



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia Agrícola

MARIA LÍDIA CARRA

**TRATAMENTO DE EFLUENTES DE PISCICULTURA EM REATORES
ANAERÓBIO E AERÓBIO COMBINADOS EM SÉRIE.**

CAMPINAS
ABRIL DE 2017

MARIA LÍDIA CARRA

**TRATAMENTO DE EFLUENTES DE PISCICULTURA EM REATORES
ANAERÓBIO E AERÓBIO COMBINADOS EM SÉRIE.**

Dissertação apresentada a Faculdade de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestra em Engenharia Agrícola na área de concentração Água e Solo.

Orientador: Prof. Dr. Ariovaldo José da Silva

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO MARIA LÍDIA CARRA, E ORIENTADA PELO PROF. DR. ARIOVALDO JOSÉ DA SILVA.

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 481361/2013-8; CAPES

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

C23t Carra, Maria Lidia, 1988-
Tratamento de efluentes de piscicultura em reatores anaeróbio e aeróbio combinados em série / Maria Lidia Carra. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Ariovaldo José da Silva.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Agrícola.

1. Piscicultura - Brasil. 2. Comunidades microbianas. 3. Canon. 4. Nitrificação. 5. Tratamento anaeróbio. I. Silva, Ariovaldo José da, 1966-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Agrícola. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Treatment of fish farming effluents in anaerobic and aerobic combined reactors

Palavras-chave em inglês:

Fish farming - Brasil

Microbial communities

Canon

Nitrification

Anaerobic treatment

Área de concentração: Água e Solo

Titulação: Mestra em Engenharia Agrícola

Banca examinadora:

Ariovaldo José da Silva [Orientador]

Edson Aparecido Abdul Nour

Tiago Palladino Delforno

Data de defesa: 17-02-2017

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Agrícola

Este exemplar corresponde à redação final da **Dissertação de Mestrado** defendida por **Maria Lídia Carra**, aprovada pela Comissão Julgadora em 17 de fevereiro de 2017, na Faculdade de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Campinas.

FEAGRI

Prof. Dr. Ariovaldo José da Silva – Presidente e Orientador
FEAGRI/UNICAMP

Dr. Tiago Palladino Delforno – Membro Titular
CPQBA/UNICAMP

Prof. Dr. Edson Aparecido Abdul Nour – Membro Titular
FEC/UNICAMP

Faculdade de Engenharia Agrícola Unicamp

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

DEDICATÓRIA

Dedico, aos meus pais Elisabete e Sérgio.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus e toda espiritualidade por mais essa oportunidade de crescimento na Terra e por não me faltar força e paciência nos momentos difíceis.

Agradeço ao meu orientador Ariovaldo José da Silva pela paciência e ensinamentos nestes dois anos e pela oportunidade de trabalharmos juntos neste projeto.

Aos meus pais, Sérgio Carra e Elisabete Nery Carra pelo incentivo incondicional, por acreditarem em mim, e por todo apoio e carinho.

Ao meu noivo, Paulo Jonas, pela paciência nas noites de estudo, pela companhia nos feriados e finais de semana que passamos tratando os peixes e todo amor e carinho do dia a dia.

Agradeço a banca de defesa, Edson Nour e Tiago Palladino, por todas as correções e sugestões realizadas na dissertação.

À Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) e à Faculdade de Engenharia Agrícola (FEAGRI) pela oportunidade de realização deste trabalho e pela infraestrutura dos laboratórios e bibliotecas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao técnico do Laboratório de Saneamento (LabSan) Giovani Archanjo, por toda ajuda disponibilizada durante a realização da pesquisa.

Aos alunos de ICs pela ajuda de sempre. À Vitória Teodoro e Daniela Souza que se dedicaram com tanto carinho ao nosso trabalho, essa vitória também é de vocês. Às alunas PIBIC, Alexia e Khauany pelas tarde de muitas risadas e muito trabalho também.

Aos amigos que conquistei na FEAGRI e na UNICAMP: Luiza, Wagner, Juliana, Joyce, Douglas, Erika pelos momentos vividos juntos, nas disciplinas, no laboratório, no bandeirão, às boas risadas e conversas enriquecedoras.

À amiga de Amparo que tornava o almoço no risos (RS) muito mais divertido, obrigada pelas palavras de apoio e pelos momentos OFF do nosso almoço Naty.

Ao Laboratório de Microbiologia Ambiental da UFScar em Sorocaba, principalmente Ana Araujo e Iolanda Duarte pelo auxílio dado nas análises de PCR e na extração de DNA.

Aos professores Gustavo Mockaitis, Edson Nour, Mauro Tereso, Roy Bruns pelos ensinamentos que ficarão por toda vida.

Agradeço á amiga e pesquisadora Fernanda Sampaio pela oportunidade de trabalharmos juntas na Embrapa, cujo estágio me possibilitou conhecer tantos lugares e pessoas, e todo conhecimento adquirido culminou nesse mestrado.

Ao Led Zeppelin, AC/DC, Queen, Whitesnake, Scorpions e a todos os presentes da minha "Playlist da Dissertação" no Spotify, sem vocês meus dias de estudo e escrita seriam de muito mais sono.

Aos amigos e familiares de Campinas e de Amparo que participaram ativamente só por perguntarem "E como vai o mestrado?" e darem um apoio adicional.

Aqueles que não foram mencionados, mas de alguma forma contribuíram para que esta dissertação fosse concluída, a minha sincera gratidão!!!

EPÍGRAFE

*Não há ensino que se compare ao exemplo.
Robert Baden Powell*

RESUMO E PALAVRAS CHAVE

Os efluentes de piscicultura intensiva podem conter concentrações elevadas de matéria orgânica e nitrogênio originado das sobras de ração e na excreção. A fim de minimizar os impactos e a frequência de trocas de água no tanque este projeto de pesquisa visa o desenvolvimento de tecnologia para tratamento e reúso de efluentes gerados em tanques de piscicultura intensiva. Foi estudado um sistema combinado de reatores anaeróbio (340L) e aeróbio (170L) com a finalidade de remoção de matéria orgânica, nitrogênio amoniacal e nitrito de um aquário de produção intensiva de tilápias (140L) por meio dos processos Anammox e Canon. As bactérias anammox são específicas e para comparar a diversidade microbiana desenvolvida no reator de tratamento de piscicultura foi realizado o enriquecimento de uma cultura de bactérias com atividade anammox em Reator de Bateladas Sequenciais (RBS) a partir do mesmo lodo anaeróbio utilizado como inóculo dos reatores anaeróbios. O sistema de reatores anaeróbio-aeróbio foi eficiente na remoção de matéria orgânica (66%), porém a eficácia na remoção da carga de nitrogênio do sistema foi baixa (30%) devido à influência da geração de amônia nos reatores anaeróbios e nitrito por processo convencional de nitrificação no reator aeróbio. As cargas de carbono orgânico total, sólidos totais e sólidos suspensos voláteis apresentaram redução de 44%, 29% e 63%, respectivamente. Portanto, o sistema estudado não ofereceu segurança para sugerir a recirculação direta dos efluentes tratados para o tanque de criação de peixes, sendo necessário pós-tratamento para garantir as concentrações de amônia e nitrito abaixo dos limites de toxicidades para os animais. A biomassa enriquecida em reator de batelada apresentou significativa atividade anammox, observada pelas reduções de amônia e nitrito. O sequenciamento em larga escala do RNA ribossomal 16S da biomassa bacteriana mostrou duas comunidades bacterianas anaeróbias que podem estar relacionadas com a atividade anammox apresentada. A primeira, bactérias do gênero *Ignavibacteria*, com referência em atividades desnitrificante e de redução de amônia em culturas anammox; e bactérias do gênero *Thiobacillus*, específicos da redução de enxofre, porém com referência na redução de nitrogênio por desnitrificação. A cultura enriquecida a partir do inóculo de bovinocultura de leite para obtenção de bactérias anammox

no RBS poderá ser utilizada como inóculo no start-up de sistemas e reatores anammox.

Palavras chave: anammox, efluente de piscicultura, comunidade microbiana, Canon, desnitrificação.

ABSTRACT E KEYWORDS

Effluents from intensive fish farming may contain high concentrations of organic matter and nitrogen from feed leftovers and excretion. In order to minimize the impacts and frequency of water changes in the tank, this research project aims to develop technology for treatment and reuse of effluents generated in intensive fish ponds. A combined system of anaerobic (340L) and aerobic (170L) reactors was studied for the purpose of removing organic matter, ammoniacal nitrogen and nitrite from an intensive tilapia production aquarium (140L) using the Anammox and Canon processes. The anammox bacteria are specific and to compare the microbial diversity developed in the treatment reactor of fish farming was carried out the enrichment of a culture of bacteria with anammox activity in Sequential Batch Reactor (RBS) from the same anaerobic sludge used as inoculum of the anaerobic reactors. The anaerobic-aerobic reactor system was efficient in the removal of organic matter (66%), but the efficiency in the removal of the nitrogen load from the system was low (30%) due to the influence of the ammonia generation in the anaerobic and nitrite reactors by process of nitrification in the aerobic reactor. Total organic carbon, total solids and suspended solids volatiles presented a reduction of 44%, 29% and 63%, respectively. Therefore, the system studied did not offer safety to suggest direct recirculation of treated effluents to the fish breeding tank, post treatment is required to ensure concentrations of ammonia and nitrite below the toxicity limits for the animals. The biomass enriched in a batch reactor showed significant anammox activity, observed by reductions of ammonia and nitrite. The large-scale sequencing of the 16S ribosomal RNA from bacterial biomass showed two anaerobic bacterial communities that may be related to the anammox activity presented. The first, bacteria of the genus *Ignavibacteria*, with reference in denitrifying activities and of ammonia reduction in anammox cultures; And bacteria of the genus *Thiobacillus*, specific for the reduction of sulfur, but with reference in the reduction of nitrogen by denitrification. The culture enriched from the bovine inoculum of milk to obtain anammox bacteria in RBS can be used as inoculum in the start-up of anammox systems and reactors.

Key words: anammox, effluent fish farming, microbiology, Canon, denitrification

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Características do efluente de piscicultura de acordo com os autores citados nos parâmetros de turbidez (NTU), DQO (mg.L^{-1}), nitrogênio total (mg.L^{-1}), nitrito (mg.L^{-1}), nitrato (mg.L^{-1}) e nitrogênio amoniacal (mg.L^{-1}).....	25
Tabela 2: Parâmetros, métodos e frequência de análise para acompanhamento do desempenho do tratamento.....	57
Tabela 3: Tempo de Detenção Hidráulica (TDH) no reator anaeróbio, reator Anóxico, e todo o sistema nas duas vazões de operação.....	58
Tabela 4: Composição do meio mineral autotrófico.....	61
Tabela 5: Composição das soluções de micronutrientes.....	61
Tabela 6: Ciclos de enriquecimento das bactérias anammox.....	62
Tabela 7: Valores de temperatura ($^{\circ}\text{C}$), pH, OD (mg.L^{-1}), turbidez (NTU), cor e condutividade ($\mu\text{S.cm}^{-1}$) no aquário, reatores anaeróbios e reator aeróbio.....	65
Tabela 8: Relação C/N das concentrações de DQO e NT dos reatores anaeróbios e do reator aeróbio.....	75
Tabela 9: Relação NO_3/NO_2 na saída reatores anaeróbios e reator aeróbio.....	80
Tabela 10: Relação NH_3/NO_3 na saída reatores anaeróbios e reator aeróbio.....	82
Tabela 11: Relação NH_3/NO_2 na saída do aquário e dos reatores anaeróbios.....	83
Tabela 12: Eficiência (%) de remoção de carga (mg.d^{-1}) dos parâmetros de qualidade: DQO, nitrogênio total e amônia durante 270 dias de operação.....	86
Tabela 13: Eficiência (%) de remoção de carga (mg.d^{-1}) dos parâmetros de qualidade: carbono orgânico total, carbono total e sólidos totais durante 270 dias de operação.....	87
Tabela 14: Eficiência (%) de remoção de carga (mg.d^{-1}) dos parâmetros de qualidade de nitrito, nitrato e sólidos suspensos voláteis durante 270 dias de operação.....	88
Tabela 15: Perfil de OD (mg OD.L^{-1}) em diferentes pontos e profundidades dos tanques anaeróbios.....	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Conversões possíveis entre compostos nitrogenados (adaptado de YE e THOMAS, 2001).....	33
Figura 2: Provável rota metabólica da oxidação anaeróbia do íon amônio.....	42
Figura 3: Representação esquemática da estrutura celular de bactérias com atividade anammox.....	47
Figura 4: Esquema da Instalação experimental e pontos de amostragem.....	52
Figura 5: Instalação experimental.....	53
Figura 6: Reator anaeróbio com meio suporte durante inoculação.....	55
Figura 7: Pontos de amostragem para perfil de OD nos tanques anaeróbios.....	59
Figura 8: Sistema de enriquecimento de bactérias anammox.....	60
Figura 9: Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) mostrando a estrutura da comunidade microbiana nas amostras. I1 a R3 – Amostras. M – Marcador molecular 100 bp.....	98
Figura 10: Dendrograma de similaridade do DGGE analisados utilizando o coeficiente de DICE e o algoritmo UPGMA (programa BioNumerics v. 6.6). Os valores em cada nó representam a porcentagem de similaridade e a barra o desvio padrão.....	99
Figura 11: Dendrograma de similaridade dos perfis de bandas das amostras a partir da técnica de DGGE e analisados utilizando o coeficiente de Jaccard e o algoritmo UPGMA (programa BioNumerics v. 6.6). Os valores em cada nó representam a porcentagem de similaridade e a barra o desvio padrão.....	100
Figura 12: Dendrograma de similaridade dos perfis de bandas das amostras obtido a partir da técnica de DGGE e analisados utilizando o coeficiente de correlação de Pearson e o algoritmo UPGMA (programa BioNumerics v. 6.6).....	101

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Taxa de carregamento orgânico ($\text{g DQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$) nos reatores anaeróbios e no reator aeróbio, durante 300.	68
Gráfico 2: Taxa de carregamento de Nitrogênio ($\text{gN} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$) no reator anaeróbio e reator aeróbio, durante 270 dias de operação.	69
Gráfico 3: Taxa de carregamento de carbono total (orgânico e inorgânico) ($\text{gCT} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$) reator anaeróbio e reator aeróbio, durante 270 dias de operação.	70
Gráfico 4: Taxa de carregamento de Amônia ($\text{gNH}_3 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$) no reator anaeróbio e no reator aeróbio, durante 240 dias de operação.	71
Gráfico 5: Taxa de carregamento de Nitrito ($\text{gNO}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$) no reator anaeróbio e no reator aeróbio, durante 270 dias de operação.	72
Gráfico 6: Taxa de carregamento de Nitrato ($\text{gNO}_3 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$) no reator anaeróbio e no reator aeróbio, durante 240 dias de operação.	73
Gráfico 7: Taxa de carregamento de Sólidos Totais ($\text{gST} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$) no reator anaeróbio e no reator aeróbio, durante 240 dias de operação.	73
Gráfico 8: Carga de DQO ($\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$) na caixa de abastecimento, no aquário, nos reatores anaeróbios e após reator aeróbio, e eficiência total de remoção de DQO (%) durante 300 dias de operação.	74
Gráfico 9: Carga de Nitrogênio Total ($\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$) na caixa de abastecimento, no aquário, nos reatores anaeróbios e após o reator aeróbio, e eficiência total de remoção de NT (%) durante 270 dias de operação.	76
Gráfico 10: Carga de Carbono Orgânico Total ($\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$) na caixa de abastecimento, no aquário, nos reatores anaeróbios e após o reator aeróbio, e eficiência total de remoção de COT (%) durante 270 dias de operação.	76
Gráfico 11: Carga de Carbono Total ($\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$) na caixa de abastecimento, aquário, reatores anaeróbios e após reator aeróbio, e eficiência total de remoção de CT (%) em 270 dias de operação.	77
Gráfico 12: Carga de Carbono Inorgânico ($\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$) na caixa de abastecimento, aquário, reator anaeróbio e após reator aeróbio, e eficiência total de remoção de CI (%) em 270 dias de operação.	78
Gráfico 13: Carga de Sólidos Totais ($\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$) na caixa de abastecimento, aquário, reatores anaeróbios e após reator aeróbio, e eficiência total de remoção de ST (%) em 270 dias de operação.	79
Gráfico 14: Carga de Sólidos Suspensos Voláteis ($\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$) na caixa de abastecimento, aquário, reatores anaeróbios e reator aeróbio, e eficiência total de remoção de SSV (%) em 270 dias de operação.	79
Gráfico 15: Carga de Amônia ($\text{mg} \cdot \text{dia}^{-1}$) no aquário, reatores anaeróbios e reator aeróbio, e eficiência total de remoção de NH_3 (%) em 270 dias de operação.	84
Gráfico 16: Carga de Nitrito ($\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$) no aquário, reatores anaeróbios e reator aeróbio, e eficiência total de remoção de NO_2 (%) em 240 dias de operação.	84
Gráfico 17: Carga de Nitrato ($\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$) no aquário, reatores anaeróbios e reator aeróbio, e eficiência total de remoção de NO_3 (%) em 270 dias de operação.	85
Gráfico 18: Comparação entre a remoção de DQO (%) e o aumento de NH_3 (%) no fim do sistema durante 270 dias de operação.	89
Gráfico 19: Concentrações ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) de amônia e nitrito efluente e pH efluente ao longo dos 191 dias e operação do reator.	91
Gráfico 20: Eficiência de remoção (%) de amônia do efluente ao longo dos 191 dias de operação.	92
Gráfico 21: Gêneros de bactérias mais abundantes (%) encontrados na amostra. Apenas os gêneros que apresentaram valores acima de 1% de abundância relativa na amostra foram apresentados no gráfico abaixo.	94
Gráfico 22: Espécies de bactérias mais abundantes (>1%) encontradas na amostra.	97

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	PANORAMA DA PISCICULTURA BRASILEIRA	19
2.2	CARACTERISTICAS DO EFLUENTE DE PISCICULTURA.....	24
2.3	IMPACTO DO EFLUENTE DE PISCICULTURA	26
2.4	TECNICAS USUALMENTE UTILIZADAS PARA REMOÇÃO DE NITROGÊNIO DE EFLUENTES DE PISCICULTURAS.....	29
2.5	CICLO DO NITROGÊNIO	31
2.5.1	Nitrificação.....	33
2.5.2	Destitrificação	37
2.6	PROCESSO ANAMMOX	40
2.7	ENRIQUECIMENTO DAS BACTÉRIAS ANAMMOX.....	43
2.8	MICROBIOLOGIA DAS BACTÉRIAS ANAMMOX E MÉTODOS PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MICROORGANISMOS	46
2.9	PROCESSO CANON	49
3	MATERIAL E MÉTODOS	51
3.1	AQUÁRIO E CULTIVO DOS PEIXES.....	53
3.2	REATORES ANAERÓBIOS DE LEITO FIXO.....	54
3.3	REATOR AERÓBIO	55
3.4	MONITORAMENTO	56
3.5	PERFIL DO OXIGÊNIO DISSOLVIDO NO REATOR ANAERÓBIO	58
3.6	ENRIQUECIMENTO DA CULTURA DE BACTÉRIAS ANAMMOX	59
3.7	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	63
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	65
4.1	EFICIENCIA DO SISTEMA DE REATORES ANAERÓBIO-AERÓBIO EM SÉRIE NO TRATAMENTO DE EFLUENTE DE PISCICULTURA.....	65
4.2	Perfil do Oxigênio Dissolvido nos Reatores Anaeróbios.....	89
4.3	ENRIQUECIMENTO DA CULTURA DE BACTÉRIAS ANAMMOX	90
4.4	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	93
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	103

1 INTRODUÇÃO

A produção de peixes no Brasil é baseada principalmente em regimes de produções intensivos e semi-intensivos e é sustentada principalmente por pequenos produtores. Os regimes semi-intensivos e intensivos incluem a maioria das culturas de peixes em tanques escavados, onde os animais são mantidos e criados durante todo o período de cultivo (OSTRENSKY et al., 2008).

Utilizam-se tanques com elevadas densidades de estocagem de peixes e estes são alimentados com altos níveis de proteína que são parcialmente assimiladas pelos animais. Além disso, o principal produto excretado pelos organismos aquáticos alimentados por proteína é a amônia, contribuindo para o aumento na concentração de nitrogênio nos viveiros de peixes (PEREIRA e MERCANTE, 2005) e a toxicidade por compostos nitrogenados (BOYD, 1989) como amônia, nitrito e nitrato.

A fim de minimizar os impactos dos compostos nitrogenados em tanques de piscicultura o produtor pratica a troca de água constante do tanque sem tratamento do efluente descartado, impactando os corpos hídricos receptores (QUEIROZ e BOEIRA, 2007). De acordo com a Resolução CONAMA (Conselho Nacional de Meio Ambiente) 357/2005 é proibido o lançamento de efluentes domésticos, agropecuários, de aquicultura, industriais e de quaisquer outras fontes poluentes em corpos de água sem o enquadramento de acordo com a Resolução CONAMA 430/2011 que estabelece que a concentrações máximas de lançamento. O CONAMA também determina que as fontes potencial ou efetivamente poluidoras dos recursos hídricos deverão buscar práticas de gestão de efluentes, como a melhoria da qualidade do efluente gerado.

O acelerado crescimento visto nos últimos anos nos permite afirmar que a aquicultura é hoje um setor promissor para o desenvolvimento econômico do Brasil e o investimento em melhorias de produção é essencial para a que o pescado brasileiro seja capaz de competir com o pescado do mercado externo, valorizando e enriquecendo o produtor de peixes no Brasil. Neste sentido, a realização de pesquisas visando à obtenção de ferramentas para uma produção mais eficiente e ambientalmente correta é fundamental para a manutenção da aquicultura e da vida aquática.

A forma convencional de remoção de nitrogênio de águas residuárias de grande vazão é realizada através da nitrificação e desnitrificação. Na primeira etapa a ação das bactérias *Nitrosomonas* é responsável pela oxidação da amônia a nitrito, e na segunda etapa as bactérias *Nitrobacter* são responsáveis pela conversão de nitrito a nitrato. Sendo a nitrificação aeróbia e a desnitrificação um processo anaeróbio (SCHIMIDELL et al., 2007).

Essas reações são amplamente conhecidas e vêm sendo aplicadas com sucesso na maioria dos sistemas modernos de tratamento de águas residuárias (EGLI et al., 2001). Porém esse processo apresenta algumas limitações quando se deseja tratar efluentes contendo altas concentrações de nitrogênio e baixa DBO (baixa relação DBO/nitrogênio), há uma dificuldade de transferência de altas quantidades de oxigênio necessárias à nitrificação e a necessidade de grande quantidade de matéria orgânica biodegradável na etapa da desnitrificação (SOUZA, 2011), o efluente de piscicultura é caracterizado pela alta concentração de DBO e a presença de matéria orgânica e inorgânica, por isso a eficiência do processo pode ser prejudicada e outros processos devem ser pesquisados.

Mulder et al. (1995) observaram em um reator desnitrificante um processo capaz de remover amônia com produção de gás nitrogênio sob condições anaeróbias, o processo foi denominado Anammox (Anaerobic Ammonium Oxidation), já que o mesmo converte amônia diretamente à nitrogênio gasoso sob condições anaeróbias, utilizando o nitrito como acceptor final de elétrons.

O processo anammox pode substituir completamente a etapa de desnitrificação convencional em sistemas de tratamento de águas residuárias e economizar metade dos custos com aeração na fase de nitrificação (JETTEN et al., 1997). Porém o sucesso do processo anammox depende da quantidade de biomassa de bactérias específicas presentes no sistema. Portanto trabalhos que visam obter esta população e possibilitar o desenvolvimento e manutenção dessa biomassa para posterior uso como inóculo em reatores anammox, são extremamente relevantes.

Khin e Annachatre (2004) apresentaram alguns processos inovadores para remoção total ou parcial de nitrogênio: Sistema Combinado SHARON (Single

High Amônia Removal Over Nitrite) ANAMMOX, e CANON (Completely Autotrophic Nitrogen Removal Over Nitrite) com resultados satisfatórios de remoção de nitrogênio.

É possível então desenvolver tecnologias para remoção de nitrogênio e matéria orgânica com sucesso no tratamento de efluentes de pisciculturas. Porém pesquisas são necessárias para o estabelecimento de parâmetros de operação e indicação do processo mais adequado para cada caso já que a atividade de aquicultura é bastante diversificada, seja em variedades de espécies de peixes, seja em densidade de estoque desses animais.

O objetivo principal desta pesquisa foi desenvolver um sistema para tratamento de efluentes de piscicultura combinando reatores anaeróbio e aeróbio em série a fim de aplicar sequencialmente as tecnologias Anammox e CANON. Portanto, espera-se remover carbono orgânico e parte do nitrogênio amoniacal nos reatores anaeróbios de leito fixo e, posteriormente, completar a remoção de amônia por meio do processo CANON em um reator aeróbio com concentrações limitadas de oxigênio dissolvido, inferior a 1mg.L^{-1} .

O estudo desses processos no tratamento de efluentes de piscicultura possibilitará o conhecimento das condições requeridas e das limitações de forma a determinar parâmetros operacionais para obtenção do desempenho máximo de cada processo. Neste trabalho pretende-se monitorar o pH, temperatura, condutividade elétrica, nitrogênio total, nitrogênio amoniacal, nitrito, nitrato, carbono orgânico total, sólidos totais e voláteis, demanda química de oxigênio no tanque de cultivo e no efluente final a fim de determinar a eficiência do processo na redução da carga de nitrogênio total e de matéria orgânica.

Concomitantemente, foi desenvolvida uma cultura microbiana com atividade Anammox, em meio de cultura autotrófico sob condições de temperatura, agitação e anaerobiose controladas. A comunidade microbiana desenvolvida nos filtros anaeróbios até o final do período de operação foi comparada com a comunidade microbiana anammox desenvolvida em reator de batelada sequencial, em escala de laboratório. As duas comunidades microbianas foram obtidas a partir do mesmo inóculo.

Este projeto de pesquisa foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq por meio do Edital Universal 2013, processo 481361/2013-8, intitulado “Desenvolvimento de sistema para tratamento e reuso de efluentes de piscicultura intensiva utilizando sistema combinado de reatores anaeróbio e aeróbios de alta taxa integrados a sistema de hidroponia, com aporte de R\$52.085,00 e vigência de 11/11/2013 a 30/11/2016. As pesquisas realizadas no âmbito deste projeto resultarão na produção de informações sobre o uso sustentável da água na piscicultura com aumento da produtividade nos ambientes rural e urbano. O efluente de tanques de piscicultura tratado em reatores de alta taxa poderá apresentar qualidade satisfatória para recirculação em sistemas de fluxo fechado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PANORAMA DA PISCICULTURA BRASILEIRA

De acordo com a FAO (2015) a produção mundial de pescado apresentou um crescimento extremamente acelerado nas últimas décadas, o consumo mundial de peixe per capita aumentou de uma média de 9,9 kg em 1960 para 19,2 kg em 2012. Este desenvolvimento tem sido impulsionado pelo crescimento populacional, aumento da renda e urbanização e pela forte expansão da produção de peixes e distribuição mais eficiente (VICENTE et al., 2014). A aquicultura é responsável pela produção de 66,6 milhões de toneladas de peixe ao ano, a China tem sido responsável por 88% desta produção (FAO, 2015).

O Brasil possui um grande potencial aquícola devido a sua grande área territorial e uma extensa bacia hidrográfica, apesar disso a produção de peixes no país ainda é pequena. De acordo com o extinto Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA, 2014) no país mais de 415 mil toneladas de pescado são provenientes da aquicultura, deste volume cerca de 80% são oriundas de pisciculturas, mostrando ser esta a principal atividade aquícola do país. Na piscicultura a produção de peixes é essencialmente em tanques escavados, já a aquicultura abrange tanques escavados, tanque rede em represas, pesca e produção de mariscos e camarões. A piscicultura brasileira representa um PIB (Produto Interno Bruto) de

R\$5 bilhões e mobiliza mais de 800 mil profissionais, proporcionando 3,5 milhões de empregos diretos e indiretos, consolidando-se como um setor de grande importância econômica (MPA, 2014).

Vicente et al (2014), ao estudarem as perspectivas da produção de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil afirmaram que por ser uma importante fonte de proteína as tilápias são uma das espécies de peixes mais cultivadas em todo mundo. A tilápia do Nilo apresenta um grande potencial devido á sua fácil reprodução, carne branca e alta qualidade, baixos custos de produção podendo inclusive, ser cultivada em locais com alta salinidade e baixas temperaturas. No Brasil as tilápias são cultivadas em represas, pesque-pague e pisciculturas. O crescente consumo de proteína animal vinda da aquicultura aumentou a necessidade de informações acuradas sobre a identificação e controle de situações adversas no ambiente de produção a fim de assegurar a qualidade dos peixes e a preservação do meio aquático.

Ao escrever sobre a qualidade da água na piscicultura Kubitzza (1998) afirmou que a produtividade do pescado está inteiramente ligada ao habitat que o animal cresce, os ecossistemas aquáticos são complexos e dinâmicos, influenciados por um conjunto de condições aquícolas. A boa qualidade da água, alimentação e técnicas de criação melhoram o desenvolvimento e a qualidade dos peixes, prevenindo doenças, aumentando a produção e o lucro da piscicultura e, conseqüentemente, diminuindo o impacto negativo sobre o meio aquático (AYROZA et al., 2011).

De acordo com Tavares (1994), que estudou a limnologia aplicada à aquicultura, os processos que ocorrem na água estão intimamente ligados, não podendo ser vistos como processos independentes, uma vez que na água seus efeitos atuam dinamicamente. A introdução de qualquer substancia na água acarreta alterações na sua qualidade, as quais nem sempre são favoráveis ao desenvolvimento e sobrevivência dos organismos aquáticos. Como é o caso da alimentação que não é aproveitada pelo peixe, assim como as fezes, que se decompõe por ação biológica, resultando no consumo de oxigênio e liberação de nutrientes na água (KUBITZA, 1998).

O fósforo e o nitrogênio são nutrientes essenciais para o metabolismo dos peixes. O fósforo tem papel importante no armazenamento de energia e na estruturação da membrana celular; já o nitrogênio é responsável pela formação de proteínas (AYROZA et al., 2011). Entretanto, fornecidos pela ração uma parcela destes nutrientes, cerca de 75% da matéria seca da ração é consumida e transformada em proteína animal, mas 20 a 25% dos nutrientes ingeridos não são metabolizados pelos organismos dos peixes e são excretados pelas fezes, caracterizando um efluente de alta carga orgânica (MACEDO e SIPAÚBA-TAVARES, 2010; BOCK et al., 2006).

Altas taxas de fósforo e nitrogênio promovem o crescimento excessivo de espécies fitoplanctônicas e a população microbiana responsável pela degradação da matéria orgânica e algas aumentam exponencialmente e, portanto, a demanda de oxigênio necessária para essa degradação sofre um aumento substancial (BASSIN, 2011). Por consequência o oxigênio dissolvido presente na água é consumido para a degradação desses nutrientes, podendo causar mortandade de peixes e outros organismos aquáticos por asfixia, inadequação do uso das águas e aumento do custo de tratamento, esse processo é chamado de eutrofização e é um dos problemas mais graves dos ecossistemas aquáticos.

Em tanques de criação de peixes, a proliferação excessiva do fitoplâncton pode causar diminuição de oxigênio à noite e supersaturação durante o dia, podendo ainda ocorrer obstrução das guelras dos peixes pelos filamentos e inibição do crescimento das algas mais assimiláveis, além do aparecimento de produtos do metabolismo secundário de cianobactérias, que causam sabor desagradável na carne do peixe (MACEDO, 2004).

Para minimizar a probabilidade de eutrofização nas águas de cultivo de peixes é feito constantemente ou de maneira intermitente a renovação de água do viveiro. Com o uso da renovação constante da água é possível aumentar a densidade de estocagem de peixes na água de 4 á 12 t/ha para 10 á 30 t/ha (RODRIGUES, 2013). A renovação de água do sistema de produção diminui a concentração de resíduos provenientes da ração e do metabolismo dos peixes no sistema de produção, entretanto é gerado um efluente com altas concentrações

de sólidos orgânicos em suspensão, dióxido de carbono, DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio), DQO (Demanda Química de Oxigênio), nitrogênio e fósforo, provenientes da ração e excretas dos peixes, proporcionando um considerável aporte de matéria orgânica e inorgânica aos ecossistemas aquáticos (HUSSAR e BASTOS, 2008).

A aquicultura pode ser implementada em vários níveis de produção, sendo que as características dos efluentes dependem basicamente, da qualidade da água de abastecimento, da qualidade e da quantidade dos alimentos fornecidos, do tempo de residência do efluente dentro dos sistemas de criação, das espécies criadas, da densidade de estocagem e da biomassa dos organismos (HENRY-SILVA E CAMARGO, 2008). Em sistemas extensivos de criação, a característica do efluente gerado tende a ser semelhante da água captada para abastecimento de tanques e viveiros, especialmente quando o tempo de retenção da água é longo. Entretanto, conforme a produção de organismos aquáticos aumenta, a tendência é que os impactos negativos sobre o ambiente também se intensifiquem. Segundo a Resolução CONAMA 001, de 23 de janeiro de 1986 existe a obrigatoriedade de elaboração de estudo de impacto ambiental (EIA) e do relatório de impacto ambiental (RIMA) para as atividades modificadoras do meio ambiente, como a aquicultura.

Esses instrumentos são necessários também para o licenciamento ambiental que o Estado de São Paulo, pelo Decreto Estadual 60.582 de 27 de junho de 2014 (complementa e altera a resolução CONAMA 413/2009), obriga os estabelecimentos de produção aquícola a buscar a licença ambiental. O licenciamento ambiental dos produtores é importante para a regularização do negócio, com a licença é possível acessar crédito rural, incentivos, isenções fiscais e participar de programas de aquisição de alimentos do governo, além de evitar problemas com a fiscalização ambiental, como advertências, multas e suspensão de operação. Além de colaborar com a responsabilidade ambiental dos ambientes utilizados para a prática da produção de peixes, atendendo uma visão sustentável da produção.

No mesmo enfoque, a Resolução 430 de 13 de maio de 2011 no Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) dispõe sobre as condições e

padrões de lançamento de efluentes e ainda complementa e altera a Resolução 357/2005. Os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados diretamente no corpo receptor desde que obedecem as condições e padrões previstos nesta resolução. O padrão de lançamento de DBO (DBO 5 dias a 20°C) prevê redução mínima de 60% de DBO no quinto dia de análise, e para nitrogênio amoniacal total o padrão de lançamento máximo é de 20mg.L⁻¹. Os estabelecimentos que não obedecem esses padrões de lançamento estão sujeitos a multa.

Apesar do efluente de piscicultura apresentar grandes volumes com baixos teores de nutrientes quando comparado com efluentes de origem doméstica, seu lançamento direto e contínuo nos ambientes aquáticos pode resultar em uma bioacumulação crônica e eutrofização com consequências negativas sobre o meio ambiente (GOULART e CASTILHO, 2003).

Além disso, Gazzola (2013) ao estudar o efeito da amônia e do oxigênio dissolvido na sobrevivência de alevinos de Dourado (*Salminus brasiliensis*); afirma que os compostos nitrogenados tem sido identificados como o maior produto metabólico em piscicultura, sendo a amônia o principal produto final do catabolismo proteico e da grande maioria dos organismos aquáticos. A amônia pode alcançar níveis iguais ou superiores a 80% do total de nitrogênio excretado pela maioria dos peixes podendo, portanto, acumular-se nos tanques de cultivo devido á esta excreção e/ou devido á mineralização de substancias orgânicas por bactérias heterotróficas (WOOD, 1993; SPOTTE, 1970).

Segundo Arana (1997), que estudou os princípios químicos de qualidade da água em aquicultura, principalmente para peixes e camarões, o aumento da concentração de amônia no meio externo dificulta a excreção da mesma pelos organismos, provocando um aumento no nível de amônia no sangue e nos tecidos que, além de afetar seriamente a fisiologia dos animais, pode provocar redução ou paralisação da atividade alimentar afim de reduzir a amônia metabólica.

Wood (2001) descreveu as respostas toxicológicas das brânquias dos peixes e encontrou que concentrações subletais de amônia reduzem o crescimento porque podem causar modificações fisiológicas e histológicas nos

rins, baço, tecidos tireoides e sangue, além de bloquear o processo de fosforilação oxidativa ao nível celular, causando incapacidade de converter a energia alimentar em ATP.

Esses efeitos aliados reduzem a produtividade do sistema, considerando ainda que os animais submetidos aos efeitos citados tornam-se mais susceptíveis a contrair enfermidades. A amônia, em pisciculturas intensivas, pode alcançar níveis que, além de redução no crescimento, pode causar mortalidade dos peixes.

Segundo Hussar e Bastos (2008) apesar do efluente de piscicultura apresentar grande volume com baixo teor de nutrientes quando comparado com os efluentes de origem doméstica, seu lançamento direto e contínuo nos ambientes límnicos pode resultar em uma bioacumulação crônica e eutrofização com consequências ecológicas negativas sobre o meio ambiente aquático. Atividades como a piscicultura promovem uma expressiva queda da qualidade da água e perda de biodiversidade aquática em função da desestruturação do ambiente físico, químico e alteração da dinâmica natural das comunidades biológicas.

Visando amenizar os impactos ambientais é que se buscam cada vez mais alternativas mitigadoras onde se deve levar em consideração o custo e a disponibilidade e ainda assim atendendo todas as legislações ambientais. Neste sentido, é necessário um tratamento prévio desta água de descarte.

2.2 CARACTERÍSTICAS DO EFLUENTE DE PISCICULTURA

Vários autores descreveram as características do efluente de piscicultura nos últimos anos, segue abaixo uma tabela com as principais características dos efluentes analisados.

Tabela 1: Características do efluente de piscicultura de acordo com os autores citados nos parâmetros de turbidez (NTU), DQO (mg.L^{-1}), nitrogênio total (mg.L^{-1}), nitrito (mg.L^{-1}), nitrato (mg.L^{-1}) e nitrogênio amoniacal (mg.L^{-1}).

Referência	Espécie cultivada	Tipo	Turbidez NTU	DQO mg.L^{-1}	Nitrogênio Total mg.L^{-1}	Nitrito mg.L^{-1}	Nitrato mg.L^{-1}	Nitrogênio Amoniacal mg.L^{-1}
Henry-Silva e Camargo (2006)	Tilápia do Nilo	Caixas d'água	26±12	-	0,34±0,06	9,1±2,3	48,7±22,8	10,3±4,7
Hussar e Bastos (2008)	Tilápia rendalli	Caixa de alvenaria	36±28	85,6±37,4	8,9±6,6	-	0,47±0,26	0,71±0,46
Mercante et al. (2007)	Tilápia do Nilo	Viveiro escavado	90±0	-	0,51±0,05	7,5±1,56	0,12±0,01	0,37±0,04
Mingui et al. (2011)	Cultivo múltiplo	Lago natural	-	68,1±1,9	2,89±0,15	-	-	0,53±0,17
Mohedano (2004)	Tilápia do Nilo	Caixas d'água	414	421,74	-	0,01	0,24	2,69
Moraes (2002)	Pregado	Caixas de concreto, água salina	-	-	-	0,31±0,17	1,49±1,49	1,07±0,69
Rosa et al. (2013)	Tilápia do Nilo, Carpa capim e pacu.	Viveiro escavado.	-	-	-	-	0,24 0,230 0,006	0,19 0,061 0,471
Zamboni et al. (1997)	Cultivo múltiplo	Viveiro escavado	7,1	-	-	-	-	74,8

2.3 IMPACTO DO EFLUENTE DE PISCICULTURA

O aumento das concentrações de nitrogênio e fósforo na massa líquida e o acúmulo de matéria orgânica nos sedimentos são os principais impactos que a atividade aquícola pode causar nos ecossistemas aquáticos (MIRES, 1995; BARDACH, 1997; MIDLEN E REDDING, 1998).

A disponibilidade de nutrientes tende a favorecer o aumento da comunidade fitoplanctônica, alterando o estado do oxigênio dissolvido no ambiente aquático. Durante o dia a atividade fotossintética do fitoplâncton proporciona um aumento de oxigênio, que ao ultrapassar o equilíbrio de saturação pode ocasionar embolia gasosa nos organismos aquáticos. Por outro lado, durante a noite e no início da manhã a excessiva respiração do fitoplâncton pode ocasionar o consumo por completo do oxigênio dissolvido e, conseqüentemente, a morte da maioria dos organismos heterotróficos.

O nitrogênio dos efluentes das atividades de aqüicultura provém principalmente da proteína das rações, sendo que parte é excretada pelos organismos na forma de amônia, enquanto o restante é eliminado pelas fezes na forma de nitrogênio orgânico. Estimativas indicaram que as taxas de excreção de nutrientes por peixes mantidos por uma dieta com 35-40% de proteína e, com conversão alimentar de 1:1,5 são de aproximadamente 0,025 kg de nitrogênio e 0,033 kg de fósforo/kg de biomassa produzida (COCHAVA et al., 1990).

Baccarin (2002), avaliando o impacto ambiental da produção de tilápia do Nilo sob diferentes manejos alimentares, verificou que com o incremento da biomassa dos peixes ocorreu uma redução gradativa dos teores de oxigênio dissolvido e o aumento dos valores de turbidez e de material em suspensão do efluente, independente da dieta fornecida. Este fato foi associado ao aumento do arraçoamento, ao aumento dos dejetos e à decomposição da matéria orgânica. Henry-Silva (2001) também observou que o aumento do fornecimento de ração associado ao crescimento dos peixes incrementou as concentrações de nutrientes no efluente gerado.

Persson (1991), ao analisar o impacto da implantação de tanques-redes com truta arco-íris em um lago da Suécia, constatou que os efluentes e os resíduos originários desta atividade proporcionaram uma considerável

degradação do ambiente aquático, tornando o hipolímnio anóxico em decorrência da decomposição da matéria orgânica. A agravante é que sob estas condições o fosfato, antes imobilizado nos sedimentos em função da barreira proporcionada pela camada oxidada, tornou-se disponível na coluna d'água, aumentando a produção primária do fitoplâncton.

Camargo (1992), avaliando o impacto de efluentes de fazendas de criação de trutas sobre o rio Tajuña (Espanha), constatou que os efeitos foram significativos sobre a qualidade da água do rio, visto que a um km do lançamento dos efluentes os valores de nutrientes ainda eram elevados. Este autor também observou alterações nas comunidades de invertebrados bentônicos. Nos pontos a jusante do lançamento de efluentes, as espécies adaptadas a ambientes com concentrações altas de oxigênio dissolvido e taxas de sedimentação baixas praticamente desapareceram, sendo substituídas por espécies, especialmente de *quironomídeos* que são adaptadas a ambientes com teores de oxigênio baixos e com taxas elevadas de sedimentação.

Loch et al. (1996), investigando o efeito dos efluentes de viveiros de criação de truta (*Oncorhynchus mykiss*) sobre a riqueza de macroinvertebrados bentônicos, também verificaram uma diminuição da diversidade de espécies de *efemerópteros*, *plecópteros* e *trichópteros* nos rios onde os efluentes eram despejados. Menezes e Beyruth (2003), analisando os impactos de tanques-rede com tilápia do Nilo sobre a comunidade bentônica da represa de Guarapiranga (SP), observaram maiores porcentagens de *Oligochaetas* no sedimento a baixo dos tanques-rede, provavelmente em decorrência do aumento dos teores de matéria orgânica e de nutrientes provenientes dos excretas dos peixes.

Tovar et al. (2000), investigando os impactos da aquicultura intensiva sobre um ecossistema lótico na Espanha, observaram que três pisciculturas com uma produção total de 1000 toneladas/ano de *Sparus aurata* utilizavam diariamente cerca de 240.000 m³ de água do rio San Pedro e lançavam um volume semelhante de efluentes neste ambiente aquático. Os autores constataram um padrão para as concentrações de nutrientes e de sólidos em suspensão ao longo do rio. No trecho inferior, a jusante das pisciculturas e próximo do estuário, os teores de nitrogênio, fósforo e matéria orgânica foram

menores, provavelmente em decorrência dos processos de autodepuração e pela diluição causada pela entrada de água do mar. Já no trecho superior, onde eram desenvolvidas as atividades de aquicultura, os teores destas variáveis foram maiores, especialmente em decorrência do despejo de efluentes dos viveiros de criação de peixes.

Pistori (2005) verificou maior produção primária da macrófita aquática flutuante *Salvinia molesta* em uma represa impactada pelo lançamento de efluentes de aquicultura quando comparadas com as taxas de crescimento desta mesma espécie em uma represa não impactada. Boaventura et al. (1997) observaram que os efeitos dos efluentes de fazendas de criação de truta arco íris foram notados 12 km a jusante do ponto de seu lançamento, acarretando no aumento do número de bactérias.

Macedo (2004) constatou maiores densidades de coliformes fecais em um ambiente aquático que recebia fluxo intenso de efluentes de aquicultura, sugerindo a necessidade do tratamento desses efluentes antes do lançamento no corpo d'água receptor. Na bacia hidrográfica do rio Ribeira de Iguape (SP) observou-se que as pisciculturas intensivas e semi-intensivas são as mais eutrofizadas, causando alterações nas características físicas e químicas dos ecossistemas lóticos em que seus efluentes são lançados (CASTELLANI e BARRELA, 2006).

Em ambientes aquáticos da Tailândia foram constatados problemas relacionados à grande quantidade de nutrientes e de matéria orgânica, produzidos pelas atividades de carcinicultura. A descarga destes poluentes gerou problemas não somente aos ecossistemas estuarinos, mas também afetou a produtividade das próprias fazendas de criação de camarão (CHUA et al., 1989). Estima-se que anualmente as carciniculturas da região de Bangucoque despejem aproximadamente 1500 t de nitrogênio e 146 t de fósforo nos ecossistemas estuarinos, proporcionando crescimento excessivo de algas, morte de organismos coralíneos e alterações nas comunidades de áreas alagáveis (CHUA et al., 1989; HOPKINS et al., 1995).

2.4 TÉCNICAS USUALMENTE UTILIZADAS PARA REMOÇÃO DE NITROGÊNIO DE EFLUENTES DE PISCICULTURAS

Zamboni Filho et al. (1997) estudaram a deterioração da qualidade da água causada pela piscicultura, bem como a capacidade de melhoria desse efluente através de um sistema biológico de tratamento durante dois anos e três meses de operação. Todo efluente dos tanques de cultivo eram drenados, por gravidade, até um lago de aprisionamento de peixes que também foi observada a retenção de nutrientes, como uma lagoa de estabilização. Os autores concluíram que a piscicultura acarreta um efluente eutrofizado, porém a lagoa de tratamento melhorou a qualidade da água, apresentando parâmetros semelhantes ao afluente (ZAMBONI FILHO et al., 1997).

Hussar e Bastos (2008) analisaram a utilização de macrófitas aquáticas flutuantes no tratamento do efluente de piscicultura e observaram uma remoção média de 77% para DQO, 76% de nitrogênio, 79% de nitrato, 82% de amônia, 95% de fósforo e 92% de turbidez, níveis satisfatórios de remoção de acordo com os autores. Minghui et al. (2011) também propôs a construção de wetlands para tratamento de resíduo de piscicultura que era descartado no lago Poyang, China, e obteve níveis satisfatórios de remoção de DBO, DQO, nitrogênio total e sólidos. Seus autores apoiam o uso de wetlands por ser de fácil construção e manutenção, baixo custo e elevada eficiência de remoção, porém essa técnica é adequada apenas para pisciculturas de pequeno e médio porte.

Gendel e Lahav (2013) pesquisaram sobre um novo processo físico-químico de remoção de amônia em sistemas de recirculação de água para aquicultura de água doce. O método baseia-se na separação da amônia da água de cultivo através de uma resina de troca iônica, a qual é regenerada por absorção química e oxidação eletroquímica indireta da amônia. Não é necessário período de partida do reator e os peixes são cultivados em concentrações de bactérias muito mais baixas que em reatores anaeróbios, tornando o potencial para doenças menor. O sistema foi operado com sucesso com troca parcial da água e custo menor que o esperado.

Sanchez e Matsumoto (2011) monitoraram o desempenho de remoção de nitrogênio amoniacal no tratamento de águas residuárias da produção

intensiva de tilápia do Nilo em sistema com recirculação de água. O sistema foi constituído por um sedimentador convencional e um reator aeróbio de leito fluidizado trifásico e carvão ativado como meio suporte. A eficiência média de remoção do nitrogênio amoniacal total foi de 41.2%. O sistema avaliado foi considerado uma alternativa efetiva para o reuso da água em sistemas de recirculação para aqüicultura.

Henry-Silva e Camargo (2006) analisaram a eficiência de três espécies de macrófitas aquáticas no tratamento de efluentes de viveiro de tilápia do Nilo e encontraram remoção média de 82,6% de fósforo total e 45% de nitrogênio total e concluíram que o tratamento foi eficiente na remoção desses compostos.

A forma convencional de remoção de nitrogênio de águas residuárias de grande vazão é realizada em duas etapas distintas. Na primeira, realizada em condição aeróbia, ocorre a oxidação da amônia a nitrato, designando-se esta etapa de nitrificação. Este processo é realizado pela ação das bactérias *Nitrosomonas*, responsáveis pela oxidação da amônia a nitrito, e *Nitrobacter*, responsáveis pela conversão de nitrito a nitrato. Numa segunda etapa, a desnitrificação, é realizada na ausência ou na presença de baixas concentrações de oxigênio dissolvido. Nessas condições anóxicas, o íon nitrato recebe elétrons, oriundos de um doador, por exemplo, material orgânico e é reduzido a nitrogênio gasoso. Vários gêneros de bactérias são responsáveis por esse processo, tendo as substâncias gasosas óxido nítrico e óxido nitroso como possíveis intermediários, igualmente lançados na atmosfera, porém em quantidades normalmente muito baixas (SCHIMIDELL et al., 2007).

Essas reações são amplamente conhecidas e vêm sendo aplicadas com sucesso na maioria dos sistemas modernos de tratamento de águas residuárias (EGLI et al., 2001). Porém esse processo apresenta algumas limitações quando se deseja tratar efluentes contendo altas concentrações de nitrogênio e baixa DBO (baixa relação DBO/nitrogênio), há uma dificuldade de transferência de altas quantidades de oxigênio necessárias à nitrificação e a necessidade de grande quantidade de matéria orgânica biodegradável na etapa da desnitrificação (SOUZA, 2011), o efluente de piscicultura é caracterizado pela alta concentração de DBO e a presença de matéria orgânica e inorgânica, por

isso a eficiência do processo pode ser prejudicada e outros processos devem ser pesquisados.

Além disso, o ganho energético de cada tipo de microrganismo é diferente, por exemplo, 287 kJ/mol de amônia das *Nitrosomonas* e 76 kJ/mol de nitrito das *Nitrobacter*, considerando que a produção de novas células é proporcional a energia liberada, pode-se concluir que haverá uma maior quantidade de *Nitrosomonas* formadas do que de *Nitrobacter*. Por serem autótrofas e oxidarem compostos inorgânicos para obtenção de energia essas bactérias caracterizam-se de crescimento muito lento, que traz consequências às velocidades das reações e transformações (SCHIMIDELL et al., 2007).

Outras limitações do processo convencional são relevantes, como o pH e a temperatura. Na nitrificação há liberação de H^+ e conseqüentemente aumento da acidez do meio, o que pode limitar a velocidade do processo, já na desnitrificação há liberação de OH^- e aumento da alcalinidade do meio, inibindo o crescimento microbiano. Os organismos são sensíveis a variações na temperatura do meio, ela pode afetar a velocidade de remoção do nitrato e o crescimento microbiano (TEIXEIRA, 2006).

2.5 CICLO DO NITROGÊNIO

O ciclo do nitrogênio, também chamado de “ciclo do azoto”, é um dos ciclos mais importantes nos ecossistemas do planeta. O nitrogênio é um elemento essencial para todo tipo de vida, integrando moléculas complexas como ácidos nucleicos, aminoácidos e proteínas (ABREU, 2013).

O nitrogênio global, em sua maior parte, existe sob a forma gasosa (N_2), não estando disponível prontamente na biota terrestre. Qualquer processo que resulte na transformação do N_2 da atmosfera em outros compostos de nitrogênio é denominado de fixação de nitrogênio. Um grande número de bactérias pode converter o nitrogênio gasoso a amônia (NH_3) ou íons amônio (NH_4^+) por meio de redução catalisada por enzimas, em processo conhecido como fixação biológica de nitrogênio que representa 90% de toda a fixação de origem natural.

Para o ecossistema terrestre, na ausência de fertilizantes, a fixação biológica de N_2 pela bactéria chamada *Rhizobium* é a fonte mais importante de

nitrogênio para organismos vivos. Esta bactéria vive em nódulos ou raízes de leguminosas e representa um exemplo interessante de simbiose, onde há benefícios para ambas as espécies: a leguminosa fornece local e alimento (açúcar) para a bactéria e, por outro lado, recebe o nitrogênio em forma assimilável. Em ecossistemas aquáticos o ciclo do nitrogênio é similar, sendo as cianobactérias os microorganismos mais importantes na fixação de nitrogênio.

Adicionalmente, o nitrogênio gasoso pode ser convertido em amônia e espécies oxidadas, por meio de reação provocada por descargas de relâmpagos, em processo chamado de fixação atmosférica de nitrogênio.

Atividades antrópicas, como por exemplo, a produção de amônia ou ácido nítrico, também contribui para a fixação de nitrogênio em processo denominado de fixação industrial de nitrogênio.

No meio ambiente, o nitrogênio encontra-se mais frequentemente na forma de nitrogênio orgânico, amônia (NH_3), amônio (NH_4^+), nitrato (NO_3^-) ou nitrogênio gasoso (N_2). Em relação ao equilíbrio amônia - amônio ($\text{NH}_4^+ \leftrightarrow \text{NH}_3 + \text{H}^+$), valores ácidos de pH contribuem para o aumento da concentração de H^+ , fazendo com que o equilíbrio seja deslocado para a esquerda, havendo desta forma predominância do íon amônio. Em contrapartida, em valores alcalinos de pH, a concentração de H^+ é diminuída, sendo a amônia predominante deste caso.

As substâncias orgânicas nitrogenadas podem ser degradadas por bactérias decompositoras da matéria orgânica gerando amônia (amonificação), enquanto que o nitrogênio gasoso presente na atmosfera pode ser convertido em amônia através da atuação das bactérias fixadoras de nitrogênio (HENZE et al., 1997, MADIGAN et al., 1997).

A figura XYW representa as transformações dos compostos nitrogenados no ciclo do nitrogênio, as quais resultam do metabolismo nos processos de fixação, nitrificação, desnitrificação, oxidação anaeróbia de amônio via nitrito e redução desassimilatória e assimilatória do nitrato (YE e THOMAS, 2001).

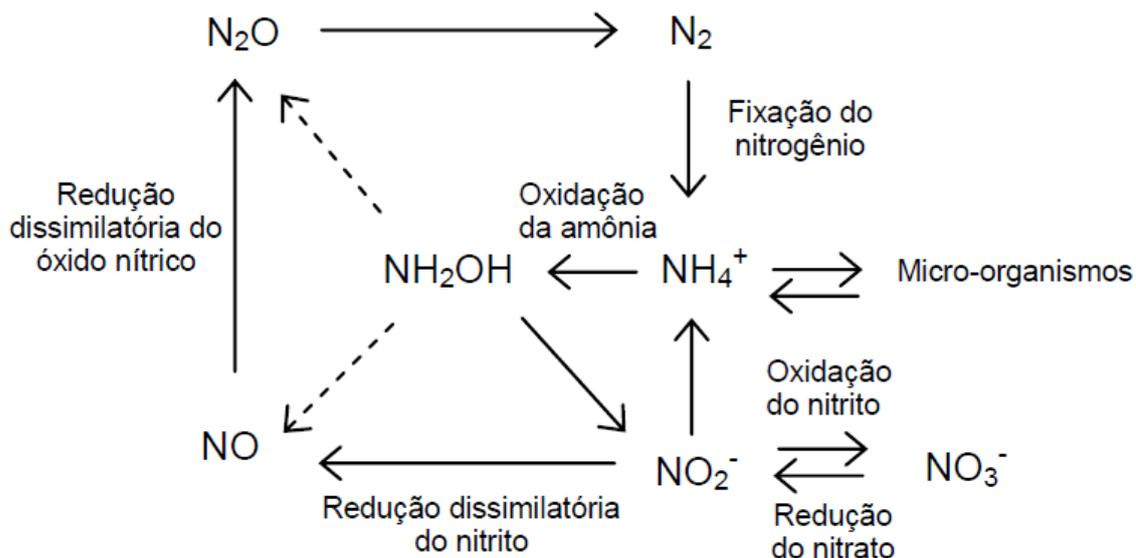


Figura 1: Conversões possíveis entre compostos nitrogenados (adaptado de YE e THOMAS, 2001).

Tradicionalmente, a eliminação de nitrogênio de uma água residuária é realizada por um processo que envolve duas etapas distintas. Na primeira etapa, designada por nitrificação, o amônio passa a nitrato em condições aeróbias, tendo o oxigênio como acceptor de elétrons na cadeia respiratória, permitindo a reoxidação das coenzimas e a geração de ATP. Na segunda etapa, designada por desnitrificação, o nitrato é convertido a nitrogênio gasoso, tendo como possíveis intermediários gasosos o óxido nítrico (NO) e óxido nitroso (N₂O), igualmente lançados na atmosfera. A desnitrificação é realizada em condições anóxicas, tendo o nitrato como acceptor de elétrons (MADIGAN et al., 1997, UEMOTO e SAIKI, 2000).

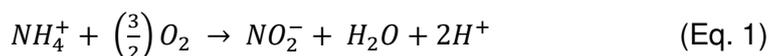
2.5.1 Nitrificação

A nitrificação é entendida como a etapa limitante do processo convencional de remoção de nitrogênio, consistindo também na etapa mais estudada e para a qual se encontra a maior abundância de informações, além de ser de vital importância para os novos processos de tratamento (BASSIN, 2012).

O processo nitrificante é realizado pela ação de dois grupos de bactérias. O primeiro grupo é responsável pela nitritação, isto é, a oxidação da amônia a nitrito, tendo a hidroxilamina (NH₂OH) como composto intermediário. Já

o segundo grupo promove a conversão do nitrito em nitrato, etapa designada por nitratação (RAMALHO, 1983; METCALF e EDDY, 1991). As etapas do processo nitrificante estão descritas nas equações 1 a 3 (HENZE et al., 1997, MADIGAN et al., 1997).

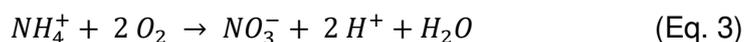
1. Geração de nitrito



2. Geração de nitrato



3. Reação global

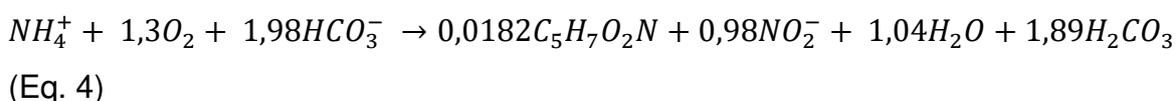


Pela estequiometria das reações (1) e (2), pode-se observar que a massa de oxigênio necessária para completar essas reações é de 4,57 gO₂/gN oxidado, sendo 3,43 g de oxigênio necessárias para a oxidação do nitrogênio amoniacal e 1,14 g requerida para a oxidação do nitrito.

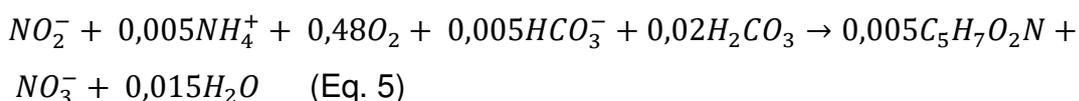
As bactérias nitrificantes apresentam crescimento lento, o que pode trazer complicações na operação dos sistemas biológicos de tratamento, contribuindo para o aumento da sensibilidade do processo e, conseqüentemente, da suscetibilidade à inibição química (SORIA e CHAVARRIA, 1978, HÄNEL, 1988). Em virtude de seu crescimento ser bastante reduzido, tempos de retenção celular relativamente elevados são necessários para que as bactérias nitrificantes sejam mantidas no interior do reator.

As reações estequiométricas da oxidação de amônio e nitrito, levando-se em consideração o seu crescimento (catabolismo e anabolismo) estão descritas nas Equações 4 e 5, respectivamente (WIESMANN e LIBRA, 1999).

Oxidação de amônio:



Oxidação de nitrito:



Como mostrado na equação 5, dois moles de alcalinidade são consumidos por mol de amônio oxidado. O tampão carbonato neutraliza a produção de prótons durante a oxidação de amônio por meio do stripping de CO₂. Caso a quantidade de tampão necessária não esteja disponível na água residuária ou não for externamente fornecida, o pH do sistema diminui e a taxa de oxidação de amônio diminuiu drasticamente. A quantidade de células produzidas por mol de composto nitrogenado oxidado é maior para a oxidação de amônio em comparação com a oxidação de nitrito.

As mais conhecidas bactérias oxidadoras de amônia encontradas em sistemas de tratamento de esgoto pertencem aos gêneros *Nitrosomonas* e *Nitrospira*. Na nitrificação, podem estar envolvidos outros gêneros como *Nitrosococcus*, *Nitrosovíbrio* e *Nitrosolobus*. Por sua vez, as principais bactérias oxidadoras de nitrito fazem parte do gênero *Nitrobacter* e *Nitrospira* (CABEZAS et al., 2004), embora outros gêneros tais como *Nitrocystis*, *Nitrococcus* e *Nitrospina* sejam reportados (SEDLAK, 1991, RITTMANN e McCARTY, 2001).

As bactérias atuantes no processo nitrificante são autotróficas, isto é, utilizam carbono inorgânico (CO₂) para a síntese celular. Desta forma, independem de compostos orgânicos como fontes de carbono. São igualmente denominadas quimiolitotróficas, indicando que utilizam substrato inorgânico (NH₄⁺, NH₃) como fonte de elétrons, ou seja, de energia. As bactérias nitrificantes são aeróbias, caracterizando-se assim pelo uso de oxigênio como acceptor final de elétrons (METCALF e EDDY, 1991, RITTMANN e McCARTY, 2001).

Diversos são os fatores responsáveis por afetar a eficiência da nitrificação, como: pH, temperatura, oxigênio dissolvido (OD) e presença de compostos inibidores. O pH ideal está em torno de 7,0 enquanto que a temperatura mais favorável para o processo nitrificante se encontra dentro da faixa de 30 - 35°C (HENZE et al., 1997; METCALF e EDDY, 2003). Em geral,

concentrações de OD maiores que 2 mgO₂/L são recomendadas (SURAMPALLI et al., 1997; HENZE et al., 1997). Em sistemas com biofilme, o nível de OD requerido pode ser maior em virtude da resistência á transferência de massa no sistema. Devido á menor afinidade pelo oxigênio apresentada pelas bactérias oxidadoras de nitrito, a oxidação desse composto é mais sensível em baixas concentrações de OD em comparação com a oxidação de amônio. Portanto, é comum ocorrer acúmulo de nitrito em condições de limitação de oxigênio (CAMPOS et al., 2007).

As concentrações de amônio e nitrito, substratos das bactérias nitrificantes, exercem efeito direto na taxa de nitrificação. Caso as concentrações sejam muitas baixas, poderá ocorrer limitação de substrato. Em contrapartida, altas concentrações de amônia e nitrito e especialmente suas formas não-ionizadas (amônia livre e ácido nitroso, respectivamente) podem inibir o processo de nitrificação (ANTHONISEN et al., 1976).

A relação carbono orgânico/nitrogênio representa um dos fatores críticos dos sistemas de nitrificação. Maiores taxas de nitrificação são obtidas quando há limitação da concentração de matéria carbonácea. Altas concentrações de matéria orgânica proporcionam condições favoráveis ao desenvolvimento de micro-organismos heterotróficos que competem com os autotróficos nitrificantes pelo oxigênio e nutrientes (FIGUEROA e SILVERSTEIN, 1992). Para agravar o problema, a reação de nitrificação é muito mais lenta e mais sensível e perturbadores externos em comparação com a oxidação de matéria orgânica promovida pelos micro-organismos heterotróficos (BASSIN, 2012).

Como todo processo biológico, a nitrificação também é sensível á presença de compostos tóxicos. Muitos compostos inibidores estão presentes nas águas residuárias, principalmente naquelas advindas de indústrias químicas, as quais empregam uma infinidade de substâncias em seus processos. Uma ampla faixa de compostos orgânicos e metais pesados se enquadra nessa categoria (JULIASTUTI et al., 2003). Fatores como pH, concentração do inibidor, espécies presentes, concentração de sólidos suspensos, idade do lodo, solubilidade do inibidor e a concentração de outros cátions e moléculas presentes, influenciam o

grau de inibição. Segundo Bassin (2012), o fato das bactérias responsáveis pela nitrificação serem restritas a poucos gêneros, associado ao seu lento crescimento celular, tornam esse processo mais suscetível à inibição.

O efeito salino é outro capaz de alterar significativamente o desempenho dos micro-organismos, ocasionando problemas aos processos biológicos. A salinidade é conhecida por afetar a atividade metabólica das bactérias, reduzindo o crescimento microbiano (DALMACIJA et al., 1996). A velocidade de crescimento de bactérias não-halofílicas é reduzida com o incremento da concentração de sal no meio devido ao fato de que parte do substrato consumido é gasto na síntese de solutos compatíveis para balancear a pressão osmótica do meio, o que implica em alto custo energético para o consórcio microbiano. Para as bactérias nitrificantes, em particular, esse encargo é adicionado ao custoso processo de redução de CO₂ (MEASURES, 1975).

2.5.2 Destitrificação

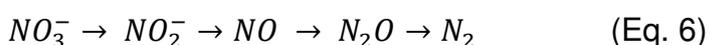
Consistindo na etapa subsequente à nitrificação no processo convencional de remoção de nitrogênio, a desnitrificação é um processo no qual micro-organismos heterotróficos anaeróbios facultativos reduzem o nitrato gerado na nitrificação a nitrogênio molecular em condições anóxicas (MADIGAN et al., 1997). É um processo de grande importância, visto que, consistindo em uma etapa integrante do processo de remoção de nitrogênio de efluentes líquidos, contribui para mitigar os diversos danos causados por esse elemento nos corpos d'água.

A desnitrificação é essencial para afluentes com baixa alcalinidade natural. A perda de alcalinidade pela liberação de íons H⁺ durante a nitrificação pode ser contornada pela desnitrificação. Além disso, concentrações elevadas de nitrato podem repercutir na geração de nitrogênio gasoso por meio da desnitrificação, o qual pode provocar lodo ascendente na fase de decantação em sistemas convencionais de lodo ativado e com isso prejudicar a operação do sistema (VON SPERLING, 1996).

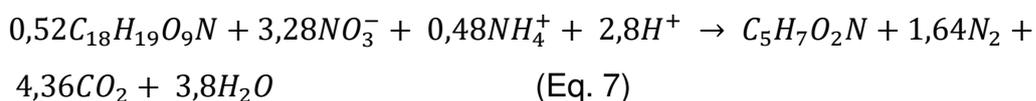
Na desnitrificação, alguns grupos de bactérias oxidam alguns substratos, que consistem em compostos de carbono orgânico tais como

carboidratos, ácidos orgânicos, álcoois, aminoácidos e ácidos graxos (METCALF e EDDY, 2003). Estes servem como fonte de energia para a produção de ATP, e os equivalentes da redução são transferidos ao nitrato, que age como acceptor final de elétrons na cadeia respiratória ao invés de oxigênio. Nessas circunstâncias, a ocorrência da desnitrificação está relacionada à presença de um substrato oxidável e de uma concentração adequada de nitrato (VAN RIJN et al., 2006). Muitas bactérias que oxidam matéria orgânica utilizando nitrato como acceptor final de elétrons agem como facultativas desnitrificantes. As bactérias desnitrificantes utilizam preferencialmente o oxigênio molecular, que compete com o nitrato na função de acceptor de elétrons. Assim, o processo desnitrificante se desenvolve na ausência de oxigênio e na presença de nitrato, isto é, em ambiente anóxico. Embora menos comum, a desnitrificação também pode ser realizada por bactérias quimiolitotróficas, as quais utilizam H_2 ou compostos reduzidos de enxofre como acceptor de elétrons (WIESMANN et al., 2007).

Resumidamente, a redução do nitrato ocorre em etapas sequenciais, conforme a Equação 6. Durante esta sequência de transformação de nitrato para nitrogênio gasoso, passando pelos óxidos gasosos, o estado de oxidação do nitrogênio passa de +5 para 0 (MADIGAN et al., 1997).



A Equação 7 representa a reação de desnitrificação, levando-se em consideração o crescimento celular. Nesse caso, considera-se que os organismos assimilam amônia (HENZE et al., 2002). Caso toda a energia seja utilizada para crescimento, o fator de rendimento de substrato em biomassa é de aproximadamente 0,40 kg biomassa/kg matéria orgânica.



A completa conversão de nitrato a nitrogênio molecular se processa através de uma microbiota desnitrificante constituída de diversos grupos de microorganismos (MANSELL e SCHROEDER, 1998), os quais representam a maior

diversidade e distribuição de micro-organismos entre os demais processos de biotransformações inorgânicas. Como exemplo de alguns gêneros diversos de bactérias desnitrificantes pode-se mencionar *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Hiphomicrobium*, *Chromobacterium*, *Halobacterium*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Paracoccus*, *Azospirillum*, *Rhodopseudomonas*, *Thiobacillus*, *Vibrio*, *Xanthomonas* e *Klebsiella* (RITTMAN e LANGELAND, 1985).

O funcionamento global do ecossistema desnitrificante pode ser afetado pela atuação das populações microbianas, as quais, por sua vez, podem sofrer interferências decorrentes de mudanças nas condições ambientais, como temperatura, pH, concentração de oxigênio dissolvido, fonte de carbono, concentração de nitrato, relação carbono orgânico/nitrogênio, tempo de retenção celular, presença de substâncias inibidoras e altas intensidades de luz (NAIR et al., 2007; BARAK et al., 1998).

A temperatura influencia diretamente o crescimento das bactérias, sendo que a desnitrificação pode ocorrer na ampla faixa de 0 a 50 °C. Entretanto, a condição mais favorável de temperatura se encontra em torno de 35 °C. Em relação ao pH, a faixa adequada está compreendida entre 6,5 e 8, sendo que valores abaixo de 6,0 e acima de 9,0 para esse parâmetro reduzem a velocidade de desnitrificação (SURAMPALLI et al., 1997). Particularmente para valores de pH abaixo de 7, a produção de óxidos de nitrogênio dotados de alta toxicidade é mais acentuada, e caso haja a presença de nitrito nestas condições de pH, elevadas concentrações de ácido nitroso podem estar presentes (ANTHONISEN et al., 1976). O oxigênio dissolvido tem a capacidade de inibir tanto a atividade como a síntese de enzimas desnitrificantes. Para se ter uma ideia, concentrações desse elemento de apenas 1 mgO₂/L ou ainda menores já interferem na atividade desnitrificante (SURAMPALLI et al., 1997).

A razão carbono orgânico/nitrogênio necessária para a completa redução de nitrato a nitrogênio gasoso pelas bactérias desnitrificantes depende da natureza da fonte de carbono e das espécies microbianas atuantes (PAYNE, 1973). Para a maioria das fontes de carbono, uma razão mássica de DQO/N-NO₃⁻ de 3 a 6 permite a redução completa de nitrato para nitrogênio elementar

(NARCIS et al., 1979, SKINDE et al., 1982). Maiores taxas de desnitrificação são obtidas, por exemplo, com ácidos graxos, enquanto que a desnitrificação suportada pelo decaimento celular consiste em um processo lento. É interessante ressaltar que a limitação de carbono pode resultar no acúmulo de produtos intermediários, como NO_2 e N_2O .

Em processos convencionais, como o de lodos ativados, os processos de nitrificação e desnitrificação são realizados em reatores distintos. A configuração mais utilizada é conhecida como pré-desnitrificação, na qual o nitrato é reduzido a nitrogênio gasoso utilizando a matéria orgânica afluyente do processo como doador de elétrons em um tanque anóxico. O nitrato é produzido em um tanque aeróbio subsequente, no qual ocorre a nitrificação, sendo posteriormente recirculado ao tanque anóxico. Em sistemas com penetração parcial de oxigênio, tais como reatores baseados em biofilmes, ambas as zonas aeróbias e anóxicas estão presentes simultaneamente no biofilme, permitindo a ocorrência do processo de nitrificação e desnitrificação simultâneas.

2.6 PROCESSO ANAMMOX

Apenas processos aeróbios vinham sendo discutidos para a oxidação da amônia até que Broda (1977), baseado em cálculos termodinâmicos, observou a existência de microrganismos capazes de oxidar amônia utilizando nitrito ou nitrato como acceptor final de elétrons. Além disso, uma perda inexplicável de amônia sob condições anóxicas havia sido relatada na década anterior em estudos a respeito do balanço de nitrogênio em fiordes anóxicos (RICHARDS, 1965). Mulder et al. (1995) verificaram perda de amônia sob condições anaeróbias em reator desnitrificante de leito fluidizado em Delft (Holanda), o qual tratava efluente de uma planta de produção de fermento. Neste reator, o consumo de amônia e nitrato foi crescente, com concomitante produção de gás nitrogênio. Após análise dos resultados, os autores concluíram que amônia estava sendo oxidada em condições anaeróbias, a partir da utilização de nitrito como acceptor final de elétrons e formação de nitrogênio gasoso.

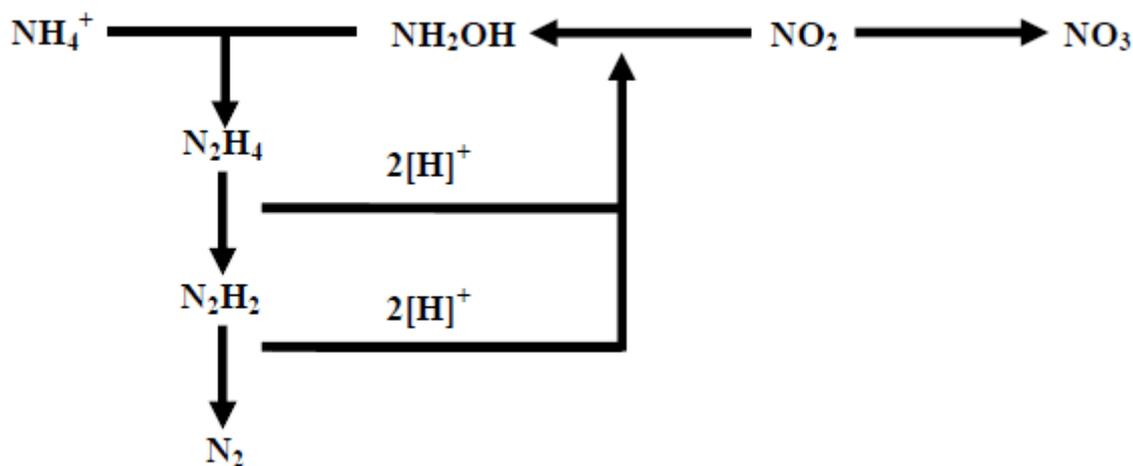
O processo biológico foi denominado de Anammox (Anaerobic Ammonium Oxidation), já que o mesmo converte amônia diretamente a nitrogênio gasoso sob

condições anaeróbias, utilizando nitrito como acceptor final de elétrons (MULDER et al., 1995). Esse sistema tem várias vantagens, incluindo pequena produção de lodo, baixo consumo de energia e nenhuma exigência de carbono orgânico externo, por isso, o Anammox tornou-se um tema importante nos domínios da microbiologia e engenharia ambiental.

A remoção sustentável de altas cargas de nitrogênio de águas residuárias ocorre pela ação dos planctomicetos sob condições anóxicas, que são os responsáveis pela geração do gás de nitrogênio (DAPENA-MORA et al., 2006). A primeira bactéria anammox identificada foi designada de *Brocadia anammoxidans* (SCHMIDELL et al., 2007). Outros organismos anammox já foram classificados provisoriamente como *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*, *Candidatus Scalindua wagneri*, *Candidatus Anammoxoglobus propionicus* (KARTAL et al., 2006) e *Candidatus Jettenia asiatica* (QUAN et al., 2008).

Para esclarecer a rota metabólica de conversão da amônia a nitrogênio gasoso sob anaerobiose Jetten et al (2002), baseados em experimentos com ^{15}N , postularam o seguinte mecanismo para a oxidação anaeróbia da amônia: a bactéria autotrófica responsável pelo processo anammox reduz nitrito (NO_2^-) a hidroxilamina (NH_2OH). Em seguida, hidroxilamina e amônio (NH_4^+) são condensados a hidrazina (N_2H_4) e água. Posteriormente, a hidrazina é oxidada a nitrogênio gasoso (N_2) e os elétrons são utilizados para reduzir a próxima molécula de nitrito (Figura 1). Além disso, parte do nitrito é convertida a nitrato, o que produz equivalentes de redução para fixação do CO_2 e conseqüentemente, aumento da biomassa.

Figura 2: Provável rota metabólica da oxidação anaeróbica do íon amônio.



Fonte: Jetten et al. (2002)

As bactérias anammox vem sendo detectadas em vários ecossistemas, Devol (2003) afirma que elas participam do ciclo oceânico do nitrogênio, sendo responsáveis por 30 á 50% da produção total de N_2 do planeta. Além disso, foram também notadas em várias estações de tratamento de efluentes na Alemanha (HELMER et al., 1999), Suíça (EGLI et al., 2001), Inglaterra (SCHMID et al., 2003), Bélgica (PYNAERT et al., 2003) e Austrália (TOH et al., 2002). A ampla ocorrência das bactérias nos ecossistemas aquáticos sugere que elas sejam encontradas em qualquer ecossistema que contenha nitrogênio e que possua zonas anaeróbicas (FRANCIS et al., 2007).

A aplicação do processo anammox é considerada uma boa alternativa para a remoção biológica de nitrogênio no tratamento de águas residuárias (VAN DONGEN et al., 2001). A aplicação do processo anammox para o tratamento de águas residuárias poderia levar à redução de até 90% dos custos operacionais (JETTEN et al., 2001b). Nozhevnikova et al (2011) destacou uma redução de 25% nos custos de aeração pela não necessidade de nitrificação completa no tratamento, redução de 40% nos custos por não necessitar de adição carbono orgânico e a emissão de dióxido de carbono teve uma queda de 20%. Porém para um desempenho satisfatório do processo, o efluente deve conter pequeno conteúdo orgânico e elevada concentração de amônia. Outro fator importante é a acumulação de um número suficientemente grande de bactérias anammox e manutenção das condições anaeróbicas adequadas (ABREU, 2013).

Castine et al. (2012) determinaram se a desnitrificação e o processo anammox ocorrem em sedimentos coletados a partir de tanques de decantação que são usados para tratar efluentes de produção de camarão e peixes. Os autores também investigaram a produção de N_2 nos tanques e o efeito do carbono na remoção de nitrogênio como aceptor de elétrons. A desnitrificação e o processo anammox acontecem concomitantemente nos tanques de decantação, porém a produção de N_2 é, majoritariamente, vinda do processo de desnitrificação. Os autores relataram que a baixa produção de N_2 pelo anammox tem sido atribuída às limitações de NO_2 , além de alterações da disponibilidade de amônia, nitrogênio, fósforo e a salinidade do reator. Apesar disso o tanque de decantação com atividade desnitrificante e anammox foi responsável pela remoção de 2,5% do nitrogênio total do sistema.

2.7 ENRIQUECIMENTO DAS BACTERIAS ANAMMOX

A aplicação do processo anammox é limitada pela disposição de uma biomassa anaeróbia, por ter condições específicas de desenvolvimento e crescimento as bactérias anammox requerem o isolamento e enriquecimento para start-up do sistema (DAPENA-MORA et al. 2004). Por apresentarem crescimento muito lento, tempo de geração de 11 dias de acordo com Jetten et al. (2001a), algumas técnicas foram desenvolvidas para seu enriquecimento.

A primeira tentativa bem-sucedida no enriquecimento parcial dos organismos anammox foi o uso do reator de leito fluidizado por Van de Graaf et al. (1996), o qual foi alimentado com meio mineral contendo somente amônio e nitrito, além de carbonato como única fonte de carbono. Os autores afirmaram que, por ter uma baixa taxa de crescimento, é necessário um sistema de retenção da biomassa, como no leito fluidizado. Verificaram ainda que taxas de conversão razoáveis foram alcançadas ($3 \text{ kg NH}_4^+ \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$) quando alimentados com 500 g.L^{-1} de NH_4^+ somente quando uma quantidade suficiente de biomassa havia se acumulado no sistema.

Strous et al. (1998) observaram, no entanto, que o cultivo de bactérias anammox através do reator de leito fluidizado não foi satisfatório, muitas vezes, a

retenção da biomassa nesse tipo de reator não foi suficiente para manter a cultura de bactérias anammox. Devido ao longo tempo requerido para o cultivo dessas bactérias várias tentativas de enriquecimento não foram bem sucedidas por problemas tais como dificuldades no controle do pH além da ocorrência de falhas das bombas responsáveis pela entrada do meio afluente e retirada do meio efluente (STROUS et al., 1998). Em geral, a espessura do biofilme e a composição da população não foram constantes ao longo de todo o reator devido à falta de volume suficiente para proporcionar uma mistura completa no reator de leito fluidizado. Em relação à composição da população microbiana. Isso fez com que alguns locais do reator não recebessem substrato continuamente, conseqüentemente a biomassa nestas áreas foi exposta a escassez de alimento, o que levou a uma diminuição da atividade anammox. Todos esses problemas dificultaram a interpretação dos resultados quantitativos, uma vez que a estratificação, que é conseqüência da ausência ou redução do processo de mistura completa, pode ser comum em reatores de leito fluidizado (STROUS et al., 1998).

Outra estratégia buscada para o cultivo de bactérias anammox foi a utilização de reatores em batelada. Alguns autores obtiveram sucesso na detecção de atividade anammox bem como no enriquecimento delas em reatores de batelada, com trocas esporádicas do meio de cultura (TSUSHIMA et al., 2007; SANCHEZ-MELSIÓ et al., 2009; TOH e ASHMOLT, 2002). Outros, entretanto, não obtiveram sucesso no enriquecimento mesmo após longos períodos de incubação.

Lara (2009) incubou lodos provenientes de um reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) e de um sistema de lodos ativados, em meio autotrófico e anaeróbio em condições de batelada durante um período de 400 dias. O processo biológico verificado, nesta condição de incubação, foi a desnitrificação intensa, tanto para o lodo aeróbio quanto para o anaeróbio. A adição de cloranfenicol nos reatores não conseguiu inibir as bactérias desnitrificantes, que na condição de batelada foram favorecidas em detrimento das bactérias anammox. Portanto, pelos trabalhos analisados verifica-se que nem

sempre a estratégia de enriquecimento das anammox em batelada apresenta resultados satisfatórios.

Nesse contexto, diversas técnicas foram desenvolvidas para estudar microrganismos aderidos, sendo que todas elas se baseiam, geralmente, em duas estratégias, que são: a espessura do biofilme, composição da população e a retenção de biomassa. Nesse sentido o Reator em Batelada Sequencial (RBS) constitui uma ferramenta importante para o enriquecimento dos organismos Anammox. Uma vez que, tal aparato conjuga essas duas características essenciais para o cultivo de microrganismos: proporciona a formação de biofilmes, os quais melhoram a culturabilidade dos microrganismos, e, simultaneamente, promove considerável retenção de biomassa (CAMPOS, 2011).

Portanto, Strous et al. (1998) demonstraram que a retenção eficiente de biomassa e a estabilidade operacional, obtidas por técnicas convenientes, tais como o RBS podem propiciar o enriquecimento e o estudo de microrganismos que estariam fora do alcance das técnicas microbiológicas clássicas de cultivo. O uso do RBS mostrou-se eficiente para o enriquecimento e estudo quantitativo de microrganismos de crescimento lento, que é o caso das bactérias Anammox (STROUS et al., 1998).

Araújo et al. (2010) obtiveram um enriquecimento de bactérias anaeróbias oxidadoras de amônia (anammox) a partir de um lodo de um sistema convencional de lodos ativados tratando esgoto doméstico de Belo Horizonte (MG) em um reator de batelada sequencial (RBS). Após três meses de cultivo atividade Anammox foi detectada no sistema pelo consumo de quantidade significativas de nitrito e amônia. A confirmação da presença de bactérias anammox foi realizada pelas análises de hibridação in situ fluorescente (FISH), que revelaram 53% de *Candidatus Brocadia anammoxidans* após seis meses de enriquecimento. O desempenho do reator ao longo dos sete meses de operação demonstrou remoção quase que total de nitrito, baseada em concentração afluente de 61 a 95 mg $\text{NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$. A eficiência máxima de remoção de amônia alcançada foi de 95%, a partir de concentração afluente de 55 a 82 mg $\text{NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$. Araújo et al. (2010) concluíram que a operação do RBS por sete meses permitiu uma concentração significativa de bactérias Anammox na biomassa enriquecida,

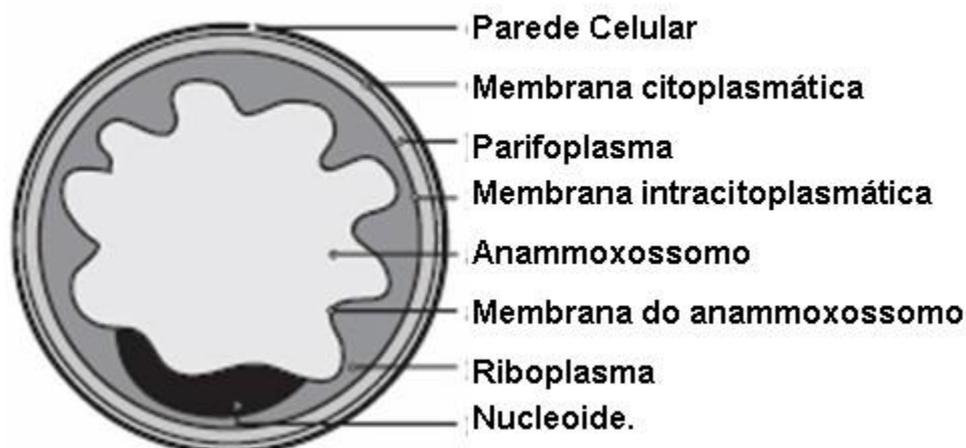
e, não obstante, a operação do RBS por mais tempo permitirá aumentar essa população. Posteriormente, essa cultura poderá ser utilizada como inoculo para a partida de reatores anammox, que poderão ser usados no tratamento de águas residuárias contendo concentrações altas de nitrogênio amoniacal (ARAÚJO et al., 2010).

2.8 MICROBIOLOGIA DAS BACTÉRIAS ANAMMOX E MÉTODOS PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MICROORGANISMOS

Bactérias com atividade anammox são autotróficas, aderem facilmente a qualquer superfície sólida, não existindo de forma uniforme dentro dos bioreatores (CAMPOS, 2011). As características ótimas para seu desenvolvimento em um bioreator são pH entre 7 e 8 e temperatura na faixa de 20 a 43° C (JETTEN et al., 1999; TOH et al., 2002).

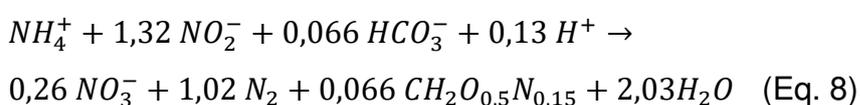
Estudos mostraram ainda, que estas bactérias não tem parede celular com peptideoglicanos como as bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas, e sim parede celular proteonacea, como as archaea. A estrutura interna também é incomum, com citoplasma dividido em três compartimentos. O compartimento mais interno, o anammoxossomo, contem partículas de ferro e estruturas semelhantes a tubos (LINDSAY et al., 2001) além de ocupar grande parte da célula (30%). O segundo compartimento citoplasmático, o riboplasma, contem ribossomos e o nucleoide e é circundado pela membrana intracitoplasmática. O terceiro e mais externo compartimento, o parifoplasma, está envolto pela membrana citoplasmática (VAN NIFTRIK et al., 2008).

Figura 3: Representação esquemática da estrutura celular de bactérias com atividade anammox.



Fonte: Van Niftrik et al, 2008

De acordo com Nozhevnikova et al. (2012), as bactérias anammox são anaeróbias quimiolitotróficas, recebendo energia advinda da oxidação do amônio e utilizando dióxido de carbono como fonte de carbono para o metabolismo. As bactérias não consomem o amônio e o nitrito na proporção 1:1 como é o esperado para seu catabolismo, mas sim em uma proporção 1:1,32, mostrado na equação 8. O excesso de nitrogênio (10%) é oxidado anaerobiamente a nitrato. As bactérias anammox podem, ainda, oxidar substratos orgânicos, como formiato, acetato e propionato, para obtenção de CO_2 . Alguns organismos são capazes de produzir nitrito do nitrato por outras fontes de carbono, ou seja, as bactérias com atividade anammox não são estritamente quimiolitotróficas (NOZHEVNIKOVA et al., 2012).



A disparidade de informações a cerca das bactérias anammox afirma a relevância de se aprofundar em estudos acerca da ecologia das bactérias anammox em ambientes naturais e antrópicos. Uma vez que, os conhecimentos acerca do assunto ainda são incipientes para que sejam formuladas explicações

para as particularidades que envolvem o enriquecimento e o nicho ecológico das oxidadoras anaeróbias de amônia.

Técnicas moleculares são poderosas ferramentas para o monitoramento ambiental e para caracterização da diversidade microbiana podendo efetivamente avaliar mudanças no ecossistema e melhorar a compreensão das comunidades microbianas envolvidas em processos vitais dentro de um ecossistema. A biologia molecular é uma estratégia bastante promissora e aplicável para a investigação das bactérias anammox, uma vez que, a maioria dessas bactérias ainda não foi isolada, portanto, as técnicas como a hibridação *in situ* fluorescente (FISH) e a reação em cadeia da polimerase (PCR) são essenciais para o futuro das pesquisas com as mesmas (SCHMID et al., 2005).

A maioria das ferramentas moleculares utilizadas atualmente para estudos ambientais e análise de comunidades microbianas baseia-se na técnica da PCR, que consiste na amplificação de uma parte do DNA que seja de interesse para o estudo (como, por exemplo, o gene que codifica o rRNA 16S) (SAIKI et al., 1985; MULLIS e FALLONA, 1987). A PCR é uma técnica que visa à identificação de uma série de microrganismos, pertencentes aos vários grupos, em diversas amostras. Tudo isso possibilita a descoberta de microrganismos não cultiváveis bem como a utilização de seus genes, muitos deles inexplorados e com propriedade de interesse, fazendo desta tecnologia um importante recurso para o estudo da ecologia microbiana nos mais diferentes ecossistemas (CULLEN et al, 2001).

Outras técnicas baseadas na amplificação por PCR e comparação das sequências de rRNA têm sido usadas para identificar os micro-organismos presentes em sistemas de tratamento de águas residuárias. Como exemplo, pode-se mencionar eletroforese em gel com gradiente de desnaturantes (DGGE), a técnica de DGGE é baseada na diferente mobilidade dos fragmentos de DNA desnaturado, que possuem o mesmo tamanho (por exemplo, gene rRNA amplificado com fragmentos de aproximadamente 500 pares de base) mas com distinta sequência de ácidos nucleicos, gerando diferentes padrões de bandas que funcionam como verdadeiro código de barras, refletindo a diversidade microbiana da amostra estudada (MADIGAN et al., 2016).

Bandas de DGGE individuais podem ser incisadas do gel e sequenciadas para revelar a verdadeira identidade dos micro-organismos envolvidos (MUYZER et al., 1993; MUYZER e SMALLA, 1998). A técnica DGGE tem sido extensivamente utilizada para observar variações das comunidades microbianas e as sucessões dos micro-organismos ao longo do tempo.

2.9 PROCESSO CANON

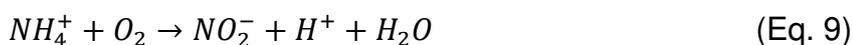
Os processos anaeróbios aplicados em sistemas de tratamento de efluentes possuem vantagens conhecidas e permitem a redução de custos operacionais no que diz respeito, principalmente, a economia de energia e a produção de lodo. No entanto, também é conhecido o fato de que os reatores anaeróbios produzem efluentes que, geralmente, não atendem aos padrões de emissão em corpos hídricos receptores. Conseqüentemente, os reatores anaeróbios devem ser combinados com outras tecnologias de forma a se atingir uma situação ideal para um determinado sistema de tratamento de esgoto (NETTO, 2011).

Embora eficiente em termos de remoção de matéria orgânica, o tratamento anaeróbio apresenta alguns problemas, entre outros, relacionados com o conteúdo de fósforo e nitrogênio no seu efluente que acarretam problemas para a sua disposição final com corpos d'água. Como uma das alternativas tecnológicas capazes de proporcionar a situação ideal de sistema de tratamento é a utilização de reatores combinados anaeróbio-aeróbio como uma das possíveis alternativas tecnológicas (SILVA & NOUR, 2004).

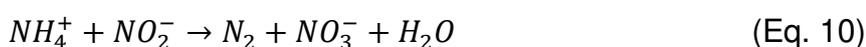
Strous (2000) e Sliekers et al. (2001) observaram a cooperação de bactérias aeróbias e anaeróbias na oxidação de amônia sob condições limitantes de oxigênio, a partir de então se iniciou estudos a respeito de um novo princípio para o tratamento de águas residuárias.

O processo CANON (Completely Autotrophic Nitrogen-removal Over Nitrite) se baseia na interação de dois grupos de bactérias autotróficas que realizam duas reações sequenciais sob condições de baixas concentrações de oxigênio e de matéria orgânica, insuficiente para suportar o processo convencional de

nitrificação/desnitrificação. Primeiramente o íon amônio é oxidado a nitrito por bactérias aeróbias, como as Nitrosomonas e Nitrospira. (SLIEKERS et al. 2002).



Nitrito é, então, usado como acceptor de elétrons por plantomicetos, como as bactérias anammox, em um meio anaeróbio para oxidar a amônia. Nitrito também é utilizado como doador de elétrons para a formação de biomassa do gás carbônico.



Essa interação das bactérias aeróbias e anaeróbias resulta em uma quase completa conversão da amônia em gás nitrogênio com pouca presença de nitrato, porém esse resultado só é satisfatório em condição de baixas concentrações de carbono orgânico. Sistemas tradicionais, muitas vezes, requerem uma DQO alta na fase de desnitrificação heterotrófica. O processo CANON torna possível a remoção de nitrogênio em um único reator, com baixa taxa de aeração, reduzindo os requisitos de espaço e de energia (KHIN E ANNACHHATRE, 2004).

Sliekers et al. (2002) estudaram a remoção completa do nitrogênio por via autotrófica pelo nitrito em um único reator e relataram taxas de remoção de nitrogênio de até 0,3 kg N total m⁻³.d⁻¹ para o processo CANON. Neste estudo os autores inocularam o reator com uma biomassa anammox em ambiente anóxico, após estabilização foi introduzida uma população de bactérias nitrificantes sob baixa taxa de oxigenação. A população desenvolvida foi monitorada por hibridação in situ com sondas fluorescentes (FISH) e mostrou que as bactérias anaeróbias permaneceram no reator mesmo após a adição de oxigênio, ainda que limitante. Amônia foi, principalmente, convertida para nitrogênio gasoso (85%) e o restante (15%) foi recuperado como nitrito.

Third et al. (2001) analisaram a interação e competição de um sistema CANON sob limitação de amônia e obtiveram taxa de remoção de 92% da amônia. Após um mês de operação foi limitada a entrada de amônia, que causou

o desenvolvimento de uma terceira cultura de bactérias no sistema afetando a reação CANON e diminuindo para 57%. Assim que a limitação de amônia foi removida o sistema se restabeleceu. Este estudo mostrou que o CANON é um sistema robusto para a remoção de amônia, suportando períodos de limitação de amônia, sem danos.

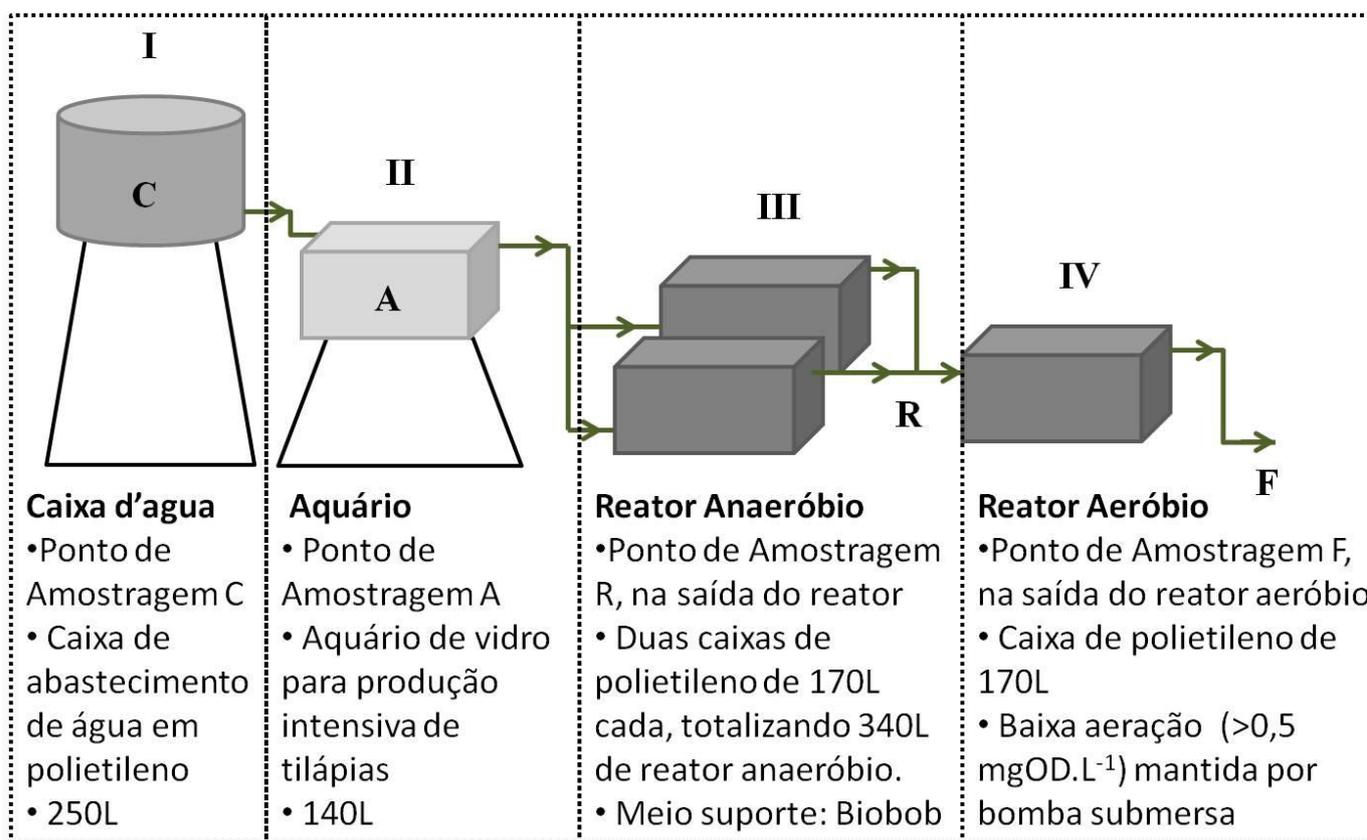
De acordo com Khin e Annachhatre (2004), o processo Canon, é uma opção econômica e eficiente para tratamento de águas residuárias, especialmente para aquelas que apresentam elevadas concentrações de nitrogênio na forma de amônia e baixas concentrações de nitrogênio orgânico. A remoção em um único reator, sob baixas concentrações de oxigênio dissolvido representa redução de espaço e energia, o que está diretamente relacionada com a redução de custos, que remete aos processos alternativos um diferencial bastante atrativo, quando comparados com os processos convencionais de remoção.

Quando o processo CANON é aplicado em larga escala é importante conhecer as limitações do sistema, para que haja controle de distúrbios. O processo depende da interação harmoniosa e equilibrada entre apenas dois grupos de bactérias, as aeróbias e as anaeróbias oxidantes de amônia. Se, sob certas condições, o equilíbrio é perturbado, por exemplo, se outros grupos de bactérias como as aeróbias oxidantes de nitrito se desenvolverem, eles podem interferir na remoção do nitrogênio (THIRD et al.,2001)

3 MATERIAL E MÉTODOS

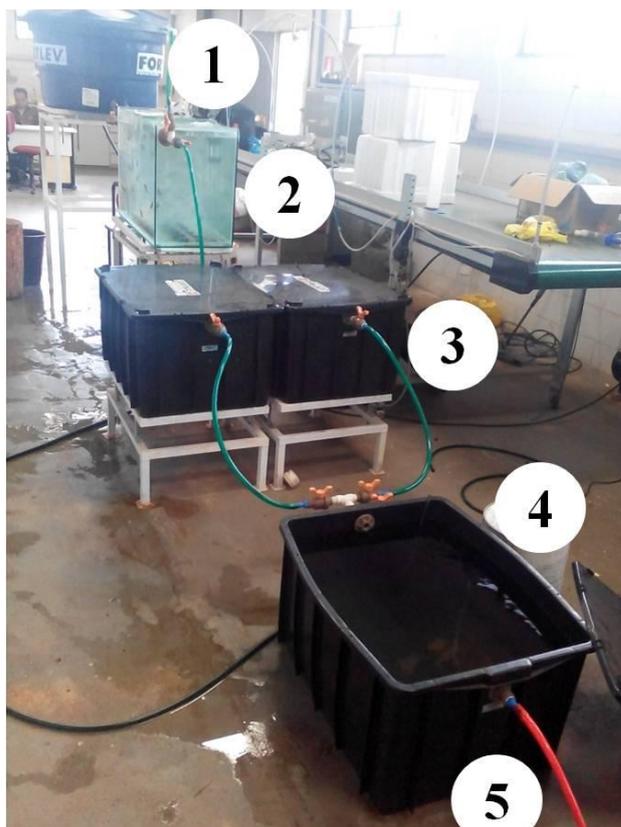
Para o desenvolvimento desta pesquisa foi instalado no Laboratório de Controle Ambiental da FEAGRI/UNICAMP um aquário para cultivo de alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com volume de 140 L seguido de um sistema de tratamento de efluentes utilizando dois reatores anaeróbios de leito fixo de 170 L cada, instalados em paralelo e seguidos de um reator anóxico que consistiu em um tanque de mistura completa (CSTR) de 170 L mantido em agitação, sem vórtice e baixa concentração de oxigênio dissolvido ($\leq 1 \text{ mg OD.L}^{-1}$). A Figura 3 apresenta o esquema da instalação experimental.

Figura 4: Esquema da Instalação experimental e pontos de amostragem



Conforme indicado na Figura 3 a instalação experimental foi composta por uma caixa de abastecimento de 250L Fortlev de polietileno (I), um aquário de vidro de dimensões 76x39x47cm de altura, comprimento e largura (II), duas caixas de polietileno de dimensões 40x60x74cm de altura, comprimento e largura contendo material suporte para imobilização de microrganismos(III) e uma caixa com as mesmas dimensões (IV). As unidades foram interligadas por tubos flexíveis de polietileno e as vazões foram controladas por registros de esfera.

Figura 5: Instalação experimental



- 1- Tanque de abastecimento
- 2- Aquário de cultivo de tilápias
- 3- Tanque anaeróbico de leito fixo
- 4- Tanque anóxico
- 5- Descarte

3.1 AQUÁRIO E CULTIVO DOS PEIXES

Foi utilizado um aquário de vidro com dimensões 76x39x47cm, 140 L, instalado sobre uma estrutura metálica (Figura 4). Para representar o cultivo intensivo de tilápias a densidade inicial de peixes foi de 5 g L⁻¹ o que correspondeu, inicialmente a 50 animais juvenis e pesando em média 13 g, fornecidos pela Piscicultura Rio Doce e Piscicultura Polettini. Para manutenção da concentração de oxigênio dissolvido em torno de 3 mg L⁻¹, foi utilizado um sistema de insuflação de ar por meio de compressor de ar Shulzs Pratic Air com dispersor de ar em cerâmica, compressor de ar Boyu ACQ-001 sem dispersor e bomba de ar Boyu AC/DC com dispersor em mangueira.

A temperatura foi mantida em 28°C por dois aquecedores Atman 200 W e um indicador de temperatura instantânea, máxima e mínima da Incoterm. O aquário era higienizado uma vez por semana para remoção de dejetos e sobras de ração que depositavam no fundo. Para limpeza, foi utilizada mangueira e sifão retirando o mínimo de água possível. O líquido retirado era reservado em um

balde para decantação dos sólidos a parte líquida era descartada e a parte sólida era despejada nos reatores anaeróbios (III) para tratamento.

Eram monitorados diariamente os parâmetros de qualidade da água pH, temperatura, oxigênio dissolvido, turbidez, cor e condutividade.

Conforme recomendação de Kubtiza et al. (2000), os peixes recebiam três refeições diárias com ração balanceada contendo 30% de proteína, a quantidade de alimento era controlada observando-se a saciedade aparente, mas, limitada de 2% a 3% do peso médio dos peixes.

A taxa de renovação de água inicialmente foi de 50 L h⁻¹ para ambientação dos peixes e pré análise do sistema. Após três meses a vazão foi reduzida para 20 L h⁻¹ e se manteve constante até o final do experimento.

3.2 REATORES ANAERÓBIOS DE LEITO FIXO

Os reatores anaeróbios de leito fixo foram confeccionados utilizando-se duas caixas plásticas retangulares com dimensões 40x60x74cm instaladas em paralelo (Figura 4) com 170L de capacidade cada caixa, totalizando 340L de reator anaeróbio. Como meio suporte para imobilização dos microrganismos foram utilizadas espumas de poliuretano envolvidas por cilindros de polietileno vazados, denominados Biobob® (Figura 5). Os materiais suportes foram colocados de forma aleatória sobre uma placa de aço provida de orifícios de 2 cm de diâmetro até a borda superior do reator, mantendo-se um fundo falso de 5 cm de altura a partir da base para distribuição do afluente.

O Biobob® foi fornecido pela empresa Bio Proj Tecnologia Ambiental localizada em São Carlos, SP. Biobob® tem sido utilizado atualmente com sucesso em diversas plantas de tratamento de efluente industrial e sanitário, apresentando-se como um ótimo material suporte para reatores de leito móvel ou leito fixo, tanto anaeróbios quanto aeróbios. A sua principal característica é possuir uma alta área superficial ($270 \times 10^3 \text{ m}^2 \text{ m}^{-3}$), o que lhe garante alta afinidade e eficiência na imobilização celular. De acordo com Silva et al. (2006) a espuma de poliuretano utilizada no Biobob® contém consistência aparente (g.mL⁻¹) de 0,023 e porosidade de 0,92.

Figura 6: Reator anaeróbio com meio suporte durante inoculação.



O meio suporte foi previamente inoculado com lodo proveniente de um reator anaeróbio compartimentado (RAC) tratando dejetos de gado leiteiro e águas residuárias da sala de ordenha da fazenda experimental do Instituto Federal Sul de Minas localizado em Inconfidentes MG. A metodologia para inoculação foi adaptada de Zaiat (1997) e consistiu em deixar o meio suporte em contato com o lodo anaeróbio por um período de 2 horas e, posteriormente iniciou-se a passagem do efluente do aquário pelos reatores.

3.3 REATOR AERÓBIO

Assim como os reatores anaeróbios, o reator aeróbio foi confeccionado utilizando-se uma caixa plástica com dimensões 40x60x74cm e 170 L (Figura 4). A agitação foi realizada por meio de uma bomba submersa Sarlobetter (≤ 1 mg

OD.L⁻¹), modelo SB1000C, com vazão de 1000 L.h⁻¹, sem formação de vórtice na superfície, de forma a manter o regime de mistura completa para remoção de amônia por meio do processo CANON.

3.4 MONITORAMENTO

A amostragem para monitoramento foi realizada em quatro pontos para avaliação da eficiência do processo: água de reposição proveniente da rede de abastecimento (C), aquário (A), efluente dos reatores anaeróbios (R) e efluente do reator com limitação de oxigênio (F), de acordo com a Figura 3.

A avaliação do desempenho do sistema de tratamento foi feita por meio de análises dos parâmetros de qualidade: pH, temperatura, condutividade, oxigênio dissolvido (OD), sólidos totais e voláteis, nitrito, nitrato, amônia, nitrogênio amoniacal, nitrogênio total, carbono orgânico total e demanda química de oxigênio. As análises físico-químicas e biológicas foram realizadas no Laboratório de Saneamento da FEAGRI/Unicamp em conformidade com metodologias preconizadas no Standard Methods for Examination of Water and Wastewater 21th Edition (APHA, 2005). Os parâmetros, métodos e frequência de análises são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Parâmetros, métodos e frequência de análise para acompanhamento do desempenho do tratamento.

Análise	Equipamento	Método	Periodicidade
pH	pHmetro Digimed DM22.	Potenciométrico	Diária
Temperatura	Termômetro Digital acoplado no pHmetro Digimed DM22	Termométrico	Diária
Condutividade	Condutivímetro Digimed DM31.	Eletrométrico	Diária
Cor	HACH DR2010	Standard Method 2120E	Diária
Turbidez	Turbidímetro HACH 2100AN.	Standard Method 2130	Diária
OD	Oxímetro com eletrodo de membrana OHAUS Starter 300D.	Standard Method 4500-O G.	Diária
Série de Sólidos	Balança analítica Marte AY220. Estufa FANEM Orion 515 Banho Maria Nova Ética 314/6 Mufla COEL GMP	Standard Methods 2540 B. 2540 D. 2540 E.	Semanal
Nitrito	Espectrofotômetro DR4000U.	HACH HACH 8153 Standard Method 4500 NO ₂ A	Semanal
Nitrato	Espectrofotômetro DR4000U.	HACH HACH 8192 Standard Method 4500 NO ₃ E	Semanal
Amônia	Aparelho de destilação marca Marconi MA 036 Eletrodo seletivo de amônia Analyser pH/Ion 450M.	Standard Methods 4500-NH ₃ B. 4500-NH ₃ D.	Semanal
Nitrogênio Total	Analizador de Carbono Orgânico Total e Nitrogênio TNM-L Shimadzu.	Oxidação catalítica de combustão á 680 °C	Semanal
Carbono Total, inorgânico e orgânico	Analizador de Carbono Orgânico Total e Nitrogênio TNM-L Shimadzu.	Decomposição térmica / detecção por quimioluminescência. á 720 °C.	Semanal
DQO	Bloco digestor Reactor HACH Espectrofotômetro HACH DR4000U	HACH COD Standard Method 5220 D	Semanal

Durante o início da operação a vazão do sistema foi maior, os tempos de detenção hidráulica, portanto, foram diferentes, conforme tabela 3.

Tabela 3: Tempo de Detenção Hidráulica (TDH) no reator anaeróbico, reator Anóxico, e todo o sistema nas duas vazões de operação.

	TDH ₁ (horas)	TDH ₂ (horas)
Reator Anaeróbico	7	18
Reator Anóxico	4	9
Todo Sistema	11	27

TDH₁ – vazão de 50 L.dia⁻¹

TDH₂ – vazão de 20 L.dia⁻¹

3.5 PERFIL DO OXIGÊNIO DISSOLVIDO NO REATOR ANAERÓBIO

Os reatores anaeróbios recebiam constantemente uma vazão fixa do efluente aerado do aquário de peixes. Para comprovação do estado anaeróbico dos reatores foi realizado uma análise do perfil do OD nos tanques.

Os tanques foram abertos e com a ajuda de um cano de PVC perfurado o eletrodo do oxímetro foi introduzido nos tanques. Foram determinados 9 pontos de coleta e três diferentes profundidades em cada ponto, superfície (S), meio (M) e fundo (F), de acordo com a Figura 6 nos dois tanques anaeróbios. Cada movimento no tanque era feito de forma a causar o menor movimento possível, para que não houvesse oxigenação.

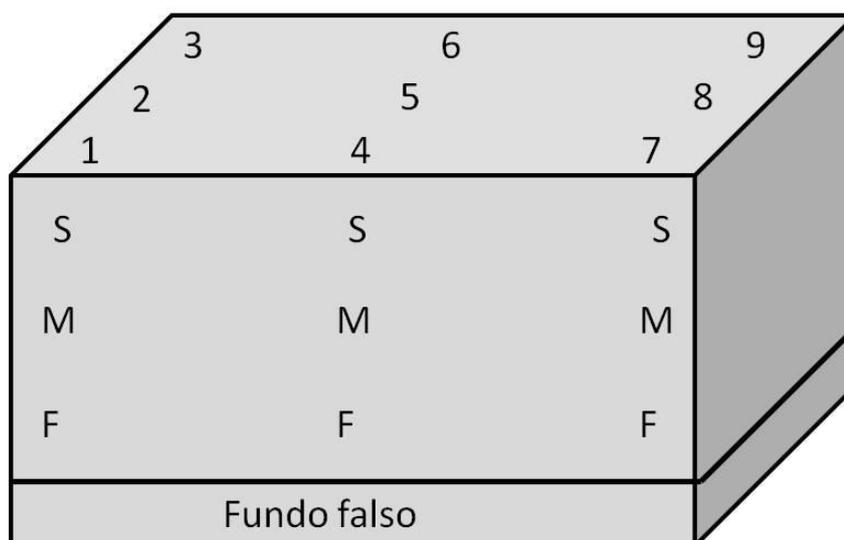


Figura 7: Pontos de amostragem para perfil de OD nos tanques anaeróbios.

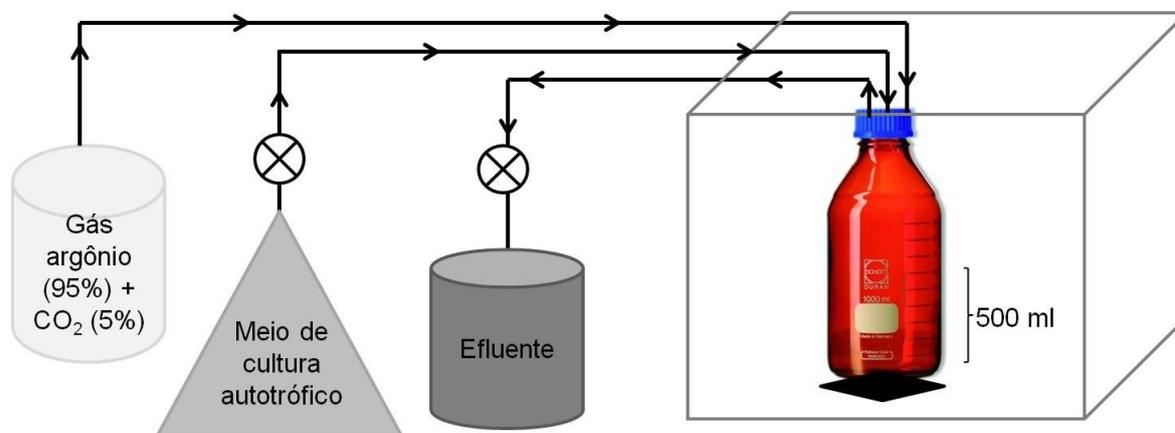
3.6 ENRIQUECIMENTO DA CULTURA DE BACTÉRIAS ANAMMOX

A fim de desenvolver uma cultura de microrganismos com atividade anammox para comparar com a biomassa que se desenvolveu nos reatores anaeróbios e propor a utilização da metodologia para obtenção de inóculo para sistemas anammox realizou-se o procedimento de enriquecimento baseado no protocolo publicado por Araújo et al. (2010).

O enriquecimento de bactérias anammox foi feito a partir do mesmo inóculo utilizado nos reatores anaeróbios de leito fixo, ou seja, lodo anaeróbio proveniente de RAC tratando dejetos de gado leiteiro e águas residuárias de sala de ordenha. O lodo anaeróbio do RAC foi centrifugado até a obtenção da concentração inicial de nitrito igual a 22 mg L^{-1} , amônia $284,9 \text{ mg L}^{-1}$ e DQO $712,5 \text{ mg L}^{-1}$ para início do enriquecimento.

O reator de bateladas sequenciais de 1000 mL provido de tampa de rosca, hermeticamente fechado, foi mantido em uma incubadora orbital shaker marca Marconi MA420 sob agitação de 190 rpm e temperatura controlada a 38°C . O lodo de inoculo foi mantido a pH 7,5 e temperatura de 38°C . O volume reacional foi de 500 ml, de forma a permitir headspace de 500 mL, para acúmulo de biogás (Figura 6).

Figura 8: Sistema de enriquecimento de bactérias anammox



Para o cultivo e enriquecimento das bactérias anammox foi utilizado um meio mineral autotrófico, cuja composição foi a mesma descrita em Dapena-Mora et al. (2004) e Van de Graaf et al. (1996) e método utilizado por Campos (2011), e é apresentada na Tabela 3. O meio de cultura foi preparado em béquer de vidro de 1000 mL, dissolvendo-se os quatro primeiros componentes do meio, de acordo com a ordem apresentada na Tabela 3. O pH foi reduzido para 5,8 e após o ajuste do volume final da solução para 1000 mL em balão volumétrico, retirou-se 7,05 mL desta solução. Utilizou-se um medidor de pH de bancada, calibrado com soluções tampão 4,01 e 7,01 da Merck. Para o ajuste do pH da solução, foi utilizada solução HCl. Este meio foi então transferido para o frasco tipo Schott, vedado com tampa rosqueável e, posteriormente, autoclavado em vapor úmido por 30 minutos a 120 °C. Após o resfriamento deste meio e sob condições de assepsia, em capela de fluxo laminar adicionaram-se os componentes abaixo para obtenção das respectivas concentrações finais, conforme demonstrado na Tabela 4.

- 2,4 mL da solução 0,5M de CaCl₂·2H₂O (concentração final 0,18 g.L⁻¹)
- 2,4 mL da solução 0,5M de MgSO₄·7H₂O (concentração final 0,3 g.L⁻¹),
- 1,0 mL da solução de micronutrientes I (composição descrita na tabela 5)
- 1,25 mL da solução de micronutrientes II (composição descrita na tabela

5)

Tabela 4: Composição do meio mineral autotrófico

Componentes	Concentração (g.L⁻¹)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,235
NaNO ₂	0,326
KHCO ₃	0,5
KH ₂ PO ₄	0,027
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,18
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,3
Solução de Micronutrientes I	1,0 ml
Solução de Micronutrientes II	1,25 mL

Fonte: Dapena-Mora et al., 2004 e Van de Graaf et al., 1996

As soluções de micronutrientes I e II foram preparadas de acordo com Dapena-Mora et al (2004), e estão descritas na tabela 5.

Tabela 5: Composição das soluções de micronutrientes

Componentes	Concentração (g.L⁻¹) da solução I	Concentração (g.L⁻¹) da solução II
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	6,25	15
FeSO ₄	6,25	-
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	-	0,43
CoCl ₂ ·6H ₂ O	-	0,24
MnCl ₂ ·4H ₂ O	-	0,99
CuSO ₄ ·5H ₂ O	-	0,25
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	-	0,22
NiCl ₂ ·6H ₂ O	-	0,19
Na ₂ SeO ₃	-	0,08
H ₃ BO ₄	-	0,014

Fonte: Dapena-Mora et al., 2004.

Após a adição destas soluções, fluxionava-se a mistura de gases argônio/CO₂ 95/5%, sob condições de assepsia, por 45 minutos no meio de cultura para torná-lo anaeróbico, sendo 5 minutos na atmosfera do frasco.

As soluções de micronutrientes I e II, bem como as soluções estoque de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,5M) e de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5M) e os utensílios utilizados, também foram devidamente esterilizados a 120 °C em vapor úmido por 30 minutos e expostos à luz UV. Nestas soluções, previamente à esterilização, fluxionava-se Ar/CO_2 por 20 minutos, garantindo a anaerobiose nas mesmas. Estas soluções foram estocadas em frascos âmbar, a 4°C por 2 a 3 meses. Foi utilizada água destilada e deionizada para diluição e preparo das soluções.

A alimentação e descarga do reator foram feitas automaticamente por bombas dosadoras controladas por temporizadores programados. Para alimentação utilizou-se uma bomba Prominent Concept Plus com vazão de 83,3 ml h^{-1} . Para retirada do sobrenadante utilizou-se uma bomba Provitec DM5000 com vazão de 996 ml h^{-1} . As bombas e o shaker foram controlados por temporizadores Elcon.

A operação do reator de bateladas sequenciais foi realizada em dois ciclos para seleção das bactérias anammox segundo a Tabela 6. Inicialmente, meio de cultura previamente preparado, era dosado com vazão de 83,3 mL h^{-1} sob agitação contínua. A alimentação era seguida de um período de decantação do meio em que a agitação e alimentação foram pausadas para separação do sobrenadante e da biomassa sedimentada. A retirada do sobrenadante era realizada sem agitação e a bomba de descarte era acionada com vazão de 996 mL h^{-1} .

Tabela 6: Ciclos de enriquecimento das bactérias anammox

Ciclo	Horário	Detalhamento
1º Ciclo	9 - 14:30h	Alimentação e agitação
	14:30 - 15h	Decantação
	15 - 15:30h	Retirada do sobrenadante
2º Ciclo	15:30 - 21h	Alimentação e agitação
	21 - 8h	Agitação
	8 - 8:30h	Decantação
	8:30 - 9h	Retirada do sobrenadante

As concentrações de amônia e nitrito no final de cada batelada foram monitoradas semanalmente e esta etapa experimental se prosseguiu até constatação de atividade anammox (210 dias), quando então as análises foram realizadas duas vezes por semana até a estabilidade do desempenho da cultura em remoção de amônia (ARAÚJO et al., 2010). Quando necessário, o pH foi ajustado com soluções de NaOH e H₂SO₄ 0,1N.

Após 30 dias do início do processo passou-se a adicionar diariamente hidrazina (0,1 mM) e hidroxilamina (0,1 mM) no reator, esses compostos são intermediários no processo anammox e a presença pode acelerar a reação e diminuir o tempo do enriquecimento das bactérias (ARAÚJO et al., 2010).

3.7 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Após ser verificada estabilidade no desempenho da cultura microbiana na atividade anammox, as biomassas desenvolvidas na cultura enriquecida e nos reatores anaeróbios foram analisadas por técnicas moleculares PCR/DGGE para caracterização da diversidade microbiana no Laboratório de Microbiologia Ambiental da Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba.

As amostras do reator de enriquecimento e do reator anaeróbio do tratamento de piscicultura foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos até a obtenção de, ao menos, 5 mL de biomassa centrifugada em triplicata. Para extração do DNA e, a partir daí realizar o PCR e DGGE, foi feita uma amostragem composta das triplicatas de cada reator, anaeróbio e de enriquecimento.

DNA de cada amostra de biomassa foi extraído pelo método de Egli et al. (2003) e amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) usando iniciadores específicos para o gene para a subunidade 16S do RNA ribossomal de bactérias anammox e *Planctomicetos* de acordo com Schmid et al. (2005), Egli et al. (2001), Penton et al. (2006) e Van der Star et al. (2007).

Foi feita a caracterização da composição da comunidade bacteriana por sequenciamento em larga escala do gene RNA ribossomal 16S do enriquecimento das bactérias anammox pelo CPQBA (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas) da Universidade Estadual de Campinas. Para tanto foi extraído o DNA das amostras homogeneizadas

utilizando o PowerMax Soil DNA Isolation Kit (Mobio), de acordo com as instruções do fabricante. O sequenciamento em larga escala da região V1-V3 do gene RNA ribossomal 16S de bactérias foi realizado pela plataforma Illumina 300, com um total de 20.000 sequencias. Este serviço foi realizado pela Empresa MR DNA (Molecular Research LP, Texas, EUA).

Foram realizadas reações de PCR com o DNA total da comunidade microbiana extraído das amostras, utilizando o par de primers (oligonucleotídeos sintéticos) acoplado a um grampo com alto conteúdo de GC (341f-GC e 907r) (Muyzer et al., 1993; 1998), complementares a regiões conservadas do gene RNAr 16S do Dominio Bacteria.

Os amplicons (produtos de PCR) foram sujeitos à eletroforese em gel com gradiente de agentes desnaturantes no sistema Ingeny phor U-2 (Ingeny International BV®), onde 15 μ L de cada amostra foram aplicados em gel de poliacrilamida 6% a uma voltagem de 100 V por 15 horas. O gradiente desnaturante (uréia e formamida) do gel utilizado para separação dos fragmentos de DNA foi de 40% a 65%. Após a eletroforese, o gel foi corado com 10 mL de solução contendo 4 μ L de SYBR Gold (Invitrogen®) em tampão TAE 1X por 1 hora no escuro.

As imagens dos géis com os perfis de bandas polimórficos foram analisadas pelo software Bionumerics (version 6.6; Applied Maths, Kortrijk, Bélgica), após conversão e normalização dos perfis utilizando como padrão as bandas presentes no marcador molecular. Os perfis de bandas foram combinados em uma única imagem e analisados por três métodos: 1) por bandas, onde as bandas foram automaticamente selecionadas pelo programa e visualmente inspecionadas e corrigidas, usando parâmetros default e o coeficiente de DICE; 2) pelo coeficiente de Jaccard com tolerância entre bandas de 5%; e 3) por curva, utilizando o coeficiente de correlação de Pearson. Neste último caso, não apenas a presença da banda é levada em consideração na análise, mas também a intensidade da mesma. Em todos os casos foi utilizado o algoritmo UPGMA para a construção do dendrograma de similaridade.

As imagens dos géis com os perfis de bandas polimórficos foram analisadas pelo software Bionumerics (version 6.6; Applied Maths, Kortrijk,

Bélgica), após conversão e normalização dos perfis utilizando como padrão as bandas presentes no marcador molecular. Os perfis de bandas foram combinados em uma única imagem e foi então gerada uma matriz de presença e ausência das bandas para cada uma das amostras analisadas. Esta matriz foi enviada ao cliente por e-mail em arquivo Excel.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os valores médios de temperatura, pH, oxigênio dissolvido, turbidez, cor e condutividade elétrica da água do aquário durante o período experimental estão dentro dos valores recomendados para a espécie (Boyd, 1990). Os mesmos parâmetros para os reatores anaeróbios e reator aeróbio foram medidos e apresentados na tabela abaixo.

Tabela 7: Valores de temperatura ($^{\circ}\text{C}$), pH, OD (mg.L^{-1}), turbidez (NTU), cor e condutividade ($\mu\text{S.cm}^{-1}$) no aquário, reatores anaeróbios e reator aeróbio.

	Aquário	Reator Anaeróbio	Reator Aeróbio
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	24 \pm 1,8	24 \pm 1,7	24 \pm 1,8
pH	7,27 \pm 0,29	7,25 \pm 0,23	7,3 \pm 0,24
OD (mgOD.L^{-1})	3,4 \pm 1,06	0,5 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1
Turbidez (NTU)	2,32 \pm 2,04	1,84 \pm 0,78	0,82 \pm 0,49
Cor	32 \pm 46	14 \pm 12	11 \pm 7
Condutividade ($\mu\text{S.cm}^{-1}$)	340 \pm 76	319 \pm 137	318 \pm 132

Pode ser observado que os valores de turbidez e cor reduzem após o tratamento anaeróbio e aeróbio pela retenção dos sólidos e partículas suspensas na biomassa dos reatores. Os demais parâmetros são mantidos praticamente iguais, porém, o OD é reduzido para atender a situação anaeróbia do reator de tratamento.

4.1 EFICIENCIA DO SISTEMA DE REATORES ANAERÓBIO-AERÓBIO EM SÉRIE NO TRATAMENTO DE EFLUENTE DE PISCICULTURA

A eficiência da combinação do sistema foi monitorada por meio das análises de DQO, nitrogênio total, carbono total, carbono inorgânico e carbono orgânico, amônia, nitrito, nitrato e sólidos totais.

Os gráficos a seguir mostram o aporte desses poluentes nas unidades de tratamento em relação à carga volumétrica.

O gráfico 1 apresenta o aporte de DQO no aquário, reatores anaeróbios e reator aeróbio em unidades de carga volumétrica de DQO ($\text{g.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$) durante os 300 dias de operação do sistema.

Durante os primeiros 60 dias de operação a taxa de carregamento orgânico nos dois reatores foi maior que nos outros meses de operação devido à operação do aquário com maior taxa de renovação de água resultando em maior vazão para o sistema de tratamento de efluentes. Durante esse período o TDH no sistema foi de 10,8 horas, menor que o restante do tratamento (27 horas). Essa concentração de carga orgânica nos reatores foi causada pela própria vazão alta, que carregou mais efluente para o sistema e também pelo aumento da densidade de biomassa no sistema devido ao crescimento dos animais, além do aumento da quantidade de ração oferecida diariamente. Esse aumento também foi observado para o aporte de nitrogênio, carbono total, nitrito, nitrato e sólidos totais.

Segundo Bowen (1987), para alevinos e juvenis, o nível de proteína bruta na ração estimado para máximo ganho de peso fornece excesso desse nutriente, reduzindo a eficiência de sua utilização, já que parte não é utilizada para a síntese proteica e, dessa forma, o valor estimado para retenção está sempre abaixo do nível encontrado para máximo ganho de peso, contribuindo para o aumento de matéria orgânica, nutrientes e sólidos no efluente de piscicultura.

Após os dois primeiros meses de cultivo o número de animais confinados foi reduzido para manter a densidade pretendida do aquário, 5 g L^{-1} e, portanto, o aporte de matéria orgânica, nutrientes e sólidos ao sistema de tratamento de efluentes também foi reduzido. Porém houve um aumento gradativo durante os próximos meses.

Na tabela 8 é apresentado a biomassa inicial, final e o ganho de peso dos animais após 5 meses de observação da produção intensiva no aquário. Foi quantificado o total de ração consumido em 1 mês de produção intensiva,

totalizando 1245,5 gramas de ração, média de 50g/dia de ração consumida. Neste mesmo período foi feita a pesagem (biometria) dos animais semanalmente desde o início do sistema e após 5 meses de observação.

Com a média de peso inicial e final e o consumo de ração diário foi possível observar que houve um ganho de 33,5g de peso por dia de experimento dos animais com alimentação a base de proteínas. O resultado está abaixo do esperado para a tilápia do Nilo, podendo ser explicado pelo confinamento do aquário e o espaço reduzido para crescimento dos animais de acordo com Kubitza (2000).

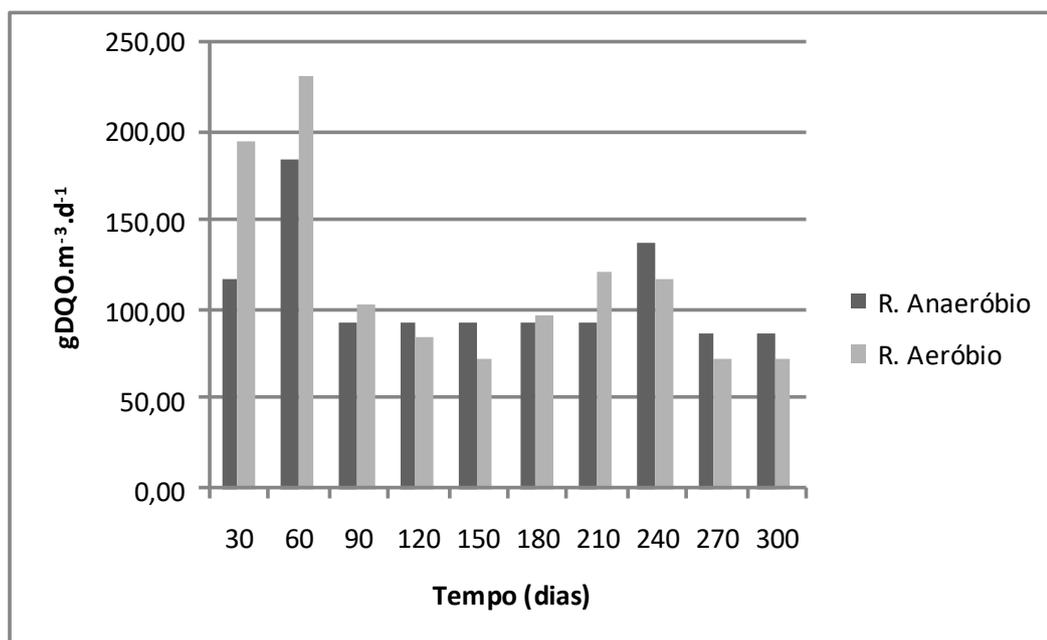
Para o cálculo do Índice de Conversão Alimentar foi utilizado o consumo de ração do animal no período de um mês/ganho de peso neste período, o valor resultante foi de 1,88. Isto equivale a dizer que, para cada grama de ganho de peso do peixe foram necessários 1,88 g de ração, valor está próximo do esperado para a espécie (1,4 á 1,8) Kubitza (2000).

Com esse cálculo é possível dizer que 0,88g de ração não foi aproveitado pelos peixes, transferindo para a água de cultivo as proteínas e nutrientes que a compunham, contribuindo para o aumento da carga de matéria orgânica e nitrogenica na água.

Tabela 8: Biomassa e ganho de peso dos peixes após 5 meses de cultivo

Biomassa (g)	
Biomassa inicial	4353
Biomassa final	8372,5
Ganho de Peso (g/dia)	33,49

Gráfico 1: Taxa de carregamento orgânico volumétrico (g DQO.m⁻³.d⁻¹) nos reatores anaeróbios e no reator aeróbio, durante 300.



O aporte de nitrogênio total durante 270 dias de operação do sistema é apresentado no gráfico 2, e teve o mesmo comportamento que a DQO, um aporte maior de N nos dois primeiros meses de operação comparado aos outros meses.

Esse aumento também pode estar relacionado á inoculação do sistema anaeróbio. A biomassa utilizada é rica em nutrientes e pode ter sido carregada para o reator aeróbio, onde apresentou maior carga de N. Esse comportamento também é observado para aporte de DQO, CT e ST. Nos últimos dias de operação do sistema foi observado um aumento gradativo do aporte de N nas unidades de tratamento devido à alta densidade de animais no aquário e, portanto, aumento da concentração de carga orgânica e de nitrogênio no efluente.

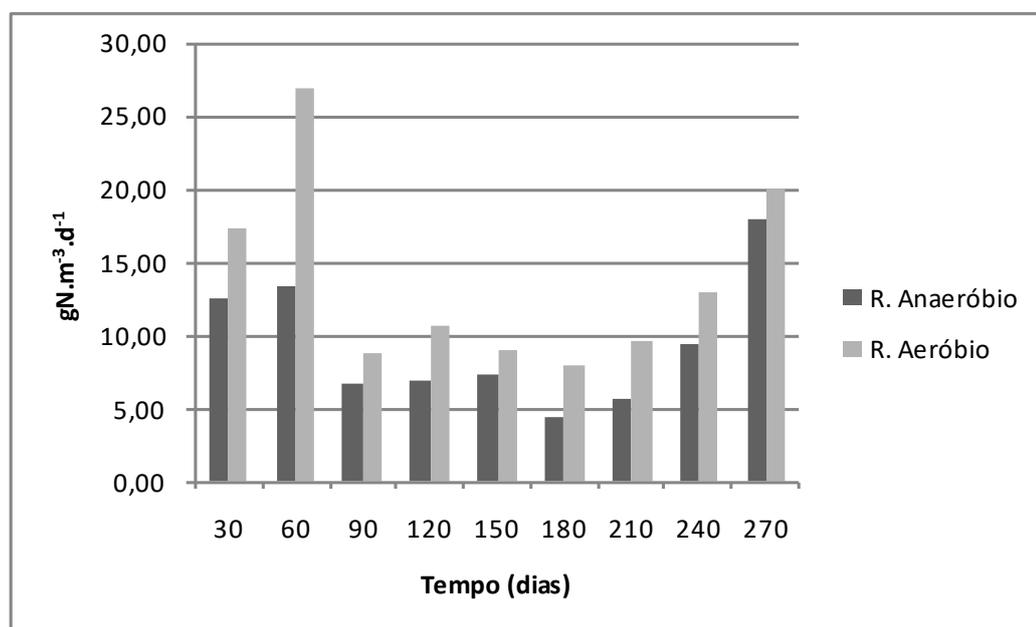
Houve uma tendência ascendente para as concentrações de nitrogênio e sólidos no efluente do aquário durante o período experimental. Essas alterações foram provavelmente associadas ao aumento da oferta de ração, devido ao ganho de peso do peixe e à decomposição da matéria orgânica. No final do experimento, a quantidade de alimento disponibilizado aos peixes foi três vezes maior do que no início, enquanto que em média os animais apresentam ganho médio de peso individual de 200g. Baccarin e Camargo (2005) e Henry Silva e Camargo (2006)

também observaram correlações positivas entre o peso corporal dos peixes e os aumentos nas concentrações de nitrogênio total e sólidos suspensos na água.

Baccarin e Camargo (2005) observaram que, em geral, houve um aumento médio de 83% nos valores de sólidos em suspensão na água efluente das lagoas de produção de peixes ao estudarem a caracterização e avaliação do impacto do fornecimento de ração na água de cultivo de tilápia do Nilo (*Oreochromis Niloticus*). Valores de nitrogênio total não variaram significativamente durante o experimento de Baccarin e Camargo (2005), já para Henry Silva e Camargo (2006) houve um aumento de 70% no nitrogênio total com a produção intensiva de peixes.

Henry Silva e Camargo (2006) avaliaram a eficiência de macrófitas aquáticas no tratamento de efluente de uma piscicultura intensiva de tilápias e também encontraram maior taxa de carregamento de nitrito e nitrato após o tanque de produção, com aumento de 36% e 10%, respectivamente.

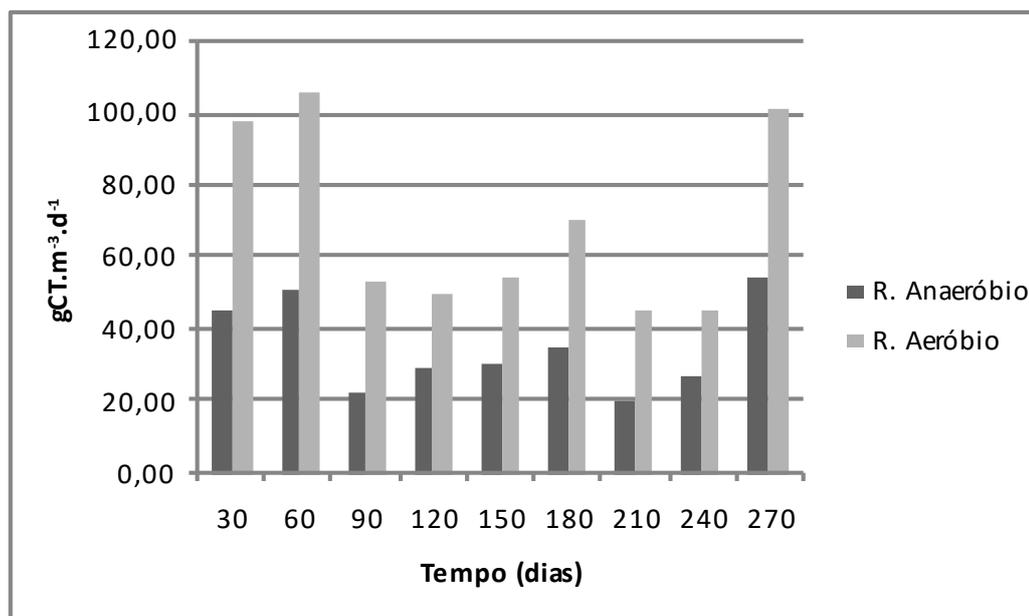
Gráfico 2: Taxa de carregamento volumétrico de Nitrogênio ($\text{gN.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$) no reator anaeróbico e reator aeróbico, durante 270 dias de operação.



O gráfico 3 diz respeito ao aporte de carbono total no aquário e nas unidades de tratamento durante 270 dias de operação. O carbono total apresentou maior aporte no reator aeróbico nos primeiros 30 dias de operação,

que pode ser explicado pelo carregamento do inoculo (rico em matéria orgânica) no reator anaeróbico. Nos últimos dias houve um aumento significativo no aporte de carbono total devido à alta densidade de animais no aquário, ao aumento no suprimento de ração e, conseqüentemente, maior concentração de matéria orgânica no efluente.

Gráfico 3: Taxa de carregamento volumétrico de carbono total (orgânico e inorgânico) ($\text{gCT} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$) reator anaeróbico e reator aeróbico, durante 270 dias de operação.



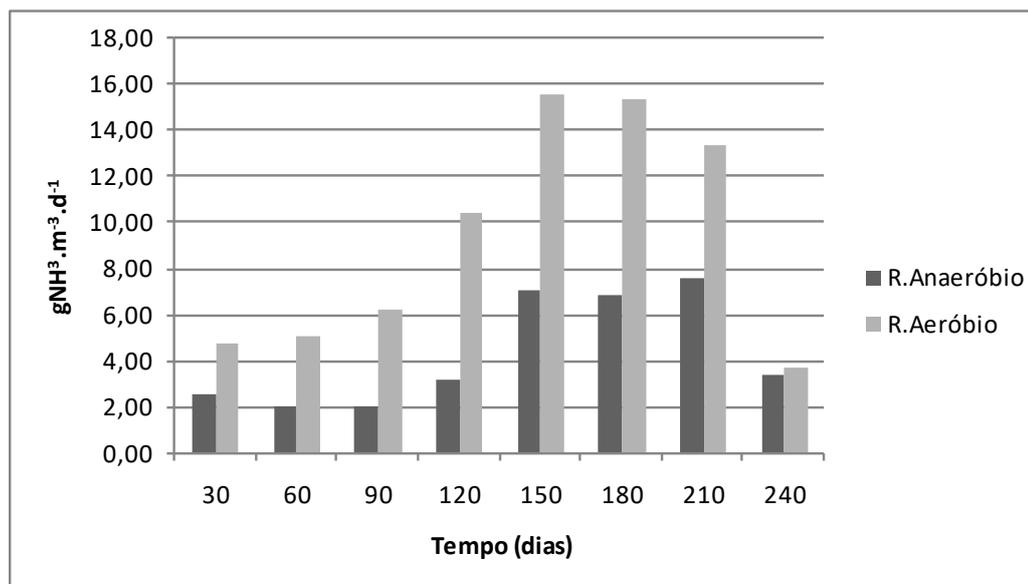
O gráfico 4 apresenta o aporte de amônia nas unidades de tratamento durante 240 dias de operação do sistema. O comportamento em relação à amônia foi diferentemente do observado para os outros compostos, baixa carga nos primeiros meses de operação e aumento gradativo para então uma queda significativa no ultimo mês de medição. A produção de amônia nos reatores anaeróbios está relacionado com a degradação da matéria orgânica.

De acordo com Chernicharo (2016) o nitrogênio é o nutriente inorgânico requerido em maiores concentrações para o crescimento dos microorganismos. Em condições anaeróbias, o nitrogênio, nas formas de nitrito e nitrato, não se encontra disponível para o crescimento bacteriano, uma vez que este é reduzido a nitrogênio gás e liberado na atmosfera. A amônia e a porção de nitrogênio

orgânico, liberado durante a degradação da matéria orgânica, são as principais fontes de nitrogênio utilizadas pelos microorganismos.

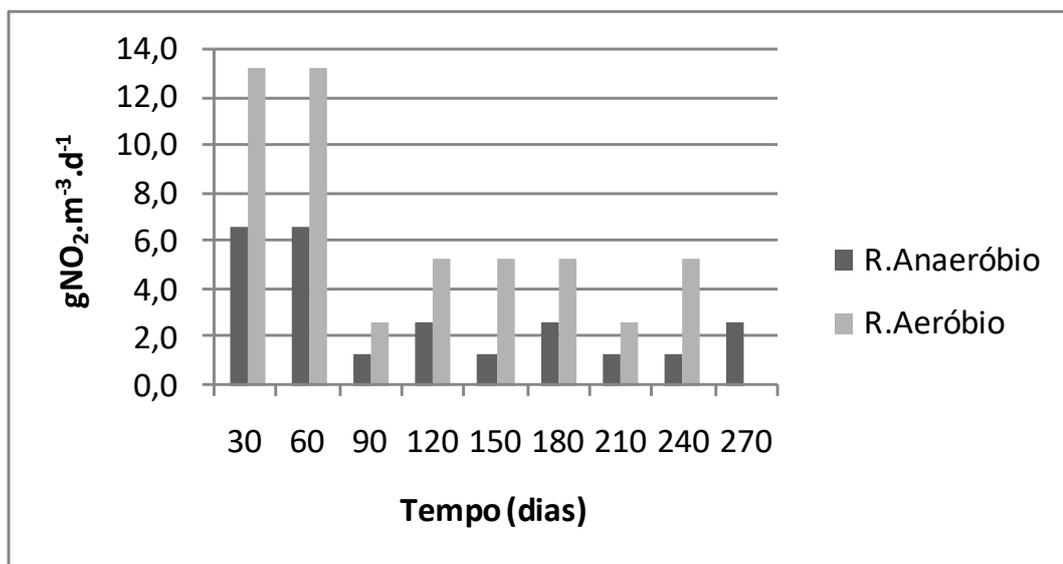
É possível observar essa relação entre o consumo de DQO e a produção de NH_3 no gráfico 18.

Gráfico 4: Taxa de carregamento volumétrico de Amônia ($\text{gNH}_3 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$) no reator anaeróbio e no reator aeróbio, durante 240 dias de operação.



O gráfico 5 apresenta a taxa de carregamento de nitrito no reator anaeróbio e no reator aeróbio em 270 dias de operação do sistema. O nitrito se comportou semelhantemente aos outros compostos, elevada taxa de carregamento nos dois primeiros meses, principalmente no reator aeróbio, e se manteve estável nos outros meses. A alta taxa de carregamento nos primeiros meses também está relacionada à maior vazão do sistema e conseqüentemente, maior carregamento deste composto para os sistemas de tratamento. Depois do tratamento anaeróbio a taxa de carregamento de nitrito foi significativamente maior, que pode estar relacionada com o processo de desnitrificação, que prevê a redução da amônia via produção de nitrito. A atividade anammox está relacionada com o fato de que bactérias heterótrofas inicialmente utilizam nitrito como receptor de elétrons, mas quando eles mudam para nitrato o nitrito produzido pode ser usado por bactérias desnitrificantes (MOZUMDER ET AL.2013).

Gráfico 5: Taxa de carregamento volumétrico de Nitrito ($\text{gNO}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$) no reator anaeróbio e no reator aeróbio, durante 270 dias de operação.



A variação da taxa de carregamento de nitrato está representada no gráfico 6, nos dois primeiros meses, maior vazão, o nitrato também apresentou maior taxa de carregamento e se estabilizou nos próximos meses com pouca ou nenhuma diferença entre reator anaeróbio e o aeróbio em 270 dias de operação.

Gráfico 6: Taxa de carregamento volumétrico de Nitrato ($\text{gNO}_3 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$) no reator anaeróbio e no reator aeróbio, durante 240 dias de operação.

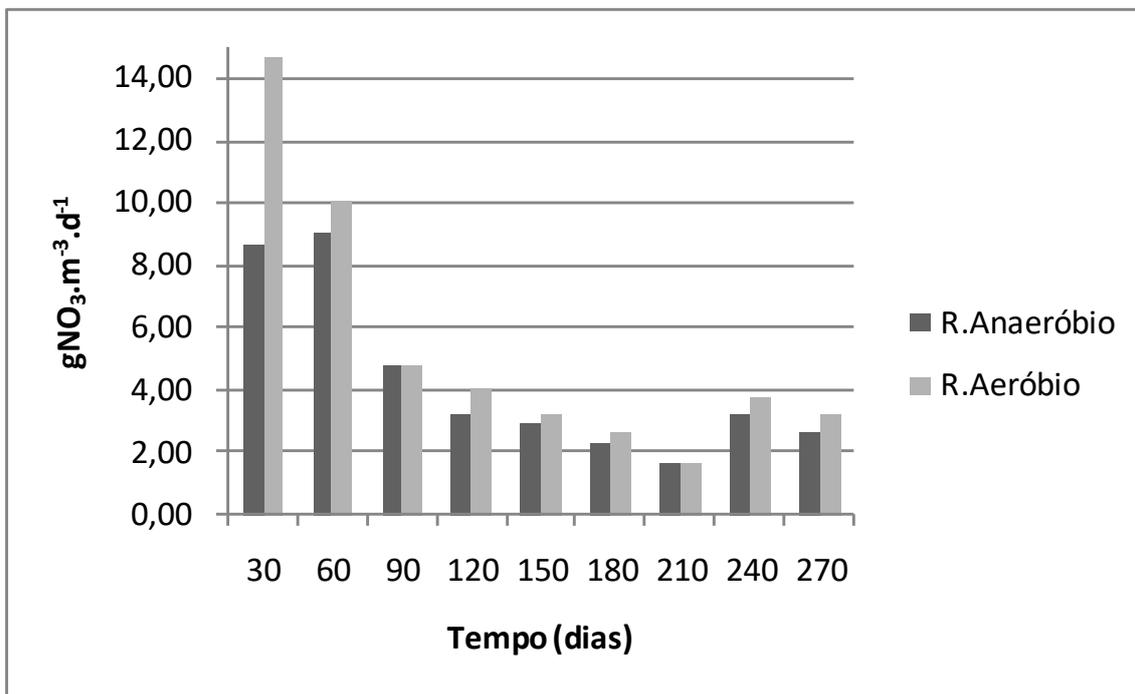
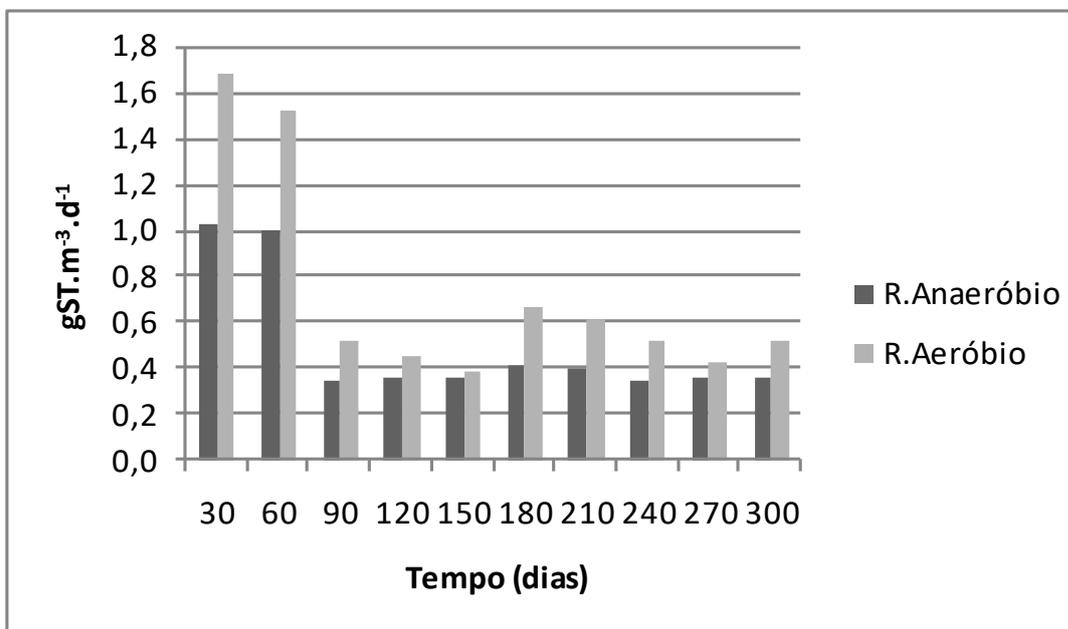


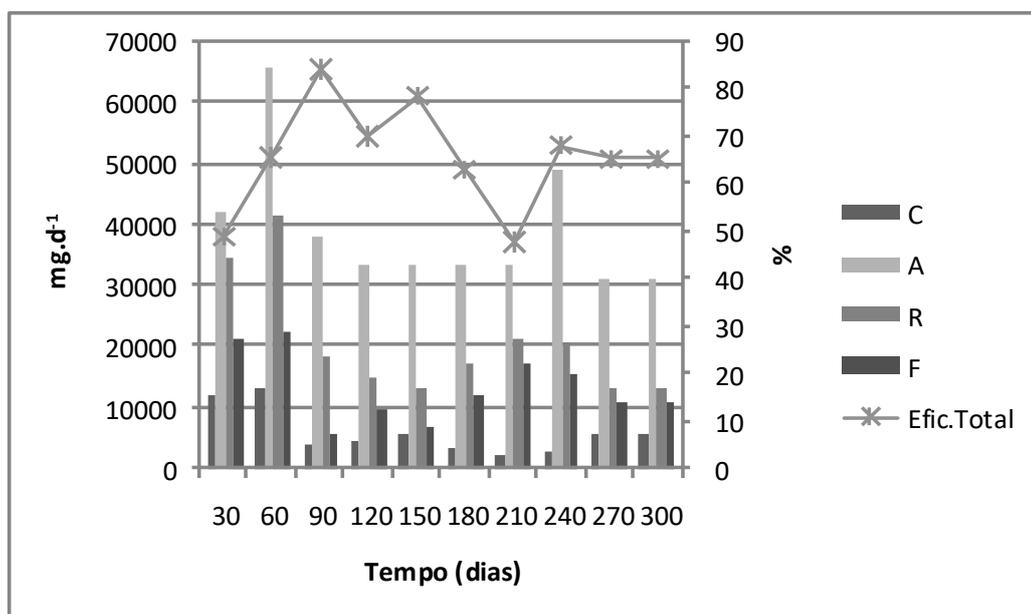
Gráfico 7: Taxa de carregamento volumétrico de Sólidos Totais ($\text{gST} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$) no reator anaeróbio e no reator aeróbio, durante 240 dias de operação.



A taxa de carregamento de sólidos totais pode ser observada pelo gráfico 7, nos dois primeiros meses de maior vazão houve também maior taxa de carregamento de sólidos totais para o sistema de tratamento, podendo ser destacado maior taxa no reator aeróbio. Nos meses seguintes o carregamento foi praticamente constante, mantendo a taxa maior no reator com baixo oxigênio comparado com o reator anaeróbio.

Os gráficos a seguir mostram a carga aplicada (mg.d^{-1}) de DQO, nitrogênio total, carbono orgânico total, carbono total, carbono inorgânico total, sólidos totais, sólidos suspensos voláteis, amônia, nitrito e nitrato na caixa de abastecimento (C), aquário (A), após reator anaeróbio (R) e após reator aeróbio, ou seja, final do sistema de tratamento (F). Os gráficos mostram também a eficiência de remoção (%) do sistema de tratamento no período de operação em cada parâmetro.

Gráfico 8: Carga de DQO (mg.d^{-1}) na caixa de abastecimento, no aquário, nos reatores anaeróbios e após reator aeróbio, e eficiência total de remoção de DQO (%) durante 300 dias de operação.



O gráfico 8 apresenta a carga de DQO nos pontos de coleta C, A, R e F e a eficiência de todo o sistema na remoção da matéria orgânica ao longo de 300 dias de operação. É possível observar um aumento considerável da matéria orgânica no aquário comparado a caixa de abastecimento, como era esperado devido à

introdução de ração e aos dejetos dos animais. Após o reator anaeróbio a DQO sofre uma redução considerável, cerca de 47% remoção, em média. Após o último reator, aeróbio, essa remoção é ainda maior, cerca de 66% de remoção média do sistema. Hussar e Bastos (2008) tratando efluentes de piscicultura com macrófitas aquáticas alcançaram uma redução média de 78% de DQO, considerando satisfatória para o sistema.

Correia et al. (2012) ao avaliarem o desempenho de reatores aeróbios de leito fluidizado com circulação interna na remoção de matéria carbonácea tratando diferentes águas residuárias encontraram remoção de 75% do reator tratando efluente de piscicultura. Outros autores, como Davidson et al. (2008) reportaram eficiências de remoção acima de 60% em reatores de leito fluidizado bifásicos com areia como meio suporte e controle da espessura do biofilme para tratamento de efluente de piscicultura.

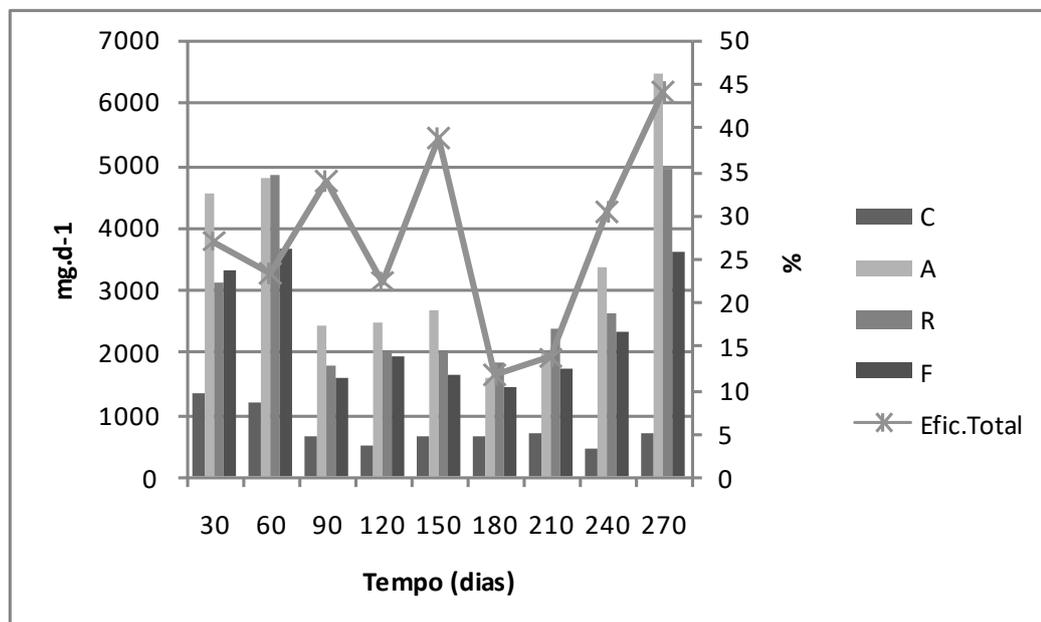
O gráfico 9 representa a carga de NT nos pontos C, A, R e F e eficiência de todo o sistema de tratamento na remoção no nitrogênio total nos 270 dias de operação. Houve um incremento visível de NT no aquário em relação a caixa de abastecimento. Nos reatores anaeróbios foi removido 16% do NT e em todo sistema a remoção média foi de 30%.

A combinação dos reatores anaeróbios e o reator aeróbio contribuíram não só para a transformação do nitrogênio em nitrato e nitrito mas, também, para complementar a remoção de matéria carbonada, visto que a relação carbono/nitrogênio foi de 6,54, conforme Tabela 9, o que classifica o processo como combinado, ou seja, ocorre remoção simultânea de carbono e de nitrogênio, segundo Metcalf e Eddy (1991).

Tabela 9: Relação C/N das concentrações de DQO e NT dos reatores anaeróbios e do reator aeróbio.

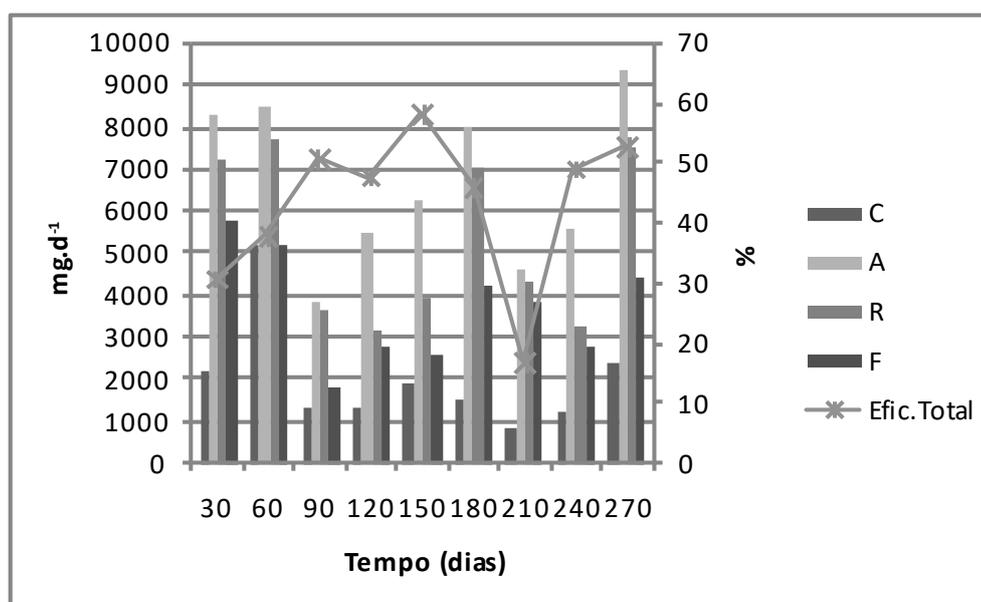
Aporte Médio	Aquário	Reatores Anaeróbios	Reator Aeróbio
DQO (mg.L ⁻¹)	77,15	35,13	23,63
NT (mg.L ⁻¹)	4,93	4,52	3,61
Relação C/N	15,64	7,77	6,54

Gráfico 9: Carga de Nitrogênio Total (mg.d^{-1}) na caixa de abastecimento, no aquário, nos reatores anaeróbios e após o reator aeróbio, e eficiência total de remoção de NT (%) durante 270 dias de operação.



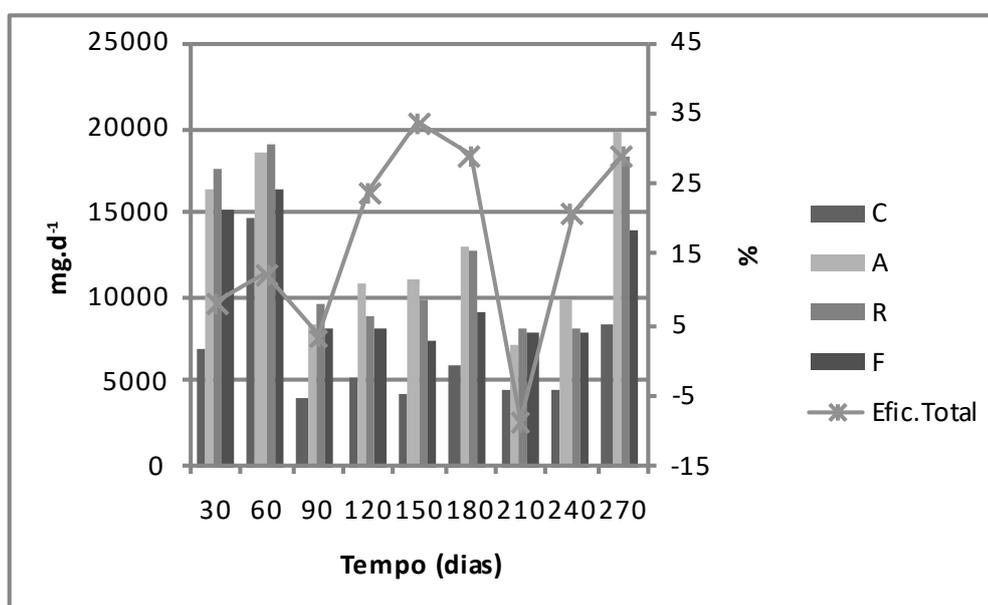
A carga de COT e a eficiência dos reatores anaeróbios e aeróbio são apresentadas no gráfico 10. A eficiência em remoção de Carbono Orgânico Total nos reatores anaeróbios é de 20% em média e, a eficiência em remoção de COT em todo o sistema foi 44% em média.

Gráfico 10: Carga de Carbono Orgânico Total (mg.d^{-1}) na caixa de abastecimento, no aquário, nos reatores anaeróbios e após o reator aeróbio, e eficiência total de remoção de COT (%) durante 270 dias de operação.



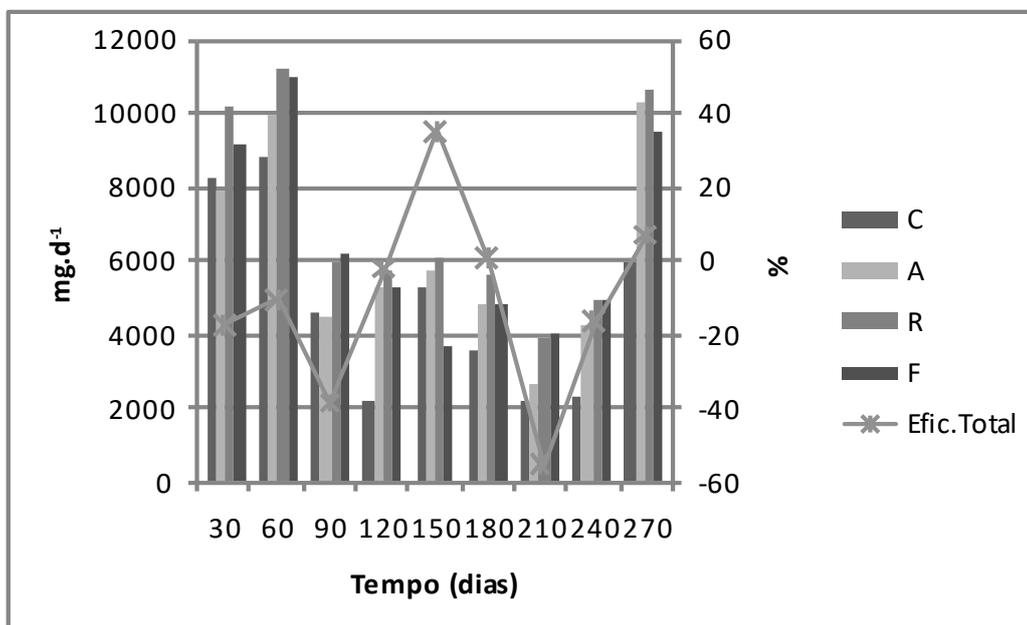
O Gráfico 11 apresenta a carga de carbono total nos pontos de coleta e a eficiência de remoção ao longo de 270 dias de operação. De acordo com a tabela 8 a eficiência média do reator anaeróbico foi de apenas 2%, ao final do sistema essa remoção média foi de 17%, sendo maior responsável o reator aeróbio.

Gráfico 11: Carga de Carbono Total (mg.d^{-1}) na caixa de abastecimento, aquário, reatores anaeróbios e após reator aeróbio, e eficiência total de remoção de CT (%) em 270 dias de operação.



O gráfico 12 apresenta carga de carbono inorgânico nos quatro pontos de coleta e a eficiência global do sistema. Pode ser observado um incremento do CI no sistema, que pode estar relacionado com a degradação da parte orgânica do carbono.

Gráfico 12: Carga de Carbono Inorgânico ($\text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$) na caixa de abastecimento, aquário, reator anaeróbico e após reator aeróbico, e eficiência total de remoção de CI (%) em 270 dias de operação.



Tanto DQO, NT, COT, CT e CI sofreram uma queda na eficiência entre o 180° e o 210° dia, que correspondem aos meses de dezembro e janeiro.

O gráfico 13 mostra a carga de ST nos pontos de coleta e a eficiência de remoção global do sistema durante 270 dias de operação. É possível observar um aumento significativo dos sólidos no aquário, em relação à caixa de abastecimento devido aos dejetos dos peixes. Na tabela 9 são mostradas as eficiências do reator anaeróbico e do reator aeróbico, a eficiência de remoção de ST média global foi de 29%.

A carga de sólidos em suspensão em C, A, R e F e a eficiência do sistema de tratamento combinado estão representados no gráfico 14. Devido à produção de tilápia aumentou consideravelmente o teor de SSV em relação à concentração na água de abastecimento. Nos reatores anaeróbios a redução de SSV foi, em média, 58%, e o sistema todo removeu cerca de 63% de SSV.

Gráfico 13: Carga de Sólidos Totais (mg.d^{-1}) na caixa de abastecimento, aquário, reatores anaeróbios e após reator aeróbio, e eficiência total de remoção de ST (%) em 270 dias de operação.

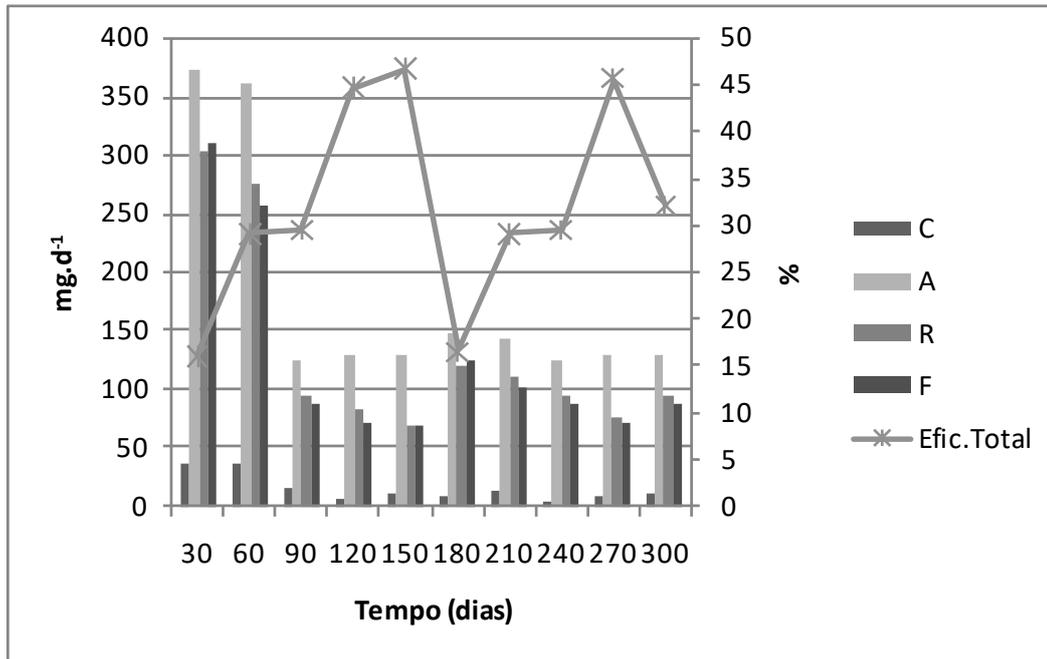
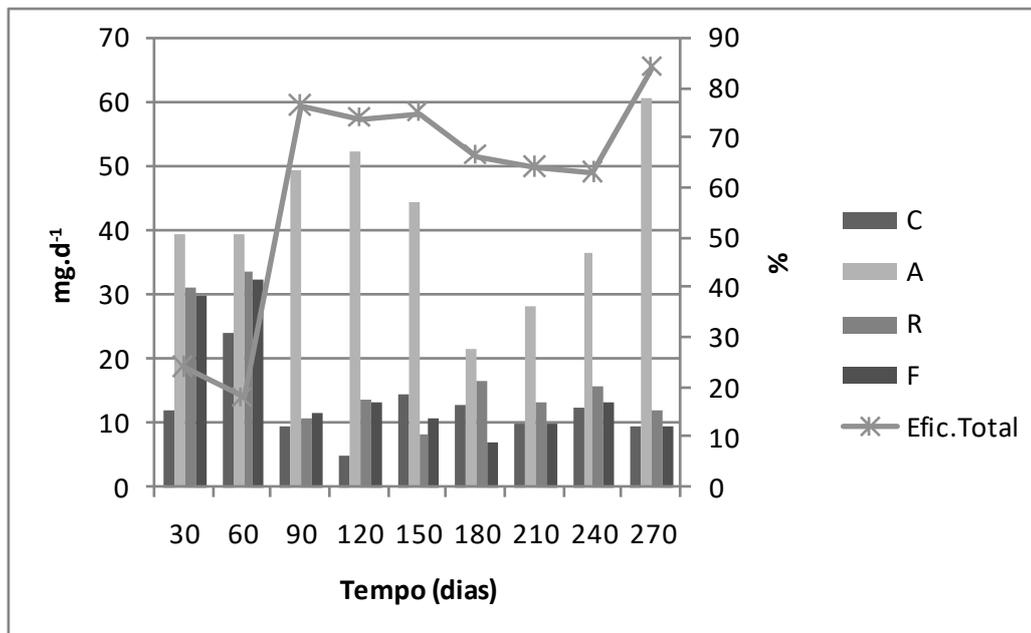


Gráfico 14: Carga de Sólidos Suspensos Voláteis (mg.d^{-1}) na caixa de abastecimento, aquário, reatores anaeróbios e reator aeróbio, e eficiência total de remoção de SSV (%) em 270 dias de operação.



A carga de amônia em todo o sistema e a eficiência de remoção pode ser observada no gráfico 15. Com a satisfatória remoção de DQO houve, conseqüentemente, um aumento na produção de amônia nos reatores de anaeróbios. Isso pode ser observado pelo gráfico 18, onde a remoção de DQO está acompanhando a geração de amônia. A não eficiência na remoção deste composto também pode estar relacionado à baixa concentração no efluente a ser tratado. Zamboni et al. (1997), Henry-Silva e Camargo (2006) e Mohedano (2004) sugerem uma carga maior de amônia do que as encontradas neste ensaio.

O gráfico 16 apresenta os dados de nitrito para carga e eficiência nos dias de operação. Não houve remoção satisfatória de nitrito no sistema, em alguns momentos ele pode ter sido gerado pela nitrificação no reator aeróbio. Já o nitrato, apresentado no gráfico 17, apresentou uma remoção média de 38% nos reatores anaeróbios e 22% no final do sistema, mostrando que houve produção de nitrato no reator aeróbio.

De acordo com Scheeren et al (2011) Os substratos amônio e nitrito e até mesmo o subproduto nitrato, também podem provocar certa inibição no processo, dependendo da concentração em que se encontram no meio. As concentrações em que tais compostos provocam a inibição ou diminuição da eficiência do processo anammox, variam muito. Isto ocorre em virtude da quantidade de substrato de que o processo necessita pois, para que haja a reação sem haver a inibição, depende da espécie de bactéria utilizada, do tipo de reator, do tipo de alimentação e das condições físico-químicas oferecidas ao processo, dentre outros (Zhu et al., 2008).

Apesar dos dados poucos satisfatórios de nitrito e nitrato a sua relação (NO_3/NO_2) no sistema estava próxima do esperado para reatores anaeróbios, ou seja, próximos de 1, de acordo com a tabela 9.

Tabela 10: Relação NO_3/NO_2 na saída reatores anaeróbios e reator aeróbio.

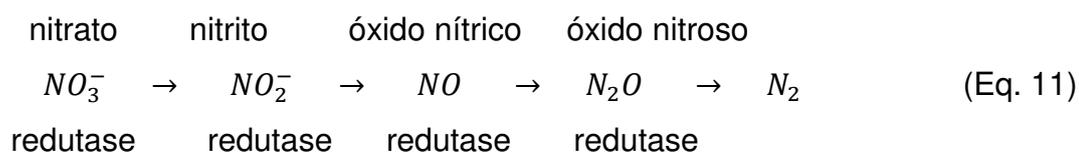
Reator Anaeróbio		Reator Aeróbio	
NO_3	NO_2	NO_3	NO_2
2640	2400	3000	3600
1800	2400	3480	2400

864	480	960	960
720	960	816	1440
576	960	576	480
480	960	336	480
288	480	288	480
672	960	720	960
576	0	528	480
Média da Relação	0,85	Média da Relação	0,91

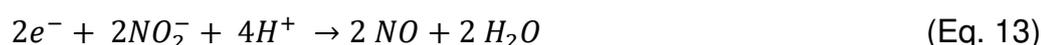
A desnitrificação é um processo de respiração na ausência de oxigênio livre, no qual o nitrato (ou nitrito) serve como acceptor de elétrons. O nitrato, NO_3^- , é reduzido a óxido nítrico, NO , e então a nitrogênio gasoso, N_2 , que escapa para a atmosfera. Neste processo ocorre a redução biológica de nitrato (ou nitrito) para nitrogênio molecular tendo-se material orgânico como redutor (AUN, 2007).

O nitrato prontamente substitui o oxigênio como acceptor final de elétrons. A diferença está na transferência de elétrons dos citocromos, onde a enzima redutase específica é substituída pela enzima redutase de nitrato, a qual catalisa a transferência final de elétrons para o nitrato ao invés do oxigênio (EKAMA E MARAIS, 1997).

Segundo Aun (2007) a desnitrificação é essencialmente um processo de quatro etapas:



Cada etapa pode ser representada por uma reação onde e- representa os elétrons transferidos do substrato orgânico conforme as equações a seguir:



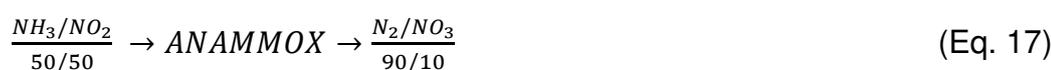
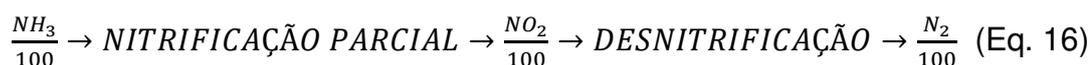
De acordo com a Equação 12 a relação $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ é igual a 1.

A tabela 10 mostra a relação NH_3/NO_3 na saída dos reatores anaeróbios e no reator aeróbios de acordo com a relação do processo Canon, Equação 18.

Tabela 11: Relação NH_3/NO_3 na saída reatores anaeróbios e reator aeróbio.

Reator Anaeróbio		Reator Aeróbio	
NH_3	NO_3	NH_3	NO_3
848	2640	935	3000
918	1800	1203	3480
1127	864	1391	960
1872	720	2400	816
2800	576	3376	576
2760	480	2616	336
2400	288	2016	288
672	672	1080	720
6624	576	1776	528
Média da Relação	4	Média da Relação	3,4

De acordo com Genilda (2015) a relação dos compostos nitrogenados para nitrificação parcial+desnitrificação, anammox e canon seguem a relação abaixo descrita. Na nitrificação parcial a relação amônia/nitrito é igual a 1. No processo anammox a relação amônia/nitrito é igual a 1; e no Canon a relação amônia/nitrato é igual a 10. Na tabela 9 é possível analisar que a relação amônia/nitrato nos reatores anaeróbios e no reator aeróbio não apresentou a melhor relação para anammox, porém se aproximou da relação para o processo Canon em relação a disponibilidade desses compostos.





Ganigué et al. (2007), estudando a oxidação parcial da amônia presente em lixiviado de aterro sanitário para a obtenção da relação amônia/nitrito necessária à implementação do processo ANAMMOX, verificaram que a relação NH_3/NO_2 do processo anammox deve ser igual a 1, concentrações elevadas de amônia podem inibir o processo. De acordo com a tabela 12 a relação amônia/nitrito foi de 2,4 na entrada do reator anaeróbio e 2,0 na saída do reator anaeróbio. Essa relação não favoreceu o processo Anammox no reator anaeróbio.

Tabela 12: Relação NH_3/NO_2 na saída do aquário e dos reatores anaeróbios.

Aquário		Reator Anaeróbio	
NH_3	NO_2	NH_3	NO_2
848	2400	935	3600
918	2400	1203	2400
1127	480	1391	960
1872	960	2400	1440
2800	960	3376	480
2760	960	2616	480
2400	480	2016	480
672	960	1080	960
6624	0	1776	480
Média da Relação	2,4	Média da Relação	2,0

Gráfico 15: Carga de Amônia (mg.dia^{-1}) no aquário, reatores anaeróbios e reator aeróbio, e eficiência total de remoção de NH_3 (%) em 270 dias de operação.

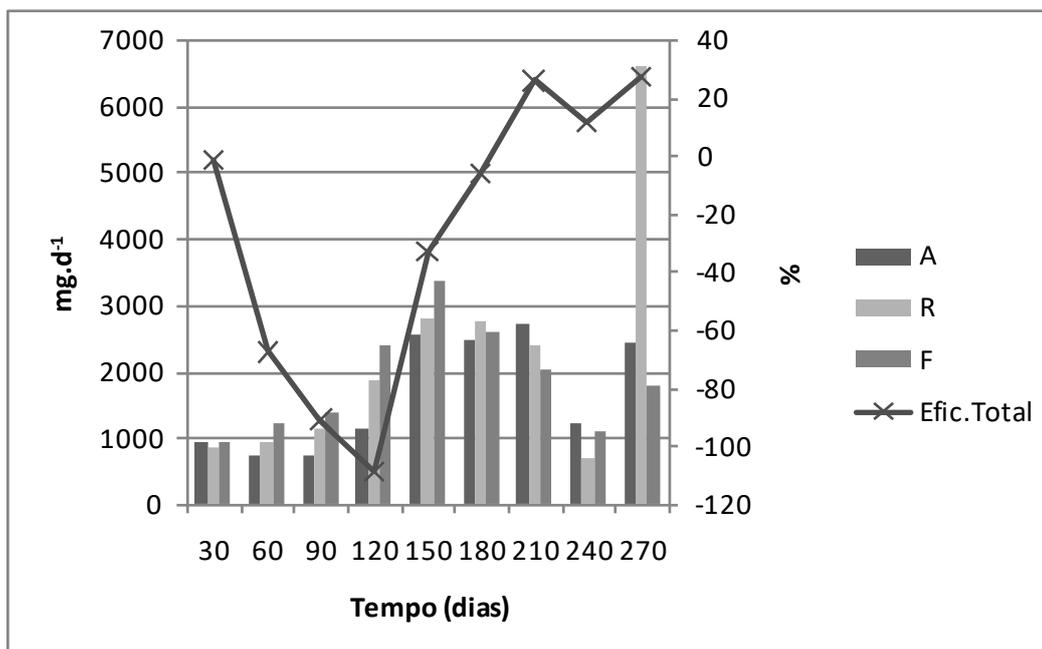


Gráfico 16: Carga de Nitrito (mg.d^{-1}) no aquário, reatores anaeróbios e reator aeróbio, e eficiência total de remoção de NO_2 (%) em 240 dias de operação.

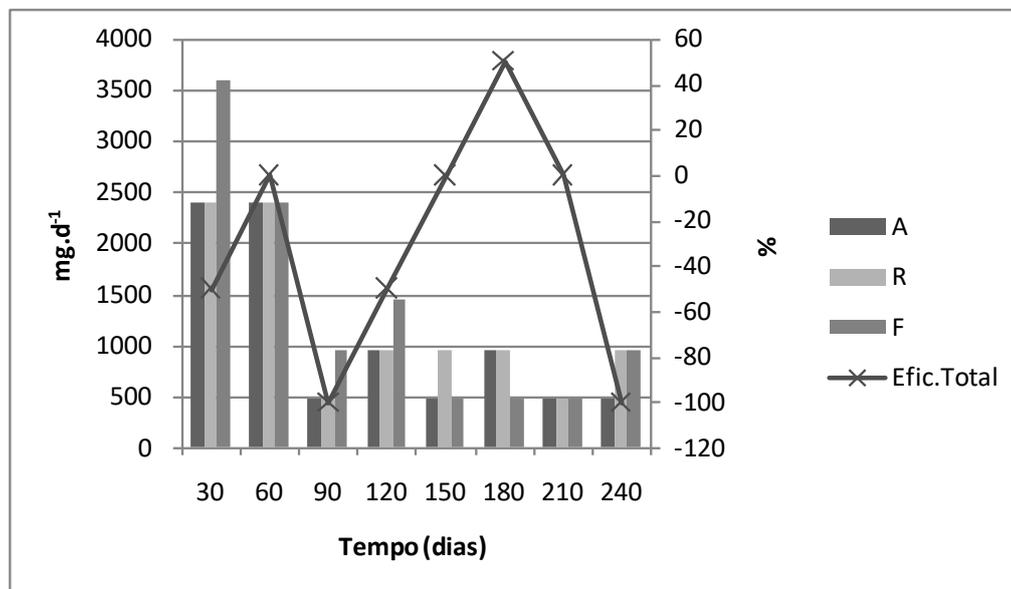


Gráfico 17: Carga de Nitrato (mg.d^{-1}) no aquário, reatores anaeróbios e reator aeróbio, e eficiência total de remoção de NO_3 (%) em 270 dias de operação.

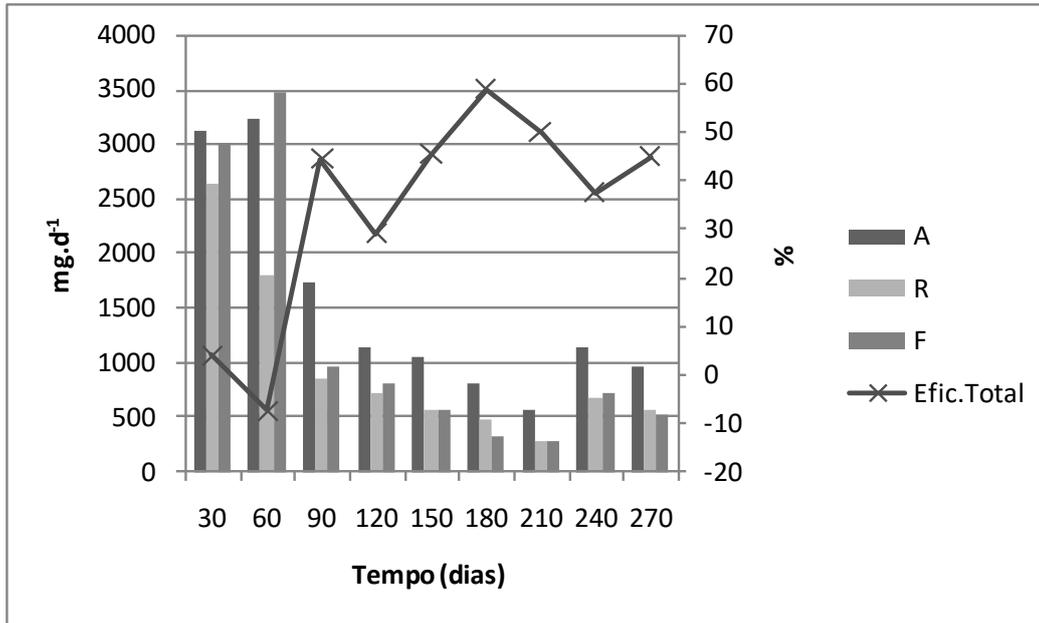


Tabela 13: Eficiência (%) de remoção de carga (mg.d^{-1}) dos parâmetros de qualidade: DQO, nitrogênio total e amônia durante 270 dias de operação.

Dias	DQO			Nitrogênio Total			Amônia		
	R. Anae.	R.Aeró.	Anae+Aero	R. Anae.	R.Aeró.	Anae+Aero	R.Anae.	R.Aeró.	Anae+Aero
30	18	38	49	31	-5	27	8	-10	1
60	37	45	66	-1	24	23	-28	-31	-67
90	52	68	84	27	10	34	-54	-23	-91
120	55	35	70	19	4	22	-63	-28	-108
150	61	45	79	23	20	39	-10	-21	-33
180	48	29	63	-14	23	12	-12	5	-6
210	36	19	48	-18	27	14	12	16	26
240	57	26	68	22	11	30	45	-61	12
270	58	18	65	23	27	44	-171	73	27
Média	48	34	66	12	16	27	-34	16	-12
Des.Pad.	14	16	11	18	11	11	62	38	51

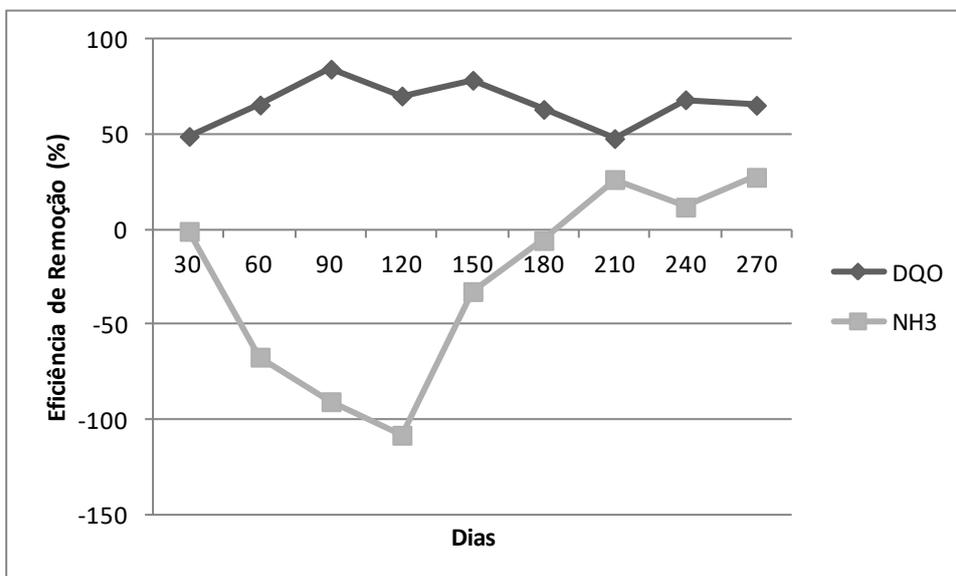
Tabela 14: Eficiência (%) de remoção de carga (mg.d^{-1}) dos parâmetros de qualidade: carbono orgânico total, carbono total e sólidos totais durante 270 dias de operação.

Dias	Carbono Orgânico Total			Carbono Total			Sólidos Totais		
	R. Anae.	R.Aero.	Anae+Aero.	R. Anae.	R.Aero.	Anae+Aero.	R.Anae.	R.Aero.	Anae+Aero.
30	13	21	31	-8	14	8	19	-3	16
60	9	32	38	-2	14	12	24	7	29
90	5	49	51	-16	16	3	25	6	30
120	42	11	48	17	9	24	37	13	45
150	37	34	59	12	25	34	46	1	47
180	12	39	46	1	28	29	19	-3	16
210	7	10	17	-13	4	-9	24	7	29
240	42	13	49	17	5	21	25	6	30
270	19	42	53	7	24	29	41	8	46
Média	21	28	44	2	15	17	29	5	32
Des.Pad.	15	14	13	12	9	14	9	5	11

Tabela 15: Eficiência (%) de remoção de carga (mg.d^{-1}) dos parâmetros de qualidade de nitrito, nitrato e sólidos suspensos voláteis durante 270 dias de operação.

Dias	Nitrito			Nitrato			Sólidos Suspensos Voláteis		
	R. Anae.	R.Aero.	Anae+Aero.	R. Anae.	R.Aero.	Anae+Aero.	R.Anae.	R.Aero.	Anae+Aero.
30	0	-50	-50	15	-14	4	21	4	24
60	0	0	0	44	-93	-7	15	4	18
90	0	-100	-100	50	-11	44	78	-4	77
120	0	-50	-50	38	-13	29	73	3	74
150	-100	50	0	45	0	45	81	-31	75
180	0	50	50	41	30	59	22	57	67
210	0	0	0	50	0	50	53	25	64
240	-100	0	-100	42	-7	38	57	15	63
270	100		50	40	8	45	80	20	84
Média	-11	-12	-22	41	-11	34	53	10	61
Des.Pad.	60	51	56	10	34	22	27	24	23

Gráfico 18: Comparação entre a remoção de DQO (%) e o aumento de NH_3 (%) no fim do sistema durante 270 dias de operação.



4.2 Perfil do Oxigênio Dissolvido nos Reatores Anaeróbios

A tabela abaixo apresenta os resultados do perfil do OD nos reatores anaeróbios em diferentes pontos e diferentes alturas.

Tabela 16: Perfil de OD (mg OD.L^{-1}) em diferentes pontos e profundidades dos tanques anaeróbios.

Ponto	Tanque A (mg OD.L^{-1})			Tanque B (mg OD.L^{-1})		
	S	M	F	S	M	F
1	0,53	0,27	0,2	0,5	0,37	0,27
2	0,56	0,52	0,25	0,54	0,35	0,2
3	0,5	0,4	0,39	0,4	0,4	0,35
4	0,48	0,38	0,28	0,48	0,26	0,28
5	0,36	0,29	0,24	0,55	0,3	0,22
6	0,4	0,4	0,25	0,39	0,39	0,2
7	0,37	0,3	0,3	0,44	0,29	0,29
8	0,44	0,4	0,29	0,5	0,25	0,3
9	0,46	0,39	0,25	0,46	0,2	0,25
Media	0,45	0,37	0,27	0,47	0,31	0,26

Des.Pad	0,06	0,07	0,05	0,05	0,06	0,04
----------------	------	------	------	------	------	------

Os resultados das análises de OD nos reatores anaeróbios mostraram que o oxigênio esteve bem perto de zero, apesar de receber um efluente aerado do aquário.

De acordo com Barbosa (2010) o coeficiente médio de saturação oxigênio dissolvido das bactérias que oxidam a amônia e das bactérias que oxidam o nitrito é $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ e $1,1 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente (WIESMAN, 1994). Portanto, baixas concentrações de OD são mais restritivas para o crescimento das bactérias que oxidam o nitrito do que para as bactérias que oxidam a amônia, o que pode causar o acúmulo de nitrito no sistema (PHILIPS et al., 2002).

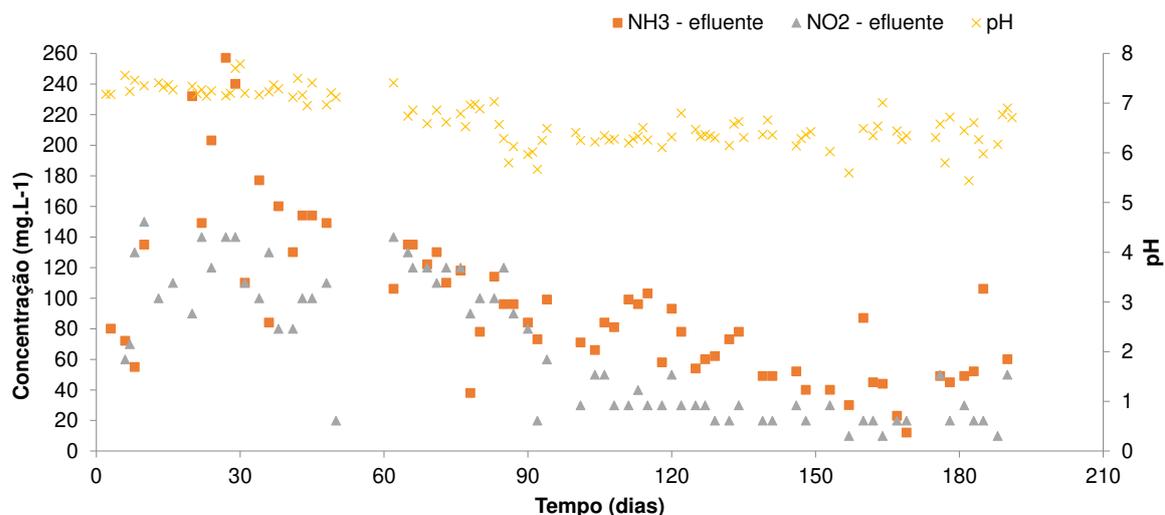
Embora muitos estudos relatem que baixos valores de OD provocam inibição do crescimento das bactérias que oxidam nitrito e causem o acúmulo das oxidadoras de amônia, os valores encontrados na literatura podem ser bastante diferentes. De acordo com Peng e Zhu (2006) baixas concentrações de OD podem causar baixas taxas de nitrificação. Por isso os autores sugerem que a concentração de OD seja mantida entre $1,0$ e $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ para nitrificação.

Porém para o desenvolvimento de bactérias anammox foi mantido oxigênio abaixo de 1 mg.L^{-1} nos reatores anaeróbios, valores de acordo com a saturação média para as oxidadoras de amônia. O reator aeróbio tinha como objetivo a simulação de um reator Canon, com baixa oxigenação, portanto, a concentração de OD foi mantida abaixo de 1 mg.L^{-1} , favorecendo também o desenvolvimento de bactérias desnitrificantes.

4.3 ENRIQUECIMENTO DA CULTURA DE BACTÉRIAS ANAMMOX

O gráfico 19 apresenta os resultados das concentrações de amônia e nitrito efluente, bem como o pH efluente ao longo dos 191 dias de operação do reator de bateladas sequenciais. É possível observar que o pH oscilou em torno de 6,0 e 7,0 com alguns pontos mais baixos em 5,4 e 5,6. De modo geral, o pH médio do efluente ao longo dos 191 dias de operação foi de 6,7.

Gráfico 19: Concentrações (mg.L^{-1}) de amônia e nitrito efluente e pH efluente ao longo dos 191 dias de operação do reator.



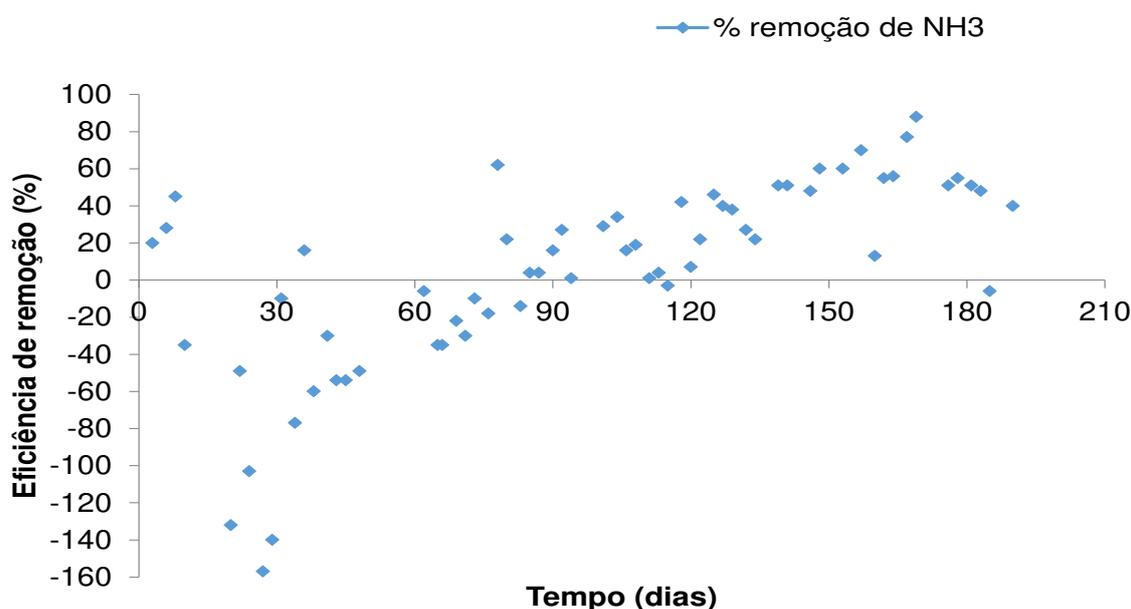
A concentração de nitrito do efluente permaneceu inferior à concentração do afluente (190 mg.L^{-1}) ao longo dos 191 dias de experimento, mostrando o consumo desse composto durante todo o período de operação do reator. Durante os 30 primeiros dias de operação do reator a concentração de nitrito efluente variou de 60 a 150 mg.L^{-1} . Por outro lado, a concentração de amônia efluente oscilou de 55 a 257 mg.L^{-1} nesse mesmo período, mostrando aumento desse composto em relação a concentração de amônia afluente ($100,1 \text{ mg.L}^{-1}$). Até o 7º dia de operação do reator a concentração de amônia efluente permaneceu abaixo da concentração afluente, quando começou a aumentar atingindo 257 mg.L^{-1} de amônia no 26º dia de operação do reator. A partir disso, a concentração de amônia efluente começou a diminuir gradativamente, apresentando picos inferiores a concentração de amônia afluente até o 90º dia.

Por 112 dias (do 77º dia até o 189º dia de operação) a concentração de amônia efluente permaneceu abaixo da concentração afluente. Nesse período, as condições de cultivo do sistema podem ter favorecido o aumento da população das bactérias anammox, resultando no surgimento da atividade anammox, verificada através do consumo simultâneo de amônia e nitrito, a partir do 86º dia. De acordo com a literatura (DAPENA-MORA et al., 2004, CHAMCHOI & NITISORAVUT, 2007) o início da atividade anammox em reator em batelada sequencial pode acontecer após 70 a 120 dias de operação do reator. Desta forma, as condições de cultivo do sistema do presente trabalho começaram a

responder dentro do observado por esses autores. Do 138^o ao 182^o dia foi que o sistema apresentou os melhores resultados de consumo de amônia e nitrito, evidenciando intensa atividade anammox. Nesse período foi possível atingir 12 mg.L⁻¹ de amônia e 10 mg.L⁻¹ de nitrito.

O gráfico 20 apresenta os resultados da eficiência de remoção de amônia, ao longo dos 191 dias de operação do reator.

Gráfico 20: Eficiência de remoção (%) de amônia do efluente ao longo dos 191 dias de operação.



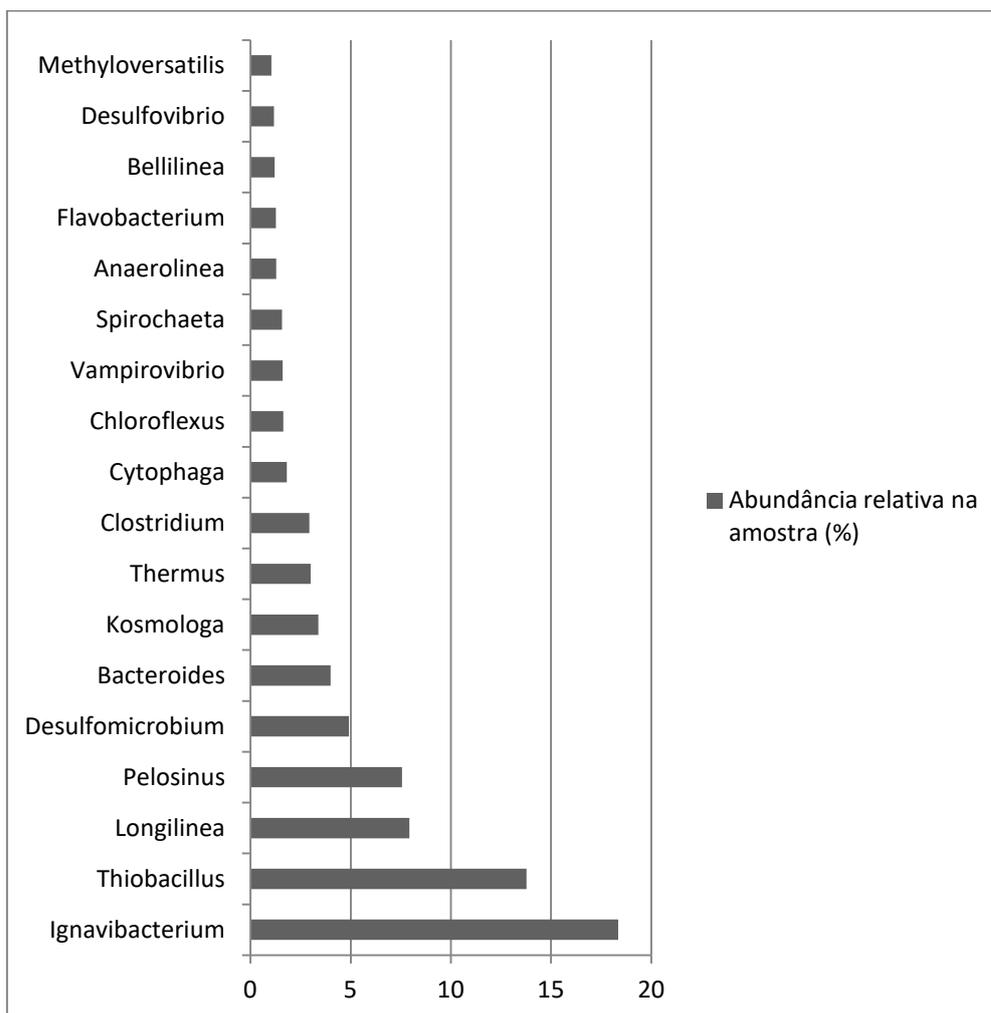
Durante os 7 primeiros dias de operação foi possível observar que a eficiência de remoção de amônia variou em torno de 20 a 45%. No 35^o dia de operação, a eficiência de remoção de amônia diminuiu para 16%. Do 9^o dia ao 75^o dia de operação do reator foi possível verificar valores negativos para a eficiência de remoção de amônia. Esses valores negativos podem estar relacionados à morte e lise das bactérias aeróbias presentes no lodo de inóculo, ocasionando desta forma, a liberação de nitrogênio gasoso e a quebra deste em amônia. Campos (2011) ao enriquecer uma cultura de bactérias anammox a partir de lodo proveniente de um sistema de lodos ativados tratando esgoto sanitário da cidade de Belo Horizonte/MG, ao longo de 420 dias de operação do reator, verificou valores negativos na eficiência de remoção de amônia durante os 25 dias iniciais de operação.

Do 77º ao 112º dia de operação a eficiência de remoção de amônia oscilou de 62% a 1% de remoção. Essa oscilação pode estar relacionada a problemas com queda de energia, fazendo com que o sistema parasse e alterasse as condições ideais do cultivo das bactérias, afetando dessa forma, seu metabolismo. A partir de 138 dias e até 189 dias foi que o sistema apresentou valores maiores de eficiência de remoção de amônia, indicando consumo desse composto. Nesse período foi possível atingir 88% de remoção de amônia, mostrando intensa atividade anammox no sistema.

4.4 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Com o sequenciamento em larga escala do gene RNAr 16S da comunidade bacteriana presente na amostra foi possível identificar as bactérias presentes e caracterizar de maneira detalhada a microbiota. É importante ressaltar que os resultados dos gêneros ou espécies encontrados são expressos em porcentagem, refletindo a abundância relativa das bactérias. A estratégia utilizada fornece o número de reads (=leituras das sequências) do gene RNAr 16S encontrado para cada um dos gêneros ou espécies na amostra analisada, sendo que o número total de sequências analisado pode variar de acordo com a profundidade do sequenciamento. Portanto, o número de reads encontrado não corresponde ao número absoluto de espécies ou indivíduos na amostra.

Gráfico 21: Gêneros de bactérias mais abundantes (%) encontrados na amostra. Apenas os gêneros que apresentaram valores acima de 1% de abundância relativa na amostra foram apresentados no gráfico abaixo.



Os gêneros mais dominantes na amostra foram *Ignavibacterium* e *Thiobacillus* que juntos somaram 32,12% da comunidade de bactérias. *Ignavibacterium* compreende bactérias gran-negativas do filo *Chlorobi*, anaeróbias estritas ou facultativas, moderadamente termofílicas, neutrófilas e que não formam esporos. O gênero *Thiobacillus* compreende bactérias gran-negativas, anaeróbias facultativas, da classe Beta-Proteobacteria, obrigatoriamente ou facultativamente autotróficas, capazes de derivar sua energia para crescimento a partir da oxidação de compostos reduzidos de enxofre.

Zhang et al (2014) determinaram comunidades bacterianas de uma biomassa para remoção de nitrogênio em um único reator usando anammox e

nitrificação parcial para tratamento de águas residuais e também observaram a presença dominante de *Ignavibacterium* em 20%, a espécie observada também foi a *Ignavibacterium álbum* que também esteve presente na nossa biomassa.

Esse gênero de bactérias também foram encontrados por Gonzalez-Gil et al. (2015), que analisaram a composição e a estrutura microbiana desenvolvida em um reator Anammox em larga escala, e encontraram 32% do gene *Brocadiacea*, exclusivamente anammox, e 18% do *Ignavibacteriaceae*. A presença de *Ignavibacteriaceae* foi justificada pela presença de carbono orgânico no inoculo, que favorece o desenvolvimento de bactérias heterotróficas facultativas como *Ignavibacteria* (18%) e *Anaerolinea* (7%) (GONZALEZ-GIL ET AL., 2015).

Wen et al. (2016) estudaram um novo processo combinado de nitrificação parcial, anammox e desnitrificação simultânea para redução de fósforo e nitrogênio em tratamento de esgoto e encontraram em maior quantidade bactérias do gênero *Candidatus Brocadia*. Porém o gênero *Ignavibacterium álbum* também estiveram presentes ($\pm 1,5\%$) desempenhando papel de bactérias anammox, podendo também ter realizado nitrificação autotrófica e desnitrificação heterotrófica (LI et al, 2015), cuja população aumentou ao longo do tempo pela adição suplementar de carbono.

De acordo com Lino et al. (2010), que isolou *Ignavibacterium* e classificou como uma nova linhagem de bactérias, as *Ignavibacterium* são bactérias estritamente anaeróbias, moderadamente termófilas, neutrofílicas e obrigatoriamente heterotróficas. Não é observado crescimento fotossintético. Representam uma linhagem filogenética distinta na família *Ignavibacteriaceae*, a ordem *Ignavibacteriales* e a classe *Ignavibacteria* do filo *Chlorobi* com base na análise da sequência do gene 16S rRNA. A espécie é o *Ignavibacterium álbum* (LINO et al. 2010).

De acordo com Kadnikov et al. (2013) *Ignavibacterium álbum* é uma bactéria heterotrófica (quimiorganotrófica) e metabolicamente versátil não tem gene para a fotossíntese e oxidação de enxofre. É capaz de sobreviver em condições aeróbias e anaeróbias.

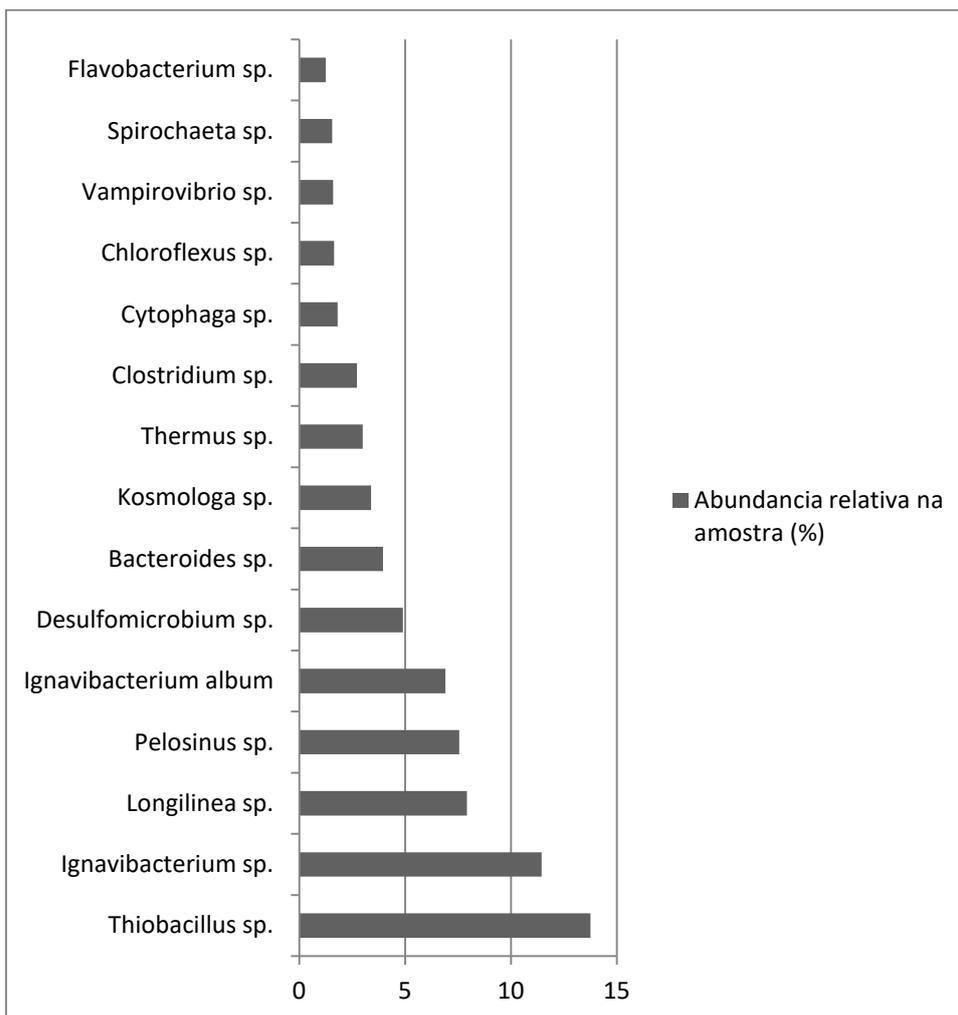
O *Thiobacillus sp.* é uma bactéria da metabolização do enxofre, concentrações desse composto estavam presentes no substrato de alimentação, podendo ter favorecido sua seleção. Essa espécie também é encontrada em reatores desnitrificantes e anaeróbios, também com o objetivo de redução de nitrogênio.

De acordo com Amim et al. (2010) que estudaram a eliminação autotrófica de nitrogênio pela oxidação de tiosulfato utilizando uma cultura mista de microorganismos, a desnitrificação autotrófica via enxofre ocorre principalmente pela atuação do microrganismo *Thiobacillus denitrificans*. Estudos atuais caracterizam o *Thiobacillus denitrificans* como anaeróbio facultativo, quimioautotrófico obrigatório (Wang et al., 2005; Beller et al., 2006). Possui a capacidade de crescer em condições aeróbias, além de, em condições anaeróbias, oxidar compostos de enxofre utilizando nitrato, nitrito e óxidos de nitrogênio como aceptores finais de elétrons. A versatilidade metabólica propicia grande aplicação em sistemas de tratamento biológico.

Wang et al. (2005) investigaram a cinética de desnitrificação, com cultura pura de *Thiobacillus denitrificans*, em processos em batelada e contínuo, utilizando sulfeto de hidrogênio como doador de elétrons e nitrato comoceptor. Concluiu-se que os fatores determinantes para estabelecimento do processo são a razão S^{-2}/NO_3^{-} (5/3 a 5/2 sendo as ideais) e a concentração de sulfeto ($< 300 \text{ mgS}^{-2} \cdot L^{-1}$). No nosso presente trabalho houve inclusão de sulfeto no meio de cultura para enriquecimento da biomassa com redução de nitrito e amônia, podendo ter ocorrido o consumo de nitrito pelo processo de desnitrificação.

Amim et al. (2010) encontraram remoção de 88% a 95% de nitrogênio em um reator contínuo com biomassa enriquecida com *Thiobacillus denitrificans* em 200 dias de operação. O reator enriquecido no nosso estudo operou com uma remoção média de 88% em 190 dias de operação, sendo que a cultura enriquecida não foi específica para essa espécie de bactérias.

Gráfico 22: Espécies de bactérias mais abundantes (>1%) encontradas na amostra.



Os fragmentos de DNAr 16S foram amplificados com sucesso a partir do DNA da comunidade microbiana obtido das amostras e submetidos à eletroforese em gel DGGE. Os padrões de banda obtidos para as diferentes amostras estão apresentados na Figura 9.

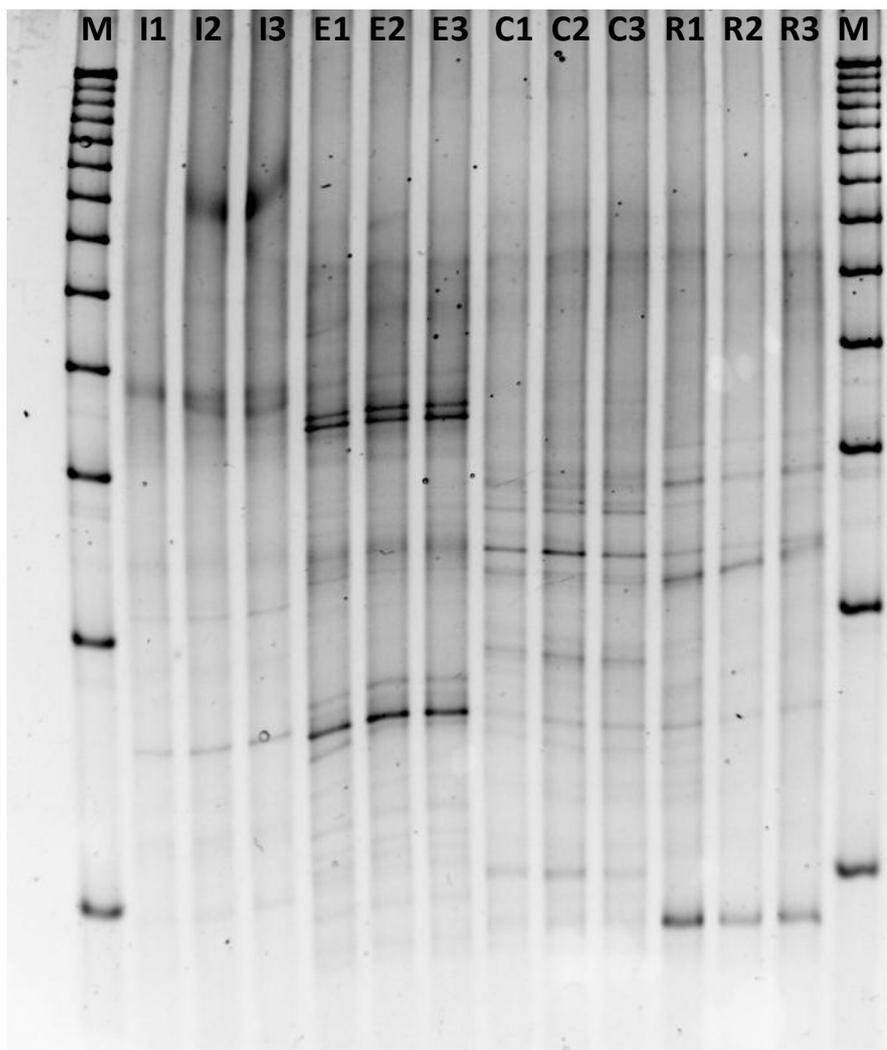


Figura 9: Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) mostrando a estrutura da comunidade microbiana nas amostras. I1 a R3 – Amostras. M – Marcador molecular 100 bp

Os dendrogramas gerados a partir dos perfis de bandas pelos coeficientes de DICE, Jaccard e correlação de Pearson estão apresentados abaixo nas figuras 10, 11 e 12. Sendo: I1, I2 e I3 amostras do inóculo; E1, E2 e E3 amostras do enriquecimento anammox; R1, R2 e R3 amostras do reator anaeróbio e C1, C2 e C3 mostras do reator aeróbio.

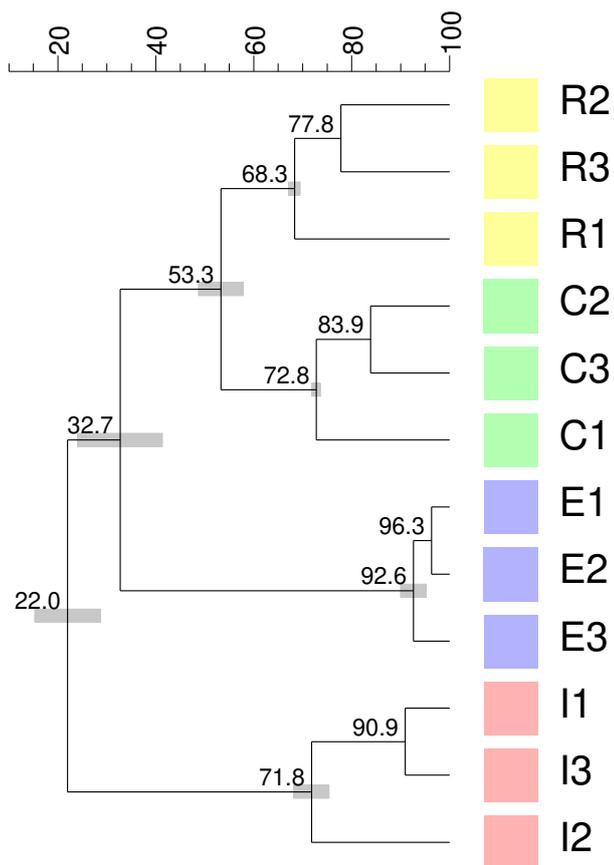


Figura 10: Dendrograma de similaridade do DGGE analisados utilizando o coeficiente de DICE e o algoritmo UPGMA (programa BioNumerics v. 6.6). Os valores em cada nó representam a porcentagem de similaridade e a barra o desvio padrão.

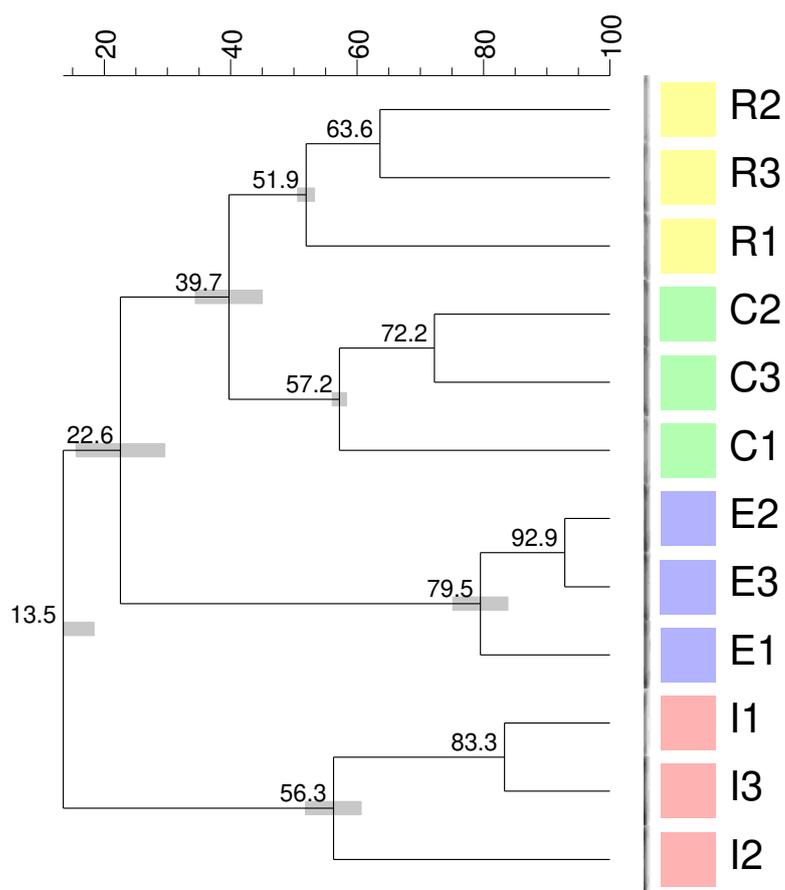


Figura 11: Dendrograma de similaridade dos perfis de bandas das amostras a partir da técnica de DGGE e analisados utilizando o coeficiente de Jaccard e o algoritmo UPGMA (programa BioNumerics v. 6.6). Os valores em cada nó representam a porcentagem de similaridade e a barra o desvio padrão.

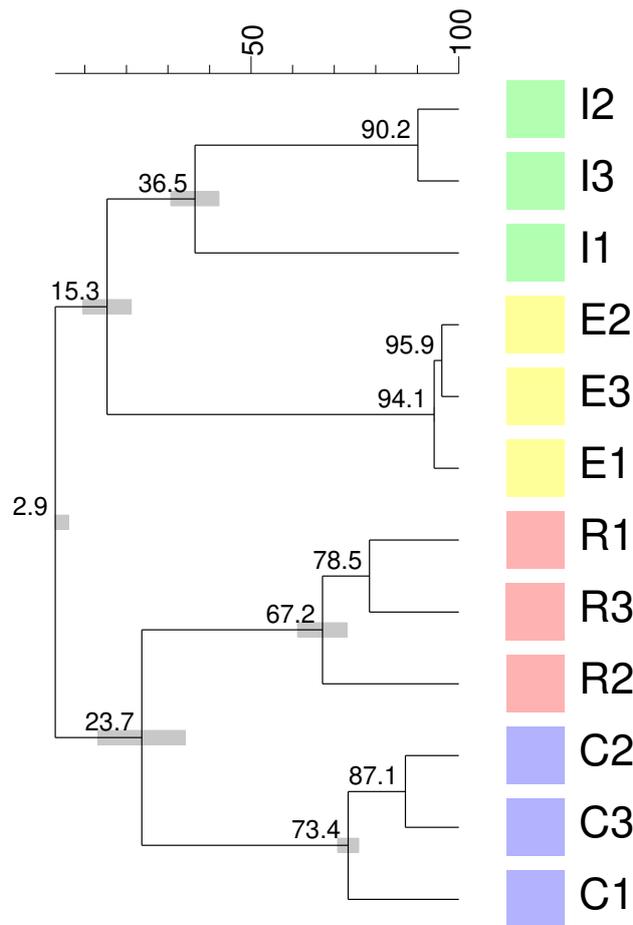


Figura 12: Dendrograma de similaridade dos perfis de bandas das amostras obtido a partir da técnica de DGGE e analisados utilizando o coeficiente de correlação de Pearson e o algoritmo UPGMA (programa BioNumerics v. 6.6).

A análise independente de cultivo por DGGE permitiu avaliar e comparar a complexidade da comunidade bacteriana nas amostras do Inóculo, Enriquecido, Canon e Reator. Os dendrogramas de similaridade com os coeficientes de DICE e Jaccard mostraram a formação de dois grandes grupos, um deles compreendido pelas amostras do Inóculo e o outro pelas amostras Enriquecido, Reator e Canon. O nível de similaridade observado entre estes dois grandes grupos foi de 22% pelo coeficiente de DICE e 13,5% pelo de Jaccard. As réplicas mostraram-se consistentes e foram mais similares entre si do que entre as amostras. Por fim, as comunidades de bactérias das amostras do Reator e Canon foram mais

semelhantes entre si (53,3% no caso do coeficiente de DICE e 39,7% no caso do coeficiente de Jaccard) do que em relação ao Enriquecido.

A baixa similaridade entre os perfis de bandas das amostras do Reator e do Canon em relação ao Inoculo pode sugerir que o processo favoreceu populações que não eram dominantes no inoculo e que passaram a ser mais abundantes no processo, possivelmente em função das condições de operação e/ou do substrato.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos com a realização desta pesquisa, que teve por objetivo avaliar a utilização dos processos anammox e canon no tratamento de efluentes de piscicultura, utilizando reator anaeróbio seguido de aeróbio e o enriquecimento de uma cultura anammox em batelada a partir do mesmo inóculo utilizado nos reatores anaeróbios, permitiram considerar que:

- A simulação de uma produção intensiva de tilápias da forma que foi realizada não resultou nas concentrações mínimas de alguns compostos como amônia, nitrogênio total, nitrito e nitrato para efetiva simulação e, portanto, não ofereceu compostos chave para a realização da redução de amônia.
- O reator anaeróbio foi eficaz na remoção de matéria orgânica, e tem potencial para possível remoção de nitrogênio via processo anammox.
- O reator aeróbio com concentração limitada de oxigênio dissolvido pode ter apresentado remoção de amônia por meio do processo canon como se esperava, porém, mais estudos devem ser feitos para comprovação do sistema.
- O enriquecimento de bactérias anammox com a mesma biomassa do sistema foi eficaz na seleção de uma comunidade bacteriana anammox, indicando o potencial de aplicação do reator de bateladas sequenciais inoculado com lodo anaeróbio de reator tratando dejetos de gado leiteiro e efluentes de salas de ordenha como um reator anammox.
- É necessário mais estudos nessa área para conhecimento e então, aplicação do sistema em escala real.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, L.S. Remoção de Nitrogênio de Efluentes Industriais e Novas Alternativas de Tratamento. **Diplomação em Engenharia Química**. Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2013

Anthonisen, A. C.; Loehr, R.C.; Prakasam, T.B.S. e Srinath, E.G. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. **Journal of the Water Pollut Control Federation**, V.48,p. 835-852. 1976

AMIM, R.S.; SANTANA, F.B.; SCHMIDELL, W.; SOARES, H.M. Eliminação autotrófica de nitrogênio pela oxidação de tiosulfato através de uma cultura mista de microorganismos. **Revista Latinoamericana de Biotecnologia Ambiental e Algal**. V.1. p.31-46. 2010.

AHN, Y.H. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: a review. **Process Biochemistry**. v. 41, n. 8, pp. 1709-1721. 2006

APHA. **Standard Methods for the examination of water and wastewater**. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environmental Federation, Washington. 2005

ARANA, L.V. **Princípios Químicos de Qualidade de Água em Aquicultura: uma revisão para peixes e camarões**. Editora da UFSC, Florianópolis, 1997.

ARAÚJO, J.C.; CAMPOS, A.P.; CORREA, M.M.S.; SILVA, E.C.; VON SPERLING, M.; CHERNICHARO, C.A.L. Enriquecimento de bactérias anaeróbias oxidadoras de amônia – Anammox. **Engenharia Sanitária Ambiental**. v.15, n.2, p.205-2012. 2010

AUN, M.V. **Estudo da remoção de nitrogênio via nitrito e via nitrato em sistema de lodo ativado alimentados por despejo com elevada concentração de fenol. Tese de Doutorado**. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Hidráulica e Sanitária. 2007.

AYROZA, L.M.S.; ROMAGOSA, E.; AYROZA, D.M.M.R.; SCORVO, J.D.; SALLES, F.A. Custos e rentabilidade da produção de juvenis de tilápia do nilo em

tanques-rede utilizando-se diferentes densidades de estocagem. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.40, n.2, p.231-239, 2011.

BACCARIN, A.E. **Impacto ambiental e parâmetros zootécnicos da produção de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) sob diferentes manejos alimentares**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista. Centro de Aquicultura. 2002.

BACCARIN, A.E.; CAMARGO, A.F.M. Characterization and evaluation of the impact of feed management on the effluents of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) culture. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. V. 48, p. 81-90. 2005.

BARBOSA, J.S.B. **Remoção biológica de nitrogênio de lixiviado do aterro de resíduos sólidos urbanos por nitrificação e desnitrificação via nitrito**. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília. Faculdade de Tecnologia. Departamento de Engenharia Civil e Ambiental. 2010.

BARDACH, J.E. **Sustainable aquaculture**. John Wiley e Sons, Inc. Estados Unidos. 1997.

BASSIN, J.P.; PRONK, M.; KRAAN, R.; KLEEREBEZEM, R.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M. Ammonium adsorption in aerobic granular sludge, activated sludge and anammox granules. **Water Research**. v.45, n.16, p.5257-5265, 2011

BELLER, H.R.; CHAIN, P.S.G.; LETAIN, T.E.; CHAKICHLA, A.; LAMIER, F.W.; RICHARDSON, P.M.; COLEMAN, M.A.; WOOD, A.P.; KELLY, D.P. The genome sequence of the obligately chemolithoautotrophic, facultatively anaerobic bacterium *Thiobacillus denitrificans*. **Journal of Bacteriology**. V. 188, p. 1473-1488. 2006.

BOAVENTURA, R.; PEDRO, A.M.; COIMBRA, J.; LENCASTRE, E. Trout farm effluents: characterization and impact on the receiving streams. **Environmental Pollution**. V.95, p.379-387. 1997.

BOCK, C.L.; PEZZATO, L.E.; CANTELMO, O.A.; BARROS, M.M. Fitase e digestibilidade aparente de nutrientes de rações por tilápia do Nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**. V.35, n.6, p.2197-2202, 2006.

BOWEN, S.H. Dietary protein requirements of fishes – a reassessment. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**. V.44. p.1995-2001. 1987.

BOYD, C.E.; WATTEN, B.J. Aeration Systems in Aquaculture. **Reviews in Aquatic Sciences**, V.1, p.425 – 472. 1989.

BOYD, Claude . Water quality management and aeration in shrimp farming. 1989.

BRODA, E. Two kinds of lithotrophs missing in Nature. **Zeitschrift Fur Allgemeine Mikrobiologie** . v.17, p.491-493, 1977.

CAMARGO, J.A. Temporal and spatial variations in dominance diversity and biotic indices along a limestone stream receiving a trout farm effluent. **Water, Air and Soil Pollution**. V.63, p. 343-359. 1992.

CAMPOS, A.P. **Enriquecimento e caracterização de bactérias anammox para a remoção de nitrogênio amoniacal de efluentes**. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia. Universidade Federal de Minas Gerais. 2011.

CASTELLANI, D.; BARRELLA, W. Caracterização da piscicultura na região do Vale do Ribeira, SP. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. V.29, p. 168-176. 2005.

CASTINE, S.A.; ERLER, D.V.; TROTT, L.A.; PAUL, N.A.; NYS, R.; EYRE, B.D. Denitrification and anammox in tropical aquaculture settlement ponds: an isotope tracer approach for evaluating N₂ production. **PLoS ONE**, v. 7, p.1-9. 2012.

CHAMCHOI, N.; NITISORAVUT, S. Anammox enrichment from different conventional sludges. **Chemosphere**. V.66, p.2225-2232. 2007.

CHERNICHARO, C.A.L. **Reatores Anaeróbios**. 2^oed. Editora UFMG. Belo Horizonte, 2016.

CHUA, T.E.; PAW, J.N.; GUARIAN, F.Y. The environmental impact of aquaculture and the effects of pollution on coastal aquaculture development in Southeast Asia. **Marine Pollution Bulletin**, v. 20, p.335-343. 1989.

COCHAVA, M.; DIAB, S.; AVNIMELECH, Y. MIREZ, D.; AMIT, Y. Intensive growth of fish with minimal water exchange. **Fish. Fish-breeding Israel**. V.23, p. 174-181. 1990.

CONAMA - **Conselho Nacional de Meio Ambiente**, Resolução Nº 357 de 18/03/2005, Diário Oficial da União, 19/03/2005.

CONAMA, **Conselho Nacional de Meio Ambiente**, Ministério do Meio Ambiente. Resolução 430 de 13 de maio de 2011 "Dispõe sobre 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." - Data da legislação: 13/05/2011

CORREIA, G.T.; ORTIZ, I.A.S.; GEBARA, D.; SOBRINHO, M.D.; MATSUMOTO, T. Desempenho de reatores aeróbios de leito fluidizado com circulação interna na remoção de matéria carbonácea tratando diferentes águas residuárias. **Interciência**. V.37, p. 266-271. 2012.

CULLEN, D.W.; LEES, A.K.; TOTH, I.K.; DUNCAN, J.M., Conventional PCR and real-time quantitative PCR detection of *Helminthosporium solani* in soil and potato tubers. **European Journal of Plant Pathology**, v.107, p.387-398, 2001.

DAPENA-MORA, A.; CAMPOS, J.L.; MOSQUERA-CORRAL, A.; MÉNDEZ, R. Anammox process for nitrogen removal from anaerobically digested fish canning effluents. **Water Science and Technology**. v.53, n.12, p.265-274, 2006

DAPENA-MORA, A.; VAN HULLE, S.W.H.; CAMPOS, J.L.; MENDEZ, R.; VAN ROLLEGHEM, P.A.; JETTEN, M. Enrichment of anammox biomasa from municipal activated sludge: experimental and modeling results. **Journal of Chemistry Technology and Biotechnology**. v.79, p.1421-1428, 2004.

DAPENA-MORA, A.;CAMPOS, L.J.; MOSQUERA-CORRAL, A.; MÉNDEZ, R. Anammox process for nitrogen removal from anaerobically digested fish canning effluents. **Anais da Conferência IWA "Nutrient management in wastewater treatment processes and recycle streams"**. Cracovia, Polonia, 19-21 Setembro , 2006

DAVIDSON, J.A.; HELWIG, N.B., SUMMERFELT, S. Fluidized sand biofilters used to remove ammonia, biochemical oxygen demand, total coliform bacteria, and suspended solids from an intensive aquaculture effluent. **Aquaculture Engineering**. V. 39, p.6-15. 2008.

DEVOL, A. H. Solution to a marine mystery. **Nature**, v. 422 , p. 575-576, 2003.

EGLI, K., FANGER, U., ALVAREZ, P.J.J., SIEGRIST, H., VAN DER MEER, J.R., ZEHNDER, A.J.B. Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate. **Archive Microbiology**. V. 175, p.198-207, 2001.

EGLI, K.; LANGER, C.; SIEGRIST, H-R.; ZEHNDER, A.J.B.; WAGNER, M.; VAN DER MEER, J.R. Community analysis of ammonia and nitrite oxidizers during start-up of nitrification reactors. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3213-3222, 2003.

EKAMA, G.A.; MARAIS, G.V.R. Biological nitrogen removal. In: MARAIS, G.V.R. **Seminário Internacional sobre Tratamiento de Desagues Cloacales – Lodos Activados**, Buenos Aires. Cap. 6, p. 1-26. 1997.

FAO - Food and Agriculture Organization. **Fisheries and Aquaculture Department Statistics 2014**. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/statistics/en> Acesso em: 15 jun. 2015.

FRANCIS, C. A.; BEMAN, J. M.; KUYPERS, M.M.M. New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. **Journal of the International Society for Microbial Ecology**, v. 1 , p. 19-27, 2007.

GANIGUÉ, R.; LÓPEZ, H.; BALAGUER, M.D.; COLPRIM, J. Partial ammonium oxidation to nitrite of high ammonium content urban landfill leachates. **Water Research**. V.41, p. 3317-33-26, 2007.

GAZZOLA, A.C. **Efeito da amônia e do oxigênio dissolvido na sobrevivência de alevinos de dourado, *Salminus brasiliensis***. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

GENILDA, M.O. Processo anammox na remoção de nitrogênio de águas residuárias – avaliação de sistemas em escala de bancada. **Tese de Doutorado**. Universidade de Brasília. Faculdade de Tecnologia. Departamento de Engenharia Civil e Ambiental. 2015.

GONZALEZ-GIL, G.; SOUGRAT, R.; BEHZAD, A.R.; LENS, P.N.L.; SAIKALY, P.E. Microbial community composition and ultrastructure of granules from a full-scale anammox reactor. **Microbial Ecology**. V.70, p.118-131. 2015.

GOULART, M.; CASTILHO, M. **Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental**, Revista da FAPAM, ano 2, no 1. 2003

GREINER, A.D.; TIMMONS, M.B. Evaluation of the nitrification rates of microbead and trickling filters in an intensive recirculating tilapia production facility. **Aquacultural Engineering**. V.18, p.189-200. 1998.

HELMER, C.; KUNST, S.; JURETSCHKO, S.; SCHMID, M.C.; SCHLEIFER, K.H.; WAGNER M. Nitrogen loss in a nitrifying biofilm system. **Water Science and Technology**, v. 39, p. 13-21, 1999.

HENRY-SILVA, G.G.; CAMARGO, A.F.M. Efficiency of aquatic microphytes to treat Nile tilapia pond effluents. *Science Agricultural*. V.63, p.433-438. 2006.

HENRY-SILVA, G.G.; CAMARGO, A.F.M.; PEZZATO, L.E. Digestibilidade aparente de macrófitas aquáticas pela nilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e qualidade da água em relação às concentrações de nutrientes. **Revista Brasileira de Zootecnia**. V.35, p. 641-647, 2006.

HENRY-SILVA, G.G.; CAMARGO, A.F.M. Impacto das atividades de aquicultura e sistemas de tratamento de efluentes com macrófitas aquáticas – Relato de caso. **Boletim do Instituto de Pesca**. V.34, p.163-173, 2008.

Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K. & Wellington, E.M. (Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3233-3241. 1997.

HOPKINS, J.S; BRADY, C.L.; HAMILTON, R.D.; HEFFERNAN, J.A. The effect on low-rate sand filtration and modified feed management on effluent quality, pond water quality and production of intensive shrimp ponds. **Estuaries**. V.18. p. 116-123. 1995

HUSSAR, G.J.; BASTOS, M.C. Tratamento de efluente de piscicultura com macrófitas aquáticas flutuantes. *Engenharia Ambiental*. V.5, p.274-285, 2008

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

JETTEN, M.S.; STROUS, M.; VAN DE PAS-SCHOONEN K.T.; SCHALK, J.; VAN DONGEN U.G.J.M.; VAN DE GRAAF, A.A.; LOGEMANN, S.; MUYZER, G.; VAN LOOSDRECHT M.C.M.; KUENEN, J.G. The Anaerobic Oxidation of Ammonium. **FEMS Microbiology**, V.22, p.421-437, 1999.

JETTEN, M.S.M.; VAN DE PAS-SCHOONEN, K.T.; FUERST, J.A.; WAGNER, M.; KUENEN, J.G.; STROUS, M. Microbiology of the anaerobic ammonium oxidation —ANAMMOX process. **Anais 9º International Symposium on Microbial Ecology**, Amsterdã, 26-31 Agosto, p.115, 2001a.

JETTEN, M.S.M.; VAN DONGEN, L.G.J.M.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M. **The Combined Sharon/Anammox Process**. Stowa: Foundation for Applied Water Research. IWA Publishing. Londres, RU, 2002.

JETTEN, M.S.M.; WAGNER, M.; FUERST, J.A.; VAN LOOSDRECHT, M.; KUENEN, G.; STROUS, M. Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation (—anammox) process. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, p. 283–288, 2001b.

KADNIKOV, V.V.; MARDANOV, A.V.; PODOSOKORSKAYA, O.A.; GAVRILOV, S.N.; KUBLANOV, I.V.; BELETSKY, A.V.; BONCH-OSMOLOVSKAYA, E.A.; RAVIN, N.V. Genomic analysis of *Melioribacter roseus*, facultatively anaerobic organotrophic bacterium representing a novel deep lineage within bacteroidetes/Chlorobi group. **PloS ONE**, v.8. 2013.

KARTAL, B.; KOLEVA, M.; ARSOV, R.; VAN DER STAR, W.; JETTEN, M.S.M.; STROUS, M. Adaptation of a freshwater anammox population to high salinity wastewater. **Journal of Biotechnology**, v.126, pag. 543-553, 2006

KARTAL, B.; RATTRAY, J.; VAN NIFTRIK, L. A.; VAN DE VOOSBERG, J.; SCHMID, M. C.; WEBB, R. I.; SCHOUTEN, S.; FUERSTE, J.; DAMSTE, J.S.;

JETTEN, M. J. M.; STROUS, M. *Candidatus* —*Anammoxoglobus propionicus* a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. **System Application Microbiology**. V. 30, p. 39-49, 2006.

KHIN, T.; ANNACHHATRE, A.P. Novel microbial nitrogen removal processes. **Biotechnology Advances**, v.22, p.519-532. 2004

KUBITZA, F. Qualidade da Água na produção de peixes. **Panorama da Aquicultura**, março/abril, 1998.

KUBITZA, F. Qualidade da água, sistemas de cultivo, planejamento da produção, manejo nutricional e alimentar e sanidade. **Panorama da Aquicultura**. V.10, maio/junho, 2000.

LARA, B. S.; ARAUHO, J. C.; CHERNICHARO, C. A. L., Diferentes estratégias para o enriquecimento de biomassa anammox a partir de lodos aeróbio e anaeróbio. **Anais 25º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**, Recife, Brasil, 2009.

LI, Y.; HUANG, Z.X.; RUAN, W.Q.; REN, H.Y.; ZHAO, M.X. Anammox performance, granulation, and microbial response under COD disturbance. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. V. 90, p. 139–148. 2015

LINDSAY, M.R.; WEBB, R.I.; STROUS, M.; JETTEN, M.S.M.; BUTLER, M.K.; FORDE, R.J.; FUERST, J.A. Cell compartmentalization in palctomycetes: novel types of structural organization for the bacterial cell. **Archives of Microbiology**, v.175, p.413-429. 2001.

LINO, T.; MORI, K.; UCHINO, Y.; NAKAGAWA, T.; HARAYAMA, S.; SUZUKI, K. *Ignavibacterium album* gen. nov., sp. nov., a moderately thermophilic anaerobic bacterium isolated from microbial mats at a terrestrial hot spring and proposal of Ignavibacteria classis nov., for a novel lineage at the periphery of green sulfur bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.60, p.1376–1382, 2010.

LOCH, D.D.; WEST, J.L.; PERLMUTTER, D.G. The effects of trout farm effluent on the taxa richness of benthic macroinvertebrates. **Aquaculture**. V.14, p. 37-55. 1996.

MACEDO, C.F. Qualidade da água em viveiros de criação de peixes com sistema de fluxo contínuo. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual Paulista. Centro de Aquicultura. 2004.

MACEDO, C.F.; SIPAÚBA-TAVARES, L.H. Eutrofização e qualidade da água na piscicultura: consequências e recomendações. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.36, p. 149 – 163. 2010.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.; BENDER, K.; BUCKLEY, D.; STAHL, D. **Microbiologia de Brock**. Artmed Editora Ltda. 14.ed. Porto Alegre, 2016.

MADIGAN, T.M.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. Brock biology of microorganisms. 8^a ed., New York: Prentice Hall. 1997

MANSELL, B.O.; SCHROEDER, E.D., “Biological denitrification in a continuous flow membrane reactor”, **Water Science and Technology**, v. 38, n. 1, pp. 9-14. 1998

MENEZES, L.C.B., BEYRUTH, Z. Impactos da aquicultura em tanques-rede sobre a comunidade bentônica da represa de Guarapiranga - São Paulo - SP. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 29, p. 77-86. 2003.

MERCANTE, C.T.J.; MARTINS, Y.K.; CARMO, C.F.; OSTI, J.S.;PINTO, C.S.R.M.; TUCCI, A. Qualidade da água em viveiro de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*): caracterização diurna de variáveis físicas, químicas e biológicas, São Paulo, Brasil. **Bioikos**. V.21, p.79-88, 2007.

METCALF & EDDY. **Wastewater engineering: treatment, disposal and reuse**. 3ed. New York: McGraw-Hill, 1334 p. 1991.

MIDLEN, A.; REDDING, T. **Environmental Management for Aquaculture**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 1998.

MINGHUI, L.; ZHANG, W.; YU, X.; YONGSHENG, G. Study on removal efficiencies of pollutant from constructed wetland in aquiculture waste water around Poyang Lake. **Procedia Environmental Sciences**. V.10, pag. 2444-2448, 2011

MIRES, D. Aquaculture and the aquatic environment: mutual impact and preventive management. **The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh**. V.47, p. 163-172. 1995.

MOHEDANO, R.A. Tratamento de efluente e produção de alimento, em cultivo de tilápias (*Oreochromis niloticus*), através da macrófia aquática **Lemna valdiviana** (Lemnaceae). **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Agrárias. 2004.

MORAES, A.C. Estudo da eficiência de diferentes sistemas de tratamento na qualidade da água de uma piscicultura intensiva de pregado (*Scophthalmus maximus L.*) ao longo de um ciclo reprodutivo. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Departamento de Zoologia e Antropologia. 2002.

MOZUMDER, M.S.I.; PICIOREANU, C.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; VOLCKE, E.I.P. Effect of heterotrophic growth an autotrophic nitrogen removal in a granular sludge reactor. **Journal of Environmental Technology**, v.35, 2014.

Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA). **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura 2010**. Brasília, DF, 2012

Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA). **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura 2012**. Brasília, DF, 2014

MULDER, A.; VAN DE GRAAF, A. A.; ROBERTSON, L. A.; KUENEN, J. G. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidised bed reactor. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 16, p. 177-184, 1995.

MULLIS, K.B.; FALLONA, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v.155, p.335-350, 1987.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, V.73, pag 127-141, 1998

MUYZER, G.; WAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase

chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**.V.59, pag. 695-700. 1993

NAIR, R.R., DHAMOLE, P.B., LELE, S.S., D'SOUZA, S.F. "Biological denitrification of high strength nitrate waste using preadapted denitrifying sludge", **Chemosphere**, v. 67, n. 8, pp. 1612-1617. 2007.

NETO, A.P.O. Reator anaeróbio-aeróbio de leito fixo em escala piloto, com recirculação da fase líquida, aplicado ao tratamento de esgoto sanitário. **Tese de Doutorado**. Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo. 2011.

NOZHEVNIKOVA, A.N.; SIMANKOVA, M.V., LITTI, Y.V. Application of the microbiol process of anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) in biotechnological wastewater treatment. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.48, p.667 – 684, 2012

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J.R.; SOTO, D. **Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer**. Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca. Brasília, DF, 2008.

PENG, Y.; ZHU, H. Biological nitrogen removal with nitrification and denitrification via nitrite pathway. **Applied Microbiology Biotechnology**, V. 73, P.15-26. 2006.

PENTON, C.R.; DEVOL, A.H.; TIEDJE, J.M. Molecular Evidence for the Broad distribution of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in Freshwater and Marine sediments. **Applied and Environmental Microbiology**,v. 72, p. 6829-6832, 2006.

PEREIRA, L.P.F; MERCANTE, C.T.J. A amônia nos sistemas de criação de peixes e seus efeitos sobre a qualidade da água. Uma revisão. **Instituto de Pesca**, v.31, p.81-88, 2005.

PERSSON, G. Eutrophication resulting from salmonid fish culture in fresh and salt waters: Scandinavian experiences. In: **International Symposium on Nutritional Strategies in Manegement of Aquaculture Waste**, 1991, Ontario. Anais. p.130-136. 1991.

PHILIPS, S., LAANBROEK, H.J. E VERSTRAETE, W. Origin, causes and effects of increased nitrite concentrations in aquatics environmental. **Environmental Science and Biotechnology**. V.1, P. 115-141. 2002.

PISTORI, R.E.T. Crescimento da macrófita aquática flutuante *Salvinia molesta* crescendo em duas represas submetidas a diferentes níveis de impactos. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual Paulista. 2005.

PYNAERT, K.; SMETS, B.F.; WYFFELS, S.; BEHEYDT, D.; SICILIANO, S.D.; VERSTRAETE, W. Characterization of an autotrophic nitrogen-removing biofilm from a highly loaded lab-scale rotating biological contactor. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 3626-3635, 2003.

QUAN, Z. X.; RHEE, S.K.; ZUO, J. E.; YANG, Y.; BAE, J. W.; PARK, J. R.; LEE, S. T.; PARK, Y. H. Diversity of ammonium-oxidizing bacteria in a granular sludge anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) reactor. **Environmental Microbiology**. v. 1^o, p. 3130-3139, 2008.

QUEIROZ, J.F. DE; BOEIRA, R.C. **Boas práticas de manejo (BPMs) para reduzir o acúmulo de amônia em viveiros de aquicultura**. Comunicado Técnico 44, Embrapa Meio Ambiente. 2007.

RICHARDS, F. A., Anoxic basins and fjords, In: Ripley JP and Skirrow G, eds. **Chemical Oceanography**, London and New York: Academic Press, pp. 611–643, 1965.

RODRIGUES, A.P.O.; LIMA, A.E.; ALVES, A.L.; ROSA, D.K.; TORATI, L.S.; SANTOS, V.R.V. **Piscicultura de água doce: multiplicando conhecimentos**. Brasília, DF. Embrapa. 2013.

ROSA, R.S.; AGUIAR, A.C.F.; BOECHAT, I.G.; GUCKER, B. Impacts of fish farm pollution on ecosystem structure and function of tropical headwater streams. **Environmental Pollution**. V.174, p.204-213, 2013.

ROSENBERG, E.; DELONG, E.F.; LORY, S.; STACKEBRANDT, E.; THOMPSON, F. **The Prokaryotes: other major lineages of bacteria and the archaea**. 4ed. Londres. Springer. 2014.

SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALLONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A. Enzymatic application of β globin genomic sequences and restriction site analysis for the diagnosis of sickle-cell anemia. **Science**, v.230, p. 1350-1354, 1985.

SÁNCHEZ, O.I.A.; MATSUMOTO, T. Hidrodinamic characterization and performance evaluation of an aerobic three phase airlift fluidized bed reactor in a recirculation aquaculture system for Nile Tilapia production. **Aquacultural Engineering**, v.47, p.16-26. 2012.

SÀNCHEZ-MELSIÓ, A.; CÁLIZ, J.; BALAGUER, M. D.; COLPRIM, J.; VILA, X. Development of batch-culture enrichment coupled to molecular detection for screening of natural and man-made environments in search of anammox bacteria for N-removal bioreactors systems, **Chemosphere**, v.75, p. 169–179, 2009.

SCHMID, M.; MAAS, B.; DAPENA A.; VAN DE PAS-SCHOONEN, K.; VAN DE VOSENBERG, J.; KARTAL B.; VAN NIFTRIK, L.; SCHMIDT, I.; CIRPUS, I.; KUENEN J.G.; WAGNER, M.; DAMASTÉ, J.S.S.; KUYPERS, M.; REVSBECH, N.P.; MENDEZ, R.; JETTEN, M.S.M.; STROUS, M. Biomarkers for in situ detection of anaerobic ammonium-oxidizing (Anammox) Bacteria. **Application Environmental Microbiology**. V. 71, p. 1677-1684, 2005.

SCHMID, M.; TWACHTMANN, U.; KLEIN, M.; STROUSS, M.; JURETSCHKO, S.; JETTEN, M.S.M.; METZGER, J.; SCHLEIFER, K.H.; WAGNER, M. Molecular Evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation. **System Application Microbiology**. V. 23, p. 93-106, 2000.

SCHMIDELL, W.; SOARES, H.M.; ETCHEBEHERE, C.; MENES, R.J.; BERTOLE, N.C.; CONTRERAS, E.M. **Tratamento Biológico de Águas Residuárias**. Florianópolis, 2007

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

SEDLAK, R. **Phosphorus and nitrogen removal from municipal wastewater**. 2ª ed., New York: Lewis Publishers. 1991.

SILVA, G.H.R.; NOUR, E.A.A. Reator compartimentado anaeróbio/aeróbio: sistema de baixo custo para tratamento de esgotos de pequenas comunidades. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. V.9, p.268-275. 2004.

SILVA, A.J.; HIRASAWA, J.S.; VARESCHE, M.B.; FORESTI, E.; ZAIAT, M. Evaluation of support materials for the immobilization of sulfate-reducing bacteris and methanogenic archaea. **Anaerobe**. V.12, p.93-98. 2006.

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

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

SOUZA, D.T. **Tratamento biológico para remoção de nitrogênio de efluentes de cortumes**. Diplomação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2011

SPOTTE, S. **Fish and Invertebrate Culture**. Wiley Interscience. New York, 1970.

STROUS, M.; HEIJNEN, J.J.; KUENEN, J.G.; JETTEN, M.S.M. The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. **Application Environmental Microbiology**. V. 50, p.589-596, 1998.

STROUS, M. **Microbiology of anaerobic ammonium oxidation**. Delfty University of Technology. 2000.

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, pp. 151-157. 1997.

TAVARES, L.H.S. Limnologia aplicada a aquicultura. Funep, Jaboticabal, 1994.

TEIXEIRA, R.M. **Remoção de nitrogênio de efluentes da indústria frigorífica através da aplicação dos processos de nitrificação e desnitrificação em biorreatores utilizados em um sistema de lagoas aeradas.** Tese de doutorado em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2006

THIRD, K.A.; SLIEKERS, A.O.; KUENEN, J.G.; JETTEN, M.S.M. The CANON system (Completely Autotrophic Nitrogen removal over Nitrite) under ammonium limitation: interaction and competition between three groups of bacteria. **Systematic and Applied Microbiology**. V.24, p.588-596. 2001.

TOH, S.K.; ASHBOLT, N.J. Adaptation of anaerobic ammonium-oxidising consortium to synthetic coke-ovens wastewater. **Application Microbiology Biotechnology**. V. 59, p. 344-352, 2002.

TOH, S.K., ASHBOLT N.J. Adaptation of anaerobic ammonium-oxidising consortium to synthetic coke-ovens wastewater. **Applied Microbiology Biotechnology**. V. 59, p.344-352, 2002.

TOVAR, A.; MORENO, C.; MÁNUEL-VEZ, M. P.; GARCÍA-VARGAS, M. Environmental impacts of intensive aquaculture in marine waters. *Water Resource*, v.34, p. 334-342. 2000.

TSUSHIMA, I.; OGASAWARA, Y.; KINDAICHI, T.; SATOH, H.; OKABE, S., Development of high-rate anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) biofilm reactors. **Water Research**.V. 41, p. 1623 – 1634, 2007.

VAN DE GRAAF, A.A.; BRUIJN, P.; ROBERTSON, L.A.; JETTEN, M.S.M., KUENEN, J.G. Autotrophic growth anaerobic ammonium-oxidation microorganisms in a fluidized bed reactor. **Microbiology**. V.142, p. 2187-2196, 1996.

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, p. 4149-4163, 2007.

- VAN DONGEN, U.; JETTEN, M.S.M; LOOSDRECHT, M.V. The SHARON-Anammox process for treatment of ammonium rich wastewater. **Water Science & Technology**, V.40, Pag, 153-160, 2001
- VAN NIFTRIK, L.; GEERTS, W.J.C.; VAN DONSELAAR, E.G.; HUMBEL, B.M.; WEBB, R.I.; FUERST, J.A.; VERKLEIJ, A.J.; JETTEN, M.S.M.; STROUS, M. Linking Ultrastructure and Function in Four Genera of Anaerobic Ammonium-Oxidizing Bacteria: Cell Plan, Glycogen Storage, and Localization of Cytochrome cProteins. **Journal of Bacteriology**, p. 708–717. 2008
- VICENTE, I.S.T.; ELIAS, F.; FONSECA-ALVES, C.E. Perspectivas da produção de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. **Revista de Ciências Agrárias**. V.37, pag 392-398, 2014
- WANG, A.; DU, D.; REN, N.; VAN GROENESTIJN, J.W. An innovative process of simultaneous desulfurization and denitrification by *Thiobacillus denitrificans*. **Journal Environmental Science Health**. V. 40, p. 1939-1949. 2005.
- WEN, X.; ZHOU, J.; LI, Y.; QING, X.; HE, Q. A novel combining simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification (SNAD) with denitrifying phosphorus removal (DPR) to treat sewage. **Bioresource Technology**. V.222, p.309-316. 2016.
- WIESMAN, U. Biological Nitrogen Removal from Wastewater. In: Fiechter, A. (ed) **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, Springer-Verlag, Berlin, Germany. 1994.
- WHEATON, F.W.; HOCHHEIMER, J.N.;KAISER, G.E.; KRONES, M.J.; LIBEY, G.S.; EASTER, C.C. Nitrification filter principles [aquaculture water reuse systems]. **Developments in Aquaculture and Fisheries Science**, v.27, pag. 101-126, 1994
- WOOD, C.M. Ammonia and urea metabolism and excretion. In: **The Physiology of fishes** (Ed. D.H. Evans). CRC Press Inc., Boca Raton: pg 379-419, 1993
- WOOD, C.M. **Toxic responses of the Gill**. Organs Taylor & Francis, London, 2001.

ZAIAT, M. **Desenvolvimento e análise de biorreatores anaeróbios contendo células imobilizadas para tratamento de águas residuárias: reator anaeróbio horizontal de leito fixo e reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais.** Texto de Livre Docência. Universidade de São Carlos, 1997

ZAMBONI-FILHO, E.; BARBOSA, N.D.C.; GONÇALVES, S.M.R. Caracterização e tratamento do efluente das estações de piscicultura. **Revista UNIMAR**, v.19, pag 537-548, 1997.

ZHANG, Y; RUAN, X; WAN, Y.; LI, X. Effects of environmental factors on anammox bacterial community structure in sediments of a freshwater aquaculture farm, Yangcheng Lake. *Geomicrobiology Journal*. V. 33, p.479-487. 2016.