors.....	177
2.5	Scanning electron microscopy	178
2.6	Quantification of nitrifying bacteria	178
2.7	Molecular methods for detection of microorganisms	179
2.7.1	Nitrogen cycle microorganism detection by PCR	179
2.7.2	Profile of bacterial domain microbial community by PCR-DGG180	
3	RESULTS AND DISCUSSION	181
3.1	Performance evaluation of the laboratory-scale bioreactors	181
3.2	Detection of microorganisms by molecular methods.....	187
3.3	Quantification of nitrifying bacteria	189
3.4	Scanning electron microscopy (SEM)	190
3.5	PCR-DGGE reactor microbial community profile.....	191
4	CONCLUSION	194
	REFERENCES.....	195
5	CONCLUSÃO GERAL.....	203

1 INTRODUÇÃO GERAL

Nas diferentes atividades antrópicas, a água é captada, utilizada nos processos produtivos e/ou de limpeza, como nos criatórios de animais, onde a água residuária é gerada durante as atividades diárias de lavagem das baias, gerando efluentes que apresentam diferentes contaminantes e um alto potencial poluidor. Portanto, torna-se importante que a água residuária passe por diferentes etapas de tratamento, adequando suas características para a disposição final escolhida, de forma a minimizar os impactos ambientais negativos.

As características das águas residuárias geradas em abrigos exclusivos de cães, ainda são pouco conhecidas, porém, apesar da escassez informações disponíveis na literatura, sabe-se que o efluente apresenta elevada de relação demanda química e demanda biológica de oxigênio (DQO/DBO), concentração de nitrogênio (N) superior ao do esgoto sanitário, presença de antibióticos, dentre outros contaminantes emergentes, além de produtos de limpeza (JAWORSKI; HICKLEY, 1962; MAFRA et al., 2013; SOUZA et al., 2018). Nesse sentido, constitui uma água residuária complexa e que requer a passagem por sistemas de tratamento, antes do retorno da água à natureza.

Por exemplo, caso haja o lançamento de águas residuárias ricas em nutrientes, como fósforo e o nitrogênio, que não tiveram o adequado tratamento, pode ocorrer a eutrofização dos cursos d'água. As estações de tratamento de efluentes (ETEs) convencionais, em função do dimensionamento dos reatores, no qual se leva em conta apenas a redução da concentração de matéria orgânica no efluente, e tendo em vista a legislação ainda pouco restritiva, apresentam baixa capacidade de remoção de nutrientes, o que aumenta o risco de ocorrência da eutrofização.

Para se elevar a capacidade de depuração das águas residuárias, torna-se importante o conhecimento do ciclo N. O elemento químico aflui para as ETEs

nas formas orgânica e amoniacal, mantendo praticamente a mesma composição até alcançar o tratamento secundário anaeróbio. Nessa etapa, sofre mineralização e amonificação, restando apenas amônia (NH_3) e o íon amônio (NH_4^+), sem haver, entretanto, redução expressiva da concentração do poluente. A partir deste estado, a remoção efetiva de N ocorre caso o elemento químico seja nitrificado, em meio aeróbio, e desnitrificado, em meio anóxico; ou pela rota alternativa Anammox, de oxidação anaeróbia, e caso haja sorção de algumas das suas formas ionizadas.

A nitrificação ocorre em duas etapas, no tratamento aeróbio, sendo realizada por bactérias oxidadoras de amônia (BOA) e/ou de nitrito (BON) dependentes de fatores como concentração de oxigênio dissolvido (OD), pH e presença de substâncias inibidoras. Já a desnitrificação heterotrófica é influenciada negativamente pela presença de OD e positivamente pela concentração de nitratos e matéria orgânica. Como boa parte da DBO e DQO é removida anteriormente, na linha de tratamento, justifica-se o fato de um grande número de ETEs não alcançar boas eficiências de remoção de N. Deve-se então, se utilizar de sistemas de tratamento que favoreçam a ocorrência de mecanismos eficazes na remoção do poluente, como a alternância de condições redox (redução-oxidação).

Em filtros biológicos aerados submersos (FBAS), por exemplo, dado o crescimento microbiano aderido, organizado em biofilme, forma-se um gradiente de concentração de OD, possibilitando a coexistência de organismos nitrificantes e desnitrificantes no interior de um mesmo reator. Porém, para que haja a nitrificação e desnitrificação simultâneas (NDS) em elevadas taxas, deve-se proporcionar condições propícias, que favoreçam ambos os mecanismos. A menor insuflação de OD ou a aeração intermitente podem fazer com que se alcance o NDS em FBAS.

Ademais, podem-se empregar meios reativos para que ocorra a adsorção de NH_4^+ e NO_3^- , ou utilizar algas e plantas para a absorção dos íons, removendo N, caso de alguns reatores utilizados no tratamento descentralizado de esgotos. Os Sistemas Alagados Construídos (SACs) são exemplos dessas unidades naturais de tratamento que têm sido empregados com sucesso na depuração de diferentes águas residuárias, em função da ocorrência de distintos mecanismos de remoção de poluentes. Na configuração de escoamento horizontal subsuperficial (SAC-EHSS), além da presença de plantas e meio suporte, a condição redox predominante (anóxico) pode favorecer a ocorrência da desnitrificação.

Apesar da existência de tecnologias promissoras, é necessário definir condições adequadas para a operação dos reatores, de forma a propiciar o adequado tratamento, o que é desafiador, sobretudo, para águas residuárias com características pouco conhecidas, como a água residuária de canil.

Na ETE do canil Parque Francisco de Assis (PFA), em Lavras-MG, composta por sistema preliminar (gradeamento), primário (decantador primário) e secundário anaeróbio (fossa-filtro e tanques de estabilização operando como lagoas anaeróbias), foi necessário instalar um pós-tratamento, em função da baixa eficiência do tratamento existente, para atender os padrões de lançamento em cursos d'água. Inseriu-se na linha de tratamento um FBAS, seis tanques como decantadores secundários e três SACs-EHSS cultivados com capim-vetiver, em substituição aos tanques de estabilização.

Além da instalação, foi importante também focar na obtenção de uma condição de operação que aliasse desempenho e economia, sobretudo, em relação ao gasto energético da aeração no FBAS. Assim, foram realizadas avaliações na Estação de Tratamento de Esgoto do Parque Francisco de Assis (ETE-PFA), para aprimoramento do processo de remoção de matéria orgânica e nitrogênio, reduzindo o consumo energético.

Estrutura dos artigos da tese

A tabela a seguir traz um resumo das etapas realizadas na presente tese (TABELA 1).

Tabela 1 - Resumo das etapas realizadas nos artigos da tese.

Artigo	Objeto de estudo	Amostragem	Análises	F1	F2	F3
I	Todas as etapas de tratamento da ETE-PFA	Semanal	pH, ST, SS, DBO, DQO, PT, NTK, NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ , CTerm	TS-FAN, FBAS, DS, SAC		
		Última amostra mensal de cada fase	PCR - <i>Giardia</i> e <i>Cryptosporidium</i>	FBAS, DS, SAC		-
II	Pós-tratamento da ETE-PFA	Semanal	pH, Temperatura, DQO, NTK, NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻	FBAS, DS, SAC		
		Mensal	BOA, BON e BD			
		Última amostra mensal de cada fase	PCR - Anammox, BOA, <i>Nitrobacter</i> , <i>Nitrospira</i> e BD PCR/DGGE - Domínio Bactéria			
III	Experimento com biorreatores (FBAS) de bancada	Uma amostra mensal da F2, cultivada para BON.	MEV	-	FBAS	-
		A cada 2 horas, durante 10 horas consecutivas diárias	pH, OD, NA, NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻			
		Final do experimento	BOA e BON. PCR - BOA, <i>Nitrobacter</i> , <i>Nitrospira</i> e Anammox PCR/DGGE - Domínio Bactéria		-	

Fonte: Da autora (2019).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a remoção de nitrogênio e a comunidade microbiana em sistemas biológicos (FBAS seguido por DS e SACs-EHSS), utilizados para o pós-tratamento de efluente de canil.

2.2 Objetivos específicos

Artigo I: Avaliar o desempenho da ETE-PFA, com o incremento do pós-tratamento aeróbio (FBAS, DS, SACs-EHSS) de tanque séptico-filtro anaeróbio (TS-FAN), em diferentes estratégias de aeração no FBAS, para remoção de nitrogênio e demais poluentes de acordo com a legislação vigente.

Artigo II: Identificar e quantificar os microrganismos envolvidos na remoção dos compostos nitrogenados no pós-tratamento, relacionando-os às variáveis físicas, químicas do processo.

Artigo III: Avaliar a capacidade de nitratação e a diversidade microbiológica em biorreatores em escala laboratorial sob aeração contínua por 24 horas, inoculado com lodo do FBAS e alimentado com efluente anaeróbio da ETE-PFA.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Águas residuárias de canil

Ainda há poucos estudos sobre as características das águas residuárias do canil e o seu tratamento. Na Tabela 2, estão apresentadas informações sobre as principais variáveis físicas, químicas, bioquímicas e microbiológicas de águas residuárias de canil, que podem ser encontradas na literatura.

Pela escassez de informações disponíveis, observa-se ser uma água residuária com elevada concentração de sólidos, ainda que tenham sido obtidas após a lavagem de baias que tiveram as fezes raspadas (JAWORSKI; HICKLEY, 1962; SOUZA et al., 2018). Também se apresenta como um efluente com elevada relação DQO/DBO, possivelmente pela presença dos pelos ou pela inibição da ação microbiana pela presença de antibióticos e produtos de limpeza (SOUZA et al., 2018; WU et al., 2016). No entanto, estas características não impedem de o efluente apresentar biodegradabilidade aeróbia (SOUZA et al., 2015).

Tabela 2 - Valores médios encontrados na caracterização física, química, bioquímica e microbiológica de águas residuárias provenientes de canis.

Variáveis	Jaworski e Hickey (1962)	Mafra et al. (2015)	Souza et al. (2018)
DBO (mg L ⁻¹)	660	595	189
DQO (mg L ⁻¹)	-	379	612
Sólidos Totais (ST) (mg L ⁻¹)	1.360	-	926
Sólidos Voláteis (SV) (mg L ⁻¹)	1.230	-	-
Sólidos Suspensos (SS) (mg L ⁻¹)	-	-	313
Detergente (mg L ⁻¹)	-	0,3	4,4
Fósforo Total (PT) (mg L ⁻¹)	-	1,2	165
Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK) (mg L ⁻¹)	-	-	94
Cu (µg L ⁻¹)	-	-	50
Zn (µg L ⁻¹)	-	-	53
pH	-	7,6	7,2
Coliformes Totais (CT) (NMP 100 mL ⁻¹)	-	-	2,34 x 10 ¹²
Coliformes Termotolerantes (CF) (NMP 100 mL ⁻¹)	-	-	1,84 x 10 ¹²

Fonte: Adaptado de Jaworski e Hickey (1962) e Souza et al. (2018).

As concentrações de N e P são superiores aos encontrados tipicamente em esgotos sanitários, porém, inferiores aos reportados para águas residuárias para criatórios de outros animais como suínos e bovinos (VON SPERLING, 2014; MATOS; MATOS, 2017). Em relação a presença de organismos patogênicos, uma preocupação de alguns autores, como Giangaspero et al. (2007), estes aparentemente estão em maior presença do que em outras águas residuárias, tendo como base o número mais provável (NMP) de coliformes termotolerantes, indicadores de contaminação fecal (SOUZA et al., 2018).

3.2 Parque Francisco de Assis (PFA)

Localizado em Lavras, Minas Gerais, o Parque Francisco de Assis (PFA) é uma instituição que acolhe e abriga cães abandonados. Atualmente, o canil possui entre as diversas baias, cerca de 450 cães.

Além dos recintos abrigo dos cães saudáveis, o PFA é dotado de enfermarias, casa de cura, depósito de ração, almoxarifado, farmácia, sala de cirurgia, ambulatório, sala de expurgo, cozinha dos animais, sala de banho e tosa, lavanderia, rouparia, banheiros e refeitório para voluntários e funcionários.

A água residuária do canil caracterizada por Mafra et al. (2015), Souza (2015), Souza et al. (2018) e Souza et al. (2019) é gerada na limpeza das baias. Diariamente, a instalação tem as fezes raspadas, havendo complementação da limpeza, utilizando-se água e água sanitária (NaClO), para higienização. Dessa forma, não há contribuição direta das enfermarias no esgoto produzido. No entanto, resíduos dos medicamentos ainda podem estar presentes nas excretas, além da presença de produtos de limpeza, que poderiam interferir no tratamento secundário.

Na antiga configuração do tratamento de efluentes (ETE-PFA), o esgoto escoava para o sistema preliminar, composto por grades, tratamento primário, havendo um decantador primário, e sistema secundário, representado por fossas sépticas, filtros anaeróbios e tanques de estabilização. Em função do baixo TDH e da elevada carga orgânica aplicada, os tanques utilizados como lagoas de estabilização, funcionavam como unidades anaeróbias. Conseqüentemente, a ETE-PFA possuía apenas etapas de tratamento secundário anaeróbio, não alcançando eficiência suficiente para lançamento no curso d'água (SOUZA et al., 2018).

Assim, tornou-se necessário realizar o pós-tratamento aeróbio para complementar, principalmente, as remoções de DQO e N, permitindo a ETE-

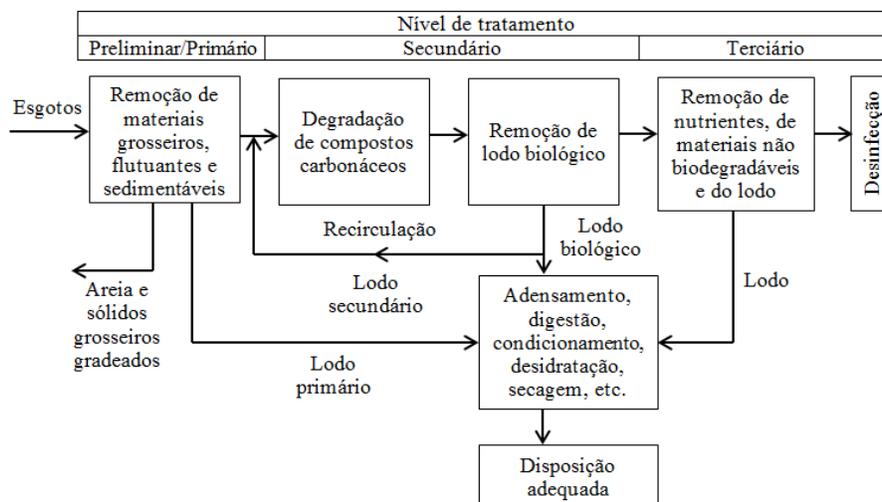
PFA atender aos padrões para lançamento. De forma a atender o objetivo, reduzindo os impactos ambientais no Ribeirão do Camarão, foram instalados um FBAS, seis decantadores secundários, para retenção da biomassa desprendida do FBAS; e três SACs-EHSS cultivados com capim-vetiver e preenchidos com brita, em substituição aos nove tanques de estabilização.

3.3 Tratamento de águas residuárias

Durante os processos de produção e limpeza em residências, indústrias e estabelecimentos comerciais, a água captada tem sua qualidade alterada, não servindo mais ao propósito inicial e não podendo retornar à natureza, pois apresenta elevada quantidade de contaminantes (MALIK et al., 2015). Para realizar o lançamento no curso d'água, opção ainda mais escolhida para disposição final das águas residuárias, deve-se atender aos padrões estabelecidos na legislação, previstas nas Resoluções do CONAMA n°357 e n°430 (BRASIL, 2005; 2011); e no caso de Minas Gerais, na Deliberação Normativa Conjunta COPAM/CERH n°01 (MINAS GERAIS, 2008).

Durante a passagem da água residuária por uma ETE, esta é submetida a algumas etapas de tratamento, visando facilitar as etapas subsequentes e reduzir os níveis dos contaminantes presentes. Na Figura 1, está apresentado um esquema da composição de uma ETE convencional.

Figura 1 - Conceito de sistema convencional de tratamento de esgotos.



Fonte: Adaptado de Andrade Neto e Campos (1999).

O tratamento preliminar consiste na utilização de grades, peneiras, desarenadores e caixas de gordura, objetivando a diminuição da concentração de sólidos grosseiros, areia e óleos e graxas, que poderiam causar desgaste e entupimento de tubulações e bombas, além da redução da eficiência do tratamento biológico (METCALF; EDDY, 2017; PRADO; CAMPOS, 2008; VON SPERLING, 2014; CHERNICHARO et al., 2015).

Tanques flocculadores, decantadores primários, flotadores, sedimentadores e filtros, podem ser utilizados durante a etapa de tratamento primário, na qual ocorre a separação, por gravidade, dos sólidos suspensos sedimentáveis. No entanto, em muitas das ETEs, estas unidades não estão presentes, sendo o papel, exercido pelos reatores anaeróbios, substituição que ainda permite o adensamento e a digestão do lodo, dispensando algumas etapas do tratamento do lodo primário (TOPARE; ATTAR; MANFE, 2011; FERNANDES; ANDREOLI; VON SPERLING, 2014).

O tratamento secundário ou biológico visa a reprodução, em condições controladas em reatores, dos processos que ocorrem na natureza como a degradação da matéria orgânica, na presença (aeróbio) ou ausência de oxigênio (anaeróbio), a assimilação de nutrientes por bactérias e algas, e a absorção por plantas. Nesta etapa, são removidos principalmente sólidos suspensos (SS) não removidos anteriormente, sólidos dissolvidos (SD), com redução da demanda bioquímica de oxigênio (DBO), e em menor proporção, nutrientes, como nitrogênio (N) e Fósforo (P) (VON SPERLING, 2014; JORDÃO; PESSOA, 2017). Na Tabela 3 estão apresentadas algumas eficiências típicas por etapa de tratamento de esgotos domésticos.

Tabela 3 - Eficiência de remoção de poluentes de esgoto doméstico por tipo de tratamento.

Tipo de tratamento	Remoção de DBO (%)	Remoção SS (%)	Remoção de nutrientes (%)	Remoção de bactérias (%)
Preliminar	5-10	5-20	Não remove	10-20
Primário	25-50	40-70	Não remove	25-75
Secundário	80-95	65-95	Pode remover	70-99
Terciário	40-99	80-99	≤ 99	≤ 99,9

Fonte: Jordão e Pessoa (2017).

Para complementar as remoções, visando reduzir as concentrações e a presença de nutrientes, organismos patogênicos, metais pesados e compostos orgânicos de preocupação emergente, como os desreguladores endócrinos e os microplásticos, a água residuária deve passar pelo tratamento terciário, que envolve processos mais complexos (PERÉZ-GONZÁLEZ et al., 2012; LUO et al., 2014; RENU; AGARWAL; SINGH, 2017). Por esta razão, são menos encontrados nas ETEs no Brasil, onde o objetivo é ainda elevar os níveis de remoção de DBO.

Segundo dados do Atlas de Saneamento, 5,5 mil toneladas de DBO (60,5% do valor presente nos esgotos sanitários) ainda são despejados em cursos

d'água diariamente, em função da inexistência de tratamento, de etapas insuficientes ou de estações operando inadequadamente. Cerca de 12 milhões de habitantes ainda têm o seu esgoto tratado apenas em etapa primária ou submetido ao tratamento biológico anaeróbio (BRASIL, 2017), o que é insuficiente para remoção de nutrientes e outros compostos antes do lançamento no curso d'água.

3.3.1 Tratamento anaeróbio

Os reatores anaeróbios têm sido largamente utilizados em ETEs em função de serem compactos e apresentarem menor geração de lodo, produção de biogás e, além disso, há possibilidade de se evitar algumas etapas no tratamento do resíduo sólido gerado (CHERNICHARO, 2007; GOUVEIA et al., 2015; ROSA et al., 2017). Como inconvenientes do seu emprego, entanto, pode-se citar a baixa remoção de nutrientes, havendo necessidade de se instalar um pós-tratamento aeróbio, além da possível liberação de odores e o longo tempo de partida do reator (CHERNICHARO, 2006; CHERNICHARO et al., 2015; GOUVEIA et al., 2015).

Para se alcançar o padrão para lançamento em corpos receptores, por exemplo, pode-se utilizar lagoas de estabilização (com zonas aeróbias), filtros biológicos, sistemas alagados construídos, lodos ativados, rampas de escoamento, dentre outros. A combinação entre sistemas anaeróbios e aeróbios é vantajosa, já que permite reduzir a demanda de área, consumo energético e a produção de lodo, que pode sofrer adensamento e digestão na própria linha de tratamento de efluentes líquidos (CHERNICHARO et al., 2006; KASSAB et al., 2010; KHAN et al., 2011; FERNANDES; ANDREOLI; VON SPERLING, 2014).

No processo anaeróbio, que ocorre em ausência de oxigênio, a matéria orgânica digerida é convertida em energia, água, carbono inorgânico (CH₄ e CO₂) e outros gases, em etapas de hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese, por ação e interação de diversos microrganismos, dentre estes, bactérias fermentativas e arqueias metanogênicas (CHERNICHARO et al., 2006; MEEGODA et al., 2014). Em relação aos nutrientes, como N e P, estes são mineralizados no interior das unidades, gerando efluentes ricos nestes elementos químicos em sua forma inorgânica (EL-SHAFAI et al., 2007; STAZI; TOMEI, 2018).

Como exemplo de reatores anaeróbios, cita-se os reatores *Upflow Anaerobic Sludge Blanket* (UASB), lagoas anaeróbias, fossas sépticas e filtros anaeróbios, sendo que os dois últimos se destacam como alternativas de baixo custo para regiões carentes de saneamento e para o tratamento descentralizado (CHERNICHARO, 2006; LOPES; RIBEIRO; TERAN, 2009).

3.3.2 Tratamento aeróbio

Mais eficiente e menos sensível às condições de operação das ETEs, o tratamento aeróbio é recomendado em um sistema de tratamento de águas residuárias, caso a destinação final desejada seja o lançamento no corpo receptor (JOURJON et al., 2001; CAVALCANTE et al., 2010; VON SPERLING, 2014). Na Tabela 4 estão apresentadas, comparativamente, as eficiências típicas de remoção de diferentes poluentes quando são utilizados apenas reatores anaeróbios e quando se conjuga com reatores aeróbios, elevando a capacidade de depuração. Dessa forma, o tratamento de águas residuárias em processos sequenciais anaeróbio-aeróbios permite explorar as vantagens dos dois sistemas (KASSAB et al., 2010).

A microbiota aeróbia cresce em taxa mais acelerada e é mais efetiva na remoção de poluentes, o metabolismo destes microrganismos também é dependente de alguns fatores. Em condições de elevadas temperaturas (até a temperatura ótima), em pH próximo à neutralidade e em concentrações suficientes de OD, a ação de degradação da matéria orgânica e de conversão de outros poluentes é mais ativa (NITTAMI et al., 2011; MATOS et al., 2014; GE et al., 2015).

Tabela 4 - Eficiências típicas de remoção de poluentes por processos biológicos.

Sistema	DBO (%)	DQO (%)	SS (%)	N total (%)	P total (%)	CTerm (NMP 100 mL ⁻¹)
Fossa séptica	30-35	25-35	55-65	<30	<35	<1
Fossa séptica + Filtro anaeróbio	80-85	70-80	80-90	<60	<35	1-2
UASB	60-75	55-70	65-80	<60	<35	≈1
UASB + lodos ativados	83-93	75-88	87-93	<60	<35	1-2
UASB + biofiltros aerado	83-93	75-88	87-93	<60	<35	1-2
Sistemas Alagados Construídos	80-90	75-85	87-93	<60	<35	3-4

Fonte: Adaptado de Von Sperling (2014).

Os reatores aeróbios empregados no tratamento de águas residuárias podem ser divididos em sistemas naturais e mecanizados e de crescimento microbiano aderido ou disperso. Os primeiros se caracterizam pela simplicidade operacional, baixo custo e maiores requisitos de área, podendo citar como exemplos, as lagoas facultativas, rampas de escoamento superficial e sistemas alagados construídos, sendo indicados para soluções descentralizadas, em localidades carentes de saneamento.

Por outro lado, para cidades maiores, e para possibilitar a redução da área requerida, deve-se utilizar de reatores classificados como mecanizados, que

requerem introdução de tecnologia, tal qual os filtros biológicos percoladores, biofiltros aerados submersos, lodos ativados, lagoas facultativas aeradas, lagoas aeradas de mistura completa e biodiscos. Como desvantagens, tem-se o requerimento de pessoal especializado e maiores custos de construção e operação (energia e tratamento do lodo) (WILDERER; SCHREFF, 2000; MASSOUD; TARHINI; NASR, 2009; MAHMOOD et al., 2013; VON SPERLING; SALAZAR, 2013; RUSSELL, 2014).

Além do tempo em que a água residuária permanece no reator, denominado tempo de detenção hidráulica (TDH), também é importante o período que a microbiota é mantida em contato com o substrato a ser transformado. Esse tempo é denominado tempo de retenção celular (θ_c), sendo utilizadas diferentes estratégias para se elevar o θ_c sem ter que mexer nas dimensões dos reatores.

Em sistemas de mistura completa com crescimento disperso, por exemplo, é necessário realizar a recirculação do lodo para se ter $\theta_c > TDH$, ao passo que a introdução de meio suporte permite que haja a retenção da biomassa que cresce aderida. No entanto, há custos para aquisição do meio suporte, e os espaços porosos entre o material de preenchimento dos reatores estão sujeitos à colmatação. Como exemplos de reatores de crescimento disperso, é possível citar as lagoas de estabilização, fossas sépticas e lodos ativados, enquanto sistemas alagados construídos, filtros biológicos, biofiltros e biodiscos são unidades de crescimento aderido (LOUPASAKI; DIAMADOPOULOS, 2013; VON SPERLING, 2016; JORDÃO; PESSOA, 2017).

3.3.2.1 Filtros Biológicos Aerados Submersos (FBAS)

O FBAS é caracterizado com um reator mecanizado e de crescimento aderido, e pode ser considerado uma combinação de concepções dos filtros

biológicos percoladores (FBP) e dos lodos ativados (LAs). É preenchido com meio suporte (filtro), no qual cresce a biomassa, e por onde escoam o líquido em tratamento, e o ar. Porém, diferentemente do FBP e, tal qual os LAs, a aeração é realizada artificialmente, com a utilização de difusores (GONÇALVES et al., 2001; METCALF; EDDY, 2003).

A introdução de O₂ permite que haja menor dependência de fatores ambientais, favorecendo maior eficiência e menor demanda de área. Por outro lado, implica em maiores gastos com energia elétrica (RYU et al., 2008; VON SPERLING, 2014; CHEN et al., 2019). Assim, é importante fazer uma avaliação das melhores condições de operação para poder aliar bom desempenho e economia no tratamento de águas residuárias. Tagliatti (2019), por exemplo, observou ser possível reduzir em 50% o consumo energético da ETE da Universidade Federal de Lavras (UFLA), sem implicar em redução das remoções de matéria orgânica, além de elevar as remoções de nitrogênio total. De forma semelhante, Ratanatamskul e Kongwong (2017) encontraram maiores eficiências de remoção de nutrientes em ciclos intermitentes de aeração, tendo 30 minutos com aerador ligado e 90 minutos desligado.

Outra variável de grande importância na operação dos FBAS é o meio suporte, que serve tanto para a retenção de SS quanto para aderência da biomassa. Segundo Kato et al. (1999), este é o principal mecanismo de imobilização das células microbianas, porém, não é o único, já que também ocorre a agregação e aderência entre as próprias células microbianas, havendo formação de grânulos e flocos no interior do reator.

Assim, à medida que a água residuária passa pelo FBAS, a matéria orgânica é degradada com a utilização de oxigênio, gerando energia para crescimento e reprodução de microrganismos heterotróficos, que crescem aderidos ao meio suporte ou nos interstícios dos espaços porosos. Ao mesmo tempo, outros substratos vão sendo disponibilizados e passam a ser utilizados

por diferentes microrganismos, permitindo haver coexistência de uma grande diversidade de organismos organizados em biofilmes (GOMÉZ-SILVÁN et al., 2010; GAO et al., 2012a; CYDIZK-KWIATKOWSKA; ZIELINSKAL, 2016). Conseqüentemente, diferentes poluentes podem ser removidos em BFAS, como matéria orgânica, sólidos, nitrogênio, compostos orgânicos emergentes, dentre outros (GONÇALVES; ARAÚJO; CHERNICHARO, 1998; HE et al., 2013; LI et al., 2013; ZHANG et al., 2015; PRIYA; PHILIP, 2015; TAO et al., 2016).

Com o tempo de operação, há maior desenvolvimento da biomassa, aumentando a espessura do biofilme, podendo haver ao mesmo tempo, condições anaeróbias, anóxicas e aeróbias, com a redução da porosidade do filtro (HWANG; WENG, 2017). Conseqüentemente, sólidos suspensos vão sendo adsorvidos ou filtrados, e as eficiências de remoção de poluentes tendem a aumentar.

No entanto, o crescimento excessivo de biomassa também implica em prejuízos, pois aumenta a perda de carga, podendo implicar em colapso do sistema (colmatação) (XU et al., 2013; GOSTOMSKI; VELA, 2018). Além disso, uma elevada espessura do biofilme, não necessariamente implica em elevada eficiência, pois apenas parte da biomassa pode estar ativa (GONÇALVES et al., 2001; LIAO et al., 2015). Com o objetivo de manter o FBAS eficiente e reduzir os impactos da biocolmatação, pode se utilizar de algumas estratégias operacionais como a alteração das taxas de aplicação hidráulica (TAH) e de aeração (TA), já que a passagem do líquido e das bolhas de ar causam erosão do biofilme. Outra possibilidade é a utilização da retrolavagem do BFAS preenchidos com material granular, havendo melhor controle da biomassa (ALBUQUERQUE; MAKINIA; PAGILLA, 2012).

Como discutido, as eficiências de remoção dos BFAS dependem das condições construtivas de operação e manutenção.

3.3.2.1.1 Condições de operação

Além da aeração, outro aspecto que diferencia os FBAS e os FBP é o sentido de escoamento do líquido em tratamento. Enquanto nos últimos, a água residuária tem entrada na parte superior e coleta na extremidade inferior, nos biofiltros pode haver configurações tanto com escoamento descendente quanto ascendente (ESPINOZA; STENPHENSON, 1999; MUDLIAR et al., 2010). Como a introdução de ar é sempre no sentido ascendente, cria-se condições de escoamento de co-corrente (ar e água residuária no mesmo sentido) e contra-corrente (ar e água residuária em sentidos opostos de escoamento). Gonçalves et al. (2001) elencam as vantagens e desvantagens das duas variantes, porém, resumidamente, pode-se citar que a configuração co-corrente fornece ar na região onde há maior demanda, enquanto a contra-corrente tem menor risco de colmatação dos difusores.

Como todo reator de tratamento de águas residuárias, o TDH, as cargas orgânicas volumétricas aplicadas (COV), as características da água residuária e o tipo de pré-tratamento também influenciam no desempenho do FBAS (GONÇALVES; ARAÚJO; CHERNICHARO, 1998; FARABEGOLI; CHIAVOLA; ROLLE, 2009; LI et al., 2010; SATRIA et al., 2018).

3.3.2.1.2 Tipo de meio suporte

Os FBAS são considerados reatores trifásicos, já que a água residuária representa a fase líquida; e o ar insuflado, a fase gasosa; enquanto a fase sólida é representada pela biomassa formada e pelo meio suporte de preenchimento das unidades (GONÇALVES et al., 2001). Para serem adequados ao uso em biofiltros, o meio suporte deve ser resistente a atritos, quimicamente estável, apresentar elevada área superficial e baixa massa específica (KENT;

FITZPATRICK; WILLIAMS, 1996). Apesar de poderem ser utilizadas pedra (brita n°4 ou pedra de mão) como material suporte (GIUSTINA; MIRANDA; MONTEGGIA, 2010). A escolha do tipo de meio suporte é de grande importância, pois, pode proporcionar maior área superficial específica para aderência dos microrganismos; criação de interfaces anaeróbias e aeróbias; serem reativas propiciando precipitação ou aumento do pH, elevando as eficiências de remoção (LI et al., 2010; AHAMMAD et al., 2013; MAGRI et al., 2013). A adoção de materiais finos ou sintéticos, sabidamente de maior área superficial específica, pode ser mais eficiente (GIUSTINA; MIRANDA; MONTEGGIA, 2010), no entanto, também podem encarecer a construção de um FBAS (FARABEGOLI; CHIAVOLA; ROLLE, 2009; YIN; YAN; GU, 2017). Já materiais reativos podem sofrer maior desgaste contribuindo para colmatação precoce do filtro (MATOS et al., 2017a).

Como meio suportes já foram avaliados brita, escória de alto forno, materiais plásticos, cerâmicos e esponjosos, conchas de ostras, argilas expandidas, bambu, carvão granular, argila calcinada, areia e zeólitas, propiciando bom desempenho na remoção de poluentes (ESPINOZA; STENPHENSON, 1999; GONÇALVES et al., 2001; OSORIO; HONTORIA, 2002; HE; XUE; KONG, 2007; LI et al., 2010; GAO et al., 2012a; AHAMMAD et al., 2013; HWANG; WENG, 2017).

Porém, o tipo de meio escolhido também interfere em outros aspectos na concepção da ETE. Quando se utiliza materiais plásticos e pedregulhos se faz necessário a presença de decantadores secundários para remoção dos sólidos desprendidos dos filtros. Por outro lado, é dispensado o emprego de decantadores após biofiltros preenchidos com materiais finos (GIUSTINA; MIRANDA; MONTEGGIA, 2010). Para alguns autores, tem-se assim, dois tipos de FBAS, os primeiros denominados biofiltros aerados submersos (BAS) de leito estruturado (ou randômico) ou filtros biológicos aerados submersos

(FBAS), e os BAS de leito granular ou simplesmente biofiltros (BF) (GONÇALVES et al., 2001).

Na literatura, entretanto, comumente, não é respeitada a classificação dos FBAS, sendo utilizado indiscriminadamente o termo biofiltro aerado submerso, ou ainda se denomina como filtros biológicos percoladores com aeração (WIK, 2003; FOCO; LOPES; NOUR, 2015).

Na Tabela 5 estão apresentadas algumas recomendações e normas de projeto para operação de FBAS, com a apresentação das diferenças entre os biofiltros de leito granular e de leito estruturado ou randômico.

Tabela 5 - Normas e recomendações de projeto de Biofiltros Aerados Submersos (BAS).

Sistema	BAS ou FBAS	BAS ou BF
Escoamento	Descedente ou ascendente	Descedente ou ascendente
Decantador secundário	Sim	Não
ASE do meio suporte utilizado ($m^2 m^{-3}$)	≤ 250	≥ 350
COV ($kg m^{-3} d^{-1}$ de DBO)	$\leq 1,8$	$\leq 4,0$
COS ($g m^{-2} d^{-1}$ de DBO)	≤ 15	≤ 15
CNS ($g m^{-2} d^{-1}$ de DBO)	≤ 1	-
h (m)	$\geq 1,6$	$\geq 1,6$
TAr ($Nm^3 kg^{-1}$ DBO aplicada)	≥ 30	≥ 30
Retrolavagem	Não	≤ 24 h $T_r \geq 600 m^3 m^{-2} d^{-1}$

Legenda: Filtro Aerado Submerso (FAS); Filtro Biológico Aerado Submerso (FBAS); Biofiltro Aerado Submerso (BAS); Biofiltros (BF); Decantador Secundário (DS); Área superficial específica (ASE); é a Carga orgânica volumétrica (COV); Carga orgânica superficial (COS) (referente à superfície específica do meio suporte); Carga de nitrogênio aplicada superficialmente (CNS) (referente à superfície específica do meio suporte); Altura (h); Taxa de aplicação de ar (TAr); Normais metros cúbicos (Nm^3), vazão de ar corrigida para temperatura de 0 °C, 1 atm de pressão e 0% de umidade relativa; Taxa de retrolavagem (T_r).

Fonte: Gonçalves et al. (2001) e NBR 12209 (ABNT, 2011).

3.3.2.1.3 Aeração

A importância da aeração está no fornecimento de oxigênio para que os organismos aeróbios possam realizar o seu metabolismo; no controle da biomassa ativa e; no contato do substrato com os microrganismos em função da turbulência criada (RUSTEN, 1984; VON SPERLING, 2016).

Se por um lado, o maior fornecimento de oxigênio pode implicar em aumento da efetividade da redução da DBO e DQO, e do potencial de nitrificação (GARCÍA-RUIZ et al., 2018), por outro, também pode causar excessivo cisalhamento da biomassa e reduzir a capacidade de desnitrificação do reator (RAY; HENSHAW; BISWAS, 2012). Assim, deve-se avaliar as condições ótimas de aeração, com o foco no desempenho e na redução dos gastos com energia elétrica.

3.3.2.1.4 Vantagens e desvantagens do uso de FBAS

As principais vantagens da utilização de biofiltros se referem a alta concentração de biomassa ativa; alta idade do lodo (elevado θ_c); à pequena produção de lodo; elevada resistência aos choques de carga (hidráulica e de carga orgânica) e de mudanças de temperatura; eficiências de remoção compatíveis a de lodos ativados, porém, com menores gastos energéticos; menor risco de exalação de odores; aspecto modular; baixo requerimento de área, dentre outros (GONÇALVES; ARAÚJO; CHERNICHARO, 1998; GONÇALVES et al., 2001; GIUSTINA; MIRANDA; MONTEGGIA, 2010; CABRERA; RAMÍREZ; CANTERO, 2011; PRAMANIAK et al., 2012; AHAMMAD et al., 2013).

Como desvantagens do seu emprego, no entanto, pode-se citar a operação mais complexa, na qual se deve controlar a entrada de ar, o risco de

colmatação, os custos com energia para aquisição e substituição e/ou lavagem do meio suporte, dentre outros (MUDLIAR et al., 2010; CABRERA; RAMÍREZ; CANTERO, 2011; KUMAR et al., 2011).

3.3.3 Sistemas Alagados Construídos (SACs)

Os SACs são reatores essencialmente naturais e de crescimento microbiano aderido, e têm sido alvo de muitas pesquisas no intuito de se realizar o polimento de águas residuárias antes do seu lançamento no curso d'água. O interesse pela tecnologia se deve a algumas vantagens como a simplicidade de construção, operação e manutenção; as elevadas eficiências de remoção; a produção de massa vegetal que pode apresentar valor econômico; a possibilidade de compor harmonia paisagística em uma unidade de tratamento; a redução de poluição do ar e a conservação de recursos naturais; o baixo requisito energético e de geração de lodo; e a grande flexibilidade operacional (KADLEC; WALLACE, 2009; FIA et al., 2010; SAEED; SUN, 2012; PRATA et al., 2013; AVELLÁN; GREMILLION, 2019; SILVA; MATOS; MATOS, 2019).

Os SACs são constituídos por unidades impermeabilizadas, saturadas, preenchidas com meio suporte e com a presença de plantas, condições que permitem que haja uma grande diversidade microbiana (ADRADOS et al., 2014; ANSOLA; ARROYO; MIERA, 2014; MATOS; MATOS, 2017). Justamente a complexa interação entre microrganismos, meio suporte, e as plantas, é que permite que haja diferentes mecanismos de remoção, favorecendo o grande potencial de depuração de águas residuárias pelas unidades.

Por filtração e adsorção no meio suporte ou na zona de raízes; absorção pelas plantas; assimilação e degradação microbiana; precipitação; liberação de fitoalexinas por plantas e sedimentação, ocorrem elevadas eficiências de remoção de matéria orgânica, nutrientes, organismos patogênicos, compostos

orgânicos emergentes, metais pesados, dentre outros poluentes (KADLEC; WALLACE, 2009; LIZAMA; FLETCHER; SUN, 2011; AVELAR et al., 2014; MENDONÇA; RIBEIRO; NOGUEIRA, 2017).

Como desvantagens dos SACs, no entanto, pode-se citar o desempenho dependente de fatores ambientais como a temperatura; o grande requerimento de área; o longo tempo de partida (estabelecimento da vegetação); a necessidade de controle de espécies invasoras; os gastos com meio suporte e o risco de colmatação dos espaços porosos (LIN et al., 2010; TAYLOR et al., 2011; GARFÍ et al., 2012; STEFANAKIS, 2015; ILYAS; MASIH, 2017a; MATOS; VON SPERLING; MATOS, 2018) Desta forma, é mais indicado para soluções descentralizadas de tratamento, para pequenas comunidades e tratamento de águas residuárias de pequenas agroindústrias.

Assim como os FBAS, existem diferentes configurações e fatores de influências no desempenho dos SACs, como discutido a seguir.

3.3.3.1 Configurações

Os SACs podem se diferenciar segundo o nível d'água em relação ao meio suporte e segundo o sentido de escoamento em sistemas alagados construídos de escoamento superficial (SACs-ES), sistemas alagados construídos de escoamento vertical subsuperficial (SACs-EV) e sistemas alagados construídos de escoamento horizontal subsuperficial (SACs-EHSS) (SEZERINO et al., 2015; DOTRO et al., 2017).

Nos SACs-ES, o líquido escoar acima do nível do meio suporte, havendo maior potencial de oxidação-redução (POR) e menores gastos com meio suporte. No entanto, tende a apresentar menor capacidade de filtração e adsorção, e maior potencial de exalação de odores e de contaminação dos operadores (CHERNICHARO, 2006; NAZ et al., 2009; YALCUK; UGURLU, 2009).

Os sistemas verticais operam em batelada, com diferentes meios suportes, em camadas com diferentes granulometrias, o que permite maior capacidade de filtração, maior oxigenação da água residuária em tratamento (maior potencial para nitrificação), trocas gasosas e maior tempo de vida útil em relação às unidades horizontais. Porém, tem a desvantagem de exigir operação mais complexa (acionamento das bateladas), há menor TDH, o que dificulta a maior absorção de nutrientes pelas plantas e um menor potencial para desnitrificação (YALCUK; UGURLU, 2009; KADLEC; WALLACE, 2009; KANTAWANICHKUL; WANNASRI; 2013).

Os sistemas mais utilizados, entretanto, são os SACs-EHSS, em função da maior facilidade de operação, menores riscos de exalação de odores e de contaminação dos operadores que precisam fazer o corte da parte aérea das plantas, além da maior capacidade de remoção por absorção pelas plantas. Porém, como a água residuária é aplicada sobre a área transversal, menor que a área superficial, requer pré-tratamento e está mais sujeita à colmatção (KANTAWANICHKUL; WANNASRI; 2013; MATOS; MATOS, 2017; MATOS; VON SPERLING; MATOS, 2018). Dado o potencial das unidades vertical e horizontal, tem-se avaliado a conjugação das unidades, na configuração denominada como híbrida (vertical-horizontal), para favorecer maior remoção de alguns poluentes, como o nitrogênio (DOTRO et al., 2017).

3.3.3.2 Espécies de plantas

As plantas apresentam grande importância na operação de SACs, pois proporcionam extração de nutrientes e poluentes (fitorremediação), liberação de substâncias antimicrobianas, bombeamento de oxigênio na zona de raízes, menor amplitude de temperatura nas unidades e maior diversidade microbiana (BRIX, 1997; TAYLOR et al., 2011; SARMENTO et al., 2012; SAMSÓ;

GARCÍA, 2013; AVELAR et al., 2014; TOSCANO et al., 2015; FAN et al., 2016).

Para que a planta possa influenciar significativamente no desempenho das unidades, deve-se escolher espécies mais propícias, realizar o corte da parte aérea frequentemente e aplicar carga orgânica e de nutrientes compatível com a capacidade de absorção das culturas (FIA et al., 2011; VERHOFSTAD et al., 2017). Realizar a policultura (uso de mais de uma espécie vegetal), o plantio com a densidade correta, e até a posição de cultivo de cada espécie, pode causar efeito positivo na depuração de águas residuárias (ZHOU et al., 2017; PANRARE; TONDEE; SOHSALAM, 2017; HERNANDÉZ et al., 2018; SARAIVA et al., 2018). Em relação ao efeito sobre a colmatação, há grande controvérsia na literatura sobre o papel da planta. Nos últimos anos, tem-se observado que as culturas contribuem inicialmente de forma negativa, pela liberação de sólidos vegetais e ocupação dos espaços porosos. No entanto, com o passar do tempo, pelo ‘empolamento’, a planta acaba atenuando o processo de obstrução dos poros dos SACs (MATOS; VON SPERLING; MATOS, 2018).

As primeiras plantas utilizadas nos SACs foram as macrófitas, que podem ser flutuantes, submersas e emersas, sendo que as últimas são mais propícias, sobretudo para águas residuárias com alta turbidez (MATOS; MATOS, 2017). No entanto, muitas dessas espécies utilizadas não têm valor comercial, o que levava a grande geração de biomassa vegetal sem possível aproveitamento. Com o advento das pesquisas e observação do desenvolvimento de adaptações (aparecimento de aerênquimas) em plantas não comuns de áreas alagadas, aumentou-se a possibilidade de uso de espécies vegetais (BRIX, 1997; KADLEC; WALLACE, 2009).

Vymazal (2011) fez um compilado com diferentes espécies já utilizadas em SACs, relacionando ao tipo de água residuária tratada. Como alguns exemplos, pode-se citar taboa (MATOS et al., 2018), capim elefante (FIA et al.,

2011), capim-tifton 85 (SARAIVA et al., 2018), azevém e aveia preta (FIA et al., 2010), alternantera (FIA et al., 2008), mentha aquática (AVELAR et al., 2014), helicônia, lírio-do-brejo e tiriricão (SARMENTO; BORGES; MATOS, 2013), dentre outras.

Uma espécie vegetal que tem recebido grande atenção nos SACs é o capim-vetiver, em função do grande crescimento das raízes (MARQUES et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2018), o que pode favorecer a construção de unidades de maior profundidade, com maior capacidade de extração de nutrientes e menor ocupação de espaço físico. Bwire, Njau e Minja (2011), por exemplo, encontraram elevadas eficiências de remoção de metais pesados no tratamento de lixiviados de aterros utilizando o capim-vetiver.

3.3.3.3 Tipo de meio suporte

A escolha do tipo de meio suporte é de grande importância em função dos mecanismos físicos e químicos que o meio contribui diretamente (precipitação, filtração e adsorção), e em relação às rotas bioquímicas de remoção que envolvem a microbiota, que cresce aderida (KADLEC; WALLACE, 2009; LU et al., 2016).

Materiais de menor granulometria, de maior área superficial específica e reativos, tendem a apresentar melhores eficiências de remoção, no entanto, proporcionam menor tempo de vida útil ao leito e encarecem os custos de construção das unidades (DORDIO; CARVALHO, 2013; MORATO et al., 2014; QUAN et al., 2016; YIN; YAN; GU, 2017; MATOS; VON SPERLING; MATOS, 2018). Por esta razão, ainda são mais utilizados os materiais pedregulhosos como apresentado no levantamento realizado por Sezerino et al. (2015). Em pesquisas brasileiras, 64% dos trabalhos empregaram brita, 14% a escória, 7% cascalho, 5% pedrisco e 5% pedra de mão. Ainda pode-se citar

estudos com areia (41%), e materiais alternativos como casca de arroz (11%), pneu picado (5%) e bambu (5%).

3.3.3.4 Outras variáveis de influência

Como outras variáveis de influência, pode-se citar a altura do nível d'água, o TDH, a temperatura, características das águas residuárias, e cargas orgânicas aplicadas (STEFANAKIS; TSIHRINTIZ, 2012; SARMENTO; BORGES; MATOS, 2013; SEEGER et al., 2013; MORATÓ et al., 2014; CARBALLEIRA; RUIZ; SOTO, 2016; PAPAEVANGELOU; GIKAS; TSIHRINTZIS, 2016; SANCHEZ-RAMOS et al., 2017).

Em função do grande número de variáveis que podem influenciar no desempenho, como plantas e tipo de meio suporte, e da tecnologia ser recente no país, ainda não há normativas para dimensionamento das unidades no Brasil. Em algumas das concepções, utiliza-se os parâmetros estabelecidos nas normativas americanas (USEPA, 2000) e europeia, com destaque para Alemanha (DWA, 2017). Porém como discutido, a temperatura é fator de grande importância no desempenho dos SACs, e é importante que se criem diretrizes próprias para o país. Em Matos e Matos (2017) e Von Sperling e Sezerino (2018), podem ser encontradas equações e recomendações para dimensionamento de SACs-EV e SACs-EHSS.

3.4 Importância de remoção de nitrogênio

Nos sistemas de tratamento encontrados no país, as remoções de N comumente são baixas. Segundo levantamento realizado por Oliveira e Von Sperling (2005), em 166 ETEs, as remoções de N estiveram entre 12 e 69% nas ETEs com presença de tratamento aeróbio, isso porque, em alguns casos, foram

levadas em conta as eficiências de remoção de nitrogênio total (NT) e NTK. Dessa forma, as remoções poderiam ser ainda menores. Acredita-se que nos últimos anos a situação não tenha mudado para melhor, tendo em vista os reduzidos investimentos em saneamento e no tratamento de esgotos (BRASIL, 2017).

Os motivos para essa condição são, em primeiro lugar, o dimensionamento de ETEs para remover matéria orgânica, que é ainda crítico no país, a complexidade de algumas configurações para polimento do efluente, e a legislação pouco restritiva em relação à concentração de N para disposição nos cursos d'água (MOTA; VON SPERLING, 2009).

Segundo a Deliberação Normativa Conjunta COPAM/CERH nº 01 de 2008, para lançamento no curso d'água, a concentração máxima de nitrogênio amoniacal deve ser igual a 20 mg L⁻¹. E mesmo assim, esse valor não é aplicável para esgotos sanitários. Os de referência de nitrito e nitrato são mencionados apenas na qualidade de água a ser mantida, segundo o enquadramento do curso d'água (ou do seu trecho) (MINAS GERAIS, 2008).

Caso semelhante ocorre com a legislação federal, que continha restrição para nitrogênio amoniacal na Resolução CONAMA nº357, que foi suspenso temporariamente pela Resolução CONAMA nº397, enquanto na Resolução CONAMA nº430, se excluiu a obrigação para esgotos sanitários (BRASIL, 2005; 2008; 2011).

Como consequência da baixa remoção de N, existem diversos impactos negativos ao meio ambiente, dentre as quais pode-se elencar a eutrofização e doenças relacionadas à contaminação das águas como metemoglobinemia, cânceres, aumento da glândula tireóide, má formação de fetos e hipertensão (GAO et al., 2012b; NAZARI-SHARABIAN; AHMAD; KARAKOUZIAN, 2018). Além disso, a NH₃ é tóxica para os peixes e outros seres aquáticos,

podendo levar ao desequilíbrio do ecossistema (PIEDRAS et al., 2006; HOLETON; CHAMBERS; GRACE, 2011).

Ambientes contaminados com N podem também contribuir para emissões gasosas de NH_3 , NO_x , N_2O e N_2 (FOWLER et al., 2013), sendo que o N_2O , um intermediário da desnitrificação heterotrófica e da nitrificação autotrófica, pode contribuir para o efeito estufa (LAW et al., 2012). Segundo Baresel et al. (2016), o óxido nitroso é 298 vezes mais prejudicial do que o CO_2 , podendo reter mais calor e contribuir para o aquecimento global.

Se a eutrofização pode contribuir para as mudanças climáticas, o contrário também pode ocorrer, já que a maior liberação de CO_2 favorece maior crescimento de algas e plantas aquáticas, uma possível consequência do impacto ambiental (NAZARI-SHARABIAN; AHMAD; KARAKOUZIAN, 2018). O tratamento de águas residuárias, por outro lado, reduz as emissões, contribuindo positivamente para o meio ambiente (INOUE et al., 2016).

Assim, torna-se de grande importância o entendimento dos mecanismos de remoção, para reduzir o aporte do contaminante nos cursos d'água e os efeitos da poluição.

3.5 Remoção biológica de nitrogênio

As águas residuárias são comumente ricas em nitrogênio, estando presente, principalmente, nas formas orgânicas (N_{org}) e amoniacal (N_{amon}). Assim sendo, o tratamento não eficaz na remoção do poluente pode implicar nos impactos ambientais negativos apresentados anteriormente.

Segundo Von Sperling (2014), tipicamente, nos esgotos domésticos há em torno de 45 mg L^{-1} de nitrogênio total (NT), sendo que destes, 20 mg L^{-1} é N_{org} , enquanto o restante trata-se da amônia (NH_3) ou íon amônio (NH_4^+), representantes do NAT (nitrogênio amoniacal total), terminologia com a qual

alguns autores se referem ao N_{amon} (KUNZ; MUKHTAR, 2016). Na literatura, é ainda possível encontrar a utilização de amônia para referir-se à soma da amônia livre ou não ionizada (NH_3) e da amônia ionizada (NH_4^+). Por fim, pode-se englobar as formas orgânica e amoniacal como nitrogênio total Kjeldahl (NTK), pois ambas são frações quantificáveis pelo método analítico (VON SPERLING, 2014; MATOS, 2015). Essas representações estão resumidas nas Equações 1 e 2.

$$\text{NAT} = N_{\text{amon}} = \text{NH}_4^+ + \text{NH}_3 \quad (1)$$

$$\text{NTK} = N_{\text{amon}} + N_{\text{org}} \quad (2)$$

A distribuição relativa entre NH_4^+ e NH_3 no nitrogênio amoniacal depende do pH, havendo maior concentração da última, que é tóxica, em condições alcalinas. Por essa razão, a legislação é mais restritiva para as concentrações de N_{amon} em situações com maiores valores do potencial hidrogeniônico (MINAS GERAIS, 2008; MOTA; VON SPERLING, 2009).

As concentrações de nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-), espécies químicas mais oxidadas do N, são desprezíveis no esgoto sanitário e nas demais águas residuárias brutas, ricas em matéria orgânica, pois para haver a presença destas formas químicas, há de se ter concentrações suficientes de oxigênio dissolvido (OD) (VON SPERLING, 2014). Com a inclusão das formas nítricas ao NTK, tem-se o nitrogênio total (NT) presente nas águas residuárias (EQUAÇÃO 3). Assim, caso haja redução da concentração de NT, houve efetiva remoção do elemento químico no tratamento do efluente.

$$\text{NT} = \text{NTK} + \text{NO}_2^- + \text{NO}_3^- \quad (3)$$

Em outras águas residuárias, principalmente as agroindustriais, é possível encontrar concentrações maiores de N, como apresentado na Tabela 6, sendo ainda mais importante obter sucesso no tratamento, sobretudo em casos que se tem elevadas vazões de despejos.

Tabela 6 - Concentrações típicas de nitrogênio total (NT) em algumas águas residuárias

Água Residuária	NT (mg L ⁻¹)
Laticínios	60-1.300
Vinhaça	480-700
Água Residuária da Café	300-500
Água Residuária da Suinocultura	900-8.600
Água Residuária da Bovinocultura	1.700-3.000
Água Residuária da Piscicultura	60-100
Chorume	40-1.500

Fonte: Adaptado de Matos e Matos (2017).

As diferentes formas de nitrogênio apresentadas compõem o ciclo do N na natureza, o qual envolve quatro processos microbiológicos, que são a fixação atmosférica de N₂, mineralização do nitrogênio orgânico, nitrificação e a desnitrificação (HAYATSU; TAGO; SAITO, 2008), estando estas etapas também presentes na remoção biológica de nitrogênio.

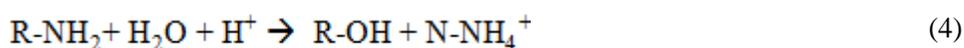
3.5.1 Amonificação

Como reportado, o N afluente às ETEs se apresenta nas formas orgânica e amoniacal, o que se mantém após a passagem pelas etapas preliminar e primária. No tratamento secundário anaeróbio, devido à degradação da matéria orgânica por organismos heterotróficos, o N_{org} é mineralizado, sofre amonificação, sendo convertido a íon amônio e amônia (formas inorgânicas) (MOTA; VON SPERLING, 2009; KUNZ, MUKHTAR, 2016).

As bactérias responsáveis por este estágio inicial das transformações do N são muito diversificadas, podendo ser aeróbias ou anaeróbias, e capazes de crescimento em uma grande faixa de pH (WIELGOSZ; JOZWIAKOWSK; BIELINSKA, 2010). Desta forma, esta não é uma etapa crítica no tratamento das águas residuárias, podendo também ocorrer em reatores aeróbios. No entanto, comumente associa-se uma unidade anaeróbia de pré-tratamento anterior para que se possa reduzir a demanda de área da ETE (VON SPERLING, 2014).

Outro aspecto importante a ser discutido é que o N não é removido com grandes eficiências no reator anaeróbio, pois ocorre a conversão de uma forma química em outra, não havendo variações expressivas de NTK. Inclusive, por vezes, as concentrações efluentes se apresentam superiores às encontradas na entrada do reator anaeróbio, o que pode ocorrer dada à liberação do nitrogênio assimilado pela microbiota (CHERNICHARO et al., 2015).

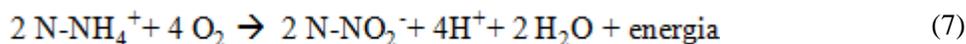
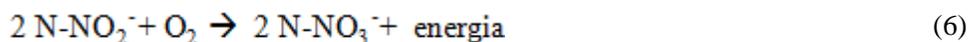
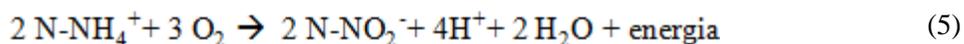
A Equação 4 expressa a equação genérica de etapa de amonificação, em que R é representativo de um radical orgânico. Observa-se que há consumo de H^+ do meio, um dos motivos, além do aumento da condutividade elétrica, pelos quais comumente se verifica elevação da alcalinidade após o reator anaeróbio (HOFFMANN et al., 2007), como foi o caso do trabalho de Dias et al. (2018).



3.5.2 Nitrificação

Após a disponibilização de N_{amon} , inicia-se a demanda nitrogenada, com consumo de oxigênio pelos organismos autotróficos para a oxidação a nitritos e a nitratos. No entanto, em um reator biológico aeróbio esta fase ocorre atrasada em relação à utilização de oxigênio pelos organismos heterotróficos para degradação da matéria orgânica, pois os nitrificantes crescem em taxas menores e são mais sensíveis às condições ambientais (VON SPERLING, 2016; ZOPPAS et al., 2016; MATOS et al., 2017b).

A nitrificação pode ser dividida em duas etapas, sendo realizada pelas bactérias oxidadoras de amônia (BOA) e pelas bactérias oxidadoras de nitrito (BON). Esses grupos de bactérias se caracterizam por utilizar o CO_2 como fonte de carbono (autotróficas) e a oxidação de ligações inorgânicas (amônia ou nitrito) como fonte energética (quimiotróficos), não dependendo da presença de matéria orgânica para o seu metabolismo (METCALF; EDDY, 2003; VON SPERLING, 2012; ZOPPAS et al., 2016). Nas Equações 5, 6 e 7, estão apresentadas, de forma simplificada, respectivamente, as etapas da nitroação (oxidação da amônia), a nitratação (oxidação do nitrito) e a reação global da nitrificação.



Os gêneros envolvidos na nitrificação são as *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrobacter* e *Nitrosovibrio*, sendo que as *Nitrosomonas* e *Nitrospira* as mais importantes representantes das BOA, e a

Nitrobacter o principal gênero de bactérias responsáveis pela oxidação do nitrito (WIELGOSZ; JOZWIAKOWSK; BIELINSKA, 2010; ZOPPAS et al., 2016; ROOTS et al., 2019).

Ao contrário da amonificação, a nitrificação causa consumo de alcalinidade em função da liberação de H^+ , como pode ser visto após o filtro biológico percolador, no trabalho de Vieira et al. (2013). Outro inconveniente é que há consumo de oxigênio, que precisa ser fornecido em maiores quantidades em reatores com introdução de oxigênio por aeradores de superfície ou difusores. Estequiometricamente, como apresentado na Equação 7, são necessários 2 mols de O_2 para cada mol de $N-NH_4^+$ a ser oxidado, o que equivale a 4,57 g de O_2 por g de $N-NH_4^+$. No entanto, para efeitos de cálculo da demanda nitrogenada, utiliza-se 4,30 g de O_2 por g de $N-NH_4^+$, já que ocorre assimilação de parte do N pela microbiota (VON SPERLING, 2012).

Dentre os fatores que podem afetar a nitrificação, cita-se o pH, temperatura, idade do lodo, TDH, a concentração de OD e de íon amônio, e de substâncias inibidoras como a presença de amônia livre (RAMOS et al., 2007; VON SPERLING, 2012; HASAN et al., 2014; ZOPPAS et al., 2016; LIU et al., 2019).

Por exemplo, concentrações de OD inferiores a $1,5 \text{ mg L}^{-1}$, e de 10 a 20 mg L^{-1} de NH_3 podem causar acúmulo de nitritos, em função da inibição das BON. Essa condição ocorre, segundo Chung et al. (2005), por serem os organismos oxidadores de nitrito mais sensíveis às baixas concentrações de OD e à presença de elevadas concentrações de NH_3 .

Se pH acima de 8,0 pode ser prejudicial às nitrificantes, valores inferiores a 6,0 também pode ocasionar decréscimo da taxa de nitrificação, já que o processo envolve liberação de H^+ (EQUAÇÃO 7), tornando a reação não favorável. Em relação à temperatura, uma condição ótima para as nitrificantes está em torno de 25 a $36 \text{ }^\circ\text{C}$ (VON SPERLING, 2012; ZOPPAS et al., 2016).

Para inibir a demanda nitrogenada na quantificação da DBO, pode-se utilizar o composto antinitrificante TCMP (2-cloro-6-triclorometilpiridina) (MATOS et al., 2017b). Outras substâncias como o clorato de sódio (NaClO_3), Dicianodiamida (DCD), fosfato de 3,4-dimetilpirazol (DMPP), antibióticos, cloro, e metais pesados, também se mostraram eficazes na inibição da nitrificação (BAUHUS; MEYER; BRUMME, 1996; CHEN; WONG, 2004; LI et al., 2016; GILSANZ et al., 2016; WU et al., 2016). Além disso, a pressão osmótica, com excesso de sais também pode ter efeito prejudicial à ação de oxidação das formas amoniacais do nitrogênio (QIU; TING, 2013).

Segundo previsto nas legislações do estado de Minas Gerais (MINAS GERAIS, 2008) e federal (BRASIL, 2011), caso haja oxidação de N suficiente para restar concentração de nitrogênio amoniacal inferior a 20 mg L^{-1} , atende-se ao padrão para lançamento de águas residuárias. Porém, como se observa, ocorre apenas uma conversão entre espécies químicas solúveis de N ($\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_3^-$), não havendo sua remoção das águas residuárias. Assim, minimiza-se o impacto do efeito tóxico da amônia no meio líquido e o consumo de oxigênio necessário à demanda nitrogenada, entretanto, o potencial de eutrofização e suas consequências negativas para o ambiente continuam presentes.

Dependendo do pH, pode até haver predomínio da amônia não ionizada, que é volátil, e pode se desprender do líquido em tratamento. No entanto, esta não é das principais rotas de remoção de N em ETEs, de acordo com o que tem sido observado em pesquisas recentes (RODRIGUES et al., 2015).

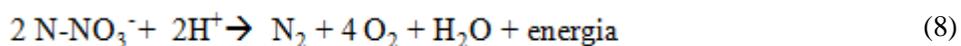
Dessa forma, é necessária a existência de outra etapa para que ocorra a remoção biológica de nitrogênio em reatores de tratamento de águas residuárias, a desnitrificação.

3.5.3 Desnitrificação

A última etapa da remoção biológica envolvendo processos microbiológicos é a desnitrificação, proporcionada por organismos heterotróficos e facultativos, normalmente encontrados em abundância no esgoto doméstico, tendo como exemplos os gêneros *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Thiobacillus* e *Thiosphaera*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Aquaspirillum*, *Flavobacterium*, *Thauera* sp., *Aeromonas* e *Moraxella*, (JOZWIAKOWSK; BIELINSKA, 2010; PRAMANIAK et al., 2012; VON SPERLING, 2012; ZOPPAS et al., 2016; LU et al., 2019).

Assim, são bactérias que podem tanto utilizar o O₂ como o NO₃⁻ como aceptores finais de elétrons, tendo preferência pelo primeiro que é mais energético, e dependem de uma fonte de matéria orgânica para suprir o carbono e a energia necessária para o seu metabolismo (MARIN; CARAVELLI; ZARITZKY, 2016; WANG et al., 2017). Neste ponto é que surge a problemática no tratamento de águas residuárias, pois boa parte da matéria orgânica já foi removida em etapas anteriores, o que justifica que as ETEs convencionais não proporcionam boas eficiências na retirada de N.

Na Equação 8, está apresentada de forma simplificada, a reação da desnitrificação.



Para aumentar as taxas de desnitrificação, algumas modificações no sistema de tratamento podem ser feitas, tais como proporcionar alternância de fases aeróbias e anóxicas nos reatores, promover a recirculação de nitratos e do lodo, aeração alternada, passagem da água residuária bruta para as unidades secundárias de tratamento, para redução da relação DBO/N ou DQO/N, e o

fornecimento de fontes externas de matéria orgânica (COATS; MOCKOS; LOGE, 2011; KUNZ et al., 2012; VON SPERLING, 2012; CAPODAGLIO; HLAVÍNEK; RABONI, 2016; TORRIJOS et al., 2016; WANG et al., 2017).

Em baixas concentrações de oxigênio, é possível obter nitrificação e desnitrificação simultânea (NDS) em um reator (ZENG et al., 2003; YANG; YANG, 2011; WANG et al., 2012). A NDS pode ocorrer no interior de biofilmes, devido ao gradiente de oxigênio que existe da parte externa, mais próxima da água residuária, e interna, em contato com o meio suporte, no caso de crescimento aderido. Dessa forma, favorece a coexistência de microrganismos nitrificantes e desnitrificantes, permitindo economia de área e infraestrutura (ZOPPAS et al., 2016).

As taxas de desnitrificação são afetadas positivamente pela concentração de matéria orgânica (e sua biodegradabilidade), temperatura, NO_3^- e relação carbono/nitrogênio (C/N ou DQO/N ou DBO/N), e negativamente pela presença de OD e amônia livre (WIELGOSZ; JOZWIAKOWSK; BIELINSKA, 2010; VON SPERLING, 2012; PELAZ et al., 2018; LIU et al., 2019). Estequiometricamente, 2,86 g de DQO para cada grama de N-NO_3^- seriam suficientes para a desnitrificação, no entanto, pesquisas têm demonstrado que devem ser fornecidas de 6 a 11 g DQO por g de N-NO_3^- para haver satisfatória redução de nitratos (RUSCALLEDA et al., 2011).

Segundo Zeng et al. (2003) e Marin et al. (2016), em reatores com processo NDS, onde são mantidas baixas concentrações de OD, pode-se favorecer o acúmulo de nitritos e a produção de N_2O , inibindo a desnitrificação e prejudicando a remoção biológica. Além disso, como discutido, o N_2O é um gás contribuinte do efeito estufa.

A desnitrificação tem grande importância no tratamento de águas residuárias, pois, efetivamente, é quando se remove N via remoção biológica, há economia de oxigênio (EQUAÇÃO 8), de alcalinidade (consumo de íons H^+) e

evita-se que haja ressuspensão do lodo sedimentado no decantador secundário (VON SPERLING, 2012).

Para a quantificação de organismos participantes da rota de remoção de N, possibilitando gerar informações para avaliação da eficácia do tratamento, pode-se utilizar métodos como os tubos múltiplos ou Número Mais Provável (NMP) ou hibridação *in situ* fluorescente (FISH), sendo ambos confiáveis, segundo Araújo et al. (2018). Porém, caso o interesse seja a identificação dos microrganismos, é necessário se utilizar de técnicas mais sofisticadas como de *Polymerase chain reaction* (PCR) (OSHIKI; SEGAWA; ISHII, 2018).

3.5.4 Rota alternativa de remoção biológica de nutrientes

Pesquisas mais recentes têm demonstrado que além dos microrganismos descritos, pode haver também a participação de outros organismos, que poderiam propiciar rotas alternativas de remoção de N, tais como fungos desnitrificantes, arqueias nitrificantes, bactérias *anaerobic ammonium oxidation* (Anammox), microrganismos heterotróficos nitrificantes e autotróficos desnitrificantes (HAYATSU; TAGO; SAITO, 2008; JI et al., 2015; CUI et al., 2019).

Um processo que é muito estudado atualmente envolve a oxidação anaeróbia de amônia (processo Anammox), no qual as BOA convertem amônia para nitrito, que por sua vez, serve como aceptor final de elétrons para oxidar a amônia restante à nitrogênio gasoso (PEREIRA et al., 2017; LIU et al., 2019). Para alcançar as condições favoráveis para ocorrência do processo que permite redução no consumo de oxigênio e de matéria orgânica para desnitrificação, utiliza-se reatores *Single-reactor High-activity Ammonia Removal Over Nitrite* (SHARON), unidades com condições propícias *Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite* (CANON), *Oxygen Limited Autotrophic Nitrification*

Denitrification (OLAND) e *Deammonification* (DEMON), com unidades com condições propícias, usando um consórcio microbiano, onde as condições são fornecidas para favorecer o crescimento de BOA e Anammox e inibir as BON, por exemplo, a temperatura, concentração de OD baixa, aeração intermitente, dentre outros (CHUNG et al., 2005; PEREIRA et al., 2017; JARAMILLO et al., 2018).

3.5.5 Outros mecanismos de remoção de nitrogênio em águas residuárias

Dentre as possíveis consequências da contaminação dos cursos d'água com N, está a eutrofização, que pode acarretar em crescimento excessivo de algas e plantas aquáticas (macrófitas) (GHALY; RAMAKRISHNAN, 2015). Para que isso ocorra, estes seres vivos precisam absorver o nutriente, que está disponível em grande concentração, extraindo-o do líquido.

De forma semelhante ao que ocorre nos ambientes lânticos, acontece também nas lagoas de maturação. Algas crescem e realizam a extração de N (como NH_4^+ e NO_3^-), ao mesmo tempo que ocasionam a elevação do pH, criando condições específicas, tanto para a precipitação do N, quanto para a volatilização da amônia. Nesse ambiente, ainda pode ocorrer sedimentação de N_{org} e nitrificação/desnitrificação (RODRIGUES et al., 2015; VON SPERLING, 2017; DIAS et al., 2017; JIANG et al., 2018a)

O uso de plantas também propicia remoção de N, como verificado em estudos em rampas de escoamento (SANTANA et al., 2017) e em sistemas alagados construídos (RAMOS et al., 2017). Outra forma de utilização da capacidade de extração de culturas vegetais é realizar a fertirrigação, uma forma de tratamento/disposição final de águas residuárias (MATOS; MATOS, 2017). Utilizando essa alternativa, Marques et al. (2017), obtiveram elevada

produtividade do capim-elefante e economia no consumo de água e adubação química, com uso do esgoto sanitário.

Em relação aos processos físicos e químicos, pode-se citar o *stripping*, com injeção de ar para remoção de N gasoso que esteja dissolvido, precipitação como estruvita, troca iônica, uso de membranas, cloração, sorção em filtros orgânicos, carvões ativados e biocarvões, processos oxidativos avançados para converter amônia e N_{org} em N_2 ou em NO_3^- (MOTA; VON SPERLING, 2009; LO MONACO; MATOS; BRANDÃO, 2011; KALKAN et al., 2011; CAPODAGLIO; HLAVÍNEK; RABONI, 2016; KUNZ; MUKHTAR, 2016; HE et al., 2018).

3.5.6 Fatores de influência na remoção de nitrogênio em biofiltros

Durante a passagem de águas residuárias por biofiltros, o meio suporte filtra sólidos e propicia a formação do biofilme formado por microrganismos que utilizam os nutrientes do efluente. Dependendo da capacidade de formação de biofilme e do gradiente de concentração de oxigênio, é possível realizar a NDS nestas unidades, possibilitando economia de área no tratamento de efluentes (ROCHER et al., 2015; PELAZ et al., 2018).

Como ressaltado nos processos microbiológicos, para que ocorra nos biofiltros a nitrificação e desnitrificação simultâneas, é importante que haja adequada alcalinidade, pH próximo da neutralidade, elevada relação C/N e concentração de OD que seja suficiente para nitrificação, porém, deve haver a formação de zonas anóxicas (PRAMANIAK et al., 2012; LU; CHANDRAN; STENSEL, 2014). Aeração intensa prejudica a desnitrificação e pode ainda causar maior destacamento do lodo (PENG et al., 2004).

Para se proporcionar gradientes de concentração de oxigênio pode ser interessante também ter mais de um estágio no reator (RYU et al., 2008;

GIUSTINA; MIRANDA; MONTEGGIA, 2010; RYU et al., 2014; KORDKANDI; KHOSHFETRAT, 2015) ou aeração intermitente (YANG; YANG, 2011; WANG et al., 2013; FENG et al., 2017; TAGLIATTI, 2019), tendo assim, fases aeróbias e anóxicas, variando no tempo ou espaço, com estratificação de distribuição de microrganismos no interior dos reatores (SUN et al., 2017; JIANG et al., 2018b; ZHANG et al., 2018).

Algumas configurações de lodos ativados têm aeração intermitente, assim como pode ter recirculação de efluente rico em nitrato na tentativa de haver pré-desnitrificação. Com este objetivo, Chiou e Ouyang (2001), avaliaram diferentes razões de recirculação, verificando que deve haver um equilíbrio, já que o retorno de maiores cargas de nitrato aumenta a desnitrificação, porém, implicam em maiores concentrações de íon amônio no efluente.

Adicionar fontes externas de carbono pode causar aumento da relação C/N, auxiliando na formação do biofilme e na redução do nitrato (ESPINOZA; STENPHENSON, 1999). Outro aspecto fundamental é o meio suporte escolhido para preenchimento do biofiltro, pois a área superficial e a porosidade proporcionada pelo meio suporte interferem na espessura do biofilme e nas trocas gasosas (BAO et al., 2016). Chen et al. (2019) observaram inclusive que meios reativos tais como ricos em ferro, resultam em condições favoráveis para remoção de N. Qiu et al. (2010) verificaram maiores taxas de nitrificação utilizando zeólitas e carbonato como suporte. Os autores, inclusive, indicam o uso do último meio suporte para águas residuárias com baixo pH, face à possível liberação de carbonato de cálcio, que poderia neutralizar a acidez do meio. Empregando filtros orgânicos para servir como biofiltro desnitrificante, Stokes, Melogno e Deshusses (2018) encontraram resultados promissores com uso de bambu.

3.5.7 Fatores de influência na remoção de nitrogênio em SACs

Em unidades aeradas tais como biofiltros, há disponibilização de oxigênio suficiente para que ocorra a nitrificação. Caso não haja condições propícias para desnitrificação simultânea, ou ainda reste uma carga expressiva de nitritos e nitratos, é necessário realizar a remoção complementar de N com a utilização de unidades que reúnam requisitos propícios para tal.

Em sistemas alagados construídos de escoamento horizontal subsuperficial (SACs-EHSS) predominam condições anóxicas ou anaeróbias (ADRADOS et al., 2014), o que permitiria haver a redução dos NO_3^- a N_2 . Leitões operando com maior profundidade útil (lâmina mantida de água residuária) e/ou recebendo maior carga de poluentes apresentam menores valores de potencial redox (POR) (DUSEK; PICEK; CIZKOVA, 2008; PELISSARI et al., 2018), tornando-se mais propensos à desnitrificação. Por outro lado, maiores carregamentos podem prejudicar outro mecanismo importante de remoção de N em SACs, a absorção pelas espécies vegetais cultivadas (MATOS et al., 2010). Com maiores vazões, há redução do TDH, implicando em menor oportunidade das plantas em extraírem poluentes.

A presença de plantas e a escolha adequada das introduzidas no sistema, também é fator essencial para se obter maiores eficiências de remoção de nitrogênio. Caselles-Osorio et al. (2017), por exemplo, constataram que as unidades plantadas foram significativamente superiores às unidades controle (sem vegetação). Fia et al. (2011) observaram que o capim-tifton 85 é mais eficaz na remoção de N que a taboa, macrófita muito empregada ainda em SACs.

Entre taboa, capim-tifton 85 e alternantera, Matos, Freitas e Lo Monaco (2009) recomendam a utilização dos dois últimos em SACs, tendo na última espécie, a melhor capacidade de remoção de N. Sarmento et al. (2013), por sua

vez, comparando tiriricão, helicônia, lírio-do-brejo em SACs-EV não vegetados, avaliaram como a melhor configuração, o uso da primeira em um elevado TDH, na qual permitiria haver maior remoção de NTK (56,5%). Em relação às espécies vegetais, é importante também realizar o corte da parte aérea com frequência correta, já que é na fase de crescimento que a planta absorve mais nutrientes (BREZINOVÁ; VYMAZAL, 2015; YANG et al., 2016).

Além da absorção, a presença de plantas favorece também a criação de microzonas aeradas, permitindo nitrificação e desnitrificação no próprio leito, contribuindo para a remoção de N (CAMACHO et al., 2007; TEE et al., 2009; COBAN et al., 2015). Corroborando a afirmativa de coexistência de regiões anóxicas e aeróbias, Adrados et al. (2014) encontraram nos SACs, a presença de desnitrificantes e espécies típicas de lodos ativados e participantes de outras etapas do ciclo do N. De forma complementar, Hua et al. (2017) observaram haver maior número de organismos nitrificantes na rizosfera, e de desnitrificantes fora dessa região, demonstrando a influência da zona de raízes, onde ocorre o bombeamento de O_2 armazenado nos aerênquimas, no potencial redox em SACs.

Inclusive, a desnitrificação parece ser um mecanismo de remoção mais importante que a absorção na remoção de NO_3^- em SACs (HALLIN et al., 2015). Segundo Wang et al. (2016), as remoções de íon amônio foram significativamente maiores em unidades plantadas, porém, quanto aos nitratos, não se observou diferença significativa. Sarmento et al. (2013) também não observaram ganho efetivo na remoção de nitratos comparando três diferentes espécies de plantas cultivadas em SACs-EV. Muitas das plantas absorvem preferencialmente nitrogênio inorgânico na sua forma mais reduzida, enquanto o nitrato seria removido, principalmente, pela ação de microrganismos heterotróficos crescendo em ambiente anóxico (GARGALLO et al., 2017).

Pensando em aumentar o potencial de remoção de N pela maior criação de zonas aeróbias e anóxicas, pesquisadores passaram a propor modificações na concepção do sistema. SACs-EHSS apresentam elevado potencial de amonificação e desnitrificação, porém, não de nitrificação, enquanto os SACs-EV favorecem maior oxidação de N (VYMAZAL, 2007). Assim, a combinação de unidades verticais e horizontais nos sistemas híbridos permite aumentar a capacidade de remoção de NT (ILYAS; MASIH, 2017b), assim como a utilização de SACs em multi-estágios (VYMAZAL; KROPFELOVÁ, 2015).

Nos SACs-EV, tem-se avaliado também a influência do fundo saturado, que permitiria a criação de zonas anóxicas na parte inferior das unidades (PELISSARI et al., 2017; SANTOS et al., 2018). Outra possibilidade é a intensificação, como a aeração artificial dos SACs-EHSS, que, no entanto, deve ser bem manejada para não inibir a desnitrificação (LANDRY et al., 2009; ZHANG et al., 2010). A aeração intermitente parece ser mais adequada do que a contínua, pensando na NDS em SACs (ILYAS; MASIH, 2017b).

O processo Anammox também pode ser encontrado em menor quantidade nos SACs-EHSS, e o seu favorecimento é importante, já que esta rota alternativa permite economia no consumo de oxigênio (VYMAZAL, 2007; KRAIEM et al., 2019). Segundo Sliemers et al. (2002) são necessários cerca de 1,9 g de O₂ para cada grama de N a ser oxidado, contrastante com os 4,3 g de O₂ por g de N requeridos na nitrificação/ desnitrificação.

De acordo com Vymazal (2007), a amônia ionizada (NH₄⁺) pode ser adsorvida no meio suporte e em substâncias húmicas, sendo influenciado pelo tipo de meio presente, o regime de alimentação, o acúmulo de matéria orgânica e a presença de plantas. A escolha do meio suporte também interfere na formação do biofilme, na fixação de plantas e na reatividade no meio.

Saraiva et al. (2018), por exemplo, encontraram maiores remoções de NT em SACs-EHSS preenchidos com brita, em comparação com leitos com

garrafas PET. Fahim et al. (2019) compararam leitos de brita preenchidos com serragem e calcário e verificaram que a incorporação do material orgânico foi mais interessante para elevar as eficiências de remoção de nitratos. Gautam e Greenway (2014), por sua vez, observaram que as plantas cultivadas na brita absorveram mais nutrientes do que na areia e na argila. A utilização de um meio sorvente se mostrou interessante na remoção de N, no estudo de Kasak et al. (2018) e Zhou et al. (2019), assim como foi a turfa para Turker et al. (2017) e a zeólita para Wen et al. (2012), em sistemas alagados construídos.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A depuração de águas residuárias é de grande importância para reduzir os impactos aos meios físico, biótico e antrópico, porém, alguns poluentes, como o nitrogênio, não são removidos com grande eficiência na maior parte das Estações de Tratamento de efluentes (ETE). Para elevar a eficiência de remoção deste elemento químico, é preciso conhecer o seu ciclo nas unidades de tratamento, proporcionando condições para que haja amonificação, nitrificação e desnitrificação e/ou sorção de formas ionizadas do N.

De acordo com a revisão de literatura realizada, em Filtros Biológicos Aerados Submersos (FBAS), pode haver coexistência de zonas anaeróbias, anóxicas e aeróbias, permitindo a ocorrência de nitrificação e desnitrificação simultâneas (NDS). No entanto, para isso, deve-se proporcionar condições favoráveis, reduzindo as taxas de aeração ou realizando aeração intermitente, por exemplo.

Outro reator passível de complementar as remoções de N são os sistemas alagados construídos de escoamento horizontal subsuperficial (SACs-EHSS), pela presença de plantas, meio suporte e ambiente predominantemente anóxico/anaeróbio. Assim, espera-se que a implementação das referidas unidades possa propiciar o atendimento à legislação quanto à disposição dos efluentes tratados da Estação de Tratamento de Esgotos, do canil Parque Francisco de Assis, no curso d'água.

REFERÊNCIAS

- ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Elaboração de projetos hidráulico-sanitários de estações de tratamento de esgotos sanitários**. NBR 12209, 2011. 53 p.
- ADRADOS, B.; SANCHEZ, O.; ARIAS, C.A.; BECARES, E.; GARRIDO, L.; MAS, J. BRIX, H.; MORAT, J. Microbial communities from different types of natural wastewater treatment systems: Vertical and horizontal flow constructed wetlands and biofilters. **Water Research**, v. 55, p. 304-312, 2014.
- AHAMMAD, S.Z.; ZEALAND, A.; DOLFING, J.; MOTA, C.; ARMSTRONG, D.V.; GRAHAM, D.W. Low-energy treatment of colourant wastes using sponge biofilters for the personal care product industry. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 634–638, 2013.
- ALBUQUERQUE, A.; MAKINIAB; J.; PAGILLA, K. Impact of aeration conditions on the removal of low concentrations of nitrogen in a tertiary partially aerated biological filter. **Ecological Engineering**, v. 44, p. 44-52, 2012.
- ANDRADE NETO, C.O.; CAMPOS, J.R. **Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo**. Rio de Janeiro: PROSAB, USP, 1999.
- ANSOLA, G.; ARROYO, P.; MIERA, L.E.S. Characterisation of the soil bacterial community structure and composition of natural and constructed wetlands. **Science of The Total Environment**, v. 473-474, p. 63–71, 2014.
- ARAÚJO, J.C.; CAMPOS, A.P.; SILVA, E.C.; OLIVEIRA, R.C.; CHERNICHARO, C.A.L. Comparação de métodos para quantificação de bactérias nitrificantes. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 23, n. 2, p. 299-305, 2018.
- AVELAR, F.F.; MATOS, A.T.; MATOS, M.P.; BORGES, A.C. Coliform bacteria removal from sewage in constructed wetlands planted with *Mentha aquatica*. **Environmental Technology**, v. 35, p. 2095-2103, 2014.
- AVELLÁN, T.; GREMILLION, P. Constructed wetlands for resource in developing countries. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 99, p. 42-57, 2019.

BAO, T.; CHEN, T.; TAN, J.; WILLE, M.L.; ZHU, D.; CHEN, D.; XI, Y. Synthesis and performance of iron oxide-based porous ceramsite in a biological aerated filter for the simultaneous removal of nitrogen and phosphorus from domestic wastewater. **Separation and Purification Technology**, v. 167, p. 154–162, 2016.

BARESEL, C.; ANDERSSON, S.; YANG, J.; ANDERSEN, M.H. Comparison of nitrous oxide (N₂O) emissions calculations at a Swedish wastewater treatment plant based on water concentrations versus off-gas concentrations. **Advances in Climate Change Research**, v. 7, p. 185-191, 2016.

BAUHUS, J.; MEYER, A.C.; BRUMME, R. Effect of the inhibitors nitrapyrin and sodium chlorate on nitrification and N₂O formation in an acid forest soil. **Biol Fertil Soils**, v.2 2, p. 318-325, 1996.

BRASIL. Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005**. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. 2005. 23 p.

BRASIL. Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011**. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. 2011. 8 p.

BRASIL. Agência Nacional de Águas. **Atlas esgotos: despoluição de bacias hidrográficas**. Brasília: ANA, 2017. 88 p.

BRASIL. Agência Nacional de Águas. Ministério das Cidades e Ministério do Meio Ambiente. **Atlas Esgoto: Despoluição de bacias hidrográficas**. Brasília, DF, 2017. 88 p.

BRIX, H. Do macrophytes play a rolen in constructed treatment wetlands? **Water Science and Technology**, v.3 5, n. 5, p.11-17, 1997.

BREZINOVÁ, T.; VYMAZAL, J. Seasonal growth pattern of Phalaris arundinacea in constructed wetlands with horizontal subsurface flow. **Ecological Engineering**, v. 80 p. 62–68, 2015.

BWIRE, K. M.; NJAU, K. N.; MINJA, R. J. A. Use of vetiver grass constructed wetland for treatment of leachate. *Water Science and Technology*, v.63, n.5, 2011.

CABRERA, G.; RAMÍREZ, M.; CANTERO, D. Biofilters. **Comprehensive Biotechnology**, v. 2, p. 303–318, 2011.

CAMACHO, J.V.; MARTÍNEZ, A.L.; GOMEZ, R.G.; SANZ, J.M. Comparative study of five horizontal subsurface flow constructed wetlands using different plant species for domestic wastewater treatment. **Environmental Technology**, v. 28. p. 1333-1343, 2007.

CAPODAGLIO, A.G.; HLAVÍNEK, P.; RABONI, M. Advances in wastewater nitrogen removal by biological processes: state of the art review. **Revista Ambiente e Água**, v. 11 n. 2, 2016.

CARBALLEIRA, T.; RUIZ, I.; SOTO, M. Effect of plants and surface loading rate on the treatment efficiency of shallow subsurface constructed wetlands. **Ecological Engineering**, v. 90, p. 203–214, 2016.

CASELLES-OSORIO, A.; VEGA, H.; LANCHEROS, J.C.; MARTÍNEZ, H.A.C.; MOSQUERA, J.E. Horizontal subsurface-flow constructed wetland removal efficiency using *Cyperus articulatus* L. **Ecological Engineering**, v. 99, p. 479–485, 2017.

CAVALCANTE, F.L., ANDRADE NETO, C.O.; ARAÚJO, A.L.C.; MELO, H.N.S. Eficiência sanitária de filtros anaeróbios avaliada em função da remoção de ovos de vermes e coliformes fecais. **Revista Aidis de Ingeniería y Ciencias Ambientales: Investigación, desarrollo y práctica**, v. 3, n. 1, p. 49-61, 2010.

CHEN, H.; LIU, Y.; XU, X.; SUN, M.; JIANG, M.; XUE, G.; LI, X.; LIU, Z. How does iron facilitate the aerated biofilter for tertiary simultaneous nutrient and refractory organics removal from real dyeing wastewater? **Water Research**, v. 148, p. 344-358, 2019.

CHEN, G.H.; WONG, M.T. Impact of Increased Chloride Concentration on Nitrifying-Activated Sludge Cultures. **J. Environ. Eng.**, v. 130, n. 2, p. 116-125, 2004.

CHERNICHARO, C.A.L.; BASTOS, R.K.X.; PIVELI, R.P.; VON SPERLING, M.; MONTEGGIA, L.O. Tratamento de esgotos e produção de efluentes adequados a diversas modalidades de reúso da água. Tratamento e utilização de

esgotos sanitários. Rio de Janeiro: ABEAS, 2006. Cap. 3. p. 63-110. (Projeto PROSAB).

CHERNICHARO, C.A. Post-treatment options for the anaerobic treatment of domestic wastewater. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 5, p. 73-92, 2006.

CHERNICHARO, C.A.L. **Princípios do tratamento de águas residuária -** Reatores anaeróbios. 2. ed. Belo Horizonte: UFMG, 2007. V. 5, 380 p.

CHERNICHARO, C.A.L.; VAN LIER, J.B.; NOYOLA, A.; RIBEIRO, T.B. Anaerobic sewage treatment: state of the art, constraints and challenges. **Rev. Environ. Sci. Biotechnol.**, v. 14, p. 649–679, 2015.

CHUNG, J.; SHIM, H.; LEE, Y. W.; BAE, W. Comparison of Influence of Free Ammonia and Dissolved Oxygen on Nitrite Accumulation Between Suspended and Attached Cells. *Environmental Technology*, v. 26, p. 21-33, 2005.

COATS, E. R.; MOCKOS, A.; LOGE, F.J. Post-anoxic denitrification driven by PHA and glycogen within enhanced biological phosphorus removal. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 1019–1027, 2011.

COBAN, O.; KUSCHK, P.; WELLS, N.S.; STRAUCH, G.; KNOELLER, K. Microbial nitrogen transformation in constructed wetlands treating contaminated groundwater. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, v. 22, p. 12829–12839, 2015.

CUI, Y.X.; BISWAL, B.K.; GUO, G.; DENG, Y.F.; HUANG, H.; CHEN, G.H.; WU, D. Biological nitrogen removal from wastewater using sulphur-driven autotrophic denitrification. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, p. 6023–6039, 2019.

CYDZIK-KWIATKOWSKA, A.; ZIELINSKA, M. Bacterial communities in full-scale wastewater treatment systems. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 32, n. 66, p.1-8, 2016.

DIAS, D.F.C.; MATOS, M.P.; PASSOS, R.G.; RODRIGUES, V.A.J.; VON SPERLING, M. Upgrading and evaluation of a simple pond system for small communities with simple interventions to reduce land requirements and increase performance. **Water Practice and Technology**, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2017.

DIAS, D.F.C.; PASSOS, R.G.; RODRIGUES, V.A.J.; MATOS, M.P.; SANTOS, C.R.S.; VON SPERLING, M. Performance evaluation of a natural

treatment system for small communities, composed of a UASB reactor, maturation ponds (baffled and unbaffled) and a granular rock filter in series.

Environmental Technology, v. 39, n. 4, p. 490-502, 2018.

DORDIO, A.; CARVALHO, A.J.P. Constructed wetlands with light expanded clay aggregates for agricultural wastewater treatment. **Science of the Total Environment**, v. 463-464, p. 454-461, 2013.

DOTRO, G.; LANGERGRABER, G.; MOLLE, P.; NIVALA, J.; PUIGAGUT, J.; STEIN, O.; VON SPERLING, M. Treatment Wetlands. 1. ed. London: IWA Publishing, 2017. V. 7. 160 p.

DUSEK, J.; PICEK, T.; CIKOVA, H. Redox potential dynamics in a horizontal subsurface flow constructed wetland for wastewater treatment: Diel, seasonal and spatial fluctuations. **Ecological Engineering**, v. 34, p. 223–232, 2008.

DWA. Standard DWA-A 262E: **Principles for dimensioning, construction and operation of wastewater treatment plants with planted and unplanted filters for treatment of domestic and municipal wastewater**. German Association for Water, Wastewater and Waste (DWA): Hennef, Germany, 2017.

EERKES-MEDRANO, D.; THOMPSON, R. C.; ALDRIDGE, D.C. Microplastics in freshwater systems: A review of the emerging threats, identification of knowledge gaps and prioritisation of research needs. **Water Research**, v. 75, p. 63-82, 2015.

EL-SHAFIL, S.A.; EL-GOHARY, F.A.; NASR, F.A.; VAN DER STEEN, N.P.; GIJZEN, H. J. Nutrient recovery from domestic wastewater using a UASB-duckweed ponds system. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 4, p. 798-807, 2007.

ESPINOZA, L.M.; STEPHENSON, T.A Review of Biological Aerated Filters (BAFs) for Wastewater Treatment. **Environmental Engineering Science**, v. 16, n. 3, p. 201-216, 1999.

ESTEBAN, S.; GORG, M.; PETROVIC, M.; GONZÁLEZ-ALONSO, S.; BARCELÓ, D.; VALCÁRCEL, Y. Analysis and occurrence of endocrine-disrupting compounds and estrogenic activity in the surface waters of Central Spain. **Science of the Total Environment**, v. 466-467, p. 939–951, 2014.

FAHIM, R.; LU, X.; JILANI, G.; HUSSAIN, J.; HUSSAIN, I. Comparison of floating-bed wetland and gravel filter amended with limestone and sawdust for

sewage treatment. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 20400–20410, 2019.

FAN, J.; ZHANG, J.; NGO, H. H.; GUO, W.; YIN, X. Improving low-temperature performance of surface flow constructed wetlands using *Potamogeton crispus* L. plant. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 1257–1260, 2016.

FARABEGOLI, G.; CHIAVOLA, A.; ROLLE, E. The Biological Aerated Filter (BAF) as alternative treatment for domestic sewage. Optimization of plant performance. **Journal of Hazardous Materials**, v. 171 p. 1126–1132, 2009.

FENG, Y.; LU, X.; AL-HAZMI, H.; MAKINIA, J. An overview of the strategies for the deammonification process start-up and recovery after accidental operational failures. **Rev. Environ. Sci. Biotechnol**, v. 16, p. 541–568, 2017.

FERNANDES, F.; ANDREOLI, C. V.; VON SPERLING, M. **Lodo de esgotos: tratamento e disposição final**. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. 2. ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, UFMG, 2014. V. 6. 444 p.

FIA, R.; MATOS, A.T.; FERREIRA, P.A.; TEODORO, P.E.P.; SCHUERY, F.C.; LUIZ, F. A. R. Desempenho agrônômica da *Typha* sp. e *Alternanthera philoxeroides* Mart. utilizadas no tratamento de águas residuárias da lavagem descascamento/despolpa dos frutos do cafeeiro em sistema alagado construído. **Engenharia na Agricultura**, v. 16, n. 4, p. 436-448, 2008.

FIA, R.; MATOS, A.T.; FIA, F.R.L.; MATOS, M.P.; LAMBERT, T.F.; NASCIMENTO, F. S. Desempenho de forrageiras em sistemas alagados de tratamento de águas residuárias do processamento do café. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 8, p. 842–847, 2010.

FIA, F.R.L.; MATOS, A.T.; FIA, R.; LAMBERT, T.F.; MATOS, M.P. Remoção de nutrientes por *Typha latifolia* e *Cynodon* spp. cultivadas em sistemas alagados construídos. **Revista Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 6, n. 1, 2011.

FOCO, M.L.R.; LOPES, G.P.R.; NOUR, E.A.A. Remoção de nitrogênio em sistema combinado anóxico-aeróbio com biomassa imobilizada. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 20, p. 55-64, 2015.

FOWLER, D.; SKIBA, U.; SUTTON, M.A.; CAPE, N.; REIS, S.; SHEPPARD, L.J.; JENKINS, A.; GRIZZETTI, B.; GALLOWAY, J.N.; VITOUSEK, P.; LEACH, A.; BOUWMAN, A.F.; BUTTERBACH-BAHL, K.; DENTENER, F.; STEVENSON, D.; AMANN, M.; VOSS, M. The global nitrogen cycle in the twenty-first century. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v. 368, p. 1-13, 2013.

GALLOWAY, J.N.; LEACH, A.M.; BLEEKER, A.; ERISMAN, J.W. A chronology of human understanding of the nitrogen cycle. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v. 368, p. 1-11, 2013.

GAO, X.Y.; XU, Y.; LIU, Y.; LIU, Y.; LIU, Z.P. Bacterial diversity, community structure and function associated with biofilm development in a biological aerated filter in a recirculating marine aquaculture system. **Mar. Biodiv.**, v. 42, p. 1–11, 2012a.

GAO, Y.; YU, G.; LUO, C.; ZHOU, P. Groundwater Nitrogen Pollution and Assessment of Its Health Risks: A Case Study of a Typical Village in Rural-Urban Continuum, China. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. 1-9, 2012b.

GARCÍA-RUIZ, M.J.; MAZA-MARQUEZ, P.; GONZALEZ-MARTINEZ, A.; CAMPOS, E.; GONZALEZ-LOPEZ, J.; OSORIO, F. Performance and bacterial community structure in three autotrophic submerged biofilters operated under different conditions. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 93, p. 2429–2439, 2018.

GARFI, M.; PEDESCOLL, A.; BÉCARES, E.; HIJOSA-VALSERO, M. SIDRACH-CARDONA, R; GARCÍA, J. Effect of climatic conditions, season and wastewater quality on contaminant removal efficiency of two experimental constructed wetlands in different regions of Spain. **Science of the Total Environment**, v. 437, p. 61–67, 2012.

GARGALLO, S.; MARTÍN, M.; OLIVER, N.; HERNANDEZ-CRESPO, C. Biokinetic model for nitrogen removal in free water surface constructed wetlands. **Science of the Total Environment**, v. 587–588, p. 145-156, 2017.

GAUTAM, D.N.; GREENWAY, M. Nutrient accumulation in five plant species grown in bioretention systems dosed with wastewater. **Australasian Journal of Environmental Management**, v. 21, n. 4, p. 453-462, 2014.

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

GHALY, A.E.; RAMAKRISHNAN, V.V. Nitrogen sources and cycling in the ecosystem and its role in air, water and soil pollution: A critical review.

Pollution Effects & Control, Halifax, v. 3, n. 2, 2015.

GIANGASPERO, A.; IORIO, R.; PAOLETTI, B.; TRAVERSA, D.; CAPELLI, G. Giardia and Cryptosporidium and public health: the epidemiological scenario from the Italian perspective. **Parasitology Research**, v. 101, n. 5, p. 1169-1182, 2007.

GILSANZ, C.; BAEZ, D.; MISSELBROOK, T.H.; DHANO, M.S.; CARDENAS, L.M. Development of emission factors and efficiency of two nitrification inhibitors, DCD and DMPP. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 216, p. 1-8, 2016.

GIUSTINA, S.V.D.; MIRANDA, L.A.S.; MONTEGGIA, L.O. Remoção de matéria orgânica e sólidos suspensos por nova configuração de biofiltro aeróbio submerso no pós-tratamento de efluente de reator UASB. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 15, n. 3 p. 257-266, 2010.

GOMEZ-SILVAN, C.; MOLINA-MUNOZ, M.; POYATOS, J. M.; RAMOS, A.; HONTORIA, E.; RODELAS, B.; GONZALEZ-LOPEZ, J. Structure of archaeal communities in membrane-bioreactor and submerged-biofilter wastewater treatment plants. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2096–2105, 2010.

GONÇALVES, R.F.; ARAÚJO, V.L.; CHERNICHARO, C.A.L. Association of a UASB reactor and a submerged aerated biofilter for domestic sewage treatment. **Water Science and Technology**, v. 38, p. 189-196, 1998.

GONÇALVES, R.F.; CHERNICHARO, C.A.L.; ANDRADE NETO, C.O.; ALÉM SOBRINHO, P.; KATO, M.T.; COSTA, R.H.R.; AISSE, M.M.; ZAIAT, M. In.: GONÇALVES, R.F. (Coord). Pós-Tratamento de Efluentes de Reatores Anaeróbios. Rio de Janeiro: ABES/RiMa, 2001. Cap. 4. 82 p. (Projeto Prosab).

GOSTOMSKI, P.A.; VELA, R.J. Metabolic uncouplers for controlling biomass accumulation in biological waste treatment systems. **Rev. Environ. Sci. Biotechnol.**, v. 17, p. 1-18, 2018.

GOUVEIA, J.; PLAZA, F.; GARRALON, G.; FDZ-POLANCO, F.; PENA, M. A novel configuration for an anaerobic submerged membrane bioreactor (AnSMBR). Long-term treatment of municipal wastewater under psychrophilic conditions. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 510–519, 2015.

HALLIN, S.; HELLMAN, M.; CHOUDHURY, M.I.; ECKE, F. Relative importance of plant uptake and plant associated denitrification for removal of nitrogen from mine drainage in sub-arctic wetlands. **Water Research**, v. 85 p. 377-383, 2015.

HASAN, H.A.; ABDULLAH, S.R.S.; KAMARUDIN, S.K.; KOFLI, N.T.; ANUAR, N. Kinetic evaluation of simultaneous COD, ammonia and manganese removal from drinking water using a biological aerated filter system. **Separation and Purification Technology**, v. 130, p. 56–64, 2014.

HAYATSU, M.; TAGO, K.; SAITO, M. Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 54, n. 1, p. 33-45, 2008.

HE, S.B.; XUE, G.; KONG, H.N. The performance of BAF using natural zeolite as filter media under conditions of low temperature and ammonium shock load. **Journal of Hazardous Materials**, v. 143 p. 291–295, 2007.

HE, Y.; WANG, X.; XU, J.; YAN, H.; GE, Q.; GU, X.; JIAN, L. Application of integrated ozone biological aerated filters and membrane filtration in water reuse of textile effluents. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 150–157, 2013.

HE, S.; DING, L.; WANG, X.; PAN, Y.; HU, H.; LI, K.; REN, H. Biochar carrier application for nitrogen removal of domestic WWTPs in winter: challenges and opportunities. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.102, p. 9411–9418, 2018.

HERNADEZ, M.E.; GALINDO-ZETINA, M.; HERNANDEZ-HERNANDEZ, J.C. Greenhouse gas emissions and pollutant removal in treatment wetlands with ornamental plants under subtropical conditions. **Ecological Engineering**, v. 114, p. 88–95, 2015.

HOFFMANN, H.; COSTA, T.B.; WOLFF, D.B.; PLATZER, C.; COSTA, R.H R. The Potential of Denitrification for the Stabilization of Activated Sludge Processes Affected by Low Alkalinity Problems. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 50, n. 2, p. 329-337, 2007.

HOLETON, C.; CHAMBERS, P.A.; GRACE, L. Wastewater release and its impacts on Canadian waters. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v. 68, p.1836–1859, 2011.

HUA, Y.; PENG, L.; ZHANG, S.; HEAL, K. V.; ZHAO, J.; ZHU, D. Effects of plants and temperature on nitrogen removal and microbiology in pilot-scale horizontal subsurface flow constructed wetlands treating domestic wastewater. **Ecological Engineering**, v. 108, p. 70–77, 2017.

HWANG, C.C.; WENG, C.H. Key factors contributing to simultaneous nitrification-denitrification in a biological aerated filter system using oyster shell medium. **Environment Protection Engineering**, v. 43, n. 1, p. 75-86, 2017.

ILYAS, H.; MASIH, I. Intensification of constructed wetlands for land area reduction: a review. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, p.1-11, 2017a.

ILYAS, H.; MASIH, I. The performance of the intensified constructed wetlands for organic matter and nitrogen removal: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 198, p. 372-383, 2017b.

INOUE, K.R.A.; SOUZA, C.F.; MATOS, A.T.; SOUSA, M.S.; VIEIRA, M.F.A. Potential of reduction in the emission of methane and nitrous oxide from swine wastewater after treated by two different systems. **Engenharia Agrícola**, v. 36, n. 6, p. 1198-1205, 2016.

JARAMILLO, F.; ORCHARD, M.; MUNOZ, C.; ZAMORANO, M.; ANTILEO, C. Advanced strategies to improve nitrification process in sequencing batch reactors - A review. **Journal of Environmental Management**, v. 218, p. 154-164, 2018.

JAWORSKI, N.A.; HICKEY, J.L.S. Cage and kennel wastewater. **Journal of Water Pollution Control Federation**, v. 34, n. 1, p. 40-43, 1962.

JI, B.; YANG, K.; ZHU, L.; JIANG, Y.; WANG, H.; ZHOU, J.; ZHANG, H. Aerobic Denitrification: A Review of Important Advances of the Last 30 Years. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 20, p. 643-651, 2015.

JIANG, Y.; WANG, H.; WANG, W.; DENG, L.; WANG, W. The optimization of microalgal culturing in liquid digestate after struvite precipitation using gray relational analysis. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 13048–13055, 2018a.

JIANG, H.; LIU, G.H.; MA, Y.; XU, X.; CHEN, J.; YANG, Y. A pilot-scale study on start-up and stable operation of mainstream partial nitrification-

anammox biofilter process based on online pH-DO linkage control. **Chemical Engineering Journal**, v. 350, p. 1035–1042, 2018b.

JORDÃO, E.P.; PESSOA, C.A. **Tratamento de Esgotos Domésticos**. 8. ed. Rio de Janeiro: ABES, 2017. 916 p.

JOURJON, F.; RACAULT, Y.; ROCHARD, J. **Effluents vinicoles: gestion et traitements**. França: Féret, Bordéus, 2011. 240 p.

JUNG, Y.T.; NARAYANAN, N.C.; CHENG, Y.L. Cost comparison of centralized and decentralized wastewater management systems using optimization model. **Journal of Environmental Management**, v. 213, p. 90-97, 2018.

KADLEC, R.H.; WALLACE, R.D. **Treatment Wetlands**. 2. ed. Florida: CRC Press, 2009. 1016 p.

KALKAN, C.; YAPSAKLI, K.; MERTOGLU, B.; TUFAN, D.; SAATCI, A. Evaluation of Biological Activated Carbon (BAC) process in wastewater treatment secondary effluent for reclamation purposes. **Desalination**, v. 265, p. 266–273, 2011.

KANTAWANICHKUL, S.; WANNASRI, S. Wastewater treatment performances of horizontal and vertical subsurface flow constructed wetland systems in tropical climate. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 35, n. 5, p. 599-603, 2013.

KASAK, K.; TRUU, J.; OSTONEN, I.; SARJAS, J.; OOPKAUP, K.; PAISTE, P.; KOIV-VAINIK, M.; MANDER, U.; TRUU, M. Biochar enhances plant growth and nutrient removal in horizontal subsurface flow constructed wetlands. **Science of the Total Environment**, v. 639, p. 67–74, 2018.

KASSAB, G.; HALALSHEH, M.; KLAPWIJK, A.; FAYYAD, M.; VAN LIER, J.B. Sequential anaerobic–aerobic treatment for domestic wastewater – **A review**. **Bioresource Technology**, v. 101 p. 3299–3310, 2010.

KATO, M.T., ANDRADE NETO, C.O., CHERNICHARO, C.A.L., FORESTI, E.E CYBIS, L. F. Configurações de reatores anaeróbios. In: **Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo**. CAMPOS, J. R. (Coord.). Rio de Janeiro: ABES, 1999. p.5 3-99. (Projeto Prosab).

KENT, T.D.; FITZPATRICK, C.S.B.; WILLIAMS, S.C. Testing of biological aerated filter (BAF) media. **Water Science and Technology**, v. 34, n. 3-4, p. 363-370, 1996.

KHANH, D.; QUAN, L.; ZHANG, W.; HIRA, D.; FURUKAWA, K. Effect of temperature on low-strength wastewater treatment by UASB reactor using poly (vinyl alcohol)-gel carrier. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 11147–11154, 2011.

KORDKANDI, S.A.; KHOSHFETRAT, A.B. Influence of carbon/nitrogen ratio and non-aerated zone size on performance and energy efficiency of a partially-aerated submerged fixed-film bioreactor. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 31, p. 257–262, 2015.

KRAIEM, K.; KALLALI, H.; WAHAB, M. A.; FRA-VAZQUEZ, A.; MOSQUERA-CORRAL A.; JEDIDI, N. Comparative study on pilots between ANAMMOX favored conditions in a partially saturated vertical flow constructed wetland and a hybrid system for rural wastewater treatment. **Science of the Total Environment**, v. 670, p. 644–653, 2019.

KUMAR, T.P.; RAHUL, KUMAR, M.A.; CHANDRAJIT, B. Biofiltration of Volatile Organic Compounds (VOCs) – An Overview. **Research Journal of Chemical Sciences**, v. 1, n. 8, p. 83-92, 2011.

KUNZ, A.; STEINMETZ, R.; DAMASCENO, S.; COLDEBELA, A. Nitrogen removal from swine wastewater by combining treated effluent with raw manure. **Scientia Agricola**, v. 69, n. 6, p. 352-356, 2012.

KUNZ, A.; MUKHTAR, S. Hydrophobic membrane technology for ammonia extraction from wastewaters. **Engenharia Agrícola**, v. 36, n. 2, p. 377-386, 2016.

LANDRY, G.M.; MARANGER, R.; BRISSON, J.; CHAZARENC, F. Nitrogen transformations and retention in planted and artificially aerated constructed wetlands. **Water Research**, v. 43, p. 535-545, 2009.

LAW, Y.; YE, L.; PAN, Y.; YUAN, Z. Nitrous oxide emissions from wastewater treatment processes. **Phil. Trans. R. Soc. B**, v. 367, p. 1265–1277, 2012.

LI, S.; CUI, J.; ZHANG, Q.; FU, J.; LIAN, J.; LI, C. Performance of blast furnace dust clay sodium silicate ceramic particles (BCSCP) for brewery

wastewater treatment in a biological aerated filter. **Desalination**, v. 258, p. 12–18, 2010.

LI, X.K.; CHU, Z.R.; LIU, Y.J.; ZHU, M.; YANG, L.; ZHANG, J. Molecular characterization of microbial populations in full-scale biofilters treating iron, manganese and ammonia containing groundwater in Harbin, China. **Bioresource Technology**, v. 147, p. 234–239, 2013.

LI, X.; KAPOORA, V.; IMPELLITERI, C.; CHANDRAN, K.; DOMINGO, J.W.S. Measuring nitrification inhibition by metals in wastewater treatment systems: Current state of science and fundamental research needs. **Critical Reviews in environmental science and technology**, v. 46, n. 3, p. 249–289, 2016.

LIBÂNIO, P.A.C.; CHERNICHARO, C.A.L.; NASCIMENTO, N.O. Dimensão da qualidade de água: avaliação da relação entre indicadores sociais, de disponibilidade hídrica, de saneamento e de saúde pública. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 10, n. 3, p. 219–228, 2005.

LIAO, X.; CHEN, C.; ZHANG, J.; DAI, Y.; ZHANG, L.; XIE, S. Operational performance, biomass and microbial community structure: impacts of backwashing on drinking water biofilter. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, v. 22, p. 546–554, 2015.

LIU, Y.; NGO, H.H.; GUO, W.; PENG, L.; WANG, D.; NI, B. The roles of free ammonia (FA) in biological wastewater treatment processes: A review. **Environment International**, v. 123, p. 10–19, 2019.

LIZAMA, K.; FLETCHER, T.D.; SUN, G. Removal processes for arsenic in constructed wetlands. **Chemosphere**, v. 84, p. 1032–1043, 2011.

LO MONACO, P.A.V.; MATOS, A.T.; BRANDÃO, V.S. Influência da granulometria dos sólidos triturados de sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar como materiais filtrantes no tratamento de águas residuárias da suinocultura. **Engenharia Agrícola**, v. 31, n. 5, p. 974–984, 2011.

LOPES, G.P.R.; RIBEIRO, L.C.J.; TERAN, F.J.C. Estudo do desempenho de um sistema híbrido no tratamento de esgoto sanitário. **HOLOS Environment**, v. 9, n. 2, p. 202–218, 2009.

- LOUPASAKI, E.; DIAMADOPOULOS, E. Attached growth systems for wastewater treatment in small and rural communities: a review. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 88, p. 190–204, 2013.
- LU, H.; CHANDRAN, K.; STENSEL, D. Microbial ecology of denitrification in biological wastewater treatment. **Water Research**, v. 64, p. 237-254, 2014.
- LU, S.; ZHANG, X.; WANG, J.; PEI, L. Impacts of different media on constructed wetlands for rural household sewage treatment. **Journal of Cleaner Production**, v. 127, p. 325-330, 2016.
- LU, L.; WANG, B.; ZHANG, Y.; XIA, L.; AN, D.; LI, H. Identification and nitrogen removal characteristics of *Thauera* sp. FDN-01 and application in sequencing batch biofilm reactor. **Science of the Total Environment**, v. 690, p. 61–69, 2019.
- MAFRA, D.C.B., VILELA, H.S., FRANCO, C.S., CARDOSO, F.O.W., FIA, R. Desempenho do sistema de tratamento de dejetos do canil de Lavras, MG. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA – CONBEA, 42., 2013, Fortaleza, CE. **Anais...** Fortaleza, CE, ago. 2013.
- MAGRI, M.E; ZAGUINI, J.G.; RAMOS, S.R.A.; PHILIPPI, L.S. Otimização do processo de nitrificação com o uso de conchas de ostras como material suporte em reatores aeróbios com biomassa fixa. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 18, n. 2, p. 123-130, 2013.
- MAHMOOD, Q.; PERVEZ, A.; ZEB, B.S.; ZAFFAR, H.; YAQOOB, H.; WASEEM, M.; ZAHIDULLAH, A.S. Natural Treatment Systems as Sustainable Ecotechnologies for the Developing Countries. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-19, 2013.
- MALIK, O.A.; HSU, A.; JOHNSON, L.A.; SHERBININ, A. A global indicator of wastewater treatment to inform the Sustainable Development Goals (SDGs). **Environmental Science & Policy**, v. 48, p. 172-185, 2015.
- MARIN, J.C.A.; CARAVELLI, A.H.; ZARITZKY, N.E. Nitrification and aerobic denitrification in anoxic–aerobic sequencing batch reactor. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 380–387, 2016.
- MARQUES, T.E.D.; BAETA, H.E.; LEITE, M.G.P.; MARTINS, S.V.; KOZOVITS, A.R. Crescimento de espécies nativas de cerrado e de *Vetiveria*

zizanioides em processos de revegetação de voçorocas. **Ciência Florestal**, v. 24, n. 4, p. 843-856, 2014.

MARQUES, M.V.A.; MATOS, A.T.; PEREIRA, A.M.P.; SILVÉRIO, T.H.R.; PENIDO, D. L. A.; COSTA, M.T.M.; SILVA, D.A.P. Potencial, economia de água e adubação com a aplicação de efluente do tratamento preliminar de esgoto doméstico na fertirrigação de capim-elefante. **HOLOS**, Natal, v. 2, p. 52-64, 2017.

MASSOUD, M.A.; TARHINI, A.; NASR, J. Decentralized approaches to wastewater treatment and management: Applicability in developing countries. **Journal of Environmental Management**, v. 90, p. 652–659, 2009.

MATOS, A.T.; FREITAS, W.S.; LO MONACO, P.A.V. Capacidade extratora de diferentes espécies vegetais cultivadas em sistemas alagados utilizados no tratamento de águas residuárias da suinocultura. **Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 4, n. 2, p. 31-45, 2009.

MATOS, A.T.; ABRAHÃO, S.S.; BORGES, A.C; MATOS, M.P. Influência da taxa de carga orgânica no desempenho de sistemas alagados construídos cultivados com forrageiras. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 15, n. 1. p. 83-92, 2010.

MATOS, A.T. **Manual de análise de resíduos sólidos e águas residuárias**. 1. ed. Viçosa: UFV, 2015. 150 p.

MATOS, M.P.; BORGES, A.C.; MATOS, A.T.; SILVA, E.F.; MARTINEZ, M.A. Effect of the time-temperature binomial in obtaining biochemical oxygen demand of different wastewaters. **Engenharia Agrícola**, v. 34, n. 2, p. 332-340, 2014.

MATOS, A.T.; MATOS, M.P. **Disposição de águas residuárias no solo e em sistemas alagados construídos**. 1. ed. Viçosa: UFV, 2017. 371 p.

MATOS, M.P.; VON SPERLING, M.; MATOS, A.T.; MIRANDA, S.T.; SOUZA, T.D.; COSTA, L.M. Key factors in the clogging process of horizontal subsurface flow constructed wetlands receiving anaerobically treated sewage. **Ecological Engineering**, v. 106, p. 588–596, 2017b.

MATOS, M.P.; VON SPERLING, M.; MATOS, A. T. Clogging in horizontal subsurface flow constructed wetlands: influencing factors, research methods and remediation techniques. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, p.1-21, 2018.

MATOS, M.P.; VON SPERLING, M.; MATOS, A.T.; DIAS, D.F.C.; SANTOS, C.R.S. Colmatação e desempenho de sistemas alagados construídos de escoamento horizontal subsuperficial ao longo de oito anos de operação. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 23, n. 6, p. 1227-1237, 2018.

MATOS, M.P.; BORGES, A.C.; MATOS, A.T.; SILVA, E.F.; MARTINEZ, M.A. Modelagem da progressão da DBO obtida na incubação de esgoto doméstico sob diferentes temperaturas. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 22, n. 5, p. 821-828, 2017b.

MEEGODA, J.N.; LI, B.; PATEL, K.; WANG, L.B.A Review of the Processes, Parameters, and Optimization of Anaerobic Digestion. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 15, n. 2224, p. 1-16, 2018.

MENDONÇA, H.V.; RIBEIRO, C.B.M.; NOGUEIRA, K.C.C. Remoção de matéria orgânica e nutrientes de águas residuais de laticínios em sistemas alagados construídos. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 40, n. 1, p. 12-22, 2017.

METCALF & EDDY, Inc. **Wastewater Engineering: Treatment and Reuse**. 4. ed. New York: McGraw-Hill, Inc. 2003, 1819 p.

MINAS GERAIS. Conselho Estadual de Política Ambiental do Estado de Minas Gerais. **Deliberação conjunta COPAM/CERH (Conselho Estadual de Recursos Hídricos), nº 01 de 13 de maio de 2008**. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. 2008. 32 p.

MORATO, J.; CODONY, F.; SANCHEZ, O.; PEREZ, L.M.; GARCÍA, J.; MAS, J. Key design factors affecting microbial community composition and pathogenic organism removal in horizontal subsurface flow constructed wetlands. **Science of the Total Environment**, v. 481, p. 81-89, 2014.

MOTA, F.S.B.; VON SPERLING, M (Coord.). **Nutrientes de esgoto sanitário: utilização e remoção**. Rio de Janeiro: ABES (PROSAB), 2009. 428 p.
MUDLIAR, S.; GIRI, B.; PADOLEY, K.; SATPUTE, D.; DIXIT, R.; BHATT, P.; PANDEY, R.; JUWARKAR, A.; VAIDYA, A. Bioreactors for treatment of VOCs and odours – A review. **Journal of Environmental Management**, v. 91, p. 1039–1054, 2010.

NASCIMENTO, C.A.; STAGGEMEIER, R.; BIANCHI, E.; RODRIGUES, M.T.; FABRES, R.; SOLIMAN, M.C.; BORTOLUZZI, M.; LUZ, R.B.;

- HEINZELMANN, L.S.; SANTOS, E. L.; FLECK, J.D.; SPILKI, F.R. Monitoring of metals, organic compounds and coliforms in water catchment points from the Sinos River basin. **Braz. J. Biol.**, v. 75, n. 2, p. 50-56, 2015.
- NAZ, I.; SAROJ, D.P.; MUMTAZ, S.; ALI, N.; AHMED, S. Assessment of biological trickling filter systems with various packing materials for improved wastewater treatment. **Environ Technol**, v. 36, v. 1-4, p. 424-34, jan./feb. 2015.
- NAZARI-SHARABIAN, A.S.; KARAKOUZIAN, M. Climate Change and Eutrophication: A Short Review. **Engineering, Technology & Applied Science Research**, v 8, n. 6, p. 3668-3672, 2018.
- NITTAMI, T.; OI, H.; MATSUMOTO, K.; SEVIOUR, R.J. Influence of temperature, pH and dissolved oxygen concentration on enhanced biological phosphorus removal under strictly aerobic conditions. **N Biotechnol.**, v. 29, n. 1, p. 2-8, 2011.
- NYENJE, P.M.; FOPPEN, J.W.; UHLENBROOK, S.; KULABAKO, R.; MUWANGA, A. Eutrophication and nutrient release in urban areas of sub-Saharan Africa — A review. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 447-455, 2010.
- ODIGIE, J.O. Harmful effects of wastewater disposal into water bodies: a case review of the Ikpoba river, Benin City, Nigéria. **Tropical Freshwater Biology**, v. 23, p. 87 - 101, 2014.
- OLIVEIRA, S.M.A.; VON SPERLING, M. Avaliação de 166 ETEs em operação no país, compreendendo diversas tecnologias. Parte 1 - Análise de desempenho. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 10, n. 4, p. 347-357, 2005.
- OSHIKI, M.; SEGAWA, T.; ISHII, S. Nitrogen Cycle Evaluation (NiCE) Chip for Simultaneous Analysis of Multiple N Cycle-Associated Genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 8, p. 1-15, 2018.
- OSORIO, F.; HONTORIA, E. Wastewater treatment with a double-layer submerged biological aerated filter, using waste materials as biofilm support. **Journal of Environmental Management**, v. 65, p. 79-84, 2002.
- PANWARE, A.; TONDEE, T.; SOHSALAM, P. Effect of Plant Density in Constructed Wetland on Domestic Wastewater Treating Efficiency.

International Journal of Applied and Physical Sciences, v. 2, n. 1, p.7-12, 2016.

PAPAEVANGELOU, V.; GIKAS, G.D.; TSIHRINTZIS, V.A. Effect of operational and design parameters on performance of pilot-scale horizontal subsurface flow constructed wetlands treating university campus wastewater. **Environ Sci Pollut Res.**, v. 23, p. 19504-19519, 2016.

PELAZ, L.; GOMEZ, A.; LETONA, A.; GARRALON, G.; FDZ-POLANCO, M. Nitrogen removal in domestic wastewater. Effect of nitrate recycling and COD/N ratio. **Chemosphere**, v. 212, p. 8-14, 2018.

PELLISSARI, C.; GUIVERNAU, M.; VINAS, M.; GARCIA, J.; VELASCO, M., SOUZA, S. S.; SEZERINO, P.H.; ÁVILA, C. Effects of partially saturated conditions on the metabolically active microbiome and on nitrogen removal in vertical subsurface flow constructed wetlands, *Water Research*, v.15, p. 141-185, set. 2018.

PELLISSARI, C.; GUIVERNAU, M.; ÁVILA, C.; VINAS, M.; GARCÍA, J.; SEZERINO, P. H. Influência de parâmetros operacionais sobre populações oxidantes de amônia. **Tecnológica**, v. 22, n. 1, p. 1-5, 2018.

PENG, Y.Z.; CHEN, Y.; PENG, C.Y.; LIU, M.; WANG, S.Y.; SONG, X.Q. CUI, Y.W. Nitrite accumulation by aeration controlled in sequencing batch reactors treating domestic wastewater. **Water Science and Technology**, v. 50, n. 10, p. 35-43, 2004.

PEREIRA, A.D.; CABEZAS, A.; ETCHEBEHERE, C.; CHERNICHARO, C.A.L.; ARAÚJO, J.C. Microbial communities in anammox reactors: a review. **Environmental Technology Reviews**, v. 6, n. 1, p.74-93, 2017.

PEREZ-GONZALEZ, A.; URTIAGA, A.M.; IBANEZ, R.; ORTIZ, I. State of the art and review on the treatment technologies of water reverse osmosis concentrates. **Water Research**, v. 46, p. 267-283, 2012.

PIEDRAS, S.R.N.; OLIVEIRA, J.L.R.; MORAES, P.R.R.; BAGER, A. Toxicidade aguda da amônia não ionizada e do nitrito em alevinos de *Cichlasoma facetum* (JENYS, 1842). **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 30, n. 5, p. 1008-1012, 2006.

PRADO, G.C.; CAMPOS, J.R. Determinação da quantidade de areia no esgoto sanitário: metodologia e estudo de caso. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 13, n. 3, p. 306-312, 2008.

- PRAMANIK, B.K.; FATIHAH, S.; SHAHROM, Z.; AHMED, E. Biological aerated filters (BAFs) for carbon and nitrogen removal: A review. **Journal of Engineering Science and Technology**, v. 7, n. 4, p. 428-446, 2012.
- PRATA, R.C.C.; MATOS, A.T.; CECON, P.R.; LO MONACO, P.A.V.; PIMENTA, L.A. Tratamento de esgoto sanitário em sistemas alagados construídos cultivados com lírio-amarelo. **Engenharia Agrícola**, v. 33, n. 6, p. 1144-1155, 2013.
- PRIYA, V.S.; PHILIP, L. Treatment of volatile organic compounds in pharmaceutical wastewater using submerged aerated biological filter. **Chemical Engineering Journal**, v. 266, p. 309-319, 2015.
- QIU, L.; ZHANG, S.; WANG, G.; MAO, D. Performances and nitrification properties of biological aerated filters with zeolite, ceramic particle and carbonate media. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7245-7251, 2010.
- QIU, G.; TING, Y. P. Osmotic membrane bioreactor for wastewater treatment and the effect of salt accumulation on system performance and microbial community dynamics. **Bioresource Technology**, v. 150 p. 287-297, 2013.
- QUAN, Q.; SHEN, B.; ZHANG, Q.; ASHRAF, M.A. Research on Phosphorus Removal in Artificial Wetlands by Plants and Their Photosynthesis. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 59, 2016.
- RAMOS, A.F.; GOMEZ, M.A.; HONTORIA, E.; GONZALEZ-LOPEZ, J. Biological nitrogen and phenol removal from saline industrial wastewater by submerged fixed-film reactor. **Journal of Hazardous Materials**, v. 142, p. 175-183, 2007.
- RAMOS, N.F.S.; BORGES, A.C.; GONÇALVES, G.C.; MATOS, A.T. Tratamento de águas residuárias de suinocultura em sistemas alagados construídos, com *Chrysopogon zizanioides* e *Polygonum punctatum* cultivadas em leito de argila expandida. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 22, n. 1, p. 123-132, 2017.
- RATANATAMSKUL, C.; KONGWONG, J. Impact of intermittent aeration mode on enhancement of biological nutrient removal by the novel prototype IT/OD-MBR (Inclined Tube/Oxidation-Ditch Membrane Bioreactor) for high-rise building's wastewater recycling. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 124, p. 36-44, 2017.

RAY, R.; HENSHAW, P.; BISWAS, N. Effects of reduced aeration in a biological aerated filter. **Can. J. Civ.**, v. 39, p. 432-438, 2012.

RENU, B.; AGARWAL, M.; SINGH, K. Methodologies for removal of heavy metal ions from wastewater: an overview. **Interdisciplinary Environmental Review**, v. 18, n. 2, 2017.

ROCHER, V.; LAVERMAN, A.M.; GASPERI, J.; AZIMI, S.; GUERIN, S.; MOTTELET, S.; VILLIERES, T.; PAUSS, A. Nitrite accumulation during denitrification depends on the carbon quality and quantity in wastewater treatment with biofilters. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, v. 22, p. 10179-10188, 2015.

RODRIGUES, V.A.J.; POSSMOSER-NASCIMENTO, T.E.; PASSOS, R.G.; VON SPERLING, M.; VASEL, J.L. Performance comparison between two equal stabilization ponds operating with and without sludge layer. **Water Science and Technology**, v. 71, n. 6, 2015.

ROOTS, P.; WANG, Y.; ROSENTHAL, A.F.; GRIFFIN, J.S.; SABBA, F.; PETROVIC, M.; YANG, F.; KOZAK, J.A.; ZHANG, H.; WELLS, G.F. Comammox Nitrospira are the dominant ammonia oxidizers in a mainstream low dissolved oxygen nitrification reactor. **Water Research**, v. 157, p. 396-405, 2019.

ROSA, A.P.; CHERNICHARO, C.A.L.; LOBATO, L.C.S.; SILVA, R.V.; PADILHA, R.F.; BORGES, J.M. Assessing the potential of renewable energy sources (biogas and sludge) in a full-scale UASB-based treatment plant. **Renewable Energy**, 2017. Disponível em: <<https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/21575>>. Acesso em: 03 abr. 2019.

RUSCALLEDA, B.M.; BALAGUER, M D.; COLPRIM, J.; PELLICER-NACHER, C.; NI, B.J.; SMETS, B.F.; WANG, R.C. Biological Nitrogen Removal from Domestic Wastewater. **Comprehensive Biotechnology**, p. 329–340, 2011.

RUSSELL, R. Waste not, want not? Evaluating the urban sustainability implications of centralized versus decentralized wastewater treatment in Tijuana, Mexico. **Urban Geography**, v. 35, n. 6, p. 805–821, 2014.

RUSTEN, B. Wastewater treatment with aerated submerged biological filters. **Journal Water Pollution Control Federation**, v. 56, n. 5. p. 424, 1984.

RYU, H.D.; KIM, D.; LIM, H.E.; LEE, S. Nitrogen removal from low carbon-to-nitrogen wastewater in four-stage biological aerated filter system. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 729–735, 2008.

RYU, H.D.; KIM, J.S.; KANG, M.K.; LEE, S. Enhanced nitrification at short hydraulic retention time using a 3-stage biological aerated filter system incorporating an organic polishing reactor. **Separation and Purification Technology**, v. 136, p. 199–206, 2014.

SAEED, T.; SUN, G. A review on nitrogen and organics removal mechanisms in subsurface flow constructed wetlands: Dependency on environmental parameters, operating conditions and supporting media. **Journal of Environmental Management**, v. 112, p. 429–448, 2012.

SAMSÓ, R.; GARCÍA, J. Bacteria distribution and dynamics in constructed wetlands based on modelling results. **Science of the Total Environment**, v. 461–462, p. 430–440, 2013.

SANCHEZ-RAMOS, D.; AGULLO, N.; SAMSÓ, R.; GARCÍA, J. Effect of key design parameters on bacteria community and effluent pollutant concentrations in constructed wetlands using mathematical models. **Science of the Total Environment**, v. 584–585, p. 374–380, 2017.

SANTANA, R.N.; MARQUES, M.V.A.; SILVA, C.G.; RIBEIRO, D.P. Análise da variabilidade espacial dos atributos químicos do solo na remoção de nutriente e da produtividade da *Brachiaria humidicula* utilizada em rampas de escoamento superficial no tratamento de esgoto sanitária operando em condições reais. **Revista Engenharia na Agricultura**, v. 25, n. 1, p.12-26, 2017.

SANTOS, M.O.; PELISSARI, C.; ROUSSO, B.Z.; FREITAS, M.N.; SEZERINO, P.H. Avaliação dos primeiros anos de operação de um wetland construído vertical de fundo saturado aplicado no tratamento de esgoto sanitário. **Tecno-Lógica**, v. 22, n. 1, p. 25-29, 2018.

SARAIVA, C.B.; MATOS, A.T.; MATOS, M.P.; MIRANDA, S.T. Influence of substrate and species arrangement of cultivated grasses on the efficiency of horizontal subsurface flow constructed wetlands. **Engenharia Agrícola**, v. 38, n. 3, p. 417-425, 2018.

SARMENTO, A.P.; BORGES, A.; MATOS, A.T. Evaluation of Vertical-Flow Constructed Wetlands for Swine Wastewater Treatment. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 223, p.1065-1071, 2012.

SARMENTO, A.P.; BORGES, A.C.; MATOS, A.T. Effect of cultivated species and hydraulic retention time on the performance of vertical-flow constructed wetlands. **Environmental Technology**, v. 34, n. 8, p. 961-965, 2013.

SATRIA, A.W.; WIJAYANTI, H.; FEBRIANTI, W.; NUR, M.H.A.; PRASETYA, A. Development of Submerged Biofilter Design for Wastewater Conservation: Carbonaceous Removal Study. **Journal of Science and Applicative Technology**, 2018. Disponível em: <<https://www.neliti.com/publications/281464/development-of-submerged-biofilter-design-for-wastewater-conservation-carbonaceo>>. Acesso em: 03 abr. 2019.

SEEGER, E.M.; MAIER, U.; GRATHWOHL, P.; KUSCHK, P.; KAESTNER, M. Performance evaluation of different horizontal subsurface flow wetland types by characterization of flow behaviour, mass removal and depth-dependent contaminant load. **Water Research**, v. 47, p. 679-680, 2013.

SEZERINO, P.H.; BENTO, A.P.; DECEZARO, S.T.; MAGRI, M.E.; PHILIPPI, L.S. Experiências brasileiras com wetlands construídos aplicados ao tratamento de águas residuárias: parâmetros de projeto para sistemas horizontais. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 20, n. 1, p.151-158, 2015.

SILVA, D.A.P.; MATOS, A.T.; MATOS, M.P. Mineralization of organic matter and productivity of tifton 85 grass (*Cynodon spp.*) in soil incorporated with stabilized sludge from a vertical flow constructed wetland. **Journal of Water Sanitation and Hygiene for Development**, v. 9, p. 309-318, 2019.

SLIEKERS, A.O.; DERWORT N.; CAMPOS GOMEZ, J.L.; STROUS, M.; KUENEN, J G.; JETTEN, M.S.M. Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite in one single reactor. **Water Resource**, v. 36, p. 2475–2482, 2002.

SORIANO, E.; LONDE, L.R.; GREGORIO, L.T.; COUTINHO, M P.; SANTOS, L.B.L. Water crisis in São Paulo evaluated under the disaster's point of view. **Ambiente & Sociedade**, v. XIX, n. 1, p. 21-42, 2016.

SOUZA, A.R. **Avaliação da eficiência do sistema de tratamento de efluentes do canil Parque Francisco de Assis em Lavras-MG**. 2015. 129 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Hídricos em Sistemas Agrícolas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2015.

SOUZA, A.R.; FIA, R.; VILELA, H.S.; MAFRA, D.C.; LANDIM, D.V.; FRANCO, C.S. Efficiency of the treatment system of wastewater at a kennel. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 40, p.1-13, 2018.

SOUZA, A.R.; CARVALHO, M.R.; CRUZ, M.J.M.; FIA, R.; FRANCO, C.S. Desempenho da estação de tratamento de efluentes do canil Parque Francisco de Assis ao longo de seis anos de monitoramento e inclusão de melhorias no sistema de tratamento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 30., 2019, Natal. **Anais...** Natal, 2019.

STAZI, V.; TOMEI, M.C. Enhancing anaerobic treatment of domestic wastewater: State of the art, innovative technologies and future perspectives. **Science of the Total Environment**, v. 635, p. 78–91, 2018.

STEFANAKIS, A.I.; TSIHIRINTZIS, V.A. Effects of loading, resting period, temperature, porous media, vegetation and aeration on performance of pilot-scale vertical flow constructed wetlands. **Chemical Engineering Journal**, v. 181–182, p. 416–430, 2012.

STEFANAKIS, A.I. Constructed Wetlands: description and benefits of an eco-tech water treatment system. In: MCKEOWN, E.; BUGY, G. **Impact of Water Pollution on Human Health and Environmental Sustainability**, Edition: 1st, Chapter: 12, Publisher: IGI, 2015.

STOKES, A.A.F.; MELOGNO, L.R.; DESHUSSES, M.A. Nitrifying trickling filters and denitrifying bioreactors for nitrogen management of high-strength anaerobic digestion effluent. **Chemosphere**, v. 204, p. 119-129, 2018.

SUN, N.; GE, C.; AHMAD, H.A.; GAO, B.; NI, S.Q. Realization of microbial community stratification for single-stage nitrogen removal in a sequencing batch biofilter granular reactor. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 681–691, 2017.

TAGLIATTI, C. **Avaliação do efeito de diferentes tempos de aeração em filtro biológico aerado submerso na remoção de matéria orgânica e nitrogenada**. 2019. 79 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologias e Inovações Ambientais) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019.

TAO, C.; PENG, T.; FENG, C.; CHEN, N.; HUA, Q.; HAO, C. The feasibility of an up-flow partially aerated biological filter (U-PABF) for nitrogen and COD removal from domestic wastewater. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 307–317, 2016.

TAYLOR, C.R.; HOOK, P.B.; STEIN, O.R.; ZABINKSI, C.A. Seasonal effects of 19 plant species on COD removal in subsurface treatment wetland microcosms. **Ecological Engineering**, v. 37, n. 5, p.703–710, 2011.

TEE, H.C.; SENG, C.E.; NOOR, A.M.; LIM, P.E. Performance comparison of constructed wetlands with gravel- and rice husk-based media for phenol and nitrogen removal. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 3563–3571, 2009.

TEIXEIRA, D.L.; MATOS, A.T.; MATOS, M.P.; VIEIRA, D.P.; ARAÚJO, E.D.; FERRAZ, L.A. The influence of plant roots on the clogging process and the extractive capacity of nutrients/pollutants in horizontal subsurface flow constructed wetlands. **Ecological Engineering**, v. 120, p. 54–60, 2018.

TOPARE, N.S.; ATTAR, S.J.; MANFE, M.M. Sewage/wastewater treatment technologies: a review. **Sci. Revs. Chem. Commun.**, v. 1, n. 1, p. 18-24, 2011.

TORRIJOS, V.; GONZALO, O.G.; TRUEBA-SANTISO, A.; RUIZ, I.; SOTO, M. Effect of by-pass and effluent recirculation on nitrogen removal in hybrid constructed wetlands for domestic and industrial wastewater treatment. **Water Research**, v. 103, p. 92-100, 2016.

TOSCANO, A.; MARZO, A.; MILANI, M.; CIRELLI, G.; BARBAGALLO, S. Comparison of removal efficiencies in Mediterranean pilot constructed wetlands vegetated with different plant species. **Ecological Engineering**, v. 75, p. 155–160, 2015.

TURKER, O.C.; TURE, C.; YAKAR, M.; SAZ, C. Engineered wetland reactors with different media types to treat drinking water contaminated by boron (B). **Journal of Cleaner Production**, v. 168, p. 823-832, 2017.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. **Manual**. Constructed Wetlands Treatment of Municipal Wastewaters. Cincinnati, USA: EPA/625/R-99/010, 2000. 165 p.

VERHOFSTAD, M.J.J.M.; POELEN, M.D.M.; VAN KEMPEN, M.M.L.; BAKKER, E.S.; SMOLDERS, A.J.P. Finding the harvesting frequency to maximize nutrient removal in a constructed wetland dominated by submerged aquatic plants. **Ecological Engineering**, v. 106, p. 423–430, 2017.

VIEIRA, P.C.; VON SPERLING, M.; NOGUEIRA, L.C.M.; ASSIS, B.F.S. Performance evaluation of a novel open trickling filter for the post-treatment of

anaerobic effluents from small communities. **Water Science and Technology**, v. 67, n. 12, p. 2746-2752, 2013.

VILELA, C.L.S.; BASSIN, J.P.; PEIXOTO, R.S. Water contamination by endocrine disruptors: Impacts, microbiological aspects and trends for environmental protection. **Environmental Pollution**, v. 235, p. 546-559, 2018.

VON SPERLING, M. **Lagoas de estabilização: Princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. 3. ed. Belo Horizonte: UFMG, 2017. V. 3. 196 p.

VON SPERLING, M. **Princípios básicos do tratamento de esgotos: Princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. 2. ed. Belo Horizonte: UFMG. V. 2, 2016. 211p.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos: Princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. 4. ed. Belo Horizonte: UFMG, 2014. V. 1, 472 p.

VON SPERLING, M. **Lodos ativados: Princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. 3. ed. Belo Horizonte: UFMG, 2012, V. 4. 484 p.

VON SPERLING, M.; CHERNICHARO, C.A.L. **Biological Wastewater Treatment in Warm Climate Regions**. IWA Publishing, 2015.

VON SPERLING, M.; SEZERINO, P. H. **Dimensionamento de wetlands construídos no Brasil. Boletim Wetlands Brasil**. Dezembro de 2018. 65 p. (Edição Especial). Disponível em: <<http://gesad.ufsc.br/boletins/>>. Acesso em: 13 abr. 2019.

VON SPERLING, M.; SALAZAR, B.L. Determination of capital costs for conventional sewerage systems (collection, transportation and treatment) in a developing country. **Water, Sanitation and Hygiene for Development**, v. 3 n. 3, p. 365-374, set. 2013.

VYMAZAL, J. Removal of nutrients in various types of constructed wetlands. **Science of the Total Environment**, v. 380, p. 48–65, 2007.

VYMAZAL, J. Plants used in constructed wetlands with horizontal subsurface flow: a review. **Hydrobiology**, v. 674, p.133-156, 2011.

VYMAZAL, J.; KROPFELOVÁ, L. Multistage hybrid constructed wetland for enhanced removal of nitrogen. **Ecological Engineering**, v. 84, p. 202–208, 2015.

WANG, B.; WANG, W.; HAN, H.; HU, H.; ZHUANG, H. Nitrogen removal and simultaneous nitrification and denitrification in a fluidized bed step-feed process. **Journal of Environmental Sciences**, v. 24, n. 2, p. 303-308, 2012.

WANG, K.; WANG, S.; ZHU, R.; MIAO, L.; PENG, Y. Advanced nitrogen removal from landfill leachate without addition of external carbon using a novel system coupling ASBR and modified SBR. **Bioresource Technology**, v. 134, p. 212–218, 2013.

WANG, W.; DING, Y.; ULLMAN, J.L.; AMBROSE, R.F.; WANG, Y.; SONG, X.; ZHAO, Z. Nitrogen removal performance in planted and unplanted horizontal subsurface flow constructed wetlands treating different influent COD/N ratios. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, v. 23, p. 9012–9018, 2016.

WANG, Q.; DUAN, H.; WEI, W.; NI, B.J.; LALOO, A.; YUAN, Z. Achieving Stable Mainstream Nitrogen Removal via the Nitrite Pathway by Sludge Treatment Using Free Ammonia. **Environ. Sci. Technol.**, v. 51, p. 9800–9807, 2017.

WEN, Y.; XU, C.; LIU, G.; CHEN, Y.; ZHOU, Q. Enhanced nitrogen removal reliability and efficiency in integrated constructed wetland microcosms using zeolite. **Front. Environ. Sci. Engin.**, v. 6, n. 1, p. 140–147, 2012.

WIELGOSZ, E.; JOZWIAKOWSKI, K.; BIELINSKA, E.J. Numbers of ammonifying, nitrifying and denitrifying bacteria in sewage treated in a system of biological stabilisation ponds. **Teka Kom. Ochr. Kszt. Środ. Przyr.**, v. 7, p. 446–456, 2010.

WIK, T. Trickling filters and biofilm reactor modelling. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 2, p. 193–212, 2003.

WILDERER, P.A.; SCHREFF, D. Decentralized and centralized wastewater management: a challenge for technology developers. **Water Science and Technology**, v. 41 n. 1, p. 1-8, 2000.

XU Q; CUI, L; ZHANG L.; LI, Z.; GUANGWEI, Y. The effect of two factor combination of three kinds of loading on the soil clogging in vertical flow constructed wetland. **Front Environ Sci**, v. 2, n. 4, p. 56–63, 2013.

YALCUK, A.; UGURLU, A. Comparison of horizontal and vertical constructed wetland systems for landfill leachate treatment. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2521–2526, 2009.

YANG, Z.; WANG, Q.; ZHANG, J.; XIE, H.; FENG, S. Effect of Plant Harvesting on the Performance of Constructed Wetlands during Summer. **Water**, v. 8, n. 24, p. 1-10, 2016.

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

YIN, H.; YAN, X.; GU, X. Evaluation of thermally-modified calcium-rich attapulgite as a lowcost substrate for rapid phosphorus removal in constructed wetlands. **Water Research**, v. 115, p. 329-338, 2017.

ZENG, R.J.; LEMAIRE, R.; YUAN, Z.; KELLER, J. Simultaneous Nitrification, Denitrification, and Phosphorus Removal in a Lab-Scale Sequencing Batch Reactor. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 84, n. 2, p. 170-188, 2003.

ZHANG, L.Y.; ZHANG, L.; LIU, Y.D.; SHEN, Y.W.; LIU, H.; XIONG, Y. Effect of limited artificial aeration on constructed wetland treatment of domestic wastewater. **Desalination**, v. 250, p. 915–920, 2010.

ZHANG, M.; LIU, G. H.; SONG, K.; WANG, Z.; ZHAO, Q.; LI, S.; YE, Z. Biological treatment of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) red water by immobilized anaerobic–aerobic microbial filters. **Chemical Engineering Journal**, v. 259, p. 876–884, 2015.

ZHANG, Q.; WANG, C.; JIANG, L.; QUI, L.J.; WANG, J.; HE, X. Impact of dissolved oxygen on the microbial community structure of an intermittent biological aerated filter (IBAF) and the removal efficiency of gasification wastewater. **Bioresource Technology**, v. 255, p. 198–204, 2018.

ZHOU, Q.; ZHU, H.; BANUELOS, G.; YAN, B.; LIANG, Y.; YU, X.; CHENG, X.; CHEN, L. Effects of Vegetation and Temperature on Nutrient Removal and Microbiology in Horizontal Subsurface Flow Constructed Wetlands for Treatment of Domestic Sewage. **Water Air Soil Pollut.**, v. 228, n. 95, p. 1-13, 2017.

ZHOU, X.; WU, S.; WU, S.; WANG, R.; WU, H. Nitrogen removal in response to the varying C/N ratios in subsurface flow constructed wetland microcosms with biochar addition. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 3382–3391, 2019.

ZOPPAS, F.M.; BERNARDES, A.M.; MENEGUZZI, A. Parâmetros operacionais na remoção biológica de nitrogênio de águas por nitrificação e desnitrificação simultânea. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 21, n. 1, p. 29-42, 2016.

**ARTIGO I – PÓS-TRATAMENTO DE EFLUENTE DE CANIL EM
FILTRO BIOLÓGICO AERADO SUBMERSO, COM DIFERENTES
ESTRATÉGIAS DE AERAÇÃO, SEGUIDO POR SISTEMAS
ALAGADOS CONSTRUÍDOS PARA REMOÇÃO DE NITROGÊNIO**

RESUMO: Sistemas anaeróbios e aeróbios combinados é uma alternativa para potencializar o tratamento de efluentes. Como é necessário encontrar alternativas que aliem desempenho, economia e simplicidade operacional, objetivou-se avaliar o efeito da introdução do tratamento complementar aeróbio, composto por um filtro biológico aerado submerso (FBAS) com decantador secundário (DS), seguido de sistemas alagados construídos de escoamento horizontal subsuperficial (SAC), após tratamento por tanque séptico-filtro anaeróbio, na capacidade de remoção de poluentes em diferentes fases de aeração (F1, F2 e F3), na estação de tratamento de efluentes do canil Parque Francisco de Assis (PFA). Sendo F1 e F2 com 7 e 5 horas diárias de aeração, respectivamente, e F3 com aeração intermitente a cada 2 horas. As fases foram monitoradas quanto a eficiência de remoção de matéria orgânica (DBO, DQO), sólidos, nutrientes (N, P), coliformes e detecção de *Giardia* e *Cryptosporidium* pela técnica de PCR. Verificou-se que, o pós-tratamento, proporcionou maior remoção de DQO e N, principalmente, e que a estratégia de aeração da F3 apresentou eficiências médias de 71% para remoção de DQO e 77% de DBO (com relação DBO/DQO afluente média de 0,3), as quais são superiores à F1 e F2. O FBAS e DS removeram N, por nitrificação e desnitrificação, restando 18 mg L⁻¹ de NTK (Nitrogênio Total Kjeldahl) de concentração efluente. O SAC apresentou potencial para nitrificação e desnitrificação simultânea, além da filtração dos sólidos. O sistema não removeu satisfatoriamente coliformes termotolerantes - CTerm (1±0 log). A PCR confirmou a presença dos patógenos *Giardia* e *Cryptosporidium*, em todas as unidades do pós-tratamento nas F1 e F2 estudadas. De forma geral, o pós-tratamento anaeróbio da água residuária do PFA com FBAS, DS e SAC potencializou as eficiências da ETE-PFA.

PALAVRAS CHAVE: *Cryptosporidium*. Dejetos de cães. *Giardia*. Tratamento aeróbio. Tratamento anaeróbio.

**POST-TREATMENT OF KENNEL EFFLUENT IN SUBMERGED
BIOLOGICAL AERATED FILTER, WITH DIFFERENT AERATION
STRATEGIES, FOLLOWED BY CONSTRUCTED WETLANDS FOR
REMOVAL OF NITROGEN**

ABSTRACT: Combined anaerobic and aerobic systems are an alternative for enhancing effluent treatment. As it is necessary to find alternatives that combine performance, economy and operational simplicity, the present work aimed to evaluate the effect of the introduction of aerobic complementary treatment, composed by a submerged biological aerated filter (SBAF) with secondary clarifier (SC), followed by subsurface horizontal flow constructed wetland (CW), after treatment by anaerobic septic tank-filter, in the capacity to remove pollutants in different aeration phases (F1, F2 e F3) at the Parque Francisco de Assis (PFA) kennel wastewater treatment plant. Being F1 and F2 with 7 and 5 hours of daily aeration, respectively, and F3 with intermittent aeration every 2 hours. The phases were monitored for removal efficiency of organic matter (BOD, COD), solids, nutrients (N, P), coliforms and detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* by PCR. Post-treatment resulted in higher COD and N removal, mainly, and the F3 presented average efficiencies of 71% for COD removal and 77% of BOD (with mean affluent BOD/COD ratio of 0,3). SBAF and SC removed N by nitrification and denitrification, remaining 18 mg L⁻¹ of NTK (Total Nitrogen Kjeldahl) effluent concentration. The CW showed potential for simultaneous nitrification and denitrification, besides the filtration of solids. The system did not satisfactorily remove thermotolerant coliforms - CTerm (1 ± 0 log). PCR confirmed the presence of pathogens *Giardia* and *Cryptosporidium* in all post-treatment units in the studied F1 and F2. In general, post-treatment anaerobic of PFA wastewater with SBAF, SC and CW enhanced the efficiencies of ETE/PFA.

KEY WORDS: Aerobic treatment. Anaerobic treatment. *Cryptosporidium*. Dog waste. *Giardia*.

1 INTRODUÇÃO

A ausência ou ineficiência do tratamento de águas residuárias antes do seu retorno ao meio ambiente, pode implicar em redução dos níveis de oxigênio dissolvido (OD) e eutrofização do meio aquático. Além disso, pode causar contaminação com microplásticos, desreguladores endócrinos; metais pesados e organismos patogênicos (GAO et al., 2012; FOWLER et al., 2013; EERKES-MEDRANO; THOMPSON; ALDRIDGE, 2015; NASCIMENTO et al., 2015; NAZARI-SHARABIAN; AHMAD; KARAKOUZIAN, 2018; VILELA; BASSIN; PEIXOTO, 2018). Nesse contexto, torna-se fundamental o tratamento de águas residuárias.

Sobre a água residuária de criatório de cães, e do seu tratamento, ainda há poucos estudos, no entanto, observa-se haver elevada concentração de sólidos, presença de organismos patogênicos, elevada relação DQO/DBO e concentração de nutrientes superior a encontrada no esgoto sanitário (JAWORSKI; HICKLEY, 1962; SOUZA et al., 2018). Por conseguinte, o efluente produzido em canis também requer o tratamento biológico adequado antes do lançamento no ambiente aquático.

No Brasil, um grande número de Estações de Tratamento de Efluentes (ETEs) ainda é composto apenas por etapas primária e secundária anaeróbia, o que é insuficiente para redução da concentração de nutrientes, como o nitrogênio e outros compostos, antes do lançamento em curso d'água (CHERNICHARO et al., 2015; BRASIL, 2017).

Para a remoção biológica de nitrogênio é necessário a alternância de condições aeróbias e anóxicas, para que haja a nitrificação e desnitrificação, e/ou aconteça a absorção de suas formas inorgânicas (ZOPPAS et al., 2016; WANG et al., 2016). A desnitrificação é dificultada em ETEs convencionais, pois, para que haja a redução de NO_3^- a N_2 , os organismos heterotróficos precisam de uma

fonte de carbono orgânico, sendo que boa parte dos compostos orgânicos são removidos em etapas anteriores (MARIN; CARAVELLI; ZARITZKY, 2016). Como estratégias operacionais para elevar a capacidade de desnitrificação, tem-se realizado a recirculação do efluente, com nitratos, passando de parte da água residuária bruta para a zona anóxica e a introdução de fontes externas de matéria orgânica (KUNZ et al., 2012; CAPODAGLIO; HLAVÍNEK; RABONI, 2016; TORRIJOS et al., 2016), no entanto, são procedimentos mais complexos.

Em reatores de crescimento aderido como biofiltros (BFAS) e filtros biológicos aerados submersos (FBAS), dependendo da capacidade de formação de biofilme, pode haver a coexistência de zonas aeróbias e anóxicas, favorecendo a remoção de N (ROCHER et al., 2015; PELAZ et al., 2018). Porém, para que haja maior potencial de ocorrência de nitrificação e desnitrificação simultâneas (NDS), deve-se fornecer baixas concentrações de oxigênio dissolvido (OD), que podem ser alcançadas com reduzidas taxas de aeração ou a insuflação intermitente de ar (ILYAS; MASIH, 2017; PELAZ et al., 2018). Além disso, a operação com a menor introdução de ar no reator reduz os custos com energia elétrica, podendo ser acessível para instalação em um maior número de ETEs.

Outra tecnologia de tratamento que pode ser empregada na remoção de N, são os sistemas alagados construídos de escoamento horizontal subsuperficial (SACs-EHSS), unidades caracterizadas pela presença de plantas, que proporcionam tanto a absorção de poluentes quanto a criação de microzonas aeradas, em meio ao ambiente predominantemente anóxico e anaeróbio, permitindo nitrificação e desnitrificação no próprio leito (CAMACHO et al., 2007; TEE et al., 2009; COBAN et al., 2015). Inclusive, a desnitrificação parece ser mais importante na redução da concentração de NO_3^- , enquanto a absorção pelas plantas contribui significativamente na remoção de NH_4^+ (HALLIN et al., 2015; WANG et al., 2016; GARGALLO et al., 2017). Dado esse potencial, os

menores custos, e a simplicidade de construção, operação e manutenção, os SACs têm sido indicados como soluções descentralizadas para o tratamento de efluentes (AVELLÁN; GREMILLION, 2019).

Dessa forma, a conjugação de FBAS e SACs-EHSS, que já se mostrou efetiva na remoção de diferentes poluentes em diversas águas residuárias, pode auxiliar na redução da carga de N e outros compostos lançados no ambiente, como matéria orgânica e sólidos (LIZAMA; FLETCHER; SUN, 2011; HE et al., 2013; LI et al., 2013; AVELAR et al., 2014; PRIYA; PHILIP, 2015; TAO et al., 2016; RAMOS et al., 2017).

Avaliando as características da água residuária de um canil, Souza et al. (2018) observaram que o tratamento composto por fossa-filtro anaeróbio e tanques de estabilização (operando como lagoas anaeróbias) não foi suficiente para atender aos padrões para lançamento em cursos d'água, sendo necessário instalar um pós-tratamento. Assim, torna-se importante estabelecer alternativas de tratamento que aliem desempenho, economia e simplicidade operacional e de manutenção.

Assim, o presente trabalho objetivou avaliar o efeito da introdução do pós-tratamento aeróbio, composto por FBAS e SACs-EHSS, e o efeito de diferentes estratégias de aeração no FBAS, para a remoção de poluentes da estação de tratamento de águas residuárias de um canil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

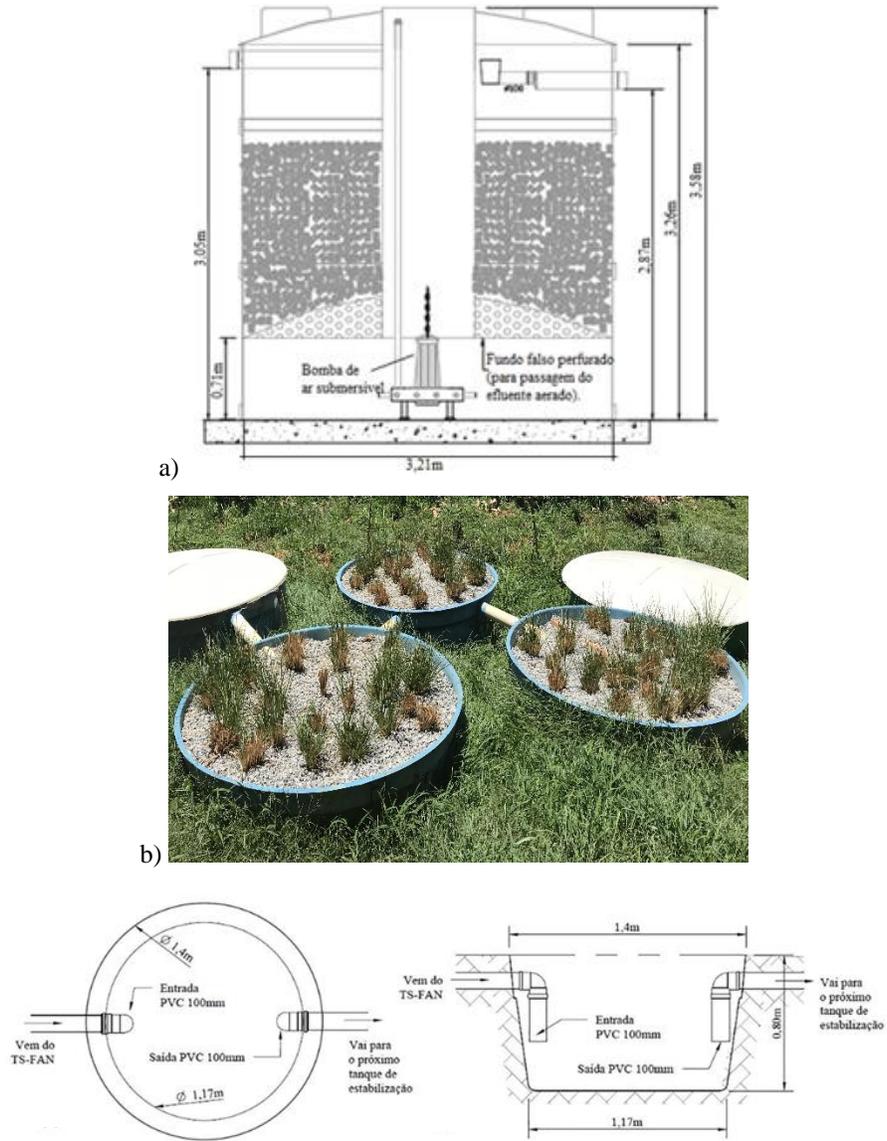
2.1 Descrição da água residuária e do sistema de tratamento

A água residuária é gerada no canil Parque Francisco de Assis (PFA), em batelada, durante as atividades de lavagem das baias (7 horas contínuas diárias), de cerca de 450 cães, após a raspagem dos dejetos sólidos. É

encaminhada à ETE-PFA, com vazão média diária de $0,08 \text{ L s}^{-1}$ e TDH de 12h, composta por tratamento preliminar por gradeamento e primário, em um decantador de 4 m^3 , que recebe a maior parte do efluente a ser tratado. Logo após, a água residuária é direcionada para uma unidade de tratamento primário/secundário constituída de um tanque séptico-filtro anaeróbio (TS-FAN) com 10 m^3 de capacidade cada (FRANCO et al., 2018).

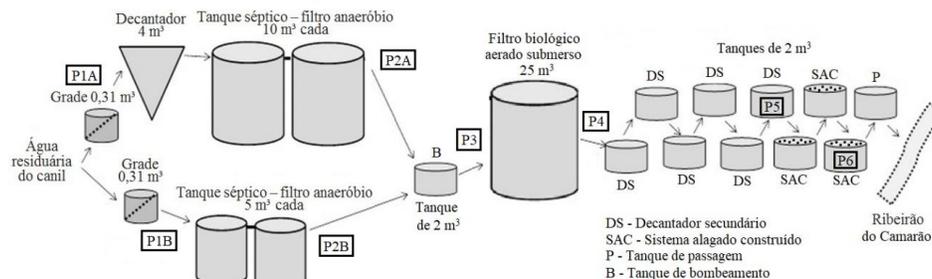
Por motivo de desnível do terreno, o restante do efluente gerado é direcionado para outro gradeamento seguido de tanque séptico-filtro anaeróbio com 5 m^3 de capacidade cada (SOUZA et al., 2018). Os efluentes das unidades anaeróbias são conduzidos em conjunto para um tanque de 2 m^3 , de onde o efluente é bombeado para um filtro biológico aerado submerso (FBAS) de 25 m^3 , preenchido com pedra de mão até o fundo falso que abriga o aerador (FIGURA 2a), seguido de 6 tanques de 2 m^3 em série que operam como decantadores secundários (DS), para reter o lodo gerado após o FBAS. E, por fim, passam por 4 tanques de 2 m^3 em série, dos quais, 3 são sistemas alagados construídos (SAC) horizontais preenchidos com brita zero e cultivados com capim-vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) (FIGURA 2b) e o último é uma caixa de passagem e filtração preenchida com brita zero. O efluente tratado é lançado no Ribeirão do Camarão (FIGURA 3) (FRANCO et al., 2018).

Figura 2 - a) Filtro Biológico Aerado Submerso (FBAS) e b) Sistemas Alagados Construídos da ETE do Parque Francisco de Assis de Lavras-MG.



Fonte: Da autora (2019).

Figura 3 - Diagrama esquemático do sistema de tratamento da água residuária gerada na lavagem das baias dos cães do Parque Francisco de Assis de Lavras-MG, com os pontos de coleta e monitoramento.



Fonte: Franco et al. (2018).

2.2 Fases de aeração e monitoramento do sistema

Em todas as etapas do tratamento foram monitoradas as variáveis físicas, químicas e microbiológicas, por meio de coletas do efluente nos seguintes pontos (FIGURA 2): P1A: gradeamento do sistema TS-FAN maior; P1B: gradeamento do sistema TS-FAN menor; P2A: após TS-FAN maior; P2B: após TS-FAN menor; P3: Tanque de bombeamento do efluente AB (afluente do FBAS); P4: efluente do FBAS; P5: efluente do último DS; e P6: efluente do último SAC.

O monitoramento ocorreu em períodos de diferentes tempos de aeração do FBAS, com taxa de aplicação de oxigênio de $0,00028 \text{ kg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ de O_2 . Classificou-se estes períodos em Fase 1 (F1), Fase 2 (F2) e Fase 3 (F3), em que a variação da aeração ocorreu entre 9 h e 16 h, período de geração da água residuária (TABELA 7).

Tabela 7 - Tempo de aeração, período de monitoramento e taxa de aplicação de oxigênio das fases analisadas.

Fases	Tempo de aeração	Período de monitoramento	Taxa de aplicação kg L ⁻¹ d ⁻¹ de O ₂
F1	Igual ao período de geração do efluente, das 9 às 16 horas (7 horas diárias ininterruptas)	5 meses (de agosto de 2017 à 9 de janeiro de 2018)	0,00196
F2	Aeração menor que a F1, das 9 às 14 horas (5 horas diárias ininterruptas)	6 meses (de 29 janeiro a julho de 2018)	0,00140
F3	Aeração intermitente (a cada duas horas, por 24 horas)	Aproximadamente 3 meses (de setembro a dezembro de 2018)	0,00336

Fonte: Da autora (2019).

2.3 Análises físicas, químicas e microbiológicas

Para as análises físicas e químicas foram realizadas amostragens simples semanais da água residuária em todos os pontos de monitoramento, em frasco de polietileno previamente limpo, durante o período de duração de cada fase.

As variáveis analisadas no Laboratório de Águas Residuárias do Núcleo de Engenharia Ambiental e Sanitária do Departamento de Recursos Hídricos e Saneamento da Universidade Federal de Lavras (UFLA) foram pH, pelo método potenciométrico; sólidos totais (ST) e suspensos (SS) por gravimetria; demanda bioquímica de oxigênio (DBO) por titulação do oxigênio dissolvido, pelo método de Winkler após 5 dias de incubação da amostra a 20 °C; fósforo total (PT) pelo método do complexo vanadatomolibdato e dosagem colorimetricamente em espectrofotometria, demanda química de oxigênio (DQO) por colorimetria, após digestão da amostra em refluxo fechado, nitrogênio total Kjeldahl (NTK) pelo método micro-Kjeldahl, nitrito (NO₂⁻) por colorimetria, pelo método da sulfanilamida, nitrato (NO₃⁻) por colorimetria, pelo método do salicilato, e coliformes termotolerantes (CTerm), pelo método de

fermentação por tubos múltiplos. Todas as metodologias seguiram o recomendado em APHA, AWWA e WEF (2005).

A partir dos resultados obtidos semanalmente, foram calculadas as eficiências de remoção em cada unidade de tratamento, e no sistema como um todo.

Os dados foram submetidos ao teste de Tukey a um nível de significância de 5%, para avaliar se as médias eram estatisticamente diferentes entre si. O teste foi realizado no programa STATISTICA®.

2.4 Extração de DNA e análise molecular por PCR para detecção de *Giardia* e *Cryptosporidium*

Utilizou-se a última amostra do FBAS, DS e SAC (P4, P5 e P6) das fases de aeração 1 e 2 (obtendo-se uma microbiota mais adaptada à condição de cada fase) para a detecção, por *Polymerase chain reaction* (PCR), dos protozoários *Giardia* e *Cryptosporidium*. As amostras passaram por procedimentos básicos de sedimentação e separação do lodo. O lodo foi pipetado (2 mL a 5 mL), armazenado em tubos Eppendorf, e encaminhados ao Laboratório de Microbiologia de Água e Esgoto do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Minas Gerais.

As amostras com o lodo foram centrifugadas a 4.000 rpm por 20 minutos, lavadas por três vezes com tampão fosfato-salino (PBS 1X, NaCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, pH = 7,2-7,4), pesadas e armazenadas a -20 C°.

Procedeu-se extração do DNA genômico utilizando o kit FastDNATM Spin for Soil (MP Biomedicals), a partir de 0,5 g de todas as amostras, de acordo com as instruções do fabricante. Alíquotas de 3,0 µL do DNA extraído das amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,2% (80 volts, 40

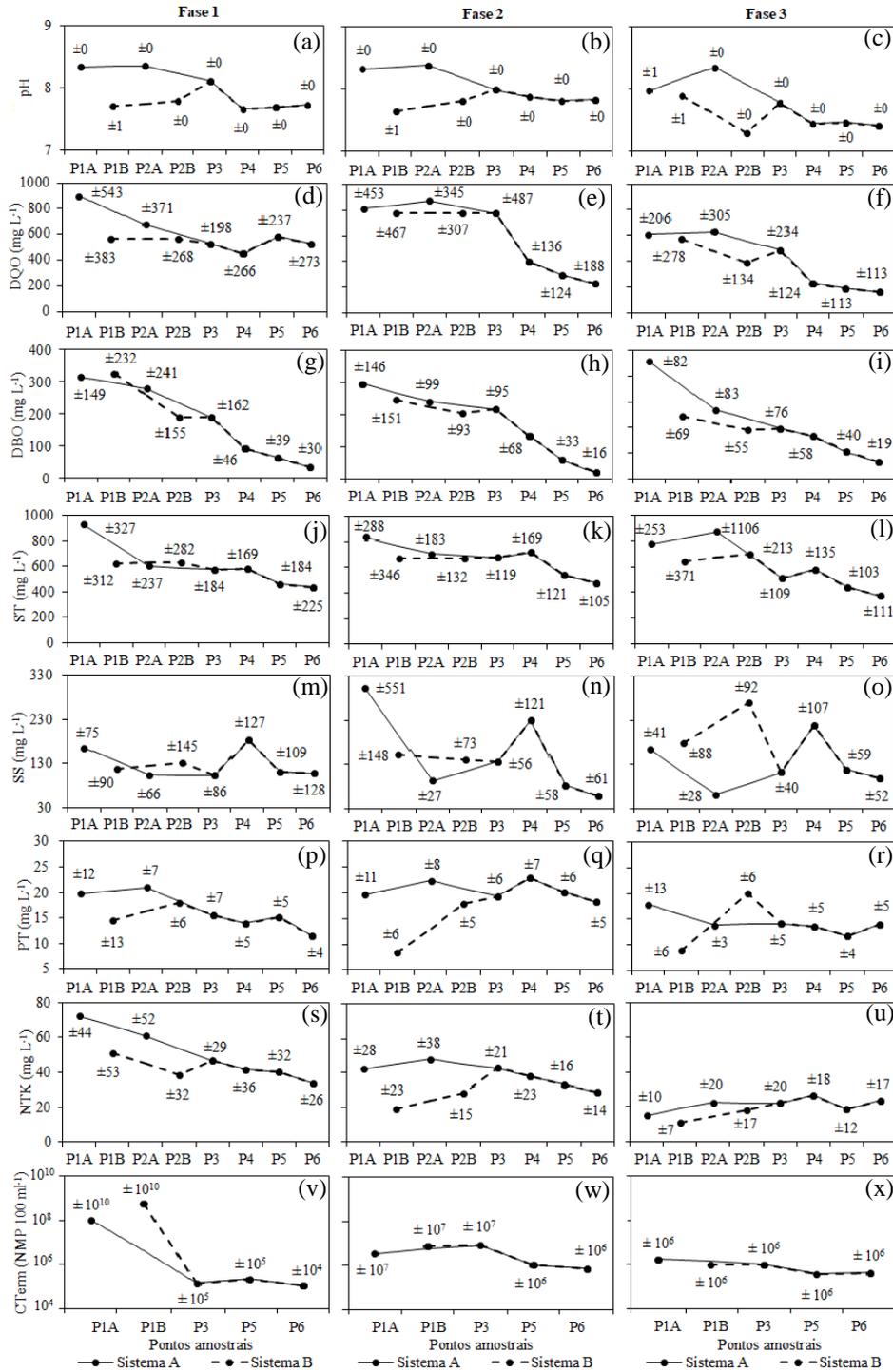
minutos), para a verificação do resultado e posterior quantificação em espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

Para a realização do PCR foram utilizados os *primers* P214F-P214F para *Giardia* e P702F-P702R para *Cryptosporidium* a uma concentração de 30 pmol μL^{-1} . Pré-mix da marca Phoneutria foi utilizado na PCR, contendo tampão de uso padrão, nucleotídeos e a enzima taq polimerase. A temperatura de anelamento seguiu as especificações de cada primer. A presença e o tamanho dos fragmentos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1%, com alíquota de 2 μL do produto da PCR. Os controles negativos contendo apenas o reagente da PCR e a água ultrapura utilizada foram realizados para controle de qualidade das reações.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do monitoramento físico-químico e microbiológico estão apresentados na Figura 4 e serão discutidos, a seguir, por etapas de tratamento (sistema anaeróbio A+B e pós-tratamento aeróbio) e sistema completo.

Figura 4 - Valores médios e desvio padrão de pH, DQO, DBO, ST, SS, PT e NTK, médias geométricas com desvio padrão de CTerm, das unidades ETE-PFA, nas diferentes fases de aeração.



Fonte: Da autora (2019).

3.1 Sistema anaeróbio A e B

Os valores médios de pH afluente aos dois sistemas de tratamento anaeróbios (FIGURA 3 a, b, c) foram superiores ao valor típico (7,0) em esgotos domésticos (VON SPERLING, 2017), ao encontrado por Silva e Souza (2011) no TS-FAN estudado (7,3), e também à faixa ótima de pH para o desenvolvimento das arqueias metanogênicas (6,6 - 7,4) (CHERNICHARO, 2007). Portanto, o sistema pode não estar apresentando boas condições para a degradação microbiológica, necessitando de intervenções de controle do pH.

No sistema B, o pH permaneceu dentro da faixa de variação apresentada por Von Sperling (2017) (que é de 6,7 a 8,0), porém, no sistema A, o pH foi superior, possivelmente devido a presença de algumas substâncias químicas no efluente gerado na lavagem das baias. O que se deve provavelmente ao fato de que esse sistema abrange algumas das baias destinadas ao abrigo de cães em tratamento, que recebem medicação, ou que passaram por intervenções cirúrgicas.

Aliado a esta hipótese, as concentrações médias de DQO (FIGURA 3 d, e, f) encontradas no sistema A, nas três fases, foram maiores que no B. E em ambos os sistemas é maior que a média observada por Souza et al. (2018), de 334 mg L⁻¹, nos mesmos reatores do PFA. No entanto, as concentrações médias de entrada em ambos os sistemas estão dentro faixa de variação comumente encontrada em esgoto doméstico (450 - 800 mg L⁻¹) (VON SPERLING, 2017).

A relação DBO/DQO média do afluente ao sistema, obtida a partir dos dados apresentados na Figura 3 (d, e, f, g h, i) demonstrou que este é um efluente com baixa biodegradabilidade, de 0,3 na F1 e 0,4 nas F2 e F3, mostrando que a fração inerte é elevada. Esta característica pode ser atribuída à presença de pelos dos cães, óleos e graxas, produtos de limpeza, higiene e medicamentos utilizados

no tratamento dos cães (SOUZA, et al., 2018; VON SPERLING, 2017; AFFANDI et al., 2014; KORNILŁOWICZ-KOWALSKA; BOHACZ, 2011; MERRETTIG-BRUNS, JELEN, 2009).

Giustina, Miranda e Monteggia (2010) encontraram concentrações de DQO em efluente sanitário bruto próximas à média afluente da ETE-PFA, porém, com biodegradabilidade de 0,6. A baixa biodegradabilidade encontrada no efluente do PFA não impede, mas pode dificultar o tratamento biológico e, conseqüentemente, a eficiência satisfatória de remoção de matéria orgânica (VON SPERLING, 2017).

As eficiências médias de remoção de matéria orgânica (DBO e DQO) nos sistemas A e B não foram satisfatórias, pois não alcançaram a remoção esperada para estas unidades de tratamento, de 80 a 85% para DBO e de 70 a 80% para DQO (VON SPERLING, 2017), e também não atenderam ao exigido na legislação para disposição em cursos d'água, de 75% para DBO e 70% para DQO (MINAS GERAIS, 2008) (TABELA 8). As concentrações finais também foram superiores ao máximo permitido para lançamento no corpo hídrico (60 mg L⁻¹ de DBO e 180 mg L⁻¹ de DQO), de 226 e 172 mg L⁻¹ de DBO e 751 e 616 mg L⁻¹ de DQO, nos sistemas A e B respectivamente, sem diferença significativa (p>0,05) quando comparadas as entradas e as saídas dos sistemas. O que justifica a fase aeróbica seguinte, como pós-tratamento.

Tabela 8 - Eficiências médias e desvio padrão de remoção de DQO, DBO, ST, SS, PT, NTK e CTerm nos sistemas tratamento anaeróbio A e B (TS-FAN), da ETE-PFA.

Tratamento anaeróbio	P1-P2 (%)						P1A+ P1B-P3 (log)
	DQO	DBO	ST	SS	PT	NTK	CTerm
Sistema A	20±28	30±31	25±25	42±32	12±19	23±38	1±3
Sistema B	17±16	25±32	12±21	14±29	5±28	20±33	

Fonte: Da autora (2019).

Eficiências superiores foram encontradas em TS-FAN de outros estudos com esgoto doméstico, de 59 e 77% para DBO e de 53 e 79% (OLIVEIRA; VON SPERLING, 2005; SILVA; SOUZA, 2011; MOURA et al., 2011), o que pode estar relacionado à baixa biodegradabilidade em condições anaeróbias do efluente da ETE-PFA (SOUZA, 2015).

As eficiências de remoção do sistema A foram maiores em comparação ao sistema B, não só de matéria orgânica, mas também de sólidos e nutrientes. Conforme apresentado na Figura 3, o sistema A possui um decantador primário antes do TS-FAN, o que contribui com o aumento das eficiências por meio da retenção de sólidos, dentre eles, os compostos orgânicos e nutrientes (nitrogênio e fósforo) ligados aos sólidos.

Sabe-se que unidades anaeróbias de tratamento apresentam restrições quanto à remoção de nutrientes (CHERNICHARO, 2007). Porém, o fósforo incorporado ao lodo, no decantador ou TS-FAN, pode ser removido por bactérias heterotróficas que acumulam polifosfatos dentro da célula, dependendo de condições favoráveis ao seu crescimento e metabolismo (HENRIQUE et al., 2010). Além disso, com o pH acima de 8,0, no sistema A, pode ter havido remoção físico-química por meio da precipitação de fósforo devido a alta capacidade de transferência, e também pode ter favorecido a perda de nitrogênio por volatilização da amônia (VON SPERLING, 2017). Esses processos foram relatados por Vivan et al. (2010) em pH de 8,5, em lagoas de estabilização.

Lamego Neto e Costa (2011) explicam que para a remoção completa de NTK é necessário que haja variação do potencial de oxirredução no meio, portanto, a maior parte de NTK e o PT, geralmente é conservada durante o tratamento anaeróbio, com aumento da fração mineralizada.

Moura et al. (2011), constataram eficiência de remoção para PT variando de 9,8 a 86%, e de NTK de 15 a 77%, enquanto Oliveira e Von Sperling (2005) encontraram média de 30% para PT e 24% para NTK, em

sistemas anaeróbios. Segundo Von Sperling (2017), não se espera mais do que 35% de remoção de PT em um tratamento de esgoto doméstico por TS-FAN. Portanto, as eficiências encontradas no tratamento anaeróbio da ETE-PFA são baixas, inclusive não havendo diferença significativa ($p>0,05$) entre as concentrações de nutrientes entre entrada e saída, de ambos os sistemas.

Na Figura 4 (p, q, r, s, t, u) observa-se um frequente aumento na concentração dos nutrientes das unidades anaeróbias (P2A e P2B), devido ao acúmulo da fração mineralizada de nutrientes no lodo do sistema TS-FAN, que sofre arraste de acordo com a ocorrência de choques de carga hidráulica ou de vazão afluente ao sistema, conforme demonstrando por Souza et al. (2018). Nesse sentido, as concentrações de NTK na saída dos sistemas anaeróbios não atenderam a legislação, com 46 e 29 mg L⁻¹ nos sistemas A e B, respectivamente, apesar de a legislação normatizar apenas o N amoniacal em 20 mg L⁻¹.

A remoção de SS (FIGURA 4 m, n, o) foi satisfatória no sistema A, atendendo a concentração limite estabelecida na legislação (150 mg L⁻¹), com média de 89 mg L⁻¹, com diferença significativa entre entrada e saída ($p<0,03$). A concentração média de SS na saída do sistema B (171 mg L⁻¹) não diferiu estatisticamente com a entrada e não atendeu a legislação. Isso mostra que o decantador primário no tratamento do efluente do PFA é de extrema importância para a redução do aporte de sólidos suspensos para as etapas subsequentes do tratamento na ETE-PFA. Moura et al. (2011), encontraram eficiências de remoção de SS em TS-FAN variando entre 71 e 88%, enquanto Oliveira e Von Sperling (2005) verificaram média de 66%, considerando um universo de 166 ETEs com diferentes configurações. Segundo Von Sperling (2017), a faixa comum de remoção de SS é de 80 - 90% para esgoto doméstico, portanto, a eficiência dos TS-FAN do PFA poderia ser maior, se melhor manejados quanto a remoção periódica de parte do lodo das unidades de tratamento.

Quanto à remoção de coliformes, Oliveira e Von Sperling (2005) verificaram eficiência média de 79% (0,9 unidades log) em sistema TS-FAN, ao passo que Von Sperling (2017) apresenta a faixa de 1 a 2 unidades logarítmicas removidas. Portanto, a eficiência encontrada no monitoramento foi satisfatória (FIGURA 4 v, w, x), mas pode aumentar, já que a média geométrica de saída dos tratamentos anaeróbios, no P3, ainda é de 2×10^6 NMP 100 mL^{-1} , sem diferença significativa entre a entrada e saída.

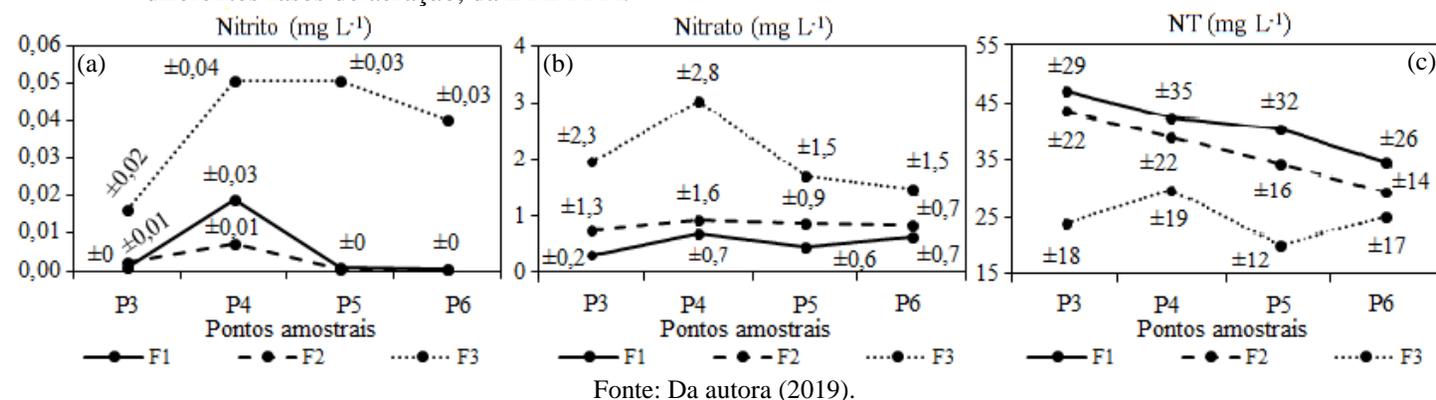
3.2 Pós-tratamento do efluente

Os valores médios de pH (FIGURA 4 a, b, c) em P3 ao P6, permaneceram dentro da faixa adequada às atividades dos microrganismos nitrificantes, de 6,0 a 8,0, e apresentaram redução ao longo do tratamento, evidenciando a nitrificação, pois no processo ocorre liberação de íons H^+ (VON SPERLING, 2012; ZOPPAS et al., 2016).

Observou-se que o processo de nitrificação foi maior no P4 (de tratamento aeróbio por FBAS) em relação às demais unidades do pós-tratamento (FIGURA 5 a, b), com maiores concentrações de nitrito e nitrato, devido à condição de aerobiose, que é favorável às atividades das bactérias nitrificantes (nitrosação e nitratação).

A nitrosação (FIGURA 5 a) e nitratação (FIGURA 5 b) no FBAS foi significativamente maior na F3 (maior tempo de aeração) com maiores concentrações médias de nitrito ($0,05 \text{ mg L}^{-1}$) e nitrato (3 mg L^{-1}) em relação à F1 ($p < 0,02$ para nitrito e nitrato) e à F2 ($p < 0,001$ para nitrito); ($p < 0,02$ para nitrato). O aumento da concentração destes compostos no FBAS, na F3, reduziu a eficiência de remoção conforme apresentado na Tabela 9.

Figura 5 - Valores médios e desvio padrão de nitrito, nitrato e NT no pós-tratamento por (FBAS, DS e SAC), nas diferentes fases de aerção, da ETE-PFA.



Fonte: Da autora (2019).

Tabela 9 - Eficiências médias de remoção de DQO, DBO, ST, SS, PT, NTK, NT; NO₂⁻, NO₃⁻ e CTerm no pós-tratamento (FBAS, DS e SAC), da ETE-PFA, nas diferentes fases de aerção.

Fase	Etapa	DQO	DBO	ST	SS	PT (%)	NTK	NT	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	CTerm (log)
F1	FBAS	24±31	44±29	5±6	1±5	14±20	29±30	27±29	7±12	8±19	0±0
	DS	3±9	33±25	22±14	47±28	11±14	21±28	21±28	78±31	28±30	0±0
	SAC	19±25	53±32	13±16	24±27	23±25	23±35	22±34	17±28	7±15	0±1
F2	FBAS	40±24	38±32	3±6	6±17	5±13	31±30	30±29	2±9	9±16	0±1
	DS	24±25	51±23	24±8	63±22	18±17	17±24	17±24	80±21	19±21	0±1
	SAC	34±31	66±22	12±9	39±35	12±14	21±19	20±19	14±22	13±20	1±0
F3	FBAS	51±13	19±19	2±16	10±30	9±13	14±26	14±26	0±0	6±11	1±0
	DS	23±19	38±32	25±16	47±23	21±26	35±31	33±30	11±15	29±38	1±0
	SAC	23±27	33±26	16±11	23±28	8±14	7±12	5±9	27±24	22±30	0±0

Fonte: Da autora (2019).

No DS (P5) F3, a nitrificação permaneceu constante e não houve nitratação, possivelmente pela redução do oxigênio dissolvido (OD) neste reator, já que em concentrações inferiores, de 0,3 a 0,7 mg L⁻¹, ocorre a prevalência do processo de oxidação de amônia, pois as bactérias responsáveis pela nitratação são sensíveis à baixa oxigenação do meio (ZENG et al., 2013; LUESKEN et al., 2011; GE et al., 2015; ZOPPAS et al., 2016; GIONGO et al. 2018; ILYAS; MASIH, 2017; PELAZ et al., 2018). Com isso, neste meio anóxico, ocorreu maior desnitrificação (remoção de nitrato), em comparação com as demais unidades e fases (TABELA 9). Pode-se assim inferir, ter havido nitrificação e desnitrificação simultâneas (NDS) no DS, de acordo com estudos recentes (YAO, PENG, 2017; HE et al., 2016; KINH et al., 2017; ZHENG et.al., 2018).

Porém, na F3, devido ao acúmulo de lodo no reator DS (FIGURA 4 o), tornando o meio mais anaeróbico, a nitrificação diminuiu e prevaleceu a desnitrificação (TABELA 8), com a maior adaptação das bactérias heterotróficas a esta condição e à presença de fontes de carbono, reduzindo o nitrato a nitrogênio gasoso (N₂). Nessas condições, as bactérias desnitrificantes podem se tornar predominantes, devido a maior velocidade de crescimento e de rendimento celular (7,2 d⁻¹; 0,43 g g⁻¹de DQO) (BELTRAN, 2008; NOCKO, 2008; ZOPPAS et al., 2016; METCALF; EDDY, 2003). Consequentemente, houve maior eficiência de remoção de N no DS, apresentando concentrações de 20 mg L⁻¹ para NT e 18 mg L⁻¹ para NTK, valores dentro do limite para lançamento em corpo hídrico (≤20 mg L⁻¹ de N amoniacal).

Nas fases F1 e F2, o acúmulo de lodo foi menor, pois foram realizadas limpezas periódicas dos DS a cada 7 meses, que ocorreram, uma no início do monitoramento, outra durante a F2 e, a subsequente, coincidiu com o término do estudo, sendo a F3 monitorada sem intervenção de limpeza. Outro fator que pode ter contribuído com o acúmulo de lodo nos DS, na F3, é o maior tempo de aeração aplicado. Um tratamento aeróbico é comumente caracterizado pela

grande geração de lodo (VON SPERLING, 2017; JORDÃO; PESSOA, 2017), o que pode ser observado no P4 (FIGURA 4 m, n, o), portanto, o maior tempo de aeração contribuiu para maior degradação orgânica e geração de lodo.

Na F3, a concentração de SS no DS foi de 119 mg L⁻¹ com maior eficiência de retenção de ST (dissolvidos e suspensos) e de PT incorporado no lodo (TABELA 9), assim como no estudo de Henrique et al. (2010). Destaca-se que o DS, em todas as fases, foi capaz de reduzir a concentração de SS para valores aceitáveis pela legislação (≤ 150 mg L⁻¹).

Giustina, Miranda e Monteggia (2010) destacaram a necessidade da existência de dispositivos para retenção de lodo do FBAS. Devido a elevada geração de lodo e baixa capacidade de retenção dos biofiltros analisados (com brita 4, PET, e anel Pall), a câmara de retenção de sólidos após o tratamento aeróbio foi essencial. Segundo os autores, graças a presença da câmara de retenção de lodo, logo após o biofiltro, foi possível atingir eficiência média de remoção de SS de 94%.

Observou-se maior eficiência de degradação de matéria orgânica, considerando a remoção de DQO, no FBAS durante a F3, período de maior tempo de aeração aplicada (TABELA 9). Hasan et al. (2014) também detectaram maior eficiência de remoção de DQO, de 99%, na fase em que aumentaram a vazão de aeração de 0 para 2 L min⁻¹.

Analisando a água residuária do PFA, Souza et al. (2018) identificaram maior capacidade de remoção de DQO na presença de oxigênio, justificado pela elevada fração de difícil biodegradação, conforme descrito anteriormente. No P3 a relação DBO/DQO foi de 0,4 na F1; 0,3 na F2; 0,2 na F3, ou seja, o afluente ao pós-tratamento apresentou baixa biodegradabilidade, já que a maior parte da fração biodegradável foi removida no tratamento anterior, por TS-FAN.

Observa-se ainda, que a concentração afluente de DQO diminuiu na F3, mas a DBO diminuiu ainda mais, com diferença significativa entre F2 e F3

($p < 0,004$), resultando em uma menor biodegradabilidade, e, conseqüentemente, menor eficiência de remoção de DBO nesta fase. Por outro lado, a redução de DQO pode ter contribuído para maior eficiência de remoção destes compostos, aliada ao maior tempo de aeração. A oscilação da entrada de matéria orgânica na ETE-PFA não foi controlada, e ocorreu por redução do número de cães e/ou maior diluição da água residuária gerada na lavagem das baias dos animais.

Apesar disso, a matéria orgânica (DBO) remanescente do FBAS foi removida no DS, que apresentou boa eficiência na F3 e F2, com isso, a concentração de DBO na saída do DS foi de 59 mg L^{-1} na F2 e 53 mg L^{-1} na F3, atendendo ao limite da legislação (60 mg L^{-1}), o que não aconteceu com a DQO, com exceção da F3. Na fase de maior tempo de aeração, o SAC foi capaz de reduzir a concentração de DQO para valores aceitáveis para lançamento em curso hídrico (180 mg L^{-1}) (MINAS GERAIS, 2008), com concentração de saída de 166 mg L^{-1} .

No trabalho de Giustina, Miranda e Monteggia (2010), avaliando o tratamento de efluente com elevada concentração de DQO, observou-se baixa eficiência de remoção destes compostos (22%) em biofiltro com brita 4, em comparação com o FBAS do PFA. Porém, com a câmara de retenção de lodo, a eficiência subiu para 72%, assim como o DS e SAC contribuiu na ETE-PFA para alcançar concentrações aceitáveis de matéria orgânica após o tratamento.

Como descrito por outros autores (LIZAMA; FLETCHER; SUN, 2011; HE et al., 2013; LI et al., 2013; AVELAR et al., 2014; PRIYA; PHILIP, 2015; TAO et al., 2016; RAMOS et al., 2017), foi observado nos SACs, na F1 e F2, remoção de P e principalmente N. Porém, devido às maiores concentrações de matéria orgânica de entrada, que resultou em maior geração de lodo, nestas fases, o tratamento não atingiu a eficiência necessária. Na F3 verificou-se aumento na concentração dos nutrientes, dado ao acúmulo de lodo no DS e arraste para os SACs, reduzindo a capacidade de remoção no reator. As

concentrações médias foram de 25 mg L⁻¹ para NT e 24 mg L⁻¹ para NTK, valores pouco maiores que o limite de 20 mg L⁻¹ de nitrogênio amoniacal estabelecido pela legislação (20 mg L⁻¹). Durante o período, constatou-se atividades de nitratação (remoção de nitrito) e desnitrificação (remoção de nitrato).

De acordo com a literatura, as plantas dos SACs favorecem a remoção de N por meio da absorção e bombeamento de oxigênio na zona de raízes, contribuindo para o processo de nitrificação nas microzonas aeróbias e desnitrificação nas regiões predominantemente anóxicas ou anaeróbias (ADRADOS et al., 2014; TAYLOR et al., 2011; SARMENTO et al., 2012; SAMSÓ; GARCÍA, 2013; AVELAR et al., 2014; TOSCANO et al., 2015; FAN et al., 2016). Portanto, houve condições para que no SAC ocorressem nitrificação e desnitrificação simultânea (NDS), conforme observado nos dados de eficiência de nitratação e desnitrificação (TABELA 8).

A coocorrência de condições aeróbia, anóxica e anaeróbia dentro de um SAC pode aumentar a atividade de nitrificação e desnitrificação (PELISSARI et al., 2017; 2018), com resultados satisfatórios na remoção de NT, que variam de 40 a 70% (DONG; SUN, 2007; HUANG et al., 2017; PELISSARI et al., 2017; SAEED; SUN, 2017).

Observou-se ainda, que o SAC na F2 removeu 1 log de CTerm, assim como o FBAS seguido de DS na F3, que apresentaram melhores condições de remoção de CTerm, podendo ser por oxidação ou competição com os outros microrganismos. Mas o lodo arrastado para o SAC e, conseqüentemente, acúmulo de microrganismos, pode ter reduzido as condições de inativação, tendo em vista que os SACs cultivados e operados com menores cargas orgânicas, normalmente apresentam maior capacidade de remoção de coliformes, em função da liberação de substâncias antimicrobianas pelas plantas (AVELAR et al., 2014; BRIX et al., 1989).

No que se refere à detecção realizada pela técnica da PCR, confirmou-se a presença dos gêneros de protozoários *Giardia* e *Cryptosporidium* nas amostras efluentes em F1 e F2 em todas as etapas analisadas (TABELA 10), confirmando que o pós-tratamento não foi capaz de remover microrganismos patogênicos.

Tabela 10 – Resultados PCR's com primers específicos para *Giardia* e *Cryptosporidium* nos diferentes pontos amostrais da estação de tratamento de efluentes do canil.

Amostras	<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i>
FBAS F1	+	+
DS F1	+	+
SAC F1	+	+
FBAS F2	+	+
DS F2	+	+
SAC F2	+	+
FBAS F3	+	+
DS F3	+	+
SAC F3	+	+

Fonte: Da autora (2019).

Microrganismos do gênero *Giardia* e *Cryptosporidium* são encontrados comumente em amostras de fezes de cães, porém, existem poucos estudos sobre o papel dos cães na transmissão parasitária zoonótica, ainda que se saiba que as fezes dos cães são uma fonte potencial de infecções por estes microrganismos (JULIEN et al., 2019).

3.3 Avaliação completa da ETE-PFA

Analisando o sistema de tratamento completo da ETE-PFA (TABELA 4), observa-se que a F3, além de apresentar concentrações de matéria orgânica satisfatória na saída da ETE (P6) (FIGURA 3 f, i), mostrou eficiência de remoção superior ao estabelecido na legislação para DQO (70%) e DBO (75%) (MINAS GERAIS, 2008) (TABELA 11). Nas demais fases, a eficiência de

remoção atingiu os padrões estabelecidos na legislação apenas para DBO. Portanto, o acréscimo de mais tempo de aeração no biofiltro contribuiu para remoção de N e estabilização da DQO, que é elevada no efluente estudado, assim como no estudo de Hasan et al. (2014).

Tabela 11 - Eficiências médias de remoção e desvio padrão de DQO, DBO, ST, SS, PT, NTK, CTerm e NT na ETE-PFA, nas diferentes fases de aeração.

Fase	P1A+P1B a P6 (%)						P3 a P6 (%)	
	DQO	DBO	ST	SS	PT	NTK	CTerm	NT
F1	30±26	89±9	34±25	48±38	30±30	50±30	4±6 log	35±33
F2	66±25	90±8	34±22	70±29	10±14	23±31	5±1 log	34±30
F3	71±20	77±19	43±27	43±27	14±21	7±22	1±0 log	14±17

Fonte: Da autora (2019).

A remoção de sólidos (SS) foi satisfatória em todas as fases, apesar do acúmulo e arraste do material no DS e SAC na F3, devido a maior geração de lodo no FBAS, com o maior tempo de aeração. Por esse motivo, a eficiência remoção de N e P foi baixa nesta fase (TABELA 9).

No entanto, a concentração de N (NTK e NT) na saída da ETE (P6), na F3 (FIGURA 2 r; 3 c), foi próxima do limite estabelecido na legislação. Isso mostra que o sistema de tratamento tem capacidade para proporcionar eficiente remoção de N, e essa estratégia de aeração pode ser adotada, conforme observado por Pelissari et al. (2017; 2018). No entanto, deve-se adotar um menor intervalo entre as limpezas do DS, de forma a aproveitar o potencial da condição de operação.

O acúmulo e arraste de lodo na F3 também podem ter sido os fatores que reduziram a eficiência de inativação de CTerm, pois o sistema apresentou boa remoção dos microrganismos na F1, que teve início após a limpeza dos DS, e na F2 que recebeu limpeza no meio do monitoramento (TABELA 9). A F3 teve o

agravante de maior geração de lodo e a falta de limpeza no período monitorado, como explicado por Avelar et al. (2014).

4 CONCLUSÕES

O tratamento anaeróbio composto por TS-FAN não foi suficiente para cumprimento da legislação, para lançamento da água residuária tratada do PFA em corpo hídrico, principalmente quanto as variáveis DQO e N. O que justifica as etapas seguintes, de pós-tratamento.

O pós-tratamento da água residuária do PFA com FBAS, DS e SAC potencializou as eficiências do tratamento, sendo que a operação do FBAS com aeração intermitente a cada 2 horas, foi a que proporcionou os melhores resultados. Nessa condição, na F3, ocorreu a degradação da DQO do efluente e a nitrificação.

De maneira geral, observou-se que o DS atuou na retenção de sólidos e fósforo incorporado no lodo, e na desnitrificação. A combinação FBAS+DS foi responsável pela remoção de N na ETE-PFA, enquanto o SAC teve função de polimento, removendo o remanescente de DQO e N por nitrificação e desnitrificação simultânea (NDS), além da filtração, retendo sólidos, P e N arrastados do DS, principalmente na F3.

Recomenda-se a implementação de mecanismos de descarga do lodo acumulado nos DS, com intervalos de no máximo 6 meses, garantindo maiores eficiências de remoção de nutrientes e de microrganismos patogênicos. A quantidade a ser descartada deve ser mais bem avaliada para não reduzir a capacidade de desnitrificação do DS, devido à condição anóxica na presença do lodo.

Recomenda-se ainda, a quantificação de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* na entrada e saída do sistema, a fim de correlacionar a

densidade desses microrganismos à elevada presença de coliformes, e buscar formas de melhoria na qualidade do sistema de tratamento, inserindo uma fase de desinfecção, considerando, além da remoção de compostos orgânicos, também a remoção de microrganismos patogênicos.

REFERÊNCIAS

AFFANDI, I.E. et al. Degradation of oil and grease from high-strength industrial effluents using locally isolated aerobic biosurfactant-producing bacteria. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 95, n. 1, p. 33-40, 2014.

ADRADOS, B.; SANCHEZ, O.; ARIAS, C.A.; BECARES, E.; GARRIDO, L.; MAS, J. BRIX, H.; MORAT, J. Microbial communities from different types of natural wastewater treatment systems: Vertical and horizontal flow constructed wetlands and biofilters. **Water Research**, v. 55, p. 304-312, 2014.

APHA. American Public Health Association. AWWA. American Water Works Association. WEF, Water Environment Federation. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21th. ed. Washington. D.C.: APHA/AWWA/WEF, 2005, [s.n.].

AVELAR, F.F.; MATOS, A.T.; MATOS, M.P.; BORGES, A.C. Coliform bacteria removal from sewage in constructed wetlands planted with *Mentha aquatica*. **Environmental Technology**, v. 35, p. 2095-2103, 2014.

BRIX H.; SCHIERUP H.H. A utilização de plantas aquáticas em água controle de poluição. *Ambio*, v. 18, n. 2, p. 100-107. 1989.

BELTRAN, C.A.E. **Aplicación de un sistema de control supervisor de pH y OD en la operación continua de un reactor nitrificante de disco rotatório**. Departamento de Ingeniería Química, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile, 2008.

CHERNICHARO, C.A.L. **Reatores anaeróbios**. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (DESA/UFMG), 2007. 246 p. (Princípios do tratamento biológico de águas residuárias, v. 5).

DONG, Z., SUN, T. Um novo processo potencial para melhorar a remoção de azoto em zonas húmidas construídos Promotoras de coexistência de parcial-nitrificação e Anammox. **Ecol. Eng.**, v. 31, p. 69-78, 2007.

EERKES-MEDRANO, D.; THOMPSON, R.C.; ALDRIDGE, D.C. Microplastics in freshwater systems: A review of the emerging threats, identification of knowledge gaps and prioritisation of research needs. **Water Research**, v. 75, p. 63-82, 2015.

FAN, J.; ZHANG, J.; NGO, H. H.; GUO, W.; YIN, X. Improving low-temperature performance of surface flow constructed wetlands using *Potamogeton crispus* L. plant. **Bioresource Technology**, v. 218, p.1257–1260, 2016.

FOWLER, D.; SKIBA, U.; SUTTON, M.A.; CAPE, N.; REIS, S.; SHEPPARD, L.J.; JENKINS, A.; GRIZZETTI, B.; GALLOWAY, J.N.; VITOUSEK, P.; LEACH, A.; BOUWMAN, A.F.; BUTTERBACH-BAHL, K.; DENTENER, F.; STEVENSON, D.; AMANN, M.; VOSS, M. The global nitrogen cycle in the twenty-first century. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v. 368, p. 1-13, 2013.

FRANCO, C.S.; FIA, R., MAFRA, D.C.B.; VILELA, H.S., LANDIM, D.V.; SOUZA, A.R. **Operação do sistema de tratamento de dejetos do Parque Francisco de Assis, Lavras MG**. Lavras: UFA, 2018. 39 p. (Boletim Técnico).

GAO, Y.; YU, G.; LUO, C.; ZHOU, P. Groundwater Nitrogen Pollution and Assessment of Its Health Risks: A Case Study of a Typical Village in Rural-Urban Continuum, China. **Plos One**, v. 7, n. 2, p. 1-9, 2012.

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

GIONGO, A.; BORTOLI, M.; PRÁ, M.C.; VERUCK, M.; KUNZ, A. Swine wastewater nitrogen removal at different C/N ratios using the modified ludzack-etttinger process. **Engenharia Agrícola**, v.38, n. 6, p. 968-977, 2018.

GIUSTINA, S.V.D.; MIRANDA, L.A.S.; MONTEGGIA, L.O. Remoção de matéria orgânica e sólidos suspensos por nova configuração de biofiltro aeróbio submerso no pós-tratamento de efluente de reator UASB. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 15, n. 3 p. 257-266, 2010.

HASAN, H.A.; ABDULLAH, S.R.S.; KAMARUDIN, S.K.; KOFLI, N.T.; ANUAR, N. Kinetic evaluation of simultaneous COD, ammonia and manganese removal from drinking water using a biological aerated filter system. **Separation and Purification Technology**, v. 130, p. 56–64, 2014.

HENRIQUE, I.N. et al. Remoção biológica de fósforo em reatores em bateladas sequenciais com diferentes tempos de retenção de sólidos. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 2, p. 197-204, abr./jun. 2010.

HE, T.; LI, Z.; SUN, Q.; XU, Y.; YE, Q. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by *Pseudomonas tolaasii* Y-11 without nitrite accumulation during nitrogen conversion *Bioresour. Technol.*, v. 200, p. 493-499, 2016.

HE, Y.; WANG, X.; XU, J.; YAN, H.; GE, Q.; GU, X.; JIAN, L. Application of integrated ozone biological aerated filters and membrane filtration in water reuse of textile effluents. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 150–157, 2013.

HUANG, M.; WANG, Z. QI, R. Valorização do autotrófico completa remoção de azoto ao longo de um processo de nitrito no subsolo de fase única modificado fluxo vertical fitodepuração: Efeito da profundidade zona saturada. **Bioresour. Technol.**, v. 233, p. 191-199, 2017.

ILYAS, H.; MASIH, I. The performance of the intensified constructed wetlands for organic matter and nitrogen removal: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 198, p. 372-383, 2017.

KINH, C.T.; RIYA, S.; HOSOMI, M.A. Terada Identification of hotspots for NO and N₂O production and consumption in counter- and co-diffusion biofilms for simultaneous nitrification and denitrification *Bioresour. Technol.*, v. 245, p. 318-324, 2017.

JORDÃO, E.P.; PESSOA, C.A. **Tratamento de Esgotos Domésticos**. 8. ed. Rio de Janeiro: ABES – Associação Brasileira de Engenharia Sanitária, 2017. 916 p.

JULIEN, D.A.; SARGEANT, J.M.; GUY, R.A.; SHAPIRO, K.; IMAI, R.K.; BUNCE, A.; SUDLOVENICK, E.; CHEN, S.; LI, J.; HARPER, S.L. Prevalência e caracterização genética de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em cães em Iqaluit, Nunavut, Canadá. **Zoonoses and Public Health**, jul. 2019.

KORNIŁŁOWICZ-KOWALSKA, T.; BOHACZ, J. Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects. **Waste Management**, v. 31, n. 8, p. 1689-1701, 2011.

LAMEGO NETO, L.G.; COSTA, R.H.R. da. Tratamento de esgoto sanitário em reator híbrido em bateladas sequenciais: eficiência e estabilidade na remoção de matéria orgânica e nutrientes (N, P). **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 4, p. 411-420, out./dez. 2011.

LI, X.K.; CHU, Z.R.; LIU, Y.J.; ZHU, M.; YANG, L.; ZHANG, J. Molecular characterization of microbial populations in full-scale biofilters treating iron, manganese and ammonia containing groundwater in Harbin, China. **Bioresource Technology**, v.147, p.234-239, 2013.

LIZAMA, K.; FLETCHER, T.D.; SUN, G. Removal processes for arsenic in constructed wetlands. **Chemosphere**, v. 84, p.1032–1043, 2011.

LUESKEN, F.A.; VAN ALEN, T.A.; VAN DER BIEZEN, E.; FRIJTERS, C.; TOONEN, G.; KAMPMAN, C.; HENDRICKX, T.L.; ZEEMAN, G.; TEMMINK, H.; STROUS, M.; OP DEN CAMP, H.J.; JETTEN, M. S. Diversity and enrichment of nitrite-dependent anaerobic methane oxidizing bacteria from wastewater sludge. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, n. 4, p. 845-854, 2011.

MERRETTIG-BRUNS, U.; JELEN, E. Anaerobic biodegradation of detergent surfactants. **Materials**, v. 2, n. 1, p. 181-206, 2009.

MINAS GERAIS. COPAM. Conselho de Política Ambiental; CERH – Conselho Estadual de Recursos Hídricos. **Deliberação Normativa Conjunta COPAM/Conselho Estadual de Recursos Hídricos do Estado de Minas Gerais CERH-MG nº 01, de 05 de maio de 2008**. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. 2008.

METCALF & EDDY, Inc. **Wastewater Engineering: Treatment and Reuse**. 4a ed. New York: McGraw-Hill, Inc. 2003, 1819 p.

MOURA, F.N. et al. Desempenho de sistema para tratamento e aproveitamento de esgoto doméstico em áreas rurais do semiárido brasileiro. **Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, v. 8, n. 1, p. 264-276, jan./mar. 2011.

NASCIMENTO, C.A.; STAGGEMEIER, R.; BIANCHI, E.; RODRIGUES, M. T.; FABRES, R.; SOLIMAN, M.C.; BORTOLUZZI, M.; LUZ, R.B.; HEINZELMANN, L.S.; SANTOS, E. L.; FLECK, J.D.; SPILKI, F.R.

Monitoring of metals, organic compounds and coliforms in water catchment points from the Sinos River basin. **Braz. J. Biol.**, v. 75, n. 2, p. 50-56, 2015.

NAZARI-SHARABIAN, A.S.; KARAKOUZIAN, M. Climate Change and Eutrophication: A Short Review. Engineering, **Technology & Applied Science Research**, v. 8, n. 6, p. 3668-3672, 2018.

NOCKO, L.M. **Remoção de carbono e nitrogênio em reator de leito móvel submetido à aeração intermitente**. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

OLIVEIRA, S.M.A.C.; VON SPERLIG, M. Avaliação de 166 ETEs em operação no país, compreendendo diversas tecnologias. Parte 1 - Análise de desempenho. **Eng. sanit. ambient.**, v. 10, n. 4, p. 347-357, out./dez. 2005.

PELAZ, L.; GOMEZ, A.; LETONA, A.; GARRALON, G.; FDZ-POLANCO, M. Nitrogen removal in domestic wastewater. Effect of nitrate recycling and COD/N ratio. **Chemosphere**, v. 212, p. 8-14, 2018.

PELISSARI, C.; AVILA, C.; MARIA, C.; TREIN, C.M.; GARCÍA, J.; ARMAS, R.D.; SEZERINO, P.H. Nitrogen transforming bacteria within a full-scale partially saturated vertical subsurface flow constructed wetland treating urban wastewater. *Sci. Total de Environ.*, v. 574, p. 390-399. 2017.

PELISSARI, C.; GUIVERNAU, M.; VINAS, M.; GARCIA, J.; VELASCO, M.; SOUZA, S. S.; SEZERINO, P. H.; ÁVILA, C. Effects of partially saturated conditions on the metabolically active microbiome and on nitrogen removal in vertical subsurface flow constructed wetlands, **Water Res.**, v. 15, n.141, p. 185-195, set. 2018.

PRIYA, V.S.; PHILIP, L. Treatment of volatile organic compounds in pharmaceutical wastewater using submerged aerated biological filter. **Chemical Engineering Journal**, v. 266, p. 309–319, 2015.

RAMOS, N.F.S.; BORGES, A.C.; GONÇALVES, G.C.; MATOS, A.T. Tratamento de águas residuárias de suinocultura em sistemas alagados construídos, com *Chrysopogon zizanioides* e *Polygonum punctatum* cultivadas em leito de argila expandida. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 22, n. 1, p. 123-132, 2017.

SAEED, T.; SUN, G. Poluentes: mudanças empregando insaturados e parcialmente saturados vertical Fluxo Wetlands: um estudo comparativo. **Chem. Eng. J.** n. 325, p. 332-341, 2017.

SAMSÓ, R.; GARCÍA, J. Bacteria distribution and dynamics in constructed wetlands based on modelling results. **Science of the Total Environment**, v. 461–462, p. 430–440, 2013.

SARMENTO, A.P.; BORGES, A.C.; MATOS, A.T. Evaluation of Vertical-Flow Constructed Wetlands for Swine Wastewater Treatment. *Water, Air and Soil Pollution*. **Dordrecht**, v. 223, p. 1065-1071, 2012.

SILVA, F.J.A.; SOUZA, R.O. Turbidez e cloro residual livre na monitoração de ETE tipo tanque séptico seguido de filtro anaeróbio. *Acta Scientiarum*. **Technology**, Maringá, v. 33, n. 4, p. 407-413, 2011.

SOUZA, A.R. **Avaliação da eficiência do sistema de tratamento de efluentes do canil Parque Francisco de Assis em Lavras-MG**. 2015.130 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Hídricos em Sistemas Agrícolas) – Universidade de Federal de Lavras, Lavras, 2015.

SOUZA, A.R.; FIA, R.; VILELA, H.S.; MAFRA, D.C.B.; LANDIM, D.V.; FRANCO, C.S. Efficiency of the treatment system of wastewater at a kennel. *Acta Scientiarum*. **Technology**, v. 40, p. e36694, 2018.

TAO, C.; PENG, T.; FENG, C.; CHEN, N.; HUA, Q.; HAO, C. The feasibility of an up-flow partially aerated biological filter (U-PABF) for nitrogen and COD removal from domestic wastewater. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 307–317, 2016.

TAYLOR, C.R.; HOOK, P.B.; STEIN, O.R.; ZABINKSI, C.A. Seasonal effects of 19 plant species on COD removal in subsurface treatment wetland microcosms. **Ecological Engineering**, v. 37, n. 5, p. 703–710, 2011.

TOSCANO, A.; MARZO, A.; MILANI, M.; CIRELLI, G.; BARBAGALLO, S. Comparison of removal efficiencies in Mediterranean pilot constructed wetlands vegetated with different plant species. **Ecological Engineering**, v. 75, p. 155–160, 2015.

VILELA, C.L.S.; BASSIN, J.P.; PEIXOTO, R.S. Water contamination by endocrine disruptors: Impacts, microbiological aspects and trends for environmental protection. **Environmental Pollution**, v. 235, p. 546-559, 2018.

VIVAN, M. et al. Eficiência da interação biodigestor e lagoas de estabilização na remoção de poluentes em dejetos de suínos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 3, p. 320-325, 2010.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**: Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. 4. ed. Belo Horizonte: UFMG, 2017. V. 1. 472 p.

VON SPERLING, M. **Lodos ativados**: Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. 3. ed. Belo Horizonte: UFMG, 2017. V. 4. 484 p.

YANG, H.; ZHANG, Y.; YE, Y. Study on the Dissolved Oxygen (DO) on the Short-cut Nitrification in Sequencing Batch Reactor (SBR). **Advanced Materials Research**, v. 374, p. 1009-1012, 2012.

YAO, Q.; PENG, D.C. Nitrite oxidizing bacteria (NOB) dominating in nitrifying community in full-scale biological nutrient removal wastewater treatment plants. **AMB Express**, v. 7, n. 25, 2017.

ZENG, R. J.; LEMAIRE, R.; YUAN, Z.; KELLER, J. Simultaneous Nitrification, Denitrification, and Phosphorus Removal in a Lab-Scale Sequencing Batch Reactor. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 84, n. 2, p. 170-188, 2003.

ZHENG, Z.; ZHANG, D.; LI, W.; QIN, W.; HUANG, X. Substrates removal and growth kinetic characteristics of a heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacterium, *Acinetobacter harbinensis* HITLi7T at 2 °C. **Bioresource Technology**, v. 259, p. 286–293, 2018.

ZOPPAS, F.M.; BERNARDES, A.M.; MENEGUZZI, A. Parâmetros operacionais na remoção biológica de nitrogênio de águas por nitrificação e desnitrificação simultânea. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 21, n. 1, p. 29-42, 2016.

**ARTIGO II - AVALIAÇÃO DA REMOÇÃO DE NITROGÊNIO E DA
COMUNIDADE MICROBIANA EM FILTRO BIOLÓGICO AERADO
SUBMERSO, COM DIFERENTES FASES DE AERAÇÃO, E SISTEMAS
ALAGADOS CONSTRUÍDOS COMO PÓS TRATAMENTO DE
EFLUENTE DE CANIL**

RESUMO: Dentre os fatores que influenciam na remoção microbiológica de nitrogênio em águas residuárias, destacam-se a concentração de carbono e nitrogênio, pH, temperatura e taxa de oxigenação do meio, a fim de garantir atividade microbiana, equilíbrio das reações, com eficiência e menor gasto energético. Neste contexto, o presente estudo investigou os microrganismos envolvidos e seus produtos no pós-tratamento de efluente de canil com filtro biológico aerado submerso (FBAS), operados com diferentes tempos de aeração, e sistemas alagados construídos de escoamento horizontal subsuperficial (SACs). Nos períodos em que foram aplicados os tempos de aeração, fase 1 (7 horas de aeração contínua diária), fase 2 (5 horas de aeração contínua diária) e fase 3 (Aeração intermitente a cada 2 horas), monitorou-se semanalmente, em cada reator, a concentração de matéria orgânica, dos compostos nitrogenados, pH e temperatura. Também foram monitorados mensalmente, a densidade (NMP) de bactérias oxidadoras de amônia (BOA), de nitrito (BON) e bactérias desnitrificantes (BD). No final de cada fase realizou-se PCR-DGGE para o domínio bactéria, do lodo dos reatores. Os resultados mostraram um maior crescimento médio das bactérias nitrificantes (da ordem de 10^6) e desnitrificantes (10^{22}) na fase 3, na qual obteve-se melhor desempenho na remoção de nitrogênio total (NT) no pós-tratamento analisado, em relação às demais fases, devido ao maior tempo de aeração e menor relação Carbono/Nitrogênio (15,7). Na F3, a eficiência de remoção de NT foi de 33%, contra 21% na F1 e 17% na F2. Em todas as fases, detectou-se por PCR com *primers* específicos, BOA, o gênero *Nitrobacter* (BON) e BD. Por PCR/DGGE, os gêneros predominantes na F1 foram *Clostridium* e *Bacillus*, já nas demais fases foi *Thauera*, que está relacionado à remoção de nitrogênio por desnitrificação no tratamento de efluentes. Conclui-se que o sistema de tratamento estudado, remove NT por nitrificação e desnitrificação heterotrófica simultânea, e que a limpeza periódica do lodo dos reatores se faz necessária para promover maiores taxas de nitrificação autotrófica aeróbia.

PALAVRAS CHAVE: Aeração intermitente. Bactéria. Desnitrificação. Nitrificação. *Thauera*.

**EVALUATION OF NITROGEN REMOVAL AND OF THE MICROBIAN
COMMUNITY IN SUBMERGED BIOLOGICAL AERATED FILTER
WITH DIFFERENT PHASES OF AERATION AND CONSTRUCTED
WETLANDS AS POST-TREATMENT OF KENNEL EFFLUENT**

ABSTRACT: Among the factors that influence the microbiological nitrogen removal, can be highlight the carbon and nitrogen concentration, pH, temperature and oxygenation rate of the environment, in order to ensure microbial activity, reaction balance, efficiency and lower energy expenditure. In this context, the present study investigated the microorganisms involved and their products in the post-treatment of kennel effluent with submerged biological aerated filter (SBAF) operados com diferentes tempos de aeração and horizontal subsurface flow constructed wetlands (CW). During the periods in which the aeration times were applied, phase 1 (7 hours of continuous daily aeration), phase 2 (5 hours of continuous daily aeration) and phase 3 (intermittent aeration every 2 hours), was monitored weekly in each reactor, the concentration of organic matter, nitrogenous compounds, pH and temperature. The density (MPN) of ammonia-oxidizing bacteria (AOB), nitrite (NOB) and denitrifying bacteria (DB) was also monitored monthly. At the end of each phase, PCR-DGGE for the Bacteria domain, was performed from the reactor sludge. The results showed a higher average growth of nitrifying bacteria (in the order of 10^6) and denitrifying bacteria (10^{22}) in phase 3, which obtained better performance in total nitrogen removal (TN) in the post-treatment analyzed, compared to the other phases due to longer aeration time and lower Carbon/Nitrogen ratio (15,7). In F3, the removal efficiency of NT was 33%, against 21% in F1 and 17% in F2. In all phases, PCR was detected with specific primers, OAB, the genus *Nitrobacter* (NOB) and BD. By PCR/DGGE, the predominant genera in F1 were *Clostridium* and *Bacillus*, while in the other phases it was: *Thauera*, which are related to nitrogen removal by denitrification in effluent treatment. It is concluded that the treatment system studied removes TN by simultaneous heterotrophic nitrification and denitrification, and that periodic cleaning of reactor sludge is necessary to promote higher rates of aerobic autotrophic nitrification.

KEY WORDS: Bacterium. Denitrification. Intermittent aeration. Nitrification. *Thauera*.

1 INTRODUÇÃO

A remoção de nitrogênio de águas residuárias é requerida antes do lançamento em cursos d'água em função dos possíveis impactos relacionados, como a eutrofização (VON SPERLING, 2017; LUESKEN et al., 2011). Dentre os processos de tratamento utilizados para remoção de nitrogênio, o mais usual é a nitrificação-desnitrificação (ZHANG et al., 2019, CHEN et al., 2019).

A nitrificação é o passo inicial no tratamento biológico de remoção de nitrogênio, caracterizada pela oxidação do íon amônio NH_4^+ via NO_2^- e NO_3^- . Esse processo é mediado por dois grupos funcionais distintos de microrganismos quimioautotróficos (bactérias nitrificantes) em meio aeróbio, as bactérias oxidadoras de amônia (BOA): *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosolobus*, *Nitrosovibrio*, *Nitrospira*, ou arqueias oxidadoras de amônio, *Nitrosopumilus maritimus*, *Nitrosocaldus yellowstonii*, responsáveis pela oxidação do NH_4^+ a NO_2^- , em um processo denominado nitrosação; e as bactérias oxidadoras de nitrito (BON): *Nitrobacter*, *Nitrospina*, *Nitrococcus*, *Nitrospira* responsáveis pela oxidação do NO_2^- a NO_3^- , denominada de nitratação (KOCH, et al. 2019; USHIKI et al., 2018; YIN et al., 2018; PAN et al., 2018; ZOPPAS et al., 2016).

Recentes estudos apontam que o gênero *Nitrospira*, que prospera em substratos com reduzidas concentrações de NO_2^- e oxigênio, tem capacidade de executar nitrificação completa, ou seja, desde a oxidação de amônia até a formação de nitrato, esse processo é denominado Comammox (DAIMS et al., 2015; VAN KESSEL et al., 2015; ROOTS et al., 2019).

Em sequência, a desnitrificação é a redução de NO_3^- a nitrogênio gasoso (N_2), sob condições anóxicas/anaeróbias por bactérias desnitrificantes (BD) heterotróficas facultativas: *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Neisseria*, *denitrificans* e *Azospirillum*. A desnitrificação completa acontece em quatro estágios: NO_3^- a NO_2^- , NO_2^- a óxido nítrico (NO),

NO a óxido nitroso (N_2O) e, por fim, N_2O a N_2 (BOTHE et al., 2007; MADIGAN et al., 2016).

Além da desnitrificação heterotrófica, compostos inorgânicos reduzidos podem ser utilizados como doadores de elétrons, como o sulfeto, caracterizando um processo de desnitrificação autotrófica. Os microrganismos responsáveis pelo processo são do gênero *Thauera*, *Comanas*, *Alcaligenes*, *Brachymonas*, *Acidovarase* e *Paracoccus* e, podem ser aplicadas em sistemas de tratamento que visam tratar efluentes com altas concentrações de matéria orgânica e nitrogênio amoniacal (OLIVEIRA, 2012).

A amônia ainda pode ser oxidada anaerobiamente por um processo designado como Anammox, por bactérias do gênero *Candidatus Brocadia*, *Ca. Kuenenia* e *Ca. Scalindua*. A amônia é oxidada, utilizando-se nitrito, como acceptor de elétrons originando N_2 como produto final, que é liberado para a atmosfera (MADIGAN et al., 2016).

No caso dos processos de nitrificação seguido pela desnitrificação, os principais desafios em estações de tratamento de esgoto (ETE) são o requerimento de aeração na etapa de nitrificação e a adição de uma fonte de carbono orgânico externa como fonte de energia na etapa de desnitrificação, de acordo com Koch et al. (2019). Além do nível de oxigenação, os processos de nitrificação e desnitrificação dependem da concentração de matéria orgânica, bem como da relação das concentrações de carbono e nitrogênio, temperatura, pH, e a presença de substâncias tóxicas ou inibidoras, inclusive o próprio substrato, dentre outros (GUJER, 2010; ZOPPAS et al., 2016).

No tratamento terciário de águas residuárias, os biofiltros são projetados principalmente para remover amônio, nitrito ou nitrato, podendo ser chamado de filtro nitrificante ou desnitrificante (CUI et al., 2017; HU et al., 2018; RYU et al., 2014, ZHANG et al., 2019). Nesse sentido, o oxigênio dissolvido (OD) é introduzido por aeradores que consomem energia e mantêm uma condição de

aerobiose que não permite a desnitrificação (YANG et al., 2018). Assim, a variação de condições de aeração, como a intermitente, mostra-se como uma possível alternativa para nitrificação e desnitrificação simultânea (ZHANG et al., 2018; ZHANG et al. 2019) e/ou sistemas aeróbios seguidos de anóxicos, com menor consumo de energia.

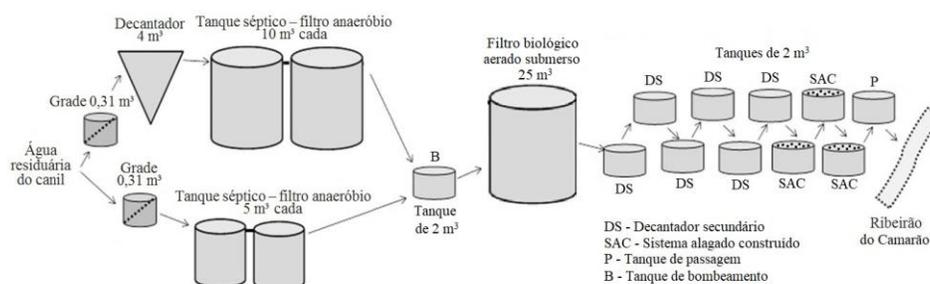
Nesse contexto, o principal objetivo deste estudo foi quantificar e identificar a comunidade microbiana envolvida nos processos de nitrificação e desnitrificação, e inferir sobre o desempenho dos microrganismos na remoção de nitrogênio em uma ETE de tratamento de água residuária gerada na lavagem de baias de um canil, variando as condições de aeração dos FBAS constituintes deste sistema de tratamento.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Sistema de tratamento

A ETE-PFA foi dimensionada para um tempo mínimo de detenção hidráulica (TDH) de 12 h e vazão máxima de $20 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$ (FRANCO et al., 2018), estando em operação com vazão média diária tratada de $0,08 \text{ L s}^{-1}$ (SOUZA, 2015). O tratamento é composto por dois sistemas de tanque séptico-filtro anaeróbio (TS-FAN), sendo um com decantador primário, e ambos seguidos de filtro biológico aerado submerso (FBAS), seis decantadores secundários (DS), três sistemas alagados construídos (SACs) de escoamento horizontal subsuperficial cultivados com capim-vetiver e caixa de passagem com filtração em brita zero (FIGURA 6) (FRANCO et al., 2018).

Figura 6 - Diagrama esquemático do sistema de tratamento da água residuária gerada na lavagem das baias dos cães do Parque Francisco de Assis de Lavras-MG.



Fonte: Franco et al. (2018).

2.2 Fases de aeração e monitoramento

As unidades FBAS, DS e SACs foram monitoradas quanto as variáveis físico-químicas e microbiológicas, quantitativa e qualitativa, em períodos de diferentes tempos de aeração do FBAS, com taxa aplicação de oxigênio pelo aerador de $0,00028 \text{ kg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ de O_2 . Classificou-se estes períodos em Fase 1 (F1), Fase 2 (F2) e Fase 3 (F3), compreendendo o período de geração (lavagem das baias) e entrada de efluente na ETE, entre 9 e 16 h (TABELA 12).

Tabela 12 - Tempo de aeração, período de monitoramento e taxa de aplicação de oxigênio no filtro biológico aerado submerso utilizado no tratamento de efluente de canil, nas fases analisadas.

Fases	Tempo de aeração	Período de monitoramento	Taxa de aplicação kg L ⁻¹ d ⁻¹ de O ₂
F1	Igual ao período de geração do efluente, das 9 às 16 horas (7 horas diárias ininterruptas)	5 meses (de agosto de 2017 à 9 de janeiro de 2018)	0,00196
F2	Aeração menor que a F1, das 9 às 14 horas (5 horas diárias ininterruptas)	6 meses (de 29 janeiro à julho de 2018)	0,00140
F3	Aeração intermitente (a cada duas horas, por 24 horas)	Aproximadamente 3 meses (de setembro à dezembro de 2018)	0,00336

Fonte: Da autora (2019).

2.3 Análises físicas e químicas

Para as análises físicas e químicas realizou-se coletas semanais da água residuária, em frasco de polietileno previamente limpos, durante o período de duração de cada fase, nas etapas do tratamento: afluente e efluente do FBAS, último DS e último SAC.

As variáveis analisadas no Laboratório de Águas Residuárias do Núcleo de Engenharia Ambiental e Sanitária do Departamento de Recursos Hídricos e Saneamento (DRS), da Universidade Federal de Lavras (UFLA), foram temperatura (T), com termômetro de mercúrio, pH, pelo método potenciométrico; nitrogênio total (NTK) por micro-Kjeldahl; nitrito (NO₂⁻) por colorimetria, pelo método da sulfanilamida; nitrato (NO₃⁻) por colorimetria, pelo método do salicilato, e demanda química de oxigênio (DQO), em refluxo fechado e leitura espectrofotométrica. Todas as metodologias seguiram o recomendado em APHA, AWWA e WEF (2005).

Os dados foram submetidos ao teste de Tukey a um nível de significância de 5%, para comparação de médias entre as fases. O teste foi realizado no programa STATISTICA®.

2.4 Análise microbiológica: técnica dos tubos múltiplos

Para a análise microbiológica de detecção e quantificação das bactérias nitrificantes e desnitrificantes, realizou-se coletas mensais do lodo durante o período de duração de cada fase, nas etapas do tratamento: saída do FBAS, último DS e mistura dos três SACs. A avaliação foi feita utilizando o método dos tubos múltiplos (NMP), metodologia proposta por Alexander e Clarck (1982), para solos, e adaptada para análise em lodos orgânicos por Kieling (2004), segundo descrito detalhadamente por Araujo et al. (2018). As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Núcleo de Engenharia Ambiental e Sanitária do DRS/UFLA.

Calculou-se a média das fases por meio de média geométrica e os dados foram submetidos ao teste de Tukey a 5%, para comparação de médias entre as fases. O teste foi realizado no programa STATISTICA®.

2.5 Métodos moleculares para detecção de microrganismos

Das amostras coletadas para análises de bactérias nitrificantes e desnitrificantes, descritas no item anterior, utilizou-se a última amostra de cada fase de aeração (obtendo-se uma microbiota mais adaptada à condição de cada fase) para detecção de microrganismos do ciclo do nitrogênio e análise do perfil da comunidade microbiana desenvolvida no reator no Laboratório de Microbiologia de Água e Esgoto do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Minas Gerais (DESA/UFMG).

2.5.1 Detecção de microrganismos do ciclo do nitrogênio por PCR

O DNA genômico foi extraído utilizando-se o *kit FastDNA® SPIN Kit for Soil* (MP *Biomedicals*) e amplificado pela PCR, utilizando-se *primers* para a detecção de genes específicos: Pla 46F e Amx 667 para *Planctomycetes* e Anammox (VAN DER STAR et al., 2007), AmoA1 F- AmoA2 R para BOA (ROTTHAUWE et al., 1997), Nitro1198 F – Nitro1423 R para *Nitrobacter* (GRAHAM et al., 2007), NTSPA F - NTSPA R para *Nitrospira* (KINDAICHI et al., 2006) e NosZ F e NosZ 1622 R para desnitrificantes (ENWALL et al., 2005).

Para uma reação de PCR com volume final de 50 μL , as concentrações dos reagentes foram: 18 μL de água ultra-pura; 3 μL de BAS a $5\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$; 0,5 μL de iniciador 1 e 2; 25 μL de pré-mix e 3 μL de amostra de DNA a $30\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$, em cada tubo. Realizou-se a reação no aparelho Veriti 96-Well *Thermal Cycler* (*Applied Biosystems*), com 4 minutos e 18 segundos de desnaturação inicial a 94 °C, seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C, anelamento a 55 °C e extensão a 72 °C, cada um por 1 minuto. Ao final, realizou-se uma etapa de extensão final a 72 °C por 10 minutos. Os amplicons foram submetidos à eletroforese com *Low Mass DNA Ladder* para a quantificação do DNA no programa *ImageJ* (*Image Processing and Analysis in Java*, <http://imagej.nih.gov/ij/>).

2.5.2 Análise do perfil da comunidade microbiana por PCR/DGGE

Para análise do perfil da comunidade microbiana desenvolvida no reator, por meio da técnica da PCR-DGGE (MUYZER et al., 1993) o DNA foi extraído e amplificado pela PCR, conforme descrito no item anterior, utilizando-se o par

de *primers* 1055F -1392R-GC para a região V8 do RNAr 16S do Domínio Bacteria (FERRIS et al., 1996).

A DGGE foi realizada em aparelho Bio-Rad DCode™ *Universal Mutation Detection System* (Hercules, CA, USA), utilizando-se um gel de poliacrilamida a 8% e um gradiente desnaturante de 45 a 75%, durante 17 horas, à 60 °C, com 400 ng de DNA de cada amostra em cada canaleta. Os géis foram corados com *Sybr-Gold* por 30 minutos e visualizados em um transiluminador sob luz ultravioleta. As bandas foram excisadas dos géis com um cortador, armazenadas em tubo de 0,5 mL com 50 µL de TE, a 4 °C, para eluição. Após 24 horas, o DNA eluído foi submetido à PCR, para amplificação, com os primer 1055f 1392R sem cauda GC, e eletroforese com gel agarose, 76 V por 30 minutos. As amostras amplificadas foram purificadas com etanol e o produto ressuspendido em 20 µL de água ultrapura (SINISCALCHI et al., 2017).

Realizou-se eletroforese com *Low Mass DNA Ladder* e quantificação do DNA no programa ImageJ, para posterior sequenciamento na Macrogen Inc (Coréia do Sul). As sequências foram submetidas à análises de similaridade com sequências do NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) por meio do programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) e RDP (*Ribosomal Database Project*).

Por meio do perfil de bandas obtido no DGGE, construiu-se um dendograma, pelo método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group with mathematical Averages*), que permitiu comparar a similaridade pelo coeficiente DICE, utilizando o programa Bionumerics 7.1 (Applied Maths, Bélgica).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Remoção de nitrogênio

Os resultados de densidade de bactérias nitrificantes, nos reatores analisados, e de bactérias desnitrificantes no FBAS e SAC, não diferem estatisticamente entre as fases. Já no DS, observou-se diferença significativa na F3 ($p < 0,0003$), para bactérias desnitrificantes (BD) (TABELA 13 e FIGURA 7).

Tabela 13 - Médias geométricas e desvio padrão de BOA, BON e BD no FBAS, DS e SAC nas diferentes fases de aeração da ETE-PFA (Continua).

Bactéria (NMP 100mL ⁻¹)	Etapa do tratamento	F1	F2	F3
Nitrificante BOA	FBAS	3,1x10 ⁶ ±	7,2x10 ⁴ ±	4,9x10 ⁶ ±
		2x10 ⁶ a	1,6x10 ⁶ a	9,9x10 ⁷ a
	p-valor	-	1,0	0,2
	p-valor	1,0	-	0,1
	p-valor	0,2	0,1	-
	DS	6,5x10 ⁶ ±	8,8x10 ⁴ ±	4,4x10 ⁶ ±
		1,1x10 ⁷ a	7,7x10 ⁵ a	2,1x10 ⁵ a
	p-valor	-	0,1	0,6
	p-valor	0,1	-	0,7
	p-valor	0,6	0,7	-
	SAC	1,2x10 ⁶ ±	1,4x10 ⁵ ±	1,6x10 ⁶ ±
		4,4x10 ⁵ a	7,1x10 ⁶ a	7,6x10 ⁶ a
p-valor	-	0,9	0,7	
p-valor	0,9	-	0,9	
p-valor	0,7	0,9	-	
Nitrificante BON	FBAS	2,7x10 ⁵ ±	9,6x10 ⁵ ±	3,6x10 ⁶ ±
		1,7x10 ⁵ a	1,9x10 ⁸ a	2,8x10 ⁵ a
	p-valor	-	0,7	1,0
	p-valor	0,7	-	0,8
	p-valor	1,0	0,8	-
	DS	6,4x10 ³ ±	2,6x10 ⁶ ±	1,6x10 ⁶ ±
		1x10 ⁴ a	5,6x10 ⁷ a	1,6x10 ⁶ a
	p-valor	-	0,6	1,0
	p-valor	0,6	-	0,7
	p-valor	1,0	0,7	-

Tabela 13 - Médias geométricas e desvio padrão de BOA, BON e BD no FBAS, DS e SAC nas diferentes fases de aeração da ETE-PFA (Conclusão).

Bactéria (NMP 100mL ⁻¹)	Etapa do tratamento	F1	F2	F3
Nitrificante BON	SAC	1,9x10 ⁴ ± 8,2x10 ³ a	1x10 ⁷ ± 6,5x10 ⁸ a	7,1x10 ⁶ ±4, 4x10 ⁷ a
	p-valor	-	0,6	1,0
	p-valor	0,6	-	0,7
	p-valor	1,0	0,7	-
Desnitrificante	FBAS	1x10 ¹⁰ ± 9,2x10 ¹¹ a	4x10 ¹⁸ ± 7,1x10 ²³ a	3,1x10 ²³ ± 2,7x10 ²⁴ a
	p-valor	-	0,9	0,2
	p-valor	0,9	-	0,3
	p-valor	0,2	0,3	-
	DS	2,9x10 ¹⁰ ± 2x10 ¹² a	1x10 ¹⁵ ± 1,5x10 ¹⁶ a	2x10 ¹⁷ ± 5,7x10 ¹⁶ b
	p-valor	-	0,9	0,0003
	p-valor	0,9	-	0,0003
	p-valor	0,0003	0,0003	-
	SAC	1,6x10 ¹¹ ± 9,4x10 ¹² a	1x10 ²¹ ± 7,1x10 ²⁵ a	2,4x10 ²⁵ ± 1,7x10 ²⁶ a
	p-valor	-	0,9	0,3
p-valor	0,9	-	0,5	
p-valor	0,3	0,5	-	

Legenda: Médias com a mesma letra na linha não diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Fonte: Da autora (2019).

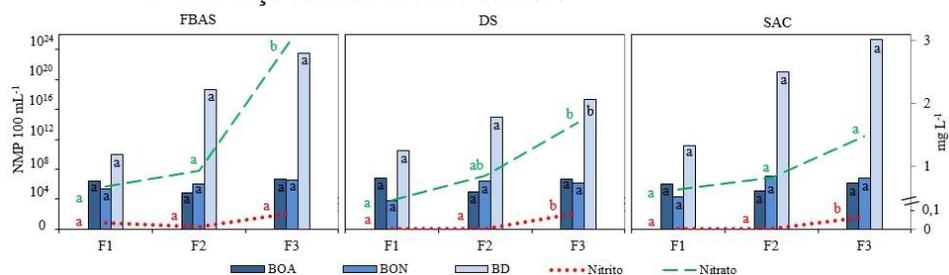
Numericamente, os valores de BOA foram inferiores (cerca de 1 a 2 ordens de grandeza menor) nos três reatores analisados, na fase de menor tempo de aeração (F2), justamente porque o crescimento destas bactérias depende da energia obtida por meio de oxidação aeróbia do nitrogênio amoniacal (NA). Portanto, quanto menor a disponibilidade de O₂ (< 2 mg L⁻¹) menor será seu crescimento (LUESKEN et al., 2011; HIDAKA et al., 2002; BELTRAN, 2008; GE et al., 2015; ZOPPAS et al., 2016). Desta forma, foi na F3, fase de maior aeração, que os valores de BOA foram superiores (cerca de 1 a 2 ordens de grandeza maior) no FBAS e SAC, sendo maior no FBAS.

Oliveira et al. (2013) encontraram valores de bactérias nitrificantes e desnitrificantes em reator aeróbio, tratando lixiviado de aterro sanitário, variando de 10^1 a 10^8 para BOA, 10^4 a 10^7 para BON, e de 10^5 a 10^{10} NMP 100 mL^{-1} para BD. Os autores consideraram que para um efluente que apresentou baixa biodegradabilidade ($\text{DBO/DQO} < 0,1$), os valores de BD foram elevados. Comparando com os resultados de Oliveira et al. (2013), foram encontrados valores de nitrificantes menores neste trabalho e densidade de BD maior, pois a biodegradabilidade da água residuária do canil é maior (F1: $< 0,2$; F2: $< 0,3$; F3: $< 0,4$).

Assim como verificado para BOA, as BON também foram detectadas com valor superior (cerca de 1 ordem de grandeza maior) no FBAS da F3, devido à maior aeração, uma vez que requerem de oxigênio disponível para realizar a oxidação de nitrito (NO_2^-) e obter energia nesse processo (LUESKEN et al., 2011; BELTRAN, 2008; GE et al. 2015; ZOPPAS et al., 2016; ANTILEO et al., 2013). As BON apresentam maior velocidade de crescimento ($1,08 \text{ d}^{-1}$), em comparação às BOA ($0,77 \text{ d}^{-1}$), quando não há limitação de oxigênio. Esse fato faz com que as BON convertam o nitrito a nitrato de forma mais acelerada, impedindo o acúmulo de nitrito no sistema (BELTRAN, 2008; COX, 2009; ANTILEO et al., 2013; MADIGAN et al., 2016; ZOPPAS et al., 2016).

Em comparação com os resultados físico-químicos, a maior densidade de bactérias nitrificantes no FBAS na F3 contribuiu com aumento significativo da nitrosação (p-valor F2-F3: 0,0008) e nitratação (p-valor F1-F3: 0,02) na referida fase em relação às demais, as quais apresentavam baixa nitrificação (FIGURA 7).

Figura 7 - NMP de BOA, BON, BD, concentração de nitrito e nitrato no FBAS, DS e SAC nas diferentes fases de aeração da ETE-PFA e comparação de diferença estatística entre as fases.



Fonte: Da autora (2019).

No DS, a maior densidade de BOA foi na F1 (cerca de 2 ordens de grandeza maior que a F2), fase intermediária de aeração, possivelmente pela existência de algumas espécies de bactérias BOA que são capazes de crescer sob condições aeróbias e anaeróbias (SCHIMIDT et al., 2003; CIUDAD, 2007), explicando sua presença no decantador secundário, ambiente normalmente de baixo potencial redox (VON SPERLING, 2017). Porém, não foi encontrado nitrito (dentro do limite de detecção da técnica usada), produto das BOA, no DS durante a F1, estas bactérias podem estar inativas, mas permanecem no meio.

Nesse caso, estudos explicam que, na atividade de oxidação realizada pelas BOA, em ambientes com concentração de oxigênio dissolvido (OD) abaixo de 0,8 mg L⁻¹, os produtos são, além do nitrito, nitrogênio gasoso (N₂) e óxidos nítricos (NO) (SCHMIDT, BOCK, 1997; GE et al., 2015). Isso ocorre por meio de enzimas redutases de nitrito e redutases de óxido nítrico, favorecendo a transformação de NO₂⁻ para N₂O em ambientes com baixo O₂ (KOZLOWSKI et al., 2016; ZHU et al., 2013).

Yao e Peng (2017) explicam que o desequilíbrio de onde há mais BOA do que BON, acarreta em uma competição entre oxidação de nitritos por BON e redução de nitritos por bactérias redutoras de nitrito (BRNi). Assim, parte do nitrito produzido por BOA pode ter sido reduzido a nitrogênio gasoso (N₂) por

BRNi, ou seja, o substrato (nitrito), que deveria ter sido usado para BON, foi reduzido, como também ocorreu nos estudos de Fujita et al. (2010) e Mari et al. (2012). Corroborando os estudos, neste trabalho observou-se que as BON não tiveram bom desenvolvimento na F1.

Outro fator que pode ter inibido o desenvolvimento das BON é a relação carbono: nitrogênio (DQO:NT) que foi maior na F1 no FBAS, DS e SAC, já que uma maior razão DQO:NT tende a prejudicar a nitrificação. Como consequência, há baixa atividade das BON (nitratação), resultando em reduzidas concentrações de nitrato, que foram significativamente menores nesta fase (ZIELINSKA et al., 2012; ZOU et al., 2012) (TABELA 12).

As relações DQO:NT encontradas no presente trabalho, são altas, em comparação à literatura (TABELA 14). Não obstante, observou-se redução da F1 para a F3, influenciada pela diferença significativamente menor de DQO afluente a ETE. De acordo com Li et al. (2015), a relação C/N afeta significativamente a eficiência de remoção de N, pois influencia nas rotas de nitrificação e desnitrificação. Segundo os autores, o aumento de 2 para 8, favoreceu a remoção de N, pois auxilia a redução de nitratos, porém, com relação acima de 10, houve prejuízo ao tratamento, por diminuição da atividade de BOA e BON.

Tabela 14 - Médias e desvio padrão de DQO e relação DQO:NT efluente das etapas de tratamento nas diferentes fases de aeração da ETE-PFA.

Parâmetros	Etapa do tratamento	F1	F2	F3
DQO (mg L ⁻¹)	FBAS	452,3±226,1 a	399,6±136,2 ab	235±124,1 b
	DS	585,2±237,2 a	297,7±123,8 bc	193±113,1 c
	SAC	529,2±272,8 a	229,5±187,9 a	165,6±112,5 b
Relação DQO/NT	FBAS	22,1±21,4 a	18,9±24,2 a	15,8±24,5 a
	DS	27,3±25,5 a	16,2±25,8 a	17,5±20,9 a
	SAC	34,5±46,5 a	13,5±26,1 a	13,8±19,5 a

Legenda: Médias com a mesma letra na linha não diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Fonte: Da autora (2019).

Zoppas et al. (2016) e Nocko (2008), mostraram que a matéria orgânica, fonte de carbono, em excesso, pode aumentar o crescimento de bactérias heterotróficas, as quais competem por espaço, pelo oxigênio e por nutrientes com as bactérias autotróficas nitrificantes, que tem velocidade de crescimento menor. Essa disputa pode levar à eliminação de bactérias nitrificantes, devido à carência de OD e substrato, e conseqüentemente, prejudica a remoção de nitrogênio por nitrificação/desnitrificação, o que pode ter acontecido com as BON na F1.

Salienta-se que a água residuária do PFA apresenta menor biodegradabilidade comparada ao esgoto doméstico (SOUZA et al., 2018), e no presente trabalho, verificou relação DQO/DBO de 5, no FBAS, na F1 e de 3 nas demais fases. Portanto, a fonte de carbono prontamente disponível para bactérias heterotróficas, é baixa, em relação ao material inerte, o que pode ser explicado pela presença de algum componente tóxico ou compostos refratários de baixa biodegradabilidade. Esta característica pode ser atribuída à presença de pelos dos cães, óleos e graxas, detergentes e contaminantes emergentes (VON SPERLING, 2017; KORNILŁOWICZ-KOWALSKA, BOHACZ, 2011; MERRETTIG-BRUNS, JELEN, 2009; AFFANDI et al., 2014).

Observou-se também, que as BON foram mais sensíveis que as BOA à aeração reduzida da F1, e apresentaram menor crescimento (diferença de 1 a 4 ordens de grandeza), pois o coeficiente de rendimento celular de *Nitrobacter* é menor, de 0,042 g g⁻¹ de NO₂⁻, e possuem alta constante de saturação por oxigênio, de 1,1 mg L⁻¹ de O₂, em comparação às *Nitrosomonas* (0,147 g g⁻¹ de NH₄⁺; 0,3 mg L⁻¹ de O₂) (BELTRAN, 2008; COX, 2009; MADIGAN et al., 2016; ZOPPAS et al., 2016). Portanto, provavelmente seria necessário proporcionar maior concentração de OD, superior a 2,0 mg L⁻¹ de acordo com Antileo et al. (2013), para favorecer as BON, de forma a evitar acúmulo de nítrito.

Na F2, onde a densidade de BON foi maior que BOA, Yao e Peng (2017) explicam que o desequilíbrio implica em oxidação de nitrito acoplada à redução de nitrato. Mari et al. (2012) exemplificam que nesse caso um *loop* de nitrito será formado, pois um substrato (nitrito) adicional pode ser fornecido por bactérias redutoras de nitrato (BRNa) para o crescimento de BON. O crescimento de BON, na F2, também pode ser explicado pelos dados de relação DQO:NT que foram menores no DS, e principalmente no SAC, pois a redução da relação DQO:NT aumenta a nitrificação, graças a diminuição da competição entre esse grupo de microrganismos e as bactérias heterotróficas, resultado do decaimento de matéria orgânica (ZIELINSKA et al., 2012).

Essa diminuição da relação entre as variáveis ocorreu em decorrência da redução significativa das concentrações de DQO da F1 para F3, no DS (p-valor: 0,0001) e no SAC (p-valor: 0,001). A oscilação dos valores de DQO afluente a ETE durante o período de monitoramento foram maiores na F1, com diminuição consecutivamente nas fases posteriores, possivelmente por motivo de redução do número de cães e/ou maior diluição da água residuária gerada na lavagem das baias dos animais.

Conforme mencionado, Zielinska et al. (2012), afirmam que a redução da relação DQO:NT aumenta a nitrificação, mas pode prejudicar a eficiência da desnitrificação, uma vez que a velocidade de crescimento das BD depende da concentração de matéria orgânica, e de compostos nitrogenados aceptores finais de elétrons. Alguns autores relatam que relações menores que 2,5 não apresentam desnitrificação satisfatória e acima de 4 favorecem a remoção total de nitrogênio (LIU et al., 2010; COX, 2009; HELMER-MADHOK et al., 2002; MATSUMOTO et al., 2007; ZOU et al., 2012; MENG et al., 2008; LUESKEN et al., 2011).

Na F3, as relações DQO:NT são próximas às encontradas por Meng et al. (2008), entre 10 e 15, com remoção eficiente de nitrogênio total, e Chen et al.

(2016) de 16. Yao e Peng (2017) observaram que, devido à maior razão DQO:NT no afluente, altas taxas de remoção de NT (63-89%) foram alcançadas nos 10 tratamentos analisados. Nesse sentido, a pesquisa mostrou que a nitrificação e desnitrificação simultâneas (NDS) podem ser estimuladas em um sistema de oxidação, o que beneficia a alta remoção de NT (ZHOU et al., 2013).

Nesse contexto, a interação entre os fatores que influenciam o processo teve saldo positivo para o desenvolvimento das BD, no presente estudo. Observou-se que o aumento da taxa de aeração diária e a redução da relação DQO:NT não prejudicou a atividade desnitrificante, já que esses fatores favoreceram o acréscimo de nitrito e nitrato, receptores finais de elétrons, no sistema.

Os valores elevados de bactérias desnitrificantes heterotróficas na F3, com maior tempo de aeração, podem ser justificados a partir do resultado de estudos recentes, que evidenciaram a capacidade de bactérias realizarem nitrificação aeróbica heterotrófica, removendo simultaneamente NH_4^+ e NO_3^- em um reator, tratando águas residuárias com altas concentrações de substratos (HE et al., 2016; KINH et al., 2017; ZHENG et al., 2018).

Pode-se inferir que aeração intermitente aplicada no FBAS na F3 viabilizou a proliferação simultânea de bactérias nitrificantes e desnitrificantes permitindo a NDS nos reatores, devido ao gradiente de oxigênio através do biofilme, bem como a distribuição desigual de oxigênio na biomassa. Assim, é criado um ambiente em que as bactérias nitrificantes foram ativadas pela disponibilidade de oxigênio, enquanto que em áreas onde a concentração de oxigênio é limitada, houve atividade das bactérias desnitrificantes (JU et al., 2007; ZOPPAS et al., 2016). Em NDS, bactérias desnitrificantes podem se tornar predominantes, devido a sua maior velocidade de crescimento e de rendimento celular ($7,2 \text{ d}^{-1}$; $0,43 \text{ g g}^{-1}$ de DQO) (BELTRAN, 2008; NOCKO, 2008; ZOPPAS et al., 2016; METCALF; EDDY, 2003).

Essas oscilações e diferenças de valores podem ocorrer devido à tipologia do sistema, estabilidade da comunidade microbiana e maior eficiência da oxigenação (METCALF; EDDY, 2003). As características do efluente também influenciam nestas diferenças, uma vez que a água residuária deste trabalho é de origem canina, da qual existem poucos estudos e nenhum registro na literatura sobre crescimento microbiano nitrificante e desnitrificante em sistemas de tratamento tratando este tipo de efluente.

Evidenciando o melhor desenvolvimento das BD na F3, a eficiência de remoção de nitrato foi de 22% contra 7% na F1. E a maior atividade das bactérias nitrificantes e desnitrificantes na F3 contribuiu para remoção de nitrogênio total (NT) de 33% contra 17% na F2.

Yao e Peng (2017) explicam que, quando há equilíbrio, a nitrificação é normalmente acoplada à desnitrificação para converter amônio em nitrogênio gasoso. Se a nitrificação e desnitrificação ocorrerem de forma independente, o nitrito produzido pelas BOA será usado completamente pelas BON, então o saldo de crescimento de BOA e BON pode ser alcançado, como ocorreu na F3, BOA e BON com densidade de 10^6 NMP por 100 mL, pois, para a desnitrificação aeróbia, a falta de fontes de carbono é restritiva.

Destaca-se que, tanto o pH, quanto a temperatura, durante os monitoramentos das fases, se mantiveram dentro da faixa de variação adequada às atividades das bactérias envolvidas na remoção do nitrogênio, sendo que as faixas encontradas na literatura com maior variação são de pH (6,6-8,0) para nitrificação (MAIER; PEPPER; GERBA, 2009) e 6,5-8,0 para desnitrificação (SURAMPALLI et al., 1997); e temperatura variando de 20 a 36°C para nitrificação, sendo que em 25°C as BOA apresentam melhor desenvolvimento e em 28°C, há crescimento ótimo para BON (GU et al., 2012; NOCKO, 2008; PAREDES et al., 2007).

3.2 Análises moleculares por PCR e PCR-DGGE

3.2.1 Detecção por PCR de bactérias nitrificantes, desnitrificantes e Anammox

Observa-se na Tabela 15, na qual estão apresentados os resultados de presença e ausência das bactérias do ciclo do nitrogênio, que não há bactérias Anammox em nenhuma das amostras analisadas, pois no reator, não foram estabelecidas as condições específicas para esse processo. Dentre as bactérias envolvidas no processo de nitrificação/desnitrificação usual, observa-se a presença de BOA, BON, do gênero *Nitrobacter*, e desnitrificantes.

Tabela 15 - Resultados das PCR's com primers específicos para bactérias do ciclo do nitrogênio nos diferentes pontos amostrais da estação de tratamento de efluentes do canil.

Amostras	Primers				
	Pla46F Amx667R	amoA1 F amoA2 R	Nitro1198 F Nitro1423 R	NTSPA F NTSPA R	NosZ F NosZ1622 R
FBAS F1	-	+	+	-	+
FBAS F2	-	+	+	-	+
FBAS F3	-	+	+	-	+
DS F1	-	-	+	-	+
DS F2	-	+	+	-	+
DS F3	-	+	+	-	+
SAC F1	-	-	+	-	+
SAC F2	-	+	+	-	+
SAC F3	-	+	+	-	+

Fonte: Da autora (2019).

As BON do gênero *Nitrospira* não se desenvolveram nos reatores. Segundo Kim e Kim (2006) e Off et al. (2010) *Nitrospira* seria k-estrategista (alta afinidade com o substrato em baixas concentrações), enquanto *Nitrobacter* seria r-estrategista (altas taxas de crescimento específico e taxas de utilização de

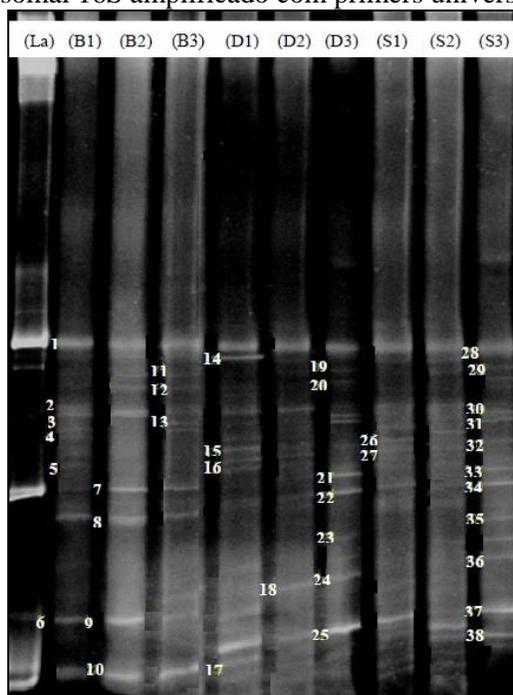
substrato em altas concentrações), indicando que os substratos para crescimento de BON (OD e Nitrito) estavam em concentrações satisfatórias para *Nitrobacter*.

Não se observou BOA no DS e SAC da F1, provavelmente devido a limpeza realizada nos decantadores para o início do experimento.

3.2.2 Perfil da Comunidade Microbiana por DGGE

O perfil de microrganismos das amostras dos reatores do pós-tratamento da ETE-PFA, nas três fases, foi avaliado por meio da técnica de PCR-DGGE (FIGURA 8).

Figura 8 - Gel de DGGE corado com Sybr-Gold contendo fragmento de DNA ribossomal 16S amplificado com primers universais para Bacteria.



Legenda: (La) Ladder; (B1) Biofiltro - FBAS Fase 1; (B2) Biofiltro FBAS Fase 2; (B3) Biofiltro - FBAS Fase 3; (D1) DS Fase 1; (D2) DS Fase 2; (D3) DS Fase 3; (S1) SAC

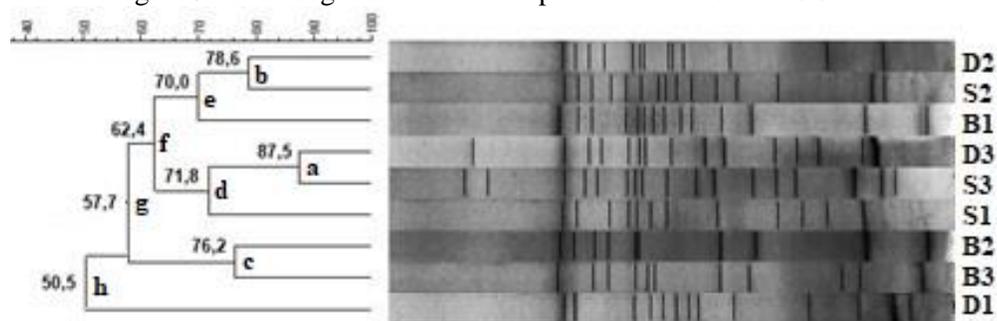
Fase 1; (S2) SAC Fase 2; (S3) SAC Fase 3. As bandas enumeradas correspondem às bandas recortadas do gel de DGGE para sequenciamento e identificação dos grupos.

Fonte: Da autora (2019).

Avaliando o perfil de bandas obtidos pelo DGGE, observa-se um elevado grupos microbianos em cada amostra, uma vez que, de acordo com a técnica, cada banda pode representar uma população (SINISCALCHI et al., 2017). Obteve-se 120 bandas a partir do gel do DGGE, porém, apenas 38 foram recuperadas e sequenciadas, apresentando similaridade com o BLAST acima de 90%. Dentre estas, nenhuma pertenceu à amostra do SAC na F2.

O perfil de bandas obtido no DGGE foi comparado conforme os coeficientes de similaridade entre as amostras, construindo um dendograma que uniu os conjuntos com base no perfil da DGGE (FIGURA 9).

Figura 9 - Dendrograma baseado no perfil de bandas do DGGE.



Legenda: (B1) FBAS F1; (B2) FBAS F2; (B3) FBAS F3; (D1) DS F1; (D2) DS F2; (D3) DS F3; (S1) SAC F1; (S2) SAC F2; (S3) SAC F3.

Fonte: Da autora (2019).

Pode-se observar no dendrograma, que os agrupamentos com maior similaridade foram DS e SAC da F3 com 87,5% (a) e DS e SAC da F2, com 78,6% (b) indicando que devido às condições de cada fase, as mesmas características microbianas foram encontradas no DS e SAC, por causa ao acúmulo de lodo no sedimento no DS e retido, por filtração, no SAC. De acordo

com a Tabela 14, que apresenta o resultado do sequenciamento genético, os microrganismos em comum estabelecidos nestes reatores são do gênero *Thauera*, as quais são bactérias heterotróficas desnitrificantes.

E com 76,2% (c) de similaridade entre o FBAS das fases 2 e 3, pode-se entender que o acréscimo de mais sete horas de aeração, embora tenha alterado o perfil da comunidade microbiana, ainda manteve as fases 2 e 3 mais próximas do que F1.

A mesma explicação se aplica para o agrupamento secundário com 71,8% (d) que une o SAC da F1 com o agrupamento “a” (DS e SAC da F3). Porém, observa-se que a diversidade genética é maior nestes reatores.

De acordo com o outro agrupamento secundário (e) pode-se inferir que o FBAS da F1 tem 70% de similaridade com o agrupamento “b” (DS e SAC da F2), indicando que o tempo de aeração intermediário aplicado na F1 não foi suficiente para o desenvolvimento de microrganismos no FBAS diferentes do DS e SAC da F2 (de menor aeração); possivelmente, ocorreu acúmulo de lodo no FBAS com características parecidas, porém, com grande diversidade genética, por apresentar agrupamento secundário, com similaridade menor que 75%.

Observa-se que o reator com características microbiológicas que mais difere dos demais reatores é DS da F1, com 50,5% (h) de similaridade, provavelmente devido à limpeza realizada nos decantadores para o início do experimento. No DS F1, banda 17 (TABELA 16), a maior similaridade (97%) é com o gênero *Rhodopseudomonas*, da família *Bradyrhizobiaceae*, à qual pertencem alguns gêneros de BON principalmente *Nitrobacter* (PELISSARI et al., 2017). Pode-se inferir que a limpeza do lodo acumulado no DS favoreceu o desenvolvimento de BON, reduzindo a competição com as heterotróficas. Na Tabela 14 está apresentada a similaridade do gene RNAr 16S das bandas obtidas

no gel do DGGE (FIGURA 9) com sequências de microrganismos inseridas no *GenBank* e *RDP Classifier*.

A maioria das bactérias desnitrificantes *Acidovorax*, *Azoarcus*, *Thauera*, entre outras, podem estar presentes no tratamento de resíduos e são capazes de transformar nitrato a nitrogênio gasoso com uma fonte de carbono exógenos. Para isso, normalmente os microrganismos utilizam o oxigênio do ar como a fonte de energia (respiração aeróbia), mas também têm a capacidade de usar nitrato e nitrito em vez de oxigênio (anoxia) como acceptor final de elétrons. Assim, estas bactérias podem crescer aerobicamente na ausência de nitrato, ou sob condições de anoxia na presença de nitrato (MAINTINGUER et al., 2013).

A análise de similaridade mostrou identidade de 95 a 99% das bandas recortadas com os genes encontrados nas amostras de todos os reatores na F3, FBAS e DS na F2, FBAS na F1 das bactérias anteriormente citadas. Corroborando os resultados de NMP, encontrou-se desnitrificantes em maior número que as nitrificantes, e a F3 com maior densidade microbiana. Gentile et al. (2007) e Maintinguer et al. (2013) concluíram em seus estudos que a redução de nitratos para N₂ foi realizado por *Acidovorax*, que estavam presentes também, nas amostras da ETE-PFA.

Bactérias desnitrificantes como a ordem *Clostridiales*, da família *Peptostreptococcaceae*, gênero *Clostridium*, são bem conhecidas no tratamento de águas residuárias (PELLISSARI et al., 2017) e foram encontradas similaridades acima de 90% nas amostras do FBAS e DS da F1.

Na mesma fase, no FBAS e no SAC, também se observou similaridade com as bactérias do filo *Firmicutes* (*Bacillus*) e gênero *Lactobacillus*, as quais geralmente crescem em solos nas raízes de plantas, responsáveis pela fixação de nutrientes, fertilidade dos solos, rendimento (crescimento) das plantas (MEENA, 2017). Portanto, podem ter se desenvolvido nas raízes do capim-vetiver no SAC, assim como encontrado por Andrados et al. (2014) nos SACs estudados. No

entanto, segundo os autores, em águas residuárias, estas bactérias estão ligadas à remoção de nitrogênio no tratamento em biofiltro, onde podem desenvolver desnitrificação autotrófica (CHEN et al., 2014; DOLEJS et al., 2015) e, por conseguinte, estas bactérias podem ser importantes para desnitrificação em biofiltro de nitratação parcial (RODRIGUEZ-SANCHEZ et al., 2016).

Tabela 16 - Bandas de DGGE (gel mostrado na Figura 9) associadas ao gene RNAr 16S (Continua).

Amostra	Número da banda	RDP Classifier	Blast	Número de Acesso no GenBank	(%)
D1	15	Família <i>Peptostreptococcales</i>	<i>Clostridium sp. enrichment culture clone NHT21</i>	JF312662.1	93
B1	3		<i>Clostridium hiranonis strain: JCM 10542</i>	AB971818.1	96
S1	26	Domínio bactéria	<i>Bacillus crescens strain KHONG1</i>	KX373481.1	91
	5		<i>Lactobacillus johnsonii strain: MYU 221</i>	LC163938.1	93
	1				92
B1	4	Filo <i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus sp. strain NIOT-AS-13</i>	KY306688.2	93
	2	Ordem <i>Clostridiales</i>	<i>Clostridium sp. Fer_34</i>	KF933839.1	94
B1, B2, D2, D3, S3	6, 7, 9, 18, 21, 22, 24, 34, 35, 36	Gênero <i>Thauera</i>	<i>Thauera sp. strain ZY1</i>	MK928401.1	99
B2, B3, D3, S3	10, 13, 23, 25, 30, 31, 32, 33, 37		<i>Thauera sp. JPB-3.02</i>	EU652481.1	99

Tabela 16 - Bandas de DGGE (gel mostrado na Figura 9) associadas ao gene RNAr 16S (Conclusão).

B2, B3, D3	8, 11, 12, 19, 20		<i>Azoarcus sp.</i> <i>strain RS4</i>	MH394448.1	98
S3	29		<i>Uncultured</i> <i>Thauera sp. clone</i> <i>F2M5Y2A01BBT</i> <i>NH</i>	HQ040322.1	99
S1, D1	27, 16	Gênero <i>Turicibacter</i>	<i>Turicibacter sp.</i> <i>H121, complete</i> <i>genome</i>	CP013476.1	96
	17	Família <i>Bradyrhizobiacae</i>	<i>Rhodopseudomonas sp. strain WR-17</i>	KY437087.1	97
D1	14	Filo <i>Saccharibacteria_g</i> <i>enera_incerta_sedi</i> <i>s</i>	<i>Uncultured</i> <i>Candidatus</i> <i>Saccharibacteria</i> <i>bacterium clone:</i> <i>AAV-3</i>	AB862036.1	97
	28	Classe <i>Betaproteobacteria</i>	<i>Uncultured</i> <i>bacterium clone</i> <i>DR-13</i>	AY945923.1	95
S3	38	Família <i>Comamonadaceae</i>	<i>Acidovorax sp.</i> <i>040703/8067L</i>	AY360350.1	97

Fonte: Da autora (2019).

Rhodopseudomonas detectada em D1, e provavelmente presente também no SAC, mas não foi recuperada em função das limitações do DGGE, é um tipo de bactéria púrpura não sulfurosa fixadora de N e que não ocorre em condições aeróbias. Na pesquisa, ela foi analisada em associação numa cultura com *Bacillus*, para proteção de seus componentes celulares da exposição ao ar (ARASHIDA et al., 2019).

As bactérias anaeróbias *Turicibacter*, encontradas nas amostras do SAC e DS da F1, são classificadas como um novo gênero distinto são comumente detectadas numa variedade de hospedeiros animais ou seus resíduos, mas sua

filogenia, seu papel ecológico e seu potencial patogênico permanecem incertos (AUCHTUNG et al., 2016).

A *Saccharibacteria* é ultrapequena e ainda pouco conhecida, pode ter grande importância e ainda são raramente reportadas em sistemas de tratamento de esgotos. Vive como parasita em outras bactérias, em solos e raízes de plantas, podendo levar a bactéria hospedeira à morte. Sabe-se que ela utiliza carbono orgânico e pode respirar aerobicamente. Foi encontrada em DS F1, inferindo que a limpeza do lodo do reator no início do experimento proporcionou condições aeróbias, já que se observou similaridade com família de BON, provavelmente estava no SAC também, mas não foi recuperada pelas limitações do DGGE. Xiujie et al. (2019) encontraram esta bactéria no tratamento de efluente em lodos ativados e observou que a introdução da OD aumentou o crescimento de *Candidatus Saccharibacteria*, que é mais adaptável em ambientes aeróbicos.

4 CONCLUSÕES

Com este estudo, conclui-se que a fase de melhor desempenho na remoção de nitrogênio no pós-tratamento da ETE-PFA foi a F3, com maior tempo de aeração e, coincidentemente, menor relação DQO:NT, contribuindo com a nitrificação e desnitrificação simultânea (NDS), com aeração intermitente.

Em todas as fases detectou-se por PCR com *primers* específicos, BOA e o gênero *Nitrobacter* (BON). O resultado também foi alcançado pela técnica de tubos múltiplos, permitindo a quantificação desses microrganismos. As BD foram detectadas por PCR, tubos múltiplos e pela técnica de PCR-DGGE. A relação entre o consumo de formas nitrogenadas mostrou a função desses microrganismos e a relação entre a redução da concentração de formas nitrogenadas e a presença de microrganismos.

O excesso de lodo orgânico desencadeou a ocorrência de nitrificação e desnitrificação heterotrófica, portanto, recomenda-se a manutenção e limpeza periódica para possibilitar a nitrificação-desnitrificação, aumentando a eficiência de remoção de nitrogênio total.

REFERÊNCIAS

ADRADOS, B.; SÁNCHEZ, O.; ARIAS, C. A.; BECARES, E.; GARRIDO, L.; MAS, J.; BRIX, H.; MORATO, J. Microbial communities from different types of natural wastewater treatment systems: Vertical and horizontal flow constructed wetlands and biofilters. **Water Research**, v. 55, p. 304- 312, 2014.

AFFANDI, I.E. et al. Degradation of oil and grease from high-strength industrial effluents using locally isolated aerobic biosurfactant-producing bacteria. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 95, n. 1, p. 33-40, 2014.

ALEXANDER, M.; CLARK, F.E. “Nitrifying bacteria”. In: BLACK C.A. (Ed.). **Methods of soil analysis, part 2. Chemical and microbiological properties**. Madison, Wis: American Society of Agronomy, 1982. p. 1477-1483.

ANTHONISEN, A.C.; LOEHR, R.C.; PRAKASAM, T.B.S.; SRINATH, E.G. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. **Journal Water Pollution Control Federation**, v. 48, n. 5, p. 835-852, 1976.

ANTILEO, C.; MEDINA, H.; BORNHARDT, C.; MUÑOZ, C.; JARAMILLO, F., PROAL, J. Actuators monitoring system for real-time control of nitrification-denitrification via nitrite on long term operation. **Chemical Engineering Journal**, v. 223, p. 467-478, 2013.

ANTILEO, C.; ROECKEL, M.; WIESMANN, U. High nitrite buildup during nitrification in a rotating disk reactor. **Water Environment Research**, v. 75, n. 2, p. 151-162, 2003.

APHA. American Public Health Association. AWWA. American Water Works Association. WEF. Water Environment Federation. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21th. ed. Washington. D.C.: APHA/AWWA/WEF, 2005.

ARASHIDA, H. et al. Nitrogen fixation in *Rhodopseudomonas palustris* co-cultured with *Bacillus subtilis* in the presence of air. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 127, n. 5, p. 589-593, maio. 2019.

ARAUJO, J.C.; CAMPOS, A.P.; SILVA, E.C.; OLIVEIRA, R.C.; CHERNICHARO, C.H.L. Comparison of methods for quantification of nitrifying bacteria. **Eng. Sanit. Ambient.**, v. 23, n. 2, p. 299-305, 2018.

AUCHTUNG, T.A. et al. Complete Genome Sequence of *Turicibacter* sp. Strain H121, Isolated from the Feces of a Contaminated Germ-Free Mouse. **Genome Announc.**, v. 4, n. 2, p. e00114-16, mar-apr. 2016.

BELTRAN, C.A.E. **Aplicación de un sistema de control supervisor de pH y OD en la operación continua de un reactor nitrificante de disco rotatório.** Departamento de Ingeniería Química, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile, 2008.

BOTHE, H.; FERGUNSON, S.J.; NEWTON, W.E. **Biology of the Nitrogen Cycle.** 1 ed. Elsevier, 2007. 453 p.

BRASIL. CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº. 430 de 2011.** Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente, 2006.

CAMPOS, A.P.; ARAÚJO, J.C. de. **Determinação de Bactérias Nitrificantes pelo Método dos Tubos Múltiplos (NMP). Procedimento Operacional Padrão (POP).** Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2010. 22 p. (Documento da Rede PROSAB Microbiologia para o Saneamento Ambiental. Área: Bacteriologia).

CHEN, J.S.; GU, H.; HAO, J. Chen Characteristics and metabolic pathway of *Alcaligenes* sp. TB for simultaneous heterotrophic nitrification-aerobic denitrification **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 100, p. 9787-9794, 2016.

CHEN, J.; TANG, Y.Q.; LI, Y.; NIE, Y.; HOU, L.; LI, X.Q.; WU, X.L. Impacts of diferente nanoparticles on functional bacterial community in activated sludge. **Chemosphere**, v. 104, p. 141-148, 2014.

CHEN, H. et al. How does iron facilitate the aerated biofilter for tertiary simultaneous nutrient and refractory organics removal from real dyeing wastewater? **Water Research**, v. 148 p. 344e358, 2019.

CIUDAD, G.A.B. **Nitrificación-desnitrificación vía nitrito em reactores de discos rotatorios bajo das modalidades de operación**: continua y secuenciada. Departamento de Engenharia Química. Instituto de Agroindústria, Universidad de La Frontera, Temuco, 2007.

COX, M.J.F. **Desarrollo de una estrategia de operación para promover el proceso nitrificación**: desnitrificación simultánea em un reactor secuencial de biopelícula. Departamento de Ingeniería Química, Universidad de La Frontera, Temuco, 2009.

DAIMS, H.; LEBEDEVA, E.V.; PJEVAC, P.; HAN, P.C.; HERBOLD, M.; ALBERTSEN, N.; JEHLICH, M.; PALATINSZKY, J.; VIERHEILIG, A.; BULAEV, R.H.; KIRKEGAARD, M.; VON BERGEN, T.; RATTEL, B.; BENDINGER, P.H.; NIELSEN, M. W. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. **Nature**, p. 10.1038, 2015.

DOLEJS, P.; PACLIK, L.; MACA, J.; POKORNA, D.; ZABRANSKA, J.; BARTACEK, J. Effect of S/N ratio on sulfide removal by autotrophic denitrification. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 99, p. 2383-2392, 2015.

ENWALL, K.; PHILIPPOT, L.; HALLIN, S.; SALIN, S. Activity and composition of the denitrifying bacterial community respond differently to long-term fertilization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8335-8343, 2005.

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

FORESTI, E.; ZAIAT, M.; VALLERO, M. Anaerobic Processes as the core technology for sustainable domestic wastewater treatment: consolidated applications, new trends, perspectives, and challenges. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 3-19, 2006.

FRANCO, C.S.; FIA, R.; MAFRA, D.C.B.; VILELA, H.S.; LANDIM, D.V.; SOUZA, A.R.S. **Operação do sistema de tratamento de dejetos do Parque**

Francisco de Assis, Lavras –MG. Lavras: UFLA, 2018. 39 p. (Boletim Técnico).

FUJITA, M.; TSUJI, K.; AKASHI, A. Temporal variation in maximum cell-specific nitrification rate. **Water Sci Technol.**, v. 61, p. 2069–2073, 2010.

GENTILE, M.E.; JESSUP, C.M.; NYMAN, J.L.; CRIDDLE, C.S. Correlation of Functional Instability and Community Dynamics in Denitrifying Dispersed-Growth Reactors. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 3, p. 680, 2007.

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

GRAHAM, D.W.; KNAPP, C.W.; VLECK, E.S.V.; BLOOR, K.; LANE, T.B.; GRAHAM, C. E. Experimental demonstration of chaotic instability in biological nitrification. **International Society for Microbial Ecology**, v. 1, p. 385-393, 2007.

GUJER, W. Nitrification and me – A subjective review. **Water Research**, v. 44, n. 1, p. 119, 2010.

GU, S.; WANG, Q.; YANG, P.; YANG, Y. Peng Start up partial nitrification at low temperature with a real-time control strategy based on blower frequency and pH Bioresour. **Technol.**, v. 112, p. 34-41, 2012.

HELMER-MADHOK, C.; SCHMID, M.; FILIPOV, E.; GAUL, T.; HIPPEN, A.; ROSENWINKEL, K.H.; SEYFRIED, C.F.; WAGNER, M.; KUNST, S. Deammonification in biofilm systems: population structure and function. **Water Science and Technology**, v. 46, n. 1-2, p. 223-231, 2002.

HE, T.; LI, Z.; SUN, Q.; XU, Y.; YE, Q. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by *Pseudomonas tolaasii* Y-11 without nitrite accumulation during nitrogen conversion Bioresour. **Technol.**, v. 200, p. 493-499, 2016.

HIDAKA, T.; YAMADA, H.; KAWAMURA, M.; TSUNO, H. Effect of dissolved oxygen conditions on nitrogen removal in continuously fed intermitente aeration process with two tanks. **Water Science and Technology**, v. 45, n. 12, p. 181-188, 2002.

HORNES, M. et al. **Influência dos compostos nitrogenados na concentração de proteína da cianobactéria *Aphanothece Microscopica* Nägeli.** Rio Grande:

Laboratório de Biotecnologia, Departamento de Química, Universidade Federal do Rio Grande, 2010.

JAISWAL, S.K.; MANDAL, D.; VISWESWARA RAO, R.V.R.L. Recovery and reuse of nitric acid from effluents containing free nitric acid in absence and presence of metal nitrates. **Chemical Engineering Journal**, v. 266, p. 271–278, 2015.

KIELING, D.D. **Estudo da remoção biológica de nitrogênio a partir de lodo nitrificante cultivado em meio autotrófico sob condições anóxicas**. 2004. 119 p. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

KINDAICHI, T.; KAWANO, Y.; ITO, T; SATOH, H.; OKABE, S. Population dynamics and in situ kinetics of nitrifying bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by real-time quantitative PCR. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 94, n. 6, p.1111-1121, 2006.

KIM D.J.; KIM S.H. Effect of nitrite concentration on the distribution and competition of nitrite oxidizing bacteria in nitrification reactor systems and their kinetic characteristics. **Water Research**, v. 40, p. 887–894, 2006.

KINH, C.T.; RIYA, S.; HOSOMI, M.A. Terada Identification of hotspots for NO and N₂O production and consumption in counter- and co-diffusion biofilms for simultaneous nitrification and denitrification Bioresour. **Technol.**, v. 245, p. 318-324, 2017.

KOCH, H.; VAN KESSEL, M.A.H.J.; LÜCKER, S. Complete nitrification: insights into the ecophysiology of comammox Nitrospira. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 103, p. 177–189, 2019.

KORNİŁŁOWICZ-KOWALSKA, T.; BOHACZ, J. Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects. **Waste Management**, v. 31, n. 8, p. 1689-1701, 2011.

KOZŁOWSKI, J.A.; KITS, K.D.; STEIN, L.Y. Comparison of nitrogen oxide metabolism among diverse ammonia-oxidizing bacteria. *Front. Microbiol.*, v. 7, p. 1-9, 2016.

LI, B.K.; IRVIN, S.; BAKER, K. The variation of nitrifying bacterial population sizes in a sequencing batch reactor (SBR) treating low, mid, high concentrated synthetic wastewater. **J Environ Eng Sci**, v. 6, p. 651–663, 2007.

LI, C.; YANG, J.; WANG, X.; WANG, E.; LI, B.; HE, R.; YUAN, H. Removal of nitrogen by heterotrophic nitrification–aerobic denitrification of a phosphate accumulating bacterium *Pseudomonas stutzeri* YG-24. **Bioresource Technology**, v. 182, p. 18–25, 2015.

LIU, J.; ZUO, J.E.; YANG, Y.; ZHU, S.; KUANG, S.; WANG, K. Na autotrophic nitrogen removal process: short-cut nitrification combined with ANAMMOX for treating diluted effluent from an UASB reactor fed by landfill leachate. **Journal of Environmental Sciences**, China, v. 22, n. 5, p. 777-783, 2010.

LUESKEN, F.A.; VAN ALEN, T.A.; VAN DER BIEZEN, E.; FRIJTERS, C.; TOONEN, G.; KAMPMAN, C.; HENDRICKX, T. L.; ZEEMAN, G.; TEMMINK, H.; STROUS, M.; OP DEN CAMP, H. J.; JETTEN, M. S. Diversity and enrichment of nitrite-dependent anaerobic methane oxidizing bacteria from wastewater sludge. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, n. 4, p. 845-854, 2011.

LUESKEN, F.A.; ZHU, B.; VAN ALEN, T.A.; BUTLER, M.K.; RODRIGUEZ DIAZ, M.; SONG, B.; OP DEN CAMP, H.J.M.; JETTEN, M.S.M.; ETTWIG, K.F. A primers for detection of anaerobic methanotrophs. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 11, 3877–3880, 2011.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. *Microbiologia de Brock*. 14 ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. 1006 p.

MAIER, R.M.; PEPPER, I.L.; GERBA, C.P. *Environmental microbiology*. 2nd ed. Academic Press, 2009. 624 p.

MAINTINGUER, S.I.; SAKAMOTO, I.K.; ADORNO, M.A.T.; VARESCHE, M.B.A. Evaluation of the microbial diversity of denitrifying bacteria in batch reactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n. 3, p. 457-465, 01 Sept. 2013.

MARI, K.H.; JOÃO, P.B.; ROBBERT, K.; DIMITRY, Y.S.; MARK, C.M. Unravelling the reasons for disproportion in the ratio of AOB and NOB in aerobic granular sludge. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 94, p. 1657–1666, 2012.

MATSUMOTO, S.; TERADA, A.; TSUNEDA, S. Modeling of membrane aerated biofilm: effects of C/N ratio, biofilm thickness and surface loading of

oxygen on feasibility of simultaneous nitrification and denitrification.

Biochemical Engineering Journal, v. 37, n. 1, p. 98-107, 2007.

MEENA, V.S. et al. Plant beneficial rhizospheric microorganism (PBRM) strategies to improve nutrients use efficiency: A review. **Ecological Engineering**, v. 107, p. 8–32, 2017.

MENG, Q.; YANG, F.; LIU, L.; MENG, F. Effects of COD/N ratio and DO concentration on simultaneous nitrification and denitrification in an airlift internal circulation membrane bioreactor. **Journal of Environmental Sciences**, China, v. 20, n. 8, p. 933-939, 2008.

MERRETTIG-BRUNS, U.; JELEN, E. Anaerobic biodegradation of detergent surfactants. **Materials**, v. 2, n. 1, p. 181-206, 2009.

MINAS GERAIS. COPAM. Conselho de Política Ambiental. CERH. Conselho Estadual de Recursos Hídricos. Deliberação Normativa Conjunta COPAM/Conselho Estadual de Recursos Hídricos do Estado de Minas Gerais. **CERH-MG nº 01, de 05 de maio de 2008**. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.

METCALFY, E. **Wastewater Engineering: Treatment and Reuse**. 4. ed. New York: McGraw-Hill, 2003. 1819 p.

MURO-PASTOR, M.I.; FLORENCIO, F.J. Regulation of ammonium assimilation in cyanobacteria. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 6-7, p. 595-603, 2003.

MUYZER, G.; WAAL, E.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 695-700, 1993.

NOCKO, L.M. **Remoção de carbono e nitrogênio em reator de leito móvel submetido à aeração intermitente**. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

OFF, S.; ALAWI, M.; SPIECK, E. Enrichment and physiological characterization of a novel Nitrospira-like bacterium obtained from a marine sponge. **Appl Environ Microbiol.**, v. 76, p. 4640–4646, 2010.

OLIVEIRA, A.C.D.G. **Bactérias heterotróficas e autotróficas envolvidas na remoção de nitrogênio de lixiviado de aterro sanitário em reator de leito móvel.** 2012.130 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Edificações e Saneamento) – Centro de Tecnologia e Urbanismo, Londrina, 2012.

OLIVEIRA, A.C.D.G.O.; BLAICH, C.I.; LOPES, D.D.; SANTANA, S.V.; PRATES, K. NMP de bactérias nitrificantes e desnitrificantes e sua relação com os parâmetros físico-químicos em lodo ativado para remoção biológica de nitrogênio de lixiviado de aterro sanitário. **Revista DAE**, v. 107, n. 192, p. 60-69, jan. 2013.

PAN, K.L.; GAO, J.G.; FAN, X.Y.; LI, D.C.; DAI, H.H. The more important role of archaea than bacteria in nitrification of wastewater treatment plants in cold season despite their numerical relationships. **Water Research**, v. 145, p.10.1016, 2018.

PAREDES, D. et al. New Aspects of Microbial Nitrogen Transformations in the Context of Wastewater Treatment – **A Review Eng.Life Sci.**, v. 7, n. 1, p. 13–25, 2007.

PELLISSARI, C.; GUIVERNAU, M.; VIÑAS, M.; SOUZA, S. S.; GARCÍA, J.; SEZERINO, O. H.; ÁVILA, C. Unraveling the active microbial populations involved in nitrogen utilization in a vertical subsurface flow constructed wetland treating urban wastewater. **Science of The Total Environment**, v. 584–585, p. 642-650, 15 april. 2017.

REYNOLDS, C.S. **The ecology of freshwater phytoplankton:** Cambridge studies in ecology. Cambridge: Cambridge University Press, 1984.

RODRIGUEZ-SANCHEZ, A. et al. Performance and bacterial community structure of a submerged biofilter subjected to high ammonium and high organic carbon concentrations. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 115, p. 224 – 233, 2016.

ROOTS, P.; WANG, Y.; ROSENTHAL, A.F.; GRIFFIN, J.S.; SABBA, F.; PETROVIC, M.; YANG, F.; KOZAK, J.A.; ZHANG, H.; WELLS, G.F. Comammox *Nitrospira* are the dominant ammonia oxidizers in a mainstream low dissolved oxygen nitrification reactor. **Water Research**, v. 157, p. 396-405, 2019.

ROTHAUWE, J.H.; WITZEL, K.P.; LIESACK, W. The Ammonia Monoxygenase Structural Gene *amoA* as a Functional Marker: Molecular Fine-

Scale Analysis of Natural Ammonia-Oxidizing Populations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 12, p. 4704-4712, 1997.

SCHMIDT, I.; BOCK, E. Anaerobic ammonia oxidation with nitrogen dioxide by *Nitrosomonas eutropha*. **Arch. Microbiol.**, v. 167, n. 2-3, p. 106-111, 1997.

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

SINISCALCHI, L.A.B.; LEITE, L.R.; OLIVEIRA, G.; CHERNICHARO, C.A.L.; ARAÚJO, J. K. Illumina sequencing-based analysis of a microbial community enriched under anaerobic methane oxidation condition coupled to denitrification revealed coexistence of aerobic and anaerobic methanotrophs. **Environmental Science and Pollution Research**, September, 2016.

SHARMA, P.D. **Environmental Microbiology**. Alpha Science International. Science, 2005. 372 p.

SOUZA, A.R. **Avaliação da eficiência do sistema de tratamento de efluentes do canil Parque Francisco de Assis em Lavras-MG**. 2015.130 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Hídricos em Sistemas Agrícolas) – Universidade de Federal de Lavras, Lavras, 2015.

SOUZA, A.R.; FIA, R.; VILELA, H.S.; MAFRA, D.C.B.; LANDIM, D.V.; FRANCO, C.S. Efficiency of the treatment system of wastewater at a kennel. *Acta Scientiarum*. **Technology**, v. 40, p. e36694, 2018.

STARR, E.P. et al. Stable isotope informed genome-resolved metagenomics reveals that *Saccharibacteria* utilize microbially-processed plant-derived carbon. **Microbiome**, v. 6, n. 122, jul. 2018.

SURAMPALLI, R.Y.; TYAGI, R.D.; SCHEIBLE, O.K.; HEIDMAN, J.A. Nitrification, denitrification and phosphorus removal in sequential batch reactors. **Bioresource Technology**, v. 61, n. 2, p. 151-157, 1997.

USHIKI, N.; FUJITANI, H.; SHIMADA, Y.; MOROHOSHI, T.; SEKIGUCHI, Y.; TSUNEDA, S. Genomic analysis of two phylogenetically distinct *Nitrospira* species reveals their genomic plasticity and functional diversity. **Front. Microbiol.**, v. 8, p. 2637, 2018.

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

VAN KESSEL, M.A.H.J. et al. Op den Camp, B. Kartal, M.S.M. Jetten, S. Lücker. Complete nitrification by a single microorganism. **Nature**, v. 528, p. 555-559, 2015.

VON SPERLING, M. **Estudos e modelagem da qualidade da água de rios**. 1 ed. Belo Horizonte: UFMG, 2017. 588 p. (Princípios do tratamento biológico de águas residuárias; v. 7).

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 4. ed. Belo Horizonte: UFMG, 2017. 472 p. (Princípios do tratamento biológico de águas residuárias; v. 1).

XIUJIE, W. et al. Dominance of Candidatus saccharibacteria in SBRs achieving partial denitrification: effects of sludge acclimating methods on microbial communities and nitrite accumulation. **RSC Adv.**, v. 9, p.11263–11271, 2019.

YAO, Q.; PENG, D.C. Nitrite oxidizing bacteria (NOB) dominating in nitrifying community in full-scale biological nutrient removal wastewater treatment plants. **AMB Express**, v. 7, n. 25, 2017.

YE, L.; ZHANG, T. Estimation of nitrifier abundances in a partial nitrification reactor treating ammonium-rich saline wastewater using DGGE, T-RFLP and mathematical modeling. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 88, n. 6, p. 1403–1412, 2010.

YIN, Z.; BI, X.; XU1, C. **Ammonia-Oxidizing Archaea (AOA) Play with Ammonia-Oxidizing Bacteria (AOB) in Nitrogen Removal from Wastewater**. Hindawi Archaea, Volume 2018, 9 pages, September, 2018.

ZHANGA, S.; CHANGBO, Z.; SHIBIN, X.; MENG, L. Impact of different running conditions on performance of biofilters treating secondary effluent during start-up. **Bioresource Technology**, v. 281, p. 168-178, 2019.

ZHENG, Z.; ZHANG, D.; LI, W.; QIN, W.; HUANG, X.; LV, L. Substrates removal and growth kinetic characteristics of a heterotrophic nitrifying-aerobic

denitrifying bacterium, *Acinetobacter harbinensis* HITLi7T at 2 °C. **Bioresource Technology**, v. 259, p. 286–293, 2018.

ZHOU, X.; HAN, Y.P.; GUO, X.S. Enhanced total nitrogen removal performance in a modified Orbal oxidation ditch system with internal nitrate recycle. **Chem Eng J.**, v. 228, p.124-131, 2013.

ZHU, X.; M. BURGER, T.A.; DOANE, W.R. Ammonia oxidation pathways and nitrifier denitrification are significant sources of N₂O and NO under low oxygen availability. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v, 110 p. 6328-6333, 2013.

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

ZOPPAS, F.M.; BERNARDES, A.M.; MENEGUZZI, A. Parâmetros operacionais na remoção biológica de nitrogênio de águas por nitrificação e desnitrificação simultânea. **Eng. Sanit. Ambient.**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 1, p. 29-42, mar. 2016.

ZOU, J.L.; XU, G.R.; PAN, K.; ZHOU, W.; DAI, Y.; WANG, X.; ZHANG, D.; HU, Y.C.; MA, M. Nitrogen removal and biofilm structure affected by COD/NH₄⁺-N in a biofilter with porous sludge-ceramsite. **Separation and Purification Technology**, v. 94, p. 9-15, 2012.

**ARTICLE III - STUDY OF NITRATATION IN PILOT-SCALE
BIOREACTORS FED WITH AN EFFLUENT FROM A SUBMERGED
BIOLOGICAL AERATED FILTER USED IN THE TREATMENT OF
DOG WASTEWATER**

ABSTRACT: Nitrification is a biochemical process that allows oxidation of ammonium ion to nitrite, and nitrite to nitrate in a biological system. Aerobic processes, such as use of submerged biological aerated filter (SBAF), enable nitrification. However, some variables that are entirely unavailable or not available at the required concentration range may hamper the process, as for example, dissolved oxygen (DO), since it is the preferred electron acceptor of heterotrophic bacteria for removal of carbonaceous organic matter in the system. In this study, nitrification under high DO concentrations was evaluated in laboratory-scale bioreactors containing 10% inoculum (0.5 kg kg^{-1}) fed with affluent from a SBAF that receive the sewage generated from washing the bays of a dog kennel in Lavras, MG, Brazil. The following variables were monitored over time: ammoniacal nitrogen ($12.44\text{-}29.62 \text{ mg L}^{-1}$), nitrite ($0.28\text{-}0.54 \text{ mg L}^{-1}$), nitrate ($1.75\text{-}3.55 \text{ mg L}^{-1}$), pH (8.11 ± 0.62), temperature ($21.61 \pm 1.24 \text{ }^\circ\text{C}$) and dissolved oxygen ($9.69 \pm 0.36 \text{ mg L}^{-1}$). Quantification of nitrifying bacteria by the multiple tube technique showed the value of $1.4 \times 10^{12} \text{ MPN mL}^{-1}$ for ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and $9.2 \times 10^{14} \text{ MPN mL}^{-1}$ for nitrite-oxidizing bacteria (NOB). These values were higher than those found in a synthetic medium, which can be explained by the greater availability of ammonium and nitrite in the effluent of the kennel. Scanning electron microscopic observations of a selective growth medium for *Nitrobacter* showed cells typical of this genus. By the culture-independent method, extraction of total genomic DNA, and PCR, with specific primers, the presence of the AmoA (Ammonia monooxygenase) gene for AOB and of the *Nitrobacter* genus was detected in the bioreactor samples. By PCR-DGGE, the sequenced bands showed high similarity with denitrifying bacteria, such as *Pseudomonas*, *Limnobacter*, *Thauera*, *Rhodococcus*, and *Thiobacillus*. Thus, the saturation of dissolved oxygen in the system resulted in improvement in the nitrification step and allowed detection of bacterial genera involved in the process.

KEY WORDS: AOB. Kennel wastewater. Nitrification. NOB. Oxygen.

**ESTUDO DA NITRATAÇÃO EM REATORES EM ESCALA PILOTO
ALIMENTADOS COM EFLUENTE DE UM FILTRO BIOLÓGICO
AERADO SUBMERSO USADO NO TRATAMENTO DE ÁGUA
RESIDUÁRIA DE CÃES**

RESUMO: A nitrificação é um processo bioquímico que permite, respectivamente, a oxidação do íon amônio a nitrito, e nitrito a nitrato, em um sistema biológico. Processos aeróbios como uso de Filtro Biológico Aerado Submerso (FBAS), possibilitam a nitrificação. No entanto, algumas variáveis, como o oxigênio dissolvido (OD), indisponíveis e/ou disponíveis fora da faixa de concentração requerida, dificultam os processos, uma vez que o OD é o aceptor de elétrons preferível para as bactérias heterotróficas, na remoção da matéria orgânica carbonácea do sistema. Nesse sentido, por meio de biorreatores em escala de bancada, contendo 10% de inoculo ($0,5 \text{ kg kg}^{-1}$) alimentado com efluente de um FBAS, que recebe o esgoto gerado pela lavagem das baias de um Canil em Lavras MG, avaliou-se a nitratação sob elevadas concentrações de OD, tendo como controle reatores alimentados com solução sintética. Foram monitoradas ao longo do tempo, as variáveis: nitrogênio amoniacal ($12\text{-}30 \text{ mg L}^{-1}$), nitrito ($0,28\text{-}0,54 \text{ mg L}^{-1}$), nitrato ($1,75\text{-}3,55 \text{ mg L}^{-1}$), pH ($8,11 \pm 0,62$), temperatura ($21,61 \pm 1,24$) e OD dos biorreatores ($9,69 \pm 0,36 \text{ mg L}^{-1}$). A quantificação de bactérias nitrificantes, pela técnica de tubos múltiplos, mostrou o valor de $1,4 \cdot 10^{12}$ NMP mL^{-1} para bactérias oxidadoras de amônia (BOA) e $9,2 \cdot 10^{14}$ NMP mL^{-1} para bactérias oxidadoras de nitrito (BON), superiores aos encontrados em um meio sintético (branco), justificado pela maior disponibilidade de amônia e nitrito, no efluente do canil. Por microscopia eletrônica de varredura realizada com o cultivo seletivo de *Nitrobacter*, visualizou-se células típicas do gênero. Por técnica independente de cultivo, extração de DNA genômico total e PCR, com *primers* específicos, detectou-se a presença do gene *AmoA* (*Amonia mono oxigenase*), para BOA e do gênero *Nitrobacter* nas amostras dos biorreatores. Por PCR-DGGE, as bandas sequenciadas apresentaram similaridade elevada com bactérias desnitrificantes, tais como *Pseudomonas*, *Limnobacter*, *Thauera*, *Rhodococcus*, *Thiobacillus*. Assim, a saturação de oxigênio dissolvido no sistema, implicou em melhoria na etapa de nitratação, e permitiu a detecção de gêneros bacterianos envolvidos no processo.

PALAVRAS CHAVE: BOA. BON. Efluente de Canil. Nitrificação. Oxigênio.

1 INTRODUCTION

Nitrogen removal from wastewater has conventionally been performed by microbiological processes such as nitrification and denitrification. In nitrification in an aerobic environment, the ammonium ion (NH_4^+) is first oxidized to nitrite (NO_2^-) (Nitritation) by the ammonia-oxidizing bacteria (AOB) *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosolobus*, *Nitrosovibrio*, or *Nitrospira*, or the ammonia-oxidizing archaea *Nitrosopumilismaritimus* or *Nitrosocaldusyellowstonii* (USHIKI et al., 2018; YIN et al., 2018). Nitrite is oxidized to nitrate (NO_3^-) by the nitrite-oxidizing bacteria (NOB) (Nitratation) *Nitrobacter*, *Nitrospina*, *Nitrococcus*, or *Nitrospira* (ZOPPAS et al., 2016). In denitrification, under anoxic conditions, facultative heterotrophic denitrifying bacteria, such as *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, and *Neisseria*, reduce nitrate to nitrogen gas (N_2), and a series of electron donors can be used. Complete denitrification occurs in four stages: NO_3^- to NO_2^- , NO_2^- to nitric oxide (NO), NO to nitrous oxide (N_2O), and finally N_2O to N_2 (BOTHE et al., 2007; MADIGAN et al., 2010). There is also autotrophic denitrification, performed by *Thiobacillus denitrificans*, that use reduced inorganic compounds, such as sulfide, as electron donors (FORESTI, 2006).

More recent studies show that the complete nitrification process can also be performed by a single microorganism. This process called Comammox (Complete Ammonia Oxidation) is carried out by *Nitrospira inopinata*, which has all the enzymes required for direct oxidation of the NH_4^+ ion to NO_3^- , without passing through NO_2^- (DAIMS et al., 2015; VAN KESSEL et al., 2015). The Anammox process (Anaerobic Ammonium Oxidation) is also able to oxidize ammonia under anaerobic conditions. This process is performed by anaerobic chemoautotrophic microorganisms that oxidize NH_4^+ (electron donor)

to N_2 , using NO_2^- as an electron acceptor (MULDER et al., 1995; PEREIRA, 2018). These bacteria are from the phylum Planctomycetes, and genera reported include *Candidatus Brocadia*, *Ca. Kuenenia*, *Ca. Anammoxoglobus*, *Ca. Jettenia* (fresh water) and *Ca. Scalindua* (sea water). Many of these may be applied in wastewater treatment (JETTEN et al., 2009; NARITA et al., 2017; NIKOLAEV et al.; 2015; VAN DE VOSSENBERG et al., 2013).

Nitrification is an important step in removing nitrogen from wastewater, but *Nitrosomonas* and *Nitrobacter* are sensitive, and their activities can be affected by several environmental and operational factors, including dissolved oxygen concentration, temperature, hydrogenionic potential (pH), biofilm structure, organic matter, and chemical inhibitors. For example, the nitrification process may be slow at pH values below 6.0 and inhibited at pH below 4.5, with an optimum range of 6.6 to 8.0 (MAIER et al., 2009).

Studies carried out by Carvalho (2018) at the Effluent Treatment Plant (WWTP) of a dog shelter in Lavras, MG, Brazil (Parque Francisco de Assis - PFA), which includes use of a Submerged Biological Aerated Filter (SBAF) unit, with daily aeration of five hours, showed low nitrification efficiency in the nitrification stage, measured by NO_3^- -N quantification, probably due to low DO concentration.

According to Zielinska et al. (2012) control of DO concentration is crucial for nitrogen removal, since this control determines the dominant biochemical route: high DO concentration inhibits denitrification, whereas low DO concentration causes limitation of nitrification. NOB may be inhibited at reduced DO concentrations, which may lead to nitrite build-up in a system under limited oxygen conditions (CAMPOS et al., 2007). Studies have shown accumulation of nitrite at OD concentrations between 0.5 and 2.0 mg.L⁻¹ (BERNET et al., 2001; HELMER; KNUST, 1998; YOO et al., 1999; RUIZ; JEISON; CHAMY, 2003; GARRIDO et al., 1997; ANTILEO et al., 2013).

Studies of detection and quantification of bacterial diversity are complementary to chemical analyses. Therefore, it is essential to understand which microorganisms coexist in the treatment in order to optimize conditions required for microbial metabolism.

In this context, laboratory-scale bioreactors simulating the effluent inflow condition of the SBAF studied by Carvalho (2018), but without oxygen limitation, were set up with biomass and wastewater from the biofilter of the kennel. The biofilter biomass and culture medium were used for nitrite oxidizers to show that viable cells were available in the samples. In addition, molecular and microbiological analyses were performed to study microorganisms in the bioreactors.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Sludge and effluent sampling

Effluent and sludge were collected on the entrance of SBAF and on the secondary sedimentation tank, respectively (CARVALHO, 2018), that treat the effluent generated from washing of about 400 dog bays in the Parque Francisco de Assis (PFA) on highway BR-265, km 341, within the urban area of Lavras, MG, at 21°15'47.4"S and 44°56'12.5"W.

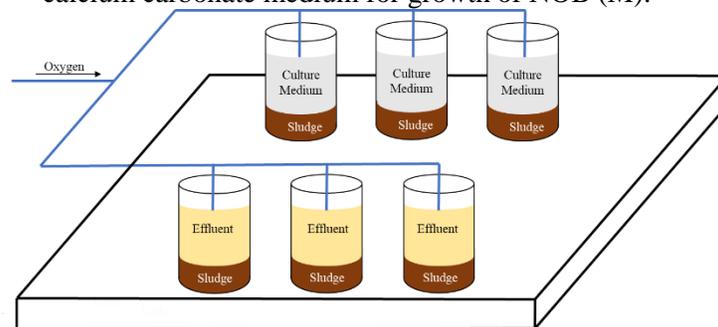
2.2 Bioreactor characteristics and operating conditions

Laboratory-scale aerobic bioreactors in triplicate were used to simulate the nitrification of wastewater affluent the SBAF. The experimental system (FIGURE 10) was composed of six glass bioreactors (600 mL), containing 10% sludge (inoculum) and 475 mL of effluent (substrate), with approximately 20%

free space. One trio of bioreactors had the PFA effluent (E) as substrate, and the other trio had a synthetic effluent of nitrite-calcium carbonate medium for growth of NOB (M) with the following composition: 0.006 g KNO_2 , 1.0 g K_2HPO_4 , 0.3 g NaCl , 0.1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.03 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.0 g CaCO_3 , and 0.3 g CaCl_2 (ALEXANDER; CLARK, 1982).

Aeration was carried out by an air compressor and flow controlled by a flowmeter regulated at 6.5 L min^{-1} , which provided oxygen to each of the bioreactors through a cylindrical air stone diffuser. The bioreactors were operated continuously, and the substrates were changed every 12 hours, during the three days of the experiment, reproducing the hydraulic retention time (HRT) of the SBAF located in the waste water treatment plant (WWTP) of PFA.

Figure 10 - Schematic diagram of the laboratory-scale bioreactors representing the trio with effluent from the SBAF (E) and the trio with nitrite-calcium carbonate medium for growth of NOB (M).



Source: From the author (2019).

2.3 Applied biological organic load

The sludge and effluent samples collected from the WWTP of the PFA were analyzed in the Wastewater Analysis Laboratory of the Environmental and Sanitary Engineering Center of the Department of Water Resources and Sanitation of the Universidade Federal de Lavras, where analyses of total solids

(TS) and total volatile solids (TVS) of the sludge sample were carried out by the gravimetric method, and analysis of chemical oxygen demand (COD) of the effluent by the closed reflux-titrimetric method (APHA et al., 2005).

Based on concentration of TVS in the sludge and COD of the effluent, the ratio used in the reactor was calculated. The proportion was established according to the biological organic load (BOL), which represents the food to microorganism ratio (F/M) inside the reactor. The BOL value of 0.5 kg kg^{-1} was adopted in the form of $[\text{COD}] [\text{TVS}]^{-1}$, the highest performing F/M ratio in a study performed by Bertolino et al. (2008). The adopted BOL ensured approximately 10% sludge (inoculum) in relation to effluent (substrate) volume, with 45.83 mL of sludge for 430 mL of effluent.

2.4 Monitoring of laboratory-scale bioreactors

After the experiment began, a minimum of 120 hours was allowed for acclimatization of the biomass. After that period, a 10 mL sample was collected for analysis every 2 hours for 10 consecutive hours over for 3 days. Ammoniacal nitrogen (AN) was determined by the micro-Kjeldahl *method (without digestion)* using the titration method, nitrite (NO_2^- -N) by the colorimetric method using sulfanilamide, according to APHA, AWWA e WEF (2005), and nitrate (NO_3^- -N) by the colorimetric method using salicylate (YANG et al., 1998; MATOS, 2012).

At sample collection, the DO supply was interrupted, and after approximately five minutes of sedimentation, the liquid phase was aseptically collected from each reactor, filtered in $0.45 \mu\text{m}$ porosity filter paper, for nitrite and nitrate analysis only, and kept for subsequent analysis.

In each reactor, temperature, dissolved oxygen, and pH were monitored before each collection, throughout the experiment. From the data obtained, the

correlation coefficient (R) was calculated between the ammonia, nitrite, nitrate, pH, temperature, and DO variables using the free software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011).

2.5 Scanning electron microscopy

From a sample of biomass collected directly from the SBAF was grown in a nitrite carbonate liquid culture medium for NOB analysis was performed scanning electron microscopy. In the Electron Microscopy and Ultra-Structural Analysis Laboratory of the Department of Plant Pathology of the Universidade Federal de Lavras, the sample was immersed in modified Karnovsky Fixative (2.5% glutaraldehyde; 2.5% formaldehyde in 0.05 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2; 0.001 M CaCl₂). The sample was then pipetted onto a slide coated with a poly-L-lysine film, washed in 0.05 M cacodylate buffer (pH 7.2), and dehydrated in ethanol (25%, 50%, 75%, 90%, and 100% for 10 minutes each). The sample was then dried in a critical point dryer (Bal-Tec), *mounted on a stub, sputtered with gold* (Sputter Coater, Bal-Tec), and observed with a Scanning Electron Microscope (SEM) LEO EVO 40 XVP.

2.6 Quantification of nitrifying bacteria

At the end of the laboratory-scale bioreactor experiment, homogeneous liquid and sludge samples from the bioreactor trios (SBAF effluent and culture medium/synthetic effluent) were collected for detection / quantification by the “multiple fermentation tube” or “most probable number” technique, proposed by Alexander and Clarck (1982) for *Nitrosomonas* and *Nitrobacter* nitrifying bacteria. Samples were incubated for 3 weeks at 28°C with uninoculated tubes (control).

2.7 Molecular methods for detection of microorganisms

For molecular analysis of bioreactor microbial community by PCR-DGGE technique (MUYZER et al., 1993), biomass samples from the six bioreactors were collected, stored separately in Falcon tubes, and sent to the of Water and Wastewater Microbiology Laboratory of the Department of Sanitary and Environmental Engineering of the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). The samples were centrifuged at 4000 rpm for 20 minutes and washed three times with phosphate buffered saline (PBS 1X, NaCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, pH = 7.2-7.4). The genomic DNA was then extracted from 0.5 g of samples with the FastDNA[®] Spin Kit for Soil (MP Biomedicals) extraction kit, according to manufacturer's instructions. To verify the extraction result, electrophoresis in 1.2% agarose gel (80 volts, 40 minutes) was performed on 3.0 µl aliquots of DNA extracted from the samples. The DNA was quantified in a Nanodrop 1000 spectrophotometer (ThermoScientific).

2.7.1 Nitrogen cycle microorganism detection by PCR

Polymerase Chain Reaction (PCR) for the detection of specific genes involved in the nitrogen cycle the following primers were used: AmoA1 F- AmoA2 R for OAB (ROTTTHAUWE et al., 1997), Nitro1198 F - Nitro1423 R for *Nitrobacter* (GRAHAM et al., 2007), NTSPA F - NTSPA R for *Nitrospira* (KINDAICHI et al., 2006) and Pla 46F and Amx 667 for *Planctomycetes* and Anammox (VAN DER STAR et al., 2007).

The PCR was performed for a final volume of 50 µL per reaction using 3 µL DNA template, 25 µL of Phoeutria 1X pre-mix, 3 µL of 0.3 ng.µL⁻¹ BSA (Bovine serum albumin), 18 µL of ultrapure water, and 0.5 µL of each primer at 300 nM per reaction. The reaction was performed in the Veriti 96-Well Thermal

Cycler apparatus (Applied Biosystems) with 4 minutes and 18 seconds of initial denaturation at 94 °C, followed by 30 cycles of denaturation at 94 °C, annealing at 55 °C and extension at 72 °C each. 1 minute. At the end, a final extension step was performed at 72 °C for 10 minutes.

2.7.2 Profile of bacterial domain microbial community by PCR-DGGE

In this analysis the same PCR reaction described above was performed using the 1055F-1392R-GC primer pair for the B8 Domain 16S rRNA V8 region (FERRIS et al., 1996).

For Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), 2 µl of each sample were subjected to 1% agarose gel electrophoresis with GelRed solution (Biotium), 10x buffer (Phoneutria), and *molecular weight marker* Low Mass DNA Ladder (Invitrogen) as the reference standard for DNA quantification. The ImageJ program (Image Processing and

Analysis in Java, <http://imagej.nih.gov/ij/>) was used to analyze images and to estimate the amount of DNA present, to be added to the gel. Amplicons containing 400 ng of DNA from samples from the two trios of laboratory-scale bioreactors were electrophoresed at 60°C at 0.5 TAE for 17 hours at 80 V in a Bio-RadDCode Universal Mutation Detection System (Hercules, CA, USA) using an 8% polyacrylamide gel and a denaturing gradient from 45% to 75%. The gels stained with Sybr-Gold solution (Life Technologies) for 30 minutes were visualized under ultraviolet light and the bands were contained, excised from the gels, and eluted in 50 µL Tris-EDTA buffer, remaining at 4 °C for 48 hours. The eluted DNA was reamplified with primers 1055-1392 (without GC clamp). The purified PCR products were sent to the MacrogenInc company (South Korea) for unidirectional sequencing (primer 1055F) by a 3730XL sequencer. The sequences were aligned through the FASTA program

(http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2), University of Virginia, USA. The aligned sequences were compared to those in the Ribosomal Database Project through the RDP Classifier program (<https://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>) and to those in the NCBI (National Center of Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) through the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). A phylogenetic tree was constructed by the Mega X software using the neighbor-joining method and bootstrap test for 1000 recombinations to perform a confidence estimation of the tree from the sequenced bands identified.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Performance evaluation of the laboratory-scale bioreactors

The culture medium for nitrite-oxidizing bacteria, used in the "M" bioreactors, does not contain ammonia, which explains the absence of ammonia (TABLE 17). The nitrite concentration found comes from the culture medium itself.

In Table 17, for "M" bioreactors, nitrate concentrations can be observed in all three days; therefore, oxidation of nitrite to nitrate occurred. This means that, in this control, the microorganisms from the WWTP-PFA sludge *were active in the presence of oxygen*.

Table 17 - Average ammonia, nitrite, and nitrate concentrations measured in the trios of bioreactors with effluent (E) and with culture medium (M) over a three-day sampling period

Time (hours)	First day					
	NA (mg L ⁻¹)		NO ₂ ⁻ -N (mg L ⁻¹)		NO ₃ ⁻ -N (mg L ⁻¹)	
	E	M	E	M	E	M
0	24	0	0,10	0,0011	2,90	0,60
2	37	0	0,13	0,0010	3,14	0,43
4	24	0	0,19	0,0015	2,72	0,34
6	19	0	0,23	0,0012	1,28	0,26
8	16	0	0,27	0,0010	1,43	0,26
10	12	0	0,28	0,0010	1,75	0,29
Second day						
0	25	0	0,21	0,0030	2,45	1,68
2	31	0	0,29	0,0030	2,47	1,50
4	12	0	0,35	0,0010	2,74	1,54
6	18	0	0,48	0,0010	3,61	1,56
8	9	0	0,49	0,0010	4,37	1,10
10	11	0	0,52	0,0017	3,77	0,84
Third day						
0	30	0	0,16	0,0010	1,50	0,66
2	34	0	0,25	0,0010	2,80	0,82
4	32	0	0,32	0,0010	2,34	0,93
6	28	0	0,42	0,0010	3,40	1,00
8	30	0	0,54	0,0010	3,55	0,76
10	-	-	-	-	-	-

Source: From the author (2019).

The mean values of ammonia, nitrite, and nitrate (TABLE 1) in all days of the experiment are higher in bioreactors with effluent (E), since bioreactors with culture medium (M) have specific nutrients necessary for NOB growth. The effluent has high concentration of ammoniacal nitrogen, since the ammonification process has already occurred (oxidation of organic matter generating inorganic compounds, among them, ammonium ions). By means of biochemical processes, the ammonium nitrogen formed is aerobically oxidized by microorganisms chemotrophs for energy production and cell growth,

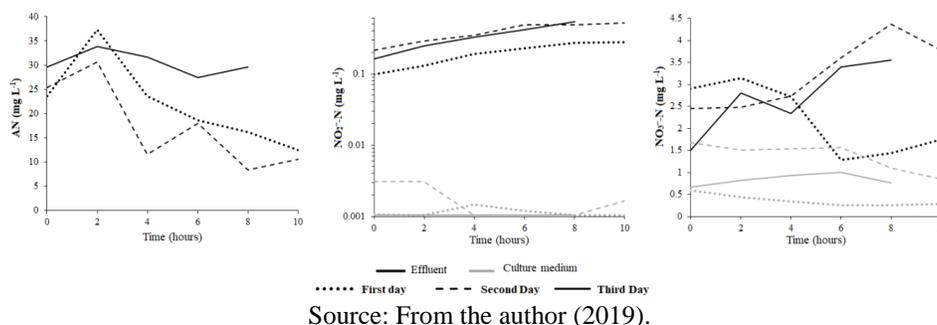
explaining the higher concentration of nitrite and nitrate in "E" bioreactors compared to "M" bioreactors, which did not contain ammonia.

Carvalho (2018) monitored nitrite and nitrate values at the outlet of the SBAF, operating with five hours of aeration per day, and observed an accumulation of nitrite that may have been related to the conversion efficiency of ammonia carried out by AOB and to the reduced abundance of bacteria of the *Nitrobacter* genus responsible for oxidation of the available nitrite. Low concentrations of dissolved oxygen may have had a more significant effect on the growth rates of microorganisms responsible for oxidation of nitrite than those that oxidize ammonia (BERNET et al., 2001). Thus, low DO concentration may be one of the limiting factors for NOB activity in treatment of the PFA effluent. In addition, in surface regions of the biofilm, nitrifying organisms with a low growth rate compete for oxygen with heterotrophic organisms that have more accelerated growth. This dispute leads to limitation of nitrifying respiration, since NOB are more dependent on oxygen (JETTEN et al., 1997).

The nitrate values found in the present study (TABLE 1) were higher than the mean value of 0.5 mg L^{-1} found by Carvalho (2018) at the outlet of the SAB. This suggests that the increase in DO concentration in the system led to improvement in nitrification, especially in the nitrataion stage performed by NOB.

Nitrite and nitrate values are low and do not show a constant behavior over time (FIGURE 11). The nitrite values had little variation or remained constant. Possible limitations of the method used for quantification and nitrite instability are factors that may explain the small concentrations observed. As higher concentrations of nitrate were detected, it is assumed that much of the nitrite present in the culture medium was oxidized to nitrate by biological processes.

Figure 11 - Average concentration of ammonia, nitrite, and nitrate in the bioreactor trios with effluent and culture medium.



In Figure 11, a similar behavior is observed on the second and third day, with an increase in nitrate due to oxidation of nitrite by NOB.

On the first and second day, there is a decrease in ammonia concentration as the hours pass due to conversion of ammonia to nitrite by AOB. However, on the third day, the concentration of ammonia remains constant even though nitrite formation occurs in the system. A possible explanation is the occurrence of ammonification of organic matter present in the effluent, providing more nitrogen in the form of ammonia, since organic matter degradation efficiency (COD) was higher on the third day [in analysis of the first sample (0 h: 266.7 mg L^{-1}) to the last (10 h: 88.1 mg L^{-1}) - removal efficiency of 67%]. Therefore, it can be inferred that there was greater activity of degrading microorganisms on the third day, which led to higher concentration of ammonium ions in the medium, and thus this concentration remained constant even with concomitant nitrification.

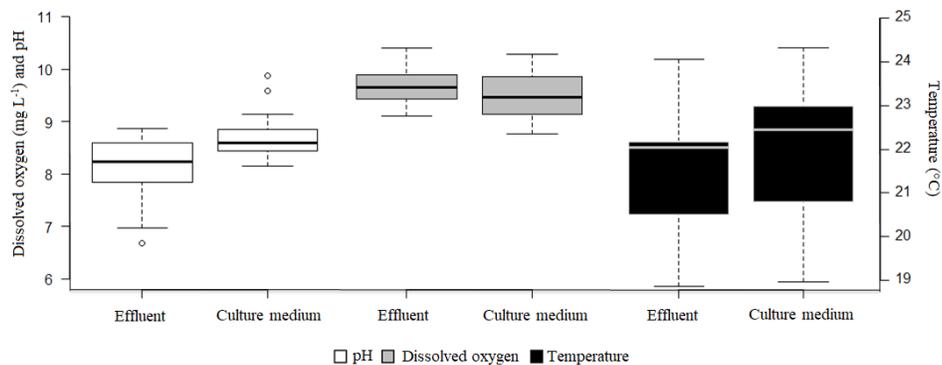
On the first day, COD removal efficiency was 17% (0 h: 533.5 mg L^{-1} and 10 h: 444.5 mg L^{-1}) and on the second day, 20% (0 h: 444.4 mg L^{-1} and 10 h: 355.6 mg L^{-1}). The decrease in COD at 0 h from the first to the third day may have been due to degradation of organic matter present in the sludge.

The bioreactors with effluent had lower values of pH (FIGURE 12). This can be explained by the generation of H^+ ions during nitrification that react

with alkalinity components, causing a decrease in the buffer capacity of the system and, consequently, reductions in pH. The pH remained stable in the bioreactors with culture medium; an increase at some points is likely due to CaCO_3 in the culture medium that prevented pH reduction.

On days with higher temperatures, the dissolved oxygen was lower, demonstrating that the solubility of gases decreases as temperature rises. In a study conducted by Ge et al. (2015), at temperatures above 15 °C, the AOB had a higher growth rate than the NOB, confirming that reduction in DO as temperature increases does not affect the activity of AOB; however, it can inhibit NOB, as described by Campos et al. (2007). Ge et al. (2015) also found that pH is a variable highly influenced by ammonia oxidation and that greater activity of AOB in the reactor tends to reduce pH values, as occurred in the present study.

Figure 12 - Average values of pH, temperature, and dissolved oxygen of the bioreactor trios with effluent and culture medium.

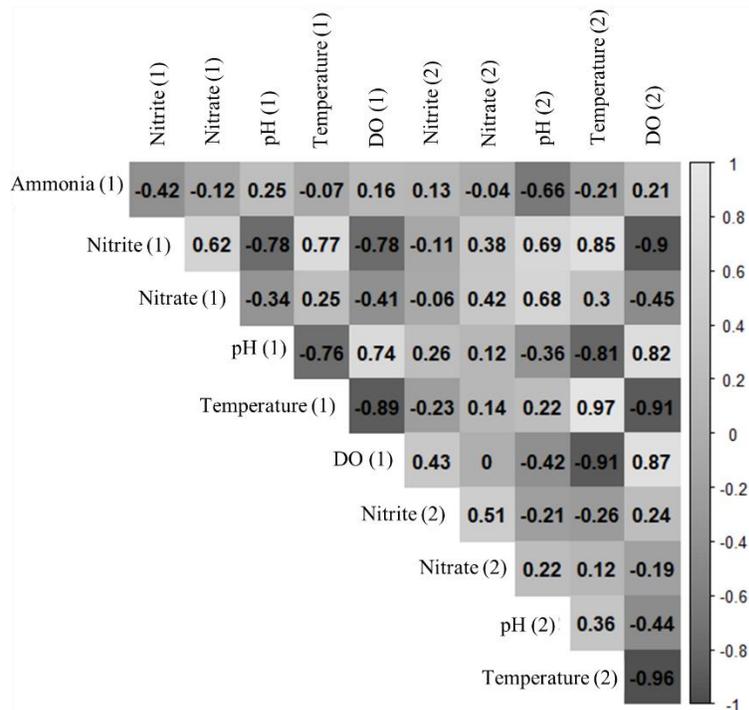


Source: From the author (2019).

The results of the correlation matrix of the effluent and culture medium (FIGURE 13) showed a moderate positive correlation between nitrite and nitrate due to the biochemical oxidation carried out by NOB. It also showed a strong positive correlation between nitrite and temperature in the effluent, since high

temperatures favor microbial metabolism and formation of nitrite. There was also a strong negative correlation between pH and temperature, probably due to the increase in nitrification, which generates acidity, and the increase in temperature, which promotes dissociation of compounds and release of H^+ . Temperature and DO also exhibited a negative correlation, arising from the decrease in oxygen solubility.

Figure 13 - Correlation matrix between the variables. Sub-index (1) represents the variables of the trio with effluent and (2) represents the trio with culture medium



Source: From the author (2019).

3.2 Detection of microorganisms by molecular methods

In Table 18, results of the samples are shown for each primer used to detect microorganisms involved in the nitrogen cycle. Table 3 shows the results of the presence and absence of these microorganisms.

Table 18 - Results of PCRs with specific primers for nitrogen cycle bacteria in the effluent (E) and culture medium (M) bioreactor sludge samples.

Samples	OAB	<i>Nitrobacter</i>	<i>Nitrospira</i>	Anammox
E	+	+	-	-
M	+	+	-	-

Source: From the author (2019).

Ammonia oxidizing bacteria (OAB) and *Nitrobacter* are present in both samples analyzed. Analysis indicates possible absence of *Nitrospira* and Anammox in samples.

The diversity of nitrifying bacteria in aerobic effluent treatment systems has already been investigated in other studies. Daimset et al. (2009) and Yao and Peng (2017) observed that the most common AOB found belongs to the genus *Nitrosomonas*, whereas for NOB, bacteria of the genus *Nitrobacter* and *Nitrospira* were found, with *Nitrospira* in greater abundance.

In the present study, AOB and NOB were detected in the two samples, which was expected, given the presence of nitrite and nitrate in the bioreactors. However, among NOB, only bacteria of the genus *Nitrobacter* were found, corroborating the study by Park et al. (2010), who found predominance of the genus *Nitrobacter* in relation to the genus *Nitrospira* in the reactors analyzed.

Pereira (2018) reported that throughout an experiment, when the availability of nitrite decreased, *Nitrospira* was more abundant, to the detriment of *Nitrobacter*. Nogueira and Melo (2006) also observed that bioreactors with higher concentrations of nitrite stimulated the growth of *Nitrobacter*; and lower

concentrations, the growth of *Nitrospira*. These studies support the hypothesis of different bacterial survival strategies: the genus *Nitrobacter* is a superior competitor when resources are abundant, whereas the genus *Nitrospira* grows under conditions of scarcity of resources.

Huang et al. (2010) found a negative correlation between *Nitrospira* gene concentration and high nitrite concentration in a study on the influence of physicochemical parameters in NOB communities. Gilbert et al. (2014) explain that *Nitrobacter* is a r-strategist (high specific growth rates and substrate utilization rates in high substrate concentrations), whereas *Nitrospira* is a k-strategist (high substrate affinity in low substrate concentrations). Thus, the genus *Nitrospira* is generally more competitive only in environments with low concentrations of nitrite and oxygen and is surpassed by *Nitrobacter* when these substrates are available in abundance in the medium. In this study without oxygen restriction and although the concentrations of nitrite were low, there was high nitrification. In addition, the presence of *Nitrobacter* at a certain cell density may be able to inhibit the growth of *Nitrospira* (NOGUEIRA; MELO, 2006).

In addition, Blackburne et al. (2007) evaluated the effect of inhibition of free ammonia on *Nitrobacter* and *Nitrospira* activity. Their results indicated that the genus *Nitrospira* was more sensitive than *Nitrobacter* to low concentrations of free ammonia. Therefore, in the system of the present study, the high concentration of DO, nitrite, or the presence of free ammonia could be factors that favored the development of the genus *Nitrobacter* and inhibited the presence of *Nitrospira*, which was present (detection by PCR-DGGE) but was not detected by primers specifically for the genus.

In samples from the bioreactors with culture medium specific for NOB, without ammonia in its composition, the presence of AOB was observed, probably because the inoculum used (PFA sludge) already had this microbial

community, and a concentration of ammonia already present in the sludge was sufficient to maintain its existence.

3.3 Quantification of nitrifying bacteria

The most probable number (MPN) of NOB (9.2×10^{14} MPN mL⁻¹) was higher than that of AOB (1.4×10^{12} MPN mL⁻¹) in the reactor with the effluent. In the bioreactor with culture medium (3.5×10^{12} MPN mL⁻¹), the lower value of NOB was due to nitrite limitation. According to Ye and Zhang (2010), the syntrophy that occurs in biofilms between ammonia oxidizers and nitrite oxidizers is favorable to NOB, which can obtain the nitrite directly. A study by Winkler et al. (2012), with bioreactors under fully aerobic conditions (DO maintained at 100% saturation), also observed a higher amount of NOB in relation to AOB.

The average growth rate is 0.76 day⁻¹ for AOB and 0.84 day⁻¹ for NOB (WATANABE et al., 1992). Iamamoto (2006) also states that bacteria of the genus *Nitrobacter* have a higher growth rate compared to AOB. According to the author, this causes NOB to convert nitrite to nitrate more rapidly, preventing nitrite accumulation in the system. Therefore, the higher value of NOB found in the present study also explains the absence of nitrite accumulation and the higher concentration of nitrate.

The values found in the present study are higher than those found by Mendonça et al. (2001). They estimated 4.9×10^6 MPN mL⁻¹ for AOB and 4.9×10^4 MPN mL⁻¹ for NOB in a laboratory-scale batch system consisting of an aerobic reactor followed by an anaerobic reactor fed with synthetic sewage similar to sanitary sewage. The concentrations found by Campos (2011) were also lower than the averages obtained in the present study. The author found

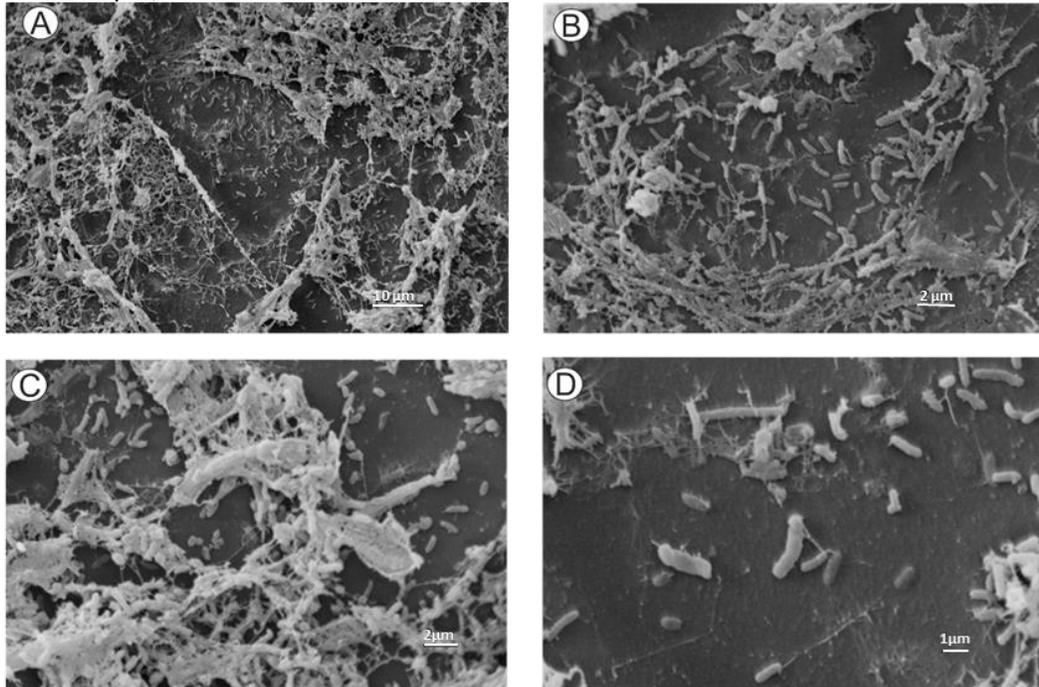
concentrations in the order of 1.8×10^8 MPN mL⁻¹ for both AOB and NOB in the sludge of an activated sludge system.

A hypothesis for the higher values found in this study arises from the type of system used, a microbial community structured from a real-scale biofilter, and from higher oxygenation efficiency, which may increase the growth rate of bacteria (METCALF; EDDY, 2003).

3.4 Scanning electron microscopy (SEM)

In Figure 14, rod-shaped bacteria are evident, probably NOB of the genus *Nitrobacter* since the sample comes from a culture medium selective for NOB. For the reactor containing effluent, SEM was not performed since the presence of a greater diversity of microorganisms and fewer cells typical of nitrifying organisms were expected. Oliveira et al. (2013) analyzed a sample with nutrient medium selective for NOB using SEM and they too observed rod-shaped bacteria. In a sample from a complete nitrification reactor, Wang et al. (2013) observed rod-shaped microorganisms with a smooth surface and 1 µm length using SEM.

Figure 14 - Images obtained by scanning electron microscopy showing bacterial cells embedded in a polysaccharide matrix. A (2300x, bar – 10 μm) / B (7000x, bar – 2 μm) / C (8500x, bar – 2 μm), D (13730x, bar – 1 μm).

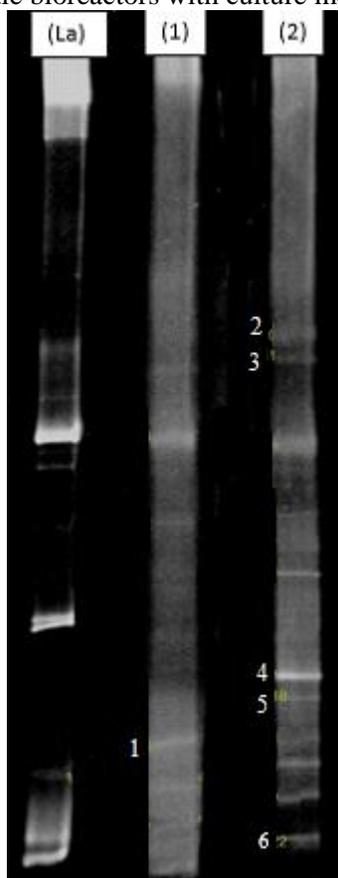


Source: From the author (2019).

3.5 PCR-DGGE reactor microbial community profile

The microbial community was evaluated using the PCR-DGGE technique. Figure 15 shows the DGGE gel.

Figure 15 - DGGE gel stained with Sybr-Gold containing a 16S ribosomal DNA fragment amplified with universal primers for bacteria. (La) molecular weight marker (Ladder Express); (1) sludge from the laboratory-scale bioreactors with effluent; (2) sludge from the laboratory-scale bioreactors with culture medium



Source: From the author (2019).

Although a large number of bands were recovered from the two samples analyzed, only the sequences of the bands listed in Table 19 were evaluated, with similarity above 90%. Lane 1 corresponded to the sample containing effluent, while lane 2 contained the culture medium. Most of the bands showed similarity with denitrifying bacteria.

Table 19 - Sequences obtained from the bands with the programs RDP Classifier and Blast.

Sample	Band number	RDP Classifier	GenBank accession number	Blast	Similarity (%)
Bioreactor with effluent	1	Class Betaproteo bacteria	FN394315.1	Uncultured <i>Nitrospira</i> sp.	93
	2	Class Betaproteo bacteria	KX774234.1	Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. clone JSPHS-11	95
Bioreactor with culture medium	3	Class Betaproteo bacteria	MK819100.1	<i>Limnobacter</i> sp. strain syn219	96
	4	Class Betaproteo bacteria	HQ097319.1	Uncultured <i>Thiobacillus</i> sp. clone	100
	5	Genus <i>Thauera</i>	HQ091029.1	Uncultured <i>Thauerasp.</i> clone	94
	6	Order Actinomycetales	KU232329.1	Uncultured <i>Rhodococcus</i> sp. clone	91

Source: From the author (2019).

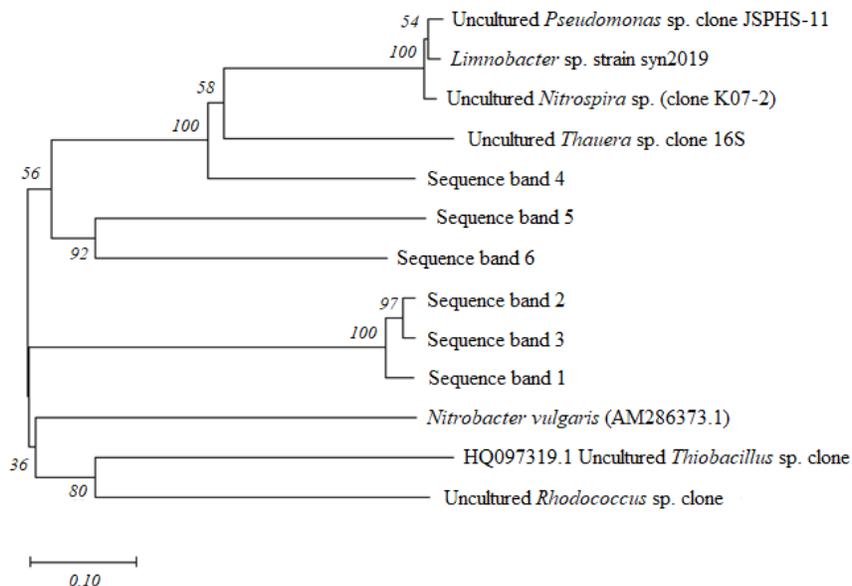
The sequence recovered from the effluent sample showed 93% similarity to *Nitrospira*, a slow-growing nitrifying microorganism, with a nitrite affinity constant lower than *Nitrobacter* and, therefore, with a lower demand for this substrate. Araújo et al. (2018) detected the presence of *Nitrospira* in more than 90% of the activated sludge samples analyzed. Ushiki (2018) also found the predominance of *Nitrospira* in effluent treatment plants.

Genre bands *Pseudomonas*, *Limnobacter*, *Thauera*, and *Rhodococcus* recovered in the sample with culture medium, with 95, 96, 94, and 91 % similarity, respectively, are related to heterotrophic denitrification and are widely reported in the literature as common in aerobic treatment systems, for example in activated sludge (MADIGAN et al.; 2010; ZHANG et al., 2017).

The bacterial genus *Thiobacillus* has also been reported in sewage treatment systems. It is a chemotrophic microorganism, grows under anoxic conditions using nitrate as an electron acceptor, and oxidizes iron and sulfur compounds, among others, to obtain energy (LETAIN et al., 2007).

Figure 16 shows the phylogenetic tree constructed by the Neighbor Joining method of Mega software, obtained from the DNA sequences recovered from bands 1, 2, 3, 4, 5, and 6.

Figure 16 - Phylogenetic tree showing gene sequences from excised DGGE bands. Bootstrap values are indicated in the tree. The classified taxa refer to sequences retrieved from the NCBI genBank. *Nitrobacter vulgaris* was used as outgroup.



Source: From the author (2019).

4 CONCLUSION

The use of laboratory-scale bioreactors showed that the presence of a high concentration of dissolved oxygen in the system was responsible for

improvement in the nitrification stage. In the sample from bioreactors with effluent, the nitrate values found were three times higher on average than the values found at the outlet of the SBAF-PFA, in another study. These results indicate that dissolved oxygen may be the main determining factor for the nitrification step in the WWTP at PFA, needing to increase PFA-FBAS aeration.

Quantification of the most probable number (MPN) of nitrifying bacteria showed a higher amount of NOB than AOB, which explains the higher concentration of nitrate and non-accumulation of nitrite in the laboratory-scale bioreactors.

The amplification of DNA fragments using specific primers detected the presence of AOB and NOB in the reactor with effluent and culture medium, and the NOB found were of the genus *Nitrobacter*. These results confirm the presence of these bacteria through monitoring of the reactor and MPN techniques. Scanning electron microscopy suggestive of NOB showed bacterial cells adhering to an exopolymer matrix, manifesting the importance of this structure for the support and stability of microorganisms in biofilms.

Genera related to biological removal of nitrogen and to nitrification were found in the DGGE, but most of them were denitrifying microorganisms.

REFERENCES

ALEXANDER, M.; CLARK, F.E. Most probable number method for microbial populations. In: BLACK, C.A. (Ed.). **Methods of soil analysis, part 2:** Chemical and microbiological properties. Madison: American Society of Agronomy, 1982. p. 1467-1472.

ANTILEO, C.; MEDINA, H.; BORNHARDT, C.; MUÑOZ, C.; JARAMILLO, F., PROAL, J. Actuators monitoring system for real-time control of nitrification-denitrification via nitrite on long term operation. **Chemical Engineering Journal**, v. 223, p. 467-478, 2013.

APHA. American Public Health Association. AWWA. American Water Works Association. WEF. Water Environment Federation. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21th. ed. Washington. D.C.: APHA/AWWA/WEF, 2005.

ARAÚJO, J.C.; CAMPOS, A.P.; SILVA, E.C.; OLIVEIRA, R.C.; CHERNICHARO, C.A.L. Comparação de métodos para quantificação de bactérias nitrificantes. **Eng. Sanit. Ambient.**, v. 23, n. 2, p. 299-305, 2018.

BERTOLINO, S.M. CARVALHO, C.F.; AQUINO, S.F. Caracterização e biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia dos esgotos produzidos em campus universitário. **Eng. sanit. Ambiente.**, v. 13, n. 3, p. 271-277, 2008.

BERNET, N.; DANGCONG, P.; DELGENÈS, J.P.; MOLETTA, R. Nitrification at low oxygen concentration in biofilm reactor. **Journal of Environmental Engineering**, v. 127, n. 3, p. 266-271, 2001.

BLACKBURNE, R. et al. Kinetic characterization of an enriched Nitrospira culture with comparison to Nitrobacter. **Water Research**, v. 41, P. 3033–3042, 2007.

BOTHE, H.; FERGUNSON, S.J.; NEWTON, W.E. Biology of the Nitrogen Cycle. 1. ed. Elsevier, 2007. 453 p.

CAMPOS, A.P. **Enriquecimento e caracterização de bactérias anammox para a remoção de nitrogênio amoniacal de efluentes**. 2010, 122 p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

CAMPOS, J.L. et al. Stability of a nitrifying activated sludge reactor, Biochemical Engineering Journal. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, n. 1, p. 87-92, 2007.

CARVALHO, L.A. **Avaliação do potencial de remoção biológica de nitrogênio pela quantificação por tubos múltiplos de bactérias nitrificantes e desnitrificantes na ETE do parque Francisco de Assis**. 2018. 84 p. Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental e Sanitária) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

DAIMS, H. et al. Complete nitrification by Nitrospira bacteria. **Nature**, v. 528, n. 7583, p. 504-509, 2015.

DAIMS H.; MAIXNER F.; SCHMID, M.C. **The nitrifying microbes:** ammonia oxidizers, nitrite oxidizers, and anaerobic ammonium oxidizers. London: IWA, 2009.

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

FORESTI, E.; ZAIAT, M.; VALLERO, M. Anaerobic Processes as the core technology for sustainable domestic wastewater treatment: consolidated applications, new trends, perspectives, and challenges. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 3-19, 2006.

GARRIDO, J.M.; VAN BENTHUM, W.A.; VAN LOOSDRECHT, M.C.; HEIJNEN, J.J. Influence of dissolved oxygen concentration on nitrite accumulation in a biofilm airlift suspension reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 53, n. 2, p. 168-178, 1997.

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

GILBERT, E.M.; AGRAWAL, S.; BRUNNER, F.; SCHWARTZ, T.; HORN, H.; LACKNER, S. Response of Different Nitrospira Species To Anoxic Periods Depends on Operational DO. **Environmental Science & Technology**, v. 48, n. 5, p. 2934-2941, 2014.

GRAHAM, D.W. et al. Experimental demonstration of chaotic instability in biological nitrification. **Isme J.**, v. 1, n. 5, p. 385-93, sep. 2007.

GRAHAM, D.C.; KNAPP, E.; VAN VLECK, K.; BLOOR, T.L.; GRAHAM, C. Experimental demonstration of chaotic instability in biological nitrification. **Isme J.**, v. 1, p. 385-393, 2007.

HELMER, C.; KNUST, S. Simultaneous nitrification/denitrification in an aerobic biofilm system. **Water Science and Technology**, v. 37, n. 4-5, p. 183-187, 1998.

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, 2010.

IAMAMOTO, C.Y. **Remoção de Nitrogênio de Águas Residuárias com Elevada Concentração de Nitrogênio Amoniacal em Reator Contendo Biomassa em Suspensão Operado em Batelada Sequenciais e Sob Aeração Intermitente**. 2006. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2006.

JETTEN, M.S.M. et al. Towards a more sustainable municipal wastewater treatment system. **Water Science and Technology**, v. 35, p.171-180, 1997.

JETTEN, M.S.M. et al. Biochemistry and molecular biology of anammox bacteria. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 44, n. 2-3, p. 65-84, 2009.

LENS, P. et al. **Biofilms in medicine, industry and environmental biotechnology**: characteristics, analysis and control. 1 ed. London: IWA, 2003.

LETAIN, T.E.; KANE, S.R.; LEGLER, T.C.; SALAZAR, E.P.; AGRON, P.G.; BELLER, H. R. Development of a genetic system for the chemolithoautotrophic bacterium *Thiobacillus denitrificans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 3265-3271, 2007.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1128 p.

MAIER, R.M.; PEPPER, I.L.; GERBA, C.P. **Environmental microbiology**. 2. ed. Arizona: Academic Press, 2009. 624 p.

MENDONÇA, H.V. et al. Caracterização microbiológica de um sistema de remoção de nitrogênio em batelada. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 21, 2001, João Pessoa. **Anais...** São Carlos: EESC, 2001.

MATOS, A.T. **Qualidade do meio físico ambiental**: práticas de laboratório. Viçosa: UFV, 2012. p. 148-150.

METCALFY, E. **Wastewater Engineering**: Treatment and Reuse. 4th ed. New York: McGraw-Hill, 2003. 1819 p.

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

MUYZER, G.; WAAL, E.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 695-700, 1993.

NARITA, Y.; ZHANG, L.; KIMURA, Z.; ALI, M.; FUJII, T.; OKABE, S. Enrichment and physiological characterization of an anaerobic ammonium-oxidizing bacterium 'Candidatus Brocadia sapporoensis'. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 40, n. 7, p. 448–457, 2017.

NIKOLAEV, Y. A. et al. Candidatus "Jetteniamoscovienalis" sp. nov., a new species of bacteria carrying out anaerobic ammonium oxidation. **Microbiology**, v. 84, n. 2, p. 256–262, 2015.

NOGUEIRA, R.; MELO, L.F. Competition Between *Nitrospira* spp. and *Nitrobacter* spp. in Nitrite-Oxidizing Bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 95, n. 1, 2006.

OLIVEIRA, A.C.D.G. et al. NMP de bactérias nitrificantes e desnitrificantes e sua relação com os parâmetros físico-químicos em lodo ativado para remoção biológica de nitrogênio de lixiviado de aterro sanitário. **Revista DAE**, n. 192, p. 60-69, 2013.

PARK, H.; ROSENTHAL, A.; JEZEK, R.; RAMALINGAM, K.; FILLOS, J.; CHANDRAN, K. Impact of inocula and growth mode on the molecular microbial ecology of anaerobic ammonia oxidation (anammox) bioreactor communities. **Water Research**, v. 44, n. 17, p. 5005–5013, 2010.

PEREIRA, A.D. Reatores com atividade anammox para o pós-tratamento de digestato de resíduo alimentar: Avaliação de diferentes estratégias de aeração e da comunidade microbiana. 2018. 242 p. Tese (Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) - Universidade Federal de Minas Gerais, 2018.

R DEVELOPMENT CORE TEAM). R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2011.

ROTTTHAUWE, J.H.; WITZEL, K.P.; LIESACK, W. The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. **Applied and environmental microbiology**, v. 63, n. 12, p. 4704-4712, 1997.

ROUXHET, P.G., MOZES, N. Physical chemistry of the interface between attached micro-organisms and their support. **Water Science and Technology**, v. 22, n. 1-2, p. 1-16, 1990.

RUIZ, G.; JEISON, D.; CHAMY, R. Nitrification with high nitrite accumulation for the treatment of wastewater with high ammonia concentration. **Water Research**, v. 37, n. 6, p. 1371-1377, 2003.

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

VAN KESSEL, M.A.H.; SPETH, D.R.; ALBERTSEN, M.; NIELSEN, P.H.; OP DEN CAMP, H.J.M.; KARTAL, B.; JETTEN, M.S.M.; LÜCKER, S. Complete nitrification by a single microorganism. **Nature**, v. 528, n. 7583, p. 555–559, 2015.

USHIKI, N.; FUJITANI, H.; SHIMADA, Y.; MOROHOSHI, T.; SEKIGUCHI, Y.; TSUNEDA, S. **Genomic Analysis of Two Phylogenetically Distinct Nitrospira Species Reveals Their Genomic Plasticity and Functional Diversity**. *Front Microbiol*, 2018.

VAN DE VOSSENBERG, J. et al. The metagenome of the marine anammox bacterium 'Candidatus Scalindua profunda' illustrates the versatility of this globally important nitrogen cycle bacterium. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 1275–1289, 2013.

WANG, W. et al. Sustainable nitrification in fluidised bed reactor with immobilised sludge Pellets. **Water SA**, v. 39 n. 2, p. 285-293, 2013.

WATANABE, Y.; MASUDA, S.; ISHIGURO, M. Simultaneous nitrification and denitrification in micro-aerobic biofilms. **Water Sci. Technol.**, v. 26, n. 3-4, p. 511-522, 1992.

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, 2012.

- YANG, J.E.; SKOGLEY, E.O.; SCHASS, P.E.; KIM, J.J. A simple spectrophotometric determination of nitrate in water, resin and extracts. **Soil Science Society American Journal**, v. 62, p. 108-115, 1998.
- YAO, Q.; PENG, D.C. Nitrite oxidizing bacteria (NOB) dominating in nitrifying community in full-scale biological nutrient removal wastewater treatment plants. **AMB Express**, v. 7, 2017.
- YE, LIN; ZHANG, T. Estimation of nitrifier abundances in a partial nitrification reactor treating ammonium-rich saline wastewater using DGGE, T-RFLP and mathematical modeling. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v. 88, p. 1403-1412, 2010.
- YIN, Z.; BI, X.; XU, C. Ammonia-Oxidizing Archaea (AOA) Play with Ammonia-Oxidizing Bacteria (AOB). In: **Nitrogen Removal from Wastewater**. Hindawi Archaea, 2018. 9 p.
- YOO, H.; AHN, K.H.; LEE, H.J.; LEE, K.H.; KWAK, Y.J.; SONG, K.G. Nitrogen removal from synthetic wastewater by simultaneous nitrification and denitrification (SND) via nitrite in an intermittently-aerated reactor. **Water Research**, v. 33, n. 1, p. 145-154, 1999.
- ZHANG, B.; XU, X.; ZHU, L. Structure and function of the microbial consortia of activated sludge in typical municipal wastewater treatment plants in winter. **Scientific Reports**, 2017.
- ZIELINSKA, M.; BERNAT, K.; CYDZIK-KWIATKOWSKA, A.; SOBOLEWSKA, J.; WOJNOWSKA BARYLA, I. Nitrogen removal from wastewater and bacterial diversity in activated sludge at different COD/N ratios and dissolved oxygen concentrations. **Journal of Environmental Sciences, China**, v. 24, n. 6, p. 990-998, 2012.
- ZOPPAS, F.M.; BERNARDES, A.M.; MENEGUZZI, A. Parâmetros operacionais na remoção biológica de nitrogênio de águas por nitrificação e desnitrificação simultânea. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 21, p. 29-42, 2016.

5 CONCLUSÃO GERAL

Dentre as avaliadas, a melhor estratégia de aeração para um bom desempenho no tratamento da ETE-PFA, foi a aeração intermitente – F3 (2 h de aeração e 2 h sem aeração), na qual foram obtidos os melhores resultados para remoção de poluentes, principalmente nitrogênio e matéria orgânica (DBO e DQO), alcançando concentrações suficientes para atender as normas ambientais para disposição em cursos d'água.

Quanto à microbiota envolvida no processo de remoção de nitrogênio, a F3 apresentou melhores condições físico-químicas e redox para desenvolvimento dos microrganismos avaliados, com predominância de bactérias desnitrificantes. A comunidade microbiana estabelecida apresentou capacidade para nitrificação e desnitrificação simultânea.

O experimento de biorreatores com aeração contínua mostrou que, apesar da maior taxa de aplicação de oxigênio (29 vezes maior que no FBAS-PFA), os resultados dos compostos nitrogenados não apresentaram diferença em relação à F3 ($p < 0,05$), mesmo com maior densidade microbiológica nitrificante. A aeração contínua diária agregaria um maior custo energético com pouco incremento na remoção de poluentes em relação à F3.

Portanto, para aliar desempenho com economia, no tratamento aeróbio, a aeração intermitente a cada 2 horas é a melhor estratégia para a ETE-PFA. Para que isto ocorra, torna-se necessário a manutenção do sistema, com remoção periódica de lodo do DS, para evitar acúmulo e arraste de sólidos, garantindo eficiência no tratamento, maior atividade nitrificante aeróbia, e maior remoção de patógenos no SAC.

Este estudo mostrou a usabilidade de aeração intermitente no tratamento de efluentes, provando que, dependendo do sistema e da água residuária, um FBAS não precisa necessariamente de aeração contínua, que é a prática mais

usada até o momento, e que, inclusive, esta alternativa contribui no processo de remoção de nitrogênio.

Recomenda-se o aprofundamento no estudo da nitrificação e desnitrificação simultânea na ETE-PFA, bem como uma avaliação da diversidade microbiana ao longo do sistema de tratamento, sobretudo dos novos microrganismos e processos alternativos de remoção de nitrogênio, como os microrganismos nitrificantes heterotróficos e desnitrificantes aeróbios explorados na discussão deste trabalho.

Assim como em outros tratamentos de efluentes animais, no tratamento de água residuária de canil, é relevante estudar a inibição ou alteração dos processos microbianos, por fármacos administrados aos cães, bem como a presença de genes de resistência no efluente de canil.

