



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo

RAÚL LIMA COASACA

**“REMOÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM
SISTEMAS ALAGADOS CONSTRUÍDOS (*Constructed
Wetlands*) ENRIQUECIDOS COM BACTÉRIAS
ANAMMOX”**

CAMPINAS

2016

RAÚL LIMA COASACA

**“REMOÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM
SISTEMAS ALAGADOS CONSTRUÍDOS (*Constructed
Wetlands*) ENRIQUECIDOS COM BACTÉRIAS
ANAMMOX”**

Dissertação de Mestrado apresentada a Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo da Unicamp, para obtenção do título de Mestre em Engenharia Civil, na área de Saneamento e Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Luiz Tonetti

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO OU TESE DEFENDIDA PELO ALUNO RAÚL LIMA COASACA E ORIENTADO PELO PROF. DR. ADRIANO LUIZ TONETTI.

ASSINATURA DO ORIENTADOR



CAMPINAS

2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 134466/2014-4

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

L628r Lima Coasaca, Raúl, 1986-
Remoção biológica de nitrogênio em sistemas alagados construídos enriquecidos com bactérias Anammox / Raúl Lima Coasaca. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Adriano Luiz Tonetti.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo.

1. Nitrogênio. 2. Desnitrificação. 3. Manguezais. 4. Amônio. I. Tonetti, Adriano Luiz, 1973-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Biological nitrogen removal in constructed wetlands enhanced with Anammox bacteria

Palavras-chave em inglês:

Nitrogen

Denitrification

Wetlands

Ammonium

Área de concentração: Saneamento e Ambiente

Titulação: Mestre em Engenharia Civil

Banca examinadora:

Adriano Luiz Tonetti [Orientador]

Tamara Simone van Kaick

Arioaldo José da Silva

Data de defesa: 11-07-2016

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Civil

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA CIVIL, ARQUITETURA E
URBANISMO**

**“REMOÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM SISTEMAS
ALAGADOS CONSTRUÍDOS (*Constructed Wetlands*)
ENRIQUECIDOS COM BACTÉRIAS ANAMMOX”**

Raúl Lima Coasaca

Dissertação de Mestrado aprovada pela Banca Examinadora, constituída por:

Prof. Dr. Adriano Luiz Tonetti
Presidente e Orientador(a)/Nome da Instituição

Prof. Dr. Tamara Simone van Kaick
Nome da Instituição

Prof. Dr. Ariovaldo José da Silva
Nome da Instituição

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se
no processo de vida acadêmica do aluno.

Campinas, 11 de julho de 2016

*Ao amor, porque sem ele nada
houvesse concluído nem começado.
Somos todos um grande amor.*

AGRADECIMENTOS

A gratidão que tenho é infinita pelas pessoas que estiveram comigo nos momentos bons e ruins. Em especial dos que aqui menciono:

A Deus, por ser quem é e por dar-me a oportunidade de ser quem sou, ¡*gracias!*.

A meus pais, Marina e Raúl, por ter sempre uma fé inquebrantável para meus sonhos, sem ajuda deles nada estaria feito. ¡*Los amo mucho!*

Agradeço, muito especialmente, a quem soube ser paciente e levar o amor no ventre apesar da minha ausência. ¡*Muchas gracias, Lyzbeth! ¡Te amo mucho!*

À vida, que traz maravilhas todo dia, e claro, nenhuma maior que a vida mesma, minha pequena Meredith, meu novo grande amor.

Ao meu professor orientador Adriano, quem desde o começo foi grande apoio para realizar meus sonhos, obrigado pelos conselhos e ensinamentos.

Ao Professor Dr. Ariton Kunz e a Marina Celant de Prá, por seu apoio na tecnologia Anammox e o fornecimento do material biológico.

Aos professores do programa de mestrado de Engenharia Civil, por seus grandes aportes no meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Aos meus grandes amigos do mestrado, pelas horas de tempo vividas em harmonia, felicidade e trabalho, seus aportes para minha pesquisa são inestimáveis, estarei sempre grato com vocês.

Aos meus parceiros de pesquisa, Daniel, Francisco, Taína, Noely, cujas discussões e ajuda aportaram grandes novidades a meu projeto.

A Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo, pela disposição de recursos, laboratórios e pessoal para o desenvolvimento da pesquisa; em especial ao pessoal de apoio técnico dos laboratórios.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela bolsa de mestrado concedida.

A todos, ¡GRACIAS TOTALES!

RESUMO

A presença de nutrientes nos efluentes de sistemas de tratamento de esgoto trazem problemas de toxicidade e eutrofização. As tecnologias convencionais de remoção de nitrogênio nitrificação/desnitrificação requerem de gastos energéticos elevados e/ou adição de uma fonte de carbono externa. A partir disso, novas tecnologias foram desenvolvidas, destacando entre todas, a oxidação anaeróbia de amônio ou Anammox (do inglês *Anaerobic Ammonium Oxidation*). Este processo permite a oxidação de amônio (NH_4^+) até nitrogênio gasoso (N_2) utilizando nitrito (NO_2^-) como agente oxidante com baixo consumo de energia e sem adição externa de fontes de carbono em relação ao processo convencional. Porém, a formação biológica de nitrito precisa de um cuidado operacional avançado, o que limita seu uso em sistemas simplificados. O presente estudo revela que a atividade Anammox pode ser promovida em sistemas alagados construídos (*Constructed wetlands*) utilizando uma mistura de efluente anaeróbio rico em amônio e efluente aeróbio rico em nitrato (NO_3^-). Para isto, utilizou-se dois sistemas alagados construídos, um vegetado e um não vegetado, alimentados com mistura de efluente anaeróbio (75%) e efluente nitrificado (25%). Os resultados mostram valores até 59% de remoção de nitrogênio total inorgânico quando inoculado com biomassa Anammox na unidade vegetada. Isto evidencia a importância da presença das plantas, que aumentam a eficiência de remoção. Finalmente, apesar de não ser a única rota de remoção, Anammox, é promovido, principalmente, pela formação de nitrito a partir da desnitrificação parcial de nitrato.

Palavras chave: Remoção de nutrientes. Nitrogênio. Anammox. Desnitrificação parcial. Sistemas alagados construídos.

ABSTRACT

The presence of nutrients in the effluent of sewage treatment systems bring toxicity and eutrophication problems. The conventional nitrogen removal technologies nitrification/denitrification require high energy expenditures and/or addition of an external source of carbon. From this, new technologies have been developed, emphasizing among all the anaerobic ammonium oxidation (Anammox). This process allows oxidation of ammonium (NH_4^+) to gaseous nitrogen (N_2) using nitrite (NO_2^-) as an electron acceptor with low energy consumption and without addition of external carbon source. However, the biological formation of nitrite need an advanced operational care, which limits its use in simplified systems. This study shows that Anammox activity can be promoted in constructed wetlands using a mixture of anaerobic effluent rich in ammonium and rich aerobic effluent nitrate (NO_3^-). For this, it was used two constructed wetland systems, vegetated and no vegetated; fed with a mixture of anaerobic effluent (75%) and nitrified effluent (25%). The results show values up to 59% of total inorganic nitrogen removal when inoculated with Anammox bacteria, this values are considered high for wetlands of subsurface flow. Another important factor is the presence of plants, which increase the removal efficiency. Finally, although not to be the only route removal, Anammox, is promoted primarily by nitrite formation from nitrate partial denitrification.

Keywords: Nutrient removal. Nitrogen. Partial Denitrification. Anammox. Constructed Wetlands.

SUMÁRIO

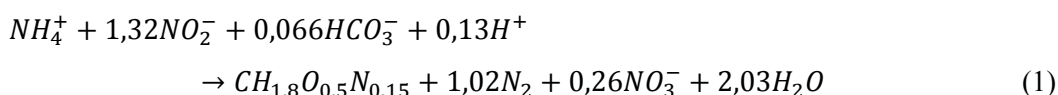
1	INTRODUÇÃO.....	10
1.1	OBJETIVOS	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1	O problema do nitrogênio	13
2.2	Alternativas de remoção de nitrogênio em zonas rurais	14
2.3	Sistemas alagados construídos (Constructed wetlands).....	15
2.4	Oxidação anaeróbia de amônio	17
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1	Configuração do sistema.....	23
3.2	Delineamento experimental	26
3.3	Procedimentos específicos	26
3.3.1	Medida da vazão e Evaporação/Evapotranspiração	26
3.3.2	Coleta e análise de amostras.....	27
3.3.3	Inoculação de Anammox	27
3.3.4	Taxa de desnitrificação e oxidação anaeróbia de amônio (Anammox) potencial	28
4	ANÁLISE DE DADOS	28
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
6	CONCLUSÕES	45
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
	APÊNDICE	52

1 INTRODUÇÃO

A presença de compostos nitrogenados no efluente final dos sistemas de tratamento de esgoto pode causar impactos negativos nos corpos receptores e na saúde pública. Em escala global, são lançados 160 teragramos¹ de nitrogênio de origem antropogênico na superfície terrestre por ano (GALLOWAY et al., 2003, 2008) causando graves impactos ambientais. Os principais impactos gerados incluem o esgotamento de oxigênio dissolvido (O₂), eutrofização, toxicidade e meta-hemoglobinemia² (CANFIELD; GLAZER; FALKOWSKI, 2010).

Desse modo, a remoção de nutrientes tem ganhado importância devido as novas exigências nos padrões de lançamento e disposição de esgoto, cada vez mais estritos. Durante décadas, a principal rota de remoção biológica de nitrogênio foi a amonificação (N_{org} → NH₄⁺), seguida da nitrificação (NH₄⁺ → NO₂⁻ → NO₃⁻) e da desnitrificação (NO₃⁻ → NO₂⁻ → NO → N₂O → N₂). No entanto, nas últimas décadas vêm surgindo um número de novos processos alternativos para remoção de nitrogênio baseados na nitrificação parcial (HELLINGA et al., 1998), oxidação anaeróbia de amônio (Anammox) (MULDER *et al.*, 1995), desamonificação aeróbia (HIPPEL et al., 1997) e desnitrificação autótrofa (SLIEKERS, 2002).

Destes processos, sem dúvida, o mais promissor é o *Anammox* (*Anaerobic ammonium oxidation*). Este processo descoberto por Mulder et al. (1995) utiliza nitrito como receptor de elétrons para oxidar o íon amônio em nitrogênio gasoso (Eq. 1). Do ponto de vista tecnológico, ele permite reduzir o consumo de energia e evitar o uso de doadores de elétrons (STROUS et al., 1998); porém, concentrações elevadas de nitrito ou oxigênio podem inibir o crescimento destes micro-organismos (JIN et al., 2012; LOTTI et al., 2012).



¹ 1 Tg = 10⁹ g

² Também conhecida por "meta-Hb", é uma desordem caracterizada pela presença de um nível mais alto do que o normal de meta-hemoglobina no sangue. A meta-hemoglobina é uma forma de hemoglobina que não se liga ao oxigênio. Quando sua concentração é elevada nas hemácias pode ocorrer uma anemia funcional e hipoxia em tecido.

Devido a sua instabilidade, a formação de nitrito, é a principal dificuldade no processo Anammox. Para produzir nitrito sem a subsequente formação de nitrato (nitritação) existem distintos métodos e estratégias operacionais, como: baixos níveis de oxigênio dissolvido (GARRIDO et al., 1997; RUIZ; JEISON; CHAMY, 2003), aumento da temperatura do meio (HAO; HEIJNEN; VAN LOOSDRECHT, 2002), toxicidade por amônia livre (LIU; TAY, 2001; PARK; BAE; RITTMANN, 2010) ou aumentando a taxa de carregamento hidráulico (HELLINGA et al., 1998; VAN DONGEN; JETTEN; VAN LOOSDRECHT, 2001).

Os sistemas alagados construídos (*Constructed Wetlands*) são áreas alagadas adaptadas para o tratamento de distintos tipos de efluentes (VYMAZAL, 2009). Como podem prover uma elevada eficiência de tratamento com baixo consumo de energia e baixo custo de construção, operação e manutenção; são amplamente utilizados como sistemas de tratamento para pequenas comunidades (GUDE; TRUAX; MAGBANUA, 2013; WU et al., 2014). Os sistemas alagados com fluxo horizontal são os mais utilizados e possuem meio de suporte vegetado com macrófitas, cujas raízes liberam oxigênio de forma passiva, permitindo a formação de um biofilme estável com zonas anaeróbias e aeróbias (GAGNON et al., 2007; KADLEC et al., 2000).

Quando utilizados para remoção de nitrogênio, os sistemas alagados construídos de fluxo horizontal, utilizam principalmente o processo nitritação/Anammox (PAREDES; KUSCHK; KÖSER, 2007; TAO et al., 2012) devido à oxigenação passiva das plantas dentro do meio. No entanto, o processo é lento e a taxa de remoção é baixa (ZHU et al., 2011), então o fato de utilizar um efluente nitrificado junto com um efluente anaeróbio (amonificado) permitiria uma desnitrificação parcial até nitrito a partir de nitrato pela carência de fontes de carbono facilmente biodegradáveis (DU et al., 2015; KALYUZHNYI; GLADCHENKO, 2009; KALYUZHNYI et al., 2006; WAKI et al., 2013), isto promoveria o aumento na atividade Anammox. Desta forma, a remoção de nitrogênio seria promovida simultaneamente por Anammox e a desnitrificação.

Na atualidade vem se realizando vários estudos para avaliar os fatores que influenciam o desenvolvimento das bactérias oxidadoras de amônio dentro destes sistemas alagados (DONG; SUN, 2007; TAO; WANG, 2009; TAO et al., 2012; WANG; LI, 2014a, 2014b; ZHU et al., 2011, 2014). No Brasil, distintas pesquisas visam a aplicação do processo Anammox, em especial para efluentes com elevado teor de nitrogênio (KUNZ et al., 2013;

SCHEEREN et al., 2011), outros autores estudam distintas estratégias nas condições de crescimento (AGNES et al., 2008), enriquecimento da biomassa (COSTA et al., 2014; DE ARAÚJO et al., 2010), e estratégias de partida para distintos reatores (CASAGRANDE et al., 2011).

No entanto, são poucos os estudos que avaliam o tratamento de esgoto domiciliar e presença de Anammox no processo de desnitrificação. Portanto, o uso de bactérias Anammox dentro dos sistemas alagados utilizados para tratar um efluente rico em amônio (reator anaeróbio) e um efluente rico em nitrato e nitrito (filtro de areia) pode promover a remoção autótrofa de nitrogênio, aumentando a eficiência de remoção de nitrogênio e reduzindo a produção de gases de efeito estufa.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência das bactérias Anammox na remoção de nitrogênio sobre o processo de desnitrificação em sistemas alagados construídos de fluxo subsuperficial como pós-tratamento de reator anaeróbio e filtro de areia.

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Caracterizar a eficiência de remoção de nitrogênio em sistemas alagados construídos empregados no pós-tratamento de filtro anaeróbio e filtro de areia.
- 2) Avaliar a influência da vegetação na remoção de nitrogênio.
- 3) Avaliar a atividade Anammox no sistema alagados construídos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O problema do nitrogênio

No último século, o foco do tratamento de esgoto foi o a remoção de matéria orgânica. Assim, a maioria de Estações de Tratamento de Esgoto (E.T.E.) tinham como principal objetivo a remoção destes compostos carbonáceos usando diferentes tecnologias (CHERNICHARO et al., 2015). Porém, o carbono orgânico não é o único contaminante dentro das águas residuárias, também existem as espécies de nitrogênio reativas (Nr), como amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-), que devem ser removidas para evitar impactos negativos no meio ambiente (GALLOWAY et al., 2008).

Dentre as principais consequências, a eutrofização é a mais problemática (SELMAN; GREENHALGH, 2010). Este fenômeno é causado pelo aumento de nutrientes em corpos hídricos, provocando um aumento desmesurado de organismos fotossintéticos. Nestas condições, os micro-organismos responsáveis pela degradação destes organismos fotossintetizadores crescem exponencialmente, esgotando o oxigênio e ocasionando a mortandade de peixes e outros organismos aquáticos. Além disso, aumenta a dificuldade do tratamento da água para abastecimento (BAIRD, 1995).

Numa escala global, a contribuição de nitrogênio reativo pelo esgoto humano é calculada em 25 Tg N/ano (GALLOWAY et al., 2003); disso, aproximadamente 9,8 Tg N/ano é coletado por estações centralizadas de tratamento de esgoto e lançadas nos ecossistemas aquáticos (WHO/UNICEF, 2006); o resto é tratado por sistemas descentralizados ou dispostos *in natura* ao ambiente, podendo contaminar o lençol freático (STUART; LAPWORTH, 2016).

Em vista do problema, surgem os processos convencionais de remoção de nitrogênio: nitrificação e desnitrificação. O problema destes processos é que precisam de muita energia para criar condições aeróbias, na nitrificação; e também, precisa-se do uso de carbono orgânico para ajudar a remover nitrato via bactérias desnitrificantes. Como alternativa a estes problemas surge o uso de bactérias anaeróbias oxidadoras de amônio (Anammox), que precisam de menos energia; porém, apresentam crescimento lento (KUENEN, 2008) e têm a necessidade de um maior controle do processo para criar uma ambiente adequado (MA et al., 2016).

2.2 Alternativas de remoção de nitrogênio em zonas rurais

Os recursos financeiros limitados e falta de pessoal capacitado nas zonas rurais, semiurbanas ou afastadas, leva à engenharia a formular novas alternativas sustentáveis de sistemas de tratamento de esgoto. Assim, nascem os sistemas de tratamento de esgoto descentralizados, como uma opção para resolver os problemas de saneamento de pequenas comunidades. Porém, precisa-se estudar as possibilidades para melhorar a qualidade dos efluentes destes sistemas e, assim, aumentar seu uso (STARKL et al., 2012).

Como mencionado, dos 25 Tg N/ano provenientes do esgoto; 15,2 Tg N/ano são de origem rural ou periurbano; portanto, são lançados ao ambiente através de sistemas locais de tratamento de esgoto por via úmida (tanque séptico) ou via seca (fossa seca). Segundo Crites e Tchobanoglous (1998) os sistemas descentralizados de gestão do esgoto são definidos como a coleta, o tratamento e o reúso do esgoto perto do ponto de geração do esgoto. Assim, as estações descentralizadas podem ser usadas em casas individuais, pequenas comunidades, áreas urbanas periféricas e em zonas industriais ou agrícolas. Segundo a ABNT (1997), os sistemas locais de tratamento de esgoto são sistemas de saneamento onde as distâncias entre as fontes geradoras de esgotos, seu tratamento e disposição final são próximas entre si, não necessitando normalmente de rede coletora extensa, coletor-tronco, poços de visita, emissários, elevatórias etc.

Dentro dos principais limitantes dos sistemas descentralizados está a remoção de nutrientes; portanto, os sistemas locais de tratamento de esgoto são uma fonte significativa de poluição por nitrogênio tanto em águas superficiais quanto nas águas subterrâneas (OAKLEY; GOLD; OCZKOWSKI, 2010).

Desse modo, nos sistemas descentralizados foram adotadas distintas estratégias para remoção de nitrogênio (Fig. 1) baseadas no processo convencional de nitrificação/desnitrificação. A escolha do sistema depende da eficiência do sistema, da realidade econômica e da aceitação da população (MASSOUD; TARHINI; NASR, 2009).

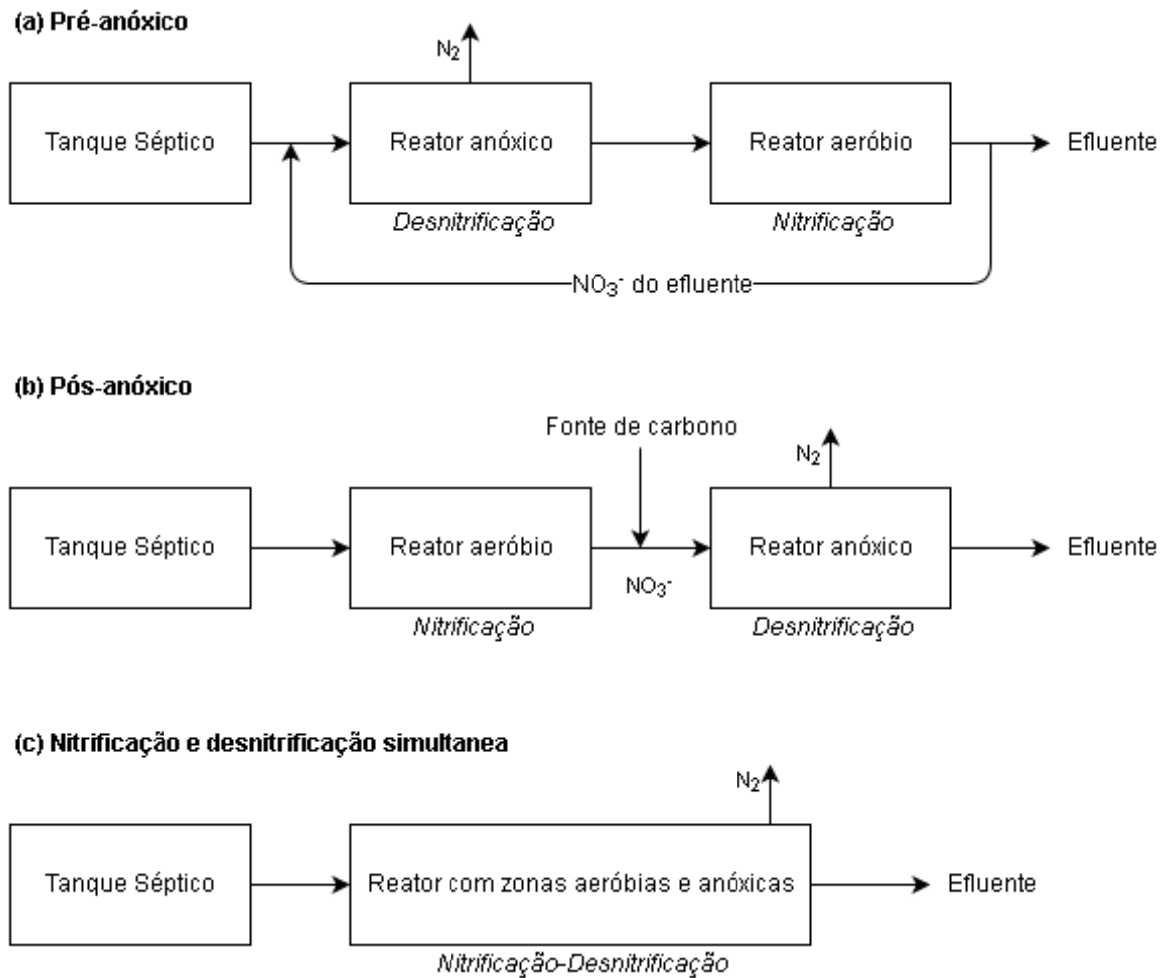


Figura 1 – Esquema das principais estratégias para remoção biológica de nitrogênio em sistemas de tratamento de esgoto descentralizados [Adaptado de Oakley et al. (2010)].

2.3 Sistemas alagados construídos (*Constructed wetlands*)

Os sistemas alagados construídos são adaptações engenhosas de sistemas de terras húmidas naturais, como os pântanos e pantanais. Estes sistemas naturais possuem características únicas que os diferenciam do resto de grupos de ecossistemas. Por exemplo, o fato de ficar sempre alagado permite um desenvolvimento rápido da maioria de processos biológicos; do mesmo modo, as macrófitas adaptadas a este meio, tomam vantagem do grande abastecimento de água, superando o deficit de oxigênio que existe nesses ambientes. Isto faz com que as terras húmidas sejam um dos ecossistemas com maior produtividade biológica do planeta (KADLEC; WALLACE; KNIGHT, 1995).

Devido à elevada atividade biológica, os sistemas alagados contruídos podem transformar muitos dos contaminantes convencionais que proveem das águas residuárias convencionais em subprodutos menos nocivos (VYMAZAL, 2009). Estas transformações são feitas em função da área superficial do sistema, permitindo o uso de energia natural; como luz solar, vento, solo, plantas e animais. Todas estas características fazem com que as *wetlands* sejam um dos sistemas mais rentáveis em função do custo relativamente baixo do manejo de solo, tubulações, poucas estruturas, e; principalmente, o mínimo uso de combustível fóssil e produtos químicos (BRIX et al., 2000).

Basicamente, há dois tipos de sistemas alagados contruídos: os de fluxo superficial e os de fluxo subsuperficial (Fig. 2). Os sistemas de fluxo superficial são zonas alagadas de esgoto sobre um solo impermeável onde crescem principalmente plantas flutuantes. Os sistemas subsuperficiais normalmente utilizam brita como meio suporte para o crescimento das plantas. O fluxo pode passar vertical ou horizontalmente permitindo a formação de biofilme na superfície do meio e nas raízes da planta (KADLEC; WALLACE, 2010).

Os sistemas alagados são considerados sistemas com zonas aeróbias e anaeróbias onde os processos de nitrificação e desnitrificação acontecem simultaneamente (VYMAZAL, 2007) (Fig 3), não obstante, o oxigênio dissolvido torna-se o elemento limitante do processo devido à competição entre os micro-organismos heterótrofos e nitrificantes (autótrofos). Em vista disso, muitos outros mecanismos para a remoção de nitrogênio podem ser desenvolvidos nas *wetlands*, incluindo a oxidação anaeróbia de amônio (SAEED; SUN, 2012).

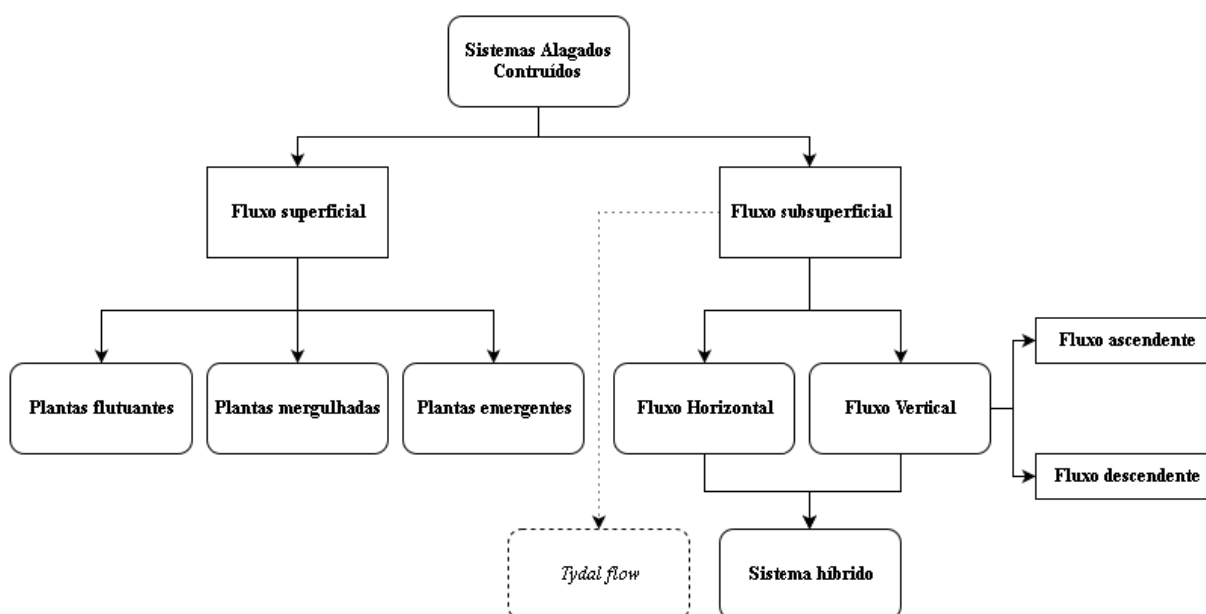


Figura 2 – Classificação dos Sistemas alagados Construídos para o tratamento de efluentes (Modificado de Vymazal, 2007)

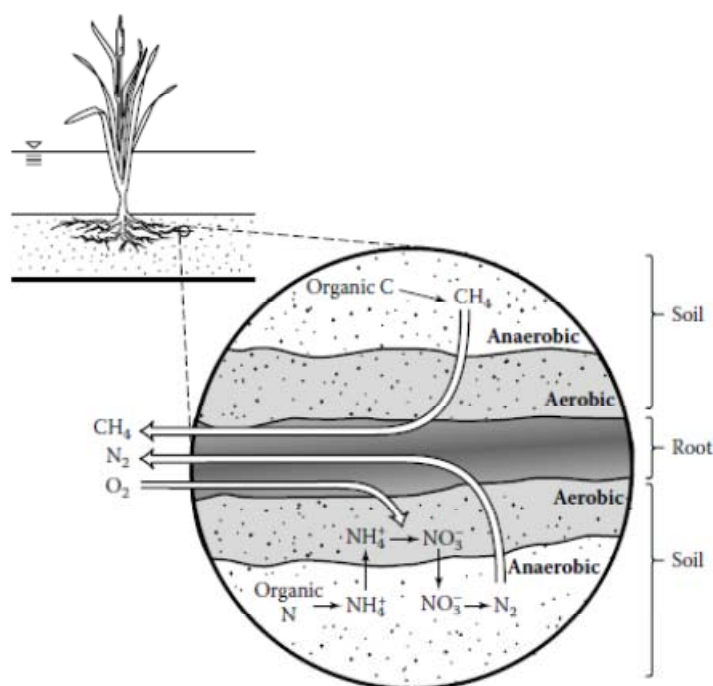
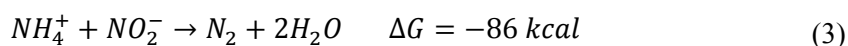
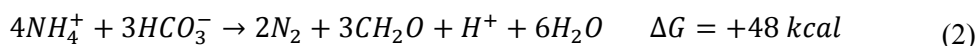


Figura 3 - Rotas de transformação de nitrogênio na proximidade da raiz (KADLEC; WALLACE, 2010)

2.4 Oxidação anaeróbica de amônio

Historicamente, a oxidação anaeróbica de amônio foi predita nos anos setenta pelo físico-químico Broda (1977). Ele conta sobre a existência de dois grupos de micro-organismos autótrofos perdidos na área da termodinâmica e na evolução. Cada grupo de organismos seria capaz de utilizar o amônio como doador de elétrons para o metabolismo deles, o primeiro grupo seriam fotoautótrofos (Eq. 2) e o segundo quimiolitótrofos (Eq. 3); estes últimos, empregariam nitrito ou nitrato como oxidante para produzir gás nitrogênio (N_2) como produto final; os primeiros ainda não foram descobertos. No entanto, essa predição que considerava a existência de um micro-organismo que oxidaria a amônia em ausência de oxigênio era tomada com muito ceticismo.



Foi assim que após dez anos, o processo biológico foi descoberto como oxidação anóxica de amônio (MULDER, 1989) e as bactérias identificadas como: bactérias anaeróbicas oxidadoras de amônio (MULDER et al., 1995), nome pelo qual esse processo é mais conhecido. Anammox é um acrônimo de *ANAerobic AMMonium OXidation* (Oxidação anaeróbica de amônio) e é um processo totalmente autótrofo na remoção de nitrogênio.

Este processo de conversão apresenta-se como um atalho no ciclo do nitrogênio (Fig. 4). Nele há conversão de amônio diretamente para gás nitrogênio (N_2) em condições anaeróbicas tendo o nitrito como receptor de elétrons. Estas bactérias utilizam o CO_2 como fonte principal de carbono do mesmo modo que as bactérias nitrificantes. Para mais detalhes sobre a descoberta deste processo, o leitor está convidado a ler a revisão de Kuenen (2008).

Comparado com o processo convencional de nitrificação/desnitrificação, as vantagens de utilizar Anammox na remoção de nitrogênio são evidentes: Primeiro, não existe a necessidade de uma fonte externa de carbono, em contraste com os micro-organismos desnitrificantes que precisam de material carbonáceo para reduzir o nitrato; segundo, apenas o 50% de amônio precisa ser oxidado (menor demanda de oxigênio, por tanto, menor consumo de energia); e finalmente, tem pouca produção de biomassa (menos lodo produzido). Quando combinado com o processo de nitrificação parcial (nitritação), a reação global pode se ver como a oxidação direta de amônio para nitrogênio molecular. As equações simplificadas deste processo são (Eq. 4, 5, 6):

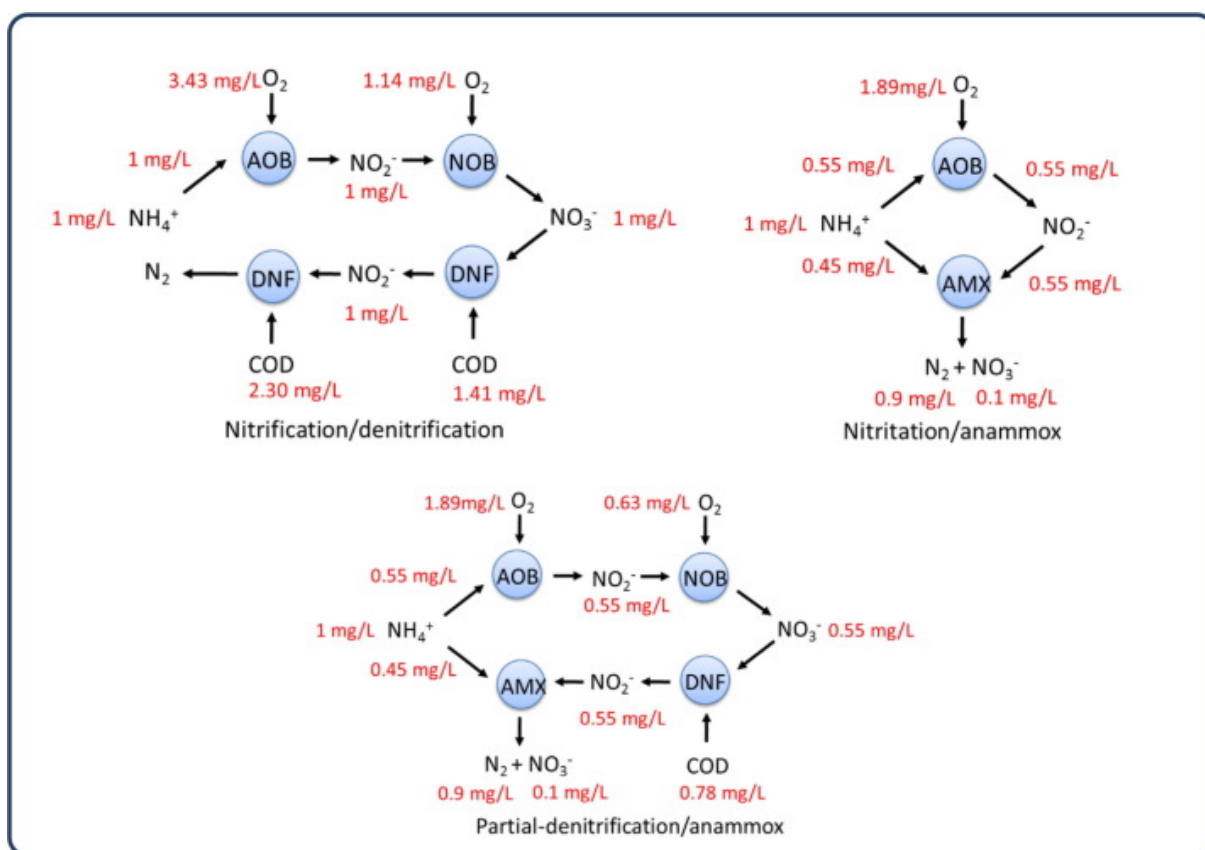
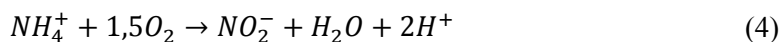


Figura 4 - Comparação dos processos de remoção de nitrogênio. Onde AOB: bactérias oxidadoras de amônio; NOB: bactérias oxidadoras de nitrito; AMX: bactérias anaeróbicas oxidadoras de amônio e; DNF: Organismos desnitrificantes (MA et al., 2016).

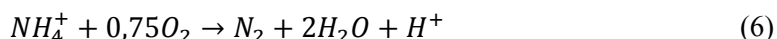
Nitrificação parcial (nitritação):



Oxidação anaeróbia de amônio:



Reação global:



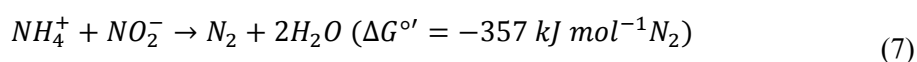
A redução no consumo de energia e doadores de elétrons provocados pelo processo Anammox contribui para o incremento da sustentabilidade das operações de tratamento de esgoto. Na Tabela 1 vemos uma comparação indicativa do processo convencional e o processo Anammox. Além das vantagens operacionais, o processo Anammox tem uma menor produção de gases de efeito estufa, como se pode ver na quantidade de CO₂ emitido.

Tabela 1 – Comparação entre a remoção convencional e nitrogênio e o processo de nitrificação parcial/Anammox.

Item	Unidade	Tratamento convencional	Nitritação/Anammox
Energia	kWh/kg N	2,8	1,0
Metanol	kg/kg N	3,0	0
Produção de lodo	kg SSV/kg N	0,5-1,0	0,1
Emissão de CO ₂	kg/kg N	>4,7	0,7

Fonte: van Loosdrecht (2008).

As bactérias anaeróbias oxidadoras de amônio (An-BOA) ou bactérias Anammox formam um grupo separado e diferente do mundo microbiano, elas formam parte do grupo das *Planctomycetes* (STROUS et al., 1999). Anammox tem um intermediário exclusivo no seu catabolismo, a hidrazina (VAN DE GRAAF et al., 1997). Também está presente a hidroxilamina, mas seu papel exato no processo ainda está em debate (KARTAL et al., 2013); e é provável que o óxido nítrico (NO) seja também intermediário junto com ou substituindo à hidroxilamina (STROUS et al., 2006; VAN DE GRAAF et al., 1997) (Fig. 5). A reação geral do catabolismo está representada pela Equação 7.



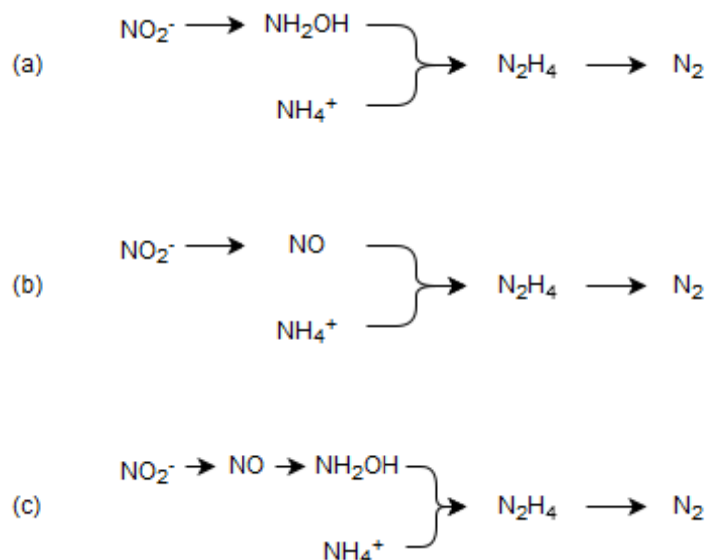
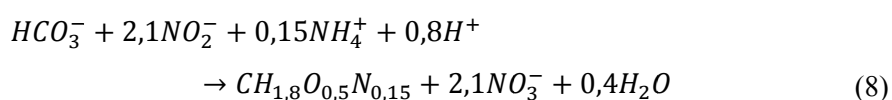
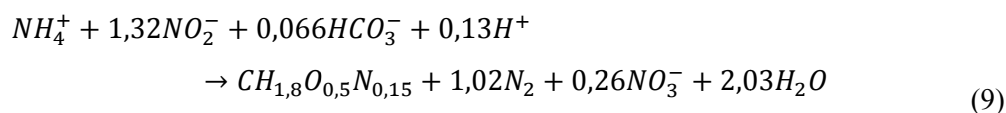


Figura 5. Rotas catabólicas do processo Anammox com hidrazina funcionando como intermediário principal. Outros possíveis intermediários são a hidroxilamina (a), óxido nítrico (b), ou ambos (c). (Adaptado de VAN DER STAR, (2008))

Anammox utiliza CO_2 (alcalinidade) como fonte de carbono e precisa realizar 15 vezes a reação catabólica para gerar energia suficiente para fixar um átomo de carbono e oxidar o nitrito a nitrato para compensar a redução do CO_2 . Nestes processos autótrofos, a medição do nitrato produzido pode ser um bom indicador de crescimento celular (VAN LOOSDRECHT, 2008). A equação resumida (Eq. 8) da rota anabólica é:



Operando em estado estacionário em escala de laboratório, tendo amônio, nitrito e o carbonato como única fonte de carbono, as reações catabólica e anabólica podem-se combinar para formar a seguinte reação global (Eq. 9) (STROUS et al., 1998):



O principal problema com este organismo é sua baixa taxa de crescimento ($0,04$ - $0,06 \text{ d}^{-1}$ a 35°C)(VAN DE GRAAF et al., 1996). Além disto, a presença de algumas substâncias presentes no esgoto (amônio, sulfeto, nitrito) podem causar inibição do

crescimento. A inibição por amônio acontece quando a concentração no afluente está perto das centenas de mg L^{-1} de N-NH_4^+ , um valor difícil de atingir em esgoto doméstico; enquanto que a inibição por nitrito acontece apenas a concentrações $>70 \text{ mg L}^{-1}$ de N-NO_2^- (DAPENA-MORA et al., 2007; STROUS; KUENEN; JETTEN, 1999). A faixa de pH ótimo para o crescimento de Anammox é 6,7-8,3 (STROUS; KUENEN; JETTEN, 1999), e a temperatura de 30-37°C.

Como visto em vários estudos, o processo Anammox pode contribuir na remoção de nitrogênio em zonas anaeróbias e com baixo conteúdo de oxigênio nos sistemas alagados construídos.

Na Tabela 2, são mostrados alguns dos estudos realizados em *wetlands* com Anammox. Os primeiros estudos não focaram a avaliação da atividade Anammox, justamente porque não era esperado dentro do sistema, desse modo, a atividade Anammox foi descoberta a partir do balanço global na remoção de nitrogênio (DONG; SUN, 2007; SUN; AUSTIN, 2007). À luz dos resultados, novos experimentos foram guiados para avaliar a atividade Anammox nos sistemas alagados (PAREDES; KUSCHK; KÖSER, 2007; TAO; WANG, 2009; TAO et al., 2012), os resultados mostram que Anammox cumpre uma função importante na remoção de nitrogênio; no entanto, essa atividade é maior em sistemas de esgoto sintético fornecidos com os nutrientes necessários (NH_4^+ e NO_2^-) para o crescimento ótimo da bactéria. Cabe destacar também, que a determinação da atividade Anammox em sistemas alagados construídos não está padronizada, o cálculo pode estar referido em relação ao meio de suporte (biomassa aderida) ou ao volume total do reator (biomassa aderida + suspensa). Em todos os casos, Anammox representa apenas uma fração da remoção total de nitrogênio, esta última tem valores de até $5,7 \text{ g N m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ para esgoto doméstico.

Como visto na presente revisão, existem diversos mecanismos de remoção de nitrogênio que acontecem dentro dos sistemas alagados construídos que, por sua vez, dependem dos fatores ambientais e de crescimento. A estratégia da presente pesquisa foi utilizar um efluente nitrificado, rico em nitrito e nitrato, junto com efluente anaeróbio (rico em amônio) visando uma maior remoção de nitrogênio por via Anammox complementada com a desnitrificação convencional.

Tabela 2 – Caracterização dos diferentes usos de oxidação anaeróbia de amônio em sistemas alagados construídos

Sistema ^a	Tipo de afluente	Regime	Área (m ²)	Carga hidráulica (m ³ m ⁻² d ⁻¹)	TDH (d)	Afluente			Taxa de remoção de nitrogênio (g m ⁻² d ⁻¹)	Atividade Anammox	Fonte
						NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹)	NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)			
FV+FV	Chorume	Contínuo	0,007	0,19	1,3	490	0,2	1,6	50 ^b	-	Sun e Austin (2007)
FV+FH	Esgoto doméstico	Intermitente	28,07	0,595	5	41,5	0,09	0,15	0,8	-	Dong e Sun (2007)
FH	Esgoto sintético	Contínuo	0,229	0,2	5	150	75	0	5,7	19,1 mgN Kg ⁻¹ d ⁻¹	Paredes et al. (2007)
FS+FH	Esgoto sintético	Batelada	0,2352	0,018	7	60	0	0	2,1	2,4 gN m ⁻³ d ⁻¹	Tao e Wang (2009)
FH	Esgoto doméstico	Contínuo	0,6	0,183	3	23,9	0,2	0,05	5,42	-	Wang e Li (2011)
FS	Esgoto sintético	Batelada	0,213675	0,02	7	263,8	103,7	0,37	2,52	0,256 mgN g ⁻¹ d ⁻¹	Tao e Wang (2012)
FH	Esgoto doméstico	Contínuo	0,6	0,138	4	23,5	-	-	3,5	3,4 gN m ⁻³ d ⁻¹	Wang e Li (2014a)

^a Representa o tipo de sistema alagado construído: FV = Fluxo vertical subsuperficial; FH = Fluxo horizontal subsuperficial; FS = Fluxo superficial.

^b Taxa expressada em remoção de Nitrogênio amoniacal NH₃-N.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Configuração do sistema

O sistema de alagados construídos foi montado no Laboratório de Protótipos (LABPRO) da Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo (FEC) da UNICAMP. Foram construídas duas unidades de sistemas alagados construídos de fluxo horizontal utilizando duas caixas de polietileno de dimensões $0,81 \times 0,51 \times 0,48$ m de comprimento \times largura \times profundidade, respectivamente; foram recheadas com brita nº0 ($\varnothing = 4 - 10$ mm) até uma altura de 0,4 m; e na entrada e saída do sistema com brita nº2 para evitar entupimentos (Fig. 6) na entrada e na tubulação de saída. Uma das unidades foi plantada com *Cyperus papyrus*, vegetação escolhida por apresentar um crescimento rápido e uma taxa de acumulação de nitrogênio de até $0,54 \text{ gN m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ (TAO et al., 2012); o outro sistema não teve a adição de plantas e serviu como tratamento controle (Fig. 7 e 8). O regime de alimentação foi por bateladas com Tempo de Detenção Hidráulico (TDH), que foi ajustado para 3 dias.

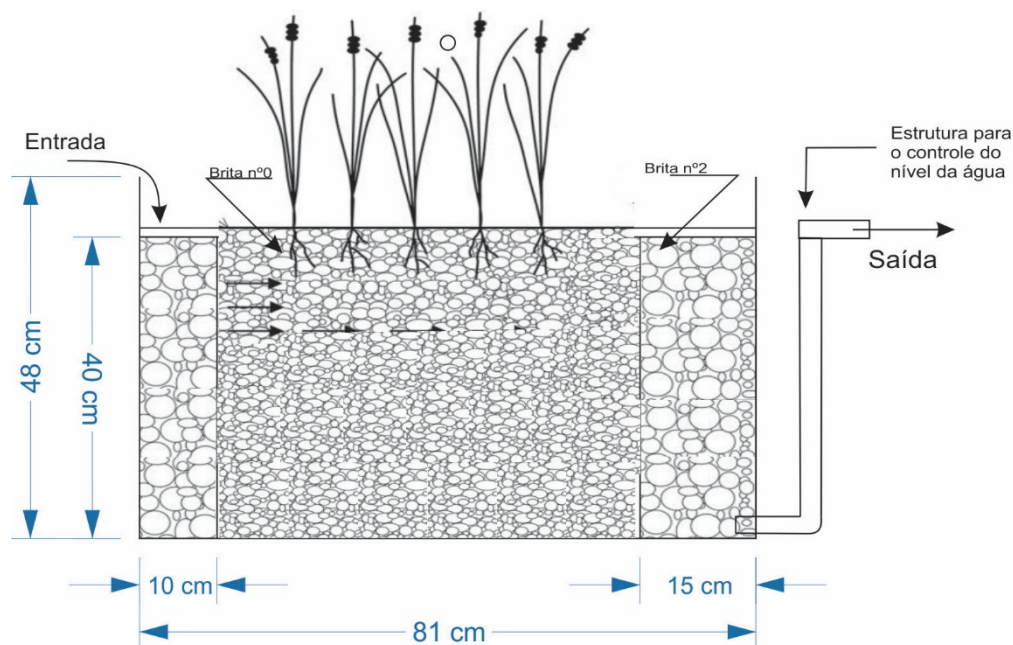


Figura 6 – Esquema de uma unidade experimental de sistema alagado construído de fluxo subsuperficial.

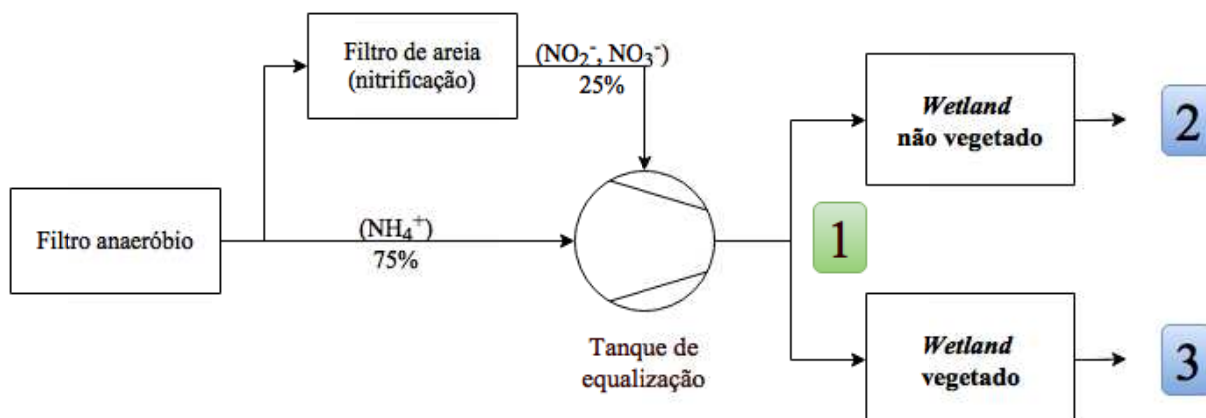


Figura 7 – Layout dos sistemas alagados construídos de fluxo horizontal subsuperficial, vegetado e não vegetado.

Os sistemas foram alimentados com esgoto tratado proveniente de uma estação de tratamento de esgoto piloto instalada no Laboratório de Protótipos (Fig. 9) que atende a área da Faculdade de Medicina, Hospital de Clínicas (HC), uma escola e uma creche dentro da universidade. O sistema vem operando durante 10 anos e está constituído por filtros anaeróbios seguidos de filtros de areia. O descritivo da construção dos filtros anaeróbios pode ser encontrado em Cruz et al.(2013) e para os filtros de areia em Tonetti et al.(2012) (Fig. S4 e S5, no Apêndice). Os filtros anaeróbios oferecem um efluente rico em amônio e o filtro de areia oferece um efluente totalmente nitrificado, ou seja, rico em nitrato.



Figura 8 – Detalhe dos sistemas alagados construídos: à esquerda o vegetado e à direita o não vegetado.

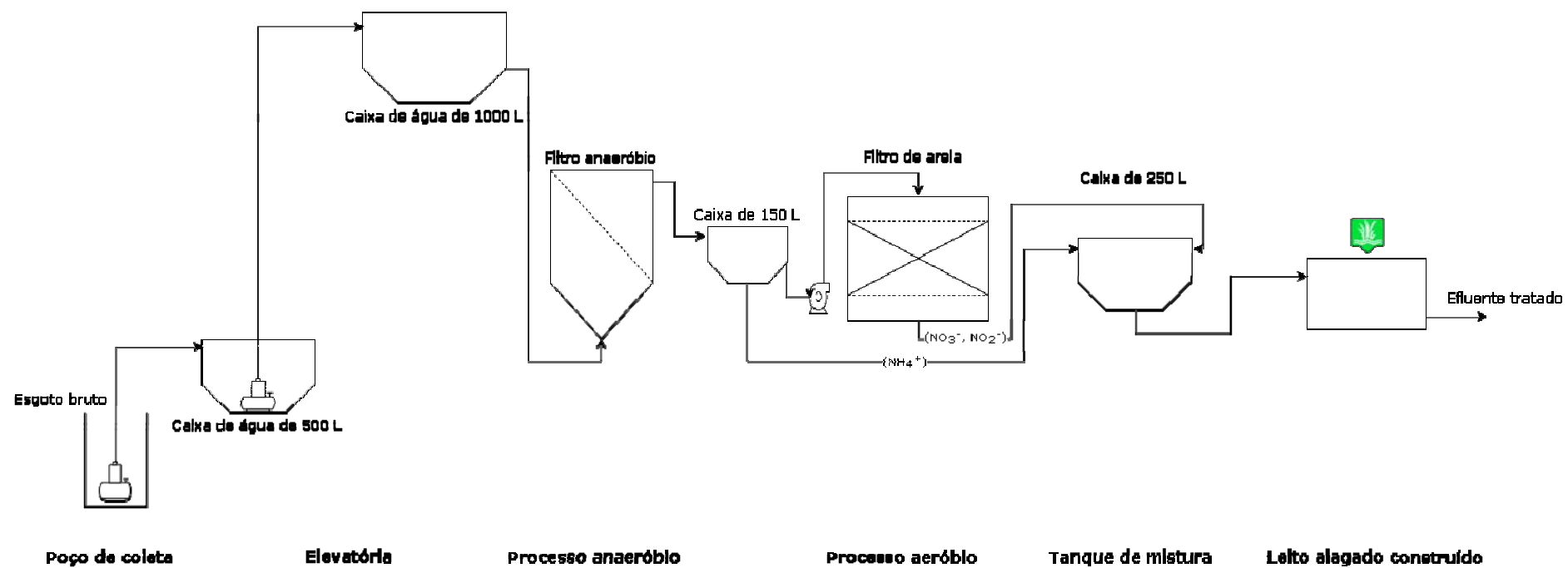


Figura 9 – Fluxograma da Estação de Tratamento de Esgoto piloto do laboratório de protótipos da FEC.

3.2 Delineamento experimental

A remoção de nitrogênio foi avaliada durante três Etapas (Tabela 3) para cada sistema (vegetado e não vegetado) em paralelo. A primeira etapa foi de aclimação e formação de biofilme. Os sistemas foram utilizados como se fossem pós-tratamento de filtro anaeróbio convencional, o efluente anaeróbio era armazenado em uma caixa de água de 250 L utilizada como tanque de equalização (vide Fig. 7); foi utilizado um balde de 10 litros para dosar 55 L na entrada de cada unidade, isto foi repetido a cada três dias. Na Etapa II, para alimentar o sistema, foram misturados no tanque de equalização o efluente do filtro anaeróbio e o efluente do filtro de areia em proporção 3:1 (anaeróbio:nitrificado), buscando promover a desnitrificação. A mistura era preparada com 90 L de efluente anaeróbio e 30 L de efluente nitrificado; logo, eram transferidos 55 L para cada unidade experimental de forma similar à etapa anterior. Finalmente, no início da terceira etapa, foi adicionado lodo rico em biomassa Anammox, para isto, foram coletados 2 L de lodo de um reator anaeróbio híbrido (UASB + FA) montado no laboratório de Saneamento da FEC (veja a seção 3.3.3), os 2 L foram misturados junto com 158 L da mistura relatada anteriormente; a nova mistura foi distribuída em forma homogênea por toda a área de cada unidade. Seguidamente, continuou-se a alimentação da mesma forma que a segunda etapa.

Tabela 3. Delineamento experimental para o sistema de sistemas alagados construídos.

Etapas do experimento	Tipo de Afluente	Duração (dias)	Número de amostras	Data de início
Etapa I	Anaeróbio	99	19	10/01/2016
Etapa II	Anaeróbio (75%) + nitrificado (25%)	34	10	21/04/2016
Etapa III	Anaeróbio (75%) + nitrificado (25%) + inóculo Anammox	24	7	30/05/2016

3.3 Procedimentos específicos

3.3.1 Medida da vazão e Evaporação/Evapotranspiração

No início do experimento a vazão era controlada por bombas peristálticas com fluxo intermitente, com um regime de 1h de trabalho por 2h de repouso, a vazão era ajustada

para atingir um TDH teórico de 3 dias. A vazão de saída era calculada medindo o volume total coletado por um dia de cada unidade.

Por problemas operacionais que gerava o uso de bombas, tais como crescimento de algas nas tubulações, entupimentos e problemas elétricos, a partir do 88º dia do experimento foi adotado um regime de alimentação por batelada, o efluente armazenado em uma caixa de água de 250 L era distribuído para cada unidade experimental em uma única batelada a cada três dias com auxílio de baldes; do mesmo modo, era coletado e quantificado o volume total na saída de cada unidade. A vazão se calculou a partir do volume coletado dividido pelo TDH.

A evaporação – EV (unidade não vegetada) e a evapotranspiração – ET (unidade vegetada) foi calculada do balanço hídrico de cada unidade, sendo um sistema experimental compacto, a perda de água por infiltrações foi descartado, logo, a EV/ET foi a diferença entre o volume de água da entrada e saída do sistema.

3.3.2 Coleta e análise de amostras

As amostras foram coletadas na entrada e saída dos sistemas alagados construídos (pontos 1, 2 e 3 da Figura 7) a cada 3 dias durante todas as etapas. Para cada uma delas foram avaliados os seguintes parâmetros: pH, alcalinidade, demanda química de oxigênio (DQO), amônia, nitrito e nitrato segundo os *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012), no Laboratório de Saneamento da Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo da UNICAMP (LABSAN). O Nitrogênio Total Inorgânico – NTI foi calculado da soma da concentração de amônio + nitrito + nitrato.

3.3.3 Inoculação de Anammox

Para poder inocular os sistemas alagados construídos com biomassa Anammox, foi necessário aclimatar as bactérias com antecedência. Com este motivo, foi montado no LABSAN um reator anaeróbio híbrido (UASB + Filtro anaeróbio) de 3 L de volume útil. O reator foi inoculado com lodo granular Anammox fornecido pelo Dr. Airton Kunz, da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC.

Para manter condições anaeróbias e aclimatar as bactérias ao novo substrato, o reator foi alimentado com efluente do filtro anaeróbio proveniente do LABPRO e para garantir nutrientes suficientes para o crescimento das bactérias, foi dosada uma solução de

NaNO₂ [100 mM] até se obter uma concentração final de 70 mg L⁻¹ de N-NO₂⁻. Este procedimento foi realizado a cada 15 dias aproximadamente.

Os sistemas alagados construídos foram inoculados com lodo deste reator como descrito anteriormente, a atividade potencial Anammox do lodo usado para inocular os sistemas alagados construídos era de 21 mg N L⁻¹ d⁻¹.

3.3.4 Taxa de desnitrificação e oxidação anaeróbia de amônio (Anammox) potencial

As taxas dos processos de desnitrificação e Anammox foram medidas adaptando o procedimento descrito por Tao et al. (2012). Foram incubados dois frascos de 250 mL em escuridão a 29°C por 15 dias em uma câmara incubadora com agitação orbital de 110 RPM. No primeiro frasco, foram colocados 100 g de substrato com biofilme aderido e suspenso com 200 mL de solução 330 mg L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄ e 345 mg L⁻¹ de NaNO₂. O segundo foi preenchido também com 100 g de substrato e com 200 mL uma solução de 345 mg L⁻¹ de NaNO₂. Ambas foram borbulhadas com gás argônio por 25 min até conseguir uma concentração de OD < 0,2 mg L⁻¹ e selados com uma rolha de borracha. A redução do nitrogênio total dentro da primeira matriz indicará a taxa de reação de Anammox mais taxa de desnitrificação; a redução de nitrogênio na segunda matriz indicará somente a taxa de desnitrificação devido a inexistência de amônio que é fundamental para o processo Anammox. Finalmente, a diferença do primeiro com o segundo representará a taxa de reação Anammox. Este experimento foi realizado em duplicata.

3.4 Análise de Dados

O objetivo da presente pesquisa foi verificar se a remoção de nitrogênio poderia aumentar quando adicionadas as bactérias oxidadoras de amônio, para isto, foram comparadas as distintas etapas em relação a taxa de remoção de nitrogênio total inorgânico.

Devido à distribuição não normal dos dados, foi utilizado um teste não paramétrico de Wilcoxon de amostras pareadas (dependentes) para comparar as medianas entre as unidades vegetada e não vegetada com um nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$) para cada Etapa do experimento. Por outro lado, para avaliar as diferenças entre as etapas I, II e III foi realizado o teste de Mann-Whitney para amostras independentes ($\alpha = 0,05$). As análises estatísticas e os gráficos foram desenvolvidos com o programa Origin 9.1.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Afluente

Para alimentar o sistema foi utilizado uma mistura de efluente anaeróbio e efluente nitrificado. Os parâmetros de qualidade de cada um dos componentes e da mistura em cada etapa do experimento são mostrados na Tabela 4. Durante a primeira etapa do experimento o afluente foi preparado unicamente com efluente do filtro anaeróbio, este último apresentou características de um reator anaeróbio maduro, com concentrações de DQO na faixa de 113 -176 mg L⁻¹, um pH estável e próximo de 7,6 e nitrogênio amoniacal perto de 70 mg L⁻¹. Estes valores são similares aos encontrados em outros reatores anaeróbios no Brasil (CHERNICHARO et al., 2015).

O filtro de areia possui características de um reator aeróbio com elevada nitrificação, isto é evidenciado pela presença de N-NO₃⁻ (\bar{x} = 60 mg L⁻¹) no efluente, também pelo pH baixo (entre 3,5 - 4,5) e a quase ausência de alcalinidade (~0 mg CaCO₃ L⁻¹); estas condições correspondem às registradas por Tonon et al. (2015), onde se encontram valores de 53,2 mg L⁻¹ de N-NO₃⁻ para uma taxa superficial de 200 L m⁻² d⁻¹ (usada no presente estudo).

Finalmente, a mistura gerada destes efluentes possui uma nova matriz de nitrogênio (nas Etapas II e III), com uma relação de amônio e nitrato de 3:1 aproximadamente. Cabe destacar que a concentração de Nitrogênio Total Inorgânico (NTI) permanece na mesma faixa, isto porque os reatores estão em série e acontece apenas a transformação do nitrogênio de forma amoniacal para forma de nitrito e nitrato não existindo, de fato, remoção do nitrogênio total (TONON et al., 2015).

Tabela 4 – Média e desvio padrão dos parâmetros físico-químicos dos efluentes utilizados para alimentar os SAC vegetado e não vegetado.

	Filtro anaeróbio			Filtro de areia			Mistura (75% Filtro anaeróbio + 25% Filtro de areia)		
	Etapa I	Etapa II	Etapa III	Etapa I	Etapa II	Etapa III	Etapa I	Etapa II	Etapa III
n	19	10	7	11	10	7	19	10	7
DQO (mg L ⁻¹)	113 ± 37	132 ± 23	176 ± 76	47 ± 23	54 ± 33	42 ± 5	113 ± 37	111 ± 28	132 ± 54
N-NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹)	76,7 ± 3,6	70,7 ± 7,2	67,7 ± 17,9	14,9 ± 12,9	12,7 ± 4,5	4 ± 3,8	76,7 ± 3,6	54,4 ± 3,1	49,4 ± 12
N-NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	0,090 ± 0,256	0,005 ± 0,005	0,011 ± 0,018	2,183 ± 4,028	1,264 ± 133	0,987 ± 1,477	0,094 ± 0,256	1,021 ± 0,087	1,055 ± 1,585
N-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	0,3 ± 0,4	0 ± 0,1	0,1 ± 0,1	35,6 ± 32,3	82,6 ± 13	64,1 ± 15,6	0,3 ± 0,4	18,4 ± 3,6	13,1 ± 6,4
NTI (mg L ⁻¹)	77,1 ± 3,6	70,7 ± 7,2	67,8 ± 17,9	49,9 ± 45,4	96,5 ± 15,7	69 ± 15,4	77,1 ± 3,6	73,8 ± 2,6	63,6 ± 13,3
pH	7,61 ± 0,21	7,6 ± 0,16	7,58 ± 0,22	4,85 ± 0,9	4,41 ± 0,76	3,85 ± 0,12	7,61 ± 0,21	7,51 ± 0,17	7,47 ± 0,2
Alc. (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	347 ± 33	355 ± 20	326 ± 43	2 ± 6	1 ± 2	0 ± 0	347 ± 33	246 ± 17	230 ± 26

Os valores representam a Média ± Desvio Padrão.

n = número de amostras

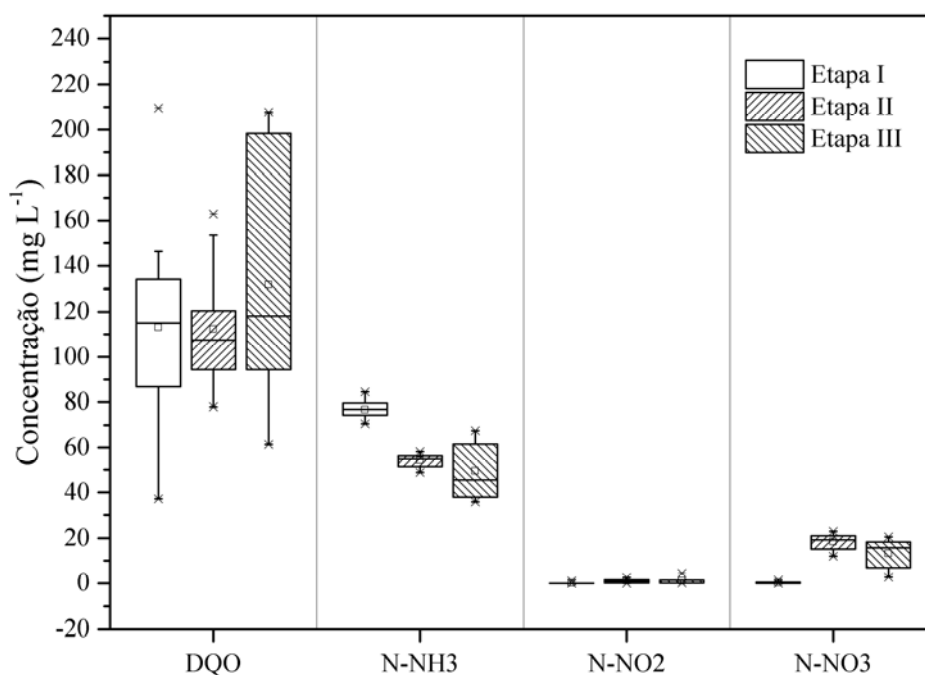


Figura 10 – Box-plot dos principais parâmetros de qualidade da mistura (afluente) durante as três etapas do experimento.

Umas das dificuldades de trabalhar com esgoto real é a grande variabilidade que apresenta em sua qualidade. Isso, dificulta a análise dos dados, por este motivo, muitas vezes é preferido mostrar os dados em forma de gráficos Box-plot ou séries temporais. Na Figura 10, mostra-se a distribuição dos dados do esgoto afluente nos sistemas alagados construídos. Pode-se observar também que a Etapa III apresenta maior variabilidade, devido, provavelmente, à mudança nas condições climáticas, já que no mês de junho se registraram temperaturas baixas em relação ao clima da região, o que provocou perda de eficiência no reator anaeróbico e consequentemente no resto do sistema.

4.2 Concentrações das espécies de nitrogênio nos efluentes e a evapotranspiração

O comportamento das espécies de nitrogênio muda a cada etapa e a cada unidade conforme indicado na Figura 11. Durante a Etapa I, o sistema alagado não vegetado apresentou uma menor concentração de amônio em relação à unidade vegetada, este comportamento se inverte na Etapa II, com a adição de um efluente nitrificado (Fig. 11c). A presença de nitrato no efluente do sistema vegetado confirma a nitrificação, este processo junto com a desnitrificação são a principal rota de remoção de nitrogênio em sistemas

alagados construídos de fluxo subsuperficial (PARANYCHIANAKIS; TSIKNIA; KALOGERAKIS, 2016).

O processo de nitrificação foi potencializado na Etapa II na unidade vegetada; porém, o nível de NTI não apresenta diferenças significativas entre os dois sistemas (Fig. 11). Isto indicaria que os dois sistemas têm a mesma eficiência de remoção (~15%) baseada nas concentrações (Fig 11d); o que significa que a diminuição de amônio na unidade vegetada é pela oxidação do mesmo até nitrato.

Na Etapa III, após a inoculação de biomassa Ananmmox, o desempenho foi diferente. Tanto o amônio quanto o nitrato diminuem, o que produz uma redução na concentração de NTI na saída e se nota uma diferença no desempenho de cada unidade com eficiências de remoção de 44% e 26% para as unidades vegetada e não vegetada, respectivamente.

Avaliar a concentração do efluente final é importante para poder atingir os padrões de lançamento da legislação; porém, isto não mostra o desempenho real dos sistemas alagados construídos; para isto, é necessário considerar as perdas de água por evaporação/transpiração que modificam o volume de água do efluente e, portanto, a concentração dele. Este fenômeno será evidenciado nas seguintes seções.

Uma característica importante nos sistemas alagados construídos é a evapotranspiração. Esta, por sua vez, depende de vários fatores; entre eles, a temperatura, a umidade e a espécie vegetal (KADLEC; WALLACE, 2010). Para avaliar as perdas de água por evapotranspiração foram medidas as vazões de entrada e saída de cada unidade (Fig. 12).

As perdas de água por Evapotranspiração/evaporação, no sistema vegetado, foram maiores que no sistema não vegetado (Fig. 13). Este efeito foi diferente com respeito a cada período estacional. A Etapa I começou em 10 de janeiro, com médias de temperatura de 32°C e perdas por evapotranspiração de até 70% na unidade vegetada; em contraste, no final da Etapa II e começo da Etapa III onde a temperatura média diminuiu até 20°C e as perdas de água foram menores à 15%. De forma similar Da Costa (2012) mostra perdas de água de até 20% para sistemas alagados de fluxo subsuperficial. A diferença com respeito a outros estudos é atribuída a que no presente experimento as contribuições de água de chuva foram desconsideradas devido a que o sistema estava coberto.

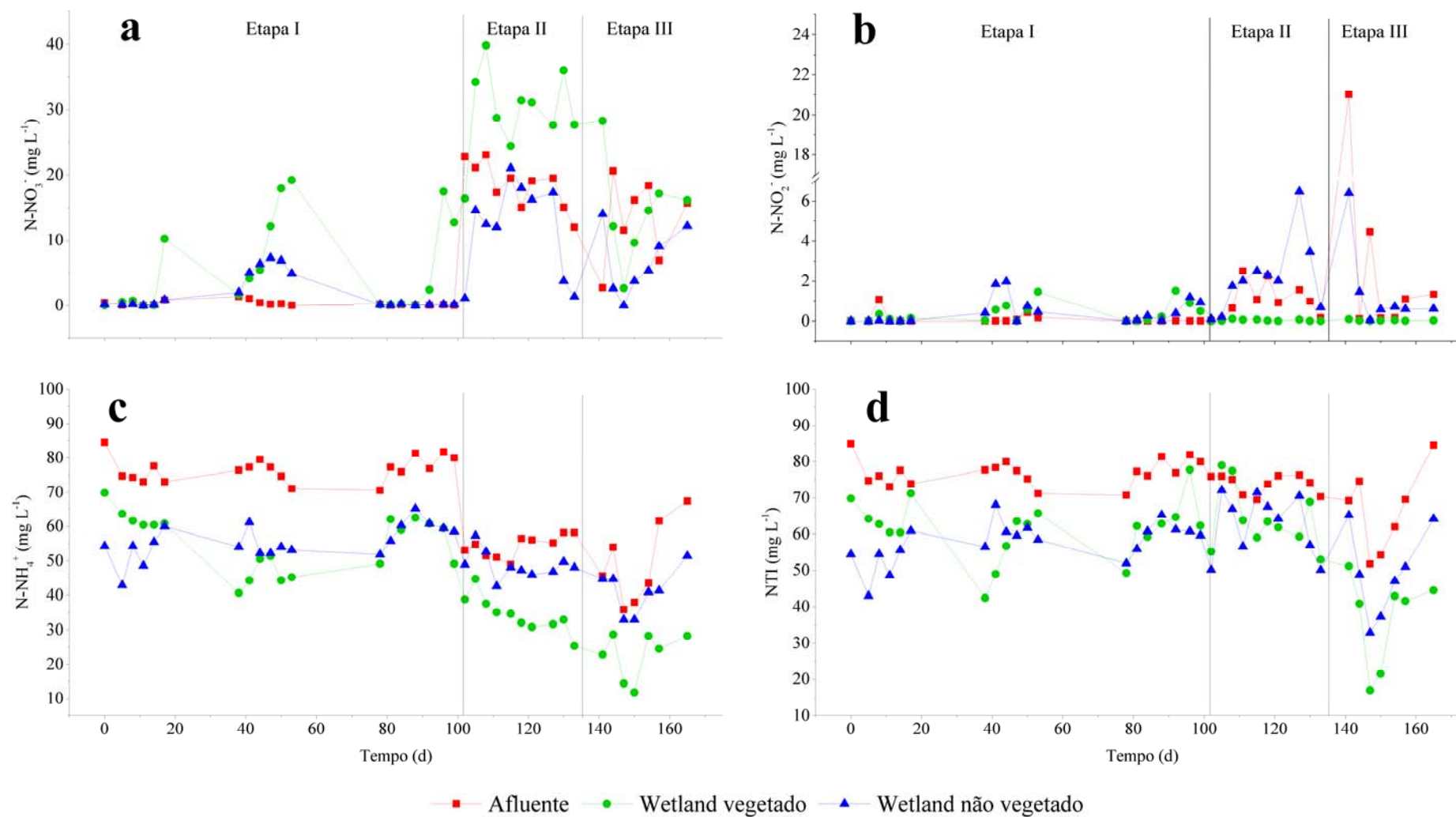


Figura 11 – Concentrações da entrada e saída dos sistemas alagados construídos nas três etapas do experimento. (a) Nitrato, (b) Nitrito, (c) Amônio e (d) Nitrogênio Total Inorgânico.

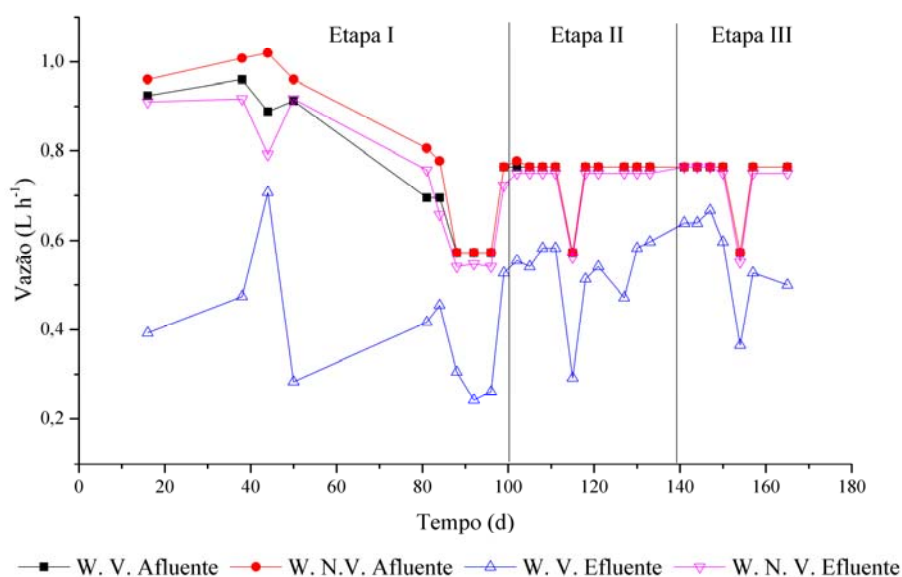


Figura 12 – Balanço hídrico dos sistemas alagados construídos nas três etapas do experimento.

Estas variações no volume final do efluente podem ocasionar a concentração do mesmo até quase o dobro do valor esperado, porém o verdadeiro desempenho do sistema deve ser avaliado com a carga. Este fenômeno prejudica o lançamento do efluente tratado, visto que, a maioria de legislações estabelecem os padrões de lançamento em função da concentração (p.ex. Resolução CONAMA N°430/2011). No entanto, o fato de evapotranspirar não tira o desempenho real do sistema, pelo contrário, ajuda na oxigenação do meio na zona de raízes (DORNELAS; MACHADO; VON SPERLING, 2009; PARANYCHIANAKIS; TSIKNIA; KALOGERAKIS, 2016) e cria um ambiente com maior biodiversidade microbiana (PARANYCHIANAKIS; TSIKNIA; KALOGERAKIS, 2016) devido as microzonas aeróbias e anaeróbias formadas na rizosfera.

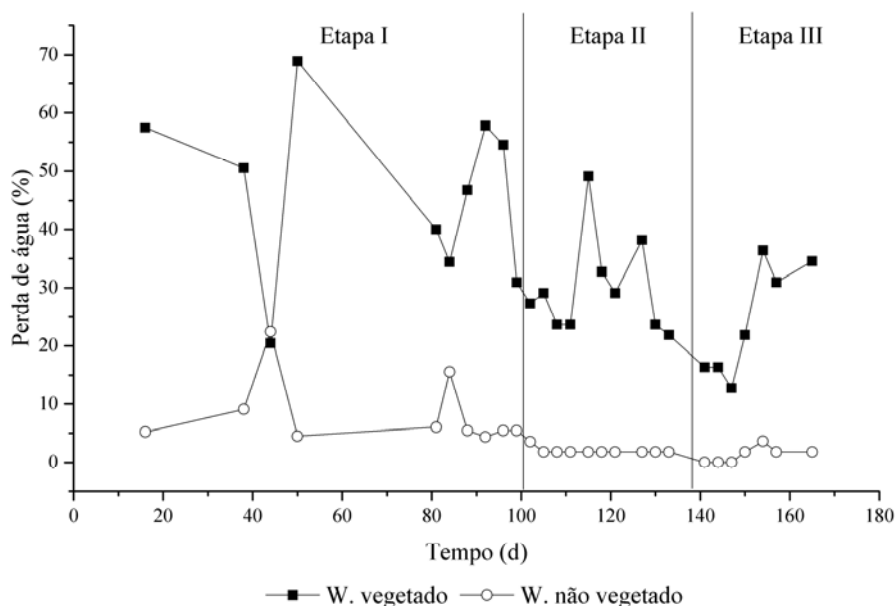


Figura 13 – Perdas de água por EV/ET nos sistemas alagados durante as três etapas de tratamento.

4.3 Balanço de massa do nitrogênio

Como visto acima, as plantas têm uma enorme influência na hidrologia dos sistemas alagados construídos devido ao efeito da evapotranspiração; portanto, um balanço baseado apenas nas concentrações daria uma falsa imagem do verdadeiro comportamento do sistema. Assim, foi elaborado um balanço de massa utilizando as cargas de cada espécie de nitrogênio, para atenuar o efeito da evapotranspiração.

Na Figura 14 estão mostradas as diferenças entre as cargas de alimentação e saída das unidades experimentais. Enquanto a unidade não vegetada mostra um comportamento similar a seu análogo no gráfico da concentração (vide Fig. 11) a unidade vegetada apresenta um comportamento diferente. Na Etapa I, o sistema vegetado apresentou cargas menores de nitrogênio amoniacal ($0,62 \text{ g d}^{-1}$) em relação à unidade não vegetada ($1,05 \text{ g d}^{-1}$), este fato evidencia a influência da evapotranspiração sobre a remoção real do nitrogênio, quando comparado com as concentrações.

Um fato importante é que não há níveis significativos de nitrito na saída da unidade vegetada em nenhuma etapa do experimento de forma contrária à unidade não vegetada. Isto significa que o nitrito, que é intermediário de todos os mecanismos de remoção de nitrogênio, está sendo constantemente consumido e sugere uma alta diversidade microbiana. Em outros estudos um maior consumo de nitrito significa uma maior atividade Anammox (PAREDES; KUSCHK; KÖSER, 2007; TAO et al., 2012; WANG; LI, 2014b).

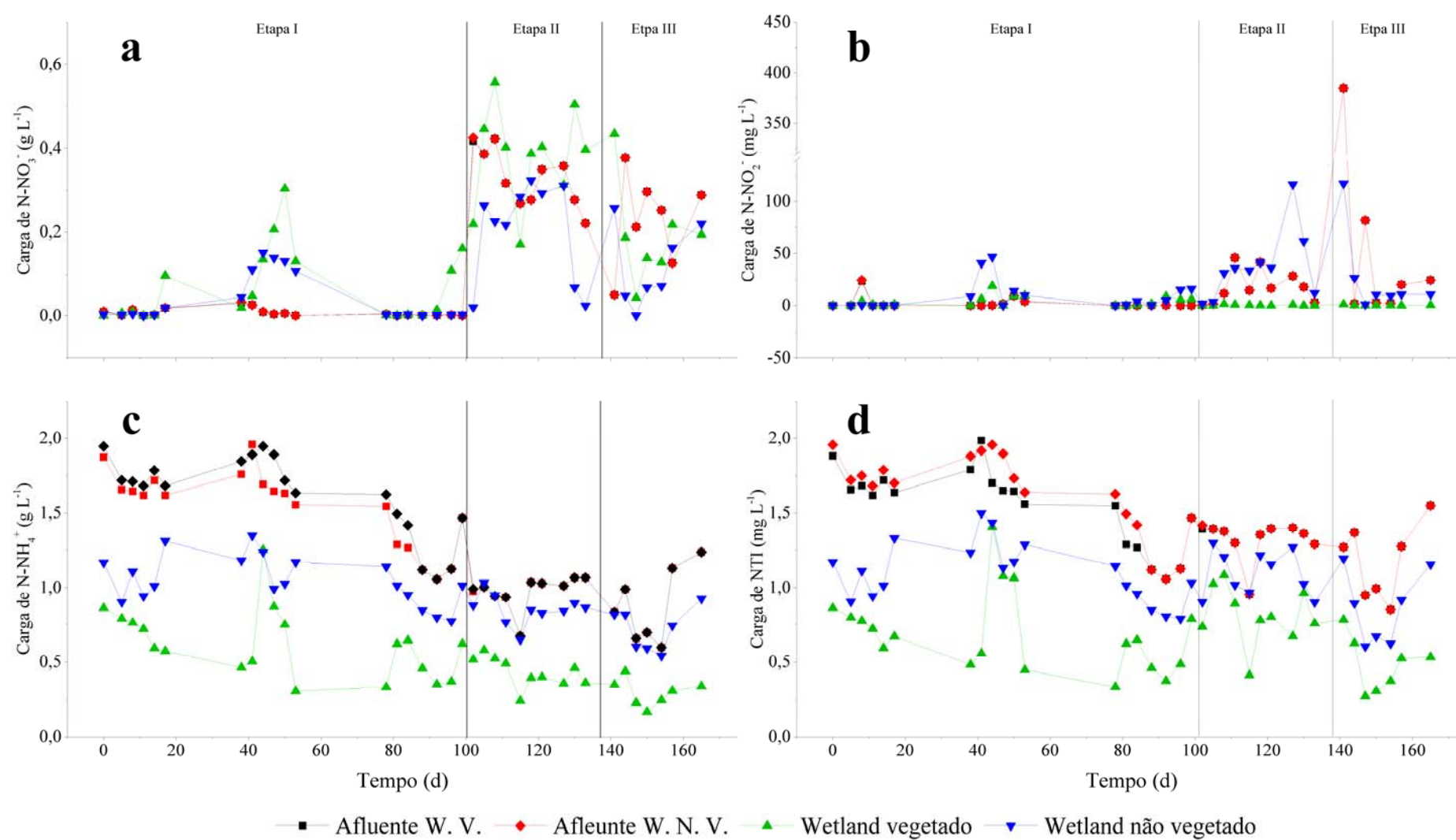


Figura 14 – Cargas das espécies de nitrogênio na entrada e saída de cada sistema durante as três etapas do experimento. (a) Nitrato, (b) Nitrito, (c) Amônio e (d) Nitrogênio Total Inorgânico.

A comparação da composição das espécies de nitrogênio das unidades, vegetada e não vegetada, durante todo o experimento está mostrada na Figura 15. Na Etapa I, a composição do efluente de ambas as unidades foi principalmente nitrogênio amoniacal (99%); na Etapa II, após a adição de efluente nitrificado, aumentou a fração de nitrato das amostras; principalmente na unidade vegetada; o que, de novo, comprova o processo de nitrificação dentro deste. Estes valores podem ser explicados pela falta de fontes de carbono facilmente biodegradáveis para a desnitrificação. Como mostram Borges et al. (2016), em sistemas de fluxo superficial, quando não tem matéria orgânica suficiente a desnitrificação não ocorre ou ocorre parcialmente, dando baixa remoção de nitrato (12-55%). Ora, na unidade vegetada, além de não desnitrificar totalmente, a oxigenação das plantas promove a nitrificação (processo autótrofo), o que explica o aumento no teor de nitrato e consumo de amônio. Por outro lado, na Etapa III, os valores de todas as espécies de nitrogênio diminuíram na unidade vegetada em relação à Etapa II ($p < 0,05$), enquanto na unidade não vegetada, apenas diminuiu a carga de nitrato (Tabela 5).

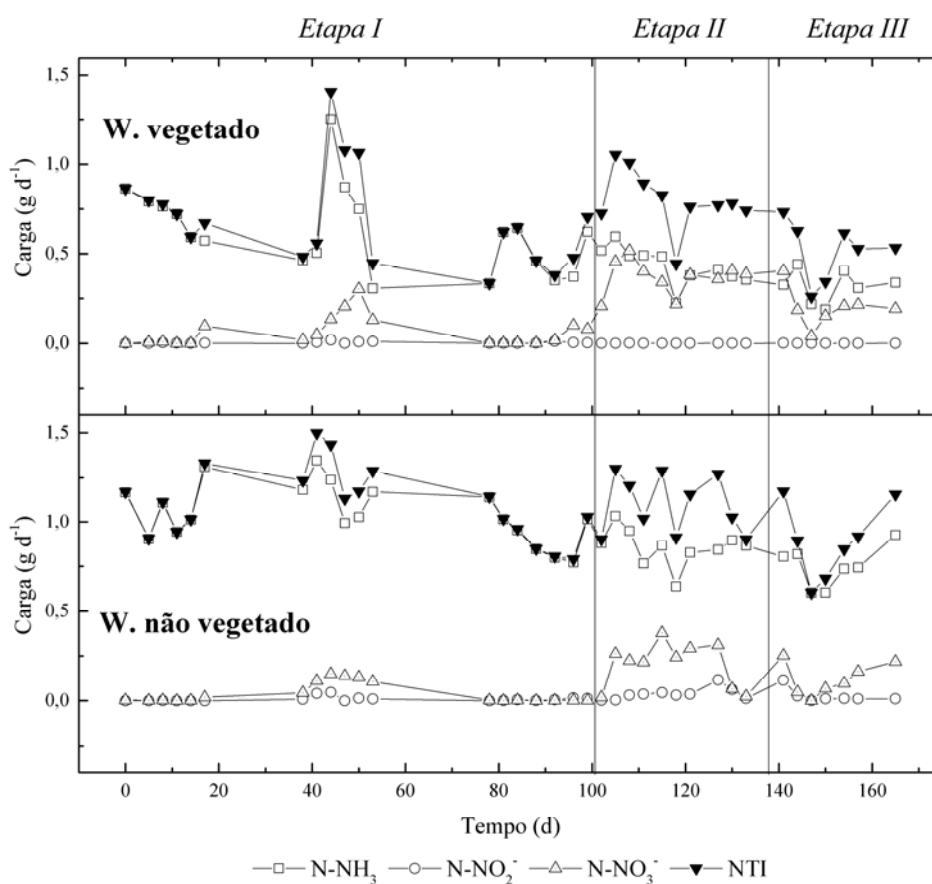


Figura 15 – Cargas das espécies de nitrogênio no efluente de cada unidade experimental durante as três etapas do experimento.

A eficiência é uma medida relativa que permite uma comparação mais acertada entre amostras independentes, nesse sentido, permite comparar o sistema entre etapas. Logo, a Etapa III apresenta os melhores valores de eficiência de remoção (59%) de Nitrogênio Total Inorgânico em relação à Etapa II (38%) e a Etapa I (55%) na unidade vegetada (Tabela 5). Alguns trabalhos similares mostram eficiências entre 25% (DA COSTA et al., 2013), 51% (TAO et al., 2012) e 48 % (WANG; LI, 2014a).

Finalmente, as comparações dos efluentes das unidades vegetada e não vegetada foram feitas com o teste não paramétrico de Wilcoxon para amostras pareadas (dependentes) a um nível de significância de 5%, comparando as medianas das concentrações e cargas dos efluentes. Os resultados do teste estatístico são mostrados na Tabela 6.

Tabela 5 – Desempenho do sistema por etapa do experimento.

Parâmetro	Etapa	W. vegetado			W. não vegetado		
		Carga Afluente (g d ⁻¹)	Carga Efluente (g d ⁻¹)	Eficiência média (%)	Carga Afluente (g d ⁻¹)	Carga Efluente (g d ⁻¹)	Eficiência média (%)
DQO	I	2,30	0,60	74	2,41	1,26	47
	II	1,96	0,67	66	1,97	1,27	35
	III	2,34	0,50	79	2,34	0,96	59
N-NH ₄ ⁺	I	1,54	0,62	59	1,62	1,05	35
	II	0,97	0,43	56	0,98	0,86	12
	III	0,88	0,30	66	0,88	0,72	18
N-NO ₂ ⁻	I	2,1E-03	3,9E-03	-91	2,16E-03	8,62E-03	-299
	II	1,8E-02	4,4E-04	98	1,82E-02	3,75E-02	-106
	III	7,4E-02	4,3E-04	99	7,41E-02	2,67E-02	64
N-NO ₃ ⁻	I	0,01	0,07	-886	0,01	0,04	-456
	II	0,33	0,38	-15	0,33	0,20	39
	III	0,23	0,19	16	0,23	0,12	48
NTI	I	1,55	0,69	55	1,63	1,10	33
	II	1,32	0,81	38	1,32	1,10	17
	III	1,18	0,49	59	1,18	0,87	27

Segundo os resultados do teste estatístico, no geral, existem diferenças significativas entre as cargas das duas unidades, exceto para nitrito e nitrato da primeira etapa. Assim também, existem diferenças significativas na maioria das concentrações de saída das

unidades, mas não no NTI da segunda etapa nem no nitrogênio amoniacal da primeira etapa, isto confirma os resultados observados nas Figuras 11 e 14.

Tabela 6 – Comparação entre as unidades vegetada e não vegetada. Resultado do teste de Wilcoxon de amostras pareadas para as medianas dos valores de concentração e carga dos efluentes.

Parâmetro	Etapa	Valor p para comparação de concentração	Valor p para comparação de carga
DQO	I	0,021	0,0001
	II	0,006	0,006
	III	0,022	0,022
N-NH ₄ ⁺	I	0,776	0,000
	II	0,006	0,006
	III	0,022	0,022
N-NO ₂ ⁻	I	0,478	0,107
	II	0,006	0,006
	III	0,022	0,022
N-NO ₃ ⁻	I	0,061	0,191
	II	0,006	0,019
	III	0,022	0,035
NTI	I	0,067	0,000
	II	0,610	0,006
	III	0,022	0,022

$p \leq 0,05$; as medianas das unidades vegetada e não vegetada tem diferenças significativas.

$p > 0,05$; as medianas das unidades vegetada e não vegetada não tem diferenças significativas.

4.4 Taxa de remoção de nitrogênio

Considerando as diferenças de cargas da entrada e saída que, por sua vez, são influenciadas pela evapotranspiração e crescimento das plantas, foi calculada a taxa de remoção por unidade de área. Na Figura 16 se mostram as taxas de remoção para o NTI calculadas em função do tempo e as etapas de tratamento. Note-se, na Figura 16, que na Etapa I os valores de taxa de remoção são maiores que na Etapa II e III para ambos os sistemas, devido a que possuem uma carga maior (vide Fig. 15), só a partir do dia 81 o sistema apresenta uma maior estabilidade (em destaque na Fig. 16). Já na Etapa II, a taxa de remoção de todo o sistema diminui, devido, possivelmente, à redução da DQO do afluente ao sistema pela mistura dos efluentes (Tabela 4), a falta de material carbonáceo limitaria o processo de desnitrificação, evidenciando que era este último o principal mecanismo de remoção no sistema alagado construído, especialmente na unidade não vegetada.

Finalmente, na Etapa III, a taxa de remoção aumenta tanto na unidade vegetada quanto na não vegetada. Apesar dos problemas pela diminuição de temperatura, o sistema se mostra robusto e aumenta a taxa de remoção após a inoculação de biomassa Anammox. Ao possuir as mesmas limitações que a Etapa II, pode-se concluir que o aumento na remoção foi por efeito da inoculação, o efeito positivo do inóculo foi evidenciado por outros autores (PAREDES; KUSCHK; KÖSER, 2007; TAO; WANG, 2009); mas o diferencial da presente pesquisa foi utilizar um efluente nitrificado como fornecedor de nitrito.

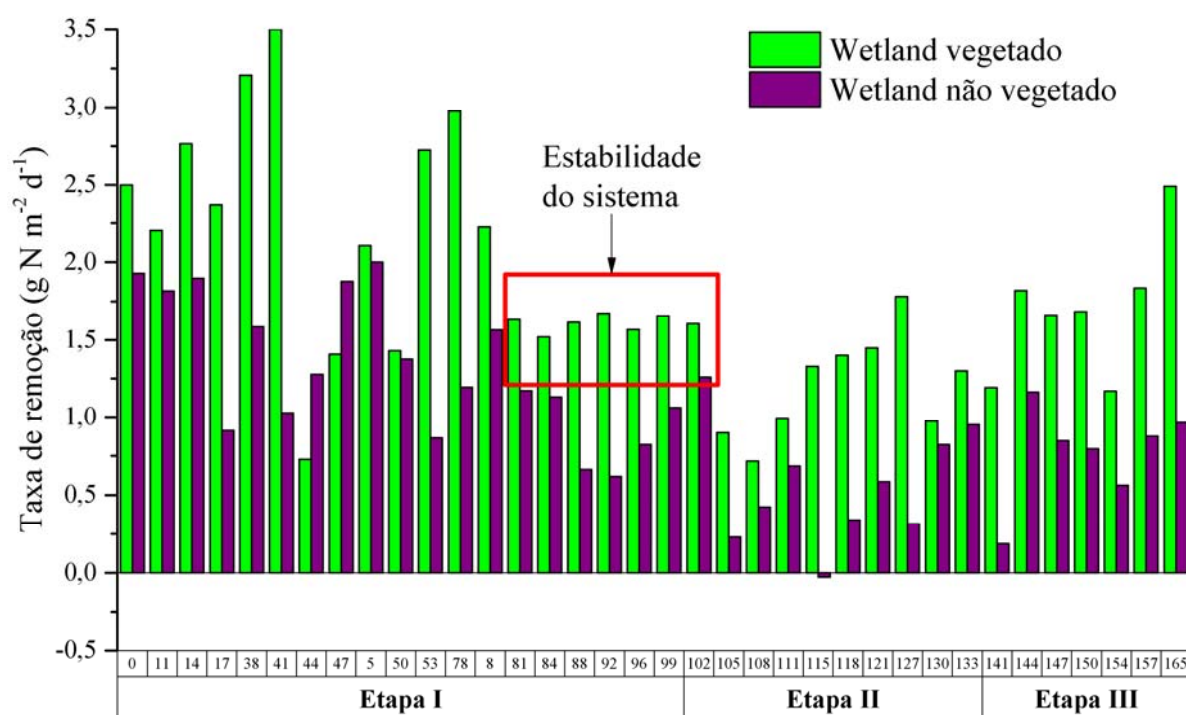


Figura 16 – Taxa de remoção do Nitrogênio Total Inorgânico (NTI) em função do tempo e unidade experimental. O quadro vermelho indica a fração da Etapa I que atinge estabilidade.

Os valores médios e desvio padrão de taxa de remoção para cada unidade por etapas se mostram na Figura 17. Em todas as etapas existem diferenças significativas entre as unidades vegetada e não vegetada ($p < 0,01$) e, a Etapa III apresenta maior taxa de remoção que a Etapa II ($p < 0,05$) na unidade vegetada. Apesar de não apresentar diferenças estatisticamente significativas entre as Etapas II e III da unidade não vegetada, pode-se observar um aumento na taxa de remoção na Etapa III.

Na Tabela 2, se mostram alguns valores de taxa de remoção de nitrogênio para experimentos similares. Os valores estão entre 0,8 e 50 g m⁻² d⁻¹, a diferença está na concentração de entrada, quanto maior a concentração maior a taxa de remoção; por exemplo, Sun e Austin (2007) reportaram valores de 50 g m⁻² d⁻¹ para uma concentração de 490 mg L⁻¹,

enquanto Tao e Wang (2009) sinalaram valores de $2,1 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ para uma concentração de 60 mg L^{-1} .

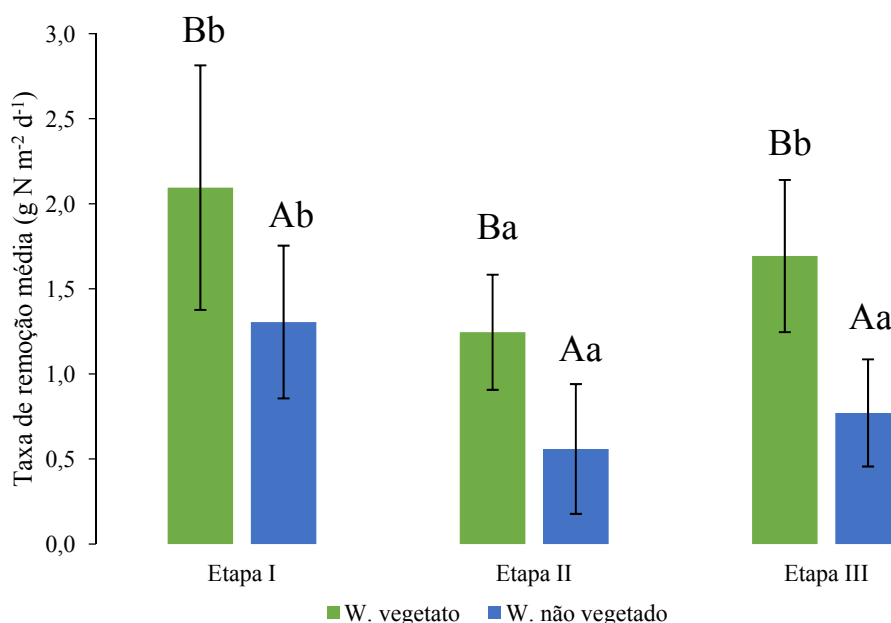


Figura 17 – Diferenças na taxa de remoção média entre as unidades e entre as etapas. Os valores representam a média \pm desvio padrão. As letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre as unidades vegetada e não vegetada. As letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre as três etapas para uma mesma unidade.

4.5 Atividade potencial desnitrificante e Anammox

Para corroborar a atividade Anammox, foram executados testes de cinética microbiana. Para isso foram realizados testes de consumo de substrato com respeito ao tempo; o substrato mais usado para teste Anammox é o amônio (DAPENA-MORA et al., 2007; PAREDES; KUSCHK; KÖSER, 2007; TAO et al., 2012; VAN DE GRAAF et al., 1996). O desenvolvimento de Anammox dentro dos sistemas é comprovado com os valores de taxa de reação Anammox (Tabela 7).

Tabela 7 – Atividade potencial Anammox e desnitrificante antes e depois da inoculação.

	Taxa de reação Anammox + Desnitrificante [mg N kg ⁻¹ d ⁻¹]		Taxa de reação desnitrificante [mg N kg ⁻¹ d ⁻¹]		Taxa de reação Anammox [mg N kg ⁻¹ d ⁻¹]	
	Etapa II	Etapa III	Etapa II	Etapa III	Etapa II	Etapa III
<i>Wetland</i> vegetado	24,2	74,5	19,2	20,0	5,1	54,4
<i>Wetland</i> não vegetado	11,9	64,7	4,1	17,7	7,8	47,0

A Etapa III apresenta uma maior atividade Anammox nas duas unidades experimentais, o que significa que o lodo inoculado teve boa sinergia com a microbiota presente nos sistemas alagados. Na unidade vegetada foi maior do que na não vegetada; porém, as duas unidades apresentaram uma maior taxa Anammox do que desnitrificante, em contraste com a Etapa II onde a taxa desnitrificante é maior. Esta atividade pode se atribuir ao fato de acumular mais nitrito por desnitrificação parcial do nitrato, como explicado por Kalyuzhnyi (2006).

Outros estudos reportaram valores de atividade Anammox similares, Paredes et al. (2007) tiveram como resultado até $19,1 \text{ mg N kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$, Tao e Wang (2012) reportaram $0,256 \text{ mg N g}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Estes estudos foram realizados para cargas elevadas de amônia, onde foi fornecida a fonte de nitrito artificialmente. Porém, outros estudos mostram que Anammox pode acontecer naturalmente em alagados construídos (DONG; SUN, 2007), infelizmente não foi realizado nenhum teste específico da atividade.

4.6 Demanda química de oxigênio, pH e alcalinidade

O teor de matéria orgânica foi avaliado pela DQO, que varia em função do tempo (Fig. 18). Durante todo o experimento os valores de DQO do efluente da unidade vegetada foram quase a metade que da unidade não vegetada, isto, apesar do viés ocasionado pela evapotranspiração, o que significa uma maior eficiência da unidade vegetada. Alguns valores reportados na literatura mostram eficiências entre 69 – 89% (DA COSTA et al., 2013; SEZERINO et al., 2015) no presente trabalho se obteve uma remoção entre 60 – 90% (Fig. 19).

Durante todo o experimento foram medidos os valores de pH e Alcalinidade (Fig. 20). Estes dois parâmetros são importantes para avaliar o comportamento de cada unidade. É sabido que o processo de nitrificação consome alcalinidade e reduz o pH, do lado oposto, a desnitrificação produz alcalinidade. Na Figura 20 podemos observar uma diminuição da alcalinidade e pH a partir da Etapa II na unidade vegetada até valores de $130 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ de 6,8, respectivamente. Este fato corrobora a atividade nitrificante nessa unidade como visto em outros estudos (TAO; WANG, 2009; TUNÇSIPER, 2009). Em contraste, a unidade não vegetada apresenta um aumento de pH (7,8) o que sugere que a desnitrificação é o processo principal de remoção de nitrogênio nessa unidade, mas está limitada à disponibilidade de fonte de carbono (BORGES et al., 2016).

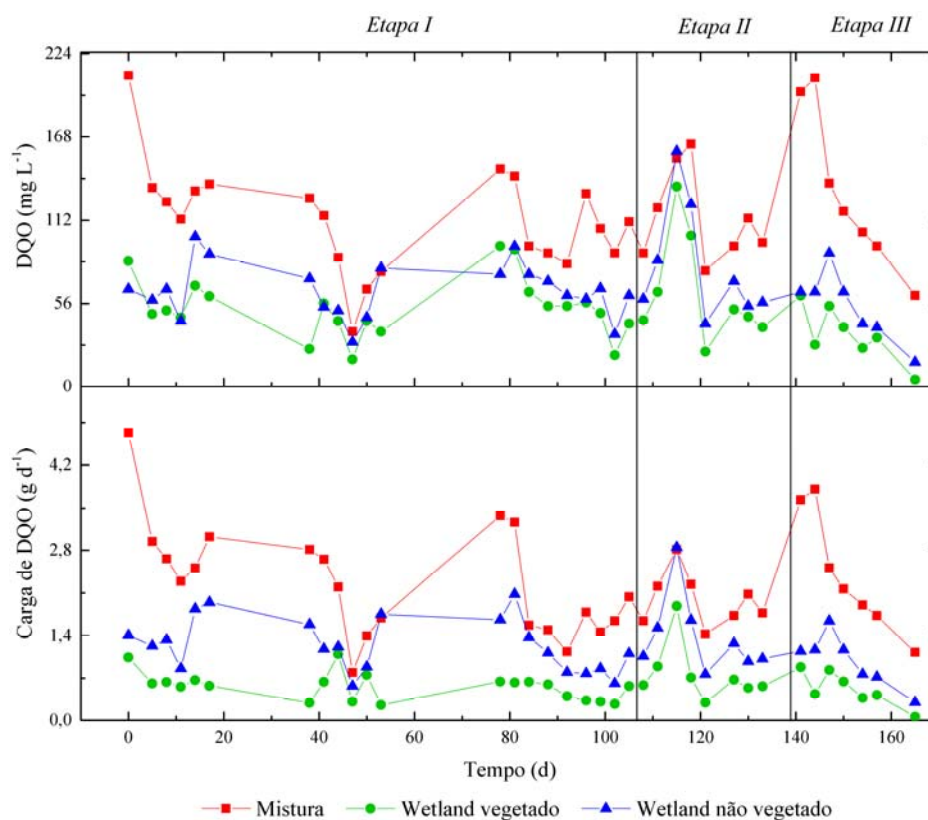


Figura 18 – Serie temporal da concentração e carga da DQO durante todo o experimento.

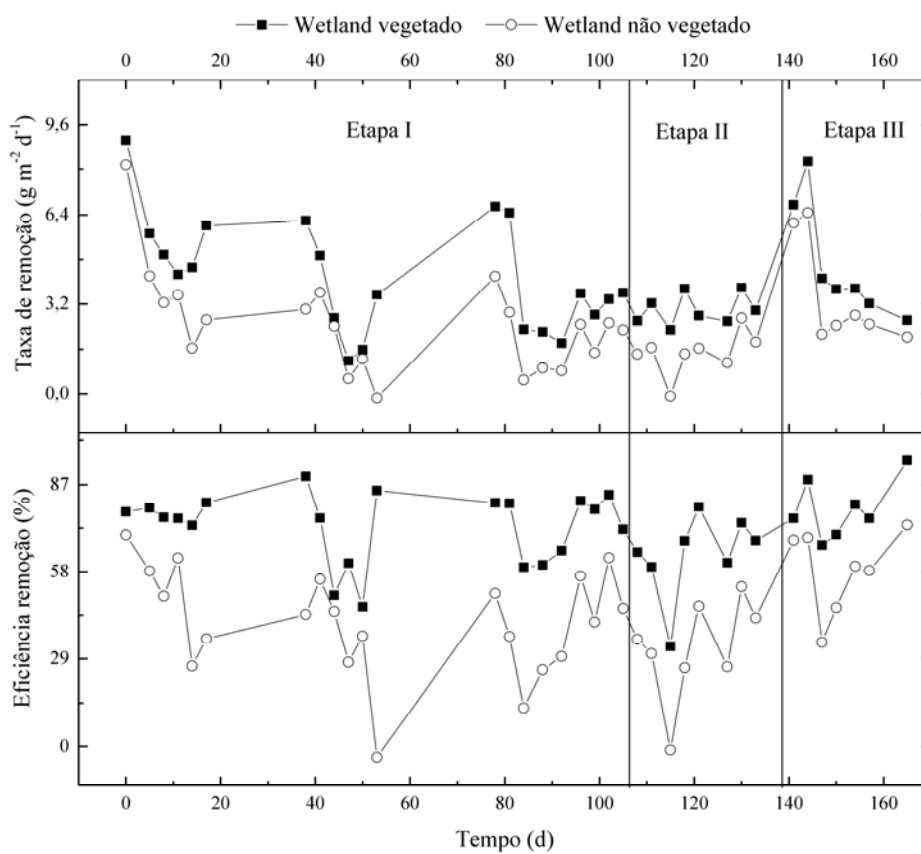


Figura 19 – Desempenho dos sistemas alagados construídos na remoção de matéria orgânica.

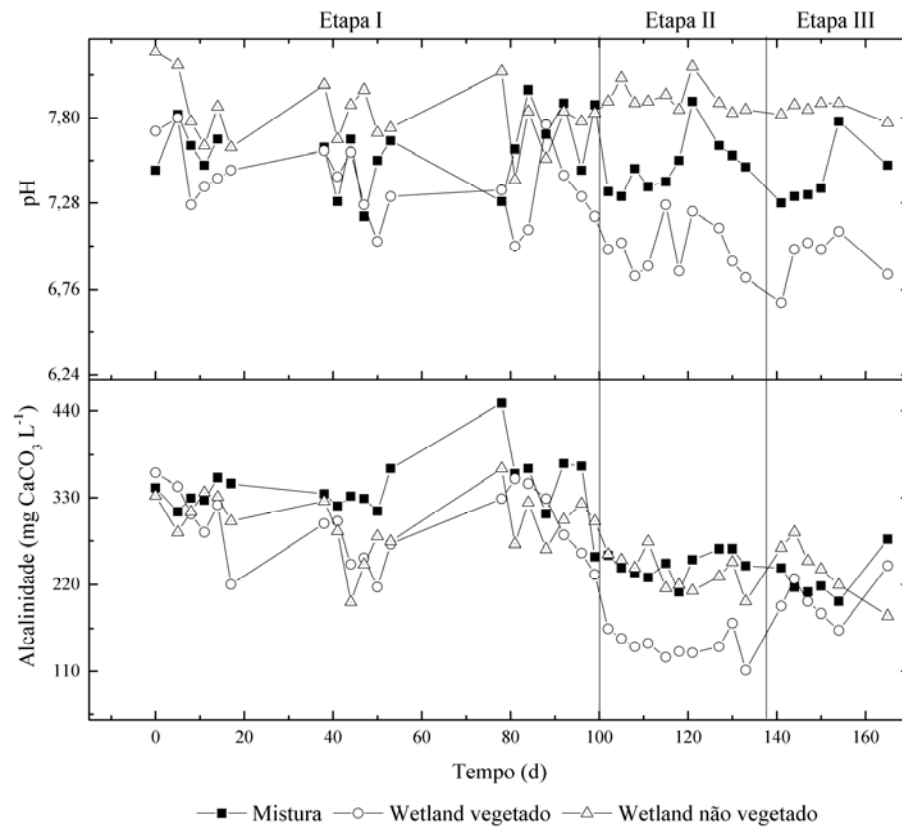


Figura 20 - Valores de pH e alcalinidade na entrada e saída dos sistemas alagados cosntruídos.

5 CONCLUSÕES

A mistura de efluentes anaeróbios com efluentes nitrificados aumenta a potencialidade dos sistemas alagados construídos de fluxo subsuperficial na remoção de nitrogênio via Anammox.

A inoculação de biomassa Anammox mostra que a mistura de efluentes favorece o desenvolvimento destes micro-organismos, chegando a aumentar a remoção biológica de nitrogênio.

Do mesmo modo, as plantas permitem uma maior remoção de nitrogênio (até 59%) devido, principalmente, a que promovem o processo de nitrificação.

Finalmente, a biomassa Anammox inoculada, aclimataou-se de forma favorável em ambas as unidades, vegetada e não vegetada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGNES, I. B. et al. Avaliação da capacidade de remoção de Nitrogênio por processo ANAMMOX em escala de bancada. **Seminário de Desenvolvimento da Pesquisa**, v. 12, 2008.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater**. 22th. ed. Washington D. C.: [s.n.].
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR13.969. Tanques sépticos- Unidades de tratamento complementar e disposição final dos efluentes líquidos-Projeto, construção e operação**, 1997.
- BAIRD, C. **Environmental Chemistry**. [s.l.] W.H. Freeman, 1995.
- BORGES, A. C. et al. Potential for denitrification in sequencing batch constructed wetlands cultivated with *T. latifolia* and *C. zizanioides*. **Desalination and Water Treatment**, v. 57, n. 12, p. 5464–5472, 8 mar. 2016.
- BRIX, H. et al. Constructed wetlands for pollution control : process, performance, design and operation. . 2000, p. 156.
- BRODA, E. Two kinds of lithotrophs missing in nature. **Zeitschrift fur Allgemeine Mikrobiologie**, v. 17, n. 6, p. 491–493, 1977.
- CANFIELD, D. E.; GLAZER, A. N.; FALKOWSKI, P. G. The Evolution and Future of Earth's Nitrogen Cycle. **Science**, v. 330, n. 6001, p. 192–196, 7 out. 2010.
- CASAGRANDE, C. G. et al. Comparação da partida de reatores com atividade ANAMMOX com diferentes concentrações de inóculo. **Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos das Produções Agropecuária e Agroindustrial**, v. 2, 2011.
- CHERNICHARO, C. A. L. et al. Anaerobic sewage treatment: state of the art, constraints and challenges. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 14, n. 4, p. 649–679, 2015.
- COSTA, M. C. M. S. et al. Impact of inocula and operating conditions on the microbial community structure of two Anammox reactors. **Environmental technology**, v. 35, n. 13-16, p. 1811–22, ago. 2014.
- CRITES, R. W.; TCHOBANOGLIOUS, G. **Small and decentralized wastewater management systems**: [s.l.] WCB/McGraw-Hill, 1998.
- CRUZ, L. M. et al. Coconut shells as filling material for anaerobic filters. **SpringerPlus**, v. 2, p. 655, 2013.
- DA COSTA, J. F. et al. Performance and behaviour of planted and unplanted units of a horizontal subsurface flow constructed wetland system treating municipal effluent from a UASB reactor. **Water science and technology**, v. 68, n. 7, p. 1495–502, 2013.
- DAPENA-MORA, A. et al. Evaluation of activity and inhibition effects on Anammox process

by batch tests based on the nitrogen gas production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 859–865, mar. 2007.

DE ARAÚJO, J. C. et al. Enriquecimento de bactérias anaeróbias oxidadoras de amônia–Anammox. **Eng Sanit Ambient**, v. 15, n. 2, p. 205–212, 2010.

DONG, Z.; SUN, T. A potential new process for improving nitrogen removal in constructed wetlands—Promoting coexistence of partial-nitrification and ANAMMOX. **Ecological Engineering**, v. 31, n. 2, p. 69–78, out. 2007.

DORNELAS, F. L.; MACHADO, M. B.; VON SPERLING, M. Performance evaluation of planted and unplanted subsurface-flow constructed wetlands for the post-treatment of UASB reactor effluents. **Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research**, v. 60, n. 12, p. 3025–33, jan. 2009.

DU, R. et al. Advanced nitrogen removal from wastewater by combining Anammox with partial denitrification. **Bioresource Technology**, v. 179, p. 497–504, 2015.

GAGNON, V. et al. Influence of macrophyte species on microbial density and activity in constructed wetlands. **Water Science & Technology**, v. 56, n. 3, p. 249, ago. 2007.

GALLOWAY, J. N. et al. The Nitrogen Cascade. **BioScience**, v. 53, n. 4, p. 341–356, 1 abr. 2003.

GALLOWAY, J. N. et al. Transformation of the Nitrogen Cycle: Recent Trends, Questions, and Potential Solutions. **Science**, v. 320, n. 5878, p. 889–892, 16 maio 2008.

GARRIDO, J. M. et al. Influence of dissolved oxygen concentration on nitrite accumulation in a biofilm airlift suspension reactor. **Biotechnology and bioengineering**, v. 53, n. 2, p. 168–78, 20 jan. 1997.

GUDE, V. G.; TRUAX, D. D.; MAGBANUA, B. S. Natural Treatment and Onsite Processes. **Water Environment Research**, v. 85, n. 10, p. 1232–1261, 2013.

HAO, X.; HEIJNEN, J. J.; VAN LOOSDRECHT, M. C. . Model-based evaluation of temperature and inflow variations on a partial nitrification–ANAMMOX biofilm process. **Water Research**, v. 36, n. 19, p. 4839–4849, nov. 2002.

HELLINGA, C. et al. The sharon process: An innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich waste water. **Water Science and Technology**, v. 37, n. 9, p. 135–142, 1998.

HIPPEN, A. et al. Aerobic deammonification: A new experience in the treatment of wastewaters. **Water Science and Technology**, v. 35, n. 10, p. 111–120, 1997.

JIN, R.-C. et al. The inhibition of the Anammox process: A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 197, p. 67–79, jul. 2012.

KADLEC, R. et al. **Constructed Wetlands for Pollution Control. Processes, Performance, Design and Operation**. Londres: IWA publishing, 2000.

KADLEC, R. H.; WALLACE, S. **Treatment Wetlands, Second Edition**. [s.l.] CRC Press, 2010.

KADLEC, R. H.; WALLACE, S.; KNIGHT, R. L. **Treatment Wetlands**. [s.l.] Taylor & Francis, 1995.

KALYUZHNYI, S. et al. DEAMOX--new biological nitrogen removal process based on anaerobic ammonia oxidation coupled to sulphide-driven conversion of nitrate into nitrite. **Water research**, v. 40, n. 19, p. 3637–45, nov. 2006.

KALYUZHNYI, S.; GLADCHENKO, M. DEAMOX – New microbiological process of nitrogen removal from strong nitrogenous wastewater. **Desalination**, v. 248, n. 1-3, p. 783–793, nov. 2009.

KARTAL, B. et al. How to make a living from anaerobic ammonium oxidation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 3, p. 428–461, 1 maio 2013.

KUENEN, J. G. Anammox bacteria: from discovery to application. **Nature reviews. Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 320–326, 2008.

KUNZ, A. et al. **Influência da concentração de nitrogênio em reatores com atividade Anammox durante o start-up do sistema**. Embrapa Suínos e Aves-Artigo em anais de congresso (ALICE). **Anais...In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE GERENCIAMENTO DE RESÍDUOS AGROPECUÁRIOS E AGROINDUSTRIAS**, 3., 2013, São Pedro, SP. Anais... São Pedro, SP: SBERA, 2013., 2013

LIU, Y.; TAY, J.-H. Factors affecting nitrite build-up in nitrifying biofilm reactor. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 36, n. 6, p. 1027–1040, 30 jun. 2001.

LOTTI, T. et al. The effect of nitrite inhibition on the Anammox process. **Water research**, v. 46, n. 8, p. 2559–69, 15 maio 2012.

MA, B. et al. Biological nitrogen removal from sewage via Anammox: Recent advances. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 981–990, 2016.

MASSOUD, M. A.; TARHINI, A.; NASR, J. A. Decentralized approaches to wastewater treatment and management: applicability in developing countries. **Journal of environmental management**, v. 90, n. 1, p. 652–9, jan. 2009.

MULDER, A. et al. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 16, n. 3, p. 177–184, mar. 1995.

MULDER, A. **Anoxic ammonia oxidation** European Patent Office, 1989.

OAKLEY, S. M.; GOLD, A. J.; OCZKOWSKI, A. J. Nitrogen control through decentralized wastewater treatment: Process performance and alternative management strategies. **Ecological Engineering**, v. 36, n. 11, p. 1520–1531, 2010.

PARANYCHIANAKIS, N. V.; TSIKNIA, M.; KALOGERAKIS, N. Pathways regulating the removal of nitrogen in planted and unplanted subsurface flow constructed wetlands. **Water Research**, 2016.

PAREDES, D.; KUSCHK, P.; KÖSER, H. Influence of Plants and Organic Matter on the Nitrogen Removal in Laboratory-Scale Model Subsurface Flow Constructed Wetlands Inoculated with Anaerobic Ammonium Oxidizing Bacteria. **Engineering in Life Sciences**, v.

7, n. 6, p. 565–576, dez. 2007.

PARK, S.; BAE, W.; RITTMANN, B. E. Operational boundaries for nitrite accumulation in nitrification based on minimum/maximum substrate concentrations that include effects of oxygen limitation, pH, and free ammonia and free nitrous acid inhibition. **Environmental science & technology**, v. 44, n. 1, p. 335–42, 1 jan. 2010.

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. 1371–7, mar. 2003.

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. 429–48, 15 dez. 2012.

SCHEEREN, M. B. et al. O processo ANAMMOX como alternativa para tratamento de águas residuárias, contendo alta concentração de nitrogênio. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, n. 12, p. 1289–1297, 2011.

SELMAN, M.; GREENHALGH, S. Eutrophication: sources and drivers of nutrient pollution. **Renewable Resources Journal**, v. 26, n. 4, p. 19–26, 2010.

SEZERINO, P. H. et al. 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, mar. 2015.

SLIEKERS, A. Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite in one single reactor. **Water Research**, v. 36, n. 10, p. 2475–2482, maio 2002.

STARKL, M. et al. Small is beautiful but is large more economical? Fresh views on decentralised versus centralised wastewater management. **WATER21**, p. 45–47, 2012.

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

STROUS, M. et al. Missing lithotroph identified as new planctomycete. **Nature**, v. 400, n. 6743, p. 446–449, 29 jul. 1999.

STROUS, M. et al. Deciphering the evolution and metabolism of an Anammox bacterium from a community genome. **Nature**, v. 440, n. 7085, p. 790–794, 6 abr. 2006.

STROUS, M.; KUENEN, J. G.; JETTEN, M. S. M. Key Physiology of Anaerobic Ammonium Oxidation. **Appl. Envir. Microbiol.**, v. 65, n. 7, p. 3248–3250, 1 jul. 1999.

STUART, M. E.; LAPWORTH, D. J. Macronutrient status of UK groundwater: Nitrogen, phosphorus and organic carbon. **The Science of the total environment**, 2016.

SUN, G.; AUSTIN, D. Completely autotrophic nitrogen-removal over nitrite in lab-scale constructed wetlands: evidence from a mass balance study. **Chemosphere**, v. 68, n. 6, p. 1120–8, jun. 2007.

TAO, W. et al. Nitrogen Removal in Constructed Wetlands Using Nitritation/Anammox and Nitrification/ Denitrification: Effects of Influent Nitrogen Concentration. **Water Environment Research**, v. 84, n. 12, p. 2099–2105, 1 dez. 2012.

TAO, W.; WANG, J. Effects of vegetation, limestone and aeration on nitritation, Anammox and denitrification in wetland treatment systems. **Ecological Engineering**, v. 35, n. 5, p. 836–842, maio 2009.

TONETTI, A. L. et al. Tratamento de esgoto e produção de água de reúso com o emprego de filtros de areia. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 17, n. 1, p. 287–294, 2012.

TONON, D. et al. Wastewater treatment by anaerobic filter and sand filter: Hydraulic loading rates for removing organic matter, phosphorus, pathogens and nitrogen in tropical countries. **Ecological Engineering**, v. 82, p. 583–589, set. 2015.

TUNÇSIPER, B. Nitrogen removal in a combined vertical and horizontal subsurface-flow constructed wetland system. **Desalination**, v. 247, n. 1-3, p. 466–475, out. 2009.

VAN DE GRAAF, A. A. et al. Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor. **Microbiology**, v. 142, n. 8, p. 2187–2196, 1 ago. 1996.

VAN DE GRAAF, A. A. et al. Metabolic pathway of anaerobic ammonium oxidation on the basis of ¹⁵N studies in a fluidized bed reactor. **Microbiology**, v. 143, n. 7, p. 2415–2421, 1 jul. 1997.

VAN DER STAR, W. R. L. **Growth and metabolism of Anammox Bacteria**. [s.l.] TU Delft, Delft University of Technology, 15 abr. 2008.

VAN DONGEN, U.; JETTEN, M. S. M.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. **The SHARON®-Anammox® process for treatment of ammonium rich wastewater**. Water Science and Technology. **Anais...**2001

VAN LOOSDRECHT, M. Innovative Nitrogen Removal. In: HENZE, M. et al. (Eds.). **Biological Wastewater Treatment: Principles, Modelling and Design**. London, UK: IWA Publishing, 2008.

VYMAZAL, J. Removal of nutrients in various types of constructed wetlands. **The Science of the total environment**, v. 380, n. 1-3, p. 48–65, 15 jul. 2007.

VYMAZAL, J. The use constructed wetlands with horizontal sub-surface flow for various types of wastewater. **Ecological Engineering**, v. 35, n. 1, p. 1–17, jan. 2009.

WAKI, M. et al. Effect of electron donors on Anammox coupling with nitrate reduction for removing nitrogen from nitrate and ammonium. **Bioresource technology**, v. 130, p. 592–8, fev. 2013.

WANG, L.; LI, T. Effects of seasonal temperature variation on nitrification, Anammox process, and bacteria involved in a pilot-scale constructed wetland. **Environmental science and pollution research international**, 30 set. 2014a.

WANG, L.; LI, T. Vegetation effects on Anammox spatial distribution and nitrogen removal in constructed wetlands treated with domestic sewage. **Water science and technology: a**

journal of the International Association on Water Pollution Research, v. 70, n. 8, p. 1370–5, out. 2014b.

WHO/UNICEF. **Meeting the MDG drinking-water and sanitation target**. Geneva: World Health Organization and UNICEF, 2006.

WU, S. et al. Development of constructed wetlands in performance intensifications for wastewater treatment: a nitrogen and organic matter targeted review. **Water research**, v. 57, p. 40–55, 15 jun. 2014.

ZHU, G. et al. Anammox bacterial abundance, biodiversity and activity in a constructed wetland. **Environmental science & technology**, v. 45, n. 23, p. 9951–8, 1 dez. 2011.

ZHU, H. et al. Removal of nitrogen and COD in horizontal subsurface flow constructed wetlands under different influent C/N ratios. **Ecological Engineering**, v. 63, p. 58–63, fev. 2014.

APÊNDICE

1. FIGURAS DAS UNIDADES DE TRATAMENTO DO LABORATÓRIO DE PROTÓTIPOS



Figura S 1. Ponto de coleta de esgoto bruto



Figura S 2. Primeira caixa de armazenamento de esgoto bruto.



Figura S 3. Segunda caixa de armazenamento de esgoto bruto (elevada).



Figura S 4. Sistema de Filtros Anaeróbios.



Figura S 5. Filtro de areia.

2. DETALHE DO SISTEMA DE SISTEMAS ALAGADOS CONSTRUÍDOS



Figura S 6. Muda de *Cyperus papyrus* plantado no sistema vegetado.



Figura S 7. Sistema alagado construído vegetado



Figura S 8. Sistema alagado construído não vegetado



Figura S 9. Sistema de dosagem dos sistemas alagados construídos.



Figura S 10. Detalhe da parte posterior da casa de vegetação, à esquerda a caixa de armazenamento do efluente anaeróbico, à direita o de efluente nitrificado.