BRUNA DE SOUZA MORAES

Desnitrificação autotrófica com o uso de sulfeto e
integração com o processo de nitrificação em um único
reator

Tese apresentada à Escola de Engenharia de
São Carlos, da Universidade de São Paulo,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Ciências, Programa de
Engenharia Hidráulica e Saneamento

Área de Concentração:
Engenharia Hidráulica e Saneamento

Orientador:
Prof. Tit. Eugenio Foresti

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos, SP

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

M827a	<p>Moraes, Bruna de Souza.</p> <p>Desnitrificação autotrófica com o uso de sulfeto e integração com o processo de nitrificação em um único reator. / Bruna de Souza Moraes ; orientador Eugenio Foresti. São Carlos, 2012.</p> <p>Tese - Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Ciências em Hidráulica e Saneamento)-- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2012.</p> <p>1. Remoção de nitrogênio em única etapa. 2. Esgoto sanitário. 3. Desnitrificação autotrófica. 4. Sulfeto. 5. Doador de elétrons. 6. Parâmetros cinéticos intrínsecos. I. Título.</p>
-------	--

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Engenheira **BRUNA DE SOUZA MORAES**

Título da tese: "Avaliação de alguns fatores determinantes no desempenho da desnitrificação com o uso de sulfeto e a viabilidade da integração com o processo de nitrificação em um único reator".

Data da defesa: 23/03/2012

Comissão Julgadora:

Resultado:

Prof. Titular **Eugenio Foresti (Orientador)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Aprovada

Prof. Associado **Marcelo Zaiat**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Aprovada

Prof. Associado **José Alberto Domingues Rodrigues**
(Escola de Engenharia de Mauá/EEM)

Aprovado

Prof^a. Dr^a. **Sávia Gavazza dos Santos**
(Universidade Federal de Pernambuco/UFPE)

Aprovada

Prof^a. Dr^a. **Ana Cláudia Barana**
(Universidade Estadual de Ponta Grossa/UEPG)

APROVADA

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:

Prof. Titular **Edson Cezar Wendland**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Associado **Paulo Cesar Lima Segantine**

Recebido em 23/03/2012
Serviço de Pós-Graduação
EESC/USP

*Aos meus pais, Pedro e Gisela, e à minha irmã
Érica, extraordinários exemplos de vida, fontes de
inspiração e os grandes responsáveis pela minha
caminhada até aqui.
Amo vocês!*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me contemplado com o milagre da vida, sempre guiando e iluminando meus passos, e me fazendo crer que nada é impossível quando caminhamos ao lado de nossa fé. Agradeço a Ele pela oportunidade de conviver com pessoas tão maravilhosas e tão queridas nesta importante etapa de minha vida.

Aos meus pais, Pedro e Gisela, que são e sempre serão presenças constantes em minha vida, e sem os quais jamais teria completado esta jornada. Obrigada pelo apoio e amor incondicionais, pela serenidade e incentivo constantes, pelas palavras de sabedoria nos momentos de indecisão, e por me proporcionarem a alegria de viver. Que orgulho de ser filha de vocês!

À minha irmã Érica, pelo admirável exemplo de coragem e determinação, pela inspiração que irradia, e por mostrar que nunca devemos desistir de nossos sonhos. Obrigada pelo constante interesse e curiosidade pelo meu trabalho, e por sempre se preocupar com a “saúde e bem-estar dos meus bichos”. É uma honra ser sua irmã!

Ao meu querido Jorge, por tornar minha vida completa, por compartilhar meu presente e por inspirar meus sonhos e planos para o futuro. Agradeço seu apoio, amor, carinho, compreensão e paciência, e por me proporcionar momentos em que as preocupações e inquietações são esquecidas. AMO! AMO! AMO!

A todos meus familiares, em especial a avó Diva, a tia Márcia e minha prima Cláudia, por sempre se interessarem pelo meu trabalho, sempre curiosas para saber como eu “*quiava bicho*” (tradução: criava bicho), dando apoio e incentivo. À tia-madrinha Nega, aos avôs Pedro (em memória) e Nania (em memória), e à avó Benedita (em memória).

Ao Prof. Eugenio Foresti, um magnífico exemplo de ser humano, por me orientar com grande sabedoria, serenidade e humildade, por compartilhar seu admirável conhecimento e por depositar sua confiança em meu trabalho, proporcionando segurança e o mais importante

dos incentivos para minha caminhada na vida acadêmica. Mais do que orientador, se tornou um grande e verdadeiro amigo, uma pessoa que levarei para sempre no coração. Sou sua fã!

Ao Prof. Marcelo Zaiat, a personificação da eficiência e da prestatividade, pelas inúmeras e valiosas contribuições durante o desenvolvimento da pesquisa, e pelas críticas e sugestões muito proveitosas feitas no exame de qualificação. Sinto-me privilegiada por ter cruzado seu caminho e poder ter sua amizade.

À amiga e Prof^a. Ana Barana, por compartilhar suas experiências como engenheira de alimentos, pelas sugestões durante a última etapa da parte experimental desta pesquisa e por me mostrar que a pesquisa aliada ao bom-humor é muito mais produtiva. À amiga e Prof^a. Giovana Tommaso, por ter sido minha primeira inspiração para entrar na vida acadêmica e por me mostrar que a engenharia de alimentos pode se aliar muito bem ao saneamento..

Aos professores do Laboratório de Processos Biológicos, Prof^a. Bernadete Varesche e Prof. Wyclef Dimurgo Marra Júnior, pelas sugestões produtivas e pelo convívio agradável e divertido durante minha permanência no laboratório, e à Prof^a. Márcia Damianovic, pelas críticas e sugestões muito bem-vindas no exame de qualificação, pelas sábias informações relacionadas ao “tóxico sulfeto” e pela amizade construída.

À grande amiga e Prof^a. Renata Rodriguez, pela sincera amizade, pelo exemplo de força e persistência, pelas inúmeras vezes em que me deu uma mãozinha quando precisei e pelos sábios conselhos como amiga e como profissional. Agradeço por estar ao meu lado na minha primeira apresentação oral em congresso internacional realizado no México, proporcionando confiança e segurança, e por ter tornado aquela viagem tão divertida. Muito obrigada por ser parte da minha vida!

Ao grande companheiro de laboratório Theo Syrto, que se tornou um verdadeiro amigo e que esteve ao meu lado desde o início desta caminhada. Obrigada por compartilhar idéias, experiências e conhecimentos, por ter sido ótima companhia na viagem ao Canadá, e

por dividir comigo a tarefa de descobrir o que há por trás da desnitrificação autotrófica. Sentirei falta das conversas divertidas, das risadas, das suas manias (aqui entra em cena o Theo Surto) e de trabalhar com uma pessoa tão competente e bacana como você. “Aí sim, Theo!”

À queridíssima amiga Débora Fonseca, pela valiosa e essencial contribuição na etapa final da pesquisa, compartilhando o cansaço de manusear centenas de tubos para a contagem de microrganismos (ensaios inesquecíveis!). Agradeço pela amizade, e por acrescentar um toque de sensibilidade no dia-a-dia do laboratório.

Ao autêntico amigo Gustavo Mockaitis, pelas muitas conversas repletas de sinceridade, pelas viagens filosóficas durante os cafés e por sempre estar à disposição para tudo. Ao amigo acelerado Jorge Pantoja, amante da cafeína e da busca pelo conhecimento, por ser uma pessoa prestativa e inspirar ótimas discussões a respeito da pesquisa. A NASA que o aguarde!

Ao querido amigo Djalma Ferraz, exemplo de sinceridade e competência, que em pouco tempo se tornou praticamente um amigo de infância. Obrigada pelo auxílio com as análises no cromatógrafo gasoso, pelas conversas produtivas e bem-humoradas, pela divertidíssima companhia na viagem a Ouro Preto e por tornar minha vida mais “*beautiful*”. “É isso mesmo, produção?”

Ao amigo “bunito” Eduardo Penteado, pela profunda amizade, por ser tão competente e prestativo sempre que **todos** no laboratório precisavam e pelos vários *help’s* em diversas análises. Agradeço por ser meu agente de viagem na minha ida a Portugal e por me mostrar que uma simples árvore pode diminuir o stress. Sentirei muita saudade de conviver com um amigo tão especial como você.

À queridíssima Priscila Camiloti, uma verdadeira e divertida amiga, com quem compartilhei as dificuldades enfrentadas na convivência com compostos iônicos e de enxofre.

Com você, aprendi que tudo é possível quando se tem competência e força de vontade. Obrigada por proporcionar ânimo e disposição nos momentos em que achei que tudo estava perdido. Obrigada, “bunita”!

Ao amigo e companheiro de câmara Tiagão Martins, por enriquecer meu vocabulário com palavras que até o Aurélio desconhece, por fazer da pesquisa uma profunda e divertida viagem ao desconhecido e por pajear meu reator na minha ausência. Obrigada por estar sempre por perto na minha busca incansável pelas “*Xeracoloc*”, dando apoio e incentivo. Talvez eu as tenha encontrado, mas deixo para você a tarefa de identificá-las.

À amiga *workaholic* Drica Braga, por me ensinar que uma carinhosa conversa com o reator pode ser a solução dos problemas. Às amigas Livia Botta, Mara Rúbia e Mariana Carosia, algumas das *roommates* no albergue de Ouro Preto, que transformaram nossa desconfortável estadia em uma divertida e harmoniosa permanência. À amiga tagarela Juliana Kawanishi, que me mostrou como uma boa conversa pode alegrar nosso dia. Às amigas internacionais Adis Brown, Mélida Pilar e Verónica Perna, que me entendiam perfeitamente quando dizia “Yo tengo *fueme*!”. Às ótimas companhias na viagem da Grécia, Carol Zampol, Regiane Ratti e Sandra Maintinguer. Às queridas amigas e colegas de trabalho Flávia Saia, Lorena Oliveira e Regiane Corrêa.

Ao “minerin” Fabrício Monterani, pela amizade, prestatividade e pelas divertidas conversas no café. Ao amigo “zen” Filipe Ferreira, por mostrar que nem sempre a pressa é inimiga da perfeição. Ao amigo e companheiro de FIA, Rafael Brito, pelas proveitosas discussões profissionais, por sempre atender meus pedidos de ajuda quando solicitei e por compartilhar a freqüente irritação quando ouvimos comentários alheios do tipo: “Ah, então você não trabalha, só estuda!?”. Ao amigo itatibense Tiago Palladino (e não atibaiano!). Aos colegas de trabalho Daniel Fontes, Dagoberto Okada, Guilherme Peixoto, Moacir Araújo Júnior, Rogerio Vilela e Vinícius Rocha.

Ao grande Betão Leite, meu “companheiro de copo”, por ser uma pessoa tão amiga, por compartilhar suas válidas experiências e pelo exemplo de que nunca é tarde demais para ser um jovem pesquisador. À Prof^a. Deize Lopes, que, apesar da curta permanência no laboratório, criou laços de amizade, deu ótimos conselhos e esteve sempre pronta para ajudar quando precisei.

À amiga de apê Amanda Aragão, por me fazer enxergar um outro lado da ciência, voltado à educação especial, pela troca de experiências e pela agradável e divertida convivência. Apesar de parecer a “turista” do apê, foi maravilhoso dividir minha vida São-carlense com você. Sentirei saudade do nosso sertanejo na sacada... Também sou grata por ter me apresentado à Dri, nossa moradora esporádica e um exemplo de pessoa apaixonada por sua profissão.

Ao aluno de iniciação científica João Gabriel Tavares, por segurar as pontas nos momentos em que eu estava ausente, e por mostrar interesse e iniciativa durante o trabalho no laboratório. Ao aluno de iniciação científica Ricardo Almeida, exemplo de persistência e responsabilidade, e aos demais alunos com quem convivi no laboratório.

Aos estagiários da Universidade Estadual da Paraíba, Catarina Chagas e Narcísio Araújo, por me acompanharem no laboratório com muita responsabilidade, iniciativa e dedicação.

Às técnicas do Laboratório de Processos Biológicos, Elô, Isabel e Janja, pela constante disposição em me auxiliar quando precisei durante a fase experimental desta pesquisa. Aos técnicos do curso de Engenharia Ambiental, em especial ao Seu Edson, ao Fernando, à Juliana e à Silvana, por todo auxílio e prestatividade.

Ao técnico do Laboratório de Tratamento Avançado e Reuso de Águas, Wagner Lamon, pelo desenvolvimento e manutenção dos micro-sensores utilizados nesta pesquisa, contando com a colaboração da doutoranda Beatriz Cruz Gonzalez.

Ao pessoal da limpeza e da segurança do prédio da Engenharia Ambiental.

Às secretárias do Departamento de Hidráulica e Saneamento, Pavi, Rose e Sá, às secretárias da contabilidade, Fernanda e Flávia, e ao técnico do Laboratório de Hidráulica Computacional, André Garcia, pelas informações e por todo auxílio.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida e pelo auxílio financeiro ao projeto de pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro durante a realização da pesquisa.

E a você, que está lendo esta tese e contribuindo para a difusão da ciência.

into muito, mas não pretendo ser um imperador. Não é esse o meu ofício. Não pretendo governar ou conquistar quem quer que seja. Gostaria de ajudar – se possível – judeus, o gentio... negros... brancos.

Todos nós desejamos ajudar uns aos outros. Os seres humanos são assim. Desejamos viver para a felicidade do próximo – não para o seu infortúnio. Por que havemos de odiar e desprezar uns aos outros? Neste mundo há espaço para todos. A terra, que é boa e rica, pode prover a todas as nossas necessidades.

O caminho da vida pode ser o da liberdade e da beleza, porém nos extraviamos. A cobiça envenenou a alma dos homens... levantou no mundo as muralhas do ódio... e tem-nos feito marchar a passo de ganso para a miséria e os morticínios. Criamos a época da velocidade, mas nos sentimos enclausurados dentro dela. A máquina, que produz abundância, tem-nos deixado em penúria. Nossos conhecimentos fizeram-nos céticos; nossa inteligência, empedernidos e cruéis. Pensamos em demasia e sentimos bem pouco. Mais do que de máquinas, precisamos de humanidade. Mais do que de inteligência, precisamos de afeição e doçura. Sem essas virtudes, a vida será de violência e tudo será perdido.

A aviação e o rádio aproximaram-nos muito mais. A própria natureza dessas coisas é um apelo eloqüente à bondade do homem... um apelo à fraternidade universal... à união de todos nós. Neste mesmo instante a minha voz chega a milhares de pessoas pelo mundo afora... milhões de desesperados, homens, mulheres, criancinhas... vítimas de um sistema que tortura seres humanos e encarcera inocentes. Aos que me podem ouvir eu digo: “Não desesperéis! A desgraça que tem caído sobre nós não é mais do que o produto da cobiça em agonia... da amargura de homens que temem o avanço do progresso humano. Os homens que odeiam desaparecerão, os ditadores sucumbem e o poder que do povo arrebataram há de retornar ao povo. E assim, enquanto morrem homens, a liberdade nunca perecerá.

Soldados! Não vos entregueis a esses brutais... que vos desprezam... que vos escravizam... que arregimentam as vossas vidas... que ditam os vossos atos, as vossas idéias e os vossos sentimentos! Que vos fazem marchar no mesmo passo, que vos submetem a uma alimentação regrada, que vos tratam como gado humano e que vos utilizam como bucha de canhão! Não sois máquina! Homens é que sois! E com o amor da humanidade em vossas almas! Não odieis! Só odeiam os que não se fazem amar... os que não se fazem amar e os inumanos!

Soldados! Não batalheis pela escravidão! Lutai pela liberdade! No décimo sétimo capítulo de São Lucas está escrito que o Reino de Deus está dentro do homem – não de um só homem ou grupo de homens, mas dos homens todos! Está em vós! Vós, o povo, tendes o poder – o poder de criar máquinas. O poder de criar felicidade! Vós, o povo, tendes o poder de tornar esta vida livre e bela... de fazê-la uma aventura maravilhosa. Portanto – em nome da democracia – usemos desse poder, unamo-nos todos nós. Lutemos por um mundo novo... um mundo bom que a todos assegure o ensejo de trabalho, que dê futuro à mocidade e segurança à velhice.

É pela promessa de tais coisas que desalmados têm subido ao poder. Mas, só mistificam! Não cumprem o que prometem. Jamais o cumprirão! Os ditadores liberam-se, porém escravizam o povo. Lutemos agora para libertar o mundo, abater as fronteiras nacionais, dar fim à ganância, ao ódio e à prepotência. Lutemos por um mundo de razão, um mundo em que a ciência e o progresso conduzam à ventura de todos nós. Soldados, em nome da democracia, unamo-nos!

...

Hannah, estás me ouvindo? Onde te encontrares, levanta os olhos! Vês, Hannah? O sol vai rompendo as nuvens que se dispersam! Estamos saindo da treva para a luz! Vamos entrando num mundo novo – um mundo melhor, em que os homens estarão acima da cobiça, do ódio e da brutalidade. Ergue os olhos, Hannah! A alma do homem ganhou asas e afinal começa a voar. Voa para o arco-íris, para a luz da esperança. Ergue os olhos, Hannah! Ergue os olhos!."

Discurso final do filme *O Grande Ditador*, no contexto da 2ª Guerra Mundial, de autoria de Charles Spencer Chaplin (1889-1977).

A handwritten signature in black ink, reading "Charlie Chaplin" in a cursive, flowing script.

RESUMO

MORAES, B.S. **Desnitrificação autotrófica com o uso de sulfeto e integração com o processo de nitrificação em um único reator.** 2012. 285 f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

A remoção de nitrogênio acoplada à oxidação de sulfeto pode ser uma opção adequada para o pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios, os quais contêm nitrogênio amoniacal, que deve ser nitrificado, e sulfeto, que poderia ser utilizado como doador de elétrons endógeno para a desnitrificação autotrófica. Com base nessa constatação, esta pesquisa propôs a aplicação da nitrificação e desnitrificação autotrófica acoplada à oxidação de sulfeto, em um único reator, para a remoção de nitrogênio de efluentes de reatores anaeróbios tratando esgoto sanitário. Visto que existem lacunas na literatura referente ao processo desnitrificante autotrófico citado, as bases teóricas para a determinação das condições operacionais partiram da caracterização cinética e de aspectos fundamentais da desnitrificação autotrófica com uso de sulfeto como doador de elétrons. Numa primeira etapa, avaliou-se o efeito da concentração de sulfeto na desnitrificação, com uso de nitrato e nitrito como receptores de elétrons, em reatores verticais de leito fixo. Os resultados revelaram que compostos intermediários de enxofre foram principalmente formados quando se aplicou excesso de sulfeto, fato que foi mais evidente com o uso de nitrato. Evidências visuais sugeriram que enxofre elementar foi o principal intermediário formado, o qual também estava sendo utilizado quando aplicadas concentrações estequiométricas de sulfeto relativas a nitrato/nitrito. De modo geral, a desnitrificação autotrófica não foi afetada pela desnitrificação heterotrófica residual via atividade endogênica. Numa segunda etapa, determinou-se a cinética intrínseca da desnitrificação autotrófica via nitrato e nitrito com uso de diferentes concentrações de sulfeto em reatores diferenciais de leito fixo. Este bioprocessos pôde ser descrito por modelo cinético de ordem $\frac{1}{2}$ para biofilmes. As constantes cinéticas variaram entre 0,425-0,658 $\text{mg N}^{1/2} \text{ L}^{-1/2} \text{ h}^{-1}$ para desnitrificação via nitrito e entre 0,190-0,609 $\text{mg N}^{1/2} \text{ L}^{-1/2} \text{ h}^{-1}$ para desnitrificação via nitrato. Neste último, o menor valor foi devido ao uso de elétrons doados a partir de compostos intermediários de enxofre formados. Numa terceira etapa, utilizou-se um reator de leito fixo operado em batelada alimentada sequencial, com ciclos de 8 horas, submetido à aeração intermitente e empregando a desnitrificação autotrófica com uso de sulfeto presente no efluente sanitário, pré-tratado anaerobiamente, como doador de elétrons. O prévio estabelecimento da nitrificação com posterior aplicação de baixas concentrações de sulfeto foi a melhor estratégia de partida do reator. A alimentação em batelada alimentada com aplicação de sulfeto em excesso apenas nos períodos anóxicos foi a melhor estratégia de alimentação, proporcionando eficiência média de 85,7% e 53,0% para nitrificação e desnitrificação, respectivamente. O acúmulo de nitrito foi observado após aplicação de carga de choque de sulfeto, que inibiu as bactérias oxidadoras de nitrito. No entanto, houve dificuldade em se estabelecer a desnitrificação via nitrito em função da toxicidade deste composto aos organismos desnitrificantes instalados no reator. A baixa eficiência global de remoção de nitrogênio e algumas restrições operacionais indicaram que a desnitrificação autotrófica usando sulfeto em um único reator operado em bateladas sequenciais não foi adequada para a proposta desta pesquisa.

Palavras-chave: Remoção de nitrogênio em única etapa. Esgoto sanitário. Desnitrificação autotrófica. Sulfeto. Doador de elétrons. Parâmetros cinéticos intrínsecos.

ABSTRACT

MORAES, B.S. **Autotrophic denitrification using sulfide and integration with the nitrification process in a single reactor.** 2012. 285 f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

Nitrogen removal coupled with sulfide oxidation may be suitable for the post treatment of effluents from anaerobic reactors. These effluents contain ammonium, which must be nitrified, and sulfide, which could be used as an endogenous electron donor for autotrophic denitrification. Since there are gaps in literature regarding the mentioned autotrophic denitrifying process, the theoretical basis for determination of operating conditions came from the characterization of kinetics and fundamentals aspects of autotrophic denitrification using sulfide as electron donor. In a first step, the effect of sulfide concentration on this bioprocess using nitrate and nitrite as electron acceptors in vertical fixed-bed reactors was evaluated. The results showed that intermediary sulfur compounds were mainly produced when excess of electron donor was applied, which was more evident when nitrate was used. Visual evidences suggested that elemental sulfur was the intermediary compound produced. There was also evidence that the elemental sulfur previously formed was being used when sulfide was applied in stoichiometric concentration relative to nitrate/nitrite. For all conditions assayed, autotrophic denitrification was not affected by residual heterotrophic denitrification via endogenic activity, occurring as a minor additional nitrogen removal process. In a second step, the intrinsic kinetics of sulfide-oxidizing autotrophic denitrification via nitrate and nitrite in systems containing attached cells was determined. Differential reactors were fed with nitrified synthetic domestic sewage and different sulfide concentrations. This bioprocess could be described by a half-order kinetic model for biofilms. The half-order kinetic coefficients ranged from 0.425 to 0.658 $\text{mg N}^{1/2} \text{ L}^{-1/2} \text{ h}^{-1}$ for denitrification via nitrite and from 0.190 to 0.609 $\text{mg N}^{1/2} \text{ L}^{-1/2} \text{ h}^{-1}$ for denitrification via nitrate. In this latter, the lower value was due to the use of electrons donated from intermediary sulfur compounds formed. In a third step, a sequencing fed-batch biofilm reactor of 8-h cycles was operated under intermittent aeration, applying autotrophic denitrification using sulfide present in the sanitary effluent, anaerobically pre-treated, as electron donor. The effect of the start-up period and the feeding strategy were evaluated. The previous establishment of nitrification process with subsequent application of sulfide in low concentrations was the best start-up strategy. The fed-batch mode with sulfide application in excess only in the anoxic periods was the best feeding strategy, providing average efficiencies of 85.7% and 53.0% for nitrification and denitrification, respectively. Nitrite accumulation was observed after application of shock loading of sulfide, which inhibited nitrite-oxidizing bacteria. However, it was difficult to establish denitrification via nitrite due to the toxicity of this compound to denitrifying organisms developed inside the reactor. The low overall efficiency of nitrogen removal and some operational constraints indicated that autotrophic denitrification using sulfide in a single sequencing fed-batch reactor was not suitable for the purpose of this research.

Keywords: Single step nitrogen removal. Domestic sewage. Autotrophic Denitrification. Sulfide. Electron donor. Intrinsic kinetic parameters.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 – Ciclo do nitrogênio tradicional, com os respectivos estados de oxidação do nitrogênio (Fonte: AHN, 2006).	46
Figura 4.2. Esquema da remoção de nitrogênio via nitrito, com remoção ideal de 100% de N (valor em parêntese) (Fonte: SCHMIDT <i>et al.</i> , 2003).	52
Figura 4.3 – Esquema do processo combinado SHARON-ANAMMOX (Fonte: KHIN E ANNACHHATRE, 2004).	55
Figura 4.4 – Fluxograma da concepção do processo DEAMOX (Fonte: KALYUZHNYI <i>et al.</i> , 2006).	61
Figura 4.5 – Seqüência de operação durante 1 ciclo em um RBS tradicional: (a) alimentação; (b) reação; (c) sedimentação e (d) descarte do líquido.	64
Figura 4.6 – Esquema representativo das interações entre transporte de massa e reações bioquímicas em uma lâmina simétrica de uma biopartícula. Os fenômenos sumarizados na seção superior ocasionam os perfis de concentração dos substratos e produtos esboçados na seção intermediária, que podem ser descritos quantitativamente em termos dos parâmetros indicados na seção inferior (adaptado de BAILEY E OLLIS, 1986).	67
Figura 4.7 – Balanço material para uma fatia elementar de um poro ideal, no qual o substrato se difunde e reage ao longo da parede porosa (adaptado de HARREMÕES, 1976, e LEVENSPIEL, 1999).	71
Figura 5.1 – Fluxograma das etapas experimentais e experimentos realizados.	82
Figura 5.2 – Reatores verticais de leito fixo em funcionamento.	84
Figura 5.3 – Frascos de alimentação com bexigas acopladas aos septos emborrachados, preenchidas com gás N ₂	85
Figura 5.4 – Etapas da imobilização da biomassa: (a) espumas em contato com o lodo macerado; (b) espumas totalmente encobertas pelo lodo; (c) retirada do excesso de lodo com uso de peneira; (d) inoculação dos cubos de espuma no interior do reator.	88
Figura 5.5 – Esquema do conjunto experimental utilizado para os ensaios cinéticos: (1) reator diferencial; (2) câmara climatizada a 30 + 1°C; (3) frasco de alimentação; (4) banho termostatizado; (5) ponto de coleta de amostras; (6) bomba peristáltica.	92
Figura 5.6 – Reatores diferenciais em funcionamento: (a) conjunto experimental; (b) detalhe dos reatores.	92
Figura 5.7 – Detalhe das matrizes cúbicas de espuma de poliuretano utilizadas nos experimentos das 1ª e 2ª etapas.	93
Figura 5.8 – Representação esquemática do aparato experimental do reator nitrificante/desnitrificante: (1) reator nitrificante/desnitrificante operado em batelada alimentada; (2) agitador mecânico; (3) impelidor tipo turbina; (4) cesto de aço inox; (5) bomba peristáltica – alimentação; (6) bomba diafragma – descarte; (7) pedra porosa; (8) aerador de aquário; (9) entrada para micro-sensores.	98
Figura 5.9 – Sistema experimental do reator nitrificante/desnitrificante em funcionamento.	99
Figura 5.10 – Conjunto experimental para a medição de OD e POR: sistema computadorizado de aquisição de dados.	99

Figura 5.11 – Recipiente para armazenamento do efluente do reator UASB.....	100
Figura 5.12 – Frascos de alimentação do reator nitrificante/desnitrificante, contendo solução de sulfeto (direita) e solução de bicarbonato de sódio (esquerda).	100
Figura 5.13 – Reator UASB em funcionamento.....	102
Figura 5.14 – Detalhe das matrizes cúbicas de poliuretano, com 1,0 cm de aresta, utilizadas na 3ª etapa.	103
Figura 5.15 – Matrizes cúbicas de poliuretano contendo biomassa imobilizada com lodo de inóculo proveniente de: (a) reator UASB e (b) sistema de lodos ativados.	103
Figura 5.16 – Frascos Duran de 250 mL utilizados nos ensaios complementares da 3ª etapa.	107
Figura 5.17 – Aparato experimental utilizado para R1 com a finalidade de ser avaliado o uso do biogás pelos organismos desnitrificantes.	116
Figura 5.18 – Detalhe do ponto de coleta das amostras afluentes, por meio de um cateter localizado na mangueira de entrada do reator.....	121
Figura 5.19 – Detalhe do procedimento de troca de atmosfera para a retirada de oxigênio do <i>headspace</i> dos frascos de antibiótico, utilizados na quantificação das bactérias desnitrificantes autotróficas oxidadoras de sulfeto.....	125
Figura 6.1 – Valores de concentração de (●) nitrato no afluente, (○) nitrato no efluente e (□) nitrito no efluente, monitorados durante a operação do reator vertical na ausência de sulfeto e desnitrificação via nitrato.....	129
Figura 6.2 – Valores de concentração de nitrogênio amoniacal (■) afluente e (□) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical na ausência de sulfeto e desnitrificação via nitrato.	129
Figura 6.3 – Valores concentração de alcalinidade a bicarbonato (●) afluente e (○) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical na ausência de sulfeto e desnitrificação via nitrato.	130
Figura 6.4 – Valores de pH (●) afluente e (○) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical na ausência de sulfeto e desnitrificação via nitrato.	130
Figura 6.5 – Valores de potencial redox (■) afluente e (□) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical na ausência de sulfeto e desnitrificação via nitrato.	131
Figura 6.6 – Valores de concentração de nitrato no afluente (●) e no efluente (○), monitorados durante a operação do reator vertical com excesso de sulfeto e desnitrificação via nitrato.	132
Figura 6.7 – Valores de concentração de nitrogênio amoniacal (■) afluente e (□) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com excesso de sulfeto e desnitrificação via nitrato.	133
Figura 6.8 – Valores de concentração de enxofre na forma de sulfeto dissolvido total (●) afluente e (○) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com excesso de sulfeto e desnitrificação via nitrato.	134
Figura 6.9 – Valores de concentração de enxofre na forma de sulfato (▲) afluente e (Δ) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com excesso de sulfeto e desnitrificação via nitrato.....	134

Figura 6.10 – Balanço de massa de enxofre, considerando: (●) consumo de sulfeto e (Δ) produção de sulfato, para aplicação de excesso de sulfeto e desnitrificação via nitrato.	135
Figura 6.11 – Camadas esbranquiçadas encobrendo as matrizes cúbicas de espuma, indicando a formação de enxofre elementar.....	135
Figura 6.12 – Valores de alcalinidade a bicarbonato (●) afluente e (○) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com excesso de sulfeto e desnitrificação via nitrato. ...	137
Figura 6.13 – Valores de pH (●) afluente e (○) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com excesso de sulfeto e desnitrificação via nitrato.	138
Figura 6.14 – Valores de potencial redox (■) afluente e (□) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com excesso de sulfeto e desnitrificação via nitrato.....	139
Figura 6.15 – Valores de concentração de (●) nitrato afluente e (○) nitrato efluente, e (▲) nitrito efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com sulfeto em concentração estequiométrica e desnitrificação via nitrato.	140
Figura 6.16 – Valores de concentração de nitrogênio amoniacal (■) afluente e (□) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com sulfeto em concentração estequiométrica e desnitrificação via nitrato.	141
Figura 6.17 – Valores de concentração de enxofre na forma de sulfeto dissolvido total (●) afluente e (○) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com sulfeto em concentração estequiométrica e desnitrificação via nitrato.	142
Figura 6.18 – Valores de concentração de enxofre na forma de sulfato (▲) afluente e (Δ) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com sulfeto em concentração estequiométrica e desnitrificação via nitrato.	142
Figura 6.19 – Balanço de massa de enxofre, considerando: (●) consumo de sulfeto e (Δ) produção de sulfato, com sulfeto em concentração estequiométrica e desnitrificação via nitrato.....	143
Figura 6.20 – Valores de alcalinidade a bicarbonato (●) afluente e (○) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com sulfeto em concentração estequiométrica e desnitrificação via nitrato.	144
Figura 6.21 – Valores de pH (●) afluente e (○) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com sulfeto em concentração estequiométrica e desnitrificação via nitrato. ...	145
Figura 6.22 – Valores de potencial redox do afluente (■) e do efluente (□), monitorados durante a operação do reator vertical com sulfeto em concentração estequiométrica e desnitrificação via nitrato.	146
Figura 6.23 – Valores de concentração de (▲) nitrito afluente, (Δ) nitrito efluente, e (○) nitrato efluente, monitorados durante a operação do reator vertical na ausência de sulfeto e desnitrificação via nitrito.	149
Figura 6.24 – Valores de concentração de nitrogênio amoniacal (■) afluente e (□) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical na ausência de sulfeto e desnitrificação via nitrito.	150
Figura 6.25 – Valores de alcalinidade a bicarbonato (■) afluente e (□) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical na ausência de sulfeto e desnitrificação via nitrito.	151
Figura 6.26 – Valores de pH (●) afluente e (○) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical na ausência de sulfeto e desnitrificação via nitrito.....	152

Figura 6.27 – Valores de potencial redox (■) afluyente e (□) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical na ausência de sulfeto e desnitrificação via nitrito.....	152
Figura 6.28 – Valores de concentração de nitrito (▲) afluyente e (Δ) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com excesso de sulfeto e desnitrificação via nitrito..	153
Figura 6.29 – Valores de concentração de nitrogênio amoniacal (■) afluyente e (□) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com excesso de sulfeto e desnitrificação via nitrito.....	154
Figura 6.30 – Valores de concentração de sulfeto dissolvido total (●) afluyente e (○) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com excesso de sulfeto e desnitrificação via nitrito.....	155
Figura 6.31 – Valores de concentração de enxofre na forma de sulfato (▲) afluyente e (Δ) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com excesso de sulfeto e desnitrificação via nitrito.	156
Figura 6.32 – Balanço de massa de enxofre, considerando: (●) consumo de sulfeto e (Δ) produção de sulfato, com excesso de sulfeto e desnitrificação via nitrito.	156
Figura 6.33 – Camadas esbranquiçadas encobrendo as matrizes cúbicas de espuma, indicando a formação de enxofre elementar.	157
Figura 6.34 – Valores de alcalinidade a bicarbonato (■) afluyente e (□) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com excesso de sulfeto e desnitrificação via nitrito..	157
Figura 6.35 – Valores de pH (■) afluyente e (□) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com excesso de sulfeto e desnitrificação via nitrito.	158
Figura 6.36 – Valores de potencial redox (■) afluyente e (□) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com excesso de sulfeto e desnitrificação via nitrito.....	159
Figura 6.37 – Valores de concentração de nitrito (▲) afluyente e (Δ) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com sulfeto em concentração estequiométrica e desnitrificação via nitrito.	160
Figura 6.38 – Valores de concentração de nitrogênio amoniacal (■) afluyente e (□) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com sulfeto em concentração estequiométrica e desnitrificação via nitrito.	160
Figura 6.39 – Valores de concentração de sulfeto dissolvido total (●) afluyente e (○) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com sulfeto em concentração estequiométrica e desnitrificação via nitrito.	162
Figura 6.40 – Valores de concentração de enxofre na forma de sulfato (▲) afluyente e (Δ) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com sulfeto em concentração estequiométrica e desnitrificação via nitrito.	162
Figura 6.41 – Balanço de massa de enxofre, considerando: (●) consumo de sulfeto e (Δ) produção de sulfato, com sulfeto em concentração estequiométrica e desnitrificação via nitrito.....	163
Figura 6.42 – Valores de alcalinidade a bicarbonato (■) afluyente e (□) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com sulfeto em concentração estequiométrica e desnitrificação via nitrito.	164
Figura 6.43 – Valores de pH (■) afluyente e (□) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com excesso de sulfeto e desnitrificação via nitrito.	165

Figura 6.44 – Valores de potencial redox (■) afluyente e (□) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com sulfeto em concentração estequiométrica e desnitrificação via nitrito.	166
Figura 6.45 – Morfologias observadas sob microscopia óptica de contraste de fase, referentes aos experimentos nos quais não foi adicionado sulfeto. (a) Filamentos, (b) morfologias semelhantes a <i>Methanosaeta</i> e alguns bacilos dispersos, (c) morfologias semelhantes a <i>Methanosarcina</i> , (d) cocos e bacilos.	171
Figura 6.46 – Morfologias observadas sob microscopia óptica de contraste referente aos experimentos com adição de sulfeto. (a) Aglomerado de bacilos e coco-bacilos, (b) formações semelhantes à enxofre elementar, (c) bacilos dispersos, (d) alguns filamentos e bacilos.	172
Figura 6.47 – Concentrações de nitrogênio na forma de nitrato obtidos para v_s de (♦) 0,007, (■) 0,022, (▲) 0,054, (●) 0,069, (Ж) e 0,075 cm s^{-1} e as respectivas curvas ajustadas por meio da regressão polinomial: (a) concentração de sulfeto em excesso; (b) concentração estequiométrica de sulfeto relativamente ao nitrato.	175
Figura 6.48 – Perfis de velocidade específica inicial observada de utilização de nitrogênio na forma de nitrato em função de v_s : (a) concentração de sulfeto em excesso; (b) concentração estequiométrica de sulfeto.	177
Figura 6.49 – Curvas ajustadas aos pontos experimentais para equação cinética de ordem $\frac{1}{2}$, referentes à remoção de nitrogênio na forma de nitrato ao longo do tempo, para v_s de (■) 0,054 cm s^{-1} e (▲) 0,075 cm s^{-1} : (a) concentração de sulfeto em excesso; (b) concentração estequiométrica de sulfeto relativa ao nitrato.	178
Figura 6.50 – Concentrações de nitrogênio na forma de nitrito obtidas para v_s de (♦) 0,007, (■) 0,022, (▲) 0,054, (●) 0,069, (Ж) e 0,075 cm s^{-1} e as respectivas curvas ajustadas por meio da regressão polinomial.	185
Figura 6.51 – Perfil de velocidade específica inicial observada de utilização de nitrogênio na forma de nitrito em função de v_s : (a) concentração de sulfeto em excesso; (b) concentração estequiométrica de sulfeto.	186
Figura 6.52 – Curvas ajustadas aos pontos experimentais para equação cinética de ordem $\frac{1}{2}$, referentes à remoção de nitrogênio na forma de nitrito ao longo do tempo, para v_s de (♦) 0,069 cm s^{-1} e (■) 0,075 cm s^{-1} : (a) concentração de sulfeto em excesso; (b) concentração estequiométrica de sulfeto relativa ao nitrito.	187
Figura 6.53 – Monitoramento dos compostos de nitrogênio durante a operação da primeira tentativa de aplicação da estratégia II: (▲) N-NH_4^+ afluyente; (Δ) N-NH_4^+ efluente; (●) N-NO_3^- efluente.	196
Figura 6.54 – Exames microscópicos do lodo de inóculo utilizado na segunda estratégia operacional, caracterizando a predominância de filamentosas: (a) filamento semelhante ao tipo 021N; (b) bactérias filamentosas, rotífero e ciliado peduncular semelhante a <i>Vaginicola</i>	197
Figura 6.55 – Concentração dos compostos de nitrogênio durante o monitoramento do período para estabelecimento da nitrificação: (▲) N-NH_4^+ afluyente; (Δ) N-NH_4^+ efluente; (●) N-NO_3^- formado; (●) N-NO_2^- formado; (x) N-N_2 calculado.	198
Figura 6.56 – Concentração da DQO filtrada durante o monitoramento no período para estabelecimento da nitrificação: (♦) DQO afluyente; (◇) DQO efluente.	199

Figura 6.57 – Concentração dos compostos de nitrogênio para o período monitorado em que foram contempladas as estratégias de alimentação: (▲) N-NH ₄ ⁺ afluyente; (Δ) N-NH ₄ ⁺ efluente; (●) N- NO ₃ ⁻ efluente; (●) N-NO ₂ ⁻ efluente; (x) N-N ₂ calculado.....	202
Figura 6.58 – Perfil temporal dos compostos de enxofre durante um ciclo de 8 horas para a condição 1A após ser atingido o estado estacionário: (○) sulfeto; (●) sulfato.	204
Figura 6.59 – Filtro de celulose (100%) (destacado no círculo vermelho) acoplado à saída do reator UASB (seta vermelha) para evitar o escape de biomassa juntamente com o efluente (Condição 1B).....	206
Figura 6.60 – Comparação entre os perfis temporais de POR das estratégias de alimentação avaliadas, quando aplicadas as mesmas concentrações de sulfeto: (■) condição 1A; (□) condição 2A.	208
Figura 6.61 – Concentração dos compostos nitrogenados durante um ciclo de 8 horas, em estado estacionário, para (a) condição 1A e (b) condição 2A: (▲) N-NH ₄ ⁺ ; (x) N-NH ₃ ; (●) N-NO ₃ ⁻ ; (●) N-NO ₂ ⁻	208
Figura 6.62 – Perfil temporal de POR com duração de um ciclo de 8 horas, em estado estacionário, para a condição 2B.....	209
Figura 6.63 – Concentração dos compostos de nitrogênio para o período monitorado durante a verificação de acúmulo de nitrito e desnitrificação via nitrito: (▲) N-NH ₄ ⁺ afluyente; (Δ) N-NH ₄ ⁺ efluente; (●) N- NO ₃ ⁻ efluente; (●) N-NO ₂ ⁻ efluente; (x) N-N ₂ calculado.	212
Figura 6.64 – Concentração dos compostos de nitrogênio para o período monitorado durante a condição 3: (▲) N-NH ₄ ⁺ afluyente; (Δ) N-NH ₄ ⁺ efluente; (●) N- NO ₃ ⁻ efluente; (●) N-NO ₂ ⁻ efluente; (x) N-N ₂ calculado.	213
Figura 6.65 – Concentração dos compostos nitrogenados em um perfil temporal durante um ciclo de 8 horas, em estado estacionário, para a condição 3: (▲) N-NH ₄ ⁺ ; (x) N-NH ₃ ; (●) N-NO ₃ ⁻ ; (●) N-NO ₂ ⁻	214
Figura 6.66 – Perfil temporal da (▲) concentração de OD e as respectivas relações (■) OD/NH ₃ e (□) OD/NH ₄ ⁺ , realizado durante um ciclo de 8 horas, em estado estacionário, para a condição 3.	214
Figura 6.67 – Formação de uma camada esbranquiçada encobrindo a parte inferior do suporte para colocação da biomassa imobilizada, característica de enxofre elementar (condição 3).	216
Figura 6.68 – Concentração dos compostos nitrogenados em um perfil temporal durante um ciclo de 8 horas, em estado estacionário, para a condição 3: (▲) N-NH ₄ ⁺ ; (x) N-NH ₃ ; (●) N-NO ₃ ⁻ ; (●) N-NO ₂ ⁻	217
Figura 6.69 – Formação de uma substância esbranquiçada nas conexões das mangueiras de alimentação, característico de enxofre elementar.	218
Figura 6.70 – Concentração dos compostos de nitrogênio para o período monitorado durante a condição 5: (▲) N-NH ₄ ⁺ afluyente; (Δ) N-NH ₄ ⁺ efluente; (●) N- NO ₃ ⁻ efluente; (●) N-NO ₂ ⁻ efluente; (x) N-N ₂ calculado.	219
Figura 6.71 – Acúmulo de precipitado de coloração escura (a) no interior das mangueiras e (b) na parte inferior do reator, variável de acordo com a concentração de sulfeto aplicada..	221
Figura 6.72 – Caracterização química do precipitado formado na parte inferior do reator por Espectroscopia de Raios X por Dispersão em Energia (EDX), ao final da condição 5.....	221

Figura 6.73 – Valores medidos de pH em função da concentração de sulfeto aplicada na condição 6: (●) sulfeto afluente; (■) pH afluente e (□) pH efluente.	223
Figura 6.74 – Concentração dos compostos de nitrogênio para o período monitorado durante a condição 6: (▲) N-NH ₄ ⁺ afluente; (Δ) N-NH ₄ ⁺ efluente; (●) N- NO ₃ ⁻ efluente; (●) N-NO ₂ ⁻ efluente; (x) N-N ₂ calculado.....	224
Figura 6.75 – Concentração dos compostos (▲) N-NH ₄ ⁺ , (●) N-NO ₃ ⁻ , (●) N-NO ₂ ⁻ , (■) S-SDT e (□) S-SO ₄ ²⁻ durante os perfis temporais realizado para o primeiro ensaio complementar, sob diferentes concentrações de sulfeto aplicadas: (a) ausência de sulfeto; (b) 9 mg S-SDT L ⁻¹ ; (c) 19 mg S-SDT L ⁻¹	227
Figura 6.76 – Concentração dos compostos (▲) N-NH ₄ ⁺ , (●) N-NO ₃ ⁻ , (●) N-NO ₂ ⁻ , (■) S-SDT e (□) produção de S-SO ₄ ²⁻ durante os perfis temporais realizado para o segundo ensaio complementar, sob diferentes concentrações de sulfeto aplicadas: (a) ausência de sulfeto; (b) 30 mg S-SDT L ⁻¹ ; (c) 50 mg S-SDT L ⁻¹ ; (d) 80 mg S-SDT L ⁻¹	232
Figura 6.77 – Alterações observadas visualmente durante o segundo ensaio complementar, com adição de 50 mg S-SDT L ⁻¹ , após o consumo de sulfeto: (a) meio líquido turvo e esbranquiçado e (b) camadas esbranquiçadas ao redor de algumas matrizes de espumas.	235
Figura 6.78 – Consumo de nitrogênio amoniacal em função da relação molar N-NH ₄ ⁺ /S-SDT para o segundo ensaio complementar: influência da concentração de sulfeto na oxidação anaeróbia de nitrogênio amoniacal.	237
Figura 6.79 – Concentrações de (▲) N-NH ₄ ⁺ ; (●) N-NO ₃ ⁻ ; (●) N-NO ₂ ⁻ ; (□) S-SO ₄ ²⁻ ao longo do tempo durante o terceiro ensaio complementar: (a) reator 1; (b) reator 2; (c) reator 3.	240
Figura 6.80 – Desprendimento e escurecimento da biomassa imobilizada nos cubos de espuma, ao final do terceiro ensaio complementar, indicando redução e/ou supressão da atividade microbiana.....	241
Figura 6.81 – Equilíbrio químico entre as formas de sulfeto de acordo com os valores de pH: (□) faixa de pH da digestão anaeróbia e (▨) faixa de pH ótimo para digestão metanogênica.	244
Figura 6.82 – Concentração de nitrato ao longo do tempo, após a adição de biogás, para os reatores: (■) R1; (▲) R2; (●) R3.	245
Figura 6.83 – Alterações observadas apenas em R1 (à esquerda), ao final do quarto ensaio complementar: (a) meio líquido turvo e esbranquiçado e formação de partículas brancas ao redor das matrizes de espuma; (b) detalhe dos cubos de espuma encoberto por partículas brancas.	246
Figura 6.84 – Modelos cinéticos de ordem zero ajustados aos dados experimentais de concentração de nitrogênio, na forma de nitrato, obtidos no quarto ensaio complementar: (■) R1; (▲) R2; (●) R3.	247
Figura 6.85 – Microscopias ópticas de contraste de fase realizadas para amostras retiradas durante a estratégia II de partida do reator, indicando a presença de: (a) amebas e (b) rotíferos.	251
Figura 6.86 – Microscopias ópticas de contraste de fase realizadas com amostras retiradas durante a condição 1 ^a , indicando a presença de: (a) cocos, bacilos e filamentos, (b) agrupamento de cocos e bacilos, (c) bacilos dispersos, (d) protozoário.....	253
Figura 6.87 – Microscopias ópticas de contraste de fase realizadas com amostras retiradas durante a condição 3, indicando a presença de: (a) aglomerado de bacilos, (b) cocos e bacilos	

dispersos, (c) formas luminosas semelhantes a grânulos de enxofre elementar, (d) protozoário, (e) morfologias semelhantes às bactérias ANAMMOX, (f) aglomerado de cocos e bacilos. 255

Figura 6.88 – Microscopias ópticas de contraste de fase realizadas com amostras retiradas durante a condição 6, indicando a presença de: (a) cocos semelhantes a *nitrosococos*, (b) cocos e bacilos dispersos, (c) cocos e bacilos curvilíneos, (d) aglomerado de bactérias semelhantes a “clusters” ANAMMOX. 257

Figura 6.89 – Microscopias ópticas de contraste de fase realizadas com amostras retiradas ao final do quarto ensaio complementar, após a aplicação de biogás, indicando a presença de: (a) pontos luminosos semelhantes a enxofre elementar próximos de bacilos e cocos, (b) e (c) morfologias semelhantes a “clusters” ANAMMOX, (d), (e) e (f) morfologias predominantes não identificadas. 260

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 – Composição da água residuária sintética nitrificada.....	86
Tabela 5.2 – Composição da solução de micronutrientes.	86
Tabela 5.3 – Caracterização da água residuária simulando esgoto sanitário nitrificado.	87
Tabela 5.4 – Concentrações do doador e dos receptores de elétrons correspondentes às relações N/S aplicadas.	87
Tabela 5.5 – Concentrações aproximadas de sulfeto dissolvido total, de nitrato e de nitrito aplicadas aos ensaios abióticos, com as respectivas relações N/S.	90
Tabela 5.6 – Caracterização do efluente de reator UASB utilizado na alimentação do reator nitrificante/desnitrificante.....	105
Tabela 5.7 – Composição do esgoto sanitário sintético utilizado na alimentação do reator UASB.	106
Tabela 5.8 – Ensaio complementares realizados e as respectivas águas residuárias utilizadas.	107
Tabela 5.9 – Descrição das condições nas quais o RLFBAS foi submetido durante todo o período de operação.....	113
Tabela 5.10 – Parâmetros e metodologia de análise discriminados para cada etapa experimental.	118
Tabela 5.11 – Meio de cultivo contendo sais minerais e elementos traço para o crescimento de organismos nitrificantes.....	123
Tabela 6.1 – Concentrações médias medidas de sulfeto e nitrato durante o período monitorado, com as respectivas relações molares N/S experimentais, de acordo com as condições avaliadas.	127
Tabela 6.2 – Resumo dos resultados obtidos nos ensaios da 1ª etapa, para a desnitrificação via nitrato, em termos de valores médios, após ser atingida a estabilidade aparente do processo.	147
Tabela 6.3 – Concentrações médias medidas de sulfeto e nitrito durante o período monitorado, com as respectivas relações molares N/S experimentais, de acordo com as condições avaliadas.	148
Tabela 6.4 – Concentrações médias dos compostos de nitrogênio no afluente e no efluente, monitorados na ausência de sulfeto e desnitrificação via nitrito.	150
Tabela 6.5 – Resumo dos resultados obtidos nos ensaios da 1ª etapa, para a desnitrificação via nitrito, em termos de valores médios, após ser atingida a estabilidade aparente do processo.	166
Tabela 6.6 – Efeito das atividades químicas na desnitrificação autotrófica, avaliadas sob as mesmas condições empregadas nos ensaios biológicos conduzidos nos reatores verticais de leito fixo.....	169
Tabela 6.7 – Concentração de nitrogênio na forma de nitrato no meio líquido (mg N L ⁻¹) em função do tempo para diferentes velocidades superficiais e para diferentes concentrações do doador de elétrons.....	174

Tabela 6.8 – Equações obtidas de concentração de nitrogênio na forma de nitrato no meio líquido ($\text{mg N-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$) em função do tempo para diferentes velocidades superficiais e para diferentes concentrações de sulfeto, e os respectivos coeficientes de correlação (R^2).	174
Tabela 6.9 – Equações de velocidade específica de utilização de nitrogênio na forma de nitrato (r_{obs}) para cada v_s e as respectivas concentrações de biomassa, de acordo com a concentração de sulfeto utilizada.	175
Tabela 6.10 – Parâmetros cinéticos intrínsecos de ordem $\frac{1}{2}$, com os respectivos coeficientes de correlação (R^2), obtidos para cada v_s empregado, referentes à remoção de nitrogênio na forma de nitrato, de acordo com a concentração de sulfeto utilizada.	179
Tabela 6.11 – Balanço de massa dos compostos de enxofre para os perfis temporais do ensaio de desnitrificação autotrófica via nitrato com sulfeto aplicado em excesso e em concentração estequiométrica.	180
Tabela 6.12 – Concentração de nitrogênio na forma de nitrito no meio líquido ($\text{mg N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$) em função do tempo para diferentes velocidades superficiais e para diferentes concentrações do doador de elétrons.	184
Tabela 6.13 – Equações obtidas de concentração de nitrogênio na forma de nitrito no meio líquido ($\text{mg N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$) em função do tempo para diferentes velocidades superficiais e para diferentes concentrações de sulfeto, e os respectivos coeficientes de correlação (R^2).	184
Tabela 6.14 – Equações de velocidade específica de utilização de nitrogênio na forma de nitrito (r_{obs}) para cada v_s e as respectivas concentrações de biomassa, de acordo com a concentração de sulfeto utilizada.	185
Tabela 6.15 – Parâmetros cinéticos intrínsecos de ordem $\frac{1}{2}$, com os respectivos coeficientes de correlação (R^2), obtidos para cada v_s empregado, referentes à remoção de nitrogênio na forma de nitrato, de acordo com a concentração de sulfeto utilizada.	188
Tabela 6.16 – Balanço de massa dos compostos de enxofre para o perfil temporal do ensaio de desnitrificação autotrófica via nitrito com sulfeto aplicado em excesso e em concentração estequiométrica.	189
Tabela 6.17 – Parâmetros monitorados durante a operação inicial do RLFBAS: primeira estratégia operacional.....	195
Tabela 6.18 – Balanço dos compostos nitrogenados durante o período monitorado para o estabelecimento da nitrificação.	199
Tabela 6.19 – Valores teóricos e medidos de alcalinidade a bicarbonato ($\text{mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$) para todo o período de operação durante o estabelecimento da nitrificação.	200
Tabela 6.20 – Valores médios dos parâmetros monitorados durante o período operacional composto pelas estratégias de alimentação, dividido de acordo com as condições avaliadas.	203
Tabela 6.21 – Valores médios dos parâmetros monitorados durante o período operacional para a verificação do acúmulo de nitrito e desnitrificação via nitrito, dividido de acordo com as condições avaliadas.	211
Tabela 6.22 – Concentrações molares médias (mM) dos compostos de nitrogênio e enxofre, ao longo de 24 horas, para as três condições avaliadas durante o primeiro ensaio complementar.	228

Tabela 6.23 – Parâmetros cinéticos específicos aparentes de ordem zero para consumo de N- NO_3^- com uso de biogás como doador de elétrons, obtidos para cada um dos reatores utilizados no quarto ensaio complementar.247

Tabela 6.24 – Estimativa de organismos nitrificantes e desnitrificantes, por meio da técnica do Número Mais Provável (NMP), ao final de condições operacionais especificadas.250

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB	Alcalinidade a bicarbonato
ANAMMOX	<i>Anaerobic Ammonium Oxidation</i>
Bardenpho	<i>Barnard Denitrification Phosphorus removal</i>
CANON	<i>Complete Autotrophic Nitrogen-removal over Nitrite</i>
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DANDE	Digestão Anaeróbia, Nitrificação e Desnitrificação Endógena
DEAMOX	<i>Denitrifying Ammonium Oxidation</i>
DQO	Demanda química de oxigênio
EDX	<i>Energy-Dispersive X-ray spectroscopy</i>
EESC	Escola de Engenharia de São Carlos
LATAR	Laboratório de Tratamento Avançado e Reuso
LPB	Laboratório de Processos Biológicos
NDS	Nitrificação e Desnitrificação Simultâneas
NMP	Número Mais Provável
OD	Oxigênio Dissolvido
pH	Potencial Hidrogeniônico
POR	Potencial de Oxi-Redução
R1	Reator 1 referente ao quarto ensaio complementar
R2	Reator 2 referente ao quarto ensaio complementar
R3	Reator 3 referente ao quarto ensaio complementar
RAAHLF	Reator Aeróbio-Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo
RBS	Reatores operados em Bateladas Sequenciais
RDNA	Redução dissimilativa de nitrato a amônia
RMRLF	Reator Misto Radial de Leito Fixo
RLFBAS	Reator de Leito Fixo operado em Bateladas Alimentadas Sequenciais
S-SDT	Sulfeto Dissolvido Total
SHARON	<i>Single-reactor High-Activity Ammonium Removal Over Nitrite</i>
SHS	Departamento de Hidráulica e Saneamento
SSV	Sólidos suspensos voláteis
STV	Sólidos totais voláteis
SURAMOX	<i>Sulfate Reduction via Ammonium Oxidation</i>
TDH	Tempo de Detenção Hidráulica
UASB	<i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket</i>

USP

Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

ϕ_{obs}	Módulo de Thiele observado
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
μ_m	Micrômetro
a	Área interfacial para transferência de massa [cm^2]
A	Área da seção transversal do reator [cm^2]
A_p	Área da biopartícula [cm^2]
Bi	Número de Biot
cm	Centímetro
C_N	Concentração de nitrogênio [mg N L^{-1}]
$C_{N'}$	Concentração específica de nitrogênio [$\text{mg N gSSV}^{-1} \text{L}^{-1}$]
C_{Ni}	Concentração de nitrogênio na interface líquido sólido [mg N L^{-1}]
C_{NL}	Concentração de nitrogênio na fase líquida [mg N L^{-1}]
C_{O_2}	Concentração de O_2 [kg m^{-3}]
C_S'	Concentração específica de substrato no meio líquido [$\text{mg N g SSV}^{-1} \text{L}^{-1}$]
C_S	Concentração do substrato na biopartícula em uma dada posição x [mg L^{-1}]
C_{S0}	Concentração do substrato na fase líquida [mg L^{-1}]
C_{Si}	Concentração do substrato na interface líquido-sólido [mg L^{-1}]
D	Coefficiente de difusão molecular [$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$]
d	Dia
D_e	Difusividade efetiva do substrato na biopartícula [$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$]
D_L	Difusividade do substrato na fase líquida [$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$]
d_p	Diâmetro da esfera equivalente [cm]
E	Eficiência de transferência de O_2 do aerador
g	Gramas
h	Hora
H_2S	Sulfeto de hidrogênio
HS^-	Sulfeto na forma iônica
$k_{(1/2)}$	Constante cinética de ordem $1/2$ [$\text{mg N}^{1/2} \text{L}^{-1/2} \text{h}^{-1}$]
$k_{(1/2)a}$	Constante de reação de ordem $1/2$ por unidade de área do biofilme [$\text{g m}^{-1/2} \text{s}^{-1/2}$]
k_0	Constante cinética de ordem zero [$\text{mg N L}^{-1} \text{h}^{-1}$]

k_0'	Constante cinética específica de ordem zero [mg N g SSV ⁻¹ h ⁻¹]
k_{0a}	Constante de reação de ordem zero por unidade de área do biofilme [g m ⁻² s ⁻¹]
k_s	Coeficiente de transferência de massa líquido-sólido [cm ³ s ⁻¹]
L	Espessura do biofilme [cm]
$L^{(1)}$	Comprimento do poro cilíndrico ideal [cm]
$L^{(2)}$	Litro
m	Metro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mmol	Milimol
mV	Milivolt
n	Número de biopartículas no reator diferencial
N	Nitrogênio
N ₂	Nitrogênio molecular
N-amoniacal	Nitrogênio amoniacal
$N\text{-}Amônia_{total}$	Concentração de N como amônia total [mg N L ⁻¹]
N_i	Velocidade de transferência de massa intraparticular [mg cm ⁻³ h ⁻¹]
N-NH ₃	Concentração de N como amônia livre [mg N-NH ₃ L ⁻¹]
N-NH ₄ ⁺	Nitrogênio amoniacal
N-NO ₂ ⁻	Nitrogênio na forma de nitrito
N-NO ₃ ⁻	Nitrogênio na forma de nitrato
N_s	Velocidade de transferência de massa na fase líquida [mg cm ⁻³ h ⁻¹]
P	Pressão atmosférica [N m ⁻²]
Q	Vazão do líquido [L h ⁻¹]
Q_{ar}	Vazão de ar [L h ⁻¹]
R	Constante universal dos gases [N m kg-mol ⁻¹ K ⁻¹]
R	Raio do poro cilíndrico ideal [cm]
R_0	Demanda de oxigênio para a nitrificação [kg h ⁻¹]
r'_N	Velocidade específica de remoção de nitrogênio [mg N g SSV ⁻¹ h ⁻¹]
r_a	Velocidade de reação por unidade de área da superfície do biofilme [g m ⁻² s ⁻¹]
r_N	Velocidade de utilização de nitrogênio [mg N L ⁻¹ h ⁻¹]
$r_{N_{obs}}$	Velocidade específica de consumo de nitrogênio observada [mg N g SSV ⁻¹ h ⁻¹]

r_{obs}	Velocidade específica de utilização de substrato observada [mg N g SSV ⁻¹ h ⁻¹]
$r_{obs} _{t=0}$	Velocidade específica inicial observada de utilização do substrato [mg N g SSV ⁻¹ h ⁻¹]
R_p	Raio da biopartícula [cm]
S	Enxofre
S ⁰	Enxofre elementar
S ²⁻	Sulfeto na forma iônica
S ₂ O ₃ ²⁻	Tiossulfato
S ₄ O ₆ ²⁻	Tetracionato
SO ₃ ²⁻	Sulfito
S-SO ₄ ²⁻	Enxofre na forma de sulfato
T	Temperatura [°C ou K]
t	Tempo
t ₀	Tempo inicial
V _L	Volume do líquido interfacial [L]
V _{reator}	Volume útil do reator [L]
v _s	Velocidade superficial de líquido [cm s ⁻¹]
x	Distância da entrada do poro [cm]
X	Concentração de biomassa no interior do reator [g SSV L ⁻¹]
α	Coefficiente de absorção
β	Constante adimensional denominada taxa de penetração
ΔN	Concentração de nitrogênio nitrificado [kg m ⁻³]
ε	Porosidade do leito

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	37
2.	HIPÓTESE.....	41
3.	OBJETIVOS	42
3.1.	OBJETIVO GERAL.....	42
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4.	REVISÃO DA LITERATURA.....	44
4.1	BIOTECNOLOGIA ANAERÓBIA APLICADA A ESGOTOS SANITÁRIOS.....	44
4.2	PÓS-TRATAMENTO BIOLÓGICO PARA REMOÇÃO DE NITROGÊNIO.....	45
4.2.1	Processos convencionais	46
4.2.2	Novos bioprocessos e tecnologias alternativas	49
4.2.2.1	Remoção de nitrogênio com aeração intermitente.....	50
4.2.2.2	Nitrificação - desnitrificação pela via curta.....	51
4.2.2.3	Processos baseados na oxidação anaeróbia de nitrogênio amoniacal	53
4.2.2.4	Desnitrificação autotrófica utilizando compostos reduzidos de enxofre	56
4.2.2.5	Uso de biogás como doador de elétrons para a desnitrificação	61
4.3	REATORES OPERADOS EM BATELADAS SEQUÊNCIAIS	63
4.4	ANÁLISE DE REATORES CONTENDO BIOMASSA IMOBILIZADA	65
4.4.1	Desnitrificação autotrófica com uso de sulfeto em reatores de leito fixo	70
4.4.1.1	Fundamentação teórica do processo	70
4.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
5.	MATERIAL E MÉTODOS	79
5.1	DESENHO EXPERIMENTAL.....	79
5.2	EXPERIMENTOS DA 1ª ETAPA	83
5.2.1	Reatores verticais de leito fixo	83
5.2.2	Água residuária sintética.....	85
5.2.3	Inóculo	87
5.2.4	Procedimento Experimental	89
5.2.5	Ensaio complementares – testes abióticos	90
5.3	EXPERIMENTOS DA 2ª ETAPA	91
5.3.1	Reatores diferenciais de leito fixo	91
5.3.2	Água residuária e inóculo	92
5.3.3	Modelagem cinética.....	93
5.3.4	Procedimento experimental	96
5.4	EXPERIMENTOS DA 3ª ETAPA	97
5.4.1	Reator de leito fixo operado em batelada alimentada sequencial (RLFBAS)	97

5.4.2	Reator anaeróbio de manta de lodo (UASB)	101
5.4.3	Água residuária e inóculo	102
5.4.4	Ensaio complementares.....	106
5.4.5	Procedimento experimental.....	108
5.5	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	118
5.6	AMOSTRAGEM	120
5.7	EXAMES MICROBIOLÓGICOS	121
5.7.1	Exames microscópicos.....	122
5.7.2	Quantificação de organismos nitrificantes e desnitrificantes	122
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	126
6.1	EXPERIMENTOS DA 1ª ETAPA.....	126
6.1.1	Reatores verticais de leito fixo: monitoramento.....	126
6.1.1.1	Desnitrificação via nitrato	127
6.1.1.2	Desnitrificação via nitrito.....	147
6.1.2	Ensaio complementares – testes abióticos.....	167
6.1.3	Exames microscópicos.....	170
6.1.3.1	Ausência de sulfeto	170
6.1.3.2	Adição de sulfeto	171
6.2	EXPERIMENTOS DA 2ª ETAPA.....	173
6.2.1	Reatores diferenciais de leito fixo: ensaios cinéticos	173
6.2.1.1	Desnitrificação via nitrato	173
6.2.1.2	Desnitrificação via nitrito.....	183
6.3	EXPERIMENTOS DA 3ª ETAPA.....	191
6.3.1	Reator nitrificante/desnitrificante – RLFBAS	191
6.3.1.1	Determinação de parâmetros operacionais iniciais	191
6.3.1.2	Estratégias de partida do reator	194
6.3.1.3	Estratégias de alimentação	201
6.3.1.4	Verificação de acúmulo de nitrito e da desnitrificação via nitrito.....	211
6.3.2	Ensaio complementares.....	225
6.3.3	Exames microbiológicos.....	249
6.3.4	Limitações operacionais da aplicação proposta de integração dos processos em um único reator	261
6.4.	VISÃO GERAL DA PESQUISA: INTERLIGAÇÃO DAS TRÊS ETAPAS	263
7.	CONCLUSÕES	267
8.	SUGESTÕES.....	270
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	272

“O começo é a metade do todo.

Platão (428/427 a.C. -348/347 a.C.)

1. INTRODUÇÃO

A aplicação da biotecnologia anaeróbia para o tratamento de esgotos sanitários tem crescido e sido difundida principalmente em países de clima tropical, como o Brasil, onde tal tecnologia pode ser considerada consolidada. Entretanto, os reatores anaeróbios não promovem a remoção de nutrientes de forma eficiente, particularmente compostos nitrogenados, os quais devem ser removidos de modo a atender aos requisitos ambientais e legais. Desse modo, o pós-tratamento dos efluentes de reatores anaeróbios tratando esgoto sanitário se torna imprescindível.

Nos processos usualmente empregados, a remoção de nitrogênio é realizada por meio da nitrificação autotrófica seguida da desnitrificação heterotrófica. Esta última é efetivada na presença de doadores de elétrons orgânicos, provenientes de fontes endógenas ou exógenas. No caso de efluentes de reatores anaeróbios, a fração de matéria orgânica remanescente não é prontamente biodegradável, o que dificulta sua utilização como fonte endógena para a desnitrificação. Portanto, se faz necessária a adição de fontes de carbono exógenas, tais como

metanol, etanol ou ácidos voláteis, aumentando os custos operacionais do sistema, o qual pode se tornar inviável economicamente.

Visando a redução dos custos relacionados ao tratamento terciário, diversas pesquisas vêm sendo realizadas acerca de tecnologias não convencionais para remoção de nitrogênio. A remoção de nitrogênio via nitrito, denominada via curta, por omitir a etapa de nitratação, é uma concepção inovadora bastante interessante, visto que há economia de oxigênio e alcalinidade para a nitrificação e redução da quantidade de fonte de carbono para a desnitrificação heterotrófica. Adicionalmente, o tempo de reação necessário para a completa nitrificação e desnitrificação pode ser encurtado, já que são omitidas duas etapas intermediárias do processo.

Outra alternativa recente que merece destaque é a desnitrificação autotrófica utilizando sulfeto como doador de elétrons, que pode eliminar ou reduzir a necessidade de adição de fonte de carbono. Para efluentes de reatores anaeróbios tratando esgoto sanitário este processo se mostra particularmente interessante, visto que utiliza compostos comumente disponíveis neste tipo de despejo: nitrogênio amoniacal (que deve ser nitrificado), sulfeto solúvel e sulfeto de hidrogênio presente no biogás. Vale ressaltar que, para ser eficiente, esta aplicação depende de maiores pesquisas a respeito de novas configurações de reatores e suas condições operacionais. Os reatores devem permitir a nitrificação parcial do efluente, de forma a preservar parte do sulfeto para a desnitrificação, uma vez que, em condições de aerobiose, o sulfeto é oxidado a sulfato e/ou compostos de enxofre em estados de oxidação intermediários.

Neste sentido, reatores operados em bateladas sequenciais (RBS) podem se constituir em alternativa viável e otimizada para o pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios, por permitirem a ocorrência da nitrificação e desnitrificação em um único reator. Em teoria, a operação em regime de batelada alimentada permitiria que, mesmo após o processo

nitrificante, o sulfeto presente nesse efluente estivesse disponível para a desnitrificação, uma vez que haveria entrada controlada da água residuária. Adicionalmente, este tipo de reator também é capaz de promover a ocorrência simultânea da nitrificação e desnitrificação em condições operacionais especificadas. Portanto, a investigação das variáveis operacionais destes reatores contribuiria para a possível viabilização de sua aplicação ao pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios.

Embora sejam abundantes as pesquisas sobre os processos convencionais de nitrificação e desnitrificação, incluindo o pós-tratamento biológico em RBS, existem lacunas na literatura a respeito da desnitrificação autotrófica utilizando sulfeto como doador de elétrons. A viabilidade deste processo – via nitrato e via nitrito – em efluentes de reatores anaeróbios tratando esgoto sanitário, com emprego de sulfeto presente no próprio efluente, vem sendo investigada recentemente no Laboratório de Processos Biológicos (LPB) da Escola de Engenharia de São Carlos - USP. Os resultados já obtidos demonstram que o processo é tecnicamente viável. No entanto, o acoplamento deste processo à nitrificação em um único reator ainda não foi amplamente investigado, sendo muito escassas as pesquisas a respeito (PÉREZ *et al.*, 2007), especialmente para o pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios aplicados ao tratamento de esgotos sanitários.

Visto que a desnitrificação integrada à oxidação de sulfeto é uma concepção ainda muito recente, há a necessidade de realização de estudos fundamentais para melhor descrever e compreender os processos físicos e bioquímicos envolvidos. Portanto, a investigação da cinética da desnitrificação autotrófica utilizando sulfetos como doadores de elétrons, aplicada a esgoto sanitário, merece destaque, por terem sido localizados poucos artigos que tratem especificamente desse tema na literatura.

Considerando a crescente necessidade de desenvolvimento de sistemas de pós-tratamento que apresentem menores custos operacionais, esta pesquisa visou ampliar os

conhecimentos acerca da desnitrificação autotrófica utilizando sulfeto como doador de elétrons e avaliar a possibilidade de sua integração à nitrificação em um mesmo reator para o pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios tratando esgoto sanitário.

“ A dúvida é o princípio de toda sabedoria.
Aristóteles (384 a.C. -322 a.C.)

2. HIPÓTESE

Esta pesquisa partiu da hipótese de que é possível promover a remoção de nitrogênio de efluentes de reatores anaeróbios tratando esgoto sanitário em um único reator, utilizando fonte endógena e inorgânica de doador de elétrons para a desnitrificação. Neste sistema, o nitrogênio amoniacal presente no efluente seria nitrificado e a desnitrificação autotrófica sequencial ocorreria com uso de sulfeto – também presente no efluente a ser tratado – como doador de elétrons em um processo cíclico, ocorrendo em reator operado em batelada alimentada sequencial e submetido à aeração intermitente. As bases teóricas para a determinação das condições operacionais, visando o estabelecimento de ambos os processos, partiriam da investigação e caracterização cinética da desnitrificação autotrófica integrada à oxidação de sulfeto. Desse modo, o melhor conhecimento deste último processo permitiria, hipoteticamente, seu acoplamento à nitrificação em um único reator.

“Quando se navega sem destino,
nenhum vento é favorável.
Lúcio Aneu Sêneca (4 a.C. - 65 d.C.)

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral da pesquisa é avaliar a viabilidade técnica de remoção de nitrogênio de efluente de reator anaeróbio tratando esgoto sanitário em reator de leito fixo, operado em batelada alimentada sequencial (RLFBAS), e submetido a condições de aeração intermitente, empregando a desnitrificação autotrófica com uso de sulfeto presente no efluente como doador de elétrons.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliação do efeito da concentração de sulfeto na desnitrificação autotrófica via nitrato e via nitrito;
- Determinação dos parâmetros cinéticos intrínsecos da desnitrificação autotrófica via nitrato e via nitrito, para diferentes concentrações de sulfeto e diferentes relações N/S;
- Avaliação de estratégias de partida e de alimentação do reator favoráveis ao estabelecimento da nitrificação e da desnitrificação autotrófica em RLFBAS;
- Avaliação das melhores estratégias operacionais relacionadas às fases aeradas e não aeradas de RLFBAS e os respectivos tempos de duração;
- Verificação das condições propícias ao acúmulo de nitrito e à inibição das bactérias oxidadoras de nitrito;
- Avaliação da desnitrificação autotrófica via nitrito utilizando sulfeto como doador de elétrons, acoplada à nitrificação pela via curta;
- Verificação da ocorrência de outros processos de remoção de nitrogênio, complementares ao processo nitrificante/desnitrificante estudado;
- Avaliação do uso de biogás para a desnitrificação de efluente sanitário nitrificado;
- Caracterização microbiológica da biomassa presente nos reatores estudados.

“O início da sabedoria é a admissão da própria ignorância. Todo o meu saber consiste em saber que nada sei.

Sócrates (469 a.C.-470 a.C.)

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1 BIOTECNOLOGIA ANAERÓBIA APLICADA A ESGOTOS SANITÁRIOS

A necessidade por sistemas simplificados de tratamento de esgoto no Brasil, em função do quadro sócio-econômico e das condições de saneamento das comunidades brasileiras, impulsionou a evolução e aplicação da tecnologia anaeróbia para esse fim. As diversas vantagens associadas a essa tecnologia, como o baixo custo, simplicidade operacional, ausência de consumo de energia para aeração e baixa produção de sólidos, aliadas às condições ambientais de clima tropical, têm contribuído para a colocação dos sistemas anaeróbios de tratamento de esgoto em posição de destaque no Brasil. Neste caso, os reatores ascendentes de manta de lodo, denominados UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*), se revelam como ótimas opções de tratamento.

Atualmente, a tecnologia anaeróbia aplicada ao tratamento de esgotos sanitários encontra-se consolidada no Brasil, existindo muitas unidades de tratamento operando em escala real. Segundo Chernicharo (2006), no Brasil, praticamente todas as análises de

alternativas de tratamento de efluentes incluem os reatores anaeróbios como primeiras unidades.

Vale ressaltar que os sistemas anaeróbios também apresentam algumas limitações intrínsecas no que diz respeito ao efluente gerado, o qual dificilmente atende aos padrões estabelecidos pela legislação ambiental brasileira, especialmente no que diz respeito aos compostos nitrogenados. Quando indevidamente lançados nos corpos aquáticos, esses efluentes podem causar a diminuição dos níveis de oxigênio e o crescimento exacerbado de algas como resultado da eutrofização, além de possíveis danos à saúde humana. Adicionalmente, a presença de sulfeto neste tipo de despejo também é fonte de problemas ambientais e à saúde humana. Por estes motivos, é imprescindível promover o pós-tratamento dos efluentes de reatores anaeróbios, principalmente para a remoção de nitrogênio, com a finalidade de adequá-los aos requisitos da legislação vigente.

4.2 PÓS-TRATAMENTO BIOLÓGICO PARA REMOÇÃO DE NITROGÊNIO

A legislação brasileira estabelece, na Resolução do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) nº430/2011, os padrões de lançamento de efluentes nos corpos de água receptores. No entanto, apenas a limitação da concentração de nitrogênio amoniacal total é apresentada (20 mg N L^{-1}), enquanto os compostos oxidados de nitrogênio – nitrito e nitrato – ainda não estão sujeitos às restrições de lançamento definidas nesta resolução. Neste caso, na resolução CONAMA nº357/2005, são apresentadas apenas as concentrações máximas permitidas de acordo com a classificação dos corpos hídricos. Para os corpos receptores de água doce pertencentes às Classes I a IV, as concentrações máximas permitidas são $1,0 \text{ mg N L}^{-1}$ e $10,0 \text{ mg N L}^{-1}$, para nitrito e nitrato, respectivamente. De qualquer forma, estas restrições se relacionam com os padrões de lançamento de efluentes, uma vez que o efluente

lançado não deve alterar os padrões de qualidade dos corpos receptores determinados por esta resolução.

A remoção dos compostos de nitrogênio pode ser realizada por processos físico-químicos ou biológicos, sendo que estes últimos são predominantes em função do baixo custo aliado à alta eficiência. A seguir serão descritos os processos biológicos tradicionais para remoção de nitrogênio, assim como os processos alternativos, que visam à otimização dos sistemas de pós-tratamento.

4.2.1 Processos convencionais

A remoção biológica de nitrogênio em tratamentos convencionais ocorre em duas etapas, envolvendo a nitrificação seguida da desnitrificação, conforme apresentado na Figura 4.1. A nitrificação consiste em um processo autotrófico no qual o nitrogênio amoniacal (amônio + amônia) é oxidado a nitrito (nitritaço) e sequencialmente a nitrato (nitrataço), sob condições estritamente aeróbias. Subsequentemente, na desnitrificação, o nitrato é reduzido a nitrogênio gasoso em um processo heterotrófico, em condições anóxicas.

Figura 4.1 – Ciclo do nitrogênio tradicional, com os respectivos estados de oxidação do nitrogênio (Fonte: AHN, 2006).

Os estágios envolvidos na nitrificação ocorrem devido à ação de gêneros distintos de bactérias, os quais utilizam nitrogênio amoniacal ou nitrito como fonte de energia e dióxido de carbono como fonte inorgânica de carbono, enquanto o oxigênio molecular é o receptor final de elétrons. Na nitrificação, o gênero mais comumente envolvido é *Nitrosomonas*, sendo que, segundo Ahn (2006), *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosovibrio* e *Nitrosolobus* também são capazes de oxidar nitrogênio amoniacal a nitrito. Na nitratação, há destaque para o gênero *Nitrobacter*, sendo conhecidos também *Nitrospira*, *Nitrospina*, *Nitrococcus* e *Nitrocystis* (METCALF E EDDY, 2003; SCHMIDT, 2003).

As bactérias envolvidas na desnitrificação heterotrófica utilizam nitrito ou nitrato como receptores de elétrons e matéria orgânica como fonte de carbono e energia. O gênero *Pseudomonas* é o mais comum entre as desnitrificantes, havendo ainda *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Hypomicrobium*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Paracoccus*, *Propionibacterium*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Spirillum* e *Vibrio* (METCALF E EDDY, 2003; AHN, 2006).

As reações de oxidação de nitrogênio amoniacal a nitrato podem ser descritas segundo as equações (4.1) e (4.2).

Observa-se que a nitrificação é um processo acidificante, em que há grande consumo de alcalinidade. Portanto, a carência de alcalinidade pode afetar o pH e a estabilidade do sistema. De acordo com Grady e Lim (1980), 8,62 mg de alcalinidade na forma HCO_3^- são consumidos para cada 1 mg de N-NH_4^+ removido. Nota-se, também, a demanda considerável

de oxigênio, sendo teoricamente equivalente a 4,33 mg O₂ para cada mg N-NH₄⁺ oxidado até nitrato.

Segundo Henze *et al.* (1997), a oxidação do nitrogênio amoniacal é a etapa limitante deste processo, pois sua velocidade de oxidação é mais lenta em relação à oxidação do nitrito. Os autores ainda afirmam que a temperatura, o pH, a concentração de oxigênio dissolvido, a concentração e composição do substrato, tempo de retenção celular e a fração de bactérias nitrificantes no sistema são parâmetros importantes na cinética da nitrificação. As faixas ótimas de pH e temperatura, para desenvolvimento dos organismos nitrificantes, variam de 7,5 a 8,0 e de 30°C a 35°C, respectivamente.

Com relação à desnitrificação heterotrófica, as reações descritas nas equações (4.3) e (4.4) estão envolvidas (KHIN E ANNACHHATRE, 2004).

Observa-se que o processo em questão gera alcalinidade, recuperando metade daquela consumida durante a nitrificação, fato que reduz ou elimina a necessidade de adição de composto alcalino para corrigir o pH (VAN HAANDEL *et al.*, 1999). De acordo com Henze *et al.* (1997), a desnitrificação produz 1 equivalente grama de alcalinidade, ou 50 g de alcalinidade como CaCO₃, por mol de N reduzido.

Fatores ambientais como pH, temperatura, concentração de oxigênio dissolvido e fontes de energia (substrato) afetam a velocidade de desnitrificação. As faixas de temperatura e pH ótimos variam de 10°C a 30°C e de 6,5 a 8,0, respectivamente (METCALF E EDDY, 2003).

De acordo com Villaverde (2004), a integração dos processos de nitrificação e desnitrificação convencionais para remoção de nitrogênio se enquadra em três categorias principais: i) nitrificação seguida de desnitrificação em tanque anóxico separado, com adição de fonte externa de carbono; ii) pré-desnitrificação em compartimento anóxico seguido de uma etapa aeróbia na qual ocorre a nitrificação e são gerados compostos oxidados de nitrogênio, havendo a recirculação do efluente da fase aeróbia para o compartimento anóxico anterior (processo Bardenpho); iii) reatores em bateladas sequenciais (RBS), nos quais os ciclos sequenciais e intermitentes, de aeração (nitrificação) e não aeração (desnitrificação), permitem a remoção de nitrogênio.

Além dos processos tradicionais para remoção de nitrogênio, tecnologias alternativas vêm sendo estudadas recentemente com o intuito de buscar melhores desempenhos de processo em termos dos padrões de qualidade do efluente e, ao mesmo tempo, redução dos custos de construção, operação e manutenção. A descoberta de novas rotas metabólicas envolvidas na conversão dos compostos nitrogenados também tem contribuído para os avanços obtidos nesta área.

4.2.2 Novos bioprocessos e tecnologias alternativas

Visto que os processos convencionais de remoção biológica de nitrogênio apresentam algumas desvantagens econômicas, principalmente com relação ao alto consumo de oxigênio, ao requerimento de doadores de elétrons orgânicos exógenos e à geração considerável de lodo, é justificável a realização de diversas pesquisas acerca de novos processos e tecnologias alternativas. A seguir, serão descritas algumas dessas tecnologias e processos biológicos, que visam melhores eficiências de tratamento juntamente com a redução dos custos.

4.2.2.1 Remoção de nitrogênio com aeração intermitente

A operação sob aeração intermitente consiste em um processo cíclico, com períodos específicos de aeração e não aeração, no qual é promovida a nitrificação e a desnitrificação, em um único reator, aplicado ao pós-tratamento de efluentes contendo nutrientes. A duração para um ciclo contendo períodos específicos de aeração e não aeração é denominada tempo de ciclo. Durante o período de não aeração, o reator opera essencialmente como um reator anóxico. Neste período, ocorre a depleção da concentração de oxigênio dissolvido (OD), de modo que a concentração das formas oxidadas de nitrogênio se reduz e a concentração de nitrogênio amoniacal se eleva. No período de aeração subsequente, o nitrogênio amoniacal é oxidado a nitrato ou nitrito. Os tempos específicos de aeração e não aeração durante os ciclos são determinantes para o desempenho do sistema de tratamento (METCALF E EDDY, 2003). Dados reportados de desempenho de plantas de tratamento para processos com aeração intermitente indicam que as concentrações de nitrato no efluente variam de 3,0 a 4,8 mg N L⁻¹, enquanto que as concentrações de nitrogênio amoniacal se mantêm em níveis menores que 8,0 mg N L⁻¹ (U.S. EPA, 1993 *apud* METCALF E EDDY, 2003).

De acordo com Chen *et al.*, (2000), a incorporação de um período não aerado no sistemas de digestão de lodo e de remoção biológica de nutrientes oferece muitas vantagens, como a melhoria de remoção de nitrogênio, economia de energia, menor produção de lodo quando comparado aos sistemas convencionais de lodos ativados e pH estável devido à desnitrificação. Jenkins *et al.* (2003) ainda apontam que tal alternância promove a habilidade das populações microbianas em absorver substrato solúvel e estocá-lo internamente para utilização durante o período de escassez.

Os tempos dos ciclos anóxico/aeróbio podem ser controlados manualmente, pelo uso de *timers*, ou por meio de um sistema automatizado baseado nas medidas de potencial de

oxidação-redução (POR). Neste processo, a aeração é acionada quando a medida de POR indica que o nitrato foi removido (desnitrificação completa), e é desligada após completada a nitrificação (METCALF E EDDY, 2003).

Chen *et al.* (2000) avaliaram a remoção simultânea de carbono e nitrogênio de água residuária municipal sintética, em reator contendo biomassa imobilizada (12 L de volume útil), operado em batelada, com agitação e aplicação de aeração intermitente. O monitoramento foi realizado por meio de medidas de POR. A máxima eficiência de desnitrificação, acompanhada por nitrificação suficiente, foi obtida quando a relação tempo de aeração/tempo de ciclo foi de 50%. Mantida tal relação e utilizando três ciclos anóxico/aeróbio por dia, com TDH de 10 horas, as eficiências de remoção de nitrogênio e de DQO foram superiores a 80% e 90%, respectivamente.

Villaverde *et al.* (2000) aplicaram a aeração intermitente em um sistema convencional de lodos ativados, para o pós-tratamento de efluente de reator UASB tratando água residuária proveniente da fabricação de amido de milho. Após a aclimação da biomassa, a remoção de nitrogênio atingiu eficiência de até 66%. Os autores afirmaram que os períodos cíclicos de aeração permitiram o uso mais eficiente do oxigênio para a nitrificação e do conteúdo de matéria orgânica presente no efluente para a desnitrificação.

4.2.2.2 Nitrificação - desnitrificação pela via curta

O acúmulo de nitrito em alguns casos relatados na nitrificação convencional impulsionou diversas pesquisas acerca da nitrificação pela via curta (TURK E MANIVIC, 1989; ALLEMAN, 1985; RUIZ *et al.*, 2003; CHUNG E BAE, 2002). Neste processo, as etapas de nitratação e subsequente redução de nitrato a nitrito são eliminadas e,

consequentemente, o nitrogênio amoniacal é oxidado apenas a nitrito (Figura 4.2). Isso resulta em redução significativa dos custos operacionais em função da economia de fonte de energia para aeração (redução de 25% de demanda de oxigênio) e de fonte de carbono exógena para a desnitrificação (redução de 30% a 40% de fonte de carbono) (VILLAVÉRDE, 2004; BAE *et al.*, 2002). Além disso, a nitrificação a nitrito pode diminuir o tempo de reação tanto na nitrificação quanto na desnitrificação e reduzir, também, o excesso de lodo (TURK E MANIVIC, 1989; ALLEMAN, 1985).

Figura 4.2. Esquema da remoção de nitrogênio via nitrito, com remoção ideal de 100% de N (valor em parêntese) (Fonte: SCHMIDT *et al.*, 2003).

O acúmulo de nitrito ocorre por meio da inibição das bactérias oxidadoras de nitrito. A inibição de tais bactérias se dá, principalmente, pela presença de amônia livre (BAE *et al.*, 2002), mas pode ocorrer também com baixas concentrações de oxigênio no meio (ÇEÇEN E GÖENEÇ, 1995), baixas concentrações de hidroxilamina livre (YANG E ALLEMAN, 1992), ou com alternância da nitrificação e desnitrificação em um mesmo reator (VILLAVÉRDE, 2004).

O pH e a temperatura também são parâmetros operacionais importantes para o controle das populações microbianas, por seu efeito no equilíbrio químico que controla a concentração de amônia livre. Bae *et al.* (2002) observaram o máximo acúmulo de nitrito em reator operado em batelada na faixa de pH 8-9 e temperatura em torno de 30°C, usando biomassa mista (suspensa e imobilizada). A concentração inicial de amônia era 50 mg N L⁻¹. Observou-se que 77% da amônia removida foi transformada em nitrito, resultando em acúmulo desse composto no sistema.

A primeira tecnologia a aplicar com sucesso a nitrificação/desnitrificação com nitrito como intermediário foi o processo SHARON – *Single-reactor High-activity Ammonium Removal Over Nitrite* (VAN KEMPEN *et al.*, 2001 *apud* KHIN E ANNACHHATRE, 2004). Este sistema faz uso das diferentes velocidades de crescimento das oxidadoras de nitrogênio amoniacal e de nitrito a temperaturas suficientemente altas (30-35°C), que são mais favoráveis às oxidadoras de nitrogênio amoniacal. É reproduzido em reator de mistura perfeita e adequado para efluentes contendo concentrações de íon amônio maiores que 500 mg N L⁻¹ (IAMAMOTO, 2006). De acordo com Martins (2010), o modo de operação do sistema sem a retenção de lodo e sem o controle do pH fazem com que as bactérias oxidadoras de nitrito sejam lavadas do reator.

4.2.2.3 Processos baseados na oxidação anaeróbia de nitrogênio amoniacal

Entre os processos baseados na oxidação anaeróbia de nitrogênio amoniacal destacam-se o ANAMMOX (*Anaerobic Ammonium Oxidation*) e o CANON (*Complete Autotrophic Nitrogen removal Over Nitrite*).

O ANAMMOX é um processo em que nitrito é utilizado como receptor de elétrons para a oxidação de nitrogênio amoniacal, sem a adição de fonte de carbono externa. O principal produto formado é N₂, mas aproximadamente 10% do nitrogênio alimentado (nitrogênio amoniacal e nitrito) são convertidos a nitrato. Visto que o crescimento da biomassa neste sistema é muito baixo, se fazem necessários um sistema eficiente de separação de sólidos e um longo tempo de partida para se obter concentração de biomassa suficiente para a manutenção da operação (JETTEN *et al.*, 1997; STROUS *et al.*, 1997b).

A reação bioquímica do processo ANAMMOX é descrita de acordo com a equação (4.5), proposta por Van de Graaf *et al.* (1996).

Strous *et al.* (1997a) demonstraram que a inibição deste processo pela presença de oxigênio é reversível. Reatores operados em batelada foram submetidos a condições de microaerofilia (concentrações de OD de 2%, 1%, 0,5% da concentração de saturação). Nestas condições, não foi observado o desenvolvimento de microrganismos anammox. Porém, quando os reatores passaram a operar em ambiente anaeróbio, o processo ANAMMOX foi restabelecido.

Sliekers *et al.* (2002) observaram a coexistência de bactérias anaeróbias oxidadoras de nitrogênio amoniacal e de bactérias nitrificantes aeróbias sob condições de limitação de oxigênio. Neste caso, as bactérias nitrificantes oxidaram o nitrogênio amoniacal a nitrito, exaurindo todo o oxigênio do meio, enquanto que as bactérias anammox converteram todo o nitrito formado a nitrogênio molecular. A combinação da nitrificação parcial e ANAMMOX em um único reator, sob condições limitadas de oxigênio e de matéria orgânica, descrevem o processo CANON. A interação estável entre as bactérias supracitadas permitem a ocorrência deste processo (KHIN E ANNACHHATRE, 2004).

O processo ANAMMOX ainda pode ser combinado com o SHARON de modo que águas residuárias contendo altas concentrações de nitrogênio amoniacal são submetidas ao SHARON para oxidação de 50% a nitrito, e enviadas ao reator ANAMMOX para a desnitrificação autotrófica (Figura 4.3).

Figura 4.3 – Esquema do processo combinado SHARON-ANAMMOX (Fonte: KHIN E ANNACHHATRE, 2004).

Estas tecnologias são aplicáveis para águas residuárias contendo elevadas concentrações de nitrogênio amoniacal, além de ser necessário alto controle operacional dos sistemas.

Um novo conceito de oxidação anaeróbia de nitrogênio amoniacal foi proposto inicialmente por Fdz-Polanco *et al.* (2001). Na pesquisa realizada em reator anaeróbio de leito fluidizado, para o tratamento de vinhaça proveniente da destilação de etanol, foi observado um comportamento anômalo relativo à produção de altas concentrações de nitrogênio molecular no biogás. As análises indicaram remoção de 50% de nitrogênio, convertido a N_2 , concomitantemente à remoção de 80% de enxofre na forma de sulfato, que não foram convertidos a sulfeto (dissolvido e no biogás). Os autores atribuíram este comportamento a um mecanismo incomum envolvendo a oxidação anaeróbia de nitrogênio amoniacal simultânea à redução de sulfato. Este processo ficou conhecido como SURAMOX (*Sulfate Reduction via Ammonium Oxidation*). A reação global proposta é descrita pela equação (4.6).

A reação bioquímica global foi obtida através da combinação de reações envolvendo a formação de nitrito e o processo ANAMMOX, conforme expresso pelas equações (4.7), (4.8) e (4.9).

Diante dos resultados obtidos, os autores salientaram a necessidade de realização de experimentos mais sofisticados, com uso de substratos marcados, visando demonstrar o destino dos compostos de nitrogênio e enxofre neste processo.

4.2.2.4 Desnitrificação autotrófica utilizando compostos reduzidos de enxofre

A desnitrificação autotrófica com o uso de compostos de enxofre, como doadores de elétrons, é uma alternativa que vem sendo estudada recentemente, com aplicação para diferentes tipos de águas residuárias industriais (GOMMERS *et al.*, 1988; KLEEREBEZEM E MENDEZ, 2002; REYES-AVILA, 2004; VAIOPOULOU *et al.*, 2005) e águas subterrâneas contaminadas com nitrato (KOENIG E LIU, 2001; SIERRA-ALVAREZ *et al.*, 2007). Entretanto, as pesquisas relacionadas à aplicação em esgotos sanitários são escassas, embora sejam bastante promissoras.

A remoção dos compostos de nitrogênio integrada ao ciclo do enxofre é possível em função dos metabolismos destes dois elementos interagirem em vários níveis de tratamento (HULSHOFF POL *et al.*, 1998). Nesse caso, o nitrato é reduzido por meio da ação de bactérias oxidadoras de enxofre, como *Thiobacillus denitrificans* e *Thiomicrospira denitrificans* (ZHANG *et al.*, 1999), ao mesmo tempo em que utilizam uma variedade de compostos inorgânicos reduzidos de enxofre (S^{2-} , S^0 , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$, SO_3^{2-}) (MANCONI *et al.*, 2007), os quais funcionam como doadores de elétrons para a desnitrificação. Visto que tais

bactérias são quimioautotróficas e, por isso, utilizam fonte de carbono inorgânica, não é necessária a adição de fonte externa de carbono, como metanol e etanol, o que reduz os custos do processo (KIM *et al.*, 2003). Além disso, há menor geração de lodo quando comparado aos processos convencionais.

Outra vantagem deste processo é a remoção simultânea de nitrogênio e enxofre. Os compostos reduzidos de enxofre representam um problema ambiental, devido à toxicidade, mau odor, propriedades corrosivas e demanda química de oxigênio. Quando convertidos na desnitrificação autotrófica, esses compostos transformam-se em produtos não prejudiciais: sulfato e enxofre elementar. O sulfato pode ser descartado diretamente nos corpos receptores (MANCONI *et al.*, 2007), enquanto que o enxofre elementar, por ser insolúvel, pode ser removido fisicamente do efluente para reuso, por exemplo, para a produção de ácido sulfúrico (JASSEN *et al.*, 1999).

De acordo com Reyes-Ávila *et al.* (2004), a equação (4.10) representa a redução de nitrato utilizando sulfeto como fonte de energia, tendo como produtos finais sulfato e N₂.

Dependendo das condições fisiológicas, a oxidação de sulfeto pode ocorrer parcialmente a enxofre elementar (BERISTAIN-CARDOSO *et al.*, 2006), conforme a equação (4.11).

A desnitrificação com a oxidação de enxofre elementar a sulfato também é possível, como descrita na equação (4.12), segundo Sierra-Alvarez *et al.* (2007). Neste caso, vale ressaltar que há consumo de alcalinidade, ao contrário dos casos em que sulfeto é oxidado.

O uso de tiosulfato como doador de elétrons para a desnitrificação autotrófica é termodinamicamente mais favorável quando comparados ao sulfeto e enxofre elementar (BERISTAIN-CARDOSO *et al.*, 2006), como apresentado na equação (4.13).

Por fim, a desnitrificação via nitrito utilizando sulfetos como doadores de elétrons foi investigada por Mahmood *et al.* (2007b), ocorrendo conforme as equações (4.14) e (4.15). Observa-se que a oxidação completa a sulfato é termodinamicamente mais favorável que a oxidação a enxofre elementar.

Beristain-Cardoso *et al.* (2006) realizaram bio-ensaios em batelada para investigar a fisiologia e cinética da desnitrificação autotrófica utilizando sulfeto de hidrogênio, enxofre elementar ou tiosulfato como doadores de elétrons. Na concentração estequiométrica de nitrato, a velocidade de desnitrificação com o uso de tiosulfato foi consideravelmente maior, em função de ser mais biodisponível, seguida de sulfeto e enxofre. O sulfeto também

apresenta grande biodisponibilidade, mas causa inibição da atividade microbiana a partir de certas concentrações. Quando as concentrações de nitrato foram iguais ou superiores em relação ao requerido estequiometricamente, observou-se a oxidação completa de sulfeto a sulfato; entretanto, quando as concentrações de nitrato foram limitantes, ocorreu somente oxidação parcial de sulfeto a enxofre elementar. Em concentrações de sulfeto superiores à estequiometria, foram observadas baixas velocidades de desnitrificação, em função da inibição do processo de conversão do nitrato a nitrito e geração de sulfato. Os autores concluíram que a velocidade de desnitrificação acoplada à sulfo-redução depende fortemente dos compostos inorgânicos de enxofre como doadores de elétrons.

Em pesquisa de Kleerebezem e Mendez (2002), foi investigada a remoção de sulfeto de hidrogênio presente no biogás juntamente com a desnitrificação autotrófica para eliminação de nitrato. A água residuária era proveniente de indústrias processadoras de peixe, a qual é rica em matéria orgânica biodegradável, amônia e sulfato. O afluente era tratado anaerobiamente e subsequentemente submetido à desnitrificação utilizando o biogás gerado no pré-tratamento anaeróbico como doador de elétrons. Os parâmetros cinéticos estimados para a desnitrificação autotrófica com o uso de sulfetos, em reatores de filme fixo, não apresentaram limitações à aplicação do processo. O balanço de massa demonstrou a ocorrência de acúmulo de enxofre elementar, quando o reator foi alimentado com elevadas cargas de sulfeto. Os autores ainda ressaltaram a importância de pesquisas mais detalhadas a respeito da cinética deste processo.

Mahmood *et al.* (2007b) investigaram o potencial da remoção simultânea de sulfeto e nitrito de águas residuárias sintéticas, avaliando o desempenho para diferentes cargas volumétricas, o efeito do tempo de detenção hidráulica (TDH) e da concentração do substrato. As máximas velocidades de remoção de sulfeto e nitrito alcançadas foram de $13,82 \text{ kg S m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ e $16,311 \text{ kg N m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, respectivamente, com TDH de 0,10 d. Quando o TDH foi reduzido

(de 1,50 a 0,08 d) houve influência considerável na porcentagem de remoção de nitrito, havendo pouco impacto na remoção de sulfeto. Houve acúmulo considerável de amônia no biorreator quando a concentração de nitrito no afluente era maior que 2000 mg N L⁻¹, com TDH de 2 d, fato que contribuiu para inibição do processo. Os resultados demonstram a viabilidade da remoção simultânea de sulfeto e nitrito de águas residuárias concentradas com baixos TDH.

No caso de efluentes de reatores anaeróbios, a desnitrificação utilizando sulfeto como doador de elétrons é bastante interessante, visto que tais efluentes contêm nitrogênio amoniacal, sulfetos e quantidade reduzida de matéria orgânica, além de biogás contendo sulfeto de hidrogênio, o qual também pode ser aplicado ao processo (FORESTI *et al.*, 2006). Visto que a utilização de tecnologias anaeróbias como principal unidade de tratamento de esgoto sanitário é crescente no Brasil, este processo se mostra conveniente como pós-tratamento para remoção de nitrogênio, a fim de atender aos padrões de lançamento impostos pela legislação vigente.

Com relação à remoção de nitrogênio de efluente de reator anaeróbio tratando esgoto sanitário, Garbossa (2006) utilizou reator misto radial de leito fixo (RMRLF) e reator aeróbio-anaeróbio horizontal de leito fixo (RAAHLF) para pós-tratamento de efluente de reator UASB. Os reatores também receberam o biogás proveniente do reator UASB e a desnitrificação com produção de sulfato foi observada. Desse modo, foi comprovada a viabilidade da desnitrificação autotrófica utilizando sulfeto solúvel presente no efluente e sulfeto de hidrogênio presente no biogás como doadores de elétrons.

Kalyuzhnyi *et al.* (2006) combinaram a desnitrificação autotrófica com uso de sulfeto como doador de elétrons ao processo ANAMMOX. Esta concepção de remoção de nitrogênio foi denominada DEAMOX (*Denitrifying Ammonium Oxidation*). Para a geração de nitrogênio amoniacal e sulfeto, utilizou-se um reator UASB na etapa de pré-tratamento. Parte do efluente

gerado era conduzida a um reator nitrificante, para geração de nitrato, e a parcela restante era encaminhada diretamente ao reator DEAMOX. Este reator também recebia o efluente do reator nitrificante. No interior do reator DEAMOX, ocorria a desnitrificação autotrófica parcial com uso de sulfeto como doador de elétrons, havendo a formação de nitrito, o qual era utilizado no processo ANAMMOX no mesmo reator. O fluxograma do processo está apresentado na Figura 4.4. O desempenho estável do reator DEAMOX, com eficiências próximas de 90%, só foi atingido após 410 dias. Os autores ainda ressaltaram alguns pré-requisitos para o estabelecimento deste processo referentes à composição do efluente a ser tratado: relações molares $N\text{-NO}_x/N\text{-NH}_4^+ > 1,2$ (estequiometria da reação ANAMMOX) e $S\text{-H}_2S / N\text{-NO}_3 > 0,57$ (estequiometria da desnitrificação autotrófica parcial).

Figura 4.4 – Fluxograma da concepção do processo DEAMOX (Fonte: KALYUZHNYI *et al.*, 2006).

4.2.2.5 Uso de biogás como doador de elétrons para a desnitrificação

A utilização de biogás proveniente de reatores anaeróbios, como doadores de elétrons para a desnitrificação, se mostra uma alternativa economicamente vantajosa, uma vez que o resíduo de um processo seria utilizado como substrato para outro. Porém, esta aplicação ainda vem sendo estudada, havendo poucas informações sobre sua viabilidade técnica. A grande maioria dos trabalhos reporta a utilização de apenas um dos compostos do biogás como doador de elétrons para a desnitrificação, notadamente metano e sulfeto de hidrogênio (THALASSO *et al.* 1997; SOARES, 2002; SANTOS *et al.*, 2004; ISLAS-LIMA *et al.* 2004;

CUBA, 2008; MODIN *et al.*, 2010). Poucas pesquisas investigaram o uso do biogás – contendo todos seus componentes – no processo desnitrificante (KLEEREBEZEM E MENDEZ, 2002; RODRÍGUEZ, 2006; GARBOSSA, 2006; SOUZA, 2011)

A composição do biogás, em porcentagem de volume, é normalmente de 65 – 70% de metano, 25 – 30% de gás carbônico e pequenas quantidades de nitrogênio, hidrogênio, sulfeto de hidrogênio, vapor de água e outros gases (METCALF E EDDY, 2003). Além dos potenciais doadores de elétrons para a desnitrificação, o gás carbônico presente no biogás poderia fornecer alcalinidade e carbono inorgânico aos microrganismos presentes em reatores desnitrificantes (SOUZA, 2011).

No trabalho de Garbossa (2006) apresentado na seção 4.2.2.4, a aplicação do biogás nos dois reatores incrementou a eficiência de remoção de nitrogênio, em 75% para o RMRLF, e em 87% para o RAAHLF. De acordo com o autor, sulfeto de hidrogênio foi o doador de elétrons preferencial para a desnitrificação. Por outro lado, VICTORIA (2006) constatou que o metano foi preferencialmente utilizado quando detectada a presença de oxigênio dissolvido no meio desnitrificante. Supôs-se que a baixa concentração de sulfeto de hidrogênio no biogás não permitiu sua utilização no processo, uma vez que o mesmo foi oxidado na presença de oxigênio. A configuração avaliada consistiu em um Filtro Biológico Aeróbio-Anaeróbio (FBAA), que se mostrou promissor para esta aplicação.

SOUZA (2011) propôs uma nova configuração de reator, em escala piloto, composto por três compartimentos: nitrificante, desnitrificante e de digestão anaeróbia. Neste sistema, a desnitrificação utilizaria diversas fontes endógenas de doadores de elétrons provenientes da digestão anaeróbia, incluindo o biogás. O sistema foi denominado Digestão Anaeróbia, Nitrificação e Desnitrificação Endógena (DANDE). O autor ressaltou o uso potencial de metano e sulfeto de hidrogênio na remoção de nitrogênio, mas não pôde avaliar a extensão de sua utilização em função da influência das condições operacionais.

4.3 REATORES OPERADOS EM BATELADAS SEQUENCIAIS

Os reatores operados em bateladas sequenciais (RBS) são normalmente utilizados para a remoção de nitrogênio em uma única etapa, na qual os processos de nitrificação e desnitrificação ocorrem concomitantemente em um mesmo reator (MACE E MATA-ALVAREZ, 2002). As vantagens deste processo, denominado nitrificação e desnitrificação simultâneas (NDS), sobre os sistemas convencionais, já são conhecidas. Entre elas, destacam-se os menores requerimentos para aeração, e a redução do tempo necessário para as reações completas de nitrificação e desnitrificação, quando NDS é aplicado com sucesso (ARORA *et al.* 1985; MÜNCH *et al.*, 1996). Consequentemente, os custos podem ser reduzidos (YOO *et al.*, 1999; CANTO *et al.*, 2008).

Basicamente, os RBS são operados em ciclos sequenciais compostos de quatro etapas: alimentação, reação, sedimentação e descarte de líquido (Figura 4.5). No entanto, algumas estratégias operacionais têm sido estudadas a fim de otimizar o desempenho desses reatores, tais como modificações no modo de alimentação, o uso de biomassa imobilizada e a aplicação de aeração intermitente (CHEN *et al.*, 2000; RATUSZNEI *et al.*, 2003; IAMAMOTO, 2006; CANTO *et al.*, 2008). O modo em batelada alimentada é uma alternativa que proporciona a manutenção da concentração do substrato em níveis baixos dentro do reator, de modo que a fase de alimentação tenha um período mais longo do que convencionalmente adotado. Esta estratégia pode melhorar a distribuição dos doadores de elétrons e, por causa da diluição, também pode evitar a inibição pelo substrato (TILCHE *et al.*, 1999; POO *et al.*, 2004). Por outro lado, a utilização da biomassa imobilizada em suporte inerte permite a eliminação da etapa de sedimentação e da redução do tempo de ciclo total. Além disso, as perdas de biomassa são normalmente muito baixas, resultando em elevados tempos de retenção celular.

De acordo com Pochana e Keller (1999), a atividade aumenta a NDS em reatores contendo grandes flocos de biomassa. Portanto, esta tecnologia parece ser especialmente vantajosa em sistemas contendo células imobilizadas. As limitações de difusão de oxigênio no biofilme proporcionam condições anóxicas em seu interior, favorecendo a desnitrificação nesta região, enquanto que a nitrificação ocorre na superfície dos flocos aerados.

Figura 4.5 – Seqüência de operação durante 1 ciclo em um RBS tradicional: (a) alimentação; (b) reação; (c) sedimentação e (d) descarte do líquido.

Considerando a ocorrência de desnitrificação no interior dos flocos, reatores RBS para remoção de nitrogênio podem ser operados em condições aeradas ou microaeradas durante todos os períodos (CHEN *et al.*, 2000). No entanto, a eficiência de remoção total de nitrogênio pode não ser aceitável (HASHIMOTO *et al.*, 1987). Desta forma, a aplicação de aeração intermitente pode melhorar a eficiência de remoção de nitrogênio, incorporando um período anóxico para a desnitrificação. O detalhamento deste modo de operação encontra-se na subseção 4.2.2.1.

Diversas pesquisas descreveram, com sucesso, a remoção de nitrogênio em RBS utilizando fontes orgânicas como doadores de elétrons para a desnitrificação (ABELING E SEYFRIED, 1992; BILANOVIC *et al.*, 1999; KATSOGIANNIS *et al.*, 2003; GEE E KIM, 2004; MORLING, 2009; LIM *et al.*, 2011). Entretanto, a aplicação da desnitrificação autotrófica com uso de compostos reduzidos de enxofre neste tipo de reator foi pouco investigada, sendo encontrada apenas uma pesquisa a respeito. Pérez *et al.* (2007) propuseram o processo de nitrificação/desnitrificação autotrófica via nitrito utilizando sulfetos como doadores de elétrons para o pós-tratamento de efluente de digestor de lodo de esgoto sanitário.

Foi utilizado um RBS em escala laboratorial, contendo biomassa suspensa. Sulfeto de sódio hidratado era injetado em concentrações equivalentes a 80-85% da estequiometria para evitar a oxidação do excesso de sulfeto a enxofre elementar nos períodos aerados. Entretanto, este fato ocasionou acúmulo de nitrito residual ($30 \text{ mg N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$), que poderia não representar problema se o efluente fosse recirculado à planta principal para melhor remoção. A eficiência de remoção de nitrogênio alcançada, considerando apenas o consumo de nitrogênio amoniacal e nitrato, foi maior que 95%, sendo obtida remoção total de $0,70 \text{ kg N m}^{-3} \text{ d}^{-1}$.

Essa concepção de tratamento parece ser adequada ao pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios, que contêm nitrogênio amoniacal e sulfeto. O nitrogênio amoniacal seria oxidado durante a nitrificação a nitrito e/ou nitrato, e estes utilizariam o sulfeto como doador de elétrons na desnitrificação. Desse modo, os substratos necessários para a nitrificação e desnitrificação em um único reator estariam no próprio efluente.

4.4 ANÁLISE DE REATORES CONTENDO BIOMASSA IMOBILIZADA

Grande parte dos reatores biológicos contendo biomassa imobilizada tem sido projetada com base em critérios empíricos. Isto se deve a complexidade e diversidade dos processos e reações que ocorrem nos reatores, fato que torna difícil o estudo de fenômenos fundamentais para a determinação de parâmetros racionais. Entretanto, a aplicação de critérios empíricos pode resultar em unidades sub-otimizadas ou até mesmo inadequadas. Desse modo, é de extrema importância a realização de estudos para obtenção de parâmetros com bases racionais para simulação, otimização e aumento de escala de biorreatores, além de ser fornecida melhor compreensão dos fenômenos envolvidos nos sistemas reacionais.

Em sistemas com células imobilizadas, as limitações à transferência de massa nas fases líquida e sólida podem reduzir a velocidade global da reação (BRINGI E DALE, 1990). O esquema geral que representa a transferência de massa em sistemas sólido-líquido e sua interação com o processo bioquímico pode ser visualizado na Figura 4.6, adaptada de Bailey e Ollis (1986). Neste esquema, é apresentada a seção transversal de uma lâmina da biopartícula em contato com a solução de substrato, que está fluindo sobre ambos os lados desta lâmina. Uma camada estagnada de líquido é formada nas proximidades da superfície da biopartícula. Para atingir à zona de reação da biopartícula, o substrato deve se difundir nessa camada, uma vez que não há transporte convectivo na mesma. A difusão molecular no meio líquido é lenta e dependente da concentração de substrato. Todo este processo ocorre como se o acesso da biopartícula ao substrato sofresse uma resistência externa à transferência de massa. Em sistemas com agitação ou com velocidades superficiais do líquido (v_s) suficientemente altas, esta resistência pode ser reduzida em função da diminuição da espessura da camada estagnada ao redor da biopartícula. Com a diminuição da resistência externa, o coeficiente de transferência de massa na fase líquida (k_s) aumenta, e consequentemente, a velocidade de transferência de massa na fase líquida também se eleva (equação 4.16). Este coeficiente é função das propriedades físicas e das condições hidrodinâmicas próximas à interface líquido-sólido. No interior da biopartícula, ocorre o consumo do substrato e geração de produtos, o que ocasiona a formação de gradientes de concentração entre o líquido e a parte interna do sólido. O transporte de massa no interior da biopartícula é caracterizado pela difusão intraparticular, que é influenciada pela resistência interna à transferência de massa. Matematicamente, tal resistência é inversamente proporcional ao tamanho da partícula, como pode ser observado pela equação (4.17), que representa a velocidade de transferência de massa intraparticular segundo a Lei de Fick. No entanto, as propriedades físicas do suporte de imobilização e a influência da concentração de biomassa na matriz muitas vezes não

permitem esta correlação direta. Tais considerações afetam a difusividade efetiva do substrato na biopartícula (D_e), fator que determina o transporte de massa intraparticular (BAILEY E OLLIS, 1986; BRINGI E DALE, 1990; WESTRIN E AXELSSON, 1991; CHRISTIANSEN *et al.* 1994).

Figura 4.6 – Esquema representativo das interações entre transporte de massa e reações bioquímicas em uma lâmina simétrica de uma biopartícula. Os fenômenos sumarizados na seção superior ocasionam os perfis de concentração dos substratos e produtos esboçados na seção intermediária, que podem ser descritos quantitativamente em termos dos parâmetros indicados na seção inferior (adaptado de BAILEY E OLLIS, 1986).

$$N_s = k_s a (C_{S0} - C_{Si}) \quad (4.16)$$

$$N_i = -D_e \frac{dC_s}{dx} \quad (4.17)$$

Em que:

N_s = velocidade de transferência de massa na fase líquida;

a = área interfacial para transferência de massa;

C_{S0} = concentração do substrato na fase líquida;

C_{Si} = concentração do substrato na interface líquido-sólido;

N_i = velocidade de transferência de massa intraparticular;

C_S = concentração do substrato na biopartícula em uma dada posição x .

Portanto, para que se realize a caracterização cinética completa de processos contendo biomassa imobilizada, os fenômenos físicos de transferência de massa devem ser correlacionados com as velocidades das transformações bioquímicas. A modelação destes fenômenos físicos é fundamental para a determinação de parâmetros cinéticos intrínsecos dos processos biológicos contendo células aderidas. Tais parâmetros fornecem um prognóstico das velocidades de consumo de substrato e crescimento celular sob condições estabelecidas, permitindo a modelação dos processos bioquímicos na ausência de limitação ao transporte de massa (ZAIAT *et al.*, 1996; BAILEY E OLLIS, 1986; LEVENSPIEL, 1999).

A resistência externa à transferência de massa pode ser avaliada pelo parâmetro adimensional denominado número de Biot (Bi). Este parâmetro relaciona a velocidade de transporte de massa na camada líquida estagnada ao redor da partícula com a velocidade de difusão intraparticular. Considerando uma partícula esférica, Bi é definido de acordo com a equação (4.18). Segundo Bailey e Ollis (1986), o efeito da resistência externa à transferência de massa não é significativo para $Bi \geq 100$.

$$Bi = \frac{k_s \cdot R_p}{D_e} \quad (4.18)$$

Em que:

k_s = coeficiente de transferência de massa líquido-sólido;

R_p = raio da biopartícula;

D_e = difusividade efetiva do substrato.

Com relação à avaliação da influência da resistência interna à transferência de massa sobre a velocidade bioquímica, pode-se utilizar outro parâmetro adimensional, denominado módulo de *Thiele* (ϕ_{obs}) e definido pela equação (4.19). Tal parâmetro permite avaliar a extensão do fenômeno difusivo em relação à velocidade reacional. De acordo com Bringi e Dale (1990), se $\phi_{obs} \geq 0,3$, a resistência interna à transferência de massa é significativa e a velocidade de difusão intramolecular é a limitante do processo.

$$\phi_{obs} = \frac{r_{obs} \cdot R_p^2}{9 \cdot D_e \cdot C'_S} \quad (4.19)$$

Em que:

C'_S = concentração específica de substrato no meio líquido;

r_{obs} = velocidade específica de utilização de substrato observadas.

Vale ressaltar que a determinação de parâmetros cinéticos intrínsecos depende diretamente das características do lodo, da composição do substrato e das condições ambientais. Consequentemente, a mesma deve ser estimada para determinada água residuária e cultura microbiana, sob condições ambientais e operacionais específicas.

Com relação à desnitrificação autotrófica utilizando sulfeto como doador de elétrons, não há relatos sobre a determinação de parâmetros cinéticos intrínsecos, visto que este processo é bastante recente e ainda pouco elucidado. Portanto, a realização de estudos fundamentais para melhor compreensão dos fenômenos e rotas metabólicas envolvidas em tais sistemas é de essencial importância.

4.4.1 Desnitrificação autotrófica com uso de sulfeto em reatores de leito fixo

Grande parte dos trabalhos relacionados à desnitrificação autotrófica utilizando sulfeto como doador de elétrons reporta o processo em sistemas contendo biomassa suspensa (KLEEREBEZEM E MENDEZ, 2002; REYES-ÁVILA *et al.*, 2004; PÉREZ *et al.*, 2007; CERVANTES *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2010). Existem lacunas na literatura com relação a este processo conduzido em reatores de leito fixo. No entanto, há pesquisas a respeito de reatores desnitrificantes contendo células aderidas em grânulos de enxofre elementar (FLERE E ZHANG, 1999; SIERRA-ALVAREZ *et al.*, 2007). Os estudos que avaliaram a cinética da desnitrificação autotrófica com o uso de enxofre elementar como doador de elétrons constataram a influência dos fenômenos de transferência de massa no sistema (KOENIG E LIU, 2001; ZHENG E ZHANG, 2005; MOON *et al.* 2006; WAN *et al.*, 2009), que são inerentes dos processos com imobilização da biomassa.

4.4.1.1 Fundamentação teórica do processo

Os fenômenos físicos e bioquímicos envolvidos em sistemas com células aderidas seguem o modelo conceitual do biofilme, que tem sido discutido há décadas (BATCHELOR E LAWRENCE, 1978; JANSEN E HARREMÕES, 1985; CHRISTIANSEN *et al.*, 1994; ZENG E ZHANG, 2005; MATHIOUDAKIS E AIVASIDIS, 2009). O modelo conceitual para desnitrificação autotrófica com uso de sulfeto como doador de elétrons em reatores de leito fixo pode ser descrito da seguinte forma: (1) sulfeto e nitrato/nitrito são transportados da superfície até a parte interna do biofilme por difusão; (2) a reação biológica de redução de

nitrito/nitrato acoplada à oxidação de sulfeto ocorre dentro do biofilme e (3) compostos oxidados de enxofre e compostos reduzidos de nitrogênio – os produtos da reação – são transportados para fora do biofilme por difusão.

Harremões (1976) inicialmente investigou o significado de difusão nos poros na desnitrificação em filtros biológicos e propôs que reações de ordem $\frac{1}{2}$ poderiam explicar este fenômeno. Considerou-se um poro cilíndrico ideal, de raio R e comprimento L , como mostrado na Figura 4.7. O balanço de massa para uma fatia deste poro cilíndrico resultou na equação 4.20, considerando reação com consumo de substrato. Com base neste balanço, o modelo de difusão foi contabilizado utilizando a difusão molecular representada pela Lei de Fick, que, para um poro cilíndrico, é descrita como na equação 4.21. Finalmente, a equação básica para a distribuição da concentração no poro foi obtida (equação 4.22).

Figura 4.7 – Balanço material para uma fatia elementar de um poro ideal, no qual o substrato se difunde e reage ao longo da parede porosa (adaptado de HARREMÕES, 1976, e LEVENSPIEL, 1999).

$$\frac{\partial N_i}{\partial x} = -2\pi R r_a \quad (4.20)$$

$$N_i = -\pi R^2 D \frac{\partial C_S}{\partial x} \quad (4.21)$$

$$\frac{\partial^2 C_S}{\partial x^2} = \frac{2}{RD} r_a \quad (4.22)$$

Em que:

r_a = velocidade de reação por unidade de área da parede do poro;

x = distância da entrada do poro;

D = coeficiente de difusão molecular.

Assumindo que o processo intrínseco da desnitrificação em filtros segue a cinética de Monod com baixos valores para as constantes de Monod, a reação intrínseca poderia seguir o modelo de ordem zero (JANSEN E HARREMÖES, 1985), como descrita na equação (4.23). Substituindo a velocidade de reação de ordem zero na equação (4.21), foi obtida a equação diferencial (4.24).

$$r_a = k_{0a} \quad (4.23)$$

$$\frac{\partial^2 C_S}{\partial x^2} = \frac{2k_{0a}}{RD} \quad (4.24)$$

Em que:

k_{0a} = constante de reação de ordem zero por unidade de área do biofilme.

Para resolução da equação (4.24), foi conveniente tornar os parâmetros C_S e x adimensionais, conforme as equações (4.24a) e (4.24b). Em seguida, as condições de contorno na entrada (equação 4.24c) e na saída (equação 4.24d) do poro foram consideradas. Finalmente, a solução da equação resultou na equação (4.25).

$$c = \frac{C_S}{C_{Si}} \quad (4.24a)$$

$$\varepsilon = \frac{x}{L} \quad (4.24b)$$

$$\varepsilon = 0; c = 1 \quad (4.24c)$$

$$\varepsilon = 1; \frac{\partial c}{\partial \varepsilon} = 0 \quad (4.24d)$$

$$c = \frac{\varepsilon^2}{\beta^2} - 2 \frac{\varepsilon}{\beta^2} + 1 \quad (4.25)$$

Em que:

$$\beta = \text{taxa de penetração} = \sqrt{\frac{RDC_{Si}}{L^2 k_{0a}}}$$

No entanto, esta condição apenas é válida nos casos em que o substrato penetra totalmente o poro, de modo que a reação de ordem zero no interior do poro é transformada em uma reação de ordem zero na superfície exposta do biofilme. Neste caso, o transporte total no poro é dado pela equação (4.26). Quando o substrato se esgota antes de chegar ao final do poro, que implica nas condições em que $c = 0$ e $\varepsilon = 1$, a equação (4.24) revela que $\beta = 1$. Se o valor de β for menor que a unidade, apenas parte do poro será ativo, de $\varepsilon = 0$ até um determinado ε' , definido pela fração do poro que é efetivo. Nestas condições, a equação (4.27) se aplica, resultando na equação (4.28).

$$N_S = 2\pi RLk_{0a} \quad (4.26)$$

$$\varepsilon = \varepsilon' \left[\begin{matrix} c = 0 \\ \frac{\partial c}{\partial \varepsilon} = 0 \end{matrix} \right] \rightarrow \varepsilon' = \beta \quad (4.27)$$

$$c = \frac{\varepsilon^2}{\beta^2} - 2\frac{\varepsilon}{\beta} + 1 \quad (4.28)$$

Finalmente, o transporte total resulta na equação (4.29). Portanto, a reação de ordem zero no interior do poro é transformada em uma reação de ordem $1/2$ na superfície exposta do biofilme se apenas parte do poro for ativo, ou seja, se o poro for parcialmente penetrado.

$$N_S = 2\pi RL\varepsilon' k_{0a} = 2\pi R\sqrt{k_{0a}RD} C_S^{(1/2)} \quad (4.29)$$

Em que:

$$2\pi R\sqrt{k_{0a}RD} = k_{(1/2)a}$$

O modelo de difusão no poro que foi detalhado está sintetizado nas equações (4.30) e (4.31), juntamente com a identificação dos parâmetros e suas respectivas unidades (adaptado de HARREMÖES, 1976; JANSEN e HARREMÖES, 1985).

Reação de ordem zero na superfície exposta da biomassa:

$$r_a = k_{0a} \quad \text{válido para } \beta = \sqrt{\frac{RDC_{Si}}{L^2 k_{0a}}} \geq 1 \quad (4.30)$$

Reação de ordem 1/2 na superfície exposta da biomassa:

$$r_a = k_{(1/2)a} C_{Si}^{(1/2)} \quad \text{válido para } \beta \leq 1 \quad (4.31)$$

Em que:

r_a = velocidade de remoção por unidade de área da superfície do biofilme ($\text{g m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

k_{0a} = constante de reação de ordem zero por unidade de área do biofilme ($\text{g m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

$k_{(1/2)a}$ = constante de reação de ordem 1/2 por unidade de área do biofilme ($\text{g m}^{-1/2} \text{s}^{-1/2}$)

L = espessura do biofilme (m)

D = coeficiente de difusão molecular na biomassa ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$)

C_{Si} = concentração do substrato na superfície do biofilme (g m^{-3})

β = constante adimensional denominada taxa de penetração

Segundo Harremoes (1976), em sistemas contendo biomassa imobilizada, os substratos comumente não alcançam o interior do biofilme poroso e, portanto, os poros se tornam parcialmente efetivos. Sendo assim, a eficiência de penetração do substrato no poro é inferior a 100% e a velocidade de reação se torna dependente da concentração do substrato elevada a 1/2 potência (equação 4.31). Este modelo tem sido aplicado com êxito em pesquisas relacionadas à desnitrificação autotrófica com biomassa imobilizada em grânulos de enxofre

(WANG 1998; KOENIG e LIU, 2001; MOON *et al.*, 2004; ZENG e ZHANG, 2005; WAN *et al.*, 2009).

Considerando o modelo cinético de ordem $\frac{1}{2}$, a velocidade de reação para a desnitrificação em sistemas com biomassa imobilizada pode ser descrita de acordo com a equação (4.32).

$$(r_N) = -\frac{dC_N}{dt} = k_{(1/2)} \cdot C_N^{1/2} \quad (4.32)$$

Em que:

r_N = velocidade de utilização de nitrogênio ($\text{mg N L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)

$k_{(1/2)}$ = constante cinética de ordem $\frac{1}{2}$ ($\text{mg N}^{1/2} \text{ L}^{-1/2} \text{ h}^{-1}$)

C_N = concentração de nitrogênio (mg N L^{-1})

Considerando a concentração inicial de nitrogênio (C_{N0}) no tempo t correspondente a t_0 , a equação (4.32) pode ser integrada entre esses limites, conforme demonstrado na equação (4.33).

$$-\int_{C_{N0}}^{C_N} \frac{dC_N}{C_N^{1/2}} = k_{(1/2)} \int_{t_0}^t dt \quad (4.33)$$

A equação integrada, expressa em termos de concentração de nitrogênio, pode ser escrita como apresentado na equação (4.34).

$$C_N^{1/2} = C_{N0}^{1/2} - \frac{1}{2} k_{(1/2)} \cdot (t - t_0) \quad (4.34)$$

4.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir da revisão da literatura buscou-se explicitar as bases conceituais e as concepções tecnológicas já pesquisadas que sustentam a hipótese desta pesquisa. Em primeiro lugar, a necessidade de atender aos requisitos da legislação, evitando prejuízos ao meio ambiente e à saúde humana, alavanca a busca por tecnologias de pós-tratamento aplicadas a esgoto sanitário. No Brasil, esta busca se torna essencial tendo em vista que grande parte dos sistemas de tratamento de esgoto utiliza um reator anaeróbio como primeira unidade de tratamento. Portanto, pesquisas a respeito da remoção de nitrogênio de efluentes sanitários, pré-tratados anaerobiamente, têm fundamental importância.

Com essa finalidade, os reatores operados em bateladas sequenciais (RBS) se mostram como uma alternativa viável e otimizada, apresentando vantagens econômicas e operacionais. Diversas pesquisas demonstraram com sucesso a aplicação destes reatores para a remoção de nitrogênio. No entanto, a grande maioria utilizou a desnitrificação heterotrófica no processo de remoção, sendo necessária, muitas vezes, a adição de doadores de elétrons orgânicos exógenos. Como alternativa, a aplicação de um recente processo biológico poderia reduzir ou até eliminar o uso de doador exógeno: a desnitrificação autotrófica com uso de sulfeto presente no próprio efluente como doador de elétrons. O pouco conhecimento que se tem sobre a aplicação deste bioprocessos para remoção de nitrogênio em RBS torna mais relevante a pesquisa nesta área.

Adicionalmente, algumas pesquisas revelaram a potencialidade do uso do biogás para a desnitrificação, uma alternativa vantajosa já que o resíduo de um processo seria utilizado como substrato para outro, otimizando o sistema de tratamento. Entretanto, as pesquisas sobre

este tema também são escassas, havendo mais trabalhos avaliando o uso de metano ou sulfeto de hidrogênio separadamente.

Outro ponto a ser considerado é o uso de biomassa imobilizada em RBS, que traz vantagens operacionais e pode até melhorar as eficiências de remoção, de acordo com alguns trabalhos. Considerando a utilização de células aderidas no processo de desnitrificação autotrófica com emprego de sulfeto como doador de elétrons, surge a necessidade de estudos fundamentais que caracterizem a cinética intrínseca deste processo, já que existem lacunas na literatura a respeito. Muitas pesquisas investigaram a cinética da desnitrificação autotrófica em sistemas com células aderidas em grânulos de enxofre, utilizado tanto como suporte para o crescimento bacteriano aderido quanto como doador de elétrons para a desnitrificação. Foi utilizado o modelo conceitual do biofilme, o qual resultou em modelo de ordem $\frac{1}{2}$ para a caracterização da cinética intrínseca da desnitrificação autotrófica com células aderidas. Portanto, a desnitrificação utilizando sulfeto em sistemas com biomassa imobilizada pode, hipoteticamente, ser caracterizada por modelo cinético de ordem $\frac{1}{2}$.

É importante destacar que, em processos biológicos, a diversidade de rotas metabólicas permite que diferentes reações bioquímicas ocorram em um mesmo reator. No caso do ciclo do nitrogênio integrado ao ciclo do enxofre, novos bioprocessos foram sugeridos, além da nitrificação e desnitrificação convencionais. A oxidação anaeróbia de nitrogênio amoniacal com uso de nitrato, nitrito ou sulfato é um deles, juntamente com a desnitrificação autotrófica utilizando compostos reduzidos de enxofre. A possibilidade da ocorrência destes processos em um RBS existe, uma vez que poderiam ser favorecidos pela condições operacionais deste sistema.

Diante do exposto, torna-se clara a vantagem do uso de um único reator para a remoção de nitrogênio de efluentes sanitários provenientes de reatores anaeróbios, aplicando a desnitrificação autotrófica com uso de sulfeto como doador de elétrons. No entanto, a falta de

informações sobre a viabilidade destas opções biotecnológicas recentes resulta na necessidade de maiores estudos sobre a desnitrificação autotrófica utilizando sulfeto e a possibilidade de sua integração ao processo nitrificante. Poucas informações sobre o uso potencial de biogás para a desnitrificação também exigem maiores pesquisas nesta área.

“É preciso sentir a necessidade da experiência, da observação, ou seja, a necessidade de sair de nós próprios para acender à escola das coisas, se a queremos conhecer e compreender.
Émile Durkheim (1858-1917)

5. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos desta pesquisa foram executados nas dependências do Laboratório de Processos Biológicos (LPB) do Departamento de Hidráulica e Saneamento (SHS) da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC), Universidade de São Paulo (USP).

5.1 DESENHO EXPERIMENTAL

O foco do projeto consistiu no estudo da desnitrificação autotrófica via nitrato e via nitrito, com emprego de sulfeto como doador de elétrons, em sistemas com biomassa imobilizada aplicados ao pós-tratamento de efluentes provenientes de reatores anaeróbios tratando esgoto sanitário. Este estudo abrangeu a investigação exploratória, a caracterização cinética e a viabilidade deste processo integrado à nitrificação em um mesmo reator. Para

isso, a pesquisa foi dividida em três etapas, conforme esquema da Figura 5.1 e resumidamente descritas a seguir.

ETAPA 1 – O efeito da concentração de sulfeto sobre a desnitrificação autotrófica foi avaliada em reatores verticais de leito fixo, na presença de nitrato e nitrito como receptores de elétrons. A biomassa utilizada foi imobilizada em matrizes cúbicas de espumas de poliuretano. Foram utilizados dois reatores verticais: um para os ensaios com nitrato e outro para os ensaios com nitrito. Para cada receptor, foram avaliadas três condições experimentais relativas à concentração do doador de elétrons: ausência de sulfeto; sulfeto em concentração estequiométrica relativa a nitrito ou nitrato; sulfeto em excesso relativamente aos receptores de elétrons. Desse modo, foram estudadas seis condições experimentais, as quais tiveram duração de 30 a 35 dias cada uma. Ao término de cada condição experimental foram realizados exames microscópicos para identificação morfológica de microrganismos presentes nos reatores. Para os ensaios em que houve a adição de sulfeto, o material suporte contendo a biomassa já adaptada ao bioprocessos foi utilizado para os ensaios cinéticos, conduzidos na 2ª etapa do projeto.

ETAPA 2 – Foram determinados os parâmetros cinéticos intrínsecos da desnitrificação autotrófica via nitrato e via nitrito utilizando sulfeto como doador de elétrons, em reatores diferenciais de leito fixo. Para isso, foi utilizado o modelo conceitual de biofilme. As condições analisadas nestes ensaios corresponderam às mesmas condições experimentais da 1ª etapa, nas quais houve adição de sulfeto: concentração de sulfeto em excesso e na proporção estequiométrica dos receptores de elétrons (nitrato e nitrito) com base nas reações químicas correspondentes. A biomassa empregada foi retirada dos reatores verticais de leito fixo ao final de cada condição experimental em que houve adição de sulfeto. A caracterização cinética envolveu a execução de perfis temporais de concentração de nitrogênio nas formas de nitrato e nitrito para ajuste de modelos e obtenção de parâmetros cinéticos relativos ao

consumo das formas oxidadas de nitrogênio. Os parâmetros cinéticos intrínsecos obtidos foram utilizados na 3ª etapa da pesquisa.

ETAPA 3 – Avaliou-se a viabilidade da desnitrificação autotrófica com o uso de sulfeto em um único reator nitrificante/desnitrificante, operado em regime de batelada alimentada e sujeito à aeração intermitente (RLFBAS). Os tempos de ciclo e de duração das fases aeradas e não aeradas inicialmente empregados foram baseados nos parâmetros cinéticos intrínsecos da desnitrificação autotrófica integrada à oxidação de sulfeto obtidos na 2ª etapa. Foram avaliadas as estratégias de partida e de alimentação do reator favoráveis ao estabelecimento da nitrificação e da desnitrificação acoplada à oxidação do sulfeto. Também foram verificados os efeitos da concentração de sulfeto e de OD nos processos de nitrificação e desnitrificação autotrófica, assim como as condições favoráveis ao acúmulo de nitrito. A influência do pH no processo em questão foi verificada. Ajustes nos tempos das fases aeradas e não aeradas também foram realizados, visando à otimização do desempenho da remoção de nitrogênio.

Figura 5.1 – Fluxograma das etapas experimentais e experimentos realizados.

5.2 EXPERIMENTOS DA 1ª ETAPA

5.2.1 Reatores verticais de leito fixo

Os reatores verticais de leito fixo, com volume total de 528 mL, eram constituídos de três partes moduladas: câmara de alimentação (inferior), leito para colocação de matrizes de espuma de poliuretano, e câmara de saída (superior). Todas as partes dos reatores foram confeccionadas com tubos de acrílico de 50 mm de diâmetro externo e 45 mm de diâmetro interno, unidos por meio de flanges com anéis de borracha (*orings*) para vedação. Os flanges superiores e inferiores dos módulos foram constituídos de placas de acrílico de 10 mm de espessura, presos com parafusos, porcas borboletas e arruelas de latão. Tais flanges suportavam telas de aço inox, de 50 mm de diâmetro, para contenção do suporte e escoamento de fluido. As câmaras de alimentação e de saída mediam 56 mm de altura e os orifícios de entrada e saída de fluido estavam localizados nas paredes dos módulos. O leito para colocação do suporte media 22 cm de altura. Foram utilizados suportes de aço inox para apoio dos reatores. Todas as mangueiras utilizadas em conexões e para conduzir o substrato até os reatores eram flexíveis e compostas de material inerte e impermeável a gases, de material Tygon®.

O leito dos reatores foi completamente preenchido por cubos de espuma de poliuretano de 0,5 cm de aresta, nos quais a biomassa foi imobilizada. O volume útil reacional foi de 375 mL, considerando a porosidade do leito de 40 %. O TDH aplicado era de 9 h, sendo utilizada vazão de aproximadamente 42 mL h⁻¹. Depois de inoculados, os reatores

foram mantidos em câmara climatizada com temperatura controlada de $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, operando de forma contínua, com fluxo ascendente e em condições anóxicas (Figura 5.2).

Figura 5.2 – Reatores verticais de leito fixo em funcionamento.

A alimentação era realizada através do bombeamento contínuo da água residuária, a qual era mantida em frascos Duran de 2 L sob refrigeração a 4°C para minimizar as reações químicas fora dos reatores. A atmosfera livre de oxigênio foi obtida por meio do fluxionamento no *headspace* com gás N_2 por 10 minutos, e usou-se bexiga com N_2 (100%) acoplada ao septo emborrachado no topo dos frascos para garantir a atmosfera com nitrogênio (Figura 5.3).

Figura 5.3 – Frascos de alimentação com bexigas acopladas aos septos emborrachados, preenchidas com gás N₂.

5.2.2 Água residuária sintética

A água residuária utilizada na alimentação simulava efluente nitrificado típica de tratamento de águas residuárias municipais, similar ao apresentado por Callado e Foresti (2000), sendo inseridas as modificações propostas por Moraes (2009). A solução de micronutrientes utilizada foi a proposta por Beristain-Cardoso *et al.*, (2006), com concentração de 2 mL L⁻¹. A composição da água residuária está apresentada na Tabela 5.1 e a composição da solução de sais minerais pode ser visualizada na Tabela 5.2. Na Tabela 5.3, pode ser observada a caracterização da água residuária utilizada.

A concentração de nitrogênio utilizada foi a mesma, tanto para nitrato quanto para nitrito como receptores de elétrons, sendo mantida em torno de 20 mg N L⁻¹.

O sulfeto foi fornecido na forma de solução de sulfeto de sódio hidratado ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$), injetada através do septo emborrachado localizado na tampa dos frascos. As concentrações de sulfeto injetadas corresponderam aos valores estequiométricos em relação aos receptores de elétrons (nitrito e nitrato) com base nas respectivas reações químicas, descritas nas equações (4.10) e (4.14) da subseção (4.2.2.4). Tais reações consideram a oxidação completa de sulfeto a sulfato concomitantemente à redução de nitrato/nitrito a nitrogênio molecular. Aplicou-se também sulfeto em excesso, com relação a ambos os receptores. Na Tabela 5.4, estão apresentadas as concentrações de sulfeto aplicadas, com as respectivas relações N/S resultantes e concentrações dos receptores de elétrons correspondentes.

Tabela 5.1 – Composição da água residuária sintética nitrificada.

Constituinte	Concentração
Nitrato de potássio (KNO_3) / nitrito de sódio (NaNO_2)	144 / 99 mg L^{-1}
Fosfato de potássio (KH_2PO_4)	36 mg L^{-1}
Cloreto de amônio (NH_4Cl)	16 mg L^{-1}
Bicarbonato de sódio (NaHCO_3)	2000 mg L^{-1}
Cloreto de magnésio hidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	28 mg L^{-1}
Cloreto de cálcio hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	18 mg L^{-1}
Solução de micronutrientes	2 mL L^{-1}

*Uso de nitrato ou nitrito de acordo com a via de desnitrificação estudada.

Fonte: CALLADO e FORESTI, (2000); MORAES, (2009).

Tabela 5.2 – Composição da solução de micronutrientes.

Constituinte	Concentração (g L^{-1})
EDTA	0,50
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,04
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,07
MnCl_2	0,03
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,01
$\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,02
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,02

Fonte: BERISTAIN-CARDOSO *et al.*, (2006)

Tabela 5.3 – Caracterização da água residuária simulando esgoto sanitário nitrificado.

Parâmetro	Unidade	Nº de amostras
*DQO _{filtrada} (mg O ₂ L ⁻¹)	78	-
Alcalinidade a bicarbonato (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	514,9 ± 19,5	4
pH	8,7 ± 0,1	4
POR (mV)	-295,4 ± 15,5	4
N-NH ₄ ⁺ (mg N L ⁻¹)	4,7 ± 0,9	4
N-NO ₃ ⁻ ou N-NO ₂ ⁻ (mg N L ⁻¹)	20,0 ± 0,7	4

*Valor baseado em Callado e Foresti (2000).

Tabela 5.4 – Concentrações do doador e dos receptores de elétrons correspondentes às relações N/S aplicadas.

Receptor de elétrons	Condição N/S	S-SDT ^a (mg S L ⁻¹)	N-NO _x ⁻ (mg L ⁻¹)
N-NO ₃ ⁻	0,9	50	20
N-NO ₃ ⁻	1,6 ^b	30	20
N-NO ₂ ⁻	2,7 ^b	17	20
N-NO ₂ ⁻	1,5	30	20

^a Sulfeto Dissolvido Total

^b Correspondem às relações molares N/S estequiométricas.

5.2.3 Inóculo

O inóculo utilizado nesta 1ª etapa consistiu em lodo proveniente de reator UASB da Estação de Tratamento de Águas Residuárias de Abatedouro de Aves, da Avícola Dacar S.A., localizada em Tietê - SP. Este lodo de inóculo foi escolhido por apresentar grande diversidade microbiana, conforme avaliada e caracterizada por Hirasawa (2008). Visto que o lodo era oriundo de reator anaeróbio, os microrganismos existentes eram provenientes de ambiente contendo sulfeto e, portanto, estariam adaptados à presença deste composto tóxico.

O lodo granular foi previamente desintegrado em liquidificador de forma a se obter uma mistura homogênea e pastosa. Em seguida, o lodo homogêneo foi imobilizado em matrizes cúbicas de espuma de poliuretano, de 0,5 cm de aresta. Para isso, as espumas foram

misturadas e comprimidas com uma grande quantidade do lodo, tendo permanecido em contato por pelo menos 2 horas em refrigerador, em recipiente coberto com filme plástico, como recomendado por Zaiat *et al.* (1994). Após esse período, as espumas foram transferidas para uma peneira, na qual o excesso de lodo foi retirado por meio da fricção das espumas contra a mesma. Finalmente, os cubos de espumas foram colocados no interior dos reatores com o uso de pinça, até o completo preenchimento. As etapas deste procedimento de imobilização da biomassa podem ser visualizadas na Figura 5.4.

Figura 5.4 – Etapas da imobilização da biomassa: (a) espumas em contato com o lodo macerado; (b) espumas totalmente encobertas pelo lodo; (c) retirada do excesso de lodo com uso de peneira; (d) inoculação dos cubos de espuma no interior do reator.

5.2.4 Procedimento Experimental

Os reatores verticais de leito fixo, de fluxo ascendente, foram operados de forma contínua por meio do bombeamento da água residuária sintética, conforme descrito na subseção 5.2.1. Para armazenamento do afluente, foram utilizados frascos Duran de 2 L contendo 1,5 L de efluente sanitário sintético nitrificado, os quais eram trocados diariamente. O fluxionamento, seguido do preenchimento da bexiga com gás N₂, também era realizado diariamente, sempre que a alimentação era renovada.

Quando havia a necessidade de se armazenar maiores volumes de afluente, eram utilizados galões de plástico com capacidade para 10 L. Entretanto, evitava-se o uso destes galões sempre que possível, visto que os mesmos não possuíam sistema de vedação e possibilitavam a entrada e saída de gases, não permitindo o estabelecimento de atmosfera livre de oxigênio.

A adição da solução de sulfeto concentrada era realizada por meio de seringa, após o procedimento de fluxionamento e fechamento dos frascos. Foram aplicadas concentrações de sulfeto em excesso e correspondentes à relação estequiométrica relativa aos receptores de elétrons empregados (nitrato e nitrito). O comportamento dos reatores na ausência do doador de elétrons também foi avaliado. Cada condição monitorada nestes reatores teve duração de 30 a 35 dias, período no qual foi observada a redução dos receptores de elétrons concomitantemente à oxidação do doador de elétrons de forma estável.

5.2.5 Ensaios complementares – testes abióticos

Os ensaios abióticos foram realizados para a constatação de que as alterações dos compostos de interesse, no interior dos reatores, ocorreram, principalmente, devido à ação dos microrganismos presentes no lodo inoculado. Os testes foram conduzidos nos reatores verticais de leito fixo. As condições utilizadas para tais testes foram semelhantes aos ensaios biológicos; entretanto, nenhum lodo de inóculo foi adicionado. Os frascos de alimentação contendo os meios líquidos e as espumas cúbicas de poliuretano utilizadas foram previamente autoclavados por 40 minutos a 121°C e 1 atm para inativar qualquer microrganismo presente. Ensaios abióticos sem adição de cubos de espuma de poliuretano também foram realizados com a finalidade de avaliar a influência desta sobre o processo. Todas as condições a que foram submetidos os testes, relativas às concentrações médias de sulfeto dissolvido total, nitrato e nitrito, e adição de espumas, podem ser visualizadas na Tabela 5.5.

Tabela 5.5 – Concentrações aproximadas de sulfeto dissolvido total, de nitrato e de nitrito aplicadas aos ensaios abióticos, com as respectivas relações N/S.

Receptor de elétrons	Adição de espumas	Relação N/S	mg N-NO _x ⁻ L ⁻¹	mg S-SDT L ⁻¹
Nitrato	Sim	-	20	-
	Sim	2,0	20	25
	Não	-	20	-
	Não	2,0	20	25
Nitrito	Sim	-	17	-
	Sim	2,5	17	15
	Não	-	17	-
	Não	2,5	17	15

5.3 EXPERIMENTOS DA 2ª ETAPA

5.3.1 Reatores diferenciais de leito fixo

Os reatores diferenciais utilizados possuíam volume de 15 mL, 2,4 cm de comprimento e 2,9 cm diâmetro interno. Foram confeccionados em vidro borossilicato, providos de tampa de teflon e vedados com anéis de borracha tipo *oring*. Neste sistema, a biomassa foi imobilizada em matrizes cúbicas de espuma de poliuretano de 0,5 cm de aresta, e o substrato foi recirculado e mantido em um circuito fechado. Na Figura 5.5 está apresentado o esquema do conjunto experimental.

A alimentação era realizada por meio do bombeamento contínuo da água residuária, mantida em frascos Duran de 1L, os quais continham 500 mL de meio líquido. Os frascos de alimentação foram acondicionados em banho termostatizado sob temperatura de 5°C para minimizar a ocorrência de reações bioquímicas fora dos reatores. A atmosfera livre de oxigênio no interior dos frascos foi garantida por meio do fluxionamento com gás N₂ no *headspace*, por pelo menos 10 minutos. Os reatores diferenciais foram mantidos em câmara climatizada, sob temperatura controlada de 30°C $\pm$ 1°C. O conjunto experimental dos ensaios cinéticos pode ser visualizado na Figura 5.6. Todas as mangueiras utilizadas eram de material Tygon®.

Figura 5.5 – Esquema do conjunto experimental utilizado para os ensaios cinéticos: (1) reator diferencial; (2) câmara climatizada a $30 \pm 1^\circ\text{C}$; (3) frasco de alimentação; (4) banho termostaticado; (5) ponto de coleta de amostras; (6) bomba peristáltica.

Figura 5.6 – Reatores diferenciais em funcionamento: (a) conjunto experimental; (b) detalhe dos reatores.

5.3.2 Água residuária e inóculo

A água residuária utilizada foi similar àquela apresentada na seção 5.2.2., referente aos reatores verticais de leito fixo, simulando efluente sanitário nitrificado. Este continha nitrato ou nitrito como receptores de elétrons, sendo que as mesmas concentrações de sulfeto avaliadas na 1ª etapa foram aplicadas neste ensaio.

O inóculo utilizado também foi o mesmo da 1ª etapa (subseção 5.2.3.), assim como as matrizes cúbicas de espuma de poliuretano de 0,5 cm de aresta (Figura 5.7) contendo a biomassa imobilizada. As mesmas foram retiradas dos reatores verticais de leito fixo ao final

de sua operação, sendo parte delas transferidas para os reatores diferenciais com o auxílio de pinça.

Figura 5.7 – Detalhe das matrizes cúbicas de espuma de poliuretano utilizadas nos experimentos das 1ª e 2ª etapas.

5.3.3 Modelagem cinética

A modelagem cinética foi baseada na remoção de nitrogênio nas formas de nitrato e nitrito, a partir dos perfis temporais de concentração do substrato no meio líquido, de acordo com as metodologias propostas por Zaiat *et al.* (1996) e Vieira (1996).

Para a determinação dos parâmetros cinéticos intrínsecos da desnitrificação autotrófica com uso de sulfeto como doador de elétrons, foram empregadas diferentes velocidades superficiais do líquido (v_s), por meio de ajustes na vazão de alimentação dos reatores, determinadas segundo a equação (5.1).

$$v_s = \frac{Q}{\varepsilon \cdot A} \quad (5.1)$$

Em que:

Q = vazão do líquido ($L h^{-1}$)

A = área da seção transversal do reator (cm^2)

ε = porosidade do leito

Para cada valor de v_s foi ajustada uma equação polinomial de segundo grau aplicada aos dados experimentais obtidos nos perfis de concentração de nitrogênio no meio líquido (C_N) ao longo do tempo (t), conforme descrito na equação (5.2).

$$C_N = at^2 + bt + c \quad (5.2)$$

Visto que, neste sistema experimental, o substrato foi recirculado em circuito fechado, os reatores diferenciais foram considerados como reatores em batelada de volume constante, com circulação externa da fase líquida. Sendo assim, as velocidades específicas de utilização de substrato observadas (r_{obs}), ao longo do tempo (t_i), foram calculadas em função de C_N para cada v_s aplicado, como descrito na expressão (5.3)

$$r_{obs} \Big|_{t=t_i} = \frac{dC_N}{dt} \Big|_{t=t_i} = -2at_i - b \quad (5.3)$$

A condição de resistência externa à transferência de massa desprezível foi verificada por meio da obtenção da velocidade específica inicial observada de utilização do substrato ($r_{obs} \Big|_{t=0}$) para cada v_s . O perfil de $r_{obs} \Big|_{t=0}$ versus v_s permite observar a partir de qual valor de v_s a resistência externa à transferência de massa poderia ser negligenciada. Nesta condição, a

camada de líquido estagnado ao redor das biopartículas não afeta a transferência de massa, condição em que r_{obs} deve assumir valor constante (VIEIRA, 1996).

O parâmetro adimensional Bi foi calculado para confirmar a condição anterior. Tal parâmetro foi definido conforme a equação (4.18), apresentada na seção 4.4, para partícula esférica.

Para os sistemas que operaram na ausência de limitação externa à difusão, foi avaliada a magnitude dos efeitos da resistência à transferência de massa intraparticular em relação às velocidades de reações bioquímicas, por meio do cálculo de ϕ_{obs} , definido segundo a equação (4.19) da seção 4.4. Foram utilizados valores de r_{obs} determinados para t igual a zero, e tiveram a unidade de tempo em horas convertida para segundos.

A difusividade efetiva do substrato na biopartícula foi considerada como sendo a difusividade do nitrogênio em solução aquosa, a temperatura ambiente, correspondendo a $1,99 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (PERRY E CHILTON, 1985).

Os modelos cinéticos e os respectivos parâmetros cinéticos intrínsecos foram estimados para os ensaios nos quais foram encontradas resistências externa e interna à transferência de massa desprezíveis. Os modelos avaliados consistiram em reações de ordem $\frac{1}{2}$, de acordo com o modelo de difusão no poro proposto por Harremoes (1976) (seção 4.4.1.1), sendo ajustados aos pontos obtidos experimentalmente por meio do método numérico de Levenberg-Marquardt (software Origin 6.0).

5.3.4 Procedimento experimental

Foram utilizados 5 reatores diferenciais, cada um submetido a uma vazão diferente, conforme detalhado anteriormente na subseção 5.3.3. O fornecimento da água residuária era feito de acordo com o descrito na subseção 5.3.1.

Do mesmo modo que nos reatores verticais de leito fixo, os frascos de alimentação possuíam uma bexiga acoplada ao septo emborrachado para assegurar a atmosfera livre de oxigênio em seu interior, sendo realizado o mesmo procedimento de fluxionamento e preenchimento da bexiga com gás N₂. A solução concentrada de sulfeto também era injetada após o fechamento dos frascos. Cada condição analisada nestes ensaios correspondeu à mesma condição monitorada previamente nos reatores verticais de leito fixo: concentrações de sulfeto em excesso e equivalente a relação estequiométrica baseada nas reações químicas correspondentes, relativas a nitrato e a nitrito como receptores de elétrons.

Os ensaios cinéticos conduzidos nos reatores diferenciais envolveram a realização de perfis temporais de concentração com duração de 10 h, para cada uma das 5 velocidades superficiais do líquido estudadas, sendo coletadas amostras a cada 2 h. A partir dos dados de concentração obtidos, foram determinados os modelos e parâmetros cinéticos intrínsecos da desnitrificação autotrófica, para diferentes concentrações de sulfeto aplicadas.

Anteriormente à realização dos perfis temporais, a biomassa imobilizada nas espumas permaneceu por cerca de 18 h sob adaptação nos reatores diferenciais. Para esta adaptação, os reatores foram operados continuamente em um sistema aberto.

5.4 EXPERIMENTOS DA 3ª ETAPA

5.4.1 Reator de leito fixo operado em batelada alimentada sequencial (RLFBAS)

O reator nitrificante/desnitrificante, operado em regime de batelada alimentada sequencial, foi confeccionado em vidro borossilicato, constituído por dois tubos cilíndricos concêntricos, com volume total de 7,5 L. O reator era provido de agitador mecânico da marca Marconi (modelo MA-259), composto por dois impelidores de fluxo radial tipo turbina de 3,0 cm de diâmetro. O reator continha um cesto de aço inox perfurado, com capacidade de 4,5 L, o qual continha a biomassa imobilizada em matrizes cúbicas de espumas de poliuretano. O cesto tinha a forma de cilindro oco, cuja região central acomodava o eixo do agitador. Na parte inferior do reator, foram colocadas três pedras porosas para a dispersão do ar fornecido por um aerador de aquário. Duas bombas foram utilizadas para o enchimento e descarga do reator: uma bomba peristáltica da marca Gilson e uma bomba diafragma da marca Prominent, respectivamente. Na Figura 5.8, tem-se a representação esquemática do conjunto experimental deste reator e, na Figura 5.9, é apresentada uma foto desse sistema em funcionamento.

Na parte superior do reator, dois tubos perfurados de 1,0 cm de diâmetro interno foram alocados para colocação de micro-sensores de oxigênio dissolvido (OD) e de potencial redox (POR). Os micro-sensores eram conectados a um bloco de aquisição de dados, interligado a um computador, equipado com um software para o processamento das informações e fornecimento dos dados de interesse. O software foi desenvolvido pela empresa T&S Equipamentos Eletrônicos, de São Carlos/SP. Os micro-sensores foram desenvolvidos pelo

técnico Antônio Wagner Lamon, no Laboratório de Tratamento Avançado e Reuso (LATAR), do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC). A Figura 5.10 mostra a foto do sistema computadorizado para a medição dos parâmetros supracitados.

Figura 5.8 – Representação esquemática do aparato experimental do reator nitrificante/desnitrificante: (1) reator nitrificante/desnitrificante operado em batelada alimentada; (2) agitador mecânico; (3) impelidor tipo turbina; (4) cesto de aço inox; (5) bomba peristáltica – alimentação; (6) bomba diafragma – descarte; (7) pedra porosa; (8) aerador de aquário; (9) entrada para micro-sensores.

Figura 5.9 – Sistema experimental do reator nitrificante/desnitrificante em funcionamento.

Figura 5.10 – Conjunto experimental para a medição de OD e POR: sistema computadorizado de aquisição de dados.

A alimentação do reator nitrificante/desnitrificante era proveniente de reator UASB tratando esgoto sanitário sintético. O efluente do reator UASB era coletado em um recipiente de 21 L, armazenado em geladeira a 4°C, que funcionava como um tanque pulmão (Figura 5.11). Deste recipiente, o efluente era bombeado ao reator nitrificante/desnitrificante a uma vazão constante. Vale ressaltar que este efluente era isento de sulfeto, que era adicionado separadamente na forma de solução de sulfeto de sódio para permitir um controle mais preciso da concentração de sulfeto adicionado ao reator. A solução de sulfeto era bombeada continuamente ao reator nitrificante/desnitrificante, sendo armazenada em frasco de Duran de

1 L, mantido sob refrigeração a 4°C (Figura 5.12). A solução de sulfeto era trocada diariamente, exceto nos finais de semana, nos quais se utilizava frasco Duran de 5 L, para garantir a alimentação continua de sulfeto durante este período. Adicionava-se alcalinidade (como bicarbonato de sódio) também separadamente, para atender à demanda da nitrificação. Assim como a solução de sulfeto, a solução de bicarbonato de sódio também foi armazenada a 4°C em frascos Duran de 5 L, sendo bombeada continuamente para o reator (Figura 5.12). Esta solução era reposta apenas quando do esvaziamento do frasco.

Figura 5.11 – Recipiente para armazenamento do efluente do reator UASB.

Figura 5.12 – Frascos de alimentação do reator nitrificante/desnitrificante, contendo solução de sulfeto (direita) e solução de bicarbonato de sódio (esquerda).

O tempo total de ciclo durante toda a operação do reator foi de 8 h, sendo que o tempo de alimentação, o volume total de líquido tratado por ciclo e o volume alimentado variaram de

acordo com as condições experimentais avaliadas no reator, as quais serão detalhadas posteriormente na subseção 5.4.5.

5.4.2 Reator anaeróbio de manta de lodo (UASB)

O reator anaeróbio de manta de lodo era constituído de duas chapas de acrílico opostas (frontal e dorsal) de seção retangular de 78 cm e 30 cm de altura e largura, respectivamente. As faces laterais do reator eram compostas por aço inox, e fixavam as chapas acrílicas paralelamente. O corpo principal do reator, destinado ao desenvolvimento da manta de lodo, tinha o formato de prisma retangular com 45 cm de altura e 12 cm de seção quadrada de lado. A zona de entrada tinha o formato de tronco de pirâmide invertido com 5 cm de altura, provido de uma placa de aço inox perfurada para distribuição uniforme do afluente. A parte superior do reator, logo acima do corpo principal, comportava o separador trifásico, com o formato de pirâmide invertida associado ao prisma retangular. Este sistema de separação conduzia os efluentes líquidos e gasosos para seus respectivos compartimentos, e permitia a sedimentação dos sólidos biológicos. Na Figura 5.13, está apresentada a foto do reator em funcionamento.

Figura 5.13 – Reator UASB em funcionamento.

O reator, com volume útil de 10 L, foi alimentado em fluxo ascendente por meio de bomba dosadora automática, da marca Provitec (modelo PEB-A). A vazão aproximada era de $1,1 \text{ L h}^{-1}$, correspondendo a TDH em torno de 9 h. A operação deste reator ocorreu paralelamente à operação do RLFBAS, sendo conduzida exclusivamente para a geração de efluente a ser tratado pelo RLBAS.

5.4.3 Água residuária e inóculo

O reator UASB foi inoculado com lodo granular, proveniente de reator UASB da Estação de Tratamento de Águas Residuárias de Abatedouro de Aves, da Avícola Dacar S.A., localizada em Tietê - SP. Este lodo também foi utilizado, inicialmente, para inocular o reator nitrificante/desnitrificante operado em regime de batelada alimentada, sendo imobilizado em matrizes cúbicas de espuma de poliuretano, de 1,0 cm de aresta (Figura 5.14). Vale ressaltar que este tipo de lodo contém biomassa que apresenta características heterotróficas e

desnitrificantes. O estabelecimento da nitrificação e desnitrificação autotrófica acoplada à oxidação de sulfeto também foi avaliado a partir de lodo proveniente de sistemas de lodos ativados (Volkswagen São Carlos – SP), o qual apresenta população heterogênea de microrganismos aeróbios, e dentre eles, bactérias nitrificantes. Ambos os lodos de inóculo avaliados foram imobilizados de acordo com procedimento proposto por Zaiat *et al.* (1994), sendo que o lodo granular utilizado inicialmente foi previamente macerado e homogeneizado, como detalhado na subseção 4.2.3. As matrizes cúbicas de espuma de poliuretano imobilizadas estão apresentadas na Figura 5.15, para os dois tipos de inóculo avaliados.

Figura 5.14 – Detalhe das matrizes cúbicas de poliuretano, com 1,0 cm de aresta, utilizadas na 3ª etapa.

(a)

(b)

Figura 5.15 – Matrizes cúbicas de poliuretano contendo biomassa imobilizada com lodo de inóculo proveniente de: (a) reator UASB e (b) sistema de lodos ativados.

Para cada reator foi utilizada água residuária específica, conforme diferenciado e detalhado nos subitens a seguir.

Reator nitrificante/desnitrificante operado em batelada alimentada sequencial

A água residuária utilizada na alimentação do reator nitrificante/desnitrificante – RLFBAS – consistiu em efluente de reator UASB tratando esgoto sanitário sintético. Este tipo de efluente apresenta concentrações consideráveis de nitrogênio amoniacal e sulfetos (ionizado e não ionizado), além de matéria orgânica remanescente, de difícil degradação. Vale ressaltar que o sulfeto foi adicionado ao reator nitrificante/desnitrificante separadamente, estando ausente do efluente gerado pelo reator UASB, ou seja, não foi adicionado sulfato à alimentação do reator UASB. Optou-se por este modo de alimentação para se obter um controle mais preciso da concentração de sulfeto no interior do RLFBAS, uma vez que, no reator UASB, poderia haver perdas de sulfeto dissolvido no efluente para o biogás, em função da alta volatilidade daquele composto. A caracterização do efluente gerado no reator UASB, sem a produção de sulfeto, está apresentada na Tabela 5.6. Visto que a alcalinidade a bicarbonato disponível no efluente do UASB era insuficiente para a nitrificação, foram adicionados em média $500 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$, na forma de solução de bicarbonato de sódio, separadamente

Visando avaliar a influência do doador de elétrons no processo, a concentração de sulfeto adicionada ao reator variou de 0 a $55 \text{ mg S-SDT L}^{-1}$, havendo um choque pontual de $100 \text{ mg S-SDT L}^{-1}$ durante a operação do reator. Vale ressaltar que a concentração de sulfeto em efluentes de reatores UASB tratando esgoto sanitário é bastante variável, uma vez que é dependente da concentração de sulfato presente no esgoto sanitário a ser tratado. Esta, por sua vez, é influenciada por fatores como as características da água de abastecimento do município

e os hábitos sócio-econômicos da população contribuinte. Sendo assim, as concentrações de sulfeto avaliadas também visaram cobrir os possíveis teores de sulfeto presente neste tipo de efluentes.

Tabela 5.6 – Caracterização do efluente de reator UASB utilizado na alimentação do reator nitrificante/desnitrificante.

Parâmetro	Concentração média
DQObruta ($\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$)	$193,3 \pm 8,8$
DQOfiltrada ($\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$)	$174,1 \pm 63,9$
Alcalinidade total ($\text{mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$)	$131,3 \pm 36,5$
N-amoniacal (mg N L^{-1})	$40,6 \pm 6,7$

Reator UASB

A alimentação do reator UASB consistiu em esgoto sanitário sintético, com composição semelhante ao proposto por Torres (1992). Este tipo de composição apresenta substâncias que simulam as frações orgânicas do esgoto sanitário (proteínas, carboidratos e lipídeos), de difícil e fácil degradação, além de detergente como agente tensoativo, sais minerais e micronutrientes. A DQO média deste tipo de água residuária é de $500 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$. A composição do esgoto sanitário sintético pode ser visualizada na Tabela 5.7.

Tabela 5.7 – Composição do esgoto sanitário sintético utilizado na alimentação do reator UASB.

Componente	Quantidade
<i>Componentes principais</i>	
Extrato de carne (mg L ⁻¹)	425
Sacarose (mg L ⁻¹)	36
Amido (mg L ⁻¹)	111
Celulose (mg L ⁻¹)	41
Óleo de soja comercial (mL L ⁻¹)	0,55
Detergente comercial (mL L ⁻¹)	0,10
<i>Sais</i>	
NaCl (mg L ⁻¹)	250
MgCl ₂ .6H ₂ O (mg L ⁻¹)	7
CaCl ₂ .2H ₂ O (mg L ⁻¹)	5
KH ₂ PO ₄ (mg L ⁻¹)	23
K ₂ HPO ₄ (mg L ⁻¹)	6
NaHCO ₃ (mg L ⁻¹)	200
<i>Micronutrientes</i>	
Ácido nitrilotriacético (NTA) (mg L ⁻¹)	12,800
FeCl ₃ .6H ₂ O (mg L ⁻¹)	1,350
MnCl ₂ .4H ₂ O (mg L ⁻¹)	0,100
CoCl ₂ .6H ₂ O (mg L ⁻¹)	0,024
CaCl ₂ .2H ₂ O (mg L ⁻¹)	0,100
ZnCl ₂ (mg L ⁻¹)	0,100
CuCl ₂ .2H ₂ O (mg L ⁻¹)	0,025
H ₃ BO ₃ (mg L ⁻¹)	0,010
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O (mg L ⁻¹)	0,024
NaCl (mg L ⁻¹)	1,000
Na ₂ SeO ₃ .H ₂ O (mg L ⁻¹)	0,026
NiCl ₂ .6H ₂ O (mg L ⁻¹)	0,120

5.4.4 Ensaios complementares

Paralelamente à operação do reator nitrificante/desnitrificante, ensaios complementares em frascos Duran de 250 mL (Figura 5.16) foram realizados para avaliação

de possíveis rotas metabólicas que ocorriam complementarmente à nitrificação e desnitrificação. No total, foram realizados 4 ensaios complementares. Os processos avaliados consistiram na redução dissimilativa de nitrato a amônia (RDNA), oxidação anaeróbia de amônia (ANAMMOX), redução de sulfato e oxidação de amônia simultâneas (SURAMOX), além do uso do biogás pelas bactérias desnitrificantes. A biomassa utilizada foi proveniente do reator nitrificante/desnitrificante. A água residuária utilizada variou para cada ensaio, como apresentado na Tabela 5.8. Para os ensaios 1 e 2, foram adicionadas concentrações de sulfeto variando entre 0 e 19 mg S-SDT L⁻¹ e entre 0 e 80 mg S-SDT L⁻¹, respectivamente. Para o ensaio 3, sulfato foi adicionado em concentração estequiométrica relativa ao nitrogênio amoniacal. No ensaio 4, apenas o biogás gerado no reator UASB foi adicionado aos frascos.

Figura 5.16 – Frascos Duran de 250 mL utilizados nos ensaios complementares da 3ª etapa.

Tabela 5.8 – Ensaios complementares realizados e as respectivas águas residuárias utilizadas.

Ensaio	Objetivo	Água residuária
1	ANAMMOX/RDNA	Efluente proveniente do reator UASB, parcialmente nitrificado, contendo NH_4^+ , NO_3^- e NO_2^-
2	RDNA	Efluente proveniente do reator UASB, parcialmente nitrificado, contendo NH_4^+ e NO_3^-
3	SURAMOX	Efluente proveniente do reator UASB, contendo apenas NH_4^+
4	Uso de biogás	Efluente sanitário nitrificado, contendo apenas NO_3^-

5.4.5 Procedimento experimental

Operação do reator nitrificante/desnitrificante em batelada alimentada sequencial

O RLFBAS foi operado em regime de batelada alimentada sequencial com tempo total de ciclo de 8 horas (3 ciclos por dia). Cada ciclo foi composto por duas fases anóxicas intercaladas com duas fases aeradas. Os ciclos sempre se iniciavam com uma fase anóxica e terminavam com uma fase aerada. Desse modo, considerando que o descarte do efluente do reator não era total, ao final de cada ciclo permaneceria uma parcela de efluente nitrificado no interior do reator, contendo as formas oxidadas de nitrogênio. No ciclo posterior sequencial, haveria a entrada controlada do afluente, que consistia no efluente do UASB, contendo nitrogênio amoniacal e sulfeto, sendo, este último composto, utilizado como doador de elétrons para a desnitrificação durante a primeira fase não aerada do ciclo. Após a primeira fase não aerada, o nitrogênio amoniacal permaneceria no interior do reator, para ser nitrificado durante a primeira fase aerada do ciclo. Sequencialmente, na segunda fase não aerada do ciclo, os compostos oxidados de nitrogênio, resultantes da nitrificação anterior, seriam desnitrificados com o uso de sulfeto presente na alimentação do reator (efluente do UASB). E por fim, na segunda fase aeróbia, o nitrogênio amoniacal, que permaneceu no líquido após a desnitrificação da fase anterior, seria nitrificado. Após este período, ocorria o descarte do efluente e um novo ciclo se iniciava. Esta sequência de processos ocorria de forma cíclica, se repetindo em ciclos de 8 horas.

Inicialmente, cada fase (aerada e não aerada) tinha a duração de 116 minutos, e o descarte do efluente era feito durante os 16 minutos finais de cada ciclo. A determinação destas condições operacionais iniciais (tempo de ciclo total e período das fases aeradas e não

aeradas) foi realizada com base nos parâmetros cinéticos intrínsecos determinados na 2ª etapa do projeto. O equacionamento utilizado para esta determinação foi extraído de Metcalf e Eddy, (2003), a partir do tempo de duração da fase não aerada ($t_{anóxico}$), calculado por meio da equação 5.4. Esta equação relaciona a remoção necessária (ou desejada) de nitrato, em termos de mg N h^{-1} , descrita no numerador da equação, com a remoção de nitrato baseada na velocidade de remoção biológica observada, também em termos de mg N h^{-1} (denominador da equação 5.4). Vale ressaltar que, o período de tempo da fase não aerada é determinado para um período total de 24 horas, ou seja, o resultado obtido representa as horas necessárias para a desnitrificação dentro de um período de 24 horas.

$$t_{anóxico} = \frac{\left[(N - NO_3^-)_{inicial} - (N - NO_3^-)_{final} \right] \cdot Q}{r'_N \cdot X \cdot V_{reator}} \cdot 24 \quad (5.4)$$

Em que:

$N - NO_3^-$ = concentração de nitrogênio na forma de nitrato (mg N L^{-1})

r'_N = velocidade específica de remoção de nitrogênio ($\text{mg N g SSV}^{-1} \text{ h}^{-1}$)

X = concentração de biomassa (g SSV L^{-1})

V_{reator} = volume útil do reator (L)

O reator foi mantido em câmara climatizada, com temperatura controlada de $30 \pm 1^\circ\text{C}$. A agitação contínua foi mantida em 150 rpm durante todo o período de operação. A vazão de ar fornecida pelo aerador foi determinada com base na equação (5.5), apresentada por Metcalf e Eddy (2003).

$$Q_{ar} = \frac{R_0}{E \cdot C_{O_2}} \quad (5.5)$$

Em que:

Q_{ar} = vazão de ar necessária para a nitrificação ($L\ h^{-1}$)

R_0 = demanda de oxigênio para a nitrificação ($kg\ h^{-1}$)

E = eficiência de transferência de O_2 do aerador

C_{O_2} = concentração de O_2 presente no nas condições experimentais ($kg\ O_2\ m^{-3}$)

A demanda de oxigênio para a nitrificação (R_0) foi determinada conforme a equação (5.6), também descrita por Metcalf e Eddy (2003). Esta equação considera o requerimento de oxigênio para a oxidação de nitrogênio amoniacal e nitrito a nitrato, sendo que $3,22\ g\ O_2\ g\ N^{-1}$ são requeridos para a oxidação até nitrito, e $1,11\ g\ O_2\ g\ N^{-1}$ para a oxidação até nitrato. Portanto, o requerimento total de oxigênio para a oxidação completa de nitrogênio amoniacal a nitrato (nitrificação completa) corresponde a $4,33\ g\ O_2\ g\ N^{-1}$ (WERZERNAK E GANNON, 1967 *apud* METCALF E EDDY, 2003).

$$R_0 = 4,33 \cdot Q \cdot \Delta N \quad (5.6)$$

Em que:

Q = vazão de alimentação ($m^3\ h^{-1}$)

ΔN = concentração de nitrogênio nitrificado ($kg\ N\ m^{-3}$)

A concentração de O_2 no ar foi determinada para as condições experimentais ($30^\circ C$ e pressão atmosférica), a partir da densidade do ar ($\rho_{ar, 30^\circ C, Patm}$) obtida por meio da equação (5.7).

$$\rho_{ar, 30^\circ C, Patm} = \frac{P \cdot M}{R \cdot T} \quad (5.7)$$

Em que:

P = pressão atmosférica (N m^{-2})

M = mol de ar (kg kg-mol^{-1})

R = constante universal dos gases ($\text{N m kg-mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)

T = temperatura (K)

O valor resultante de $\rho_{ar, 30^\circ C, P_{atm}}$ foi multiplicado pela fração de O_2 no ar, sendo obtido o valor de C_{O_2} . Substituindo os valores obtidos de C_{O_2} e R_0 na equação (5.5), e considerando a eficiência do aerador (E) com base nas informações do fabricante, finalmente, a vazão de ar foi determinada.

O tempo de alimentação, o volume de líquido alimentado e o volume total tratado por ciclo variaram de acordo com as condições experimentais avaliadas no reator. Tais condições, a que foi submetido o reator, foram divididas de acordo com o objetivo a ser atingido, como apresentado na Tabela 5.9. Estes objetivos consistiram na avaliação das estratégias de partida do reator, do modo de alimentação e das condições para o acúmulo de nitrito e desnitrificação via nitrito.

Inicialmente, duas estratégias de partida do reator foram avaliadas: aeração intermitente (2 fases não aeradas de 116 min intercaladas com 2 fases aeradas de 116 min) com 50 mg S-SDT L^{-1} como doador de elétrons para a desnitrificação autotrófica (estratégia I); e o fornecimento de aeração durante todo o ciclo sem adição de sulfeto para o prévio estabelecimento da nitrificação, seguido pela intercalação de períodos anóxicos/aerados (116 min/116 min) com baixa concentração de sulfeto (15 mg S-SDT L^{-1}) na alimentação (estratégia II). Na estratégia I, o inóculo utilizado era proveniente de reator UASB. Para a estratégia II, foi utilizado lodo proveniente de sistema de lodos ativados. Durante o período de partida do reator, a alimentação foi feita em regime de batelada alimentada durante as

primeiras 7 horas de cada ciclo, para ambas as estratégias. Na última hora de cada ciclo, a alimentação cessava, continuando a aeração e agitação. As estratégias de alimentação foram avaliadas sequencialmente, sendo que após a operação do reator na estratégia I, o mesmo foi desmontado e um novo experimento foi iniciado na estratégia II.

Após definida a estratégia de partida do reator, foi avaliada, sequencialmente, as estratégias de alimentação. O regime de batelada alimentada durante as primeiras 7 horas dos ciclos (condição 1, A e B) foi comparado ao regime de batelada alimentada apenas nas fases anóxicas (batelada alimentada intermitente: condição 2, A e B). Na primeira estratégia de alimentação, o reator foi quase que completamente esvaziado durante o período de descarte, restando apenas 1/7 do volume do reator. Na segunda, 1/3 do volume do reator foi mantido para a batelada seguinte. Para ambas as estratégias, as concentrações de sulfeto foram variadas, conforme descrito na Tabela 5.9: 1A (20 a 25 mg S-SDT L⁻¹); 1A (20 a 25 mg S-SDT L⁻¹); 1B (5 a 10 mg S-SDT L⁻¹); 2A (20 a 25 mg S-SDT L⁻¹); 1A (45 a 50 mg S-SDT L⁻¹); 2B (5 a 10 mg S-SDT L⁻¹);

As condições favoráveis tanto para o acúmulo de nitrito, quanto para a desnitrificação autotrófica via nitrito, foram avaliadas após a definição da estratégia de alimentação. Tais condições envolveram a sobrecarga de sulfeto, ajustes nos tempos das fases aeradas e não aeradas, variação da concentração de OD e do pH, conforme detalhado na Tabela 5.9.

Tabela 5.9 – Descrição das condições nas quais o RLFBAS foi submetido durante todo o período de operação.

Objetivo	Condição	Descrição principal	OD (mg L ⁻¹)	mg S-SDT L ⁻¹	Tempo das fases (anóxicas/ aeradas)	Modo de alimentação	Tempo de alimentação /Tempo total de ciclo	Volume alimentado /Volume total tratado por ciclo	^D Comportamento esperado
Partida do reator	I	Alta concentração de sulfeto	n.a.	45 a 50	1h 56'/1h 56'	Batelada alimentada durante as primeiras 7 h	7 h/8 h	6,5 L/5,6 L	Nitrificação e desnitrificação completas
	II	Prévio estabelecimento da nitrificação seguido de adição de baixa concentração de sulfeto	2,0 a 3,0	0 a 15	1h 56'/1h 56'	Batelada alimentada durante as primeiras 7 h	7 h/8 h	6,5 L/5,6 L	Nitrificação completa e desnitrificação incipiente (insuficiência de sulfeto)
Modo de alimentação	1A	Aumento da concentração de sulfeto	1,3 a 2,5	20 a 25	1h 56'/1h 56'	Batelada alimentada durante as primeiras 7 h	7 h/8 h	6,5 L/5,6 L	Inibição da nitrificação e melhora na eficiência da desnitrificação
	1B	Diminuição da concentração de sulfeto	2,0 a 3,0	5 a 10	1h 56'/1h 56'	Batelada alimentada durante as primeiras 7 h	7 h/8 h	6,5 L/5,6 L	Recuperação da nitrificação e desnitrificação incipiente
	2A	Alteração do modo de alimentação	1,3 a 3,0	20 a 25	1h 56'/1h 56'	^B Batelada alimentada intermitente	^C 3h 52'/8 h	6,5 L/4,3 L	Nitrificação completa e baixa eficiência de desnitrificação
	2B	Aumento da concentração de sulfeto	0,5 a 2,5	45 a 50	1h 56'/1h 56'	^B Batelada alimentada intermitente	^C 3h 52'/8 h	6,5 L/4,3 L	Nitrificação e desnitrificação completas
Acúmulo de nitrito/ desnitrificação via nitrito	^A 3	Sobrecarga de sulfeto pontual (100 mg S-SDT L ⁻¹)	0,5 a 2,5	45 a 55	1h 56'/1h 56'	^B Batelada alimentada intermitente	^C 3h 52'/8 h	6,5 L/4,3 L	Nitrificação parcial a nitrito
	4	Redução da concentração de OD e do tempo das fases aeradas	0,0 a 1,3	45 a 55	2h 06'/1h 46'	^B Batelada alimentada intermitente	^C 4h 12'/8 h	6,5 L/4,3 L	Nitrificação parcial e estabelecimento da desnitrificação via nitrito
	5	Aumento da concentração de OD e redução do tempo das fases aeradas	0,0 a 2,0	45 a 55	2h 22'/1h 30'	^B Batelada alimentada intermitente	^C 4h 44'/8 h	6,5 L/4,3 L	Recuperação da nitrificação parcial e aumento da eficiência da desnitrificação via nitrito
	6	Redução do pH (7,5) e da concentração de sulfeto	0,0 a 2,0	30 a 40	2h 22'/1h 30'	^B Batelada alimentada intermitente	^C 4h 44'/8 h	6,5 L/4,3 L	Redução da precipitação de metais pelo sulfeto

^A A carga de choque teve a duração 1 dia (3 ciclos de 8 horas), sendo mantida a concentração de 45 a 55 mg S-SDT L⁻¹ nos ciclos posteriores desta condição.

^B Alimentação realizada apenas nos períodos não aerados, em regime de batelada alimentada.

^C Correspondente ao tempo de duas fases anóxicas, visto que a alimentação era intermitente (apenas durante as fases não aeradas).

^D O comportamento esperado pode não ter correspondido ao resultado obtido.

n.a = Valor não aferido.

Ensaaios complementares

Os ensaios complementares foram realizados em estágios diferentes, de acordo com as respostas obtidas nas mudanças de condição do reator nitrificante/desnitrificante. A avaliação dos processos sugeridos para cada ensaio foi realizada por meio da execução de perfis temporais de concentração dos compostos de interesse. Para todos os ensaios, a água residuária era derivada do efluente do reator UASB, podendo ser nitrificada, parcialmente nitrificada ou se constituir no próprio efluente do reator UASB. Por meio desse procedimento, garantia-se que todos os componentes presentes naquele efluente estivessem, também, nos ensaios complementares, como é o caso da matéria orgânica de difícil degradação.

Para os experimentos do ensaio 1, visando a verificação da ocorrência dos processos ANAMMOX e RDNA, foram adicionadas 10 espumas contendo biomassa em cada frasco, provenientes do reator nitrificante/desnitrificante durante a condição operacional 1B. A cada frasco, foram adicionados 200 mL de água residuária parcialmente nitrificada, contendo nitrogênio amoniacal, nitrato e nitrito. A água residuária foi obtida a partir do efluente do reator UASB, sendo que uma parcela foi previamente nitrificada durante 4 dias em frasco Duran de 2 L continuamente aerado, contendo 10% de lodo suspenso oriundo de sistema de lodos ativados (Volkswagen). Para a obtenção dessa parcela nitrificada, também foi necessária adição suplementar de alcalinidade na forma de bicarbonato de sódio (500 mg $\text{NaHCO}_3 \text{ L}^{-1}$). Para tornar a água residuária parcialmente nitrificada isenta de oxigênio dissolvido, era feito o fluxo contínuo de gás N_2 no meio líquido por 10 minutos. Após este procedimento, os reatores eram fechados e acondicionados em estufa climatizada controlada a 30°C, sob agitação de 90 rpm.

Foram avaliadas 3 condições, conduzidas nos frascos em duplicatas, sendo alterada apenas a concentração de sulfeto (mg S-SDT L^{-1}): 0, 9 e 19. No entanto, as concentrações de

sulfeto estavam abaixo das concentrações requeridas com base na estequiometria, tanto para nitrato quanto para nitrito como receptores de elétrons.

Para o ensaio 2, o efluente parcialmente nitrificado continha apenas nitrogênio amoniacal e nitrato. O preparo dos frascos contendo a biomassa imobilizada e da água residuária isenta de oxigênio dissolvido foi semelhante ao procedimento detalhado no ensaio 1, assim como as condições de acondicionamento dos frascos. As únicas modificações consistiram no período de tempo para a obtenção do efluente nitrificado (7 dias) e nas concentrações de sulfeto avaliadas. Foram avaliadas 4 condições diferentes, conduzidas nos frascos em duplicatas: 0, 30, 50 e 80 mg S-SDT L⁻¹. Além de verificar a ocorrência do processo RDNA, estes ensaios também visaram avaliar o efeito da concentração de sulfeto na biomassa nitrificante/desnitrificante, sendo utilizadas concentrações do doador de elétrons abaixo, acima e correspondente à estequiometria. Estes ensaios foram realizados durante a condição 2B.

A verificação do processo SURAMOX (ensaio 3) foi conduzida em frascos em triplicata, também contendo 10 espumas com biomassa imobilizada, provenientes do reator nitrificante/desnitrificante na condição 5. A água residuária proveniente do reator UASB foi acrescida de sulfato em concentração estequiométrica relativamente ao nitrogênio amoniacal, segundo a reação proposta por Fdz-Polanco *et al.* (2001), descrita na subseção 4.2.2.3 (equação 4.6). O volume do meio líquido em cada frasco era de 200 mL.

A obtenção de atmosfera livre de oxigênio foi obtida por meio do fluxionamento com gás N₂ no meio líquido e no *headspace*. Após este procedimento, os frascos eram fechados e acondicionados em estufa climatizada a 30°C, sem agitação.

Os experimentos para verificação do uso do biogás pelos organismos desnitrificantes (ensaio 4), presentes no reator nitrificante/desnitrificante, foram realizados com efluente nitrificado contendo apenas nitrato. O efluente foi previamente submetido ao fluxo de gás N₂

para retirada de oxigênio dissolvido. Foram utilizados 3 frascos, cada um contendo 10 espumas com biomassa imobilizada e 200 mL de efluente. Após o fluxionamento de gás N_2 no *headspace*, os frascos eram fechados, e em 2 deles, foram adicionados 40 mL de biogás proveniente do reator UASB, com o uso de uma seringa. O terceiro frasco foi acoplado ao reator UASB, na mangueira de saída do biogás, funcionando como selo hídrico (Figura 5.17). Desse modo, o fluxo de biogás no frasco era constante, ao contrário dos outros 2 frascos. Todos os frascos foram mantidos em estufa climatizada, a 30°C, sem agitação.

O ensaio com uso de biogás foi realizado ao final da operação do reator nitrificante/desnitrificante. Uma semana antes deste ensaio, foi adicionado sulfato à alimentação do reator UASB, na concentração aproximada de 100 mg $SO_4^{2-} L^{-1}$, para que houvesse a produção de sulfeto de hidrogênio (H_2S) no biogás.

Figura 5.17 – Aparato experimental utilizado para R1 com a finalidade de ser avaliado o uso do biogás pelos organismos desnitrificantes.

A partir dos perfis temporais de concentração de nitrato, foram obtidos parâmetros cinéticos aparentes de remoção de nitrogênio com uso de biogás produzido por reator UASB em operação. O modelo cinético de ordem zero foi considerado, sendo ajustado aos dados

experimentais. Considerando este modelo, em que a velocidade de reação não é afetada pela concentração dos substratos, tem-se a igualdade expressa na equação (5.8):

$$(r_N) = -\frac{dC_N}{dt} = k_0 \quad (5.8)$$

Em que:

$$k_0 = k_0' X$$

k_0 = constante cinética de ordem zero (mg N L⁻¹ h⁻¹);

k_0' = constante cinética específica de ordem zero (mg N g SSV⁻¹ h⁻¹);

X = concentração de biomassa no interior do reator (g SSV L⁻¹).

Considerando a concentração inicial de nitrogênio (C_{N0}) em um tempo t correspondente a t_0 , a equação (5.8) pode ser integrada entre esses limites, conforme demonstrado na equação (5.9).

$$-\int_{C_{N0}}^{C_N} dC_N = k_0 \int_{t_0}^t dt \quad (5.9)$$

A equação integrada, expressa em termos de concentração de nitrogênio, pode ser escrita como apresentado na equação (5.10), a qual indica que a concentração do substrato varia linearmente com o tempo.

$$C_N = C_{N0} - k_0 \cdot (t - t_0) \quad (5.10)$$

5.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Os parâmetros analisados durante cada etapa experimental, assim como as metodologias, encontram-se apresentados na Tabela 5.10. Todas as análises apresentadas foram realizadas de acordo com técnicas descritas no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (2005).

Tabela 5.10 – Parâmetros e metodologia de análise discriminados para cada etapa experimental.

Parâmetro/Unidade	Etapas			Metodologia
	1	2	3	
pH	X		X	Potenciométrico
Potencial redox (mV)	X		X	Potenciométrico
Oxigênio Dissolvido (mg OD L ⁻¹)			X	Potenciométrico
Alcalinidade (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	X		X	Titulométrico
DQO _{filtrada} (mg O ₂ L ⁻¹)			X	Colorimétrico
N-NH ₄ ⁺ (mg N L ⁻¹)	X	X	X	Colorimétrico (FIA)
N-NO ₂ ⁻ (mg N L ⁻¹)	X	X	X	Colorimétrico (FIA)/Cromatografia iônica
N-NO ₃ ⁻ (mg N L ⁻¹)	X	X	X	Redução por cádmio (kit Nitraver® 5 Nitrate Reagent – HACH)/Colorimétrico/Cromatografia iônica
N-NH ₃ (mg N L ⁻¹)			X	ANTHONISEN <i>et al.</i> (1976)
S-SO ₄ ²⁻ (mg S L ⁻¹)	X	X	X	Turbidimétrico/Cromatografia iônica
Sulfeto (mg S-SDT L ⁻¹)	X	X	X	8131 (HACH) – colorimétrico
SSV (mg L ⁻¹)	X	X	X	Gravimétrico
Sólidos aderidos (g SSV g espuma ⁻¹)	X	X	X	Gravimétrico
Composição do biogás			X	Cromatografia gasosa

A concentração de amônia livre foi quantificada segundo a equação (5.11), proposta por Anthonisen *et al.* (1976).

$$N - NH_3 = \frac{17 \cdot (N - amônia_{total}) \cdot 10^{pH}}{\left(14 \cdot Kb / \frac{Kw}{Kw}\right) + 10^{pH}} \quad (5.11)$$

Em que:

$$Kb / Kw = e^{6344 / (273 + T)}$$

$N - NH_3$ = concentração de N como amônia livre (mg N-NH₃ L⁻¹)

$N - amônia_{total}$ = concentração de N como amônia total (mg N L⁻¹)

T = temperatura (°C)

A metodologia para determinação das concentrações de sulfeto foi modificada por meio do uso de solução de acetato de zinco 0,1 M, no qual a amostra era adicionada imediatamente após a coleta, com a finalidade de fixar o sulfeto presente na amostra. A concentração de sulfeto foi convenientemente expressa em termos de sulfeto dissolvido total (S-SDT), englobando as formas S²⁻, HS⁻ e H₂S na fase líquida (MORAES, 2009).

Para a determinação de sólidos aderidos (mg SSV g espuma⁻¹), foram retiradas amostras de espumas dos reatores e transferidas para um tubo falcon (15 mL) com água destilada e os sólidos foram removidos com o auxílio de um bastão de vidro. O volume de enxágüe foi filtrado em membrana porosa de 1,2 µm, previamente seca e pesada, e a mesma foi levada à estufa por 24 horas, à 100°C. A determinação da massa das respectivas espumas também foi realizada após secagem em estufa à 100°C por 24 horas.

Não foi possível determinar a concentração de H₂S no biogás por meio da cromatografia gasosa, frente à dificuldade em se encontrar equipamentos que detectem, adequadamente, baixas concentrações deste composto. Frente a este imprevisto, esta determinação foi feita teoricamente, com base na concentração de sulfeto dissolvido contida no efluente do reator UASB e considerando o equilíbrio químico entre as formas de sulfeto de acordo com a Lei de Henry.

5.6 AMOSTRAGEM

O monitoramento dos reatores verticais de leito fixo foi realizado por meio de análises de amostras coletadas na entrada (afluente) e na saída (efluente) dos reatores, sendo realizadas em média três vezes por semana. As amostras do afluente eram coletadas diretamente do frasco de alimentação, antes deste ser conectado às mangueiras que alimentavam os reatores. Para as amostras do efluente, os frascos de coleta eram acoplados à câmara de saída dos reatores. As análises de sulfeto, sulfato, nitrato, medições de pH e potencial redox eram realizadas logo após a coleta das amostras. Para as análises de nitrito e nitrogênio amoniacal, as amostras eram congeladas por até uma semana antes de serem utilizadas.

Com relação aos perfis temporais conduzidos nos reatores diferenciais, eram coletadas amostras diretamente dos frascos Duran, por meio de seringas através do septo emborrachado localizado no topo dos frascos. A amostragem era realizada a cada 2 h. Eram realizadas análises de sulfeto, sulfato e nitrato logo após a coleta das amostras e, para a análise de nitrito, procedia-se ao congelamento das amostras por período máximo de 7 dias antes de seu uso.

O monitoramento do reator nitrificante/desnitrificante foi realizado por meio das análises especificadas na seção 5.5 (Tabela 5.9), três vezes por semana, em média. As amostras afluentes eram coletadas por meio de um cateter inserido na mangueira localizada na entrada do reator, como mostrado em detalhe na Figura 5.18. As amostras eram coletadas com o uso de seringa. As amostras efluentes eram coletadas durante o descarte do líquido do reator. Todas as análises eram realizadas imediatamente após a coleta, com exceção das análises de nitrogênio amoniacal, cujas amostras eram congeladas e armazenadas por no máximo uma semana. As medições de OD e POR eram realizadas online, com o uso de micro-sensores que ficavam submersos no interior do reator. Ao final de cada condição

experimental, foram obtidos dados dos perfis temporais com duração de um ciclo de 8 horas, sendo coletadas amostras a cada 30 minutos.

Figura 5.18 – Detalhe do ponto de coleta das amostras afluentes, por meio de um cateter localizado na mangueira de entrada do reator.

5.7 EXAMES MICROBIOLÓGICOS

Os exames microbiológicos envolveram a identificação morfológica da população de microrganismos presentes nos reatores e a quantificação dos organismos nitrificantes e desnitrificantes com o uso da técnica do Número Mais Provável (NMP). Os exames microscópicos foram realizados para as etapas 1 e 3, enquanto que a técnica de NMP foi aplicada apenas na etapa 3. Para a etapa 1, as amostras foram retiradas ao final de cada ensaio. Para a etapa 3, as amostras para os exames microscópicos foram retiradas ao final das condições experimentais em que foi realizada a quantificação de organismos pelo NMP.

5.7.1 Exames microscópicos

Foram realizados exames de microscopia óptica comum e de contraste de fase pela pesquisadora Dra. Eloísa Pozzi do Laboratório de Processo Biológicos do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos. Também houve a contribuição da doutoranda Débora Fonseca do programa de pós-graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento.

Os exames microscópicos da biomassa aderida às espumas de poliuretano foram realizados por meio de microscópio óptico de contraste de fase disponível no Laboratório de Processos Biológicos. Uma câmera acoplada ao microscópio registrou as imagens por meio de um software que registrava a escala nas fotos. As amostras foram retiradas dos cubos de espuma de poliuretano, com auxílio de pinça, e fixadas em lâminas com ágar.

5.7.2 Quantificação de organismos nitrificantes e desnitrificantes

Estes ensaios microbiológicos contaram com a colaboração da doutoranda Débora Fonseca do programa de pós-graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento. As amostras foram coletadas ao final das condições mais relevantes da 3ª etapa, ou seja, daquelas em que se constatou alteração significativa na nitrificação e/ou desnitrificação por meio das análises físico-químicas.

A estimativa dos organismos nitrificantes e desnitrificantes foi realizada por meio de diluições seriadas a partir da biomassa aderida nos cubos de espuma de poliuretano. As

espumas foram coletadas de forma a serem representativas de toda a população de microrganismos presentes no reator. Amostras da biomassa aderida foram retiradas das espumas com auxílio de um bastão de vidro e homogeneizada. Todos os ensaios foram realizados em quintuplicatas.

A quantificação de organismos nitrificantes envolveu a estimativa das bactérias oxidadoras de nitrogênio amoniacal e de nitrito. A metodologia de quantificação foi baseada em Spínola (2009), que empregou o método de Focht e Joseph (1973), modificado por Tiedje (1982) e adaptado para amostras líquidas (GIANOTTI, 1994). O meio de cultura utilizado para o crescimento das bactérias oxidadoras de nitrogênio amoniacal e nitrito está apresentado na Tabela 5.11.

Tabela 5.11 – Meio de cultivo contendo sais minerais e elementos traço para o crescimento de organismos nitrificantes.

Constituinte químico	Concentração na solução estoque (g 100 mL ⁻¹)	Volume requerido para 1 L de meio (mL L ⁻¹)	
		Oxidadoras de nitrogênio amoniacal	Oxidadoras de nitrito
Sais			
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,34	1,0	1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	4,0	1,0	5,0
KH ₂ PO ₄	2,72	7,5	1,0
Azul de bromotimol	0,04	1,0	-
K ₂ HPO ₄	3,48	-	4,0
NaNO ₂	0,69	-	1,0
NH ₄ Cl*	-	-	-
Ferro quelante			
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,246	1,0	1,0
EDTA dissódico	0,331	1,0	1,0
Elementos traço			
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,01	1,0	1,0
MnCl ₂	0,02	1,0	1,0
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0002	1,0	1,0
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,01	1,0	1,0
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,002	1,0	1,0

*Não foi preparada solução estoque, sendo adicionados 125 mg L⁻¹ de meio para as oxidadoras de nitrogênio amoniacal.

Após o preparo do meio de cultivo para organismos nitrificantes, o mesmo foi distribuído igualmente (9 mL) em tubos de ensaio, sendo fechados com tampões de algodão e esterilizados em autoclave (20 minutos, 1 atm e 120°C). Após a inoculação e a diluição em série, em quintuplicatas, em ambiente de assepsia, os tubos foram incubados a 30°C, sem agitação, por 7 dias para as oxidadoras de nitrogênio amoniacal, e por 14 dias para as oxidadoras de nitrito.

A quantificação de organismos desnitrificantes foi realizada para bactérias heterotróficas e autotróficas oxidadoras de sulfeto. Para as bactérias heterotróficas, utilizou-se a metodologia descrita por Tiedje (1982). O meio de cultivo consistiu em meio genérico (*Nutrient Broth*), acrescido de nitrato na concentração de 500 mg L⁻¹. Foram pesados 8,0 g de meio genérico e 0,685 g de NaNO₃, completando-se o volume de 1 L com água ultra-purificada previamente aquecida. O meio foi distribuído igualmente (4,5 mL) em tubos de ensaio, os quais foram fechados com tampa de borracha e esterilizados em autoclave (20 minutos, 1 atm e 120°C). Após a inoculação e a diluição em série (quintuplicatas) em ambiente de assepsia, os tubos foram incubados a 30°C por 14 dias, sem agitação.

A metodologia para quantificação de bactérias autotróficas oxidadoras de sulfeto foi adaptada de Gevertz *et al.* (2000) e Eckford e Fedorak (2002). O meio de cultura utilizado foi baseado em Callado e Foresti (2000) e adaptado por Moraes (2009), como apresentado na subseção 5.2.2., utilizando-se apenas nitrato como receptor de elétrons. O meio foi igualmente distribuído (9 mL) em frascos de antibiótico de 30 mL, os quais foram fechados com tampas de butila, lacrados com lacres de alumínio, e esterilizados em autoclave (20 minutos, 1 atm e 120°C). Em seguida, retirou-se o oxigênio da atmosfera dos frascos com o uso da mistura de gases N₂/CO₂, a qual foi continuamente fluxionada utilizando-se agulhas inseridas nas tampas dos frascos (Figura 5.19). Após este procedimento, adicionou-se 0,25 mL de solução concentrada de sulfeto de sódio 0,1 M previamente esterilizada, e, então, procedeu-se à

diluição seriada, em quintuplicatas, em ambiente estéril. Os frascos foram incubados por 30 dias, a 30°C, sem agitação.

Figura 5.19 – Detalhe do procedimento de troca de atmosfera para a retirada de oxigênio do *headspace* dos frascos de antibiótico, utilizados na quantificação das bactérias desnitrificantes autotróficas oxidadoras de sulfeto.

A contagem do NMP de bactérias nitrificantes e desnitrificantes foi realizada com base na combinação de respostas positivas, utilizando-se a tabela padrão de probabilidade descrita no *Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater* (2005) e a equação 5.12.

$$\frac{NMP}{100mL} = \frac{\text{Valor NMP (tabela padrão de probabilidade)} \times 10}{\text{Maior diluição da combinação de tubos positivos}} \quad (5.12)$$

“ Conte-me e eu esqueço. Mostre-me e eu apenas me lembro. Envolve-me e eu compreendo. Confúcio (551 a.C. -479 a.C.)

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 EXPERIMENTOS DA 1ª ETAPA

6.1.1 Reatores verticais de leito fixo: monitoramento

Nesta seção, são apresentados os dados experimentais obtidos durante a operação dos reatores verticais de leito fixo, contemplando os valores de concentração dos compostos analisados e a discussão dos resultados encontrados. A apresentação destes resultados está subdividida a seguir em dois itens, de acordo com a via de desnitrificação estudada: nitrato e nitrito.

6.1.1.1 Desnitrificação via nitrato

As três condições estudadas estão apresentadas na Tabela 6.1, na qual são mostradas as concentrações médias medidas do doador e receptor de elétrons durante todo o período monitorado, com as respectivas relações molares N/S resultantes. A relação molar N/S estequiométrica, correspondente a 1,6, foi calculada com base na equação (4.10), conforme descrito a seguir.

$$\frac{N}{S} = \frac{N - NO_3^-}{S - S^{2-}} = \frac{2}{1,25} = 1,6$$

Vale ressaltar que na condição em que se objetivou a aplicação de concentrações de sulfeto e nitrato em proporções estequiométricas, a relação molar N/S experimental, isto é, obtida com base nas concentrações medidas experimentalmente durante todo o período monitorado, resultou em valor um pouco superior que a relação estequiométrica teórica de 1,6. Este fato ocorreu em função da dificuldade em se obter a concentração precisa de sulfeto adicionado à alimentação do reator. Desse modo, alguma limitação do doador de elétrons pode ter ocorrido, hipótese que será discutida posteriormente nesta seção.

Tabela 6.1 – Concentrações médias medidas de sulfeto e nitrato durante o período monitorado, com as respectivas relações molares N/S experimentais, de acordo com as condições avaliadas.

Condição	Relação molar N/S	S-SDT (mg S L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)
Ausência de sulfeto	n.a.	0,0	19,9 ± 1,3
Excesso de sulfeto	0,9	49,3 ± 3,5	20,2 ± 1,9
Estequiometria	1,8	26,6 ± 5,1	21,3 ± 1,5

n.a = não se aplica

Os reatores foram operados por aproximadamente 35 dias em cada condição. As três condições avaliadas, relativas ao doador de elétrons, estão apresentadas, separadamente, a seguir.

Ausência de sulfeto

A ocorrência da desnitrificação via nitrato na ausência de sulfeto, de maneira geral, foi pequena, como pode ser observado na Figura 6.1, a qual apresenta as concentrações de nitrato na entrada e na saída do reator, além da concentração de nitrito do efluente. Foi observada eficiência de remoção de nitrato de até 60% nos primeiros 10 dias de operação. Com o decorrer dos dias, tal eficiência foi decrescendo gradualmente, atingindo o valor médio de $15,5 \pm 5,2\%$ de remoção após 24 dias de operação. Neste caso, a remoção de nitrato observada ocorreu provavelmente devido à desnitrificação heterotrófica marginal com o uso de fontes de carbono endógenas, uma vez que não havia fonte de carbono orgânico na alimentação. Vale ressaltar que o inóculo era lodo anaeróbio mixotrófico. Adicionalmente, a formação de nitrogênio amoniacal nos primeiros 16 dias de operação indicou a ocorrência de atividade endogênica (Figura 6.2). Portanto, a desnitrificação heterotrófica residual ocorreu majoritariamente devido ao processo endógeno estabelecido no interior do reator. Com o decorrer dos dias, a biomassa heterotrófica foi se reduzindo, e consequentemente, a remoção de nitrato via desnitrificação heterotrófica também decresceu. Observou-se que parte da desnitrificação residual ocorreu parcialmente, havendo pequena formação de nitrito como um dos produtos finais.

Figura 6.1 – Valores de concentração de (●) nitrato no afluente, (○) nitrato no efluente e (□) nitrito no efluente, monitorados durante a operação do reator vertical na ausência de sulfeto e desnitrificação via nitrato.

Figura 6.2 – Valores de concentração de nitrogênio amoniacal (■) afluente e (□) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical na ausência de sulfeto e desnitrificação via nitrato.

A alcalinidade a bicarbonato, de maneira geral, apresentou valores mais elevados no efluente, como observado na Figura 6.3. Também foi observada a elevação dos valores médios de pH de $8,2 \pm 0,1$ para $8,5 \pm 0,1$, como apresentado na Figura 6.4. Este fato está relacionado com a ocorrência da desnitrificação heterotrófica residual, em função da liberação de íons OH^- e da geração de alcalinidade no meio, decorrentes deste processo.

Figura 6.3 – Valores concentração de alcalinidade a bicarbonato (●) afluente e (○) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical na ausência de sulfeto e desnitrificação via nitrato.

Figura 6.4 – Valores de pH (●) afluente e (○) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical na ausência de sulfeto e desnitrificação via nitrato.

Com relação ao potencial redox, foi observada grande instabilidade nos valores do efluente, como mostrado na Figura 6.5. Entretanto, o potencial redox médio foi negativo. Este fato foi atribuído à ocorrência de rotas metabólicas redutivas, como a RDNA, que causaram a redução do meio, visto que não foi adicionado nenhum agente redutor na alimentação do reator. Vale ressaltar que o lodo de inóculo utilizado apresentava grande diversidade microbiana, o que reforça a hipótese de ocorrência de outros processos metabólicos. A formação de nitrogênio amoniacal detectada certamente contribuiu para a redução do

potencial redox do meio, visto que este processo ocorre por meio de rota metabólica redutiva. Além disso, a desnitrificação heterotrófica residual via atividade endogênica também contribuiu para a diminuição dos valores de potencial redox, visto que houve decomposição de material orgânico proveniente da morte celular.

Figura 6.5 – Valores de potencial redox (■) afluente e (□) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical na ausência de sulfeto e desnitrificação via nitrato.

Sulfeto em excesso

Na Figura 6.6 são apresentadas as concentrações de nitrato na entrada e na saída do reator. Observa-se que a desnitrificação passou a ser efetiva a partir do décimo dia de operação, atingindo eficiência média de $98,5 \pm 5,2\%$ de remoção de nitrogênio na forma de nitrato. Vale ressaltar que, nos últimos 2 dias de monitoramento, a desnitrificação ocorreu completamente, sendo removido todo nitrato contido na alimentação.

Figura 6.6 – Valores de concentração de nitrato no afluente (●) e no efluente (○), monitorados durante a operação do reator vertical com excesso de sulfeto e desnitrificação via nitrato.

O monitoramento das concentrações de nitrogênio amoniacal confirmou a ocorrência da desnitrificação, visto as mesmas mantiveram-se constantes durante todo o período de operação, com valores médios de $3,72 \pm 0,36$ mg N-NH₄⁺ L⁻¹ e $3,80 \pm 0,91$ mg N-NH₄⁺ L⁻¹, no afluente e efluente, respectivamente (Figura 6.7). Dessa forma, não houve a redução dissimilativa de nitrato a amônia (RDNA), sendo todo nitrato reduzido aos produtos finais da desnitrificação. Também não foi detectada a presença de nitrito em nenhum momento, confirmando que a desnitrificação não ocorreu parcialmente.

Figura 6.7 – Valores de concentração de nitrogênio amoniacal (■) afluente e (□) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com excesso de sulfeto e desnitrificação via nitrato.

O comportamento dos compostos de enxofre comprovou a ocorrência da desnitrificação autotrófica com emprego de sulfeto como doador de elétrons. Em todo o período de operação, houve o consumo de sulfeto com a formação de sulfato no efluente, como pode ser observado nas Figuras 6.8 e 6.9, que apresentam as concentrações de sulfeto e sulfato, respectivamente, na entrada e saída do reator. Entretanto, o balanço de massa dos compostos de enxofre não pôde ser fechado, de forma que a parcela do sulfeto consumido não correspondeu à parcela de sulfato formado, como demonstrado na Figura 6.10. As concentrações de sulfeto consumido ($40,6 \pm 4,9$ mg S-SDT L⁻¹) foram superiores às concentrações de sulfato formadas ($26,0 \pm 6,6$ mg S-SO₄²⁻ L⁻¹) em todo o período, o que comprova a formação de compostos intermediários de enxofre, como o enxofre elementar (S⁰). Além disso, houve a formação de camadas esbranquiçadas recobrendo as matrizes de espuma no interior do reator durante todo o período de operação, indicativo de acúmulo de enxofre elementar, como ilustrado na Figura 6.11. Dessa forma, concentrações excessivas de sulfeto, em relação ao nitrato, conduziram à oxidação parcial deste doador de elétrons, havendo formação de produtos intermediários de enxofre. Considerando estes resultados, a

oxidação parcial do sulfeto na desnitrificação autotrófica pode ter ocorrido conforme a equação (4.11).

Figura 6.8 – Valores de concentração de enxofre na forma de sulfeto dissolvido total (●) afluente e (○) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com excesso de sulfeto e desnitrificação via nitrato.

Figura 6.9 – Valores de concentração de enxofre na forma de sulfato (▲) afluente e (Δ) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com excesso de sulfeto e desnitrificação via nitrato.

Figura 6.10 – Balanço de massa de enxofre, considerando: (●) consumo de sulfeto e (Δ) produção de sulfato, para aplicação de excesso de sulfeto e desnitrificação via nitrato.

Figura 6.11 – Camadas esbranquiçadas encobrendo as matrizes cúbicas de espuma, indicando a formação de enxofre elementar.

De acordo com Moraes (2009), a relação N/S influencia a formação dos produtos finais provenientes da oxidação de sulfeto na desnitrificação autotrófica, sendo que baixas relações N/S relativas à estequiometria ($N/S < 1,6$), ocasionam a oxidação incompleta deste doador de elétrons. A autora também observou acúmulo de enxofre elementar quando foram aplicadas concentrações excessivas de sulfeto, em reatores operados em batelada com biomassa imobilizada em matrizes cúbicas de espuma de poliuretano.

Cervantes *et al.* (2009) avaliaram a remoção de nitrato, sulfeto e *p-cresol* em reatores desnitrificantes operados em batelada contendo biomassa suspensa. Quando os reatores foram alimentados com altas concentrações de sulfeto, os autores detectaram a formação de compostos intermediários de enxofre, por meio do balanço de massa. Qualitativamente, foi observada a formação de partículas brancas no interior dos reatores, evidenciando a presença de enxofre elementar. Krishnakumar e Manilal (1999) também verificaram possível acúmulo de enxofre elementar como intermediário da oxidação de sulfeto, em reatores desnitrificantes operados em batelada sob condições de excesso do doador de elétrons, visualizando coloração esbranquiçada do meio líquido no interior dos reatores.

As análises de alcalinidade a bicarbonato mostraram que não houve grandes variações deste parâmetro ao longo de toda operação do reator (Figura 6.12). Do décimo ao vigésimo dia de operação, observou-se aumento da alcalinidade, ocasionado em função da desnitrificação autotrófica com uso de sulfeto como doador de elétrons, visto que é um processo alcalinizante. Entretanto, a partir do vigésimo segundo dia, foi detectada queda nos valores de alcalinidade. Este fato é indicativo de ocorrência da desnitrificação autotrófica a partir de enxofre elementar. Segundo Sierra-Alvarez *et al.* (2007), a oxidação de enxofre elementar por meio da desnitrificação autotrófica ocasiona o consumo de alcalinidade, conforme demonstrado na equação (4.12), da subseção 4.2.2.4. Cervantes *et al.* (2009) também observaram que o enxofre elementar previamente formado foi utilizado como doador de elétrons para completar a desnitrificação do nitrato, quando altas concentrações de sulfeto foram aplicadas.

Dessa forma, pode-se inferir que a desnitrificação autotrófica a partir de sulfeto ocorreu, preferencialmente, em duas etapas: primeiramente, o sulfeto foi parcialmente oxidado a enxofre elementar, e este, por fim, foi oxidado a sulfato. Possivelmente, a desnitrificação a partir de enxofre elementar impediu maiores elevações no valor da

alcalinidade a bicarbonato no efluente, amenizando o efeito de aumento da alcalinidade em função da desnitrificação a partir de sulfeto. No entanto, a ocorrência de alguma oxidação completa de sulfeto a sulfato na desnitrificação autotrófica, simultaneamente à oxidação parcial do sulfeto, não pode ser excluída. Porém, a oxidação de sulfeto a enxofre elementar, e seu posterior uso na desnitrificação autotrófica, pareceu ser a rota metabólica preferencial dos organismos desnitrificantes.

Figura 6.12 – Valores de alcalinidade a bicarbonato (●) afluente e (○) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com excesso de sulfeto e desnitrificação via nitrato.

Reyes-Avila *et al.* (2004) avaliaram a desnitrificação autotrófica na presença de sulfeto, utilizando biomassa suspensa previamente adaptada. Os autores constataram que a oxidação de sulfeto ocorreu em duas etapas: em uma primeira etapa, o sulfeto foi oxidado a tiosulfato e enxofre elementar, e posteriormente, estes últimos foram oxidados a sulfato, sendo esta etapa mais lenta que a primeira. Gadekar *et al.* (2009) também verificaram que a oxidação de sulfeto ocorreu em duas fases distintas. Os autores realizaram ensaios cinéticos, em reatores operados em batelada, com o objetivo de avaliar a oxidação anóxica de sulfeto, por meio da ação de bactérias do gênero *Thiomicrospira*, empregando nitrato como receptor de elétrons.

O pH também foi monitorado durante todo o período de operação do reator, como mostrado na Figura 6.13. De modo geral, este parâmetro manteve-se estável, em média de 8,9–9,0 ($\pm 0,1$). Os altos valores de pH medidos foram devidos a presença de sulfeto de sódio dissolvido no meio, visto que este composto resulta em uma solução extremamente alcalina quando dissolvido em meio líquido pouco tamponado, havendo liberação de íons OH^- (equação 6.1). Apesar de tais valores elevados, a biomassa não foi afetada e o processo biológico de desnitrificação ocorreu com estabilidade.

Figura 6.13 – Valores de pH (●) afluente e (○) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com excesso de sulfeto e desnitrificação via nitrato.

O monitoramento do potencial redox pode ser visualizado na Figura 6.14. De modo geral, observou-se aumento nos valores deste parâmetro em função da oxidação do sulfeto no processo de desnitrificação. Vale ressaltar que a medida do potencial redox no efluente foi prejudicada em função do modo de coleta da amostra: o frasco de coleta era acoplado na saída do reator e o efluente gotejava neste frasco até ser atingido o volume necessário para as análises. Até que este volume fosse obtido, a amostra ficava em contato com a atmosfera

ambiente, o que pode ter causado a alteração do potencial redox em função da presença do oxigênio do ar. Isto foi observado nas análises do efluente dos dias 20 a 24, nas quais foram detectados picos mais altos de potencial redox, provavelmente causados pelo contato com o oxigênio atmosférico.

Figura 6.14 – Valores de potencial redox (■) afluente e (□) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com excesso de sulfeto e desnitrificação via nitrato.

Sulfeto em concentração estequiométrica

A desnitrificação via nitrato com adição de sulfeto em concentração estequiométrica relativa ao receptor de elétrons ocorreu de forma estável, como pode ser observado na Figura 6.15. Entretanto, durante todo o período analisado, constatou-se pequena formação de nitrito no efluente, proveniente da desnitrificação parcial de nitrato. Em nenhum momento foi detectado o consumo completo de nitrato, e a desnitrificação completa ocorreu com eficiência média de $84,0 \pm 3,2\%$. Vale ressaltar que a concentração média de sulfeto adicionada ($26,6 \pm 5,1$ mg S-SDT L⁻¹) estava pouco abaixo da requerida estequiometricamente, a qual equivale a 28,8 mg S-SDT L⁻¹. Esta insuficiência do doador de elétrons justifica a concentração residual de nitrato no efluente e a desnitrificação incompleta com formação de nitrito.

Figura 6.15 – Valores de concentração de (●) nitrato afluente e (○) nitrato efluente, e (▲) nitrito efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com sulfeto em concentração estequiométrica e desnitrificação via nitrato.

As concentrações de nitrogênio amoniacal mantiveram-se estáveis durante o período monitorado, excetuando-se no primeiro dia de análise, cuja concentração medida no efluente foi consideravelmente maior que no afluente (Figura 6.16). Este fato possivelmente deve-se à atividade endogênica dos microrganismos heterotróficos provenientes do lodo de inóculo, em função da ausência de fonte de carbono orgânico. De modo geral, as concentrações médias de nitrogênio amoniacal medidas foram $4,36 \pm 0,15$ mg N-NH₄⁺ L⁻¹ e $4,17 \pm 0,94$ mg N-NH₄⁺ L⁻¹, no afluente e efluente, respectivamente. Igualmente à condição de sulfeto em excesso, não foi observada a ocorrência de RDNA, havendo o consumo de nitrato concomitantemente à oxidação de sulfeto, o que confirma a ocorrência da desnitrificação autotrófica.

Figura 6.16 – Valores de concentração de nitrogênio amoniacal (■) afluente e (□) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com sulfeto em concentração estequiométrica e desnitrificação via nitrato.

O consumo de sulfeto ocorreu durante todo o período de operação (Figura 6.17), restando em média, apenas $0,09 \pm 0,89$ mg S-SDT L⁻¹ no efluente. Simultaneamente, foi observada a produção de sulfato no efluente (Figura 6.18), em concentrações próximas aos valores de sulfeto injetado. Dessa forma, o balanço de massa de enxofre foi fechado com pequenas variações, as quais representaram uma pequena formação de compostos intermediários de enxofre. Em média, considerando todo o período de operação, foram consumidos $25,2 \pm 5,1$ mg S-SDT L⁻¹ e formados $23,4 \pm 3,4$ mg S-SO₄⁻² L⁻¹. Na Figura 6.19 tem-se melhor visualização do balanço de massa pontual do enxofre, para todo o período de operação. Entre os dias 12 e 22 ficou clara a defasagem entre os valores de concentração de sulfeto consumido e sulfato formado, período no qual foi observada uma camada esbranquiçada extremamente tênue ao redor de algumas espumas, fato que é indicativo da presença de enxofre elementar. Comparativamente à condição com sulfeto em excesso, a camada esbranquiçada formada foi consideravelmente inferior, acompanhando a menor formação de compostos intermediários de enxofre.

Figura 6.17 – Valores de concentração de enxofre na forma de sulfeto dissolvido total (●) afluente e (○) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com sulfeto em concentração estequiométrica e desnitrificação via nitrato.

Figura 6.18 – Valores de concentração de enxofre na forma de sulfato (▲) afluente e (△) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com sulfeto em concentração estequiométrica e desnitrificação via nitrato.

Figura 6.19 – Balanço de massa de enxofre, considerando: (●) consumo de sulfeto e (Δ) produção de sulfato, com sulfeto em concentração estequiométrica e desnitrificação via nitrato.

Com relação à alcalinidade a bicarbonato, a mesma apresentou valores similares no afluente e efluente, correspondendo aos valores de $507,9 \pm 27,0 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ e $498,3 \pm 23,3 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$, respectivamente. Mais detalhadamente, na Figura 6.20 podem ser observadas as pequenas oscilações entre geração e consumo de alcalinidade ao longo do tempo, possivelmente associadas à formação eventual de enxofre elementar, que gera alcalinidade e seu posterior uso na desnitrificação, que consome alcalinidade. Como na condição em que se aplicou a concentração de sulfeto em excesso, inferiu-se que a oxidação de sulfeto acoplada à desnitrificação autotrófica ocorreu em duas etapas consecutivas: parcialmente a enxofre elementar, e finalmente a sulfato.

Vale salientar que, a oxidação completa de sulfeto a sulfato no processo desnitrificante também pode ter ocorrido paralelamente à oxidação em duas etapas, já que a concentração de todos os compostos de enxofre ao longo do tempo não pôde ser medida, para comprovar a ocorrência exclusiva da oxidação em duas etapas. Além disso, em processos biológicos, a ocorrência exclusiva de uma determinada rota metabólica é dificultada, visto que um mesmo microrganismo pode utilizar diferentes rotas para a utilização do substrato, como é o caso das bactérias oxidadoras de enxofre. Portanto, a oxidação do sulfeto em duas etapas e a oxidação

completa a sulfato na desnitrificação autotrófica podem ter ocorrido concomitantemente nesta condição. Entretanto, em função dos resultados obtidos nas análises de alcalinidade, a oxidação do sulfeto em duas etapas na desnitrificação autotrófica foi, provavelmente, a rota metabólica preferencial.

Tais resultados estão de acordo com aqueles reportados por Beristain-Cardoso *et al.* (2009). Os autores avaliaram o efeito da concentração inicial de sulfeto na oxidação simultânea de fenol e sulfeto, em ensaios em batelada sob condições desnitrificantes. Quando nitrato e sulfeto foram adicionados em concentrações estequiométricas, o meio líquido dos bioensaios transformou-se de incolor para levemente esbranquiçado. Este comportamento foi atribuído à formação transiente de enxofre elementar coloidal na cultura. A observação de uma tênue coloração branca, característica de enxofre elementar coloidal, também foi relatada em outras pesquisas (KRISHNAKUMAR E MANILAL, 1999; BERISTAIN-CARDOSO *et al.*, 2006).

Figura 6.20 – Valores de alcalinidade a bicarbonato (●) afluente e (○) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com sulfeto em concentração estequiométrica e desnitrificação via nitrato.

Os valores de pH monitorados durante toda a operação do reator variaram entre $8,7 \pm 0,1$ e $8,9 \pm 0,1$ no afluente e efluente, respectivamente (Figura 6.21). Como na condição em

que a concentração de sulfeto estava em excesso, os altos valores de pH foram atribuídos à presença de sulfeto em solução. Entretanto, observou-se que tais valores foram ligeiramente menores que na condição de sulfeto em excesso, visto que a concentração de sulfeto aplicada na presente condição foi inferior.

Figura 6.21 – Valores de pH (●) afluente e (○) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com sulfeto em concentração estequiométrica e desnitrificação via nitrato.

Os valores medidos de potencial redox apresentaram oscilações no efluente, como mostrado na Figura 6.22. Como explicado anteriormente na condição com sulfeto em excesso, as medições deste parâmetro no efluente eram prejudicadas pela forma de coleta de amostra, possibilitando a incorporação de oxigênio atmosférico na mesma. Isso justifica a ocorrência de alguns valores mais elevados do potencial redox no efluente. De modo geral, os valores de potencial redox sofreram elevação média de $-306,4 \pm 12,0$ a $-93,6 \pm 34,7$, em função da oxidação do sulfeto no processo de desnitrificação.

Figura 6.22 – Valores de potencial redox do afluente (■) e do efluente (□), monitorados durante a operação do reator vertical com sulfeto em concentração estequiométrica e desnitrificação via nitrato.

Comparando as condições estudadas com relação à adição de sulfeto (excesso e valor estequiométrico), a formação de compostos intermediários de enxofre na segunda condição foi consideravelmente inferior. Nesta condição, a formação de tais compostos foi apenas transitória, e estes provavelmente estariam na forma de enxofre elementar coloidal. De modo contrário, o excesso de sulfeto resultou em acúmulo de enxofre elementar. Desta forma, a relação molar N/S influenciou a formação dos produtos finais da oxidação de sulfeto na desnitrificação autotrófica, fazendo com que os microrganismos utilizassem diferentes rotas metabólicas na desnitrificação autotrófica. Quando esta relação foi inferior ao valor estequiométrico requerido ($N/S < 1,6$), a oxidação incompleta de sulfeto aos compostos intermediários de enxofre foi favorecida. Por outro lado, a oxidação completa de sulfeto a sulfato foi alcançada quando essa relação era igual ou ligeiramente superior a 1,6. Independentemente da relação molar N/S, no entanto, a oxidação de sulfeto tendeu a ocorrer em duas etapas. Na condição com concentração de sulfeto em valor estequiométrico, a oxidação completa a sulfato ocorreu devido à menor concentração de sulfeto disponível para a oxidação. Portanto, os compostos intermediários de enxofre formados teriam que ser necessariamente oxidados a sulfato, a fim de fornecer os elétrons necessários para

desnitrificação completa. Na condição com sulfeto em excesso, a oxidação do doador de elétrons (sulfeto) foi preferencial devido a sua maior biodisponibilidade aos microrganismos quando comparados aos compostos intermediários, tais como enxofre elementar.

Na Tabela 6.2, estão sumarizados os principais resultados obtidos nesta 1ª etapa, para a desnitrificação via nitrato, em termos de valores médios medidos para o afluente e para efluente, ou considerando o consumo médio ou a produção média, após ser observada a estabilidade aparente no desempenho dos reatores. Para o ensaio na ausência de sulfeto, todo o período de operação foi considerado, já que o reator não apresentou estabilidade durante sua operação. Este fato explica o maior desvio-padrão para esta condição, com relação ao consumo de nitrato, quando comparada às outras condições com adição de sulfeto.

Tabela 6.2 – Resumo dos resultados obtidos nos ensaios da 1ª etapa, para a desnitrificação via nitrato, em termos de valores médios, após ser atingida a estabilidade aparente do processo.

Condição	$^a\Delta\text{NO}_3^-$ (%)	$^a\Delta\text{S-SDT}$ (mg S L ⁻¹)	$^b\Delta\text{SO}_4^{2-}$ (mg S L ⁻¹)	NH_4^+ (mg N L ⁻¹)		AB (mg CaCO ₃ L ⁻¹)		pH		Rota metabólica preferencial
				Af.	Ef.	Af.	Ef.	Af.	Ef.	
Ausência de sulfeto	$^{c}23,8 \pm 15,9$	n.a.	n.a.	3,7 $\pm 0,5$	3,8 $\pm 1,8$	456,9 $\pm 36,2$	465,5 $\pm$ 64,9	8,2 $\pm 0,1$	8,2 $\pm 0,1$	^f Desnitrific. heterotrófica/ RDNA
Estequiometria (N/S = 1,8)	$^d84,0 \pm 3,2$	25,2 $\pm 5,1$	23,4 $\pm 3,4$	4,3 $\pm 0,3$	4,2 $\pm 0,9$	507,9 $\pm 27,0$	497,1 $\pm 23,3$	8,7 $\pm 0,1$	8,9 $\pm 0,1$	Eqs. (4.10) e (4.11)
Excesso de sulfeto (N/S = 0,9)	$^{e}98,5 \pm 5,2$	41,7 $\pm 4,9$	26,0 $\pm 4,6$	3,7 $\pm 0,4$	3,8 $\pm 0,4$	521,8 $\pm 44,4$	502,2 $\pm 73,4$	8,9 $\pm 0,1$	8,7 $\pm 0,1$	Eq. (4.11)

n.a. = não se aplica; Af. = afluente; Ef. = efluente

^a Referente ao consumo de N-nitrato (em termos de eficiência de desnitrificação) e de S-sulfeto

^b Referente à produção de S-sulfato

^c Houve produção média de nitrito = $0,6 \pm 2,0$ mg N L⁻¹

^d Houve produção média de nitrito = $2,0 \pm 0,6$ mg N L⁻¹

^e Não houve geração de nitrito em nenhum momento

^f Desnitrificação heterotrófica via atividade endógena

6.1.1.2 Desnitrificação via nitrito

As concentrações médias medidas de sulfeto e nitrito, durante todo o período de operação, estão apresentadas na Tabela 6.3. Experimentalmente, a relação molar N/S

estequiométrica não correspondeu exatamente à relação teórica de 2,7, mas foi muito próxima a esse valor. O cálculo da relação molar N/S estequiométrica (2,7) foi realizado com base na estequiometria da equação (4.14), conforme descrito a seguir.

$$\frac{N}{S} = \frac{N - NO_2^-}{S - HS^-} = \frac{8}{3} = 2,7$$

Tabela 6.3 – Concentrações médias medidas de sulfeto e nitrito durante o período monitorado, com as respectivas relações molares N/S experimentais, de acordo com as condições avaliadas.

Condição	Relação molar N/S	S-SDT (mg S L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)
Ausência de sulfeto	n.a.	0,0	19,1 ± 2,0
Excesso de sulfeto	1,5	29,5 ± 2,5	19,8 ± 2,1
Estequiometria	2,8	16,4 ± 3,4	19,9 ± 1,3

n.a. = não se aplica

Os reatores foram operados por aproximadamente 35 dias em cada condição. As três condições avaliadas, relativas ao doador de elétrons, estão apresentadas, separadamente, a seguir.

Ausência de sulfeto

Na ausência de sulfeto, o comportamento dos compostos oxidados de nitrogênio se mostrou instável, havendo, de modo geral, remoção de parcela de nitrito com formação de nitrato no efluente (Figura 6.23). A formação de nitrato pode ter ocorrido em função da ação de organismos anammox possivelmente presentes no lodo de inóculo anaeróbico. A biomassa granular proveniente de reator UASB permite a presença destes microrganismos no interior dos grânulos. Como detalhado na subseção 4.2.2.3, a estequiometria da reação ANAMMOX inclui a produção de nitrato concomitantemente ao consumo de nitrito e nitrogênio amoniacal. No entanto, a formação de nitrogênio amoniacal foi constatada em todo o período de

operação, como pode ser visualizado na Figura 6.24. Este fato pode ter ocorrido por dois motivos: em função de morte celular, visto que o lodo era predominantemente heterotrófico e estava sendo adaptado em ambiente autotrófico, havendo carência de carbono orgânico para os microrganismos heterotróficos; ou pela ocorrência da redução dissimilativa de nitrato a amônia (RDNA). Portanto, a ocorrência de processos biológicos paralelos poderia explicar o comportamento observado dos compostos nitrogenados. Na Tabela 6.4, estão apresentadas as concentrações médias dos compostos de nitrogênio no afluente e no efluente, assim como o balanço de massa aproximado do nitrogênio, sendo desprezada a fração de nitrogênio orgânico, o qual não foi medido, visto que não estava presente na composição da água residuária utilizada. O período de operação foi dividido em três partes, de acordo com o comportamento dos compostos de nitrogênio, de forma a reduzir o desvio-padrão das médias, já que as concentrações se mostraram instáveis ao longo do tempo.

Figura 6.23 – Valores de concentração de (▲) nitrito afluente, (Δ) nitrito efluente, e (○) nitrato efluente, monitorados durante a operação do reator vertical na ausência de sulfeto e desnitrificação via nitrito.

Figura 6.24 – Valores de concentração de nitrogênio amoniacal (■) afluente e (□) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical na ausência de sulfeto e desnitrificação via nitrito.

Tabela 6.4 – Concentrações médias dos compostos de nitrogênio no afluente e no efluente, monitorados na ausência de sulfeto e desnitrificação via nitrito.

Dias de operação	Afluente			
	mg N-NO ₂ ⁻ L ⁻¹	mg N-NO ₃ ⁻ L ⁻¹	mg N-NH ₄ ⁺ L ⁻¹	Σmg N L ⁻¹
4 a 8	18,6 ± 3,3	-	5,7 ± 0,5	24,3 ± 3,7
11 a 19	20,8 ± 1,1	-	3,9 ± 1,4	24,7 ± 3,7
20 a 29	18,9 ± 1,0	-	4,9 ± 3,1	23,8 ± 2,9

Dias de operação	Efluente			
	mg N-NO ₂ ⁻ L ⁻¹	mg N-NO ₃ ⁻ L ⁻¹	mg N-NH ₄ ⁺ L ⁻¹	Σmg N L ⁻¹
4 a 8	5,4 ± 0,7	3,8 ± 1,6	7,1 ± 0,3	16,3 ± 1,9
11 a 19	9,7 ± 0,7	5,6 ± 2,2	5,9 ± 2,0	21,3 ± 2,8
20 a 29	8,8 ± 1,4	3,7 ± 1,1	8,0 ± 2,6	20,5 ± 4,4

Observou-se que, nos primeiros dias, uma parcela razoável do nitrito alimentado foi desnitrificado, provavelmente por meio da atividade endogênica, visto que o doador de elétrons inorgânico não foi adicionado. A partir do décimo primeiro dia, a desnitrificação heterotrófica diminuiu, e a oxidação de nitrito a nitrato foi mais expressiva até o décimo nono dia. A partir do vigésimo dia, foi detectada maior produção de nitrogênio amoniacal, sugerindo que a redução dissimilativa de nitrato a amônia (RDNA) era a rota metabólica predominantemente utilizada pelos microrganismos e /ou a morte celular foi intensificada.

De modo geral, os valores de alcalinidade a bicarbonato foram mais elevados na saída do reator, considerando todo o período de operação, como pode ser visualizado na Figura 6.25. Este fato foi atribuído à ocorrência da desnitrificação heterotrófica residual, ocasionada pela atividade endogênica, que correspondeu, em média, a 18% da remoção de nitrato.

Figura 6.25 – Valores de alcalinidade a bicarbonato (■) afluente e (□) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical na ausência de sulfeto e desnitrificação via nitrato.

O pH, monitorado durante todo o período de operação, sofreu elevação de $8,2 \pm 0,1$ a $8,5 \pm 0,1$, em média (Figura 6.26). Este comportamento foi similar ao ensaio no qual foi avaliada a desnitrificação via nitrato sem adição de sulfeto.

Figura 6.26 – Valores de pH (●) afluente e (○) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical na ausência de sulfeto e desnitrificação via nitrito.

Com relação ao potencial redox, foi observado o mesmo comportamento que na desnitrificação via nitrato nesta mesma condição, como mostrado na Figura 6.27. Os valores negativos de potencial redox possivelmente ocorreram em função de rotas metabólicas redutivas, como a suposta RDNA. A desnitrificação heterotrófica residual, via atividade endogênica, também contribuiu para a redução do potencial.

Figura 6.27 – Valores de potencial redox (■) afluente e (□) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical na ausência de sulfeto e desnitrificação via nitrito.

Sulfeto em excesso

A remoção de nitrito foi observada durante todo o período de operação do reator, como mostrado na Figura 6.28, que apresenta as concentrações de nitrogênio na forma de nitrito no afluente e no efluente. O consumo de nitrito foi detectado logo nos primeiros dias de operação, havendo eficiência média de remoção de $92,2 \pm 1,1\%$ até o oitavo dia. A partir do décimo primeiro dia, a eficiência média foi elevada para $98,4 \pm 0,4\%$, até o final da operação. Comparando este comportamento com a desnitrificação via nitrato, e considerando a mesma condição do doador de elétrons empregada, constatou-se que o nitrito foi mais prontamente utilizado que o nitrato, que passou a ser efetivamente removido somente a partir do décimo dia de operação. Este fato possivelmente se deve à maior reatividade do nitrito em relação ao nitrato, recebendo os elétrons doados pelo sulfeto mais eficientemente (MAHMOOD, 2007b). De acordo com Jing *et al.* (2010), a configuração molecular do nitrito o torna mais ativo que o nitrato, mas também mais tóxico aos microrganismos. A presença de nitrato não foi detectada em nenhum momento.

Figura 6.28 – Valores de concentração de nitrito (▲) afluente e (△) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com excesso de sulfeto e desnitrificação via nitrito.

Os valores de concentração de nitrogênio amoniacal, de modo geral, mostraram a elevação deste no efluente, conforme apresentado na Figura 6.29. Nos primeiros dias de operação, foram detectadas as maiores variações de concentração de nitrogênio amoniacal no afluente e no efluente, havendo aumento máximo de 5,9 a 11,6 mg N-NH₄⁺ L⁻¹, com diminuição gradual desta variação. Existem duas possibilidades para este comportamento: a) ocorrência do processo RDNA; b) ocorrência de morte celular em função da presença de nitrito, que poderia ter causado toxicidade à biomassa, como reportado por Jing *et al.* (2010). Neste último caso, a atividade endogênica contribuiu para a ocorrência da desnitrificação, visto que o consumo de sulfeto foi inferior ao requerido estequiometricamente para a desnitrificação autotrófica via nitrito (Figura 6.30). Com o decorrer do tempo, a partir do décimo primeiro dia de operação, a RDNA e/ou a morte celular diminuiu gradualmente (adaptação microbiana), havendo menor formação de nitrogênio amoniacal, em média de 4,1 ± 2,6 mg N-NH₄⁺ L⁻¹ para 5,1 ± 2,2 mg N-NH₄⁺ L⁻¹. Além disso, o consumo de sulfeto passou a ser superior ao requerido estequiometricamente, confirmando a ocorrência da desnitrificação autotrófica via nitrito com uso de sulfeto como doador de elétrons.

Figura 6.29 – Valores de concentração de nitrogênio amoniacal (■) afluente e (□) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com excesso de sulfeto e desnitrificação via nitrito.

Figura 6.30 – Valores de concentração de sulfeto dissolvido total (●) afluente e (○) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com excesso de sulfeto e desnitrificação via nitrito.

As concentrações de sulfato medidas no afluente e no efluente, ao longo dos dias, estão apresentadas na Figura 6.31. De maneira geral, a formação de sulfato no efluente acompanhou o consumo de sulfeto, sendo que o balanço de massa foi mais aproximado quando comparado com a desnitrificação via nitrato nesta mesma condição; entretanto, o balanço também não foi fechado (Figura 6.32). Em alguns pontos, nos dias 8 e 15, a formação de sulfato ficou claramente abaixo na concentração de sulfeto consumida, indicando a formação de compostos intermediários de enxofre. Além disso, para corroborar esta hipótese, foi observada a formação de camadas esbranquiçadas encobrindo as espumas no interior do reator (Figura 6.33). A partir do décimo nono dia, foi constatada formação de sulfato superior ao consumo de sulfeto. Este fato foi atribuído à propriedade de adsorção das matrizes cúbicas de espuma, que possivelmente retiveram parte do sulfato previamente formado, o que proporcionou o acúmulo de sulfato no efluente. Por outro lado, também deve ter havido adsorção de sulfeto pelas espumas, havendo acúmulo deste composto no interior do reator, e posterior oxidação a sulfato.

Figura 6.31 – Valores de concentração de enxofre na forma de sulfato (▲) afluente e (Δ) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com excesso de sulfeto e desnitrificação via nitrito.

Figura 6.32 – Balanço de massa de enxofre, considerando: (●) consumo de sulfeto e (Δ) produção de sulfato, com excesso de sulfeto e desnitrificação via nitrito.

Figura 6.33 – Camadas esbranquiçadas encobrindo as matrizes cúbicas de espuma, indicando a formação de enxofre elementar.

Os níveis de alcalinidade a bicarbonato mantiveram-se estáveis durante todo o período de operação, apresentando períodos intercalados com baixa geração e baixo consumo (Figura 6.34). Este comportamento sinaliza para o uso de enxofre elementar como doador de elétrons concomitantemente ao uso de sulfeto, fato que impediu grandes variações da alcalinidade. Portanto, a oxidação do sulfeto em duas etapas também pode ter ocorrido nesta condição.

Figura 6.34 – Valores de alcalinidade a bicarbonato (■) afluente e (□) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com excesso de sulfeto e desnitrificação via nitrito.

O pH também manteve-se estável durante toda a operação do reator, como pode ser visualizado na Figura 6.35. Os valores médios deste parâmetro foram $8,7 \pm 0,1$ e $8,8 \pm 0,1$ no afluente e no efluente, respectivamente. Tais valores são elevados em função da presença de sulfeto de sódio no meio líquido, uma solução extremamente alcalina (equação 6.1). Entretanto, como na desnitrificação via nitrato, este fato não afetou a biomassa ativa e a desnitrificação via nitrito ocorreu com estabilidade.

Figura 6.35 – Valores de pH (■) afluente e (□) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com excesso de sulfeto e desnitrificação via nitrito.

O monitoramento do potencial redox está apresentado na Figura 6.36. Similarmente ao ensaio de desnitrificação via nitrato, observou-se, de maneira geral, aumento deste parâmetro em função da oxidação do sulfeto. Neste caso, o mesmo inconveniente do ensaio com nitrato como receptor de elétrons também foi encontrado, sendo detectada instabilidade nos valores de potencial redox do efluente.

Figura 6.36 – Valores de potencial redox (■) afluente e (□) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com excesso de sulfeto e desnitrificação via nitrito.

Sulfeto em concentração estequiométrica

A utilização de nitrito, na presente condição, ocorreu durante todo o período monitorado, havendo consumo completo deste receptor de elétrons a partir do décimo quinto dia (Figura 6.37). A formação de nitrato não foi detectada em nenhum momento. Comparativamente à desnitrificação via nitrato, nesta mesma condição, observou-se que o consumo de nitrito ocorreu com mais eficiência. Como já afirmado anteriormente, atribuiu-se este fato à maior reatividade do nitrito em relação ao nitrato, possibilitando melhor utilização daquele receptor por parte dos microrganismos.

Os valores de nitrogênio amoniacal mostraram-se estáveis ao longo dos dias de operação, excetuando-se o primeiro dia de análise (Figura 6.38). Na primeira medição da concentração de nitrogênio amoniacal, observou-se considerável aumento deste no efluente, atribuído a ocorrência de morte celular dos microrganismos heterotróficos, devido à ausência de fonte orgânica de carbono no meio reacional. De maneira geral, os resultados confirmaram a ocorrência da desnitrificação, uma vez que a RDNA não foi detectada.

Figura 6.37 – Valores de concentração de nitrito (▲) afluente e (Δ) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com sulfeto em concentração estequiométrica e desnitrificação via nitrito.

Figura 6.38 – Valores de concentração de nitrogênio amoniacal (■) afluente e (□) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com sulfeto em concentração estequiométrica e desnitrificação via nitrito.

O comportamento das formas de enxofre analisadas comprovou a ocorrência da desnitrificação autotrófica via nitrito, integrada à oxidação de sulfeto. Em todo o período analisado foi observado o consumo praticamente completo de sulfeto, conforme apresentado na Figura 6.39, sendo detectado um residual médio de $0,05 \pm 0,1$ mg S-SDT L⁻¹. Simultaneamente, constatou-se a formação de sulfato no efluente (Figura 6.40), a qual acompanhou, com proximidade, a oxidação de sulfeto durante o período de operação do reator. Em média, foram oxidados $16,8 \pm 1,6$ mg S-SDT L⁻¹ e produzidos $15,1 \pm 1,3$ mg S-

$\text{SO}_4^{-2} \text{ L}^{-1}$. Sendo assim, o balanço de massa do enxofre foi fechado com pequenas variações, como pode ser visualizado na Figura 6.41. A partir do dia 12, observou-se que, em alguns momentos, a formação de sulfato ficou abaixo do consumo de sulfeto medido. Além disso, em alguns dias, foi visualizada a formação de tênues camadas esbranquiçadas ao redor de algumas espumas, na parte inferior do reator, indicando pequena formação de enxofre elementar. Tais formações esbranquiçadas não eram permanentes, não sendo observadas constantemente durante o período de operação. Portanto, do mesmo modo que na desnitrificação via nitrato nesta condição, também houve pequena formação transitória de compostos intermediários de enxofre, como o enxofre elementar.

Diante deste contexto, inferiu-se que pequena parcela do nitrito foi desnitrificado heterotroficamente, via atividade endogênica, complementarmente à desnitrificação autotrófica. Tal inferência reside no fato de que o receptor de elétrons foi completamente consumido em praticamente todo o período, mesmo quando o sulfeto não foi totalmente oxidado a sulfato, ou seja, quando a formação de sulfato ficou abaixo do consumo medido de sulfeto. No entanto, o receptor e o doador de elétrons estavam em concentrações estequiométricas, e, portanto, os elétrons doados somente pelo sulfeto no processo de desnitrificação autotrófica seriam insuficientes se este doador não fosse oxidado completamente.

Figura 6.39 – Valores de concentração de sulfeto dissolvido total (●) afluente e (○) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com sulfeto em concentração estequiométrica e desnitrificação via nitrito.

Figura 6.40 – Valores de concentração de enxofre na forma de sulfato (▲) afluente e (Δ) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com sulfeto em concentração estequiométrica e desnitrificação via nitrito.

Figura 6.41 – Balanço de massa de enxofre, considerando: (●) consumo de sulfeto e (Δ) produção de sulfato, com sulfeto em concentração estequiométrica e desnitrificação via nitrito.

Mahmood *et al.* (2007b) observaram um comportamento diferente dos compostos de enxofre quando aplicada a relação molar N/S estequiométrica ($N/S = 2,7$). Os autores detectaram que a reação de oxidação a enxofre elementar foi predominante em reator de fluxo ascendente. No entanto, foram aplicadas concentrações muito maiores de sulfeto e nitrito, de até 1920 mg S L^{-1} e $2265,25 \text{ mg N L}^{-1}$, respectivamente. Nestes valores de concentração dos substratos, a toxicidade destes compostos à biomassa pode ter ocorrido, resultando no prevalecimento de diferentes rotas metabólicas.

Os valores de alcalinidade a bicarbonato apresentaram pequena variação em períodos pontuais intercalados entre o aumento e diminuição da concentração deste parâmetro (Figura 6.42), refletindo o uso de diferentes doadores de elétrons, isto é, das diferentes formas de enxofre. Como mostrado anteriormente, a desnitrificação autotrófica a partir do sulfeto gera alcalinidade, ao passo que este bioprocessos a partir de enxofre elementar consome a alcalinidade do meio. Portanto, o uso dos diferentes doadores de elétrons (sulfeto e enxofre elementar) impediu grandes alterações nos valores da alcalinidade. Além disso, como já foi relatado para a desnitrificação via nitrato nesta mesma condição, observou-se a formação transitória de tênues camadas esbranquiçadas ao redor de algumas espumas, que é

característico de enxofre elementar. Sendo assim, inferiu-se que, como já reportado para as outras condições com a presença do doador de elétrons e em ambas as vias de desnitrificação, a oxidação do sulfeto também estava ocorrendo em duas etapas, havendo a formação de enxofre elementar como intermediário, o qual estava sendo usado como doador de elétrons para a desnitrificação (oxidação a sulfato). A oxidação de sulfeto em duas etapas na desnitrificação autotrófica já foi reportada por outros autores (CERVANTES *et al.*, 2009; GADEKAR *et al.*, 2009; SOUZA, 2011). No entanto, vale ressaltar que, a oxidação do sulfeto em duas etapas não exclui a ocorrência concomitante da oxidação completa de sulfeto a sulfato no processo desnitrificante. Apenas foi detectada a formação e subsequente uso do enxofre elementar, mas a impossibilidade de medir as concentrações deste composto ao longo do tempo impede que a ocorrência exclusiva da oxidação em duas etapas seja considerada. Porém, frente aos resultados obtidos e discutidos, pode-se aferir que a oxidação do sulfeto no processo desnitrificante tendeu a ocorrer em duas etapas.

Figura 6.42 – Valores de alcalinidade a bicarbonato (■) afluente e (□) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com sulfeto em concentração estequiométrica e desnitrificação via nitrito.

Relativamente aos valores de pH, foi observado aumento deste parâmetro na saída do reator. Em média, durante todo o período de operação, foram medidos os valores de $8,6 \pm 0,1$ e $8,9 \pm 0,1$, no afluente e efluente, respectivamente.

Figura 6.43 – Valores de pH (■) afluente e (□) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com excesso de sulfeto e desnitrificação via nitrito.

Com relação ao potencial redox, foi observado aumento dos valores deste parâmetro na saída do reator, ao longo dos dias de operação (Figura 6.43). Igualmente aos outros ensaios com sulfeto, o aumento do potencial redox detectado no efluente ocorreu devido à oxidação do sulfeto no processo de desnitrificação autotrófica. Em ambas as vias de desnitrificação, o aumento do potencial redox para os ensaios com excesso de sulfeto foi menor comparativamente aos ensaios com sulfeto em concentração estequiométrica, uma vez que naqueles ensaios foi detectada maior concentração de sulfeto remanescente no efluente.

Figura 6.44 – Valores de potencial redox (■) afluente e (□) efluente, monitorados durante a operação do reator vertical com sulfeto em concentração estequiométrica e desnitrificação via nitrito.

Na Tabela 6.5, estão sumarizados os principais resultados obtidos nesta 1ª etapa, para a desnitrificação via nitrito, em termos de valores médios medidos para o afluente e para efluente, ou considerando consumo ou produção médios, após ser observada a estabilidade aparente do desempenho dos reatores. Para o ensaio na ausência de sulfeto, todo o período de operação foi considerado, já que o reator não apresentou estabilidade durante sua operação. Este fato explica o maior desvio-padrão para esta condição, com relação ao consumo de nitrito, quando comparada às outras condições com adição de sulfeto.

Tabela 6.5 – Resumo dos resultados obtidos nos ensaios da 1ª etapa, para a desnitrificação via nitrito, em termos de valores médios, após ser atingida a estabilidade aparente do processo.

Condição	^a ΔNO_2^- (%)	^a $\Delta\text{S-SDT}$ (mg S L ⁻¹)	^b ΔSO_4^{2-} (mg S L ⁻¹)	NH_4^+ (mg N L ⁻¹)		AB (mg CaCO ₃ L ⁻¹)		pH		Rota metabólica preferencial
				Af.	Ef.	Af.	Ef.	Af.	Ef.	
Ausência de sulfeto	^c 56,2 ± 9,1	n.a.	n.a.	5,3 ± 1,9	6,6 ± 2,0	488,5 ± 52,9	515,5 ± 58,9	8,2 ± 0,1	8,5 ± 0,1	^e Desn. heter./RDNA/ ANAMMOX
Estequiometria (N/S = 2,8)	^d 100,0 ± 1,0	16,8 ± 1,6	15,1 ± 1,3	5,2 ± 1,0	5,6 ± 1,1	501,0 ± 48,5	502,3 ± 22,1	8,6 ± 0,1	8,9 ± 0,1	Eqs. (4.14) e (4.15)
Excesso de sulfeto (N/S = 1,5)	^d 98,2 ± 3,2	21,3 ± 5,2	22,8 ± 6,6	5,7 ± 2,2	7,7 ± 2,7	545,2 ± 44,9	524,3 ± 47,3	8,7 ± 0,1	8,8 ± 0,1	Eq. (4.15)

n.a. = não se aplica; Af. = afluente; Ef. = efluente

^a Referente ao consumo de N-nitrito (em termos de eficiência de desnitrificação) e de S-sulfeto

^b Referente à produção de S-sulfato

^c Houve produção média de nitrato = $4,4 \pm 2,0$ mg N L⁻¹

^d Não houve geração de nitrato em nenhum momento

^e Desnitrificação heterotrófica via atividade endógena

6.1.2 Ensaios complementares – testes abióticos

A comprovação da ocorrência de reações bioquímicas no processo da desnitrificação autotrófica com emprego de sulfeto como doador de elétrons foi obtida por meio dos ensaios abióticos. Na Tabela 6.6, estão apresentados os resultados encontrados em tais ensaios, a qual contempla os parâmetros e as condições analisadas. Todos os parâmetros foram medidos em duplicata.

Os ensaios abióticos revelaram perda de parte do sulfeto solúvel no meio líquido medido no efluente. Entretanto, não houve formação de sulfato em nenhuma condição analisada. Portanto, parte do sulfeto adicionado no afluente foi oxidada quimicamente a compostos intermediários de enxofre, visto que, durante a coleta de amostras do efluente, o líquido ficava exposto à atmosfera ambiente. Este fato proporcionou o contato da amostra com o oxigênio do ar, o que ocasionou a oxidação química de sulfeto a compostos intermediários de enxofre. Porém, pode-se afirmar que estes compostos também foram utilizados na desnitrificação autotrófica, visto que, nos ensaios biológicos na ausência de sulfeto, este processo não ocorreu efetivamente. Além disso, existiram evidências de que os compostos intermediários de enxofre, como o enxofre elementar, forneceram elétrons para a redução dos compostos oxidados de nitrogênio.

A oxidação química do sulfeto acarretou, em alguns casos, pequena queda nos valores de alcalinidade a bicarbonato e aumento do potencial redox. Por outro lado, os outros compostos tiveram pouca ou nenhuma alteração, especialmente os compostos oxidados de nitrogênio, ou seja, os receptores de elétrons a serem utilizados. Não foi observada, em nenhum momento, a redução destes receptores de elétrons. Portanto, como as conversões biológicas envolveram todos os compostos analisados, o processo de desnitrificação

autotrófica com uso de sulfeto como doador de elétrons ocorreu predominantemente em função das atividades biológicas.

Tabela 6.6 – Efeito das atividades químicas na desnitrificação autotrófica, avaliadas sob as mesmas condições empregadas nos ensaios biológicos conduzidos nos reatores verticais de leito fixo.

Receptor de elétrons	Adição de espumas	Nº de amostras	AFLUENTE							
			pH	Potencial Redox (mV)	AB mg CaCO ₃ L ⁻¹	N-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	N-NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹)	S-SDT (mg L ⁻¹)	S-SO ₄ ⁻² (mg L ⁻¹)
Nitrato	Não	2	8,20 ± 0,02	264,5 ± 6,5	384,7 ± 6,9	21,2 ± 0,02	-	2,91 ± 0,00	-	-
	Não	2	8,78 ± 0,02	-271,2 ± 1,6	607,6 ± 1,6	21,3 ± 0,01	-	2,91 ± 0,00	26,3 ± 0,13	6,81 ± 0,48
	Sim	2	8,29 ± 0,08	236,2 ± 14,3	533,5 ± 25,1	22,0 ± 0,11	-	3,50 ± 0,08	-	-
	Sim	2	8,82 ± 0,06	-304,0 ± 6,8	541,5 ± 12,8	22,1 ± 0,26	-	3,33 ± 0,00	24,8 ± 0,35	6,66 ± 0,31
Nitrito	Não	2	8,22 ± 0,03	235,3 ± 8,4	463,4 ± 3,9	-	16,8 ± 1,74	2,87 ± 0,00	-	-
	Não	2	8,61 ± 0,01	-287,5 ± 7,7	494,9 ± 8,7	-	16,4 ± 2,25	2,87 ± 0,00	15,6 ± 0,92	6,63 ± 0,26
	Sim	2	8,34 ± 0,03	207,0 ± 6,9	684,8 ± 15,6	-	16,7 ± 1,89	2,83 ± 0,00	-	-
	Sim	2	8,63 ± 0,00	-301,2 ± 4,2	537,2 ± 2,6	-	16,8 ± 1,74	2,83 ± 0,00	15,7 ± 0,07	6,66 ± 0,31
Receptor de elétrons	Adição de espumas	Nº de amostras	EFLUENTE							
			pH	Potencial Redox (mV)	AB mg CaCO ₃ L ⁻¹	N-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	N-NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹)	S-SDT (mg L ⁻¹)	S-SO ₄ ⁻² (mg L ⁻¹)
Nitrato	Não	2	8,25 ± 0,01	237,3 ± 5,9	399,4 ± 5,2	21,0 ± 0,4	0,57 ± 0,47	2,83 ± 0,00	-	-
	Não	2	8,79 ± 0,00	-266,4 ± 2,1	546,9 ± 19,9	21,3 ± 0,3	0,21 ± 0,53	2,66 ± 0,00	12,3 ± 0,40	6,44 ± 0,04
	Sim	2	8,58 ± 0,11	120,2 ± 20,8	513,7 ± 7,7	21,6 ± 0,0	0,08 ± 0,00	3,42 ± 0,00	-	-
	Sim	2	8,75 ± 0,07	-286,7 ± 5,3	474,9 ± 11,1	22,9 ± 0,3	0,70 ± 0,00	3,33 ± 0,00	12,4 ± 0,32	10,3 ± 4,72
Nitrito	Não	2	8,21 ± 0,01	186,8 ± 7,2	388,6 ± 1,3	0,15 ± 0,0	16,7 ± 1,9	2,99 ± 0,00	-	-
	Não	2	8,81 ± 0,01	-269,5 ± 8,0	471,6 ± 8,7	1,27 ± 0,0	16,5 ± 2,0	2,70 ± 0,00	6,40 ± 0,14	6,48 ± 0,09
	Sim	2	8,48 ± 0,04	202,6 ± 15,1	600,9 ± 2,6	0,35 ± 0,0	17,5 ± 2,2	2,46 ± 0,00	-	-
	Sim	2	8,64 ± 0,03	-233,4 ± 20,8	505,3 ± 13,0	0,07 ± 0,0	16,4 ± 1,8	2,37 ± 0,00	4,68 ± 0,39	7,64 ± 1,48

6.1.3 Exames microscópicos

As microscopias ópticas de contraste de fase foram conduzidas ao final da operação dos reatores verticais de leito fixo, contemplando todas as condições analisadas. As avaliações morfológicas estão apresentadas a seguir, divididas segundo a adição ou não do doador de elétrons. As imagens expostas são representativas das duas vias de desnitrificação estudadas, visto que as morfologias observadas foram muito semelhantes.

6.1.3.1 Ausência de sulfeto

Os exames microscópicos revelaram a predominância de filamentos, morfologias semelhantes a *Methanosaeta*, esporos e cocos, além de algumas morfologias semelhantes a *Methanosarcinas*, tanto com uso de nitrato quanto nitrito como receptores de elétrons. Alguns bacilos dispersos também foram encontrados. Tais morfologias são características de comunidades heterotróficas, as quais são provenientes do lodo de inóculo utilizado. Hirasawa (2008) relatou as mesmas constatações em pesquisa que englobou a caracterização morfológica do lodo de inóculo proveniente de reator UASB tratando água residuária de abatedouro de aves (Avícola Dacar S/A – Tietê, SP), o qual corresponde ao mesmo lodo utilizado no presente trabalho. Algumas das morfologias estão apresentadas na Figura 6.45.

Figura 6.45 – Morfologias observadas sob microscopia óptica de contraste de fase, referentes aos experimentos nos quais não foi adicionado sulfeto. (a) Filamentos, (b) morfologias semelhantes a *Methanosaeta* e alguns bacilos dispersos, (c) morfologias semelhantes a *Methanosarcina*, (d) cocos e bacilos.

6.1.3.2 Adição de sulfeto

Nas duas condições analisadas, referentes à concentração do doador de elétrons, também foram encontrados, em menor intensidade que na ausência de sulfeto, alguns filamentos, esporos e morfologias semelhantes a *Methanosaeta*, remanescentes do lodo de inóculo. Além disso, as microscopias revelaram a presença de bacilos e coco-bacilos em maior intensidade. Considerando os resultados operacionais, a alta densidade de bacilos é indicativa de morfologia semelhante às bactérias autotróficas desnitrificantes que utilizam compostos reduzidos de enxofre, como a espécie *Thiobacillus denitrificans*. Entretanto, deve-

se ressaltar que, provavelmente, parte das formas bacilares é remanescente do lodo de inóculo, já que neste, tais morfologias estão presentes. Formações semelhantes a enxofre elementar também estavam presentes, sendo que havia maiores proporções nos ensaios em que foi aplicado excesso de sulfeto. Garbossa (2006) também constatou a presença de bacilos com possíveis incrustações de enxofre em pesquisa que avaliou a diversidade microbiana presente em RAAHLF, que recebia efluente sanitário de reator UASB, após o fornecimento de biogás (subseção 4.2.2.5). Algumas imagens estão apresentadas na Figura 6.46.

Figura 6.46 – Morfologias observadas sob microscopia óptica de contraste referente aos experimentos com adição de sulfeto. (a) Aglomerado de bacilos e coco-bacilos, (b) formações semelhantes à enxofre elementar, (c) bacilos dispersos, (d) alguns filamentos e bacilos.

6.2 EXPERIMENTOS DA 2ª ETAPA

6.2.1 Reatores diferenciais de leito fixo: ensaios cinéticos

Os ensaios cinéticos em reatores diferenciais de leito fixo compreenderam o ajuste de modelos e determinação de parâmetros cinéticos intrínsecos da remoção de nitrogênio, na forma de nitrato e nitrito, no processo de desnitrificação autotrófica com uso de sulfeto como doador de elétrons. A seguir, estão apresentados e discutidos os resultados encontrados, de acordo com a via de desnitrificação avaliada.

6.2.1.1 Desnitrificação via nitrato

Os perfis de concentração de nitrogênio em função do tempo, para cada velocidade superficial e para cada concentração do doador de elétrons utilizada, estão apresentados na Tabela 6.7 e na Figura 6.47, na qual também podem ser visualizadas as curvas ajustadas por meio da regressão polinomial. Os coeficientes de correlação (R^2) obtidos para as curvas ajustadas e as respectivas equações estão apresentadas na Tabela 6.8.

Tabela 6.7 – Concentração de nitrogênio na forma de nitrato no meio líquido (mg N L^{-1}) em função do tempo para diferentes velocidades superficiais e para diferentes concentrações do doador de elétrons.

Concentração de sulfeto (mg S-SDT L^{-1})	t (h)	v_s (cm s^{-1})				
		0,007	0,022	0,054	0,069	0,075
EXCESSO ($50,5 \pm 4,0$)	0	21,36	21,36	21,36	21,36	21,36
	2	21,58	21,02	19,25	17,10	16,14
	4	19,20	16,62	14,70	13,51	12,50
	6	15,23	13,55	10,15	9,72	8,72
	8	13,27	8,33	7,38	6,56	3,98
	10	9,10	5,08	3,69	2,92	2,30
ESTEQUIOMETRIA ($30,2 \pm 2,1$)	0	21,80	21,80	21,80	21,80	21,80
	2	21,26	20,78	21,13	18,95	21,10
	4	19,52	18,16	19,57	13,60	19,51
	6	18,58	16,30	18,20	7,82	17,75
	8	16,35	9,16	15,21	6,07	15,93
	10	14,16	6,39	14,01	2,89	13,81

Tabela 6.8 – Equações obtidas de concentração de nitrogênio na forma de nitrato no meio líquido ($\text{mg N-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$) em função do tempo para diferentes velocidades superficiais e para diferentes concentrações de sulfeto, e os respectivos coeficientes de correlação (R^2).

Concentração de sulfeto (mg S-SDT L^{-1})	v_s (cm s^{-1})	C_N ($\text{mg N-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$)	R^2
EXCESSO ($50,5 \pm 4,0$)	0,007	$-0,090x^2 - 0,383x + 21,86$	0,981
	0,022	$-0,079x^2 - 0,953x + 22,10$	0,985
	0,054	$-0,003x^2 - 1,799x + 21,88$	0,991
	0,069	$0,021x^2 - 2,038x + 21,26$	0,999
	0,075	$0,059x^2 - 2,530x + 21,30$	0,992
ESTEQUIOMETRIA ($30,2 \pm 2,1$)	0,007	$-0,045x^2 - 0,314x + 21,85$	0,994
	0,022	$-0,119x^2 - 0,427x + 21,96$	0,975
	0,054	$-0,037x^2 - 0,458x + 21,97$	0,983
	0,069	$-0,057x^2 - 2,555x + 22,54$	0,983
	0,075	$-0,035x^2 - 0,460x + 21,93$	0,998

Figura 6.47 – Concentrações de nitrogênio na forma de nitrato obtidos para v_s de (♦) 0,007, (■) 0,022, (▲) 0,054, (●) 0,069, (⋈) e 0,075 cm s⁻¹ e as respectivas curvas ajustadas por meio da regressão polinomial: (a) concentração de sulfeto em excesso; (b) concentração estequiométrica de sulfeto relativamente ao nitrato.

Na Tabela 6.9 estão expostas as equações de velocidade específica de utilização do substrato observada (r_{obs}) para cada v_s empregada, e as respectivas concentrações de biomassa determinadas em cada reator diferencial, de acordo com as concentrações de sulfeto aplicadas.

Tabela 6.9 – Equações de velocidade específica de utilização de nitrogênio na forma de nitrato (r_{obs}) para cada v_s e as respectivas concentrações de biomassa, de acordo com a concentração de sulfeto utilizada.

Concentração de sulfeto (mg S-SDT L ⁻¹)	v_s (cm s ⁻¹)	g SSV L ⁻¹	r_{obs} (mg N g SSV ⁻¹ h ⁻¹)
EXCESSO (50,5 ± 4,0)	0,007	0,424	0,027 + 0,013x
	0,022	0,516	0,055 + 0,009x
	0,054	0,430	0,125 + 0,0004x
	0,069	0,407	0,150 - 0,003x
	0,075	0,523	0,146 - 0,010x
ESTEQUIOMETRIA (30,2 ± 2,1)	0,007	0,507	0,619 + 0,178x
	0,022	0,855	0,499 + 0,278x
	0,054	0,606	0,757 + 0,122x
	0,069	1,296	1,971 + 0,088x
	0,075	0,635	0,724 + 0,11x

Na Figura 6.48 encontram-se os perfis de velocidade específica inicial de utilização de substrato observada ($r_{obs}|_{t=0}$) em função de v_s . Na análise dos dados para a condição em que foi aplicado excesso de sulfeto, observou-se que, para $v_s \geq 0,069 \text{ cm s}^{-1}$, $r_{obs}|_{t=0}$ se manteve constante. Sob esta condição, a resistência externa à transferência de massa não foi significativa, ou seja, a camada de líquido estagnada ao redor das biopartículas foi minimizada. Para confirmar este fato, o parâmetro adimensional Bi calculado para v_s de 0,069 e 0,075 cm s^{-1} foi superior a 100 (BAILEY E OLLIS, 1986), correspondendo a 139,4 e 158,5, respectivamente, satisfazendo a condição de resistência externa à transferência de massa desprezível. Os valores de Bi foram calculados de acordo com a equação (4.18). O valor de k_s foi estimado utilizando-se a relação proposta para leito de espuma de poliuretano com R_p de 0,31cm e porosidade do leito de 0,4 para baixas v_s (Zaiat *et al.* 1996), segundo a equação (6.2).

$$k_s = \frac{-0,244 + 0,271 \exp(1,796 \cdot v_s)}{a_s} \quad (6.2)$$

Nesta expressão, a_s é a área interfacial para transferência de massa, e foi determinada de acordo com a equação (6.3) (Zaiat *et al.* 1996).

$$a_s = \frac{n \cdot A_p}{V_L} \quad (6.3)$$

Em que:

V_L = volume do líquido interfacial

A_p = área da biopartícula, considerando uma esfera equivalente

n = número de biopartículas no reator diferencial

Figura 6.48 – Perfis de velocidade específica inicial observada de utilização de nitrogênio na forma de nitrato em função de v_s : (a) concentração de sulfeto em excesso; (b) concentração estequiométrica de sulfeto.

A mesma análise de dados foi conduzida para a condição com concentração estequiométrica de sulfeto relativamente ao nitrato. Para esta análise, o ponto em que $v_s = 0,069 \text{ cm s}^{-1}$ foi desconsiderado, por ser muito discrepante em relação aos outros valores. Vale ressaltar que, neste ponto, a concentração de biomassa (g SSV L^{-1}) foi muito superior quando comparada às outras condições, como apresentado na Tabela 6.9. Como consequência, um alto valor de $r_{obs}|_{t=0}$ foi observado. Considerando a análise para os outros pontos, não foi possível observar a partir de qual valor de v_s a resistência externa à transferência de massa passou a ser desprezível, ou seja, quando $r_{obs}|_{t=0}$ se manteve constante, visto que tais valores ficaram bem próximos. Sendo assim, foram calculados os valores de Bi para todas v_s . Os valores de Bi para v_s de $0,007 \text{ cm s}^{-1}$, $0,022 \text{ cm s}^{-1}$, $0,054 \text{ cm s}^{-1}$ e $0,75 \text{ cm s}^{-1}$ corresponderam a 76,85; 91,91; 110,1 e 152,4, respectivamente. Finalmente, constatou-se que a resistência externa à transferência de massa pôde ser considerada desprezível para v_s de $0,054 \text{ cm s}^{-1}$ e $0,75 \text{ cm s}^{-1}$.

Para os ensaios nos quais houve minimização da resistência externa à transferência de massa, foram avaliados os efeitos da resistência interna à transferência de massa, por meio do parâmetro adimensional ϕ_{obs} . Os valores obtidos revelaram a ausência da limitação intraparticular à transferência de massa, sendo muito inferiores a 0,3 (BRINGI E DALE, 1990). Para a condição com sulfeto em excesso, tais valores corresponderam a 0,012 e 0,014

para v_s de 0,069 e 0,075 cm s^{-1} , respectivamente. Para a condição seguinte, os valores de ϕ_{obs} foram equivalentes a 0,003 para as v_s de 0,054 cm s^{-1} e 0,075 cm s^{-1} .

Logo, nos ensaios com aplicação de sulfeto em excesso, resistências externa e interna à transferência de massa não significativas foram estabelecidas para v_s de 0,069 e 0,075 cm s^{-1} . Nos ensaios em que se utilizou sulfeto em concentração estequiométrica com relação ao nitrato, esta condição foi estabelecida para v_s de 0,054 e 0,075 cm s^{-1} . Desse modo, os modelos e parâmetros cinéticos intrínsecos foram determinados para estas condições, envolvendo apenas os perfis temporais referentes às velocidades superficiais supracitadas.

Na Figura 6.49 estão apresentadas as curvas ajustadas aos pontos experimentais, correspondentes ao modelo de ordem $\frac{1}{2}$, para ambas as condições analisadas relativamente ao doador de elétrons. Para cada curva ajustada, foram estimados os parâmetros cinéticos intrínsecos de ordem $\frac{1}{2}$, e os respectivos coeficientes de correlação (R^2). Tais parâmetros estão apresentados na Tabela 6.10. Vale ressaltar que, por meio do método integral, outros modelos cinéticos também foram avaliados (modelo de primeira ordem e reação de Monod), sendo ajustados aos dados experimentais. No entanto, os respectivos valores dos coeficientes de correlação foram inferiores aos obtidos para o modelo de ordem $\frac{1}{2}$. Portanto, optou-se pelo modelo cinético de ordem $\frac{1}{2}$, sendo que os ajustes dos outros modelos cinéticos testados não serão apresentados. Este comentário aplica-se a todas as condições experimentais dos ensaios da 2ª etapa.

Figura 6.49 – Curvas ajustadas aos pontos experimentais para equação cinética de ordem $\frac{1}{2}$, referentes à remoção de nitrogênio na forma de nitrato ao longo do tempo, para v_s de (■) 0,054 cm s^{-1} e (▲) 0,075 cm s^{-1} : (a) concentração de sulfeto em excesso; (b) concentração estequiométrica de sulfeto relativa ao nitrato.

Tabela 6.10 – Parâmetros cinéticos intrínsecos de ordem $\frac{1}{2}$, com os respectivos coeficientes de correlação (R^2), obtidos para cada v_s empregado, referentes à remoção de nitrogênio na forma de nitrato, de acordo com a concentração de sulfeto utilizada.

Concentração de sulfeto (mg S-SDT L ⁻¹)	v_s (cm s ⁻¹)	$k_{(1/2)}$ (mg N ^{1/2} L ^{-1/2} h ^{-1/2})	r_{obs} (mg N g SSV ⁻¹ h ⁻¹)	R^2
EXCESSO (50,5 ± 4,0)	0,069	0,537 ± 0,026	6,155	0,993
	0,075	0,609 ± 0,031	5,417	0,992
ESTEQUIOMETRIA (30,2 ± 2,1)	0,054	0,192 ± 0,016	1,505	0,958
	0,075	0,190 ± 0,020	1,418	0,973

Considerando a média dos parâmetros cinéticos intrínsecos, na condição em que se aplicou excesso de sulfeto, os valores de $k_{(1/2)}$ e de r_{obs} foram equivalentes a $0,53 \pm 0,05$ mg N^{1/2} L^{-1/2} h⁻¹ e $5,79 \pm 0,52$ mg N g SSV⁻¹ h⁻¹, respectivamente. Na condição em que as concentrações de sulfeto e nitrato estavam em proporção estequiométrica, os valores médios de $k_{(1/2)}$ e de r_{obs} foram equivalentes a $0,19 \pm 0,00$ mg N^{1/2} L^{-1/2} h⁻¹ e $1,46 \pm 0,06$ mg N g SSV⁻¹ h⁻¹.

A diferença entre os valores dos parâmetros cinéticos intrínsecos, de acordo com a concentração de sulfeto aplicada, foi atribuída à utilização de diferentes formas de enxofre como doadores de elétrons na desnitrificação autotrófica. Na condição em que foi aplicada concentração em excesso de sulfeto relativa ao nitrato, foi observado que a formação de sulfato não acompanhou a oxidação de sulfeto. Por outro lado, o balanço de massa dos compostos de enxofre foi mais próximo do esperado, para a condição em que foram aplicadas concentrações estequiométricas do doador e receptor de elétrons, mas houve períodos nos quais a baixa formação de compostos intermediários de enxofre foi seguida pelo subsequente consumo (Tabela 6.11). Desse modo, os elétrons doados para a desnitrificação também foram provenientes de compostos intermediários de enxofre, como o enxofre elementar (oxidação em duas etapas). Adicionalmente, a formação de uma camada esbranquiçada depositada em algumas matrizes de espuma foi observada, o que é característico da deposição de enxofre elementar. De acordo com Koenig e Liu (2001), o fator limitante para a desnitrificação com uso de enxofre elementar é a baixa solubilidade deste composto em água à temperatura ambiente. Este doador só seria utilizado pelos microrganismos após a solubilização e difusão

na biomassa. Consequentemente, a velocidade das reações bioquímicas da desnitrificação autotrófica seria afetada.

Tabela 6.11 – Balanço de massa dos compostos de enxofre para os perfis temporais do ensaio de desnitrificação autotrófica via nitrato com sulfeto aplicado em excesso e em concentração estequiométrica.

Concentração de sulfeto (mg S-SDT L ⁻¹)	Tempo (h)	v_s (cm s ⁻¹)					
		0,054 (a) / 0,069 (b)			0,075		
		S-SDT (mg L ⁻¹)	S-SO ₄ ⁻² (mg L ⁻¹)	Interm.* (mg L ⁻¹)	S-SDT (mg L ⁻¹)	S-SO ₄ ⁻² (mg L ⁻¹)	Interm.* (mg L ⁻¹)
EXCESSO (a) (50,5 ± 4,0)	0	54,30	0,00	0,00	50,47	0,00	0,00
	2	37,27	13,46	3,57	38,88	12,74	0,00
	4	22,97	15,76	15,57	29,88	11,88	8,71
	6	16,80	18,63	18,87	18,81	20,64	11,02
	8	8,05	19,49	26,76	15,00	22,07	13,40
	10	5,29	23,22	25,79	10,00	22,50	17,97
ESTEQUIOMETRIA (b) (30,2 ± 2,1)	0	26,10	0,00	0,00	30,65	0,00	0,00
	2	21,20	9,01	0,00	23,30	9,01	0,00
	4	16,75	10,73	0,00	17,85	12,74	0,06
	6	12,80	11,16	2,14	12,95	15,76	1,94
	8	9,00	13,17	3,93	9,80	16,04	4,81
	10	5,90	17,60	2,60	6,25	20,49	3,91

*Compostos de enxofre em estados de oxidação intermediários.

Portanto, inferiu-se que a utilização de enxofre elementar como doador de elétrons, no ensaio com concentrações estequiométricas de sulfeto e nitrato, ocasionou o baixo valor dos parâmetros cinéticos intrínsecos em comparação à condição com excesso de sulfeto. Nesta última condição, detectou-se maior formação de compostos intermediários de enxofre, por meio do balanço de massa deste composto. Em média, foram formados $21,9 \pm 5,5$ mg S L⁻¹ de intermediários, o que representa cerca de 50% do sulfeto oxidado. Sendo assim, parte considerável dos elétrons doados foi proveniente da oxidação parcial do sulfeto, havendo maior formação de compostos intermediários de enxofre. Teoricamente, o consumo de sulfeto em torno de 55%, com oxidação completa a sulfato, ou seja, sem acúmulo de intermediários de enxofre, seria suficiente para a desnitrificação completa do nitrato. No entanto, o consumo

medido de sulfeto ficou entre 80% e 90%. Visto que o sulfeto é mais biodisponível aos microrganismos comparativamente ao enxofre elementar, a velocidade de desnitrificação autotrófica a partir da oxidação do sulfeto deve ser maior do que a partir da oxidação do enxofre elementar.

Diante do exposto, concluiu-se que a relação molar N/S influencia a formação dos produtos finais provenientes da oxidação do sulfeto, como também foi constatado nos experimentos da 1ª etapa. Quando a relação molar N/S é menor que a relação estequiométrica (1,6), o que implica em excesso de sulfeto, a maior parte dos elétrons doados para a desnitrificação deve ser proveniente da oxidação parcial do sulfeto, havendo maior formação de compostos intermediários de enxofre. Quando a relação molar N/S se aproxima da estequiometria, grande parte dos elétrons também deve ser doada pelos compostos intermediários de enxofre, visto que a oxidação do sulfeto na desnitrificação autotrófica ocorre em duas etapas. Neste caso, praticamente todos os compostos intermediários de enxofre formados devem ser oxidados a sulfato para que a desnitrificação completa ocorra, uma vez que não há excesso de doadores de elétrons.

Os valores da constante cinética de ordem $\frac{1}{2}$ encontrados na presente pesquisa são comparáveis aos valores reportados na literatura. Koenig e Liu (2001) e Moon *et al.* (2006) obtiveram constantes cinéticas de ordem $\frac{1}{2}$ em reatores desnitrificantes autotróficos com células imobilizadas em grânulos de enxofre elementar iguais a $3,15 \text{ mg N}^{1/2} \text{ L}^{-1/2} \text{ h}^{-1}$ e $0,104 \text{ mg N}^{1/2} \text{ L}^{-1/2} \text{ h}^{-1}$, quando o tamanho das partícula de enxofre variou entre 2,8 – 5,6 mm e 2 – 5 mm, respectivamente. Em ambas as pesquisas, quando o tamanho da partícula aumentou, as constantes cinéticas de ordem $\frac{1}{2}$ decresceram. Koenig e Liu (2001) reportaram valores médios de $1,59 \text{ mg N}^{1/2} \text{ L}^{-1/2} \text{ h}^{-1}$ (tamanhos de partícula entre 5,6 – 11,2 mm) e $1,21 \text{ mg N}^{1/2} \text{ L}^{-1/2} \text{ h}^{-1}$ (tamanhos de partícula entre 11,2 – 16 mm), enquanto Moon *et al.* (2006) encontraram o valor de $0,028 \text{ mg N}^{1/2} \text{ L}^{-1/2} \text{ h}^{-1}$ para tamanhos de partículas maiores que 5 mm. Nestas condições, a resistência interna à transferência de massa provavelmente afetou as reações bioquímicas, visto que quanto maior o tamanho da partícula, maior é a dificuldade em se minimizar a resistência intraparticular. Portanto, menores valores da constante foram obtidos. Moon *et al.*

(2004) também reportaram diferentes valores da constante, variando de 1,90 a 2,18 mg N^{1/2} L^{-1/2} h⁻¹, quando reatores de coluna preenchidos com grânulos de enxofre de 2 mm de diâmetro foram empregados.

Com relação aos valores de velocidade específica de consumo de nitrogênio obtidos, os mesmos foram inferiores ao encontrado por Beristain-Cardoso *et al.* (2006), quando aplicadas concentrações estequiométricas de sulfeto e nitrato. Os autores supracitados relataram o valor de 2,10 mg N g SSV⁻¹ h⁻¹ em ensaios cinéticos operados em batelada. A biomassa utilizada era suspensa, previamente enriquecida em reator UASB de 2 L, o qual foi inoculado com lodo metanogênico proveniente de indústria de papel, e alimentado com tiosulfato e nitrato a altas concentrações.

Jing *et al.* (2009) obtiveram modelo cinético de ordem zero para a desnitrificação autotrófica integrada à oxidação de sulfeto, em reator UASB, após submetê-lo a cargas de choque. Foram adicionadas altas concentrações de nitrato e de sulfeto em excesso, resultando em relações molares N/S inferiores à estequiometria. A máxima velocidade de remoção de nitrogênio encontrada correspondeu a 0,011 mg N g SSV⁻¹ h⁻¹. Os autores ressaltaram a possível toxicidade do sulfeto à comunidade microbiana durante o período de aplicação de cargas de choque de sulfeto, causando inibição do processo. Reyes-Avila *et al.* (2004) obtiveram velocidade específica de remoção de nitrato, com aplicação de sulfeto como doador de elétrons, em torno de 16 mg N g SSV⁻¹ h⁻¹, utilizando reator em batelada contendo biomassa suspensa, proveniente de reator desnitrificante heterotrófico adaptado à desnitrificação autotrófica por meio da aplicação contínua de sulfeto. A relação molar N/S mantida foi equivalente à estequiométrica. Manconi *et al.* (2007) relataram velocidade de remoção de nitrato de 24 mg N g SSV⁻¹ h⁻¹ em reator de mistura completa, empregando tiosulfato como doador de elétrons. A biomassa foi previamente adaptada à desnitrificação autotrófica por meio da adição de sulfeto em excesso. O inóculo utilizado era proveniente do sistema de lodos ativados tratando águas residuárias municipais, enriquecido com culturas puras de *T. denitrificans*. O enriquecimento foi realizado de forma que as culturas puras fossem imobilizadas no interior dos flocos do lodo ativado.

Observou-se que as velocidades médias de utilização de nitrato e as constantes cinéticas de ordem $\frac{1}{2}$, encontradas no presente trabalho, localizaram-se em faixa intermediária relativamente aos valores relatados na literatura. A grande variabilidade de tais valores pode ser atribuída a diversos fatores, como as diferentes configurações dos reatores, a forma e o tempo de enriquecimento da biomassa, a origem do lodo de inóculo utilizado, as condições operacionais a que foram submetidos os ensaios, e a composição da água residuária a ser tratada. Quaisquer alterações nestes fatores influenciam diferentemente o metabolismo da comunidade microbiana, estando, o desempenho dos reatores, sujeito à ação desses microrganismos.

Por fim, frente aos resultados obtidos, o modelo cinético de ordem $\frac{1}{2}$ pôde ser utilizado para descrever o processo intrínseco da desnitrificação autotrófica acoplada à oxidação de sulfeto em reatores de leito fixo.

6.2.1.2 Desnitrificação via nitrito

Na Tabela 6.12, estão apresentados os perfis de concentração de nitrogênio em função do tempo para cada velocidade superficial, de acordo com a concentração de sulfeto utilizada. Aos pontos experimentais obtidos, foram ajustadas curvas por meio da regressão polinomial (Figura 6.50). Os coeficientes de correlação (R^2) obtidos para as curvas ajustadas e as respectivas equações estão apresentadas na Tabela 6.13.

Tabela 6.12 – Concentração de nitrogênio na forma de nitrito no meio líquido (mg N-NO₂ L⁻¹) em função do tempo para diferentes velocidades superficiais e para diferentes concentrações do doador de elétrons.

Concentração de sulfeto (mg S-SDT L ⁻¹)	Tempo (h)	v_s (cm s ⁻¹)				
		0,007	0,022	0,054	0,069	0,075
EXCESSO (29,5 ± 2,0)	0	19,23	19,23	19,23	19,23	19,23
	2	16,61	15,52	14,42	14,05	12,58
	4	15,04	14,49	14,03	10,66	11,38
	6	12,24	13,01	10,77	8,16	7,76
	8	9,74	11,54	10,42	6,27	2,30
	10	8,97	10,37	8,67	3,27	1,13
ESTEQUIOMETRIA (19,8 ± 2,1)	0	22,82	22,82	22,82	22,82	22,82
	2	20,80	20,34	20,24	17,92	17,27
	4	20,78	19,31	18,92	14,34	12,40
	6	19,67	18,79	14,95	11,24	8,46
	8	17,22	15,31	14,93	9,93	5,19
	10	12,45	10,44	14,52	6,78	1,06

Tabela 6.13 – Equações obtidas de concentração de nitrogênio na forma de nitrito no meio líquido (mg N-NO₂ L⁻¹) em função do tempo para diferentes velocidades superficiais e para diferentes concentrações de sulfeto, e os respectivos coeficientes de correlação (R²).

Concentração de sulfeto (mg S-SDT L ⁻¹)	v_s (cm s ⁻¹)	C_N (mg N-NO ₃ L ⁻¹)	R ²
EXCESSO (29,5 ± 2,0)	0,007	$0,024x^2 - 1,315x + 19,30$	0,988
	0,022	$0,048x^2 - 1,312x + 18,80$	0,966
	0,054	$0,069x^2 - 1,661x + 18,71$	0,956
	0,069	$0,075x^2 - 2,263x + 18,82$	0,962
	0,075	$0,046x^2 - 2,248x + 18,61$	0,969
ESTEQUIOMETRIA (19,8 ± 2,1)	0,007	$-0,104x^2 + 0,138x + 22,10$	0,956
	0,022	$-0,097x^2 - 0,134x + 22,07$	0,959
	0,054	$0,071x^2 - 1,590x + 23,06$	0,956
	0,069	$0,123x^2 - 2,629x + 22,45$	0,984
	0,075	$0,124x^2 - 3,164x + 22,95$	0,999

Figura 6.50 – Concentrações de nitrogênio na forma de nitrito obtidas para v_s de (♦) 0,007, (■) 0,022, (▲) 0,054, (●) 0,069, (✕) e 0,075 cm s^{-1} e as respectivas curvas ajustadas por meio da regressão polinomial.

Na Tabela 6.14, estão expostas as equações de velocidade específica de utilização do substrato observada (r_{obs}) para cada v_s empregada, e as respectivas concentrações de biomassa determinadas em cada reator diferencial, para ambas as concentrações de sulfeto analisadas.

Tabela 6.14 – Equações de velocidade específica de utilização de nitrogênio na forma de nitrito (r_{obs}) para cada v_s e as respectivas concentrações de biomassa, de acordo com a concentração de sulfeto utilizada.

Concentração de sulfeto (mg S-SDT L^{-1})	v_s (cm s^{-1})	g SSV L^{-1}	r_{obs} (mg N g SSV $^{-1}$ h $^{-1}$)
EXCESSO (29,5 ± 2,0)	0,007	0,872	0,045 - 0,002x
	0,022	0,789	0,048 - 0,004x
	0,054	0,858	0,063 - 0,005x
	0,069	0,764	0,109 - 0,014x
	0,075	0,707	0,086 - 0,004x
ESTEQUIOMETRIA (19,8 ± 2,1)	0,007	0,620	-
	0,022	0,713	0,188 + 0,272x
	0,054	0,803	1,981 - 0,177x
	0,069	0,542	3,595 - 0,336x
	0,075	0,598	6,075 - 0,476x

Na Figura 6.51 encontram-se os perfis de velocidade específica inicial de utilização de substrato observada ($r_{obs}|_{t=0}$) ao longo de v_s . Na primeira condição analisada, na qual se

aplicou concentração de sulfeto em excesso, para $v_s \geq 0,069 \text{ cm.s}^{-1}$, $r_{obs}|_{t=0}$ ainda apresentou tendência de crescimento, mas os valores se mantiveram próximos. Desse modo, inferiu-se que a partir de $v_s \geq 0,069 \text{ cm.s}^{-1}$, a camada de líquido estagnada ao redor das biopartículas foi minimizada, e, conseqüentemente, a resistência externa à transferência de massa foi considerada desprezível. Para verificar esta suposição, o parâmetro adimensional Bi foi calculado para esta condição, da mesma forma descrita no item 6.2.1.1. Os valores encontrados para v_s de 0,069 e 0,075 cm s^{-1} corresponderam a 128,69 e 165,14, respectivamente, satisfazendo a condição de resistência externa à transferência de massa desprezível. Analogamente, para a condição de concentração estequiométrica de sulfeto relativamente ao nitrito, foi observado que $r_{obs}|_{t=0}$ se manteve praticamente constante para $v_s \geq 0,069 \text{ cm s}^{-1}$, e, assim, a resistência externa à transferência de massa não seria significativa. Os valores de Bi para v_s de 0,069 cm s^{-1} e 0,75 cm s^{-1} confirmaram este fato, correspondendo a 128,7 e 155,4, respectivamente.

Figura 6.51 – Perfil de velocidade específica inicial observada de utilização de nitrogênio na forma de nitrito em função de v_s : (a) concentração de sulfeto em excesso; (b) concentração estequiométrica de sulfeto.

A avaliação dos efeitos da resistência interna à transferência de massa foi realizada para os ensaios submetidos à ausência da limitação externa à transferência de massa. Os valores calculados para o parâmetro adimensional ϕ_{obs} revelaram a ausência da limitação intraparticular à transferência de massa, sendo muito inferiores a 0,3. Para a condição de

concentração de sulfeto em excesso, tais valores corresponderam a 0,011 para v_s de 0,069 e 0,075 cm s^{-1} . Para a condição de concentração estequiométrica de sulfeto e nitrito, os valores de ϕ_{obs} corresponderam a 0,012 e 0,014 para as mesmas v_s supracitadas, respectivamente.

Logo, para v_s de 0,069 e 0,075 cm s^{-1} , as resistências externa e interna à transferência de massa foram desprezíveis, para ambas as concentrações do doador de elétrons aplicadas. Desse modo, os parâmetros cinéticos intrínsecos foram determinados para estas condições, envolvendo apenas os perfis temporais das velocidades superficiais supracitadas.

Na Figura 6.52, estão apresentadas as curvas ajustadas aos pontos experimentais, correspondentes aos modelos de ordem $\frac{1}{2}$, considerando as duas concentrações de sulfeto utilizadas. Para cada curva ajustada, foram estimados os parâmetros cinéticos intrínsecos de ordem $\frac{1}{2}$, e os respectivos coeficientes de correlação (R^2). Tais parâmetros estão apresentados na Tabela 6.15.

Figura 6.52– Curvas ajustadas aos pontos experimentais para equação cinética de ordem $\frac{1}{2}$, referentes à remoção de nitrogênio na forma de nitrito ao longo do tempo, para v_s de (♦) 0,069 cm s^{-1} e (■) 0,075 cm s^{-1} : (a) concentração de sulfeto em excesso; (b) concentração estequiométrica de sulfeto relativa ao nitrito.

Tabela 6.15 – Parâmetros cinéticos intrínsecos de ordem $\frac{1}{2}$, com os respectivos coeficientes de correlação (R^2), obtidos para cada v_s empregado, referentes à remoção de nitrogênio na forma de nitrato, de acordo com a concentração de sulfeto utilizada.

Concentração de sulfeto (mg S-SDT L ⁻¹)	v_s (cm s ⁻¹)	$k_{(1/2)}$ (mg N ^{1/2} L ^{-1/2} h ^{-1/2})	r_{obs} (mg N g SSV ⁻¹ h ⁻¹)	R^2
EXCESSO (29,5 ± 2,0)	0,069	0,492 ± 0,026	2,797	0,991
	0,075	0,612 ± 0,072	3,776	0,963
ESTEQUIOMETRIA (19,8 ± 2,1)	0,069	0,425 ± 0,024	3,707	0,988
	0,075	0,658 ± 0,031	5,284	0,994

Considerando este modelo, os valores de $k_{(1/2)}$ para ambas as concentrações de sulfeto ficaram próximas, variando entre 0,425 e 0,657 mg N^{1/2} L^{-1/2} h⁻¹. Neste caso, não se detectou o consumo de intermediários de enxofre durante os perfis temporais. Portanto, a maior parte dos elétrons utilizados para a redução do nitrito foi doada diretamente pelo sulfeto em ambas as condições analisadas. Na Tabela 6.16 pode ser visualizado o balanço de massa de enxofre para a condição de sulfeto em excesso e de concentração estequiométrica de sulfeto e nitrito. Durante todo o perfil das duas condições em análise, apenas a geração de intermediários de enxofre foi detectada, e a formação de sulfato se aproximou da concentração de sulfeto oxidado por meio da desnitrificação do receptor de elétrons. Sendo assim, no ensaio cinético de desnitrificação via nitrito, os elétrons doados foram majoritariamente provenientes da oxidação do sulfeto, independentemente da concentração deste doador. Consequentemente, os valores dos parâmetros cinéticos intrínsecos ficaram próximos, uma vez que grande parte dos elétrons foi doada pela mesma forma de enxofre – sulfeto – nas duas condições analisadas.

Tabela 6.16 – Balanço de massa dos compostos de enxofre para o perfil temporal do ensaio de desnitrificação autotrófica via nitrito com sulfeto aplicado em excesso e em concentração estequiométrica.

Concentração de sulfeto (mg S-SDT L ⁻¹)	Tempo (h)	v_s (cm s ⁻¹)					
		0,069			0,075		
		S-SDT (mg L ⁻¹)	S-SO ₄ ⁻² (mg L ⁻¹)	Interm.* (mg L ⁻¹)	S-SDT (mg L ⁻¹)	S-SO ₄ ⁻² (mg L ⁻¹)	Interm.* (mg L ⁻¹)
EXCESSO (29,5 ± 2,0)	0	28,13	0,00	0,00	30,94	0,00	0,00
	2	23,19	11,88	0,00	22,63	9,15	0,00
	4	15,06	13,17	0,00	15,69	10,45	4,80
	6	7,40	14,03	6,69	13,75	12,03	5,16
	8	1,75	16,47	9,90	7,05	16,33	7,56
	10	0,59	17,48	10,06	4,55	17,34	9,05
ESTEQUIOMETRIA (19,8 ± 2,1)	0	21,25	0,00	0,00	18,35	0,00	0,00
	2	14,05	9,59	0,00	11,53	11,09	0,00
	4	12,05	10,09	0,00	8,73	11,88	0,00
	6	9,48	11,24	0,54	5,20	12,96	0,19
	8	6,13	13,89	1,23	2,78	14,32	1,25
	10	4,85	13,53	2,87	1,05	14,32	2,98

*Compostos de enxofre em estados de oxidação intermediários.

Comparativamente à desnitrificação via nitrato, considerando o ensaio cinético em que a mesma forma de enxofre foi majoritariamente utilizada como doador de elétrons, cuja condição corresponde ao excesso de sulfeto na desnitrificação via nitrato, observou-se que o valor máximo da velocidade específica de consumo de nitrogênio na desnitrificação via nitrito foi ligeiramente inferior. Cervantes *et al.* (2009) também verificaram velocidades de desnitrificação via nitrito inferiores a via nitrato (0,25 a 0,36 mg N g SSV⁻¹ h⁻¹), evidenciando que a redução de nitrito consistiu na etapa limitante do processo de desnitrificação autotrófica integrada a oxidação de sulfeto. De acordo com os autores, foi constatado efeito inibitório do sulfeto sobre a redução de nitrito, em função da precipitação de elementos traços, os quais são essenciais para a atividade das nitrito redutases.

O mecanismo de precipitação de metais por sulfetos pode ser descrito, de forma simplificada, de acordo com a equação (6.4). A intensidade da precipitação depende

diretamente da concentração de íons S^{2-} , cuja variação está sujeita aos valores de pH (LENS *et al.*, 1998).

Na presente pesquisa, os valores de pH medidos corresponderam em média a 8,8 – 8,9, faixa na qual a concentração de íons S^{2-} está próxima de 20%, relativamente ao equilíbrio das formas de sulfeto. Portanto, alguma precipitação de metais traços essenciais ao metabolismo bacteriano pode ter ocorrido. Sendo assim, as velocidades mais baixas alcançadas para a desnitrificação autotrófica via nitrito em comparação com nitrato foram provavelmente devido a alguma interação do sulfeto com metais traço, como o cobre, o que pode ter prejudicado a ação das nitrito redutases (CERVANTES *et al.*, 2009). No entanto, para a desnitrificação via nitrato, o acúmulo de nitrito observado foi baixo ($< 3 \text{ mg N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$), fato que indica que as nitrito redutases não foram tão afetados neste caso. Diferentes tipos destas enzimas podem catalisar a etapa de redução de nitrito, com diferentes características estruturais e funcionais, dependendo da espécie de microrganismos envolvidos (GODDEN *et al.*, 1991; WEEG-AESSENNERS *et al.*, 1991; RICHARDSON E WATMOUGH, 1999). A possibilidade de diferentes espécies atuando na desnitrificação via nitrato e nitrito não pode ser descartada, bem como os diferentes tipos de nitrito redutases utilizadas nas rotas da desnitrificação autotrófica. Portanto, existe a necessidade de maiores pesquisas nos campos de microbiologia e bioquímica, a fim de se esclarecer alguns aspectos das rotas metabólicas envolvidas na desnitrificação autotrófica usando sulfeto como doador de elétrons.

Pérez *et al.* (2007) obtiveram maior velocidade máxima específica de consumo de nitrito equivalente a $32 \text{ mg N g SSV}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Os autores utilizaram reator operado em batelada sequencial (RBS) com aeração intermitente e volume de 3,5 L, contendo biomassa suspensa heterotrófica desnitrificante adaptada à desnitrificação autotrófica, para o pós-tratamento de efluente de digestor de lodo de esgoto sanitário. Este fato possivelmente foi devido à maior concentração de nitrogênio amoniacal ($700\text{-}800 \text{ mg NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$) presente na água residuária

utilizada. Nesse trabalho, o nitrogênio amoniacal era convertido às formas oxidadas de nitrogênio nos períodos aerados para a ocorrência da desnitrificação autotrófica nos períodos anóxicos. Além disso, a faixa de pH medida foi de 7,3 a 8,5. Nesta faixa, a concentração de íons S^{2-} é baixa ou nula e, portanto, a precipitação de metais traços é menor ou inexistente. Portanto, a ação das nitrito redutases pode não ter sido afetada, possibilitando melhor desempenho na remoção de nitrito.

6.3 EXPERIMENTOS DA 3ª ETAPA

Nesta seção estão apresentados os resultados referentes à operação do reator nitrificante/desnitrificante e aos ensaios complementares realizados em paralelo. A estimativa de organismos nitrificantes e desnitrificantes também está apresentada e discutida.

6.3.1 Reator nitrificante/desnitrificante – RLFBAS

6.3.1.1 Determinação de parâmetros operacionais iniciais

Vazão de ar

Inicialmente, determinou-se a demanda de oxigênio necessária para a nitrificação, segundo a equação (5.6). O cálculo foi feito considerando a vazão de alimentação inicial (para

alimentação em batelada alimentada durante as primeiras 7 horas dos ciclos), equivalente a $9,3 \times 10^{-4} \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$, os valores de nitrogênio amoniacal presentes no efluente proveniente do reator UASB, correspondentes a 40 mg N L^{-1} em média, e que a nitrificação ocorreria com 100% de eficiência, como demonstrado a seguir.

$$R_0 = 4,33 \cdot (9,3 \cdot 10^{-4}) \cdot 40 = 0,155 \cdot 10^{-3} \text{ kg } O_2 \text{ h}^{-1}$$

A quantidade de O_2 no ar foi determinada para as condições experimentais (30°C e pressão atmosférica), a partir da densidade do ar ($\rho_{ar, 30^\circ\text{C}, Patm}$) obtida por meio da equação (5.7), conforme demonstrado a seguir.

$$\rho_{ar, 30^\circ\text{C}, Patm} = \frac{P \cdot M}{R \cdot T} = \frac{1,01325 \cdot 10^5 (\text{N m}^{-2}) \cdot 28,97 (\text{kg kg}^{-1} \text{mol}^{-1})}{8314 (\text{N m kg}^{-1} \text{mol}^{-1} \text{K}^{-1}) \cdot 303,15 (\text{K})} = 1,165 \text{ kg m}^{-3}$$

O valor resultante de $\rho_{ar, 30^\circ\text{C}, Patm}$ ($1,165 \text{ kg m}^{-3}$) foi multiplicado pela fração de O_2 no ar (0,21), sendo obtido o valor de C_{O_2} equivalente a $0,245 \text{ kg } O_2 \text{ m}^{-3}$. Considerando a eficiência de transferência de O_2 do aerador igual a 35%, a vazão de ar pôde ser determinada:

$$V_{ar} = \frac{0,155 \cdot 10^{-3}}{0,35 \cdot 0,245} = 1,8 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1} = 1,8 \text{ L h}^{-1}$$

Entretanto, na prática, a vazão calculada, que teve de ser medida experimentalmente por meio de um bolhômetro, não foi suficiente para a efetiva distribuição do ar no meio líquido. Isto é, quando as pedras porosas foram acopladas à mangueira que conduzia o ar, fornecido pelo aerador, para o interior do RLFBAS, não foi observada a saída de bolhas de ar

no líquido. No entanto, na ausência das pedras porosas, a saída de bolhas pela mangueira era visível. Sendo assim, a vazão de ar foi aumentada para cerca de 20 L h^{-1} , valor mínimo, diferente de zero, medido pelo rotâmetro utilizado em substituição ao bolhômetro. Nesse caso, eram visíveis pequenas bolhas de ar no líquido saindo através das pedras porosas e, aparentemente, haveria oxigênio suficiente para o processo nitrificante. A necessidade de ajustes no valor desta vazão foi verificada experimentalmente.

Vale ressaltar que, como a escala de medida do rotâmetro utilizado era para grandes valores, a medida dos baixos valores de vazão aplicados (na faixa de 0 a 20 L h^{-1}) era imprecisa. Portanto, apenas os valores de concentração de OD foram considerados.

Tempo dos ciclos e das fases aeradas e não aeradas

A duração dos tempos dos ciclos e das fases aeradas e não aeradas, aplicados inicialmente, foram determinados a partir do tempo de duração da fase não aerada, de acordo com a equação (5.4).

Para o cálculo da concentração de nitrogênio a ser nitrificado, foi adotado o valor máximo de 10 mg N L^{-1} de nitrogênio na forma de nitrato presente no efluente do reator, uma vez que não há, ainda, padrões de lançamento de efluentes para os compostos oxidados de nitrogênio. A concentração afluyente de nitrogênio na forma de nitrato foi baseada na composição do efluente sanitário sintético nitrificado proposto por Callado e Foresti (2000), equivalente a 20 mg N L^{-1} . A velocidade específica de remoção de nitrogênio utilizada foi determinada na 2ª etapa do projeto. Considerou-se a maior velocidade média obtida nos ensaios de desnitrificação via nitrato, que ocorreu nos ensaios com aplicação de sulfeto em excesso ($5,786 \text{ mg N g SSV}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Sendo assim, a condição com excesso de sulfeto foi aplicada inicialmente no reator, a fim de se otimizar o desempenho de remoção, visto que,

considerando a velocidade específica de remoção de nitrogênio da condição de estequiometria, o tempo da fase anóxica seria extremamente elevado.

Portanto, a duração da etapa anóxica necessária no período de 24 h resultou em:

$$t_{anoxico} = \frac{[20 - 10] \cdot 0,85}{5,786 \cdot 0,465 \cdot 6} \cdot 24 = 12,6h$$

Desse modo, visando à otimização do processo, optou-se por utilizar, inicialmente, ciclos de 8 h, nos quais haveria a necessidade de cerca de 4 h para a desnitrificação. Este tempo foi dividido em dois períodos de 2 h, intercalados com 2 períodos de aeração com duração de 2 h também. De cada fase aerada e não aerada, foram subtraídos 4 minutos para a realização do descarte, com duração de 16 minutos.

6.3.1.2 Estratégias de partida do reator

A estratégia I utilizada para o início da operação do RLFBAS consistiu em submetê-lo, logo na partida do reator, a condições de aeração intermitente com aplicação de sulfeto em excesso, visto que os parâmetros cinéticos utilizados para a determinação dos tempos dos ciclos e das fases aeradas/anóxicas eram correspondentes a esta concentração de sulfeto. Nestas condições, o reator foi operado por cerca de 45 dias, e os parâmetros monitorados durante este período podem ser visualizados na Tabela 6.17.

Tabela 6.17 – Parâmetros monitorados durante a operação inicial do RLFBAS: primeira estratégia operacional.

Parâmetros de monitoramento	Afluente	Efluente
N-NH ₄ ⁺ (mg N L ⁻¹)	40,6 ± 6,7	35,6 ± 3,6
N-NO ₃ ⁻ (mg N L ⁻¹)	1,1 ± 0,5	3,8 ± 2,2
N-NO ₂ ⁻ (mg N L ⁻¹)	0,1 ± 0,0	0,4 ± 0,1
S-SDT (mg S L ⁻¹)	48,8 ± 9,4	2,3 ± 1,2
Alcalinidade total (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	399,3 ± 29,2	276,5 ± 24,3
DQO (mg L ⁻¹)	125,7 ± 29,2	49,4 ± 19,8
pH	8,9 ± 0,3	8,7 ± 0,2

Observou-se que a nitrificação não ocorreu, visto que os valores das concentrações de nitrogênio amoniacal se mantiveram próximos no afluente e no efluente. Neste caso, a nitrificação foi inibida pela presença de sulfeto em altas concentrações ($48,8 \pm 9,4$ mg S-SDT L⁻¹), o que ocasionou o aumento do pH do meio. Em altos valores de pH, amônia livre foi formada. Os valores médios de amônia livre calculados, considerando todo o período monitorado nesta estratégia de partida do reator, corresponderam a $17,0 \pm 5,9$ mg N-NH₃ L⁻¹ e $12,6 \pm 2,7$ N-NH₃ L⁻¹, no afluente e no efluente, respectivamente. Segundo Anthonisen (1976), concentrações entre 10 e 150 mg L⁻¹ de amônia livre causam a inibição das bactérias oxidadoras de nitrogênio amoniacal, e portanto, da oxidação de nitrogênio amoniacal. Além disso, as características do lodo anaeróbio utilizado nesta estratégia podem ter contribuído para prejudicar o processo de nitrificação. Frente a estes fatos, optou-se por reinocular o reator com lodo nitrificante e suprimir as fases não aeradas e a adição de sulfeto, de modo que apenas a nitrificação fosse estabelecida inicialmente (estratégia II).

Por meio desta segunda estratégia, foi possível estabelecer a nitrificação em uma semana, havendo consumo completo de nitrogênio amoniacal com a formação de nitrato. Entretanto, problemas na refrigeração da câmara climatizada resultaram na elevação da temperatura para 45°C, fato este ocorrido à noite. Como resultado, a atividade das bactérias nitrificantes foi significativamente reduzida. Na tentativa de restabelecer a atividade nitrificante, o reator foi operado por mais três semanas, não havendo sucesso neste

procedimento: a eficiência da nitrificação permaneceu insatisfatória (Figura 6.53). Frente aos danos causados por este imprevisto aos microrganismos, optou-se por reinocular o reator novamente, sob as mesmas condições utilizadas na segunda estratégia de operação.

Figura 6.53 – Monitoramento dos compostos de nitrogênio durante a operação da primeira tentativa de aplicação da estratégia II: (▲) N-NH₄⁺ afluente; (Δ) N-NH₄⁺ efluente; (●) N-NO₃⁻ efluente.

Na segunda tentativa da aplicação da estratégia II, exames microscópicos revelaram que o lodo de inóculo nitrificante possuía características diferentes daquele utilizado na segunda tentativa de partida do reator. Foi constatada a presença de densa massa de filamentosas (tipo 021N), como pode ser visto na Figura 6.54, o que prejudicou o rápido estabelecimento da nitrificação. Segundo Iamamoto (2006), a predominância de organismos filamentosos pode levar à competição por substrato, havendo carência de nitrogênio para as bactérias nitrificantes.

Figura 6.54 – Exames microscópicos do lodo de inóculo utilizado na segunda estratégia operacional, caracterizando a predominância de filamentosas: (a) filamento semelhante ao tipo 021N ; (b) bactérias filamentosas, rotífero e ciliado peduncular semelhante a *Vaginicola*.

Somente após 20 dias de operação, observou-se o consumo completo de nitrogênio amoniacal, indicando a ocorrência efetiva do processo nitrificante (Figura 6.55). Entretanto, nos primeiros dias de operação, não foi possível “fechar” o balanço de massa para os compostos nitrogenados, não havendo a formação de compostos oxidados de nitrogênio correspondente ao consumo de nitrogênio amoniacal. Diante deste fato, levantou-se a hipótese da ocorrência de desnitrificação heterotrófica no interior das matrizes de espuma, uma vez que foi constatado o consumo de DQO durante todo o período monitorado (Figura 6.56). Considerando a concentração de nitrogênio amoniacal e a DQO que entrava no reator, foi possível obter a relação DQO/N para cada ponto experimental. De acordo com Chie-Chien Tseng *et al.* (1998), a relação DQO/N afluente ótima para desnitrificação completa deve ser igual ou superior a 5,3, quando a fonte de carbono como doador de elétrons é proveniente de esgoto sanitário. Em todos os dias monitorados, observou-se que esta relação foi inferior a 5,3, e, portanto, a desnitrificação heterotrófica via atividade endógena também contribuiu para a redução dos compostos oxidados de nitrogênio. A determinação de sólidos suspensos voláteis aderidos (g SSV.g espuma⁻¹), provenientes do lodo de inóculo utilizado e do reator ao final do período monitorado, confirmou a redução da biomassa de 0,153 para 0,102 g SSV.g

espuma, indicando a ocorrência de endogenia no interior do reator. O balanço de massa dos compostos nitrogenados durante o período monitorado e as correspondentes relações DQO/N afluente podem ser visualizados na Tabela 6.18.

Vale ressaltar que a maior formação de nitrito, detectada a partir do dia 21, também pode ter ocorrido em função da desnitrificação heterotrófica parcial, uma vez que a fonte de elétrons para a desnitrificação heterotrófica proveniente da atividade endogênica se tornou escassa e, conseqüentemente, a atividade desnitrificante foi reduzida. Além disso, o consumo de DQO não cessou, indicando o uso da matéria orgânica de difícil degradação, presente no efluente do reator UASB, como doador de elétrons para a desnitrificação heterotrófica. Entretanto, a ocorrência de nitrificação parcial a nitrito também não foi descartada.

Figura 6.55 – Concentrações dos compostos de nitrogênio durante o monitoramento do período para estabelecimento da nitrificação: (▲) N-NH₄⁺ afluente; (Δ) N-NH₄⁺ efluente; (●) N-NO₃⁻ formado; (●) N-NO₂⁻ formado; (x) N-N₂ calculado.

Figura 6.56 – Concentrações da DQO filtrada durante o monitoramento no período para estabelecimento da nitrificação: (◆) DQO afluente; (◇) DQO efluente.

Tabela 6.18 – Balanço dos compostos nitrogenados durante o período monitorado para o estabelecimento da nitrificação.

Dias de operação	Afluente		Efluente		N-NO _x ⁻ desnitrificado a N ₂ (calculado)*	DQO/N afluente
	N-NH ₄ ⁺	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₂ ⁻	N-NO ₃ ⁻		
6	42,48	4,44	8,32	20,71	9,01	1,82
13	39,13	7,60	4,11	14,88	12,54	1,84
17	30,78	6,12	5,10	14,84	4,72	2,16
19	43,97	0,00	5,08	25,43	13,47	1,59
21	40,33	1,56	17,33	23,99	0,00	1,82
24	39,86	1,01	15,93	21,23	1,69	1,87
26	42,24	7,19	13,28	12,88	8,88	1,80
28	39,40	0,00	4,84	38,93	0,00	1,54
31	35,64	0,00	9,06	29,86	0,00	1,63
33	39,06	0,00	9,18	31,30	0,00	1,49

*possível desnitrificação parcial a nitrito não foi considerada.

A hipótese da ocorrência de desnitrificação heterotrófica simultaneamente à nitrificação foi reforçada pelos valores teóricos e medidos de alcalinidade a bicarbonato (AB). Na Tabela 6.19, são apresentados os valores experimentais para o consumo de alcalinidade, juntamente com os valores de AB teoricamente necessários para a nitrificação que foi medida, com base no consumo de nitrogênio amoniacal e considerando que, para a nitrificação, são consumidos 7,14 mg CaCO₃ g N⁻¹. Também são apresentados os valores teóricos de AB

gerada pela possível desnitrificação, sabendo-se que, neste processo, são gerados 3,57 g CaCO_3 g N^{-1} . A partir destes dados, foi possível calcular os valores teóricos de AB consumida ($\text{AB}_{\text{necessária}} - \text{AB}_{\text{gerada}}$), os quais deveriam se aproximar dos valores de AB medidos experimentalmente, uma vez que contabilizam a AB necessária para nitrificar o nitrogênio amoniacal medido e a AB devolvida pela possível desnitrificação heterotrófica. Considerando a precisão do método estabelecida no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (2005), que descreve diferentes faixas de desvio-padrão de acordo com a alcalinidade medida, pode-se inferir que tais valores ficaram próximos na maior parte dos dias monitorados, corroborando a hipótese da ocorrência de desnitrificação heterotrófica no interior das espumas.

Tabela 6.19 – Valores teóricos e medidos de alcalinidade a bicarbonato ($\text{mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$) para todo o período de operação durante o estabelecimento da nitrificação.

Dias de operação	AB necessária (teórica)	AB consumida (medida)	AB gerada (teórica)	AB consumida (teórica)
13	225,15	174,60	44,77	180,39
17	176,11	138,50	16,87	159,25
19	313,96	284,97	48,08	265,88
21	276,84	284,97	0,00	276,84
24	277,41	240,39	6,03	271,39
26	250,24	205,37	31,71	218,53
28	281,30	351,83	0,00	281,30
31	254,47	222,88	0,00	254,47
33	272,01	226,06	0,00	272,01

Os valores de pH mantiveram-se constantes durante todo o período monitorando, sendo equivalentes a $8,0 \pm 0,1$ no afluente e $7,9 \pm 0,1$ no efluente.

Após a nitrificação ser estabelecida, o reator foi submetido à aeração intermitente com aplicação de sulfeto em baixas concentrações ($11,6 \pm 5,8 \text{ mg S-SDT L}^{-1}$). O reator foi operado durante 39 dias nesta condição e a ocorrência da desnitrificação autotrófica integrada à oxidação do sulfeto, no processo acoplado à nitrificação, foi avaliada. O balanço de massa dos compostos de nitrogênio revelou que $4,0 \pm 3,1 \text{ mg N L}^{-1}$ foram desnitrificados durante este

período. O consumo total de sulfeto com a produção de sulfato ($13,4 \pm 3,8 \text{ mg S-SO}_4^{-2} \text{ L}^{-1}$) foi observada. As concentrações de nitrito e nitrato efluentes foram $13,1 \pm 2,3$ e $10,7 \pm 1,9 \text{ mg N L}^{-1}$, respectivamente. Porém, o sulfeto causou toxicidade à nitrificação, visto que a eficiência média do processo foi reduzida de 97% para 77%. Sendo assim, as condições de operação que se seguiram tiveram, como objetivo, melhorar a desnitrificação autotrófica, proporcionando maior disponibilidade do doador de elétrons, sem inibir o processo de nitrificação.

6.3.1.3 Estratégias de alimentação

Após ser definida a estratégia II para a partida do reator, a operação seguiu por mais 102 dias, totalizando 180 dias de operação, incluindo a estratégia II de partida do reator. Nesta seção, apenas os resultados obtidos a partir do dia 80 em diante serão mostrados. Os valores médios de concentração dos compostos de nitrogênio estão apresentados na Figura 6.57. Os valores médios dos outros parâmetros monitorados são apresentados na Tabela 6.20, divididos de acordo com as condições avaliadas. A descrição detalhada das condições experimentais durante as estratégias de alimentação (1A, 1B, 2A, 2B) pode ser visualizada na subseção 5.4.5 (página 113). No modo de alimentação da condição 1 (A e B), foi mantido o regime de batelada alimentada durante as primeiras 7 h do ciclo de 8 h, que foi aplicado às duas estratégias de partida do reator. As diferentes concentrações de sulfeto aplicadas em 1A e 1B podem ser observadas na Tabela 6.20 (afluente). Na condição 1A, o aumento da concentração de sulfeto em relação ao período anterior (estratégia de partida II) ocasionou a redução da eficiência da nitrificação, a qual decresceu drasticamente para o valor médio de 42,3%. Neste caso, a presença de sulfeto inibiu significativamente a ação das bactérias oxidadoras de nitrogênio amoniacal. Tal resultado está de acordo com Sears *et al.* (2004), que relataram a

inibição completa da oxidação de nitrogênio amoniacal na presença de $0,5 \text{ mg S-SDT L}^{-1}$, reforçando a extrema sensibilidade das bactérias oxidadoras de nitrogênio amoniacal ao sulfeto solúvel. Por outro lado, Erguder *et al.* (2008) observaram efeitos de inibição muito menores em reator nitrificante de batelada sequencial (ciclos de 2 dias) submetidos a pulsos de sulfeto ($45 \text{ mg S-SDT L}^{-1}$) durante condições anóxicas. Os autores relataram que as bactérias oxidadoras de nitrito foram mais sensíveis ao sulfeto que as bactérias oxidadoras de nitrogênio amoniacal. Entretanto, ao contrário da presente pesquisa, o pH foi mantido em $7,5 \pm 0,2$, o que impediu a formação de amônia livre. Assim, a inibição por sulfeto parece estar mais relacionada ao aumento do pH do que à depleção de OD, visto que a concentração de sulfeto utilizada pelos autores foi muito maior do que a apresentada neste trabalho. Além disso, Joye e Hollibaugh (1995) também observaram que a concentração de OD não diferiu significativamente entre experimentos com adição de sulfeto e experimentos controle (sem adição de sulfeto). Estes autores avaliaram a influência da inibição de sulfeto na nitrificação em sedimentos estuarinos. No entanto, as velocidades de nitrificação diminuíram significativamente com a adição de sulfeto, mesmo em baixas concentrações ($1,9 \text{ mg HS}^{-} \text{ L}^{-1}$).

Figura 6.57 – Concentrações dos compostos de nitrogênio para o período monitorado em que foram contempladas as estratégias de alimentação: (▲) N-NH_4^+ afluente; (Δ) N-NH_4^+ efluente; (●) N-NO_3^- efluente; (●) N-NO_2^- efluente; (x) N-N_2 calculado.

Tabela 6.20 – Valores médios dos parâmetros monitorados durante o período operacional composto pelas estratégias de alimentação, dividido de acordo com as condições avaliadas.

Condição	Período de operação (d)	AFLUENTE				
		DQO (mg L ⁻¹)	AB (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	pH	S-SDT (mg S L ⁻¹)	SO ₄ ²⁻ (mg S L ⁻¹)
1 A	80 a 115	77,4 ± 7,4	796,1 ± 98,7	8,5 ± 0,1	23,6 ± 7,2	8,3 ± 1,7
1 B	116 a 134	83,3 ± 9,1	702,8 ± 41,7	8,1 ± 0,3	6,6 ± 3,6	10,0 ± 9,2
2 A	135 a 154	73,4 ± 11,2	684,6 ± 39,0	8,4 ± 0,1	20,2 ± 5,5	5,0 ± 3,4
2 B	155 a 180	79,8 ± 3,1	735,9 ± 12,8	8,9 ± 0,0	53,3 ± 2,9	8,6 ± 1,4

Condição	Período de operação (d)	EFLUENTE				
		DQO (mg L ⁻¹)	AB (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	pH	S-SDT (mg S L ⁻¹)	SO ₄ ²⁻ (mg S L ⁻¹)
1 A	80 a 115	24,4 ± 8,3	657,0 ± 94,1	8,1 ± 0,1	0,0 ± 0,1	28,2 ± 7,2
1 B	116 a 134	20,1 ± 3,7	450,5 ± 102,9	7,8 ± 0,2	0,0 ± 0,1	21,9 ± 7,5
2 A	135 a 154	22,3 ± 15,0	388,6 ± 42,9	8,0 ± 0,1	0,0 ± 0,1	20,0 ± 5,2
2 B	155 a 180	26,4 ± 6,5	346,4 ± 70,2	8,0 ± 0,3	0,0 ± 0,1	47,8 ± 8,4

Por outro lado, o aumento na concentração de sulfeto na presente pesquisa causou a depleção da concentração de OD de 3,0 mg L⁻¹, durante o período de estabelecimento da nitrificação (sem sulfeto – estratégia II), para 2,5 mg L⁻¹ na condição 1A. Estes valores correspondem ao valor máximo medido nos períodos aerados durante os perfis temporais. A inibição causada pela insuficiência de OD é comumente relatada em valores inferiores a 0,5 mg L⁻¹, inibindo principalmente as bactérias oxidadoras de nitrito e promovendo o acúmulo do mesmo (SCHMIDT *et al.* 2004; ERGUDER *et al.* 2008). Portanto, neste trabalho a depleção de OD não foi o fator limitante para a ocorrência da nitrificação.

O perfil temporal dos compostos de enxofre revelou a produção de sulfato e muito baixa disponibilidade de sulfeto durante todo o ciclo (Figura 6.58). Pode-se observar que pequena quantidade de sulfeto estava disponível para a desnitrificação autotrófica, o que poderia explicar os baixos valores calculados de N-N₂. Esta indisponibilidade de sulfeto provavelmente ocorreu como resultado da aeração no interior do reator, fato que promoveu a oxidação química de sulfeto principalmente a sulfato e/ou disponibilizou o oxigênio como receptor de elétrons preferencial aos microrganismos. De acordo com Buisman *et al.* (1990), a

oxidação biológica de sulfeto é significativamente mais rápida do que a oxidação química não-catalizada de sulfeto com oxigênio. Portanto, a oxidação biológica de sulfeto com oxigênio provavelmente ocorreu no interior do reator, uma vez que sulfeto não foi significativamente detectado, mesmo durante os períodos anóxicos. Além disso, algumas espécies de bactérias quimioautotróficas de enxofre, as quais promovem a desnitrificação autotrófica, tais como *Thiobacillus sp.*, são facultativas e podem utilizar o oxigênio como receptor de elétrons ao invés dos compostos oxidados de nitrogênio (KUENEN, 1985). Adicionalmente, a estratégia de alimentação aplicada nesta condição incluiu o descarte de 6/7 do volume do reator ao final dos ciclos (subseção 5.4.5). Sabendo que a fase aerada precedia o período de descarte do efluente do reator, o efluente a ser descartado continha compostos oxidados de nitrogênio. Portanto, a disponibilidade de nitrato/nitrito era baixa no início de cada ciclo, uma vez que o efluente do UASB utilizado na alimentação continha apenas nitrogênio amoniacal. Dessa forma, as bactérias desnitrificantes facultativas provavelmente utilizaram oxigênio para a oxidação de sulfeto, pelo menos na primeira fase anóxica dos ciclos.

Figura 6.58 – Perfil temporal dos compostos de enxofre durante um ciclo de 8 horas para a condição 1A após ser atingido o estado estacionário: (○) sulfeto; (●) sulfato.

Considerando estes resultados, a estratégia de alimentação teria que ser alterada de forma a permitir a melhor disponibilidade de sulfeto às bactérias autotróficas. Aliado a isso, tal estratégia também deveria diminuir, tanto quanto possível, o efeito tóxico do sulfeto à nitrificação. Portanto, a alimentação intermitente apenas nos períodos anóxicos e o descarte parcial do volume do reator ao final dos ciclos pareceu ser a solução (condição 2, A e B).

Anteriormente à alteração da estratégia de alimentação, a recuperação da nitrificação foi avaliada por meio da redução da concentração de sulfeto, o que correspondeu à condição 1B. A adição de sulfeto não foi suprimida na tentativa de adaptar os microrganismos nitrificantes à presença deste composto tóxico. Os resultados mostraram que a nitrificação foi recuperada, atingindo eficiência média de 72,3%. Nitrato foi o principal produto da nitrificação (Figura 6.57). Assim, as bactérias oxidadoras de nitrito, consideradas mais sensíveis ao sulfeto solúvel (BENTZEN *et al.* 1995; BAE *et al.* 2002; ERGUDER *et al.* 2008), também foram recuperadas. Como descrito por Sears *et al.* (2004), tais resultados mostraram que a inibição de sulfeto na nitrificação é reversível, por meio da redução da concentração do composto tóxico. No entanto, nesta condição, a desnitrificação foi praticamente inexistente, devido à insuficiência de elétrons para a redução dos compostos oxidados de nitrogênio (Figura 5.56). Como na condição anterior (1A), tal insuficiência foi resultado da oxidação química do sulfeto e/ou a utilização biológica do oxigênio como receptor de elétrons preferencial.

Ainda na condição 1B, foi colocado um filtro de papel 100% celulose (filtro de café) na saída do reator UASB em função do escape de alguns grânulos de biomassa juntamente com o efluente (Figura 6.59). Dessa forma, evitou-se que a biomassa proveniente do UASB pudesse entrar no reator nitrificante/desnitrificante, juntamente com a alimentação, e promover a competição por substratos. Esta ação contribuiu para que os organismos

nitrificantes e desnitrificantes não tivessem sua atividade reduzida em função da presença de outros microrganismos.

Figura 6.59 – Filtro de celulose (100%) (destacado no círculo vermelho) acoplado à saída do reator UASB (seta vermelha) para evitar o escape de biomassa juntamente com o efluente (Condição 1B).

Quando o reator passou a ser operado sob a condição 2A, a desnitrificação começou a ocorrer de forma instável: $3,7 \pm 6,5 \text{ mg N L}^{-1}$ foram desnitrificados. Vale ressaltar que a concentração do doador de elétrons estava abaixo do valor exigido pela estequiometria com base nas reações bioquímicas. Portanto, a quantidade de elétrons disponível não era suficiente para a ocorrência da desnitrificação completa. Considerando a desnitrificação autotrófica com uso de nitrato como receptor de elétrons, que era o principal produto da nitrificação, aproximadamente 50 mg L^{-1} de sulfeto solúvel seriam necessários. Este valor é baseado na equação (4.10) da seção subseção 4.2.2.4, e leva em conta o consumo médio de nitrogênio amoniacal neste período. Entretanto, as bactérias desnitrificantes autotróficas não utilizaram todo o sulfeto disponível ($20,2 \pm 5,5 \text{ mg S-SDT L}^{-1}$), medido na alimentação, para reduzir o nitrato, visto que aproximadamente 14 mg N L^{-1} deveriam ter sido desnitrificados se isto ocorresse, considerando-se a oxidação completa de sulfeto a sulfato. Desta forma, o uso de

oxigênio como receptor de elétrons preferencial pelos microrganismos ainda estava ocorrendo.

Com relação à nitrificação, a estratégia de alimentação intermitente foi eficaz para reduzir o efeito tóxico do sulfeto às bactérias nitrificantes, uma vez que o consumo médio de nitrogênio amoniacal aumentou para 91%. O perfil temporal de POR com duração de um ciclo para a condição 2A apresentou maior oxidação do meio durante os períodos aerados quando comparado à condição 1A, com a mesma concentração de sulfeto na alimentação (Figura 6.60). Esta estratégia de alimentação evitou a presença de sulfeto - um forte agente redutor - durante os períodos aerados, garantindo um ambiente mais oxidado para a nitrificação. De acordo com Wanner *et al.* (1991), o valor de POR ideal para nitrificação está entre 100 e 300 mV. Esta faixa ocorreu apenas para a condição 2A. Adicionalmente, a alimentação intermitente promoveu a redução de amônia livre durante os períodos aerados para valores inferiores a 1,6 mg N-NH₃ L⁻¹ (Figura 6.61a). Este valor está próximo do limite inferior da concentração inibitória de amônia livre para as bactérias oxidadoras de nitrito, apresentado por Abeling e Seyfried (1992), variando a partir de 1 a 5 mg N-NH₃ L⁻¹. De acordo com essas informações, o acúmulo de nitrito foi menor do que 3,1 mg N-NO₂ L⁻¹, com a maior parcela de nitrogênio amoniacal sendo oxidada a nitrato. Por outro lado, na condição 1A, a concentração de amônia livre atingiu valores de até 5 mg N-NH₃ L⁻¹, e acúmulo de nitrito foi de até 9 mg N-NO₂ L⁻¹ (Figura 6.61b).

Figura 6.60 – Comparação entre os perfis temporais de POR das estratégias de alimentação avaliadas, quando aplicadas as mesmas concentrações de sulfeto: (■) condição 1A; (□) condição 2A.

Figura 6.61 – Concentrações dos compostos nitrogenados durante um ciclo de 8 horas, em estado estacionário, para (a) condição 1A e (b) condição 2A: (▲) N-NH_4^+ ; (×) N-NH_3 ; (●) N-NO_3^- ; (●) N-NO_2^- .

Na tentativa de melhorar o desempenho da desnitrificação, a concentração do doador de elétrons foi aumentada (condição 2B). Considerando a concentração de nitrogênio amoniacal nitrificado ($27,5 \pm 4,6 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$), a concentração de sulfeto aplicada ($53,3 \pm 2,9 \text{ mg S-SDT L}^{-1}$) estava em excesso com relação aos receptores de elétrons. A eficiência de desnitrificação foi elevada para uma média de 53,0%, enquanto que a eficiência de nitrificação diminuiu para 85,7%. A redução das concentrações de nitrato e nitrito no efluente foi observada. Conforme apresentado na Figura 6.62, o perfil de POR com duração de um ciclo de 8 horas revelou valores favoráveis para a nitrificação e desnitrificação durante as fases aeradas e anóxicas, respectivamente. De acordo com Wanner *et al.* (1991), os valores ótimos de POR para desnitrificação estão na faixa de -50 a 50 mV. Vale ressaltar que tais valores para a desnitrificação foram observados apenas a partir da metade dos períodos anóxicos. Portanto, o ambiente favorável para o processo de desnitrificação não foi obtido durante todo o período anóxico, ou seja, a duração das fases anóxicas pode não ter sido suficiente para permitir a ocorrência de desnitrificação completa.

Figura 6.62 – Perfil temporal de POR com duração de um ciclo de 8 horas, em estado estacionário, para a condição 2B.

Diferentemente das outras condições, a oxidação parcial do sulfeto ocorreu na condição 2B, uma vez que o acúmulo de uma camada esbranquiçada na parte inferior do reator foi observado, o qual é característico da presença de enxofre elementar. Vários autores também relataram o acúmulo de enxofre elementar em reatores desnitrificantes, quando a concentração de sulfeto foi superior em relação ao exigido pela estequiometria (KRISHNAKUMAR E MANILAL, 1999; REYES-ÁVILA *et al.* 2004; BERISTAIN-CARDOSO *et al.* 2006). Os resultados de AB revelaram o uso do enxofre elementar anteriormente formado como doador de elétrons para a desnitrificação autotrófica. O consumo de AB foi maior do que o esperado quando comparado com as outras condições (Tabela 6.18). Ao contrário da desnitrificação a partir da oxidação de sulfeto, o uso de enxofre elementar como doador de elétrons promove o consumo de alcalinidade no meio, como descrito por Koenig e Liu (2002). Segundo os autores, o uso de enxofre elementar na desnitrificação autotrófica consome cerca de $4 \text{ g CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ por $\text{g N-NO}_3 \text{ L}^{-1}$. Desta forma, a desnitrificação autotrófica não foi eficaz em devolver a alcalinidade do meio para a nitrificação da fase posterior, exigindo a adição de alcalinidade externa para a ocorrência de ambos os processos. Vale ressaltar que a suplementação de alcalinidade já estava sendo fornecida no início da operação do RLFBAS, e, a exigência de alcalinidade externa constatada, não permitiu a supressão deste fornecimento. Pérez *et al.* (2007) também relataram a necessidade de adição complementar de bicarbonato para controlar o pH na faixa desejada, em função da recuperação incompleta de alcalinidade nos períodos de desnitrificação. Os autores operaram um RBS para promover a nitrificação e desnitrificação no mesmo reator e mostraram a viabilidade da utilização de sulfeto para a desnitrificação autotrófica. No entanto, o acúmulo de $30 \text{ mg N-NO}_2 \text{ L}^{-1}$ foi detectado devido à baixa concentração de sulfeto aplicada, equivalente a 80-85% da exigida estequiometricamente.

6.3.1.4 Verificação de acúmulo de nitrito e da desnitrificação via nitrito

Definida a estratégia de alimentação, as condições para o acúmulo de nitrito foram avaliadas, assim como a desnitrificação via nitrito. De acordo com Shmidt *et al.* (2003), a nitrificação e desnitrificação pela via curta é viável para o tratamento de águas residuárias que apresentam relação DQO/N (afluente) < 3. Este é o caso de efluentes de reatores anaeróbios que, em geral, apresentam baixos valores para esta relação. Neste trabalho, a relação DQO/N afluente esteve sempre abaixo de 3, possibilitando, em teoria, o processo de via curta.

Os valores médios dos parâmetros monitorados durante todo o período de operação podem ser visualizados na Tabela 6.21 e na Figura 6.63, as quais fornecem uma visão geral do comportamento dos compostos analisados de acordo com as condições avaliadas. A descrição detalhada das condições experimentais avaliadas (3, 4, 5, 6) pode ser visualizada na subseção 5.4.5 (página 113).

Tabela 6.21 – Valores médios dos parâmetros monitorados durante o período operacional para a verificação do acúmulo de nitrito e desnitrificação via nitrito, dividido de acordo com as condições avaliadas.

Condição	Período de operação (d)	AFLUENTE				
		DQO (mg L ⁻¹)	AB (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	pH	S-SDT (mg S L ⁻¹)	SO ₄ ⁻² (mg S L ⁻¹)
3	181 a 220	89,3 ± 12,0	623,4 ± 98,0	8,9 ± 0,3	45,3 ± 21,6	10,9 ± 6,1
4	221 a 246	72,1 ± 13,2	589,2 ± 92,8	8,9 ± 0,3	37,9 ± 15,1	14,5 ± 5,0
5	247 a 259	81,3 ± 15,4	573,7 ± 75,0	9,1 ± 0,2	52,8 ± 15,8	23,5 ± 7,3
6	260 a 270	73,5 ± 10,1	254,8 ± 129,0	7,7 ± 0,6	16,0 ± 6,2	14,9 ± 6,4
Condição	Período de operação (d)	EFLUENTE				
		DQO (mg L ⁻¹)	AB (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	pH	S-SDT (mg S L ⁻¹)	SO ₄ ⁻² (mg S L ⁻¹)
3	181 a 220	34,4 ± 10,9	353,9 ± 93,6	8,1 ± 0,1	0,0 ± 0,1	26,8 ± 7,3
4	221 a 246	26,5 ± 15,1	387,9 ± 49,6	7,9 ± 0,2	0,0 ± 0,1	35,2 ± 14,6
5	247 a 259	33,0 ± 7,8	389,5 ± 29,7	8,2 ± 0,2	0,0 ± 0,1	65,0 ± 14,5
6	260 a 270	27,2 ± 1,8	34,1 ± 88,3	6,7 ± 0,7	0,0 ± 0,0	33,8 ± 4,6

Figura 6.63 – Concentrações dos compostos de nitrogênio para o período monitorado durante a verificação de acúmulo de nitrito e desnitrificação via nitrito: (▲) N-NH₄⁺ afluente; (Δ) N-NH₄⁺ efluente; (●) N-NO₃⁻ efluente; (●) N-NO₂⁻ efluente; (x) N-N₂ calculado.

Durante a condição 3, a carga de choque inicial de sulfeto ($100 \text{ mg S-SDT L}^{-1}$) foi efetiva em direcionar a nitrificação somente a nitrito, ocasionando acúmulo médio de $15,9 \pm 6,5 \text{ mg N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$. No entanto, a concentração elevada de sulfeto também causou inibição do processo nitrificante imediatamente após sua aplicação. A Figura 6.64 apresenta o comportamento dos compostos nitrogenados somente para a condição 3, na qual é possível observar a queda no consumo de nitrogênio amoniacal para 14,5%. Como relatado na subseção 6.3.1.3. (condição 1B), a inibição da nitrificação causada pela presença de sulfeto é um processo reversível, e, portanto, a oxidação de nitrogênio amoniacal voltou a ocorrer com $89,9 \pm 0,9\%$ de eficiência após 9 dias decorridos a partir da aplicação da carga de choque. Visto que o principal produto da nitrificação foi nitrito, as bactérias oxidadoras de nitrito foram sensivelmente inibidas, provavelmente pela liberação de amônia livre ocasionada pela elevação do pH durante a aplicação da carga de choque de sulfeto (24 horas). Neste período, a concentração de amônia livre atingiu o valor de $26,4 \text{ mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$ na entrada do reator. Considerando que a estratégia de alimentação utilizada promovia a diluição dos substratos, a concentração de amônia livre no interior do reator no início dos ciclos, durante a aplicação da carga de choque, resultou em valores próximos de $11 \text{ mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$, valor muito acima da

concentração inibitória apresentada por Abeling e Seyfried (1992) ($1 - 5 \text{ mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$). Neste caso, as bactérias oxidadoras de nitrogênio amoniacal também foram inibidas, visto que a concentração inibitória para as mesmas está na faixa de $10 - 150 \text{ mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$ (ANTHONISEN *et al.* 1976). Adicionalmente, a presença de alta concentração de sulfeto durante as primeiras 24 horas deste período também contribuiu para a inibição da nitrificação em função da toxicidade causada pelo sulfeto.

Figura 6.64 – Concentrações dos compostos de nitrogênio para o período monitorado durante a condição 3: (▲) N-NH_4^+ afluente; (Δ) N-NH_4^+ efluente; (●) N-NO_3^- efluente; (●) N-NO_2^- efluente; (x) N-N_2 calculado.

O perfil temporal dos compostos de nitrogênio, realizado após a estabilidade aparente do processo, revelou que as concentrações de amônia livre permaneceram na faixa inibitória apenas para as bactérias oxidadoras de nitrito (Figura 6.65), havendo acúmulo deste composto no reator. Além disso, as relações OD/N-NH_3 e OD/N-NH_4^+ também favoreceram o acúmulo de nitrito. De acordo com Çeçen (1996), relações de OD/N-NH_3 e OD/N-NH_4^+ menores que 10 e 1, respectivamente, favorecem a nitrificação somente até nitrito. Na presente pesquisa, os valores destas relações ficaram na faixa descrita pelo autor supracitado, como apresentado na Figura 6.66, corroborando a existência de condições favoráveis para o acúmulo de nitrito.

Figura 6.65 – Concentrações dos compostos nitrogenados em um perfil temporal durante um ciclo de 8 horas, em estado estacionário, para a condição 3: (▲) N-NH₄⁺; (x) N-NH₃; (●) N-NO₃⁻; (●) N-NO₂⁻.

Figura 6.66 – Perfil temporal da (▲) concentração de OD e as respectivas relações (■) OD/NH₃ e (□) OD/NH₄⁺, realizado durante um ciclo de 8 horas, em estado estacionário, para a condição 3.

Com relação à desnitrificação, a eficiência da mesma decresceu consideravelmente em relação ao período anterior, sendo insignificante na maior parte deste período. Os valores de N₂ calculados durante a condição 3 revelaram grande instabilidade do processo desnitrificante ($4,3 \pm 5,6$ mg N-N₂ L⁻¹), mesmo após a recuperação do processo nitrificante. Provavelmente, a biomassa desnitrificante adaptada ao uso de nitrato como receptor de elétrons, foi inibida pela presença de maiores concentrações de nitrito, como reportado por Jing *et al.*, (2009). Os autores avaliaram a aplicação de cargas de choque de sulfeto na faixa de 520 – 1820 mg S L⁻¹

em reator anaeróbio de fluxo ascendente (1,3 L) e observaram o acúmulo de nitrito proveniente da desnitrificação parcial, ocasionada pela ação inibitória das altas concentrações de sulfeto. Após a aplicação das cargas de choque, o desempenho do reator desnitrificante não foi recuperado imediatamente, e este fato foi atribuído à presença de intermediários tóxicos, como nitrito. Outros autores também reportaram o efeito tóxico de nitrito sobre a desnitrificação (GLASS *et al.*, 1997; CHEN *et al.*, 2008; JING *et al.*, 2010). Porém, o efeito tóxico do nitrito não impede que a biomassa desnitrificante se adapte ao uso de nitrito como receptor de elétrons, uma vez que a desnitrificação autotrófica via nitrito é um processo já relatado na literatura (MAHMOOD *et al.*, 2007b; MORAES *et al.*, 2011; MORAES E FORESTI, 2012). Sendo assim, a inibição da desnitrificação causada pela presença de nitrito se mostra como um processo reversível.

Outra hipótese para a redução da atividade desnitrificante consistiu na inibição causada pela aplicação da carga de choque de sulfeto (100 mg S-SDT L⁻¹). No entanto, esta hipótese foi descartada, visto que as análises realizadas logo após esta aplicação indicaram a ocorrência de alguma atividade desnitrificante (Figura 6.64), mesmo com baixa eficiência de nitrificação. Adicionalmente, existem pesquisas que relatam a aplicação de concentrações muito maiores de sulfeto, sem prejuízo para a desnitrificação (VAIOUPOULOU *et al.*, 2005; MANCONI *et al.*, 2007; JING *et al.*, 2009).

Com relação ao doador de elétrons, a oxidação parcial do sulfeto ocorreu, sendo observada novamente a formação e acúmulo de uma substância esbranquiçada no fundo do reator, característica de enxofre elementar. Também houve indicativo da presença de enxofre elementar encobrindo a parte inferior do suporte para colocação da biomassa imobilizada (Figura 6.67). Vale ressaltar que, nesta condição, o uso do oxigênio como receptor de elétrons preferencial estava ocorrendo, uma vez que a desnitrificação via nitrito era insignificante, mas todo o sulfeto adicionado foi consumido (Tabela 6.21).

Figura 6.67 – Formação de uma camada esbranquiçada encobrindo a parte inferior do suporte para colocação da biomassa imobilizada, característica de enxofre elementar (condição 3).

Diante dos resultados obtidos, as próximas condições visaram à adaptação da biomassa desnitrificante à presença de nitrito e o estabelecimento da desnitrificação via nitrito, com a tentativa de impedir que o oxigênio fosse o receptor de elétrons preferencial. Visto que, na condição 3, o comportamento de POR durante o perfil temporal em estado estacionário apresentou valores maiores nas fases anóxicas quando comparado à condição 2B, variando de 90 a 150 mV nas fases não aeradas, e de 130 a 200 mV nas fases aeradas, inferiu-se que o ambiente não estava suficientemente favorável ao processo desnitrificante (WANNER *et al.*, 1991). Desse modo, optou-se por reduzir a concentração de OD de modo que o meio líquido se tornasse mais reduzido. O tempo das fases não aeradas também foi aumentado em 10 minutos (2 h 06 min).

O reator foi operado por 25 dias na condição 4, sendo observada a queda na eficiência da nitrificação de 89,9% para $59,9 \pm 12,0\%$. Além disso, o processo nitrificante ocorreu com instabilidade durante este período, sendo bastante afetado pela redução da concentração de OD e de 10 minutos nas fases aeradas (1 h 46 min). As concentrações de nitrato permaneceram abaixo de $4 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$, sendo nitrito ($12,0 \pm 4,6 \text{ mg N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$) o principal produto da nitrificação. O perfil temporal dos compostos de nitrogênio ao final deste

período revelou que pequena parte do nitrito estava sendo consumida durante os períodos não aerados (Figura 6.68). Desta forma, pouca melhora na desnitrificação foi observada em comparação à condição 3, sendo desnitrificados em média apenas $4,9 \pm 5,6 \text{ mg N-N}_2 \text{ L}^{-1}$.

Figura 6.68 – Concentrações dos compostos nitrogenados em um perfil temporal durante um ciclo de 8 horas, em estado estacionário, para a condição 3: (▲) N-NH_4^+ ; (×) N-NH_3 ; (●) N-NO_3^- ; (●) N-NO_2^- .

As alterações realizadas na condição 4 não foram efetivas em reduzir os valores de POR, os quais foram próximos à condição 3. Nas fases aeradas e não aeradas, os valores de POR variaram entre 100 e 200 mV e entre 100 e 150 mV, respectivamente. A presença de compostos oxidados durante as fases não aeradas, como sulfato, nitrito e nitrato, contribuiu para que os valores de POR permanecessem elevados, mesmo com a redução da concentração de OD. Adicionalmente, o uso de oxigênio como receptor de elétrons preferencial para oxidação do sulfeto continuou a ocorrer, uma vez que todo o sulfeto adicionado era sempre consumido. A oxidação parcial de sulfeto a enxofre elementar também foi novamente constatada através de evidências visuais. Entretanto, a formação deste intermediário começou a ocorrer nas mangueiras de alimentação, como pode ser observado na Figura 6.69 e nos valores de concentração de sulfeto afluente mais baixos, com considerável desvio-padrão, mostrados na Tabela 6.21. Visto que a coloração esbranquiçada era mais marcante nas

conexões das mangueiras de alimentação, assumiu-se que estava havendo entrada de oxigênio atmosférico por estes locais. Desse modo, todas as conexões das mangueiras foram trocadas, e assim, a oxidação parcial de sulfeto no interior das mangueiras cessou.

Figura 6.69 – Formação de uma substância esbranquiçada nas conexões das mangueiras de alimentação, característico de enxofre elementar.

Na condição 5, o tempo das fases não aeradas foi novamente aumentado em 16 minutos (2 h 22 min). A concentração de OD também foi aumentada, visando melhorar a eficiência da nitrificação. No entanto, o processo nitrificante continuou com baixas eficiências ($55,8 \pm 8,2\%$), como pode ser observado na Figura 6.70. Este fato ocorreu em função da presença de maiores concentrações de amônia livre no interior do reator em adição à redução dos períodos aerados. Foram detectados, em média, $10,5 \pm 2,5$ mg N-NH₃ L⁻¹. Como já relatado, concentrações de amônia livre a partir de 10 mg N-NH₃ L⁻¹ causam alguma inibição às bactérias oxidadoras de nitrogênio amoniacal, causando prejuízo à oxidação de nitrogênio amoniacal (ANTHONISEN *et al.*, 1976). Este aumento na concentração de amônia livre ocorreu em função do aumento de pH, causado pela maiores concentrações de sulfeto entrando no reator (Tabela 6.21). As maiores concentrações de sulfeto, por sua vez, foram ocasionadas pela troca das conexões das mangueiras, evitando a oxidação do sulfeto

anteriormente à entrada no reator. No entanto, no interior do reator, a oxidação parcial do sulfeto persistiu, havendo a formação de enxofre elementar detectada visualmente.

Com relação à desnitrificação, a mesma apresentou aumento de atividade com o aumento no período de tempo da fase não aerada, atingindo eficiência média de $81,5 \pm 5,2\%$, após a operação por uma semana na condição 5. Aliado a este fato, o período de tempo decorrido até esta condição, contado a partir do período em que se iniciou o acúmulo de nitrito (há 74 dias), provavelmente possibilitou a adaptação da biomassa desnitrificante à presença de nitrito. Portanto, o tempo de operação também contribuiu para a ocorrência da desnitrificação via nitrito.

Figura 6.70 – Concentrações dos compostos de nitrogênio para o período monitorado durante a condição 5: (▲) N-NH₄⁺ afluente; (Δ) N-NH₄⁺ efluente; (●) N-NO₃⁻ efluente; (●) N-NO₂⁻ efluente; (x) N-N₂ calculado.

No trabalho já citado de Pérez *et al.* (2007), foi atingida eficiência de remoção de nitrogênio acima de 95% em RBS utilizando sulfeto para a desnitrificação autotrófica via nitrito. No entanto, os autores utilizaram biomassa desnitrificante autotrófica previamente adaptada ao processo na presença de sulfeto, sendo enriquecida em reatores operados em batelada. Após ser detectada atividade desnitrificante considerável, este lodo enriquecido foi misturado à biomassa nitrificante no RBS. Mesmo com esta prévia adaptação da biomassa aos

dois processos (nitrificação e desnitrificação) separadamente, a estabilidade da remoção de nitrogênio pela via curta só foi obtido após 30 dias de operação. Portanto, a prévia adaptação da biomassa autotrófica desnitrificante, utilizando nitrito e sulfeto como receptor e aceptor de elétrons, respectivamente, parece ser essencial para o desenvolvimento da desnitrificação via nitrito, simultaneamente à nitrificação, em reatores RBS.

Mahmood *et al.* (2007a) observaram eficiência de 75% de remoção de nitrito após 15 dias de operação de um reator anóxico de fluxo ascendente, aplicando sulfeto e nitrito em concentrações estequiométricas. Entretanto, o lodo utilizado foi proveniente de reator anaeróbio metanogênico, e as condições operacionais (reator exclusivamente anóxico, afluente sintético contendo apenas nitrito como receptor de elétrons e sulfeto como doador de elétrons, operação sob condições litoautotróficas para estabelecimento da desnitrificação) eram favoráveis ao desenvolvimento da biomassa autotrófica desnitrificante. Mahmood *et al.* (2007b) também relataram altas eficiências de remoção de nitrito (78%), utilizando altas concentrações de substratos ($1920 \text{ mg N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$ e $2265 \text{ mg S-SDT L}^{-1}$). Neste caso, o lodo inoculado também foi proveniente de reator anaeróbio metanogênico, enriquecido previamente durante 30 dias às condições desnitrificantes na presença de sulfeto.

Durante todas as condições expostas e avaliadas até a condição 5, sempre foi observado o acúmulo de precipitado de coloração bastante escura no interior das mangueiras e no fundo do reator (Figura 6.71), cuja intensidade variou de acordo com a concentração de sulfeto utilizada. Quanto maior a concentração de sulfeto aplicada, maior era o acúmulo deste precipitado. Este fato foi atribuído à precipitação de ferro pelo sulfeto, formando sulfeto de ferro, composto químico que apresenta coloração escura. Para comprovar a presença de ferro, foi realizada a caracterização química deste precipitado por Espectroscopia de Raios X por Dispersão em Energia (EDX - *Energy-Dispersive X-ray spectroscopy*). A amostra foi coletada da parte inferior do reator. O espectro da amostra analisada está apresentado na Figura 6.72.

(a)

(b)

Figura 6.71 – Acúmulo de precipitado de coloração escura (a) no interior das mangueiras e (b) na parte inferior do reator, variável de acordo com a concentração de sulfeto aplicada.

Figura 6.72 – Caracterização química do precipitado formado na parte inferior do reator por Espectroscopia de Raios X por Dispersão em Energia (EDX), ao final da condição 5.

Os principais elementos detectados foram enxofre, oxigênio, ferro, cromo e cálcio, nas proporções de 34,0%, 54,3%, 2,0%, 3,6% e 6,1%, respectivamente, da amostra. Portanto, a precipitação de outros elementos traços, como cálcio e cromo, também ocorreu. Visto que tais elementos são essenciais para a atividade das enzimas que catalisam as reações envolvidas na nitrificação e desnitrificação (RICHARDSON E WATMOUGH, 1999), a precipitação daqueles pelo sulfeto estaria contribuindo para a dificuldade no estabelecimento de ambos os processos.

Tendo em vista que a precipitação com sulfeto ocorre de acordo com a equação (6.4), apresentada na subseção 6.2.1.2, os valores altos de pH estariam contribuindo para a ocorrência da precipitação. Na faixa de pH em que o reator operava (8 – 9), grande parte do sulfeto estaria na forma de S^{2-} , forma química na qual ocorre a precipitação. Portanto, na condição 6, o pH do afluente do reator foi reduzido para valores próximos de 7,5, na tentativa de reduzir a ocorrência de precipitação. A concentração de sulfeto aplicada também foi reduzida para valores próximos da estequiometria relativa ao nitrito, considerando apenas a parcela de nitrogênio amoniacal que estava sendo consumida ($\sim 20 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$). Sendo assim, cerca de $18 \text{ mg S-SDT L}^{-1}$ deveriam ser adicionados.

O ajuste no pH foi realizado por meio da adição de HCl concentrado no recipiente em que era coletado o efluente do reator UASB. O valor final do pH deste efluente ficou em torno de 6,0, mas quando ocorria a mistura com a solução concentrada de sulfeto, anteriormente à entrada no reator nitrificante/desnitrificante, o valor do pH era elevado para valores próximos de 7,5. No entanto, o ajuste do pH se tornou totalmente dependente da concentração de sulfeto. Portanto, caso a concentração de sulfeto fosse reduzida, o pH da alimentação que entrava no reator também era reduzida.

O comportamento do pH de acordo com a concentração de sulfeto está apresentado na Figura 6.73. Observou-se que no dia 268 houve uma queda abrupta na concentração de sulfeto

que alimentava o reator, ocasionada pelo escape de sulfeto, na forma de gás, do frasco de alimentação. A bexiga preenchida com gás N_2 (100%), que mantinha a pressão dentro do frasco, murchou durante a noite, ocasionando a diminuição da concentração de sulfeto dissolvido em função do escape de H_2S , segundo a Lei de Henry. Desse modo, o pH do meio líquido afluente baixou para próximo de 6, enquanto o efluente atingiu valor menor, prejudicando, principalmente, a nitrificação, como apresentado na Figura 6.74. De acordo com Fdz-Polanco *et al.* (1996), em valores de $pH < 6$, a atividade das bactérias oxidadoras de nitrogênio amoniacal e de nitrito diminui, mesmo na ausência de amônia livre, mas o quociente [oxidadoras de nitrogênio amoniacal/oxidadoras de nitrito] se eleva, havendo o acúmulo de nitrito no sistema. Jiménez *et al.* (2011) também constataram inibição às bactérias oxidadoras de nitrito em pH em torno de 6,5. No entanto, ao contrário do relatado, observou-se o acúmulo de nitrato no reator, indicando que as bactérias oxidadoras de nitrito foram recuperadas. Portanto, a inibição por amônia livre pareceu ser o fator mais importante para a redução da atividade das bactérias oxidadoras de nitrito, uma vez que, nesta condição, ao contrário das outras, as concentrações de amônia livre no interior do reator não ultrapassaram o valor de $1,5 \text{ mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$.

Figura 6.73 – Valores medidos de pH em função da concentração de sulfeto aplicada na condição 6: (●) sulfeto afluente; (■) pH afluente e (□) pH efluente.

Figura 6.74 – Concentrações dos compostos de nitrogênio para o período monitorado durante a condição 6: (▲) N-NH₄⁺ afluente; (Δ) N-NH₄⁺ efluente; (●) N-NO₃⁻ efluente; (●) N-NO₂⁻ efluente; (X) N-N₂ calculado.

A nitrificação permaneceu com eficiência satisfatória ($78,2 \pm 8,6\%$) no período anterior à redução do pH para 6. Neste período, o pH médio na entrada do reator era de $7,6 \pm 0,4$ e a alcalinidade a bicarbonato era suficiente ($370,0 \pm 45,8 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$). Após a queda abrupta do pH, a eficiência decresceu para $58,0 \pm 9,4\%$, sendo que, no dia da queda do pH (268), a alcalinidade fornecida se tornou insuficiente ($89,3 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$), e as bactérias oxidadoras de nitrogênio amoniacal foram afetadas. Mesmo após a recuperação do pH e da alcalinidade, a atividade de tais bactérias permaneceu baixa. Carrera *et al.* (2004) também constataram o acúmulo de nitrogênio amoniacal em função da limitação da alcalinidade no sistema. Entretanto, a nitrificação foi recuperada por meio da diminuição da taxa de carregamento de nitrogênio e do controle do pH em 7,5. Vale ressaltar que, na presente pesquisa, após a queda brusca do pH, o reator foi monitorado somente por mais 2 dias. Portanto, a recuperação da nitrificação não pôde ser avaliada, mas pode se afirmar que este processo apresentou sinais de melhora, com tênue acréscimo na eficiência de 46,7% para 65,4% nos dias 269 e 270, respectivamente. Nestes dias, o pH ficou em torno de 7,9.

Com relação à desnitrificação, a mesma permaneceu instável durante todo o período monitorado. Pela Figura 6.74, observa-se que, de modo geral, quando havia a formação de

nitrito, os valores calculados da concentração de N-N₂ formado eram mais baixos, reforçando a hipótese levantada anteriormente (condição 3) sobre a inibição da desnitrificação pela presença de nitrito. Este fato se tornou mais marcante a partir do dia 268, em que a concentração de nitrito formado foi nula, e a eficiência de desnitrificação apresentou melhora de 43,5% para 64,6%. Neste caso, o principal produto da nitrificação era nitrato e, portanto, a desnitrificação deveria estar ocorrendo a partir deste composto, e não pela via curta. Sendo assim, inferiu-se que a comunidade desnitrificante estabelecida no reator estaria mais adaptada ao uso de nitrato como receptor de elétrons, não sendo necessário um longo período de aclimação como foi observado no caso da via curta (descrito na condição 5). Alguns autores também reportaram a dificuldade do uso de nitrito na desnitrificação em função da toxicidade deste composto, especificamente na forma de ácido nitroso não-ionizado (ABELING E SEYFRIED, 1992; GLASS *et al.*, 1997; GLASS E SILVERSTEIN, 1998).

6.3.2 Ensaios complementares

Primeiro ensaio

O primeiro ensaio complementar, para a verificação da ocorrência dos processos ANAMMOX e RDNA, foi realizado durante a condição 1B, na qual se observou a presença de nitrogênio amoniacal ($10,6 \pm 4,2$ mg N L⁻¹), nitrato ($17,2 \pm 5,6$ mg N L⁻¹) e nitrito ($9,9 \pm 2,9$ mg N L⁻¹) no efluente do RLFBAS durante todo o período monitorado, enquanto que a desnitrificação autotrófica com uso de sulfeto foi praticamente nula. Portanto, em um mesmo

experimento, foram investigadas as rotas preferenciais utilizadas pelos microrganismos, presentes no reator nitrificante/desnitrificante, sob condições específicas.

Na Figura 6.75, estão apresentados os perfis temporais de concentração dos compostos de nitrogênio e enxofre, ao longo de 24 horas, para as 3 condições avaliadas relativamente à presença do doador de elétrons. As respectivas concentrações molares dos compostos analisados ao longo do tempo do ensaio estão apresentadas na Tabela 6.22. A ocorrência da RDNA foi descartada, uma vez que em todas as condições avaliadas houve o consumo de nitrogênio amoniacal. Visto que o meio líquido era isento de OD, já que houve o fluxionamento de gás N₂ no meio líquido (subseção 5.4.5), a ocorrência de nitrificação também foi desconsiderada. Apesar de não ter sido retirado o oxigênio atmosférico presente no *headspace* de 50 mL dos frascos, a possibilidade do mesmo ter sido solubilizado no meio era remota, considerando os princípios da Lei de Henry. Mesmo que houvesse a solubilização do oxigênio, a concentração resultante do mesmo no líquido seria insuficiente para oxidar a concentração de nitrogênio amoniacal que foi consumida ($10,3 \pm 1,1$ mg N-NH₄⁺ L⁻¹, considerando as 3 condições ensaiadas). Portanto, a oxidação de nitrogênio amoniacal provavelmente ocorreu em condições anaeróbias.

Figura 6.75 – Concentrações dos compostos (▲) N-NH₄⁺, (●) N-NO₃⁻, (●) N-NO₂⁻, (■) S-SDT e (□) S-SO₄²⁻ durante os perfis temporais realizado para o primeiro ensaio complementar, sob diferentes concentrações de sulfeto aplicadas: (a) ausência de sulfeto; (b) 9 mg S-SDT L⁻¹; (c) 19 mg S-SDT L⁻¹.

Tabela 6.22 – Concentrações molares médias (mM) dos compostos de nitrogênio e enxofre, ao longo de 24 horas, para as três condições avaliadas durante o primeiro ensaio complementar.

Condição avaliada	Tempo (h)	Concentração molar (mM)				
		S-SDT	S-SO ₄ ⁻²	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₂ ⁻	N-NO ₃ ⁻
1 (0 mg S-SDT L ⁻¹)	0	n.a	0,15 ± 0,09	1,05 ± 0,00	1,04 ± 0,00	0,99 ± 0,00
	2	n.a	0,10 ± 0,01	0,90 ± 0,03	1,16 ± 0,21	1,02 ± 0,07
	4	n.a	0,10 ± 0,02	0,75 ± 0,08	1,14 ± 0,06	1,09 ± 0,10
	6	n.a	0,09 ± 0,03	0,61 ± 0,05	1,16 ± 0,01	1,18 ± 0,05
	8	n.a	0,10 ± 0,00	0,63 ± 0,03	1,16 ± 0,12	1,05 ± 0,18
	10	n.a	0,11 ± 0,02	0,61 ± 0,04	1,14 ± 0,08	1,18 ± 0,05
	12	n.a	0,12 ± 0,04	0,54 ± 0,09	1,16 ± 0,09	1,18 ± 0,03
	14	n.a	0,09 ± 0,05	0,44 ± 0,04	1,20 ± 0,02	1,24 ± 0,05
	24	n.a	0,10 ± 0,01	0,41 ± 0,11	1,17 ± 0,05	1,27 ± 0,08
2 (9 mg S-SDT L ⁻¹)	0	0,26 ± 0,01	0,15 ± 0,02	1,12 ± 0,00	1,04 ± 0,14	0,92 ± 0,25
	2	0,00 ± 0,00	0,16 ± 0,03	1,10 ± 0,03	1,01 ± 0,02	0,89 ± 0,02
	4	0,00 ± 0,00	0,25 ± 0,01	0,98 ± 0,13	1,00 ± 0,04	0,88 ± 0,02
	6	0,00 ± 0,00	0,24 ± 0,04	0,81 ± 0,01	1,03 ± 0,05	0,88 ± 0,05
	8	0,00 ± 0,00	0,24 ± 0,00	0,75 ± 0,06	1,15 ± 0,06	0,90 ± 0,02
	10	0,00 ± 0,00	0,24 ± 0,01	0,61 ± 0,02	1,16 ± 0,16	0,90 ± 0,09
	12	0,00 ± 0,00	0,30 ± 0,04	0,55 ± 0,06	1,24 ± 0,00	0,95 ± 0,08
	14	0,00 ± 0,00	0,28 ± 0,03	0,53 ± 0,06	1,33 ± 0,07	0,86 ± 0,02
	24	0,00 ± 0,00	0,28 ± 0,05	0,31 ± 0,08	1,44 ± 0,19	0,95 ± 0,01
3 (19 mg S-SDT L ⁻¹)	0	0,60 ± 0,00	0,26 ± 0,07	1,12 ± 0,01	1,00 ± 0,03	0,91 ± 0,06
	2	0,10 ± 0,14	0,22 ± 0,05	1,14 ± 0,02	1,10 ± 0,14	0,96 ± 0,11
	4	0,00 ± 0,00	0,26 ± 0,02	0,98 ± 0,11	1,00 ± 0,01	0,80 ± 0,00
	6	0,00 ± 0,00	0,36 ± 0,00	0,90 ± 0,14	1,11 ± 0,01	0,82 ± 0,03
	8	0,00 ± 0,00	0,42 ± 0,06	0,85 ± 0,17	1,17 ± 0,01	0,85 ± 0,05
	10	0,00 ± 0,00	0,44 ± 0,09	0,69 ± 0,20	1,05 ± 0,22	0,78 ± 0,16
	12	0,00 ± 0,00	0,46 ± 0,05	0,64 ± 0,24	1,21 ± 0,10	0,78 ± 0,13
	14	0,00 ± 0,00	0,42 ± 0,03	0,68 ± 0,23	1,18 ± 0,07	0,76 ± 0,05
	24	0,00 ± 0,00	0,47 ± 0,07	0,38 ± 0,23	1,45 ± 0,03	0,69 ± 0,04

n.a = não se aplica.

Para a condição 1, observou-se o consumo de $8,92 \pm 0,58$ mg N-NH₄⁺ L⁻¹, com baixa produção de nitrato ($3,89 \pm 1,12$ mg N-NO₃⁻ L⁻¹) e de nitrito ($1,87 \pm 0,66$ mg N-NO₃⁻ L⁻¹). Como o consumo de nitrito não foi detectado para a confirmação da ocorrência do processo ANAMMOX, levantou-se a hipótese da oxidação anaeróbia de nitrogênio amoniacal integrada à redução de sulfato, uma vez que o consumo deste composto foi detectado.

Conforme descrito na subseção 4.2.2.3, este processo envolve a formação de nitrito e a reação ANAMMOX, como demonstrado nas equações (4.7), (4.8) e (4.9).

Como houve produção de nitrito, a ocorrência da reação descrita pela equação (4.7) poderia ser considerada. No entanto, a redução de sulfato estaria ocorrendo parcialmente a compostos intermediários de enxofre, visto que a formação de sulfeto não foi detectada em nenhum momento. Além disso, a concentração molar de nitrito formado ($0,13 \pm 0,05$ mM) não correspondeu à concentração molar de nitrogênio amoniacal consumido, equivalente a $0,64 \pm 0,11$ mM (Tabela 6.22). Adicionalmente, também houve a geração de nitrato como produto final. Portanto, outras rotas metabólicas, envolvendo a oxidação anaeróbia de nitrogênio amoniacal e redução de sulfato, estariam ocorrendo, com a formação de nitrito/nitrato e compostos intermediários de enxofre.

Apesar de a ocorrência destes processos ser plausível, a concentração de sulfato no sistema era limitante, não sendo suficiente para oxidar todo o nitrogênio amoniacal medido. Por meio da Tabela 6.22, observou-se que a concentração molar de nitrogênio amoniacal consumido foi superior à concentração de sulfato consumido ($0,05 \pm 0,02$ mM). Considerando a estequiometria das reações envolvidas no processo SURAMOX, deveria haver o consumo de pelo menos $0,32$ mM de $S-SO_4^{-2}$. Desse modo, a oxidação anaeróbia de nitrogênio amoniacal estaria ocorrendo com o uso de outros receptores de elétrons existentes no meio líquido, que não puderam ser identificados. Existem, na literatura, relatos sobre processos que utilizam óxidos de ferro e manganês como receptores de elétrons para a oxidação de nitrogênio amoniacal durante a mineralização de matéria orgânica, principalmente em ambientes marinhos (HULTH *et al.*, 2005). Apesar de a biomassa do reator nitrificante/desnitrificante, utilizada neste ensaio, sempre consumir parte da matéria orgânica de difícil degradação presente no efluente do reator UASB (medidas de DQO durante toda a operação do reator nitrificante/desnitrificante), não se pode afirmar que houve a formação de

óxidos de ferro ou manganês durante a degradação da matéria orgânica. Portanto, não foi possível identificar os possíveis receptores de elétrons para a oxidação anaeróbia de nitrogênio amoniacal, mas inferiu-se que os mesmos foram provenientes do consumo da matéria orgânica de difícil degradação. Outra hipótese é a de que parte do nitrogênio amoniacal estivesse sendo utilizado para a síntese microbiana.

Para as outras condições avaliadas, com aplicação de 9 mg S-SDT L⁻¹ e 19 mg S-SDT L⁻¹, foi constatado o consumo de $11,5 \pm 1,1$ mg N-NH₄⁺ L⁻¹ ($0,82 \pm 0,08$ mM) e $10,3 \pm 3,2$ mg N-NH₄⁺ L⁻¹ ($0,74 \pm 0,23$ mM), respectivamente. Nestes casos, as respectivas concentrações de nitrito formado foram $5,7 \pm 0,6$ mg N-NO₂⁻ L⁻¹ ($0,41 \pm 0,04$ mM) e $6,3 \pm 0,9$ mg N-NO₂⁻ L⁻¹ ($0,45 \pm 0,06$ mM). No entanto, as concentrações de nitrato permaneceram estáveis (condição 2) ou apresentaram algum decréscimo ao longo do tempo (condição 3), fato que indicaria pouca ou nenhuma ocorrência de desnitrificação. Visto que na ausência de sulfeto houve a formação de nitrato durante o período de 24 horas, inferiu-se que, nos experimentos com adição de sulfeto, também estaria sendo produzido nitrato, que era rapidamente consumido no processo desnitrificante. Além disso, o doador de elétrons inorgânico foi prontamente consumido nas primeiras horas dos dois experimentos. Como este doador de elétrons estava em concentrações limitantes, o processo desnitrificante provavelmente ocorreu parcialmente, havendo formação de nitrito. Este fato explicaria as maiores concentrações medidas deste composto em relação ao experimento sem aplicação de sulfeto. Adicionalmente, a desnitrificação parcial com formação de nitrito é comumente relatada quando há limitação da fonte de elétrons (REYES ÁVILA *et al.*, 2004; BERISTAIN-CARDOSO *et al.*, 2006; MORAES *et al.*, 2011).

A possível formação de nitrato estaria ocorrendo a partir da oxidação anaeróbia de nitrogênio amoniacal, assim como foi constatado no experimento sem a adição de sulfeto. Os processos combinados da oxidação anaeróbia de nitrogênio amoniacal e redução de sulfato

também poderiam ter ocorrido. Visto que a concentração de sulfeto consumido não correspondeu à concentração de sulfato formado, existe a hipótese de consumo de sulfato para a oxidação de nitrogênio amoniacal. No entanto, o consumo de nitrogênio amoniacal medido nestes dois experimentos foi maior que a disponibilidade de sulfato para a oxidação: deveria haver o consumo de pelo menos 0,41 e 0,37 mM de $S-SO_4^{-2}$ nos experimentos referentes às condições 2 e 3, respectivamente, considerando a estequiometria das reações envolvidas no processo SURAMOX. Sendo assim, as hipóteses levantadas no experimento sem a adição de sulfeto também se aplicam a estes casos.

Diante destes resultados, a hipótese da existência de microrganismos responsáveis pela oxidação anaeróbia de nitrogênio amoniacal no reator nitrificante/desnitrificante foi sustentada, enquanto que a ocorrência de RDNA pôde ser desconsiderada. Entretanto, as fontes de elétrons para a oxidação anaeróbia de nitrogênio amoniacal não puderam ser identificadas.

Segundo ensaio

Na Figura 6.76 está apresentado o comportamento dos compostos de nitrogênio e enxofre durante os perfis temporais de 30 horas, realizados para o segundo ensaio, contemplando as 4 condições avaliadas com relação à concentração de sulfeto. Este ensaio foi realizado quando observada razoável eficiência de desnitrificação de forma estável, sendo a biomassa retirada do reator nitrificante/desnitrificante ao final da condição 2B. O objetivo principal destes ensaios foi avaliar a influência da concentração de sulfeto sobre a biomassa estabelecida no reator supracitado.

Figura 6.76 – Concentrações dos compostos ($\blacktriangle$) N-NH_4^+ , ($\bullet$) N-NO_3^- , ($\bullet$) N-NO_2^- , ($\blacksquare$) S-SDT e ($\square$) produção de S-SO_4^{2-} durante os perfis temporais realizado para o segundo ensaio complementar, sob diferentes concentrações de sulfeto aplicadas: (a) ausência de sulfeto; (b) 30 mg S-SDT L^{-1} ; (c) 50 mg S-SDT L^{-1} ; (d) 80 mg S-SDT L^{-1} .

Na ausência de sulfeto (Figura 6.76a), o comportamento dos compostos de nitrogênio e enxofre foi semelhante ao primeiro ensaio complementar: consumo de nitrogênio amoniacal ($0,80 \pm 0,24$ mM) e sulfato ($0,05 \pm 0,07$ mM) e produção de nitrato ($0,07 \pm 0,18$ mM). A diferença consistiu nas baixas concentrações de nitrito, as quais permaneceram estáveis ($0,22 \pm 0,04$ mM). Portanto, a oxidação anaeróbia de nitrogênio amoniacal também ocorreu neste experimento, e utilizou fontes receptoras de elétrons complementares ao sulfato, já que este estava em concentrações limitantes. De modo geral, os produtos finais detectados foram nitrato e intermediários de enxofre, uma vez que sulfeto não foi detectado em nenhum momento. Apenas no período inicial (até 4 horas) e final (30 horas,) e pontualmente às 14 horas, foi detectado consumo de nitrogênio amoniacal juntamente com nitrato, indicando que este último poderia ser utilizado como receptor de elétrons na oxidação anaeróbia de nitrogênio amoniacal. Este processo já foi relatado por alguns autores (BOCK *et al.*, 1988; HULTH *et al.*, 2005; SUMINO *et al.*, 2006).

Quando foi aplicada a concentração de 30 mg S-SDT L⁻¹ (Figura 6.76b), constatou-se a ocorrência de desnitrificação autotrófica parcial, com consumo completo de sulfeto ($1,02 \pm 0,01$ mM) e formação de nitrito ($0,53 \pm 0,02$ mM) e sulfato ($0,52 \pm 0,06$ mM). Entretanto, a produção de sulfato ficou abaixo da esperada, caso todo o sulfeto tivesse sido completamente convertido a sulfato. Portanto, houve a formação de compostos intermediários de enxofre, que podem ter sido utilizados como doadores de elétrons para a desnitrificação. Esta hipótese foi corroborada pelo fato de que, mesmo após o consumo completo de sulfeto, o nitrato continuou a ser consumido e a formação de sulfato foi iniciada. Desse modo, os elétrons foram provenientes de outras fontes de elétrons, intermediárias do processo de oxidação de sulfeto. Considerando a reação com uso de tiosulfato (intermediário da oxidação de sulfeto) como doador de elétrons, de acordo com a reação proposta por Beristain-Cardoso *et al.* (2006) (equação 4.13, subseção 4.2.2.4), seriam utilizados cerca de 16,0 mg S L⁻¹ para a

desnitrificação de nitrato detectada. Este valor se aproxima da concentração de sulfato medida ao final do experimento ($16,6 \pm 2,0 \text{ mg S L}^{-1}$), tornado esta hipótese viável.

Outra hipótese para o balanço de massa de enxofre não ter sido fechado é a de que tenha havido redução de sulfato durante a oxidação anaeróbia de nitrogênio amoniacal, visto que o consumo de $0,80 \pm 0,26 \text{ mM}$ deste composto foi detectado. Neste processo, poderiam ser formados compostos intermediários de enxofre, nitrito e nitrato, sendo que este último estava sendo utilizado no processo desnitrificante (consumo de $0,70 \pm 0,16 \text{ mM}$). Além disso, como explicado no subitem referente ao primeiro ensaio, a possibilidade de outras fontes receptoras de elétrons para a oxidação de nitrogênio amoniacal presentes no meio líquido, bem como a síntese de novas células, poderiam ter contribuído para o consumo de nitrogênio amoniacal.

Para a condição seguinte, com aplicação de sulfeto em excesso ($50 \text{ mg S-SDT L}^{-1}$) (Figura 6.76c), o comportamento dos compostos analisados foi semelhante à condição anterior. A desnitrificação parcial de $1,10 \pm 0,40 \text{ mM}$ de nitrato com a formação de $1,10 \pm 0,12 \text{ mM}$ de nitrito e o consumo completo de sulfeto ($1,73 \pm 0,20 \text{ mM}$) com a formação de sulfato ($0,94 \pm 0,06 \text{ mM}$) inferior ao valor esperado sugerem a formação de compostos intermediários de enxofre. Este fato foi corroborado pela alteração na coloração do meio líquido, o qual se tornou turvo e esbranquiçado nas primeiras horas do experimento, além de ter ocorrido o encobrimento de algumas matrizes de espuma por partículas brancas (Figura 6.77). Estas evidências visuais indicam a formação de enxofre elementar, comumente reportadas quando excesso de sulfeto é utilizado (BERISTAIN-CARDOSO *et al.*, 2006; MORAES *et al.*, 2011). Após este período, o meio líquido continuou turvo, mas com coloração esbranquiçada menos intensa, enquanto que as partículas brancas persistiram.

O uso dos intermediários de enxofre como doadores de elétrons também foi considerado, já que a desnitrificação persistiu mesmo quando todo o sulfeto havia sido

consumido. Considerando a desnitrificação autotrófica a partir de enxofre elementar (equação 4.12, subseção 4.2.2.4), seriam necessários aproximadamente $56,0 \text{ mg S}^0 \text{ L}^{-1}$, valor este superior ao medido experimentalmente ao final do ensaio ($30,1 \pm 1,8 \text{ mg S L}^{-1}$). Sendo assim, outros intermediários de enxofre poderiam ter fornecido elétrons para a desnitrificação, como é o caso do tiosulfato. Neste caso, seriam utilizados aproximadamente $33,9 \text{ mg S L}^{-1}$, valor que se aproxima da concentração de sulfato formado ao final do experimento. Entretanto, a impossibilidade de medir as concentrações destes intermediários ao longo do perfil impediu que estes doadores de elétrons tivessem sido precisamente identificados.

Figura 6.77 – Alterações observadas visualmente durante o segundo ensaio complementar, com adição de $50 \text{ mg S-SDT L}^{-1}$, após o consumo de sulfeto: (a) meio líquido turvo e esbranquiçado e (b) camadas esbranquiçadas ao redor de algumas matrizes de espumas.

Também foi observado consumo de nitrogênio amoniacal durante o período monitorado ($5,3 \pm 2,5 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ ou $0,38 \pm 0,17 \text{ mM}$), o qual foi atribuído ao processo oxidativo em condições anaeróbias, assim como na condição anterior. Vale ressaltar que este consumo foi inferior ao medido nas condições anteriores, provavelmente em função do aumento da concentração de sulfeto aplicada. Neste caso, a relação molar $\text{N-NH}_4^+/\text{S-SDT}$ correspondeu a 0,8. Visto que sulfeto é um composto tóxico, a concentração utilizada pode ter causado alguma inibição ao processo de oxidação anaeróbia de nitrogênio amoniacal. O uso de sulfato como receptor de elétrons para tal processo, com geração de compostos

intermediários de enxofre, poderia ter contribuído para o fato de o balanço de massa de enxofre não ter sido fechado. O consumo de nitrogênio para síntese de novas células também foi considerado.

Durante o experimento com aplicação de $80 \text{ mg S-SDT L}^{-1}$ (Figura 6.76d), o mesmo comportamento da condição anterior foi observado, relativamente ao processo desnitrificante com uso de sulfeto. O consumo de nitrato ($1,69 \pm 0,42 \text{ mM}$) ocorreu quase completamente, a formação de sulfato ($1,36 \pm 0,05 \text{ mM}$) foi inferior ao consumo de sulfeto ($2,60 \pm 0,34 \text{ mM}$) e detectou-se a formação de nitrito ($0,89 \pm 0,17 \text{ mM}$). A alteração da coloração do meio líquido e o surgimento de partículas brancas em alguns cubos de espuma também foram observados. Portanto, as mesmas considerações feitas anteriormente foram reafirmadas: desnitrificação autotrófica com uso de doadores de elétrons intermediários do processo de oxidação de sulfeto e ocorrência de desnitrificação parcial a nitrito.

De maneira geral, o consumo de nitrogênio amoniacal foi baixo em relação às outras condições, em média de $3,4 \pm 0,1 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$, equivalente a $0,24 \pm 0,01 \text{ mM}$. Portanto, inferiu-se que altas concentrações de sulfeto, correspondendo à relação molar $\text{N-NH}_4^+/\text{S-SDT}$ de 0,6, foram inibitórias ao processo de oxidação anaeróbia de nitrogênio amoniacal. Na Figura 6.78, pode-se observar o consumo de nitrogênio amoniacal em função da relação molar $\text{N-NH}_4^+/\text{S-SDT}$, para as condições avaliadas neste segundo ensaio complementar. Observa-se que, quanto menor a relação molar $\text{N-NH}_4^+/\text{S-SDT}$, menor é o consumo de nitrogênio amoniacal, ou seja, o aumento da concentração de sulfeto no sistema afetou negativamente o processo de oxidação anaeróbia de nitrogênio amoniacal.

Figura 6.78 – Consumo de nitrogênio amoniaco em função da relação molar N-NH₄⁺/S-SDT para o segundo ensaio complementar: influência da concentração de sulfeto na oxidação anaeróbia de nitrogênio amoniaco.

Este ensaio também permitiu observar que a biomassa desnitrificante autotrófica não estava totalmente adaptada, uma vez que, mesmo quando o doador de elétrons estava em excesso relativamente à estequiometria (50 mg S-SDT L⁻¹ e 80 mg S-SDT L⁻¹), a desnitrificação parcial com formação de nitrito foi detectada. Para as condições com 50 mg S-SDT L⁻¹ e 80 mg S-SDT L⁻¹, as relações molares N-NO₃⁻/S-SDT corresponderam a 1,0 e 0,7, abaixo da relação estequiométrica de 1,6. Relatos na literatura apontam que o excesso do doador de elétrons promove a desnitrificação dos compostos oxidados de nitrogênio de forma mais eficiente (KRISHNAKUMAR e MANILAL, 1999; MANCONI *et al.*, 2007; MORAES *et al.*, 2011). Até mesmo os experimentos da 1ª e 2ª etapa desta pesquisa revelaram que o excesso de sulfeto com relação ao nitrato promoveu melhores eficiências de remoção e valores maiores da constante cinética. Portanto, a biomassa nitrificante/desnitrificante do RLFBAS não havia se adaptado plenamente às condições operacionais, promovendo a redução dos compostos oxidados de nitrogênio de forma não tão eficiente. Esta afirmação dá suporte ao fato de que no período monitorado durante a condição 2B, na qual a biomassa foi coletada para este ensaio, foi detectada a formação de nitrito no efluente, e a eficiência média da desnitrificação correspondeu a 53% (subseção 6.3.1.3).

Terceiro ensaio

O comportamento dos compostos de nitrogênio e enxofre durante os perfis temporais, para o ensaio 3, está apresentado na Figura 6.79. Os experimentos foram realizados em triplicatas. No entanto, apesar de os reatores terem sido submetidos às mesmas condições experimentais, os resultados obtidos para as triplicatas não tiveram reprodutibilidade, exceto para os reatores 1 e 2, que apresentaram comportamentos mais semelhantes. De qualquer forma, os resultados para os três reatores estão apresentados separadamente.

Para os reatores 1 e 2, nas primeiras horas, observou-se o consumo de nitrogênio amoniacal e sulfato, sinalizando para a redução de sulfato concomitantemente à oxidação anaeróbia de nitrogênio amoniacal. Neste processo, houve a produção de nitrito. Sequencialmente ao consumo inicial de nitrogênio amoniacal, a concentração deste apresentou um pequeno aumento, provavelmente em função da endogenia de alguns microrganismos que não encontraram condições favoráveis ao seu desenvolvimento. Após este período, a diminuição da concentração de nitrogênio amoniacal ocorreu juntamente com a redução de sulfato. Também se constatou o consumo do nitrito previamente formado, indicando a ocorrência do processo ANAMMOX. Considerando todo o período monitorado, detectou-se o consumo de $12,64 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ (0,90 mM) e $15,78 \text{ mg S-SO}_4^{2-} \text{ L}^{-1}$ (0,49 mM) para o reator 1, e $12,27 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ (0,88 mM) e $13,33 \text{ mg S-SO}_4^{2-} \text{ L}^{-1}$ (0,41 mM) para o reator 2. Com base na reação de redução de sulfato integrada à oxidação anaeróbia de nitrogênio amoniacal proposta por Fdz-Polanco *et al.* (2001), apresentada na equação (4.6), as concentrações de sulfato consumidas nos reatores 1 e 2 se aproximaram da requerida para a oxidação de nitrogênio amoniacal que foi medida nestes reatores. Seriam necessários o consumo de $14,4 \text{ mg S-SO}_4^{2-} \text{ L}^{-1}$ (0,45 mM) e $14,0 \text{ mg S-SO}_4^{2-} \text{ L}^{-1}$ (0,44 mM) para os reatores 1 e 2, respectivamente. No entanto, este processo não gerou nitrogênio molecular como

produto final, tendo sido produzido nitrato: 18,25 mg N-NO₃⁻ L⁻¹ (1,30 mM) para o reator 1, e 14,32 mg N-NO₃⁻ L⁻¹ (1,02 mM) para o reator 2. Não foi detectado sulfeto em nenhum momento. Portanto, a redução de sulfato ocorreu a compostos intermediários de enxofre.

Para o reator 3, a produção de nitrato iniciou-se logo nas primeiras horas e a formação de nitrito foi inferior à observada nos reatores 1 e 2. A pequena concentração de nitrito formada foi consumida em seguida, sinalizando para o uso de nitrito como receptor de elétrons no processo ANAMMOX, uma vez que o consumo de nitrogênio amoniacal foi observado durante todo período. Juntamente com a oxidação de nitrogênio amoniacal, observou-se a redução de sulfato. Considerando todo o período monitorado, foram consumidos 18,83 mg N-NH₄⁺ L⁻¹ (1,35 mM) e 15,30 mg S-SO₄²⁻ L⁻¹ (0,48 mM), havendo a formação de 21,55 mg N-NO₃⁻ L⁻¹ (1,54 mM). Neste caso, a concentração medida de sulfato consumido ficou abaixo da requerida (21,50 mg S-SO₄²⁻ L⁻¹ ou 0,67 mM), com base na equação 4.5. Portanto, como constatado no primeiro e segundo ensaios complementares, outras fontes receptoras de elétrons, presentes no efluente do reator UASB, foram utilizadas para a oxidação anaeróbia de nitrogênio amoniacal, complementarmente ao sulfato. Os produtos finais da redução de sulfato também foram compostos intermediários de enxofre, visto que não foi detectado sulfeto durante o período monitorado.

Mesmo não havendo o consumo completo dos substratos analisados em todos os reatores, os processos biológicos sugeridos neste ensaio complementar não persistiram por muito tempo. Após cerca de 15 dias, a biomassa imobilizada nas espumas começou adquirir uma coloração bastante escura, além de haver desprendimento para o fundo, como pode ser visualizado na Figura 6.80. Estas características indicam a diminuição e/ou supressão da atividade microbiológica. O reator 1 (no centro na imagem) foi o que apresentou menos desprendimento e menor alteração na cor da biomassa. Entretanto, não apresentou o maior consumo de nitrogênio amoniacal e de sulfato.

Figura 6.79 – Concentrações de (▲) N-NH_4^+ ; (●) N-NO_3^- ; (●) N-NO_2^- ; (□) S-SO_4^{2-} ao longo do tempo durante o terceiro ensaio complementar: (a) reator 1; (b) reator 2; (c) reator 3.

Figura 6.80 – Desprendimento e escurecimento da biomassa imobilizada nos cubos de espuma, ao final do terceiro ensaio complementar, indicando redução e/ou supressão da atividade microbiana.

De maneira geral, por meio destes experimentos constatou-se a possível ocorrência dos processos ANAMMOX e SURAMOX. No entanto, este último teve como produtos finais nitrato e compostos intermediários de enxofre. Schrum *et al.* (2011) apresentaram múltiplas reações e combinação de reações potenciais que constituem a redução de sulfato integrada a oxidação de nitrogênio amoniacal. Entre elas, foi descrita a reação de oxidação de amônia a nitrato, acoplada à desnitrificação heterotrófica, como mostrado na combinação das equações (6.5), (6.6) e (6.7). Todavia, na reação parcial com formação de nitrato apresentada, deve haver a produção de sulfeto, que não foi detectado no presente ensaio.

Por outro lado, Yang *et al.* (2009) observaram a formação de enxofre elementar e nitrogênio gasoso em experimentos operados em batelada, quando investigaram a remoção simultânea de nitrogênio amoniacal e sulfato. Fdz-Polanco *et al.* (2001) também observaram a formação de enxofre elementar e nitrogênio molecular no processo SURAMOX, e

constataram que as concentrações de S^{2-} e H_2S foram muito inferiores às esperadas de acordo com a estequiometria da redução de sulfato.

No presente ensaio a formação de enxofre elementar não pôde ser constatada por evidências visuais. No entanto, a formação de enxofre elementar coloidal não foi descartada, visto que, apesar de o meio líquido não apresentar uma coloração esbranquiçada, uma leve turbidez foi observada. Outros intermediários também podem ter sido formados, como tiosulfato ($S_2O_3^{2-}$) e sulfito (SO_3^{2-}).

Diante dos resultados e das possibilidades de diferentes rotas metabólicas na oxidação anaeróbia de nitrogênio amoniacal acoplada à redução de sulfato, algumas reações químicas, que poderiam ter ocorrido, foram propostas (equações 6.8, 6.9 e 6.10). No entanto, a comprovação da ocorrência de uma ou mais dessas reações depende de estudos mais aprofundados envolvendo termodinâmica, microbiologia e bioquímica.

Considerando a possibilidade de ocorrência dessas as reações, sugere-se que a desnitrificação autotrófica observada, nos ensaios anteriores e no RLFBAS, se deu com uso de intermediários de enxofre combinada à oxidação parcial de nitrogênio amoniacal em condições anaeróbias. A ocorrência deste último processo simultaneamente à desnitrificação autotrófica utilizando sulfeto como doador de elétrons foi observada durante o segundo ensaio complementar. Visto que o uso de intermediários de enxofre como doadores de elétrons para a desnitrificação autotrófica também foi constatado, a hipótese de integração dos dois processos supracitados permite explicar adequadamente os resultados obtidos nos vários ensaios.

Quarto ensaio

Para o quarto e último ensaio complementar, a composição do biogás produzido pelo reator UASB, medida por cromatografia gasosa, consistiu em 22,24 mmol CH₄ L⁻¹, 1,84 mmol CO₂ L⁻¹ e 1,36 mmol N₂ L⁻¹. Tendo em vista a impossibilidade de medir a concentração de H₂S no biogás, como explicado na seção 5.5, a mesma foi calculada com base na concentração de S-SDT medida no efluente do reator UASB, resultando em 20,1 ± 4,2 mg S-SDT L⁻¹. De acordo com Lens *et al.* (1998), o equilíbrio entre as formas químicas de sulfeto varia de acordo com o pH, como pode ser visualizado na Figura 6.81. Sabendo que o pH do efluente do reator UASB permaneceu em torno 7,0, concluiu-se que 65% do sulfeto dissolvido medido estaria na forma H₂S. O equilíbrio químico entre H₂S em solução e na fase gasosa é governado pela Lei de Henry, como expresso na equação (6.11) (LENS *et al.*, 1998).

$$H_2S_{(líquido)} = \alpha H_2S_{(gasoso)} \quad (6.11)$$

Em que:

α = coeficiente de absorção (adimensional)

Segundo Wilhelm *et al.* (1977), o coeficiente de absorção para o H₂S a 30°C corresponde a 1,99. Portanto, a fração de H₂S presente no biogás do reator UASB correspondeu teoricamente a 6,6 mg S L⁻¹, valor equivalente a 0,206 mmol S L⁻¹. Finalmente, a composição percentual do biogás resultou em 86,7% de CH₄, 7,2% de CO₂, 5,3% de N₂ e 0,8% de H₂S.

Figura 6.81 – Equilíbrio químico entre as formas de sulfeto de acordo com os valores de pH: (▨) faixa de pH da digestão anaeróbia e (▤) faixa de pH ótimo para digestão metanogênica.
Fonte: LENS *et al.* (1998).

Para o reator 1 (R1), o biogás foi continuamente fornecido, uma vez que este reator foi acoplado ao reator UASB como um selo hídrico. A vazão média de saída do biogás correspondeu a $78,2 \pm 3,75 \text{ mL h}^{-1}$. Considerando a composição do biogás, a vazão de metano e gás sulfídrico entrando em R1 correspondeu a $67,8 \text{ mL CH}_4 \text{ h}^{-1}$ e $0,626 \text{ mL S h}^{-1}$. Para os reatores 2 e 3 (R2 e R3) foram injetados 40 mL de biogás ($34,68 \text{ mL CH}_4$ e $0,32 \text{ mL S}$). As concentrações de nitrato medidas ao longo do tempo para cada reator, após a adição de biogás, estão apresentadas na Figura 6.82. Nitrito e nitrogênio amoniacal não foram detectados em nenhum momento. Os níveis de sulfato ficaram abaixo do limite de detecção ($< 1,7 \text{ mg S-SO}_4^{-2}$).

Figura 6.82 – Concentrações de nitrato ao longo do tempo, após a adição de biogás, para os reatores: (■) R1; (▲) R2; (●) R3.

Observou-se que, a partir de 6 horas houve uma queda abrupta na concentração de nitrato para todos os reatores, indicando a ocorrência efetiva da desnitrificação. Visto que metano era o composto mais abundante no biogás, e que não havia outra fonte de doador de elétrons no meio líquido, inferiu-se que a desnitrificação ocorreu principalmente com uso de metano como doador de elétrons. Além disso, não foi detectada a presença deste gás em R2 e R3 ao final dos perfis temporais. O gás CO₂ também não foi detectado. Victoria e Foresti (2011) também relataram metano como o principal doador de elétrons presente no biogás para a desnitrificação, quando avaliaram o desempenho de um reator nitrificante/desnitrificante compartimentado para o pós-tratamento de efluente de reator UASB tratando esgoto sanitário.

Complementarmente ao uso de metano, a pequena parcela de H₂S no biogás provavelmente foi utilizada também, pois, quando os frascos foram abertos (R2 e R3) ao final do ensaio, o cheiro de “ovo podre”, característico de sulfeto, não foi sentido. Adicionalmente, não foi detectado sulfeto dissolvido no meio líquido. Para R1, que recebeu biogás continuamente ao longo do experimento, observou-se a formação de partículas brancas ao redor das matrizes de espuma, além de a coloração do meio líquido ter se tornado turvo e

esbranquiçado (Figura 6.83). Tais observações evidenciaram a presença de enxofre elementar, e, portanto, a oxidação do sulfeto fornecido no biogás. Desse modo, inferiu-se que a desnitrificação detectada em R1 também utilizou sulfeto presente no biogás como doador de elétrons, complementarmente ao uso de metano. Neste caso, o sulfeto foi oxidado parcialmente a enxofre elementar, visto que, além das evidências visuais, concentrações de sulfato abaixo do limite de detecção foram medidas durante o ensaio.

Figura 6.83 – Alterações observadas apenas em R1 (à esquerda), ao final do quarto ensaio complementar: (a) meio líquido turvo e esbranquiçado e formação de partículas brancas ao redor das matrizes de espuma; (b) detalhe dos cubos de espuma encoberto por partículas brancas.

Vale ressaltar que o consumo um pouco maior de nitrato foi observado em R1, provavelmente em função do fornecimento contínuo do biogás, possibilitando maior disponibilidade dos doadores de elétrons, especificamente o H_2S . Ao contrário dos reatores R2 e R3, a proporção de H_2S em R1 foi maior em função da entrada contínua de biogás. Existem relatos na literatura que evidenciaram a ocorrência da desnitrificação mais facilmente com o uso de compostos de enxofre comparativamente ao uso do metano (HOUBRON *et al.* 1999; GARBOSSA *et al.*, 2005). Portanto, a maior disponibilidade de H_2S no interior de R1 pode ter contribuído para o maior consumo de nitrato.

Os modelos de ordem zero ajustados aos dados experimentais estão apresentados na Figura 6.84. Considerando este modelo, o balanço de massa para os reatores operados em batelada resultou na equação (5.6), apresentada na subseção 5.4.5. Os parâmetros cinéticos específicos aparentes de ordem zero, para os três reatores, estão expostos na Tabela 6.23.

Tabela 6.23 – Parâmetros cinéticos específicos aparentes de ordem zero para consumo de N-NO_3^- com uso de biogás como doador de elétrons, obtidos para cada um dos reatores utilizados no quarto ensaio complementar.

Reatores	Parâmetros cinéticos aparentes de ordem zero (k_0'), $\text{mg N g SSV}^{-1} \text{ L}^{-1}$	Coefficiente de correlação (R^2)
R1	1,141	0,890
R2	1,034	0,804
R3	1,056	0,882

Figura 6.84 – Modelos cinéticos de ordem zero ajustados aos dados experimentais de concentração de nitrogênio, na forma de nitrato, obtidos no quarto ensaio complementar: (■) R1; (▲) R2; (●) R3.

Considerando o modelo de ordem zero, deve-se assumir que as velocidades das reações bioquímicas não são afetadas pelas concentrações dos substratos. Esta condição foi observada neste ensaio, uma vez que os parâmetros cinéticos obtidos para os três reatores apresentaram valores muito próximos, mas o volume de biogás injetado em R1 foi maior que em R2 e R3. No entanto, os fenômenos de transferência de massa não foram considerados, os quais poderiam ter influenciado a obtenção dos parâmetros cinéticos.

Santos *et al.* (2004) também obtiveram modelo de ordem zero para desnitrificação com uso de metano como doador de elétrons. Os experimentos foram conduzidos em reatores operados em batelada, alimentados com efluente sanitário nitrificado sintético e inoculados com biomassa granular de reator UASB. As constantes cinéticas aparentes de ordem zero corresponderam a $0,06 \pm 0,002 \text{ mg N g SVT}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e $0,09 \pm 0,0001 \text{ mg N g SVT}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para dois e quatro meses de operação, respectivamente. Os autores ressaltaram a influência considerável dos fenômenos de transferência de massa sobre os valores dos parâmetros cinéticos obtidos, assim como os problemas de solubilidade do gás, os quais afetaram a concentração do metano durante os experimentos.

Islas-Lima *et al.* (2004) reportaram a dependência da desnitrificação usando metano, como única fonte de elétrons, em relação à pressão parcial do gás. Os experimentos conduzidos sob condições anóxicas demonstraram que, para pressões parciais de metano superiores a 8,8 kPa, a velocidade de desnitrificação correspondeu a $10,42 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ g SSV}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Quando a pressão parcial foi reduzida, a velocidade de desnitrificação decresceu para $0,204 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ g SSV}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Diante destes resultados, concluiu-se que a utilização do biogás proveniente de reator UASB é uma alternativa viável para a desnitrificação com fontes de elétrons endógenas (metano e gás sulfídrico). Entretanto, os problemas de solubilidade do gás e os fenômenos de transferência de massa devem ser considerados para que a aplicação deste processo seja feita de forma mais eficiente.

6.3.3 Exames microbiológicos

A estimativa das populações de organismos nitrificantes e desnitrificantes, realizada ao final de condições operacionais específicas, está apresentada na Tabela 6.24. Com estes resultados, aliado aos exames microscópicos, foi possível acompanhar o comportamento da microbiota frente às alterações operacionais a que foi submetido o RLFBAS.

Ao final da estratégia II durante a partida do reator, na qual houve o estabelecimento prévio da nitrificação e aplicação de baixas concentrações de sulfeto, observou-se número muito maior de bactérias oxidadoras de nitrogênio amoniacal que de nitrito. Segundo Barnes e Bliss (1983), em sistemas convencionais, as bactérias oxidadoras de nitrogênio amoniacal devem estar presentes em maior número que as oxidadoras de nitrito, visto que o crescimento celular destas últimas é inferior. Com relação às bactérias desnitrificantes, constatou-se ínfima população de organismos autotróficos comparativamente aos heterotróficos. Esta estimativa é coerente às análises físico-químicas, as quais indicaram insuficiência do doador de elétrons inorgânico para a desnitrificação autotrófica. Além disso, durante o estabelecimento da nitrificação, foi constatada a ocorrência de desnitrificação heterotrófica no interior das matrizes de espuma. Desse modo, a pequena parcela de desnitrificação estaria ocorrendo majoritariamente pela presença de organismos heterotróficos imobilizados no material suporte.

Os exames microscópicos realizados durante a estratégia II não permitiram uma identificação morfológica representativa dos organismos presentes no reator, uma vez que as morfologias estavam pouco definidas (Figura 8.85). No entanto, foi detectada a presença de microrganismos aeróbios, como protozoários (amebas) e metazoários (rotíferos).

Tabela 6.24 – Estimativa de organismos nitrificantes e desnitrificantes, por meio da técnica do Número Mais Provável (NMP), ao final de condições operacionais especificadas.

Condição	Via de desnitrificação	mg S-SDT L ⁻¹	mg OD L ⁻¹	pH médio (afluente - efluente)	Nitrificantes (NMP/mL)		Desnitrificantes (NMP/mL)	
					Oxidadoras de Nitrogênio amoniacal	Oxidadoras de nitrito	Heterotróficas	Autotróficas
Estratégia II	Nitrato	10 – 15	2,0 – 3,0	8,4 – 7,9	$> 1,6 \times 10^{12}$	$2,4 \times 10^6$	$> 1,6 \times 10^{12}$	$< 1,8 \times 10^1$
Condição 1 ^a	Nitrato	20 – 25	1,3 – 2,5	8,5 – 8,1	$9,2 \times 10^{16}$	$7,8 \times 10^7$	$4,7 \times 10^{16}$	$1,4 \times 10^5$
Condição 3 ^a	Nitrito	45 – 55	0,5 – 2,5	8,9 – 8,1	$1,6 \times 10^{18}$	$3,3 \times 10^6$	$> 1,6 \times 10^{18}$	$1,7 \times 10^5$
Condição 6	Nitrato	30 – 35	0,0 – 2,0	7,7 – 6,7	$2,2 \times 10^{22}$	$1,3 \times 10^9$	$2,0 \times 10^{16}$	$1,7 \times 10^7$
Uso de biogás ^b	Nitrato	–	n.a.	7,0 ^c	–	–	–	$1,7 \times 10^6$

^aAplicação pontual de 100 mg S-SDT L⁻¹ no início da condição, com duração de 24 horas (3 ciclos).

^bRelativo ao quarto ensaio complementar; biomassa retirada de R1.

^cpH medido somente no início dos experimentos.

Figura 6.85 – Microscopias ópticas de contraste de fase realizadas para amostras retiradas durante a estratégia II de partida do reator, indicando a presença de: (a) amebas e (b) rotíferos.

Para a estimativa realizada ao final da condição 1A, constatou-se que a população de bactérias oxidadoras de nitrito não foi afetada pelo aumento da concentração de sulfeto, visto que houve aumento de $2,4 \times 10^6$ a $7,8 \times 10^7$ NMP/mL. No entanto, não foi possível inferir se houve alteração no número de bactérias oxidadoras de nitrogênio amoniacal, uma vez que a leitura anterior apenas revelou valor maior que $1,6 \times 10^{12}$ NMP/mL. Considerando os resultados operacionais, que revelaram queda na eficiência da nitrificação em função do aumento da concentração de sulfeto, considerou-se a possibilidade de ter havido redução da população de organismos nitrificantes, neste caso, as oxidadoras de nitrogênio amoniacal. Entretanto, é interessante salientar que, durante a condição 1B, demonstrou-se que a inibição da nitrificação pela presença de sulfeto é um processo reversível, por meio da diminuição da concentração deste composto tóxico aos microrganismos. A eficiência média da nitrificação aumentou de 42,3% (condição 1A) para 72,3% (condição 1B) apenas com a redução da concentração de sulfeto. Portanto, inferiu-se que, durante a incubação dos tubos de NMP, em condições ótimas ao crescimento das bactérias nitrificantes e na ausência de sulfeto, tais bactérias foram rapidamente recuperadas, ocasionando o alto valor medido para a população das oxidadoras de nitrito.

Apesar de os resultados operacionais demonstrarem pouca alteração no processo desnitrificante, observou-se aumento de organismos autotróficos com o aumento da concentração de sulfeto. Este fato confirmou que a insuficiência ou baixa biodisponibilidade do sulfeto foi o principal fator limitante para a ocorrência da desnitrificação autotrófica, fazendo com que os organismos autotróficos utilizassem o oxigênio como receptor de elétrons preferencial. Não foi possível inferir se a microbiota heterotrófica sofreu alguma alteração, uma vez que a leitura anterior apenas indicou valor maior que $1,6 \times 10^{12}$ NMP/mL. Considerando o aumento da população de autotróficos, possivelmente os organismos desnitrificantes heterotróficos sofreram algum decréscimo, já que a eficiência de desnitrificação não foi alterada significativamente.

As microscopias ópticas apresentaram morfologias mais definidas que na condição anterior (estratégia II), indicando que o lodo já estava mais selecionado. Foi detectada a presença de morfologias semelhante a cocos, bacilos, filamentosas e protozoários (Figura 6.86).

Figura 6.86 – Microscopias ópticas de contraste de fase realizadas com amostras retiradas durante a condição 1^a, indicando a presença de: (a) cocos, bacilos e filamentos, (b) agrupamento de cocos e bacilos, (c) bacilos dispersos, (d) protozoário.

As leituras realizadas para a condição 3 indicaram o aumento da população de bactérias oxidadoras de nitrogênio amoniacal em duas ordens de grandeza, enquanto que as oxidadoras de nitrito decresceram em uma ordem de grandeza. Este comportamento era esperado, visto que o objetivo desta condição operacional era o acúmulo de nitrito no reator. Com a redução das bactérias oxidadoras de nitrito, a nitrificação até nitrito prevaleceu. Neste caso, observou-se que as oxidadoras de nitrito foram mais sensíveis à presença de alta concentração de sulfeto quando comparadas às oxidadoras de nitrogênio amoniacal. Adicionalmente, os resultados das análises físico-químicas indicaram a presença de amônia livre em concentrações inibitórias apenas para as bactérias oxidadoras de nitrito, o que explica o crescimento apenas da população de bactérias oxidadoras de nitrogênio amoniacal. O

aumento desta população em comparação ao que foi medida na condição 1A está em acordo com o aumento da eficiência de nitrificação para valores próximos a 90%.

Yun e Kim (2003) também constataram menor número de bactérias oxidadoras de nitrito comparativamente às oxidadoras de nitrogênio amoniacal, quando houve inibição pela presença de amônia livre, em reator de biofilme. Os valores reportados foram $4,7 \times 10^5$ NMP/mL e $3,8 \times 10^4$ NMP/mL para as oxidadoras de nitrogênio amoniacal e de nitrito, respectivamente. Os autores concluíram que a operação contínua com exposição à amônia livre causou decréscimo na velocidade de crescimento específico das oxidadoras de nitrito.

O número de organismos desnitrificantes autotróficos permaneceu estável. Já os organismos heterotróficos cresceram em magnitude maior que duas ordens de grandeza, o que contradiz os resultados das análises físico-químicas que apontaram decréscimo da atividade desnitrificante na condição 3. No entanto, na condição 2B anterior, a máxima eficiência de desnitrificação, com estabilidade, de todo o período de operação foi atingida (53%), e neste caso, a população de desnitrificantes heterotróficas deve ter se desenvolvido e contribuído para a desnitrificação. Na condição 3, a presença de altas concentrações de sulfeto e nitrito poderia ter inativado a ação das bactérias desnitrificantes heterotróficas. Desse modo, levantou-se a hipótese de que, durante a incubação dos tubos de NMP, tais bactérias encontraram condições ótimas para seu desenvolvimento e foram recuperadas.

As morfologias identificadas nesta condição podem ser visualizadas na Figura 6.87. Observou-se a predominância de cocos e bacilos, e alguns protozoários. Também foram encontradas algumas morfologias luminosas semelhantes a grânulos de enxofre elementar, normalmente próximas a agrupamentos de bacilos. O aparecimento destas morfologias está em concordância com as análises físico-químicas e evidências visuais (seção 6.3.1.4.), que indicaram a presença e acúmulo de enxofre elementar. Poucas morfologias semelhantes às bactérias ANAMMOX também foram encontradas. Tais microrganismos estão presentes em

ambientes contendo nitrogênio amoniacal e nitrito, como ocorreu nesta condição. De acordo com Martins (2010), o desenvolvimento destas bactérias a partir de lodo de reator nitrificante/desnitrificante, como é o caso, é possível.

Figura 6.87 – Microscopias ópticas de contraste de fase realizadas com amostras retiradas durante a condição 3, indicando a presença de: (a) aglomerado de bacilos, (b) cocos e bacilos dispersos, (c) formas luminosas semelhantes a grânulos de enxofre elementar, (d) protozoário, (e) morfologias semelhantes às bactérias ANAMMOX, (f) aglomerado de cocos e bacilos.

Em concordância com os resultados apresentados ao final da subseção 6.3.1.4, o número de bactérias oxidadoras de nitrito cresceu consideravelmente com a redução do pH (condição 6), e conseqüentemente, com a redução da concentração de amônia livre. Portanto, comprovou-se que a inibição pela presença de amônia livre foi o fator mais importante para a redução das bactérias oxidadoras de nitrito, como sugerido na seção supracitada. Por outro lado, a população de bactérias oxidadoras de nitrogênio amoniacal não foi afetada irreversivelmente pela redução do pH, não sendo prejudicada pela ocorrência pontual da queda abrupta do pH para 6. De acordo com as análises físico-químicas, este fato ocasionou redução de cerca de 30% da atividade nitrificante, em função da insuficiência de alcalinidade fornecida ao sistema. Entretanto, como reportado por Carrera *et al.* (2004), a limitação de alcalinidade não causa danos irreversíveis à atividade das bactérias oxidadoras de nitrogênio amoniacal, que pode ser recuperada em condições apropriadas ao seu desenvolvimento. Portanto, o aumento desta microbiota deve estar relacionado à sua recuperação durante o período de incubação dos tubos de NMP.

No caso da desnitrificação, houve decréscimo da população heterotrófica, que provavelmente foi afetada pela queda no pH. Entretanto, houve aumento no número de organismos desnitrificantes autotróficos em magnitude de duas ordens de grandeza. Durante o período monitorado nesta condição, a desnitrificação permaneceu instável, mas a microbiota desnitrificante se desenvolveu. Portanto, quando tais organismos não utilizavam nitrato e/ou nitrito como receptores de elétrons, continuavam a se desenvolver com o uso de oxigênio, visto que algumas espécies de microrganismos desnitrificantes autotróficos oxidadores de enxofre são facultativas.

Os exames microscópicos indicaram a presença predominante de cocos e bacilos dispersos, como mostrado na Figura 6.88. Foi constatada a presença de microrganismos semelhantes ao gênero *Nitrosococcus*, os quais são responsáveis pela oxidação de nitrogênio

amoniacal a nitrito (JENKINS *et al.*, 2003). Também foram encontradas morfologias semelhantes às bactérias ANAMMOX, em maior proporção que na condição anterior. Visto que, ao final desta condição, as análises físico-químicas demonstraram o consumo constante de nitrogênio amoniacal e nitrito, com a formação de nitrato, provavelmente as bactérias ANAMMOX tiveram alguma atuação no sistema. Considerando que o crescimento destes microrganismos é bastante lento, o tempo de operação contribuiu para seu desenvolvimento.

Figura 6.88 – Microscopias ópticas de contraste de fase realizadas com amostras retiradas durante a condição 6, indicando a presença de: (a) cocos semelhantes a *nitrosococos*, (b) cocos e bacilos dispersos, (c) cocos e bacilos curvilíneos, (d) aglomerado de bactérias semelhantes a “clusters” ANAMMOX.

Em linhas gerais, constatou-se que, em determinadas condições, a contagem de alguns microrganismos não correspondeu ao comportamento da nitrificação e desnitrificação monitorados durante a operação do reator. As condições a que os microrganismos eram

submetidos provavelmente ocasionaram uma inativação reversível em alguns casos. Especificamente, foi constatado que a inibição causada pela presença de sulfeto é um processo reversível, causando apenas uma inativação não-permanente na ação dos microrganismos. Quando em condições ambientais favoráveis ao seu desenvolvimento, e na ausência de compostos tóxicos, a ação de tais microrganismos era reativada, possibilitando a recuperação de sua atividade. Portanto, parte dos organismos estimados pela técnica do NMP poderia estar inativa no interior do reator, mas suas funções não foram permanentemente afetadas.

Considerando a contagem de organismos desnitrificantes heterotróficos, os resultados obtidos, de maneira geral, indicaram a presença constante destes no reator. Sendo assim, tais microrganismos tiveram participação efetiva na desnitrificação, ocorrendo conjuntamente ao processo autotrófico. Este fato também foi observado durante os experimentos da 1ª etapa desta pesquisa, conforme discutido na subseção 6.1.1. Moraes (2009) também constatou a ocorrência da desnitrificação heterotrófica em reatores operados em batelada, contendo biomassa imobilizada adaptada ao processo autotrófico. A água residuária era parcialmente nitrificada, contendo efluente real proveniente de abatedouro de aves como parte de sua composição. Sob concentrações limitantes de sulfeto, foi observada a desnitrificação completa de nitrato, que não seria possível se não houvesse outra fonte de elétrons. Neste caso, inferiu-se que os elétrons teriam sido provenientes da matéria orgânica de difícil degradação presente no efluente de abatedouro, uma vez que o consumo de DQO foi detectado. Na presente pesquisa, o consumo de DQO foi observado durante todo o período. Sendo assim, a matéria orgânica de difícil degradação presente no efluente do reator UASB provavelmente teria fornecido elétrons para a ocorrência da desnitrificação heterotrófica.

Com relação à estimativa de organismos desnitrificantes autotróficos presentes nos experimentos do quarto ensaio complementar, após a aplicação de biogás, observou-se a

redução dos mesmos em uma ordem de grandeza. Este fato ocorreu em função da pouca disponibilidade de sulfeto no biogás, havendo carência de substrato para os microrganismos oxidadores de enxofre. Neste caso, a maior disponibilidade de metano possibilitou a ocorrência da desnitrificação com uso deste doador de elétrons, suprimindo a atividade das bactérias desnitrificantes que utilizam sulfeto.

As microscopias ópticas de contraste de fase realizadas neste ensaio (Figura 6.89) revelaram a presença de pequenos pontos luminosos, semelhantes a enxofre elementar, próximos a morfologias de cocos e pequenos bacilos. Estas formações foram raramente encontradas, em função da limitação de sulfeto existente. Ainda foram encontradas morfologias semelhantes às bactérias ANAMMOX, remanescentes da condição anterior. As morfologias predominantes foram grumos semelhantes ao gênero *Methanosarcina*. No entanto, quando os exames foram realizados sob fluorescência, a mesma não foi constatada, sendo descartada a presença do gênero *Methanosarcina* na amostra. Sugeriu-se que tais morfologias, compostas de “clusters” com diâmetro maior que 5 μm , estivessem relacionadas ao uso de metano como doador de elétrons na desnitrificação, uma vez que tais formações não foram encontradas anteriormente. Na literatura, as morfologias reportadas, referentes a este processo, se apresentam com diâmetros menores que 5 μm . Entretanto, as poucas pesquisas sobre a desnitrificação com metano e a diversidade microbiológica envolvida neste processo (CUBA, 2008) impedem que qualquer afirmação seja feita.

Figura 6.89 – Microscopias ópticas de contraste de fase realizadas com amostras retiradas ao final do quarto ensaio complementar, após a aplicação de biogás, indicando a presença de: (a) pontos luminosos semelhantes a enxofre elementar próximos de bacilos e cocos, (b) e (c) morfologias semelhantes a “clusters” ANAMMOX, (d), (e) e (f) morfologias predominantes não identificadas.

6.3.4. Limitações operacionais da aplicação proposta de integração dos processos em um único reator

A principal limitação encontrada no uso do RLFBAS, submetido à aeração intermitente, para a remoção de nitrogênio acoplada à oxidação de sulfeto, consistiu na dificuldade em disponibilizar o sulfeto para o processo desnitrificante nos períodos não aerados. Como havia disponibilidade de oxigênio dissolvido, este foi utilizado preferencialmente pelos microrganismos para a oxidação de sulfeto, debilitando a desnitrificação autotrófica. Além disso, o fornecimento de ar no interior do reator possibilitava a adesão de bolhas de ar às espumas de poliuretano em que a biomassa estava imobilizada, disponibilizando o oxigênio mesmo nos períodos não aerados. Este fato deve ter contribuído para o uso de oxigênio como receptor de elétrons preferencial para a oxidação do sulfeto. Adicionalmente, as condições favoráveis ao desenvolvimento da desnitrificação autotrófica promoviam decréscimo na eficiência do processo nitrificante. Portanto, tornou-se difícil o estabelecimento de ambos os processos no mesmo reator.

A presença de sulfeto neste tipo de reator era tóxica aos microrganismos nitrificantes. As oscilações na concentração desse composto provocavam a inibição da nitrificação que, apesar de reversível, prejudicava a remoção de nitrogênio. Portanto, este tipo de reator não é indicado para tratamento de efluentes com altas concentrações de sulfeto ou com concentrações oscilatórias, já que isso ocasionaria a debilitação da nitrificação e, conseqüentemente, da desnitrificação.

Esta configuração de reator também promoveu grande acúmulo de enxofre elementar e grande consumo de alcalinidade. Desse modo, a suplementação de alcalinidade se tornou essencial, o que poderia elevar os custos do pós-tratamento no sistema. Quanto ao acúmulo de

enxofre, se fazia necessária a limpeza do reator para que as mangueiras de alimentação e de descarte não ficassem obstruídas. Após longo tempo de operação, além do acúmulo de enxofre, observou-se grande formação e acúmulo de um precipitado de coloração escura, que requeria sua frequente retirada.

Portanto, as principais dificuldades se relacionaram com a necessidade de estrito controle operacional deste sistema, além de ter a aplicação restrita a efluentes com determinadas concentrações de sulfeto. Este fato poderia até mesmo inviabilizar sua aplicação, visto que sistemas versáteis, eficientes e de fácil manutenção são claramente preferíveis. No entanto, não se deve descartar, definitivamente, o uso de reatores operados em bateladas alimentadas sequenciais para a remoção de nitrogênio proposta por esta pesquisa, visto que tal proposta é recente e pouco elucidada. Talvez o uso de dispositivos específicos acoplados ao reator poderia melhorar seu desempenho, como por exemplo, o fornecimento de ar, no meio líquido, fora do reator. Neste caso, o reator poderia possuir um sistema de recirculação, no qual poderia ser provida a aeração. Desse modo, o líquido recirculado ao interior do reator possuiria somente oxigênio dissolvido, e, portanto, a formação de bolhas de oxigênio no interior do reator, que ficavam “presas” às espumas de poliuretano em que a biomassa estava imobilizada, seria evitada. Por meio deste procedimento, a ocorrência da oxidação do sulfeto pelo oxigênio poderia, talvez, ser diminuída.

Sendo assim, a partir das principais dificuldades encontradas na integração da nitrificação e desnitrificação autotrófica com uso de sulfeto em um único reator, este trabalho visou contribuir para alavancar pesquisas a respeito de outras configurações de reatores, ou mesmo ajustes na configuração do reator proposto, buscando viabilizar a aplicação destes bioprocessos integrados.

6.4. VISÃO GERAL DA PESQUISA: INTERLIGAÇÃO DAS TRÊS ETAPAS

Considerando os resultados da 1ª etapa desta pesquisa, a desnitrificação autotrófica com uso de sulfeto como doador de elétrons sinalizou para um processo versátil, ocorrendo simultaneamente ao processo heterotrófico resultante da atividade endogênica de organismos presentes no lodo de inóculo. Neste caso, foi estabelecida uma comunidade microbiana mixotrófica, com predominância de organismos autotróficos sobre os heterotróficos, em função da limitação de fonte de carbono orgânico no meio. No entanto, a versatilidade da desnitrificação autotrófica parece se aplicar somente sob condições exclusivamente anóxicas, uma vez que, na 3ª etapa, verificou-se a dificuldade do estabelecimento deste processo quando aplicadas condições adicionais favoráveis à nitrificação, de modo intermitente. Vale ressaltar que o lodo de inóculo foi um fator importante no estabelecimento do processo autotrófico desnitrificante: nos experimentos da 1ª etapa, o lodo anaeróbico era mais favorável ao desenvolvimento de organismos desnitrificantes utilizadores de sulfeto, ao passo que o lodo utilizado na 3ª etapa guardava características fortemente nitrificantes. Portanto, para o estabelecimento da desnitrificação autotrófica juntamente ao processo nitrificante, o uso de um lodo de inóculo misto, contendo características que favoreçam tanto a nitrificação quanto a desnitrificação autotrófica, pode ser um dos fatores chaves para a viabilização da proposta apresentada na 3ª etapa.

Ainda com relação ao lodo de inóculo, o uso de lodo predominantemente nitrificante na 3ª etapa deve ter contribuído para a dificuldade em se estabelecer a desnitrificação pela via curta, ao contrário do que ocorreu quando se utilizou lodo de inóculo proveniente de UASB nos ensaios da 1ª etapa. Neste último caso, o nitrito foi prontamente utilizado e não apresentou sinais de inibição à biomassa desnitrificante, como foi constatado na 3ª etapa. Vale

ressaltar que as condições operacionais dos reatores, em ambas as etapas, eram bastante distintas, sendo que as mais favoráveis à desnitrificação autotrófica integrada à oxidação de sulfeto foram avaliadas na 1ª etapa. Portanto, as informações reportadas com base na comparação entre as etapas 1 e 3 são apenas hipotéticas, ficando, sua comprovação, como sugestão para pesquisas futuras.

A interligação mais importante entre as etapas 1 e 2 correspondeu à avaliação do uso preferencial dos receptores de elétrons estudados. Na 1ª etapa, o uso de nitrito como receptor de elétrons promoveu a desnitrificação de forma mais eficiente quando comparado ao uso de nitrato. No entanto, os parâmetros cinéticos intrínsecos da 2ª etapa demonstraram que a velocidade específica de utilização de nitrato foi maior que a de utilização de nitrito. A interação do sulfeto com as enzimas responsáveis pela redução dos compostos nitrogenados provavelmente é a resposta para estes resultados contraditórios. Adicionalmente, a diversidade de espécies envolvidas no processo desnitrificante com uso de sulfeto como doador de elétrons pode promover o uso de diferentes tipos de enzimas que catalisam as reações de redução dos compostos oxidados de nitrogênio. As diferentes características estruturais destas enzimas podem ocasionar diferentes interações com o sulfeto, que podem afetar diferentemente as vias de desnitrificação. A falta de estudos microbiológicos e bioquímicos mais sofisticados e aprofundados impede que qualquer aferição seja feita sobre as rotas metabólicas preferenciais de desnitrificação autotrófica (via nitrito ou via nitrato), de acordo com as condições ambientais a que foram submetidos os microrganismos.

Os parâmetros cinéticos intrínsecos determinados na 2ª etapa forneceram as bases teóricas para o projeto da 3ª etapa. Entretanto, tais parâmetros foram determinados para condições diferentes daquelas que foram aplicadas na etapa 3. Diferenças no lodo de inóculo, na água residuária e na configuração dos reatores são fatores importantes que influenciam diferentemente o comportamento de biorreatores. Portanto, os parâmetros cinéticos

intrínsecos obtidos, que fornecem informações de referência para o projeto de outros reatores, são suscetíveis de ajustes, uma vez que os mesmos foram determinados para condições específicas.

Em todas as etapas, a oxidação de sulfeto no processo desnitrificante apresentou comportamento semelhante, havendo primeiro a oxidação parcial e posteriormente a oxidação a sulfato. Enxofre elementar foi o principal composto intermediário formado, tendo sido provavelmente utilizado como fonte de elétrons secundária para a desnitrificação. Os resultados da 1ª etapa permitiram observar que a reação em cadeia da oxidação de sulfeto, em duas etapas, é mais evidente quando o nitrato é utilizado como receptor de elétrons. Não foi possível fazer esta constatação na 3ª etapa, tendo em vista a maior complexidade operacional e de processos biológicos instalados no reator. Entretanto, em todas as etapas, também se observou que maiores concentrações de sulfeto promovem a maior formação de compostos intermediários de enxofre, notadamente enxofre elementar.

Por outro lado, os ensaios complementares com a biomassa do reator da 3ª etapa, além de permitirem entender melhor os processos que estavam ocorrendo nos reatores em cada condição ensaiada, mostraram que diferentes doadores e receptores de elétrons podem conviver em um único reator e promover a desnitrificação de forma eficiente. Ou seja, as condições ideais para a nitrificação não foram possíveis de serem atingidas, o que prejudicou esse processo. No entanto, uma vez que o reator receba afluente parcialmente nitrificado juntamente com afluente não nitrificado, a desnitrificação poderá ocorrer por diferentes vias, com o uso de diferentes doadores e receptores de elétrons. Há indicações de que ocorreram processos como o SURAMOX e o ANAMMOX, simultaneamente com a desnitrificação heterotrófica. As melhores condições para que esses processos ocorram em um mesmo reator anóxico, no entanto, deverão ser estabelecidas em pesquisas futuras.

Em linhas gerais, pode-se afirmar que os resultados obtidos nas três etapas e suas discussões se relacionaram direta ou indiretamente. Além de maior esclarecimento e entendimento de aspectos fundamentais e operacionais da desnitrificação autotrófica integrada à oxidação de sulfeto, a interligação das três etapas contribuiu com hipóteses que poderiam explicar tópicos ainda obscuros relacionados ao tema. Considerando todos os pontos abordados nesta pesquisa, a mesma permitiu alguma expansão de fronteiras que ainda limitam a aplicação da desnitrificação autotrófica com uso de sulfeto como doador de elétrons para o pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios.

“A ciência? Ao fim e ao cabo, o que é ela senão uma longa e sistemática curiosidade?

André Maurois (1885-1967)

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos nesta pesquisa, verificou-se a dificuldade operacional em se estabelecer a desnitrificação autotrófica com uso de sulfeto como doador de elétrons ao processo nitrificante em um único reator. Apesar de a desnitrificação autotrófica integrada à oxidação de sulfeto se mostrar uma nova biotecnologia viável e promissora, capaz de promover a redução nos custos de pós-tratamento, seu acoplamento à nitrificação em um mesmo reator causou a perda de eficiência de ambos os processos. O reator operado em batelada alimentada sequencial, submetido à aeração intermitente, não promoveu remoção satisfatória de nitrogênio do efluente sanitário pré-tratado anaerobiamente. Diante destas constatações, a conclusão geral é de que a aplicação da nitrificação e desnitrificação autotrófica com uso de sulfeto como fonte endógena de elétrons no RLFBAS proposto promoveu a remoção insatisfatória de nitrogênio, sendo desaconselhável seu uso em plantas de tratamento. Portanto, diferentes configurações de reatores e de sistemas, ou mesmo a

realização de alguns ajustes no reator proposto, poderiam ser mais apropriadas para a viabilidade desta aplicação ao pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios.

De modo mais específico, outras conclusões puderam ser auferidas:

- ✓ A concentração de sulfeto influencia a formação dos produtos finais provenientes do processo de oxidação na desnitrificação autotrófica, podendo haver formação de sulfato e/ou compostos intermediários de enxofre, notadamente enxofre elementar, de acordo com a relação molar N/S. O enxofre elementar previamente formado também pode ser utilizado como doador de elétrons intermediário para a desnitrificação autotrófica (oxidação de sulfeto em duas etapas);
- ✓ O modelo cinético de ordem $\frac{1}{2}$ pode ser aplicado com sucesso para descrever o processo intrínseco de desnitrificação autotrófica via nitrato e nitrito, integrada à oxidação de sulfeto, fornecendo valores de parâmetros cinéticos intrínsecos comparáveis aos encontrados na literatura. Tais parâmetros são afetados pela forma do doador de elétrons utilizada, de modo que os maiores valores são obtidos quando os elétrons são provenientes diretamente do sulfeto;
- ✓ A partida do reator é um fator importante para o estabelecimento da nitrificação e desnitrificação autotrófica integrada à oxidação de sulfeto em RLFBAS, sendo a adaptação prévia da biomassa para a nitrificação e a manutenção de baixas concentrações de sulfeto são os fatores chaves. A estratégia de alimentação também pode melhorar o desempenho deste processo em RLFBAS submetido a condições de aeração intermitente, sendo a alimentação intermitente apenas nos períodos não aerados a melhor opção;
- ✓ Os tempos das fases aeradas e não aeradas influenciam o desempenho da nitrificação e desnitrificação autotrófica, com o uso de sulfeto, em um mesmo reator, de modo que a

desnitrificação autotrófica requer maior tempo de fase não aerada para ocorrer mais efetivamente.

- ✓ É possível promover o acúmulo de nitrito em RLFBAS, por meio da inibição às bactérias oxidadoras de nitrito, sem prejuízo para a oxidação de nitrogênio amoniacal (nitrificação parcial). No entanto, o uso de nitrito pelos organismos desnitrificantes, em uma comunidade microbiana ampla e diversificada, é dificultado em função de serem submetidos a condições adversas que não favorecem exclusivamente sua adaptação. Após longo período de adaptação, a desnitrificação autotrófica via nitrito pode se estabelecer;
- ✓ As condições operacionais para o estabelecimento da nitrificação e da desnitrificação autotrófica em um único reator podem favorecer o desenvolvimento concomitante de processos biológicos de remoção de nitrogênio não convencionais, baseados, principalmente, na oxidação anaeróbia de nitrogênio amoniacal;
- ✓ A comunidade microbiana que desempenha a desnitrificação autotrófica utilizando sulfeto como doador de elétrons pode coexistir com microrganismos associados a outros processos de remoção de nitrogênio. A predominância ou não dos organismos desnitrificantes autotróficos frente às outras populações microbianas está diretamente relacionada às condições operacionais a que são submetidos os reatores.
- ✓ O uso de biogás proveniente de reator UASB é viável para promover a desnitrificação autotrófica em efluente sanitário nitrificado, sendo que a comunidade desnitrificante adaptada ao uso de sulfeto dissolvido é capaz de utilizar eficientemente o metano como doador de elétrons.

“De fato, quanto maior for a nossa ciência, mais profundo é o mistério.

Vladimir Nabokov (1899-1977)

8. SUGESTÕES

Para pesquisas futuras, algumas sugestões foram propostas com base neste trabalho:

- ✓ Estudos mais sofisticados e aprofundados na investigação de rotas bioquímicas envolvidas na desnitrificação autotrófica integrada à oxidação de compostos reduzidos de enxofre, com uso de compostos marcados, visando investigar, principalmente, os fatores que regulam as diferentes rotas metabólicas de consumo de sulfeto;
- ✓ Investigação a respeito das enzimas envolvidas na desnitrificação autotrófica, especificamente na redução dos compostos oxidados de nitrogênio, e a influência do sulfeto sobre a atividade enzimática dos microrganismos desnitrificantes;
- ✓ Determinação de parâmetros cinéticos intrínsecos da desnitrificação autotrófica, incluindo todos os compostos reduzidos de enxofre comumente relatados (enxofre elementar, tiosulfato, sulfito), para diferentes lodos de inóculo e diferentes águas residuárias que contenham compostos nitrogenados e de enxofre;

- ✓ Avaliação da influência do lodo de inóculo para o estabelecimento da desnitrificação autotrófica com uso de sulfeto, por meio de ensaios específicos de crescimento microbiano;
- ✓ Avaliação da remoção de fósforo em sistemas semelhantes ao apresentado neste trabalho;
- ✓ Aplicação de um sistema de recirculação no RLFBAS proposto, no qual a aeração seja promovida fora do reator, com a finalidade de avaliar o desempenho da remoção de nitrogênio;
- ✓ Proposta de novas configurações de reatores, nas quais a nitrificação e a desnitrificação autotrófica fossem conduzidas em compartimentos separados, de modo a prover condições ótimas para ambos os processos;
- ✓ Investigação das interações entre o ciclo do nitrogênio e do enxofre, além do processo de desnitrificação autotrófica, visando, especialmente, a confirmação da rota metabólica autotrófica de redução de sulfato;
- ✓ Avaliação do uso de biogás proveniente de UASB para promover a desnitrificação em sistemas em escala piloto.

“O livro é um mudo que fala, um surdo que responde, um cego que guia, um morto que vive.
Pe. Antônio Vieira (1608-1697)

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELING, U.; SEYFRIED, C.F. (1992). Anaerobic-aerobic treatment of high-strength ammonium wastewater. Nitrogen removal via nitrite. *Water Science and Technology*, v.26, p.1007–1015.

AHN, Y.H. (2006). Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. *Process Biochemistry*, v.41, p.1709–1721.

ALLEMAN, J.E. (1985). Elevated nitrite occurrence in biological wastewater treatment systems. *Water Science Technology*, v.17, p.409–19.

ANTHONISEN, A.C.; LOEHR, R.C.; PRAKASAM, T.B.S.; SRINATH, E.G. (1976). Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Journal Water Pollution Control Federation*, v.45, n.5, p.835–852.

ARORA, M.L.; BARTH, E.F.; UMPHRES, M.B. (1985). Technology evaluation of sequencing batch reactors. *Journal Water Pollution Control Federation*, v.57, n.8, p.867–875.

BAE, W., BAEK, S., CHUNG, J., LEE, Y. (2002). Optimal operational factors for nitrite accumulation in batch reactors. *Biodegradation*, v.12, p.359–366.

BAILEY, J.E.; OLLIS, D.F. (1986). *Biochemical Engineering Fundamentals*. 2ed, McGraw-Hill Book Company, 984p.

BARNES, D.; BLISS, P.J. (1983). *Biological control of nitrogen in wastewater treatment*. New York: E&F Spon.

BATCHELOR, B.; LAWRENCE, A.W. (1978). A kinetic model for autotrophic denitrification using elemental sulfur. *Water Research*, v.12, p.1075–1084.

BENTZEN, G.; SMITH, A. T.; BENNETT, D.; WEBSTER, N. J.; REINHOLT, F.; SLETHOLT, E.; HOBSON, J. (1995). Controlled dosing of nitrate for prevention of H₂S in a sewer network and the effects on the subsequent treatment processes. *Water Science Technology*, v.31, n.7, p.293–302.

BERISTAIN-CARDOSO, R.; SIERRA-ALVAREZ, R.; ROWLETTE, P.; FLORE, E. R.; GÓMEZ, J.; FIELD, J. A. (2006). Sulfide oxidation under chemolithoautotrophic denitrifying conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, v.95, n.6, p.1148–1157.

BERISTAIN-CARDOSO, R.; TEXIER, A-C.; SIERRA-ALVAREZ, R.P.; RAZO-FLORES E.; FIELD, J.A.; GÓMEZ, J. (2009). Effect of initial sulfide concentration on sulfide and phenol oxidation under denitrifying conditions. *Chemosphere*, v.74, p.200–205.

BILANOVIC, D.; BATTISTONI, P.; CECCHI, F.; PAVAN, P.; MATAÁLVAREZ, J. (1999). Denitrification under high nitrate concentration and alternating anoxic conditions. *Water Research*, v.33, n.15, p.3311–3320.

BOCK, E.; WILDERER, P.A.; FREITAG, A. (1988). Growth of *Nitrobacter* in the absence of dissolved oxygen. *Water Research*, v.22, n.2, p.245–250.

BRASIL (2005). Resolução nº357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes e dá outras providências. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Poder Legislativo, Brasília, DF, Seção I, p.58.

BRASIL (2011). Resolução nº430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Poder Legislativo, Brasília, DF, Seção III, p.6.

- BRINGI, V.; DALE, B.E. (1990). Experimental and theoretical evidence for convective nutrient transport in an immobilized cell support. *Biotechnology Progress*, v.6, n.3, p.205–209.
- BUISMAN, C.J.N.; ISPEERT, P.; JANSSEN, A.J.H.; LETTINGA, G. 1990. Kinetics of chemical and biological sulphide oxidation in aqueous solutions. *Water Research*, v.24, p.667–671.
- CALLADO, N.H.; FORESTI, E. (2000). Tratamento de esgoto doméstico com remoção de nitrogênio e fósforo em reatores seqüenciais em batelada. In: Congresso Interamericano de Ingenieria Sanitaria y Ambiental. Anais. Porto Alegre, AIDIS. CD-ROM.
- CAMPOS, J.L.; CARVALHO, S.; PORTELA, R.; MOSQUERA-CORRAL, A.; MÉNDEZ, R. (2008). Kinetics on denitrification using sulphur compounds: effects of S/N ratio, endogenous and exogenous compounds. *Bioresource Technology*, v.99, p.1293–1299.
- CANTO, C.S.A.; RODRIGUES, J.A.D.; RATUSZNEI, S.M.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. (2008). Feasibility of nitrification/denitrification in a sequencing batch biofilm reactor with liquid circulation applied to post-treatment. *Bioresource Technology*, v.99, p.644–654.
- CARRERA, J; VICENT, T.; LAFUENTE, J.(2004). Effect of influent COD/N ratio on biological nitrogen removal (BNR) from high strength ammonium industrial wastewater. *Process Biochemistry*, v.39, n.12, p.2035–2041.
- ÇEÇEN, F.; GÖNENÇ, I.L. (1995). Criteria for nitrification and denitrification of high strength wastes in two upflow submerged filters. *Water Enviromental Research*, v.67, n.2, p.132–44.
- ÇEÇEN, F. (1996). Investigation of partial and full nitrification characteristics of fertilizer wastewater in a submerged biofilm reactor. *Water Science Technology*, v.34, n.11, p.77–85.
- CERVANTES F.J.; MEZA-ESCALANTE, E.R.; TEXIER, A.C.; GÓMEZ, J. (2009). Kinetic limitations during the simultaneous removal of p-cresol and sulfide in a denitrifying process. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v.36, p.1417–1424.
- CHEN, K-C.; CHEN, J-J.; HOUNG, J-Y. (2000). Improvement of nitrogen-removal efficiency using immobilized microorganisms with oxidation-reduction potential monitoring. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, v.25, p.229–234.
- CHEN, Y.; CHENG, J.J.; CREAMER, K.S. (2008). Inhibition of anaerobic digestion process: a review. *Bioresource Technology*, 99, p.4044–4064.

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

CHIE-CHIEN TSENG; THOMAS, G. P.; KOOPMAN, B. (1998). Effect of influent chemical oxygen demand to nitrogen ratio on a partial nitrification/complete denitrification process. *Water Research*, v.32, n.1, p.165–173.

CHRISTIANSEN, P.; HOLLESEN, L.; HARREMÖES, P. (1994). Liquid film diffusion on reaction rate in submerged biofilters. *Water Research*, v.29, n.3, p.947–952.

CHUNG, J.; BAE, W. (2002). Nitrite reduction by a mixed culture under conditions relevant to shortcut biological nitrogen removal. *Biodegradation*, v.13, p.163–170.

COSTA, C.; DIJKEMA, C.; FRIEDRICH, M.; ENCINA, P. G.; POLANCO, F. F.; STAMS, A. J. M. (2000). Denitrification with methane as electron donor in oxygen-limited bioreactors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.53, p.754–762.

CUBA, R.M.F. (2008). *Utilização de metano como doador de elétrons para remoção de nitrogênio via nitrificação e desnitrificação em reator operado em bateladas sequenciais*. 136p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

ECKFORD, R. E., FEDORAK, P. M. (2002) Planktonic nitrate-reducing bacteria and sulfate-reducing bacteria in some western Canadian oil field waters. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v.29, p.83–92.

ERGUDER, T.H.; BOON, N.; VLAEMINCK, S.E.; VERSTRAETE, W. (2008). Partial nitrification achieved by pulse sulfide doses in a sequential batch reactor. *Environmental Science Technology*, v.42, n.23, p.8715–8720.

FDZ-POLANCO, F.; FDZ-POLANCO, M.; FERNANDEZ, N.; URUEÑA, M.A.; GARCIA, P.A.; VILLAYERDE, S. (2001). New process for simultaneous removal of nitrogen and sulphur under anaerobic conditions. *Water Research*, v.35, n.4, p.1111–1114.

FDZ-POLANCO, F.; VILLAYERDE, S.; GARCIA, P.A. (1996). Nitrite accumulation in submerged biofilters – combined effects. *Water Science Technology*, v.34, n.3-4, p.371–378.

FLERE, J.M.; ZHANG, T.C. (1999). Nitrate removal with sulfur-limestone autotrophic denitrification process. *Journal of Environmental Engineering*, v.125, n.8, p.721–729.

FORESTI, E.; ZAIAT, M.; VALERO, M. (2006). Anaerobic processes as the core technology for sustainable domestic wastewater treatment: Consolidated applications, 19 new trends,

perspectives, and challenges. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, v.5, p.3–19.

FOOTH. D.D.; JOSEPH, H. (1973). An improved methods for the enumeration of denitrifying bacteria. *Soil Science Society of America*, v.37, n.5, p.698–699.

GADEKAR, S.; NEMAT, M.; HILL, G.A. (2006). Batch and continuous biooxidation of sulphide by *Thiomicrospira* sp. CVO: reaction kinetics and stoichiometry. *Water Research*, v.40, p.2436–2446.

GARBOSSA, L. H. P. (2006). *Avaliação de sistemas anaeróbio-aeróbio com biomassa imobilizada para remoção de matéria carbonácea e nitrogênio de esgoto sanitário e uso de H₂S na desnitrificação*. 125p. Dissertação (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

GARBOSSA, L.H.P.; RODRIGUEZ, J.A.; LAPA, K.R.; FORESTI, E (2005). A novel two-module integrated aerobic-anaerobic bioreactor for denitrification using H₂S from biogas. In: *Nutrient Management in Wastewater Treatment Process and Recycle Streams*, September, Krakow, 2005. Anais. Poland, p.347–355.

GEE, C.S.; KIM, J.S. (2004). Nitrite accumulation followed by denitrification using sequencing batch reactor. *Water Science Technology*, v.49, n.5-6, p.47–55.

GEVERTZ D, TELANG, A. J., VOORDOUW, G., JENNERMAN, G. (2000) Isolation and characterization of strains CVO and FWKO B, two novel nitrate -reducing, sulfide - oxidizing bacteria isolated from oil field brine. *Applied and Environmental Microbiology*, v.66, p.2491–2501.

GIANOTTI, E.P. (1994). *Desnitrificação em uma lagoa marginal do rio Mogi-Guaçu, Lagoa do Infernã (Estação Ecológica do Jataí – Luiz Antônio – SP)*. 298p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1994.

GLASS, C.; SILVERSTEIN, J.; OH, J. (1997). Inhibition of denitrification in activated sludge by nitrite. *Water Environmental Research*, v.69, p.1086–1093.

GLASS, C.; SILVERSTEIN, J. (1998). Denitrification kinetics of high nitrate concentration water: pH effect on inhibition and nitrite accumulation. *Water Research*, v.32, n.3, p.831–839.

GODDEN, J.W.; TURLEY, S.; TELLER, D.C.; ADMAN, E.T.; LIU, M.Y.; PAYNE, W.J.; LEGALL, J. (1991). The 2.3 angstrom X-ray structure of nitrite reductase from *Achromobacter cycloclastes*. *Science*, v.253, p.438–442.

GOMMERS P. J. F.; KUENEN J. G. (1988). Simultaneous sulfide and acetate oxidation in a denitrifying fluidized bed reactor-I. Start-up and reactor performance. *Water Research.*, v.22, n.9, p.1075–1083.

GOMMERS, P.J.; BULEVELD, W.; ZUIDERWIJK, F.J; KUENEN, J.G. (1988). Simultaneous sulfide and acetate oxidation in a denitrifying fluidized bed reactor. *Water Research*, v.22, p.1085–1095.

GRADY, C.P.L.; LIM, H.C. (1980). *Biological Wastewater Treatment: Theory and Applications*. Marcel Dekker, Inc, New York, 963p.

HAGOPIAN, D.S.; RILEY, J.G. (1998). A closer look at the bacteriology of nitrification. *Aquacultural Engineering*, v.18, n.4, p.223–244.

HARREMÖES, P. (1976). The significance of pore diffusion to filter denitrification. *Journal Water Pollution Control Federation*, v.48, n.2, p.377–388.

HASHIMOTO, S.; FURUKAWA K. (1987). Immobilization of activated sludge by PVA-boric acid method. *Biotechnology and Bioengineering*, v.30, p.52–59.

HENZE, M.; HARREMOES, P.; JASSEN, J.C.; ARVIN, E. (1997). *Wastewater Treatment. Biological and Chemical Processes*. 2 ed. German: Springer.

HIRASAWA, J.S. (2008). *Avaliação da metanogênese e sulfetogênese na presença de oxigênio, sob diferentes relações etanol/sulfato, utilizando técnicas da Biologia Molecular*. 114p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

HOUBRON, E.; TORRIJOS, M.; CAPDEVILLE, B. (1999). An alternative use of biogas applied at the water denitrification. *Water Science and Technology*, v.40, n.8, p.115–122.

HULSHOFF POL, L. W.; LENS, P. N. L.; STAMS, A. J. M.; LETTINGA, G. (1998). Anaerobic treatment of sulphate-rich wastewaters. *Biodegradation*, v.9, p.213–224.

HULTH, S.; ALLER, R.C.; CANFIELD, D.E.; DALSGAARD, T.; ENGSTRÖM, P; GILBERT, F.; SUNDBÄCK, K.; THAMDRUP, B. (2005). Nitrogen removal in marine environments: recent findings and future research challenges. *Marine Chemistry*, v.94, p.125–145.

IAMAMOTO, C.Y. (2006). *Remoção de nitrogênio de águas residuárias com elevada concentração de nitrogênio amoniacal em reator contendo biomassa em suspensão operado em bateladas sequenciais e sob aeração intermitente*. 139p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

ISLAS-LIMA, S.; THALASSO, F.; GOMEZ-HERNANDEZ, J. (2004). Evidence of anoxic methane oxidation coupled to denitrification. *Water Research*, v.38, p.13–16.

JANSEN, J.C.; HARREMÖES, P. (1985). Removal of soluble substrates in fixed films. *Water Science Technology*, v.17, p.1–14.

JANSSEN, A. J. H.; LETTINGA, G.; KEIZER, A. (1999). Removal of hydrogen sulphide from wastewater and waste gases by biological conversion to elemental sulphur: Colloidal and interfacial aspects of biologically produced sulphur particles. *Colloids and Surfaces: A Physicochemical and Engineering Aspects*, v.151, p.389–397.

JENKINS, D.; RICHARD, M.G.; DAIGGER, G.T. (2003). *Manual on the causes and control of activated sludge bulking, foaming and other solids separation problems*. 3ed, London: Lewis Publishers.

JETTEN, M.S.M.; LOGEMANN, S.; MUYZER, G.; ROBERTSON, L.A.; DE VRIES, S.; VANLOOSDRECHT, M.C.M.; KUENEN, J.G. (1997). Novel principles in the microbial conversion of nitrogen compounds. *Applied Water Management Research (STOWA)*, v.71, p.75–93.

JIMÉNEZ, E.; GIMÉNEZ, J.B.; RUANO, M.V.; FERRER, J.; SERRALTA, J. (2011). Effect of pH and nitrite concentration on nitrite oxidation rate. *Bioresource Technology*, v.102, p.8741–8747.

JING, C.; PING, Z.; MAHMOOD, Q. (2010). Influence of various nitrogenous electron acceptors on the anaerobic sulfide oxidation. *Bioresource Technology*, v.101, p.2931–2937.

JING, C.; PING.; MAHMOOD, Q. (2009). Simultaneous sulfide and nitrate removal in anaerobic reactor under shock loading. *Bioresource Technology*, v.100, p.3010–3014.

JOYE, S.B.; HOLLIBAUGH, J.T. (1995). Influence of sulfide inhibition of nitrification on nitrogen regeneration in sediments. *Science*, v.270, p.623–625.

KALYUZHNYI, S.; GLADCHENKO, M.; MULDER, A.; VERSPRILLE, B. (2006) DEAMOX—NEW biological nitrogen removal process based on anaerobic ammonia oxidation coupled to sulphide-driven conversion of nitrate into nitrite. *Water Research*, v. 40, p.3637–3645.

KATSOGIANNIS, A.N.; KORNAROS, M.; LYBERATOS, G. (2003). Enhanced nitrogen removal in SBRS bypassing nitrate generation accomplished by multiple aerobic/anoxic phase pairs. *Water Science Technology*, v.47, n.11, p.53–59.

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

KIM, H.R.; LEE, I.S.; BAE, J.H. (2003). Performance of a sulphur-utilizing fluidized bed reactor for post-denitrification. *Process Biochemistry*, v.39: p.1591–1597.

KLEEREBEZEM, R.; MENDEZ, R. (2002). Autotrophic denitrification for combined hydrogen sulfide removal from biogas and post-denitrification. *Water Science and Technology*, v.45, n.10, p.349–356.

KOENIG, A.; LIU, H. (2001). Kinetic model for autotrophic denitrification in sulphur packed-bed reactors. *Water Research*, v.35, n.8, p.1969-1978.

KOENIG, A.; LIU, L.H. (2002). Use of limestone for pH control in autotrophic denitrification: continuous flow experiments in pilot-scale packed bed reactors. *Journal of Biotechnology*, v.99, p.161–171.

KRISHNAKUMAR, B.; MANILAL, V. B. (1999). Bacterial oxidation of sulphide under denitrifying conditions. *Biotechnology Letters*, v. 21, p. 437–440.

KUENEN, J. G. (1985). Colourless sulphur bacteria and their role in the sulphur cycle. *Plant and Soil*, v.43, p.49–76.

LENS, P.N.L.; VISSER, A.; JANSSEN, A.J.H.; HULSHOFF POL, L.W.; LETTINGA, G. (1998). Biotechnological treatment of sulfate-rich wastewater. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, v.28, n.1, 41–88.

LEVENSPIEL, O. (1999). *Chemical Reaction Engineering*. 3ed., John Wiley & Sons Inc., EUA, 563p.

LIM, J-W.; SENG, C-E.; LIM, P-E.; NG, S-L.; SUJARI, A-N.A. (2011). Nitrogen removal in moving bed sequencing batch reactor using polyurethane foam cubes of various sizes as carrier materials. *Bioresource Technology*, v.102, p.9876–9883.

MACE, S., MATA-ALVAREZ, J. (2002). Utilization of SBR technology for wastewater treatment: an overview. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v.41, p.5539–5553.

MAHMOOD, Q.; ZHENG, P.; CAI, J.; WU, D.; HU, B.; ISLAM, E.; AZIM, M.R. (2007b). Comparision of anoxic sulfide biooxidation using nitrate/nitrite as electron acceptor. *Environmental Progress*, v.26, n.2, p.169–177.

MAHMOOD, Q.; ZHENG, P.; CAI, J.; WU, D.; HU, B.; LI, J. (2007a). Anoxic sulfide biooxidation using nitrite as electron acceptor. *Journal of Hazardous Materials*, v.147, p.249–256.

MANCONI, I.; CARUCCI, A.; LENS, P. (2007) Combined removal of sulfur compounds and nitrate by autotrophic denitrification in bioaugmented activated sludge system. *Biotechnology and Bioengineering* v.98, p.551–560.

MARTINS, T.H. (2010). *Conversão de compostos nitrogenados em reatores biológicos: operação, caracterização microbiológica e filogenética*. 115p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

MATHIOUDAKIS, V.L.; AIVASIDIS, A. (2009). Heterotrophic denitrification kinetics in a pressurized sewer biofilm reactor. *Desalination*, v.248, p.696–704.

METCALF E EDDY. Inc. (2003). *Wastewater Engineering – Treatment and reuse*. 4 ed. New York, McGraw-Hill Internacional edition, 1819p.

MODIN, O.; FUKUSHI, K.; NAKAJIMA, F.; YAMAMOTO, K. (2010). Aerobic methane oxidation coupled to denitrification: kinetics and oxygen supply. *Journal of Environmental Engineering*, v.136, n.2, p.211–219.

MOON, H.S.; ANH, K.H.; LEE, S.; NAM, K.; KIM, J.Y. (2004). Use of autotrophic sulfur-oxidizers to remove nitrate from bank filtrate in a permeable reactive barrier system. *Environmental Pollution*, v.129, p.499–507.

MOON, H.S.; CHANG, S.W.; NAM, K.; CHOE, J.; KIM, J.Y. (2006). Effect of reactive media composition and co-contaminants on sulfur-based autotrophic denitrification. *Environmental Pollution*, v.144, p.802–807.

MORAES, B.S. (2009). *Utilização de sulfeto como doador de elétrons para a desnitrificação autotrófica aplicada ao tratamento de esgoto sanitário*. 105p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

MORAES, B.S.; FORESTI, E. (2012). Determination of the intrinsic kinetic parameters of sulfide-oxidizing autotrophic denitrification in differential reactors containing immobilized biomass. *Bioresouce Technology*, v.104, p.250–256.

MORAES, B.S.; SOUZA, T.S.O.; FORESTI, E. (2011). Characterization and kinetics of sulfide-oxidizing autotrophic denitrification in batch reactors containing suspended and immobilized cells. *Water Science Technology*, v.64, p.731–738.

MORLING, S. (2010). Nitrogen removal and heavy metals in leachate treating using SBR technology. *Journal of Hazardous Materials*, v.174, p.679–686.

MÜNCH, E.V.; LANT, P.; KELLER, J. (1996). Simultaneous nitrification and denitrification in bench-scale sequencing batch reactors. *Water Research*, v.30, n.2, p.277–284.

PÉREZ, R.; GALÍ, A.; DOSTA, J.; MATA-ALVARÉZ, J. (2007). Biological nitrógeno removal (BNR) using sulfides for autotrophic denitrification in a sequencing batch reactor (SBR) to treat reject water. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v.46, p.6646–6649.

PERRY, R.H.; CHILTON, C.C. (1985). *Chemical Engineers Handbook*. 5.ed, McGraw-Hill, New York.

POCHANA, K.; KELLER, J. (1999). Study of factors affecting simultaneous nitrification and denitrification (SND). *Water Science Technology*, v.39, p.61–68.

POO, K.M., JUNG, B.H., LEE, S.H., IM, J.H., WOO, H.J., KIM, C.W. (2004). Treatment of strong nitrogen swine wastewater in a full-scale sequencing batch reactor. *Water Science Technology*, v.49, p.315–323.

RATUSZNEI, S.M.; RODRIGUES, J.A.D.; CAMARGO, E.F.M.; RIBEIRO, R.; ZAIAT, M. (2003). Effect of feeding strategy on a stirred anaerobic sequencing fed-batch biofilm reactor containing immobilized biomass. *Bioresource Technology*, v.90, p.199–205.

REYES-ÁVILA, J.; RAZO-FLORES, E.; GÓMEZ, J. (2004). Simultaneous biological removal of nitrogen, carbon and sulfur by denitrification, *Water Research*, v.38, p.3313–3321.

RICHARDSON, D.J.; WATMOUGH, N.J. (1991). Inorganic nitrogen metabolism in bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology*, v.3, n.2, p.207–219.

RODRÍGUEZ, J.A. (2006). Filtro biológico aeróbio/anóxico para remoção de nitrogênio de efluentes de reatores UASB. 146p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

RUIZ, G.; JEISON, D.; CHAMY, R. (2003). Nitrification with high nitrite accumulation for the treatment of wastewater with high ammonia concentration. *Water Research*, v.37, p.1371–1377.

SANTOS, S.G.; VARESCHE, M.B.A.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. (2004). Comparison of methanol, ethanol, and methane as electron donors for denitrification. *Environmental Engineering Science*. v.21, n.6, p.313–320.

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

SCHRUM, H.N.; SPIVACK, A.J.; KASTNER, M; D'HONDT, S. (2011). Sulfate-reducing ammonium oxidation: A thermodynamically feasible metabolic pathway in subseafloor sediment. *Geology*, v.37, n.10, p.939–942.

SEARS, K., ALLEMAN, J.E., BARNARD, J.L., OLESZKIEWICZ, J.A. (2004). Impacts of reduced sulfur components on active and resting ammonia oxidizers. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v.31, p.369–378.

SIERRA-ALVAREZ, R.; BERISTAIN-CARDOSO, R.; SALAZAR, M.; GÓMEZ, J.; RAZO-FLORES, E; AND FIELD, J. (2007) Chemolithotrophic denitrification with elemental sulfur for groundwater treatment. *Water Research*, v.41, p.1253–1262.

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

SOARES, M. I. M. (2002). Denitrification of groundwater with elemental sulfur. *Water Research*, v.36, p.1392–1395.

SOUZA, T.S.O. (2011). *Desnitrificação autotrófica usando sulfeto como doador de elétrons para remoção de nitrogênio de efluentes de reatores anaeróbios utilizados no tratamento de esgoto sanitário*. 167p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

SPÍNOLA, A.L.G. (2009). *Biofilmes aeróbios para remoção de nitrogênio em células de fluxo, submetidos a diferentes velocidades superficiais e taxas de carregamento*. 96p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER (2005) 21st ed, American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC, USA.

STROUS, M.; VAN GERVEN, E.; KUENEN, M. S. M.; JETTEN, M. (1997a). Effects of aerobic and microaerobic conditions on anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, v.63, n.6, p.2446–2448.

STROUS, M.; VAN GERVEN, E.; ZHENG, P.; KUENEN, M. S. M. (1997b). Ammonium removal from concentrated waste streams with the anaerobic ammonium oxidation (Anammox) process in different reactor configurations. *Water Research*, v.31, p.1955–1962.

SUMINO, T.; ISAKA, K.; IKUTA, H.; SAIKI, Y.; YOKOTA, T. (2006). Nitrogen removal from wastewater using simultaneous nitrate reduction and anaerobic ammonium oxidation in a single reactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.102, n.4, p.346–351.

THALASSO, F., VALLECILLO, A., GARCIA-ENCINA, P., AND FDZ-POLANCO, F. (1997). The use of methane as a sole carbon source for wastewater denitrification. *Water Research*, v.31, n.1, 55–60.

TIEDJE, J.M. (1982). Denitrification. In: PAGE, A.L.; MILLER, R.H.; KEENEY, D.R. *Methods of soil analysis*. Winsconsin: American Society Agronomy. Cap.47, p.1011–1026.

TILCHE, A., BACIELERI, E., BORTONE, G., MALASPINA, F., PICCININI, S., STANTE, L. (1999). Biological phosphorus and nitrogen removal in a full scale sequencing batch reactor treating piggy wastewater. *Water Science Technology*, v.40, p.199–206.

TORRES, P. (1992). *Desempenho de um reator de manta de lodo (UASB) de bancada no tratamento de substrato sintético simulando esgoto sanitário*. 186p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

TURK, O.; MANIVIC, D.S. (1989). Maintaining nitrite build-up in a system acclimated to free ammonia. *Water Research*, v.23, n.11, p 1383–88.

U.S EPA (1993). *Nitrogen control manual*, EPA/625/R-93/010, Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.

VAIOPOULOU, E.; MELIDIS, P.; AIVASIDIS, A. (2005). Sulfide removal in wastewater from petrochemical industries by autotrophic denitrification. *Water Research*, v.39, p. 4101–4109.

VAN DER GRAAF, A.A.V.; MULDER, A.; DEBRUIJN, P.; JETTEN, M.S.M.; ROBERTSON, L.A.; KUENEN, J.G. (1996). Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology-Uk*, v.142, p2187–2196.

VAN HANDEEL, A.; MARAIS, G. (1999). *O comportamento do sistema de lodo ativado: Teoria e aplicações para projetos e operação*, Epgraf, Campina Grande, 472p.

VAN KEMPEN R.; MULDER, J.W.; UIJTERLINDE, C.A.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M. (2001). Overview: full scale experience of the SHARON process for treatment of rejection water of digested sludge dewatering. *Water Science Technology*, v.44, p.145 – 52.

VICTORIA, J.R.; FORESTI, E. (2011). A novel aerobic-anoxic biological filter for nitrogen removal from UASB effluent using biogas compounds as electron donors for denitrification. *Revista Facultad de Ingenieria – Universidad de Antioquia*, v.60, p.72–80.

VIEIRA, L.G.T. (1996). *Estimativa de parâmetros cinéticos intrínsecos de utilização de substrato por lodo anaeróbio imobilizado*. 63p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

VILLAYERDE, S.; LACALLE, M.L.; GARCIA, P.A.; FDZ-POLANCO, F. (2000). Nitrification–denitrification of UASB effluents highly loaded with nitrogen in an activated sludge reactor operated with short cycled aeration. Seminario Latino-Americano de Digestão Anaeróbia, Recife, Brasil.

VILLAYERDE, S. (2004). Recent developments on biological nutrient removal processes for wastewater treatment. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, v.3, p.171–183.

WAN, D.; LIU, H.; QU, J.; LEI, P.; XIAO, S.; HOU, Y. (2009). Using the combined bioelectrochemical and sulfur autotrophic denitrification system for groundwater denitrification. *Bioresource Technology*, v.100, p.142–148.

WANG, A.; LIU, C.; REN, N.; HAN, H.; LEE, D. (2010). Simultaneous removal of sulfide, nitrate and acetate: kinetic modeling. *Journal of Hazardous Materials*, v.178, p.35–41.

WANG, Z.S. (1998). Application of biofilm kinetics to the sulfur/lime packed bed reactor for autotrophic denitrification of groundwater. *Water Science Technology*, v.37, n.9, p.97–104.

WANNER, J. (1991). Use of the routine biological analysis to check the performance of sewage treatment plants. In: Proceedings of International Symposium on Biological Approach to Sewage Treatment Process: Current Status and Perspectives.

WEEG-AERSSENS, E.; WU, W.; YE, R.W.; TIEDJE, J.M.; CHANG, C.K. (1991). Purification of cytochrome cdl, nitrite reductase from *Pseudomonas stutzeri* JM300 and reconstitution with native and synthetic heme dl. *Journal of Biological Chemistry*, v.266, p.7496–7502.

WELTY, J.R.; WICKS, C.E.; WILSON, R.E. (1984). *Fundamentals of momentum, heat and mass transfer*. 3ed, John Wiley e Sons, New York.

WERNER, M.; KAYSER, R. (1991). Denitrification with biogas as external carbon source. *Water Science Technology*, v.23, p.701–708.

WERZERNACK, C.T.; GANNON, T.T. (1967). Oxygen-nitrogen relationships in autotrophic nitrification. *Applied Microbiology*, v.15, p.211.

WESTRIN, B.A.; AXELSSON, A. (1991). Diffusion in gel containing immobilized cells: a critical review. *Biotechnology and Bioengineering*, v.38, p.439–446.

WILHELM, E.; BATTINO, R.; WILCOCK, R. J. (1977). Low-pressure solubility of gases in liquid water. *Chemical Reviews*, v.77, p.219–262.

YANG, L.; ALLEMAN, J.E. (1992). Investigation of batchwise nitrite build-up by an enriched nitrification culture. *Water Science Technology*, v.26, p.997–1005.

YANG, Z.; ZHOU, S.; SUN, Y. (2009). Start-up of simultaneous removal of ammonium and sulfate from an anaerobic ammonium oxidation (anammox) process in an anaerobic up-flow bioreactor. *Journal of Hazardous Materials*, v.169, p.113–118.

YOO, H., AHN, K-H., LEE, H-J., LEE, K-H., KWAK, Y-J., SONG, K-G. (1999). Nitrogen removal from wastewater by simultaneous nitrification and denitrification (SDN) via nitrite in an intermittently-aerated reactor. *Water Research*, v.33, n.1, p.145–154.

YUN, H.J.; KIM, D.J. (2003). Nitrite accumulation characteristics of high strength ammonia wastewater in an autotrophic nitrifying biofilm reactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.78, p.377–383.

ZAIAT M.; CABRAL A. K. A.; FORESTI E. (1994) Reator anaeróbico de leito fixo para tratamento de águas residuárias: concepção e avaliação preliminar de desempenho. *Revista Brasileira de Engenharia - Caderno de Engenharia Química*, v.11, p.33–42.

ZAIAT, M.; VEIRA, L. G. T.; FORESTI, E. (1996). Intrinsic kinetic parameters of substrate utilization by immobilized anaerobic sludge. *Biotechnology and bioengineering*, v.53, p.220–225.

ZHENG, H.; ZHANG, T.C. (2005). Evaluation of kinetic parameters of a sulfur-limestone autotrophic denitrification biofilm process. *Water Research*, v.39, p.4941–4952.

ZHANG, T. C.; LAMP, D. G. (1999). Sulfur: limestone autotrophic denitrification processes for treatment of nitrate-contaminated water: batch experiments. *Water Research*, v. 33, n.3, p. 599–608.