UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E SANEAMENTO

CARLA ELOÍSA DINIZ DOS SANTOS

**Remoção de nitrogênio de efluente de reator anaeróbio
via processo NDS utilizando sulfeto como doador de
elétrons na desnitrificação autotrófica**

Versão Corrigida

São Carlos

2019

CARLA ELOÍSA DINIZ DOS SANTOS

Remoção de nitrogênio de efluente de reator anaeróbio via processo NDS
utilizando sulfeto como doador de elétrons na desnitrificação autotrófica

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

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Helena
Rissato Zamariolli Damianovic

São Carlos
2019

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 elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues
Fontes da EESC/USP

S237r Santos, Carla Eloísa Diniz dos
Remoção de nitrogênio de efluente de reator anaeróbio via processo NDS utilizando sulfeto como doador de elétrons na desnitrificação autotrófica / Carla Eloísa Diniz dos Santos ; orientadora Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic. -- São Carlos, 2018.

Tese (Doutorado)- Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2018.

1. Pós-tratamento biológico. 2. Toxicidade do sulfeto. 3. Reator de leito estruturado submetido à aeração intermitente (LEAI). 4. Potencial de óxido-redução (POR). 5. Efluente salino. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Engenheira **CARLA ELOÍSA DINIZ DOS SANTOS**.

Título da tese: "Remoção de nitrogênio de efluente de reator anaeróbio via processo NDS utilizando sulfeto como doador de elétrons na desnitrificação autotrófica".

Data da defesa: 31/08/2018.

Comissão Julgadora:

Resultado:

Profa. Dra. **Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic**
(Orientadora)
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Aprovado

Prof. Dr. **Theo Syro Octavio de Souza**
(Escola Politécnica/EP-USP)

Aprovada

Prof. Dr. **Rafael Brito de Moura**
(Universidade Federal de Alfenas/UNIFAL)

Aprovado

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

Aprovada

Dra. **Rachel Biancalana Costa**
(Pós-Doutoranda/UNESP)

Aprovada

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

Prof. Dr. **Eduardo Mario Mendiando**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Associado **Luís Fernando Costa Alberto**

À minha mãe, pelo amor,
carinho e dedicação incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me proporcionar a vida, a saúde e a vontade de viver no caminho do bem.

Aos meus pais e a toda minha família, mas especialmente à minha mãe, Diva, pela educação, pelo carinho e acima de tudo, pela presença marcante em todos os momentos de minha vida. Agradeço também à minha irmã, Dani, que apesar de ter um gênio totalmente oposto ao meu, me completa em todos os meus sentidos.

Aos meus avós Geraldo e Orlanda por terem tido papel fundamental na minha criação e na formação do meu caráter. Eles sempre me incentivaram muito a seguir atrás dos meus sonhos e mesmo não estando presencialmente na finalização dessa etapa, sei que estão comemorando com muita alegria a minha conquista, onde quer que estejam.

Ao meu amigo e namorado, Bruno, que chegou de mansinho na minha vida e hoje já soma os seus sonhos aos meus. Obrigada por ouvir meus medos, compreender meus desabafos, por me incentivar a trilhar meu rumo (mesmo que para isso a gente precise ficar um pouco mais longe um do outro) e por acreditar em mim muito mais do que eu mesma.

À minha orientadora, Prof^{ra}. Márcia Damianovic, por me acompanhar nestes quatro anos de muita aprendizagem e por me ajudar na minha formação como pesquisadora. Agradeço sua generosidade ao me envolver no planejamento e execução de trabalhos de outros alunos. Também sou grata por compartilhar conhecimentos e saberes importantes para lidar com o início de minha trajetória como docente e com as expectativas/frustrações do mundo dos concursos públicos. São lições que irei levar comigo até o final da caminhada!

Ao Prof. Eugenio Foresti, pela participação em vários momentos da minha trajetória no LPB. Nossa convivência só fez aumentar todo o respeito e admiração que, mesmo antes de conhecê-lo, eu já nutria por você.

Ao Prof^o Marcelo Zaiat por ter sido o primeiro a me incentivar a topar o intercâmbio para a Polônia, pela amizade e pela oportunidade de acompanhar suas disciplinas nas monitorias PAE.

Ao Prof. Franscisco Javier Cuba Teran e a Universidade Estadual Paulista (UNESP) pela iniciação na vida científica e ensino de qualidade. Ao Rafael (Bazola) pelos ensinamentos prévios no laboratório quando eu ingressei no mestrado, pelas infinitas conversas por email e pelas parcerias ao longo destes sete anos de pós-graduação.

Aos Professores Dagoberto Yukio Okada e Theo Syrto Octavio de Souza pelas valiosas contribuições na banca de qualificação, as quais deram nova guinada à minha pesquisa.

Aos companheiros de trabalho que tive no LPB ao longo desses quatro anos Alana, Alejandra, Carol Granatto, Danilo Ayabe, Elias, Elis, Fabrício, Fiaz, Gui Oliveira, Guilherme Soares, Guilherme Vuitik, Juliana Kawanishi, Juliana Silva, Inaê, Inês, Leonardo (seu Léo), Mara Rúbia, Marcus Vinícius, Mirian, Mirabele, Moara, Pâmela, Raíssa, Raphaella, Rodrigo Carneiro, Rogério, Tainá, Tiago (Cebola), Thiago IQSC, Vanessa, Vivian. Um agradecimento especial aos meus amigos nitrogenados: Bruno

Giz, Jéssica Lopes e Renata, pelas excelentes discussões de artigos e grande companheirismo na hora de organizar a bancada do nitrogênio. Ao Leandro e à Renata, por não se contentarem com a resposta “fazemos assim porque é assim e ponto”, por levantarem vários “e se” no meio do caminho e esquematizarem experimentos para investigá-los. Isso é fazer ciência de verdade! Obrigada por terem me contagiado com essa curiosidade científica. À Rachel, por ter se tornado uma grande amiga, por todos os conselhos e abraços. Não posso deixar de agradecer por você ter me inserido no mundo do yoga, cuja prática, sem dúvidas, tornou minha vida muito mais leve. À Ana Flavia, aquela que conquistou minha simpatia mesmo antes de nos conhecermos pessoalmente. Que alegria foi ver que você é mesmo essa grande mulher, como as mensagens no grupo do whatsapp me mostravam. À Cris e Williane, que abraçaram o legado da continuação do meu trabalho de pesquisa e sempre estiveram abertas a receber minhas opiniões. À Camila, amiga tão especial que me abriu as portas da sua casa e se tornou um exemplo de pessoa, mulher e mãe que vou levar pra vida toda. Aos amigos Adriana (Drica), Djalma, Mara Rúbia, Mari Carosia, Milena, Rachel, Tiago (Cebola) e Thiago por serem companheiros para todas as horas, seja nos momentos de descontração (sempre regados com cervejinha e boa música) ou naqueles de desânimo e incertezas do futuro (que só quem faz pós-graduação é capaz de compreender). Aos amigos panquecados Carol Gil, Eduardo (Dú), Leandro, Lucas, Pri, Rachel e Tiago Paladino, pelo suporte em cada momento de desânimo enfrentado durante o doutorado e por todas as risadas na sala de análises. Sou grata à Laís Américo pela companhia no forró do Caaso e nos shows do Sesc e por toda a ajuda (e paciência) na parte de coleta da biomassa e análise de biologia molecular.

Às amigas “das antigas” Tati Dumke, Renata, Flavia, Mari, Carina, Kiemi, Paulinha, Tati Santos, Anelise, Aline e Camila pelos grandes momentos compartilhados em Prudente e pela saudade que nunca passa.

Aos amigos do SHS/São Carlos Andressa, Ana Paula, Araceli, Camila Leite, Evandro, Felipe (Seu Jorge), Fer, Gabi, Gui (Monstro), Jamil, Karen, Laís Giralddi, Livia Botta, Livia Rosalem, Matheus, Nathee Pelinson, Paulo (Pauleta), seu Orivaldo, Rafael (Arroz), Tácyo e Tiago (Cebola). Cada um tem sua importância em momentos específicos desses quatro anos. Obrigada por tornarem minha trajetória mais leve e alegre!

Agradecimento especial para minhas amigas de apartamento Fran e Jacque, por todos os momentos de risadas, de artes na cozinha e por toda a cumplicidade que só a convivência diária pode proporcionar a uma amizade. Obrigada também a Jú, minha amiga-irmã são-carlense, pela amizade e carinho.

Aos técnicos do Laboratório de Processos Biológicos, pelo auxílio com análises e experimentos: Carol Sabatini, Elô Pozzi, Janja e Isabel. Aos funcionários do prédio da Engenharia Ambiental: Dona Rosa, Andrea, Fernando, Silvana e seu Antônio.

Ao Projeto Carbala pelo financiamento recebido para o período de doutorado sanduíche Ao Prof^o Jacek Makinia por ter me recebido em seu grupo de pesquisa na Universidade Técnica de Gdańsk. Agradecimento especial aos amigos da universidade Agnieszka Tuszynska, Jaime Gonzalez Vilaplana, Joanna Majtacz, Kamil Wisniewski, Martin Muñoz Morales e Zhixuan Yin. E também aos amigos que conheci em Gdańsk Claudio, Gabriel, Gosia, Inna, Léo, Michał, Natalia, Paweł e Sarah. Não posso deixar de lembrar

do sábio amigo Guilherme Oliveira (GHDO) me dizendo, pouco antes da minha partida para Polônia, que a vida só começa quando saímos de nossa zona de conforto. Essa foi a primeira e a lição mais presente na minha vida naqueles doze meses: enfrentar os desafios da saudade do Brasil e da comunicação e convivência com uma cultura totalmente diferente da minha, tirando grandes aprendizados e muita evolução pessoal de tudo isso.

À Universidade de São Paulo, à Escola de Engenharia de São Carlos e ao Departamento de Hidráulica e Saneamento. Ao corpo técnico e administrativo do departamento: Sá, Priscila e Rose, por todo auxílio prestado ao longo de minha trajetória na pós-graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro à execução do trabalho.

*A utopia está lá no horizonte.
Me aproximo dois passos,
ela se afasta outros dois passos.
Caminho dez passos
e o horizonte corre dez passos.
Por mais que eu caminhe, jamais alcançarei.
Para que serve a utopia?
Serve para isso:
para que eu não deixe de caminhar.*

Eduardo Galeano

RESUMO

SANTOS, C. E. D. **Remoção de nitrogênio de efluente de reator anaeróbico via processo NDS utilizando sulfeto como doador de elétrons na desnitrificação autotrófica.** 2018. 191 p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

O principal objetivo deste trabalho foi a avaliação da viabilidade do pós-tratamento de efluente rico em sulfato pré-tratado em sistema anaeróbico, explorando o processo de nitrificação e desnitrificação simultâneas (NDS), em reator de leito estruturado submetido a aeração intermitente (LEAI), utilizando sulfeto como doador de elétrons na redução do nitrogênio oxidado remanescente. O trabalho foi dividido em duas etapas, sendo o sulfeto (HS^-) fornecido como doador de elétrons preferencial para desnitrificação. Na Etapa 1, HS^- produzido pelas bactérias redutoras de sulfato (BRS) no reator anaeróbico (RAn) esteve continuamente presente no efluente encaminhado ao reator LEAI, uma vez que os dois sistemas foram operados em série. Como resultado, observou-se efeitos tóxicos sobre a comunidade nitrificante, limitando a remoção de N-total. A eficiência máxima de oxidação de N-NH_4^+ atingida foi de $60 \pm 12\%$. Na Etapa 2, HS^- passou a ser adicionado por bombeamento de solução concentrada de sulfeto de sódio. Duas estratégias de adição do sulfeto foram testadas, iniciadas após os 30 min iniciais de cada etapa não-aerada: solução de sulfeto adicionada em pulsos únicos, com tempo de bombeamento de 15 min (Estratégia I) e adição de maneira contínua ao longo dos 90 min restantes de cada fase não-aerada (Estratégia II). A forma de administração de sulfeto reduziu seu efeito inibitório à comunidade nitrificante na Etapa 2, alcançando eficiência de oxidação de N-NH_4^+ de $65 \pm 7,8\%$. Entretanto, a remoção de N-total no reator LEAI foi limitada pela etapa de desnitrificação, uma vez que aporte de doador de elétrons inorgânico manteve-se abaixo da demanda estequiométrica nas duas estratégias de adição de sulfeto testadas. Observou-se que a adição de sulfeto mais diluída ao longo do tempo (Estratégia II) teve efeitos menos negativos à biota nitrificante na fase subsequente, refletindo em maior estabilidade e aumento da eficiência média de nitrificação de 59 para 65%, em comparação com a Estratégia I. Testes de perfis temporais de concentrações foram realizados ao final de cada etapa para elucidar a dinâmica e os efeitos do sulfeto sobre os processos combinados de nitrificação e desnitrificação. Observou-se que o sulfeto dissolvido foi efetivamente utilizado como doador de elétrons em ambas as Etapas Experimentais, resultando em cargas máximas de N-total removido de 0,095 e 0,065 $\text{kgN m}^{-3}\text{d}^{-1}$ nas Etapas 1 e 2, respectivamente. Ao final do período operacional, análises de sequenciamento do rRNA 16s detectaram sequências relacionadas a microrganismos nitrificantes do gênero *Luteimonas*, desnitrificantes heterotróficos (*Thauera* e *Azoarcus*) e autotróficos (*Thiobacillus*). Esses resultados demonstram que os processos de nitrificação e desnitrificação (autotrófica e heterotrófica) foram os envolvidos na remoção de nitrogênio no reator LEAI.

Palavras-chave: Pós-tratamento biológico, toxicidade do sulfeto, nitrogênio, água residuária rica em sulfato.

ABSTRACT

SANTOS, C. E. D. **Nitrogen removal from an anaerobic effluent by SND process coupled to sulfide-driven autotrophic denitrification.** 2018. 191 p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

The present study evaluated the feasibility of the post-treatment of the effluent from an anaerobic system treating sulfate-rich wastewater. The post-treatment was based on simultaneous nitrification and sulfide-driven autotrophic denitrification of the remaining oxidized nitrogen using a structured-bed reactor subjected to recirculation and intermittent aeration (SBBRIA). This investigation was divided into two main sections (Stages 1 and 2), with the sulfide (HS^-) supplied as the preferred electron donor for denitrification. In Stage 1, the HS^- biologically produced by the sulfate-reducing bacteria (SRB) in the anaerobic reactor (ARn) was continuously provided in the SBBRIA feeding, as the two systems were operated in series. As a result, sulfide partially inhibited the nitrifying activity, limiting the overall nitrogen removal performance. The maximum NH_4^+ -N oxidation efficiency reached was $60 \pm 12\%$. In Stage 2, HS^- was added in the SBBRIA by pumping a concentrated solution of sodium sulfide. Two strategies of sulfide addition were tested, both of them initiated after 30 min of each non-aerated period of the intermittent aeration cycle. In Strategy I, the sulfide solution was added by single pulses of 15 min in each non-aerated period. In Strategy II, a continuous sulfide addition during 90 min of each non-aerated period was tested. The sulfide-controlled addition reduced its inhibitory effect on the nitrifying community in Stage 2, resulting in an NH_4^+ -N oxidation efficiency of $65 \pm 7.8\%$. However, the Total-N removal was still limited by the denitrification, as the sulfide supply remained below the stoichiometric demand in both two strategies tested. Strategy II was less harmful for the nitrifying activity in the subsequent aerated period, reflecting in higher stability and increase of the NH_4^+ -N oxidation efficiency from 59 to 65%, compared to Strategy I. At the end of each stage, temporal profiles were performed to elucidate the dynamics of sulfide and its impacts on combined processes. Dissolved sulfide was effectively used as an electron donor for autotrophic denitrification in both stages, resulting in maximum Total-N removed loads of 0.095 and 0.065 $\text{kgN m}^{-3}\text{d}^{-1}$ in Stages 1 and 2, respectively. At the end of the operational period, rRNA 16S sequencing analysis detected sequences related to nitrifiers belonging to *Luteimonas*, heterotrophic (*Thauera* and *Azoarcus*) and autotrophic (*Thiobacillus*) denitrifiers. These results demonstrated that nitrification and denitrification (autotrophic and heterotrophic pathways) were likely in the processes involved in nitrogen removal in SBBRIA reactor.

Keywords: Biological post-treatment, sulfide toxicity, nitrogen, sulfate-rich wastewater.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema de um floco de lodo ativado com regiões aeróbias e anóxicas.	33
Figura 2 - Linha do tempo operacional do trabalho.	47
Figura 3 - Fluxograma experimental da Etapa 1.	49
Figura 4 - Fluxograma experimental da Etapa 2.	50
Figura 5 - Esquema dos reatores em escala de bancada: 1- reservatório de água residuárias sintética; 2- bomba de alimentação; 3- reator anaeróbio (RAn); 4- amostragem do efluente do reator anaeróbio; 5- selo hídrico; 6- reator LEAI; 7- pedra porosa (aeração intermitente); 8- bomba de recirculação; 9- efluente final; 10 - aerador.	51
Figura 6 - Esquema de adição de sulfeto no reator LEAI a partir de solução concentrada de $\text{Na}_2\text{S } 9\text{H}_2\text{O}$: 1- reservatório de água residuária sintética simulando efluente pré-tratado; 2- bomba de alimentação; 3- reator LEAI; 4- efluente final; 5- bomba de recirculação; 6- pedra porosa; 7- solução concentrada de $\text{Na}_2\text{S } 9\text{H}_2\text{O}$; 8- bomba de alimentação de sulfeto; 9- coletores plásticos contendo $\text{N}_{2(\text{g})}$; 10 – compressor de ar.	63
Figura 7 – Processo de congelamento em nitrogênio líquido (A) e corte da espuma (B) para obtenção de biomassa das frações externa e interna do biofilme.	69
Figura 8 – Perfil temporal das concentrações de DQO afluente e efluente e da eficiência de remoção de DQO no reator anaeróbio.	84
Figura 9 - Perfil temporal das concentrações de sulfato afluente e efluente e da eficiência de remoção no reator anaeróbio.	84
Figura 10 – Gráficos <i>boxplot</i> das eficiências de redução de sulfato (A) e remoção de DQO(B) no reator anaeróbio.	85
Figura 11 - Fluxo de elétrons entre os processos biológicos estabelecidos no reator anaeróbio ao longo de toda operação.	87
Figura 12 - Perfil temporal da comparação entre sulfeto medido (STD) e sua produção teórica ao longo da operação do reator anaeróbio.	88
Figura 13 – Perfil temporal das espécies de sulfeto (ionizada e molecular) e do pH efluente no reator anaeróbio.	89
Figura 14 – Perfil da alcalinidade parcial em amostras afluente e efluente.	90
Figura 15 – Perfil temporal da alcalinidade a bicarbonato e da relação A_I/A_P em amostras efluentes do reator anaeróbio.	92
Figura 16 – Valores médios da produção de ácidos orgânicos voláteis em cada condição operacional.	93
Figura 17 - Variação da concentração de sólidos no afluente e efluente produzido pelo reator anaeróbio nas condições experimentais testadas.	96
Figura 18 – Deposição de biomassa suspensa no fundo do reator anaeróbio ao final de sua operação.	97
Figura 19 - Variação das concentrações efluentes de N-amoniaco, N-nitrito e N-nitrato durante fase de adaptação.	98
Figura 20 – Depósito de enxofre elementar sobre a superfície das hastes de espuma utilizadas como material suporte no reator LEAI.	99

Figura 21 - Variação da concentração de N-NH_4^+ nas amostras afluyente, efluente e a eficiência de oxidação de N-NH_4^+ ao longo da operação do reator LEAI na Etapa Experimental 1.	104
Figura 22 – Perfil temporal da concentração de sulfetos dissolvidos presente no efluente e da eficiência de nitrificação alcançada no reator LEAI na Etapa Experimental 1.	105
Figura 23 - <i>Boxplot</i> da eficiência de oxidação de amônia no reator LEAI em cada condição operacional da Etapa Experimental 1.....	106
Figura 24 - <i>Boxplot</i> das eficiências de desnitrificação e remoção de N-total no reator LEAI na Etapa Experimental 1.....	107
Figura 25 – Perfil do potencial de óxido-redução durante ciclos de aeração intermitente. ...	110
Figura 26 – Variação da concentração de sólidos nos efluentes produzidos pelos reatores anaeróbio e LEAI nas Condições III e IV.....	115
Figura 27 – Perfis da oxidação de N-NH_4^+ e POR obtidos no Teste 1, sob aeração contínua.	116
Figura 28 - Perfis da oxidação de N-NH_4^+ e POR obtidos na ausência de sulfeto e sob aeração contínua (Teste 2).....	118
Figura 29 – Perfis da concentração de N-nitrato e sulfeto total dissolvido ao longo do Teste 3, sob condições anóxicas.	119
Figura 30 – Perfis temporais das concentrações de DQO e N-nitrato no Teste 4, sob condições anóxicas.....	121
Figura 31 – Comparação entre colonização microbiana na espuma de poliuretano: espuma nova (A), espuma ao final da operação do reator anaeróbio (B).	124
Figura 32 - Imagens da microscopia eletrônica de varredura de amostras coletadas ao final da operação do reator anaeróbio: bacilos alongados e com extremidades retas semelhantes a <i>Methanosaeta</i> (A); bacilos curvos (B); cocos (C) e bacilos em filamentos (D).	125
Figura 33 – Acúmulo de enxofre elementar nas paredes do reator anaeróbio e no material suporte (A); corte de espuma para análise de MEV (B).	126
Figura 34 - Imagens da microscopia eletrônica de varredura de amostras coletadas ao final da operação do reator anaeróbio: vista da parte superior, evidenciando o acúmulo de enxofre elementar (A); bacilos curvos (B).....	126
Figura 35 - Concentrações afluyente e efluente de N-NH_4^+ e sua eficiência de oxidação na Etapa Experimental 2.....	137
Figura 36 - Perfil temporal da concentração de sulfetos dissolvidos presente no efluente e da eficiência de nitrificação alcançada no reator LEAI na Etapa Experimental 2.	137
Figura 37 - <i>Boxplot</i> das eficiências de oxidação de amônia no reator LEAI em cada estratégia testada na Etapa Experimental 2.	138
Figura 38 – <i>Boxplot</i> das eficiências de desnitrificação e remoção de N-total no reator LEAI nas duas estratégias avaliadas na Etapa 2.	139
Figura 39 - Perfil do potencial de óxido-redução durante ciclos de aeração intermitente na Estratégia II.	142
Figura 40 - Variação da concentração de sólidos no afluyente e efluente do reator LEAI nas Estratégias I e II testadas na Etapa 2.....	147
Figura 41 - Perfis da oxidação de N-NH_4^+ (A), POR e OD (B) obtidos no Teste 1.	149
Figura 42 – Perfis da concentração de N-nitrato e sulfeto total dissolvido ao longo do Teste 2, sob condições anóxicas.	151

Figura 43 - Perfis temporais das concentrações de DQO e N-nitrato no Teste 3, sob condições anóxicas.	152
Figura 44 - Comparação entre colonização microbiana na espuma de poliuretano: espuma nova (A), espuma ao final da operação do reator LEAI (B).....	153
Figura 45 – Corte vertical sobre a espuma de poliuretano no qual observa-se a profundidade média de ocupação dos poros por biofilme.	154
Figura 46 – Imagens da microscopia eletrônica de varredura evidenciando parte externa do biofilme estabelecido no reator LEAI: bactéria filamentosa, cocos e bacilos (A); <i>Euglypha tuberculata</i> (B).	154
Figura 47 - Imagem da microscopia eletrônica de varredura evidenciando parte interna do biofilme estabelecido no reator LEAI.	155
Figura 48 – Principais gêneros identificados nos inóculos do reator LEAI.	156
Figura 49 - Principais famílias identificadas nas frações de biomassa aderida (zonas interna e externa) e suspensa do reator LEAI.....	158
Figura 50 – Principais gêneros identificados nas frações de biomassa aderida (zonas interna e externa) e suspensa do reator LEAI.....	159

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Possíveis rotas metabólicas para remoção biológica de nitrogênio de efluentes de sistemas anaeróbio. Adaptado de Vela et al. (2015).....	36
Tabela 2 – Efeito de concentrações variáveis de sulfeto sobre o processo de nitrificação.....	43
Tabela 3 - Características físicas dos reatores biológicos.....	52
Tabela 4 – Caracterização física dos inóculos.	53
Tabela 5 - Caracterização da água residuária sintética durante a Etapa Experimental 1.....	55
Tabela 6 - Composição da água residuária sintética em cada condição experimental (Adaptado de TORRES, 1992).	56
Tabela 7 - Composição da solução de macronutrientes (adaptado de TORRES, 1992).....	56
Tabela 8 - Composição da solução de micronutrientes (adaptado de TORRES, 1992).	57
Tabela 9 – Caracterização inicial dos perfis temporais realizados no reator LEAI após encerramento da Condição IV.....	60
Tabela 10 - Caracterização da água residuária sintética durante a Etapa Experimental 2.....	64
Tabela 11 – Concentrações de sulfeto testadas nas duas estratégias operacionais.	66
Tabela 12 - Caracterização inicial dos perfis temporais realizados no reator LEAI após encerramento da Estratégia 2.	67
Tabela 13 - Análises físico-químicas realizadas na pesquisa.	71
Tabela 14 – Vazão e TDH médios em cada uma das condições experimentais.	82
Tabela 15 – Médias das cargas aplicadas de matéria orgânica, sulfato e nitrogênio em cada uma das condições experimentais.	83
Tabela 16 – Fluxo estimado de elétrons conforme equações dispostas no item 4.5.....	86
Tabela 17 – Concentrações de sulfato removido e sulfeto (STD) no reator anaeróbio em cada condição operacional.....	88
Tabela 18 – Estimativa das concentrações médias de HS^- e H_2S em cada condição operacional.....	89
Tabela 19 – Valores médios e respectivos desvios-padrão da alcalinidade parcial em amostras afluente e efluente ao longo da operação do reator anaeróbio.	91
Tabela 20 - Valores médios e respectivos desvios-padrão da alcalinidade devida ao sulfeto em amostras efluentes do reator anaeróbio.....	93
Tabela 21 - Concentrações médias de sólidos na água residuárias sintética nas quatro condições experimentais testadas.....	95
Tabela 22 - Concentrações médias de sólidos no efluente do reator anaeróbios nas quatro condições experimentais testadas.....	95
Tabela 23 – Características físico-químicas do substrato sintético e do efluente produzido no reator anaeróbio.....	101
Tabela 24 - Concentrações afluente e efluente de N-amoniaco, N-nitrito, N-nitrato, N-total, STD, sulfato e DQO e eficiências médias de oxidação de NH_4^+ e remoção de N-total da Condição IIIb.	102
Tabela 25 - Concentrações afluente e efluente de N-amoniaco, N-nitrito, N-nitrato, N-total, STD, sulfato e DQO e eficiências médias de oxidação de NH_4^+ e remoção de N-total da Condição IV.	103

Tabela 26 - Valores médios das cargas aplicadas e removidas no reator LEAI durante a Etapa Experimental 1.....	108
Tabela 27 - Cálculos estequiométricos de demanda por elétrons para desnitrificação heterotrófica utilizando acetato como doador de elétrons.	109
Tabela 28 – Estimativa das frações de sulfato produzido pela oxidação completa de sulfeto com nitrato como aceptor de elétrons e pela oxidação aeróbia do sulfeto.	112
Tabela 29 - Concentrações afluyente e efluente de sulfato determinadas analiticamente e concentração de sulfato no efluente determinada teoricamente.	112
Tabela 30 – Valores médios e respectivos desvios-padrão da alcalinidade total em amostras afluyente e efluente ao longo da operação do reator LEAI na Etapa Experimental 1.....	113
Tabela 31 - Alcalinidade parcial afluyente e estimativas da alcalinidade devida ao sulfeto e da alcalinidade consumida na nitrificação e alcalinidade efluente no reator LEAI em cada condição experimental testada na Etapa 1.....	114
Tabela 32 – Concentrações de sólidos nas saídas do reator anaeróbio (afluyente) e no efluente final obtido no reator LEAI nas Condições III e IV.	114
Tabela 33- Estimativa das frações de sulfeto envolvidas na oxidação aeróbia a sulfato e arrastada do meio líquido a partir do <i>stripping</i> com O ₂ (Teste 5).	123
Tabela 34 – Caracterização afluyente da água residuária tratada no reator anaeróbio na Etapa Experimental 1.....	128
Tabela 35 – Características do efluente gerado pelo reator anaeróbio, o qual foi usado como afluyente do reator LEAI na Etapa Experimental 1.	129
Tabela 36 – Características do efluente, eficiências de remoção e cargas nitrogenadas metabolizadas no reator LEAI nas Condições III e IV da Etapa Experimental 1.	130
Tabela 37 - Vazão e TDH médios em cada uma das estratégias operacionais testadas na Etapa 2.	133
Tabela 38 - Concentrações dos compostos nitrogenados, STD, sulfato e DQO e eficiências médias de oxidação de NH ₄ ⁺ , desnitrificação e remoção de N-total na Estratégia I.....	134
Tabela 39 - Concentrações dos compostos nitrogenados, STD, sulfato e DQO e eficiências médias de oxidação de NH ₄ ⁺ , desnitrificação e remoção de N-total na Estratégia II.	135
Tabela 40 - Valores médios das eficiências dos processos e cargas aplicadas e removidas na Etapa Experimental 2.....	140
Tabela 41 - Cálculos estequiométricos de demanda por elétrons para desnitrificação heterotrófica nas condições testadas na Etapa 2.	141
Tabela 42 - Estimativa das frações de sulfato produzido pela oxidação completa de sulfeto com nitrato como aceptor de elétrons.....	143
Tabela 43 – Concentrações de sulfeto adicionadas ao reator LEAI, frações de N-total removido e respectivas concentrações de sulfato observadas no efluente em cada condição operacional.....	144
Tabela 44 - Valores médios e respectivos desvios-padrão da alcalinidade total em amostras afluyente e efluente ao longo da operação do reator LEAI na Etapa Experimental 2.....	145
Tabela 45 - Alcalinidade afluyente e estimativas da alcalinidade consumida e da alcalinidade produzida no reator LEAI em cada condição experimental testada na Etapa 2.	145

Tabela 46 - Concentrações de sólidos no afluente e no efluente final obtido no reator LEAI nas Estratégias I e II.	146
Tabela 47 - Caracterização afluente da água residuária tratada no reator LEAI na Etapa Experimental 2.	162
Tabela 48 – Características do efluente final do reator LEAI na Etapa Experimental 2.	163

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A _I	Alcalinidade Intermediária
AMO	Amônia monooxigenase
Anammox	Anaerobic Ammonium Oxidation
AOA	Arqueas oxidadoras de amônia
A _P	Alcalinidade Parcial
APHA	<i>American Public Health Association</i> (Associação Americana de Saúde Pública)
BOA	Bactérias oxidadoras de amônia
BRS	Bactérias redutoras de sulfato
DEAMOX	<i>DEnitrifying AMmonium OXidation</i> (Oxidação de amônia e desnitrificação)
DGGE	<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i> (Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EESC	Escola de Engenharia de São Carlos
EPA	<i>US Environmental Protection Agency</i> (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos)
LEAI	Reator de leito estruturado submetido à aeração intermitente
LPB	Laboratório de Processos Biológicos (EESC/USP)
MAAFBR	<i>Mixed Aerobic-Anoxic Fixed-Bed Reactor</i> (reator horizontal de leito estruturado aeróbio/anóxico)
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NDS	Nitrificação e Desnitrificação Simultânea
N-total	Nitrogênio Total
OD	Oxigênio dissolvido
OTU	<i>Operational taxonomic unit</i> (unidade taxonômica operacional)
PAC	Policloreto de alumínio;
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia de Polimerase)
pH	Potencial hidrogeniônico
POR	Potencial de oxidação-redução
PPG-SHS	Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento (EESC/USP)
PVC	Cloreto de polivinila
RAALF	Reator aeróbio-anóxico de leito fixo
RAn	Reator anaeróbio
RBS	Reator de batelada sequencial
RNAr	RNA ribossômico
RSBA	Reator sequencial em bateladas alimentadas
SANI	<i>Sulfate reduction, autotrophic denitrification, and nitrification integrated process</i> (processo integrado de redução de sulfato,

	desnitrificação autotrófica e nitrificação)
SHS	Departamento de Hidráulica e Saneamento
SLAD	<i>Sulfur-Limestone Autotrophic Denitrification</i> (Desnitrificação autotrófica a partir do enxofre e calcário)
SNAD	<i>Simultaneous Partial Nitrification, Anammox and Denitrification</i> (Nitrificação parcial, anammox e desnitrificação simultâneos)
SPR	<i>Semi-partitioned reactor</i> (reator semi-particionado)
SSF	Sólidos Suspensos Fixos
SST	Sólidos Suspensos Totais
SSV	Sólidos Suspensos Voláteis
ST	Sólidos Totais
STD	Sulfetos totais dissolvidos
STF	Sólidos Totais Fixos
STV	Sólidos Totais Voláteis
TDH	Tempo de Detenção Hidráulica
TRC	Tempo de Retenção Celular
UASB	<i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket reactor</i> (reator de anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo)
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

μL	Microlitro
μm	Micrômetro
μM	Micromolar
AgCl	Cloreto de prata
Atm	Atmosfera (unidade de pressão)
C	Coeficiente de retorno água/esgoto
C/N	Relação carbono/nitrogênio
C/N	Relação carbono/nitrogênio
$\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$	Biomassa
Ca^{2+}	Íon cálcio
CaCl_2	Cloreto de cálcio
CaCO_3	Carbonato de cálcio
C_E	Concentração do íon de interesse no esgoto doméstico forte
CH_4	Metano
C_I	Concentração do íon de interesse na água do mar
Cl^-	Íon cloreto
Cm	Centímetro
CO_2	Dióxido de carbono, gás carbônico
CoCl_2	Cloreto de cobalto
CuCl_2	Cloreto de cobre
d	Dia
e^-	Elétron
FeCl_3	Cloreto férrico
g	Grama
H	Hora
H^+	Próton
H_2	Hidrogênio
H_2O	Água
H_2S	Sulfeto de hidrogênio molecular
H_2SO_4	Ácido sulfúrico
H_3BO_3	Ácido bórico
Hab	Número de habitantes
HCl	Ácido clorídrico
HCO_3^-	Íon bicarbonato
HMDS	Hexametildisilazano
HS^-	Sulfeto de hidrogênio ionizado
K^+	Íon potássio
KCl	Cloreto de potássio
Kg	Quilograma
KH_2PO_4	Fosfato de potássio monobásico
kPa	Quilopascal

L	Litro
M	Concentração molar
M	Metro
m ³	Metro cúbico
Mg	Miligrama
Mg ²⁺	Íon magnésio
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
Min	Minutos
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
MnCl ₂	Cloreto de magnésio
mV	Milivolt
N ₂	Nitrogênio molecular
N ₂ O	Óxido nitroso
Na ⁺	Íon sódio
Na ₂ MoO ₄	Molibdato de sódio
Na ₂ S	Sulfeto de sódio
Na ₂ SeO ₃	Selenito de sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaNO ₃	Nitrato de sódio
NH ₂ OH	Hidroxilamina
NH ₄ ⁺	Íon amônia
NH ₄ Cl	Cloreto de amônia
NiCl ₂	Cloreto de níquel
Nm	Nanometro
N-NH ₄ ⁺	Nitrogênio na forma de N-amoniacal
N-NO ₃ ⁻	Nitrogênio na forma de nitrato
N-NO ₃ ⁻	Nitrogênio na forma de nitrato
NO	Óxido nítrico
NO ₂ ⁻	Íon nitrito
NO ₃ ⁻	Íon nitrato
NTA	Ácido nitrilotriacético
N-total	Nitrogênio total
O ₂	Oxigênio molecular
°C	Graus Celsius
OH ⁻	Íon hidroxila
PBS	Tampão fosfato-salino
pKa	Constante de acidez
Ppmv	Partes por milhão por volume
q.s.p	Quantidade suficiente para
Q _A	Vazão de alimentação
Q _E	Taxa de contribuição do esgoto

Q_{INF}	Taxa de contribuição de infiltração
Q_R	Vazão de recirculação
Rpm	Rotações por minuto
S_0	Enxofre elementar
S^{2-}	Íon sulfeto
$S_2O_3^{2-}$	Íon tiosulfato
SO_3^{2-}	Íon sulfito
SO_4^{2-}	Íon sulfato
V_{UTIL}	Volume útil
$ZnCl_2$	Cloreto de zinco
A	Nível de significância
ΔG	Variação da energia livre de Gibbs

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	23
2. HIPÓTESES DE TRABALHO E OBJETIVOS PROPOSTOS	27
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
3.1 FUNDAMENTOS DE NITRIFICAÇÃO E DESNITRIFICAÇÃO	29
3.2 NITRIFICAÇÃO E DESNITRIFICAÇÃO SIMULTÂNEAS	32
3.3 PÓS-TRATAMENTO DE EFLUENTES DE REATORES ANAERÓBIOS: REMOÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO	34
3.4 COMPOSTOS REDUZIDOS DE ENXOFRE COMO DOADORES DE ELÉTRONS NA DESNITRIFICAÇÃO AUTOTRÓFICA.....	37
3.5 PROCESSO NDS APLICADO AO PÓS-TRATAMENTO DE EFLUENTES DE SISTEMAS ANAERÓBIOS: EFEITO TÓXICO DO SULFETO.....	41
3.6 PROCESSO NDS APLICADO AO PÓS-TRATAMENTO DE EFLUENTES DE SISTEMAS ANAERÓBIOS: APLICAÇÕES E DESAFIOS	44
4. INSTALAÇÕES E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	47
4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	47
4.2 ETAPA 1: OPERAÇÃO DOS REATORES EM SÉRIE.....	51
4.2.1 REATORES BIOLÓGICOS.....	51
4.2.2 MATERIAL SUPORTE E INOCULAÇÃO.....	52
4.2.3 ALIMENTAÇÃO E SUBSTRATO SINTÉTICO	53
4.2.4 ESTRATÉGIA DE OPERAÇÃO	57
4.2.5 PERFIS TEMPORAIS DE CONCENTRAÇÕES	59
4.2.6 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	61
4.3 ETAPA 2: OPERAÇÃO DO REATOR LEAI COM EFLUENTE SINTÉTICO SIMULANDO AS CARACTERÍSTICAS DO EFLUENTE ANAERÓBIO PRÉ-TRATADO	62
4.3.1 REATOR BIOLÓGICO	62
4.3.2 ALIMENTAÇÃO E SUBSTRATO SINTÉTICO	64
4.3.3 ESTRATÉGIA DE OPERAÇÃO	65
4.3.4 PERFIS TEMPORAIS DE CONCENTRAÇÕES	67
4.3.5 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	68
4.3.6 CARACTERIZAÇÃO MICROBIANA POR SEQUENCIAMENTO DO rRNA 16S – PLATAFORMA ION TORRENT	68
4.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E CROMATOGRÁFICAS.....	70

4.4.1	ANÁLISES COLORIMÉTRICAS	72
4.4.2	ANÁLISES CROMATOGRAFICAS	74
4.4.3	ANÁLISES TITULOMÉTRICAS	74
4.4.4	CONCENTRAÇÃO DE OD, MONITORAMENTO DA CONDUTIVIDADE E DO POR.....	75
4.5	CÁLCULOS DE CARGAS APLICADAS E EFICIÊNCIAS DE REMOÇÃO.....	75
4.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	79
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	81
5.1	ETAPA EXPERIMENTAL 1: CARACTERÍSTICAS GERAIS	81
5.1.1	MONITORAMENTO DO REATOR ANAERÓBIO E ESTABELECIMENTO DA SULFETOGENESE 83	
5.1.2	MONITORAMENTO DO REATOR LEAI	97
5.1.3	PERFIS TEMPORAIS DE CONCENTRAÇÕES.....	115
5.1.4	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	123
5.1.5	SÍNTESE DOS RESULTADOS DA ETAPA 1	127
5.2	ETAPA EXPERIMENTAL 2: CARACTERÍSTICAS GERAIS	132
5.2.1	MONITORAMENTO DO REATOR LEAI	133
5.2.2	PERFIS TEMPORAIS DE CONCENTRAÇÕES.....	147
5.2.3	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	152
5.2.4	CARACTERIZAÇÃO MICROBIANA POR SEQUENCIAMENTO DO rRNA 16S – PLATAFORMA ION TORRENT.....	155
5.2.5	SÍNTESE DOS RESULTADOS DA ETAPA 2.....	161
5.3	CONSIDERAÇÕES FINAIS ACERCA DO POTENCIAL DE APLICAÇÃO TECNOLÓGICA DO SISTEMA ESTUDADO E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	165
6.	CONCLUSÕES	169
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	171
	APÊNDICE A – TESTES ESTATÍSTICOS.....	185

1. INTRODUÇÃO

Dentre os processos conhecidos para a remoção de compostos nitrogenados, o biológico é o que melhor se adapta à realidade econômica e ambiental (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - EPA, 1993) por ser mais seguro do ponto de vista ambiental e apresentar menores custos envolvidos. O processo convencional de remoção biológica de nitrogênio ocorre em duas etapas sequenciais, denominadas nitrificação e desnitrificação. Nesse processo, a etapa de desnitrificação requer a introdução de doadores de elétrons, normalmente adicionados na forma de matéria orgânica prontamente biodegradável. A desnitrificação pode ocorrer também pela via autotrófica, sendo os elétrons provenientes de substâncias inorgânicas.

Uma das formas de minimizar os custos envolvidos na implantação de sistemas de tratamento é desenvolver sistemas compactos que integram os processos de remoção de nitrogênio e de matéria orgânica em uma mesma unidade. Nesse sentido, vários sistemas têm sido propostos com o objetivo de remover matéria orgânica e nitrogênio em um único reator, por meio do processo de nitrificação e desnitrificação simultâneas (NDS) (CHIU et al., 2007; LIU et al., 2010; MENG et al., 2008; MOURA; DAMIANOVIC; FORESTI, 2012). A coexistência de populações distintas em um mesmo reator para remoção de diferentes compostos poluentes pode ser facilitada pela utilização de biomassa imobilizada, formando um biofilme mixotrófico.

Reatores de leito estruturado submetidos à aeração intermitente (LEAI) têm sido utilizados com sucesso no Laboratório de Processos Biológicos da EESC/USP para a remoção simultânea de matéria orgânica e nitrogênio. Tais estudos foram delineados com o objetivo de mostrar as vantagens operacionais dos reatores de fluxo contínuo em relação aos reatores em batelada, que tem sido a configuração dominante na aplicação do processo NDS (CHIU et al., 2007; MA et al., 2017; HE et al., 2018). Neste contexto, o reator LEAI foi utilizado para o tratamento de (i) efluente sintético simulando esgoto sanitário (MOURA; DAMIANOVIC; FORESTI, 2012); (ii) efluente de sistema anaeróbio aplicado ao tratamento de efluente de avícola (BARANA et al., 2013); (iii) efluente sintético com alto conteúdo proteico (SANTOS et al., 2016); (iv) tratamento de esgoto sanitário real (MOURA et al., 2018); (v) como pós-tratamento de efluente de reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) aplicado ao tratamento de efluente da produção de ração animal (ALMEIDA et al., 2018) e

(vi) pós-tratamento de efluente de reator UASB aplicado ao tratamento de esgoto sanitário (SILVA; DAMIANOVIC; FORESTI, 2018).

Outro aspecto que foi considerado no delineamento do presente trabalho é a crescente aplicação de tecnologias de tratamento anaeróbio no tratamento de diversos tipos de águas residuárias. Recentemente, o sistema LEAI foi testado como unidade de pós-tratamento de efluente de reator UASB (SILVA; DAMIANOVIC; FORESTI, 2018). Como esperado, observou-se que fração significativa do carbono orgânico presente na água residuária foi removida na etapa anaeróbia e o residual foi consumido pelas bactérias heterótrofas na etapa aeróbia juntamente com a oxidação do nitrogênio amoniacal (N-amoniacal) em NO_2^- e NO_3^- . Assim, a desnitrificação heterotrófica fica comprometida pela escassez de doadores de elétrons, como observado do trabalho de Silva, Damianovic e Foresti (2018). Por isso, em muitos sistemas de pós-tratamento é comum a adição de fontes carbonáceas externas (etanol, metanol ou ácido acético) para promover a redução do NO_3^- remanescente (FORESTI; ZAIAT; VALLERO, 2006; VELA et al., 2015).

Uma alternativa à adição externa de doadores de elétrons é o uso dos próprios subprodutos da digestão anaeróbia como doadores de elétrons em unidades de pós-tratamento, permitindo sua remoção das frações gasosa e líquida. O efluente gasoso de reatores anaeróbios utilizados no tratamento de esgoto sanitário contém sulfeto (H_2S), metano (CH_4), gás nitrogênio (N_2), dióxido de carbono (CO_2) e traços de outros gases. O H_2S presente no biogás causa efeitos deletérios aos equipamentos devido à corrosão, ao ambiente devido à toxicidade aos organismos, demandando mitigação de seus efeitos (MANCONI et al., 2007; PANTOJA FILHO et al., 2014). O pós-tratamento de efluentes de sistemas anaeróbios a partir da desnitrificação autotrófica utilizando sulfeto como doador de elétrons mostra-se como uma solução viável para a remoção de nitrogênio e enxofre (GUERRERO; ZAIAT, 2018; MAHMOOD et al., 2007; MORAES; ORRÚ; FORESTI, 2013; PANTOJA FILHO et al., 2014; PELAZ et al., 2017). Neste processo, compostos reduzidos de enxofre (HS^- , H_2S , S^{2-}) são oxidados utilizando NO_2^- e ou NO_3^- como aceptores de elétrons por bactérias desnitrificantes quimiolitotróficas.

Estudos visando a integração entre os ciclos biogeoquímicos do nitrogênio e enxofre são realizados, geralmente, em biorreatores contendo diferentes câmaras, nas quais o tanque anóxico recebe uma mistura de efluente anaeróbio (rico em compostos reduzidos de enxofre) com efluente nitrificado (LU et al., 2012; PANTOJA FILHO et al., 2014; SAIA et al., 2016). Sistemas horizontais diretamente conectando câmaras aeróbias e anóxicas também podem ser implementados, como o reator horizontal aeróbio-anóxico e com leito fixo (MAAFBR)

(GUERRERO; ZAIAT, 2018). Entretanto, existem lacunas na literatura sobre a utilização de sulfeto como doador de elétrons em reatores NDS operados de maneira contínua, uma vez que a literatura pertinente apresenta experimentos com reatores sequenciais de bateladas alimentadas e submetidos a aeração intermitente (MORAES; ORRÚ; FORESTI, 2013; PÉREZ et al., 2007). Dentre os principais problemas associados à ocorrência concomitante da nitrificação e desnitrificação autotrófica, Moraes, Orrú e Foresti (2013) cita a toxicidade do sulfeto à comunidade nitrificante, as dificuldades na manutenção do sulfeto no sistema, devido ao arraste da corrente líquida pelo oxigênio, consumo de alcalinidade devido uso do enxofre elementar como doador de elétrons na redução de nitrato e a baixa concentração de compostos sulfurados na água residuária estudada.

Nesse sentido, observa-se uma lacuna de conhecimento acerca de novas configurações de reatores que podem permitir a remoção de nitrogênio via processo NDS combinado à desnitrificação autotrófica. Barana et al. (2013) e Santos et al. (2016) observaram a remoção de 0,104 e 0,386 kgN m⁻³d⁻¹, respectivamente, aplicando reatores LEAI ao tratamento de águas residuárias ricas em nitrogênio. Em ambos os estudos, o processo anammox foi estabelecido como rota alternativa de remoção de nitrogênio. Tal fato evidencia o potencial do sistema LEAI para o tratamento de efluentes com baixa relação C/N via processo NDS, uma vez que o leito estruturado e as condições operacionais aplicadas permitem o desenvolvimento de microrganismos responsáveis por diferentes rotas metabólicas.

Baseado no potencial do desenvolvimento e manutenção de diferentes populações microbianas nos reatores com alimentação contínua e biofilme, submetidos ou não a aeração intermitente, o presente trabalho analisou a viabilidade do pós-tratamento de efluente com elevada concentração de sulfato, pré-tratado em sistema anaeróbio, explorando o processo de nitrificação e desnitrificação simultâneas (NDS), em reator de leito estruturado submetido a aeração intermitente (LEAI), utilizando sulfeto como doador de elétrons na redução do nitrogênio oxidado remanescente. Essa água residuária foi idealizada considerando a ocorrência de infiltração de água do mar na rede de esgotamento de uma cidade costeira. O estudo proposto justifica-se pela economia potencial do processo NDS acoplado à desnitrificação autotrófica em relação às alternativas convencionais de pós-tratamento (sistemas aeróbio/anóxico); à efetiva possibilidade do uso de subprodutos da digestão anaeróbia como insumos na etapa de desnitrificação e a possível lavagem do biogás produzido.

2. HIPÓTESES DE TRABALHO E OBJETIVOS PROPOSTOS

A condução deste trabalho esteve pautada em uma hipótese central, na qual afirma-se que **“os processos simultâneos de nitrificação e desnitrificação autotrófica a partir do sulfeto compreendem uma alternativa tecnológica a ser aplicada ao pós-tratamento de efluentes de sistemas anaeróbios”**. Neste contexto, o objetivo geral definido buscou **“avaliar a viabilidade do pós-tratamento de efluente rico em sulfato pré-tratado em sistema anaeróbio, explorando o processo de nitrificação e desnitrificação simultâneas (NDS), em reator de leito estruturado submetido a aeração intermitente (LEAI), utilizando sulfeto como doador de elétrons na redução do nitrogênio oxidado remanescente”**.

A partir da contextualização apresentada na Introdução e do referencial teórico a ser contemplado no próximo capítulo, elencaram-se três sub-hipóteses de trabalho e seus respectivos objetivos específicos.

Sub-hipótese 1: A adoção de relação DQO/sulfato de aproximadamente 2 permite o adequado estabelecimento da sulfetogênese no reator anaeróbio, a qual associada à metanogênese, acarreta a geração de sulfeto em concentrações compatíveis à demanda exigida pela desnitrificação autotrófica no reator NDS.

Objetivo: avaliar o desempenho da digestão anaeróbia em reator anaeróbio de leito estruturado perante diferentes cargas aplicadas de matéria orgânica e sulfato, buscando-se o favorecimento da sulfetogênese e a consequente produção e manutenção de HS^- no meio líquido.

Sub-hipótese 2: A aplicação de reator de leito estruturado submetido à aeração intermitente (LEAI) como unidade única de pós-tratamento do efluente obtido em sistema anaeróbio permite a remoção de nitrogênio pelos processos simultâneos de nitrificação e desnitrificação autotrófica a partir do sulfeto.

Objetivo: avaliar o desempenho do reator LEAI na remoção de N-total via processo de nitrificação e desnitrificação simultânea (NDS) acoplado à desnitrificação autotrófica, considerando duas frentes de operação: (i) alimentando o reator diretamente com o efluente produzido na unidade anaeróbia (entrada contínua de sulfeto) e (ii) dosando sulfeto apenas nas etapas não-aeradas do ciclo de aeração intermitente.

Sub-hipótese 3: O aporte de sulfetos dissolvidos exclusivamente nas etapas não-aeradas do ciclo de aeração intermitente do reator LEAI pode reduzir sua inibição sobre a comunidade nitrificante, resultando em melhorias na remoção de nitrogênio total.

Objetivo: avaliar e comparar o desempenho da nitrificação e da remoção de N-total em reator LEAI a partir de duas estratégias diferentes de dosagem de sulfeto, iniciadas após o completo consumo do oxigênio dissolvido remanescente da etapa aerada: (i) solução de sulfeto adicionada em pulsos únicos, com tempo de bombeamento de 15 min e (ii) adição de maneira contínua ao longo dos 90 min restantes de cada fase não-aerada.

Além disso, três objetivos específicos adicionais relacionados às sub-hipóteses 2 e 3 foram investigados:

- Avaliação da dinâmica dos processos de nitrificação e desnitrificação (autotrófica e heterotrófica) a partir de testes de perfis temporais específicos;
- Avaliação do impacto do sulfeto sobre o desempenho do reator LEAI durante as fases aeradas e não-aeradas do ciclo de aeração intermitente;
- Caracterização da comunidade microbiana estabelecida no reator LEAI ao final de sua operação.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo apresenta informações acerca das hipóteses e objetivos propostos para a execução do presente trabalho. Os temas abordados buscaram contextualizar a temática da pesquisa, servindo como base para a comparação e discussão dos resultados e formulação das contribuições do trabalho, incluindo:

- i. Conceitos fundamentais acerca dos processos biológicos de nitrificação e desnitrificação, destacando-se as vantagens e avanços na área e as alternativas tecnológicas já existentes;
- ii. Crescente aplicação de tecnologias de tratamento anaeróbio no tratamento de diversos tipos de águas residuárias e a consequente demanda por alternativas de pós-tratamento, especialmente aquelas que priorizam o uso dos próprios subprodutos da digestão anaeróbia como doadores de elétrons para a etapa de desnitrificação;
- iii. Aplicação de compostos reduzidos de enxofre como doadores de elétrons na desnitrificação autotrófica, destacando-se os desafios inerentes à adoção do processo de nitrificação e desnitrificação simultânea (NDS) acoplado à desnitrificação autotrófica para o pós-tratamento de efluentes de sistemas anaeróbios.

3.1 FUNDAMENTOS DE NITRIFICAÇÃO E DESNITRIFICAÇÃO

Organismos quimioautótrofos utilizam o oxigênio como receptor final de elétrons e o dióxido de carbono como fonte de carbono para oxidar amônia (NH_4^+) em nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-), no chamado processo de nitrificação. Bactérias dos gêneros *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosospira*, *Nitrosolobus* e *Nitrosovibrio* participam da primeira etapa da nitrificação, que é a nitrificação (Equação 1). E durante a segunda etapa da nitrificação, também chamada de nitratação (Equação 2) são envolvidos os gêneros *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira*, *Nitrospina* e *Nitrocystis* (TCHOBANOGLIOUS; BURTON; STENSEL, 2003).

São necessários 4,57 mg de oxigênio (O_2) para cada mg de N-NH_4^+ oxidado a N-NO_3^- (TCHOBANOGLIOUS; BURTON; STENSEL, 2003). Além disso, a oxidação do nitrogênio amoniacal libera íons H^+ que podem diminuir o pH do sistema, caso o efluente não contenha alcalinidade em quantidade suficiente para tamponar a ação destes íons. Nesse caso, a presença de bicarbonato deve ser garantida no sistema, o qual também servirá como fonte de carbono para as bactérias envolvidas. A partir da equação geral da nitrificação (Equação 3), pode-se estimar o requerimento total de álcali do processo, que é de 7,14 g de CaCO_3 para cada g de N-NH_4^+ oxidado.

Dentre os fatores ambientais que influenciam a atividade enzimática, a velocidade de crescimento dos microrganismos nitrificantes, a velocidade de difusão de substratos e a estrutura do biofilme, destacam-se: o pH, a concentração de oxigênio dissolvido, a temperatura, o tempo de retenção celular (TRC) e a toxicidade a compostos orgânicos e inorgânicos. Dentre as condições ótimas para a nitrificação tem-se: temperatura na faixa de 25°C a 35°C ; pH entre 7,5 e 9,0 e concentração de oxigênio dissolvido superior a $2 \text{mgO}_2 \text{L}^{-1}$. Reduções nas taxas de oxidação de NH_4^+ e de NO_2^- podem ocorrer em virtude de mudanças no pH e temperatura, provocando a formação de amônia livre (N-NH_3) ou ácido nitroso (HNO_2).

A conversão biológica dos compostos produzidos durante a nitrificação em compostos mais reduzidos, tais como: óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N_2O) e principalmente gás nitrogênio (N_2) e que ocorre sob condições anóxicas é denominada desnitrificação. Tal processo pode ser processado por bactérias facultativas heterotróficas ou autotróficas, as quais utilizam NO_2^- e NO_3^- como aceptores de elétrons em ambiente anóxico, caracterizando um processo de respiração anaeróbia.

Um ponto essencial para ocorrência da desnitrificação é a presença de doador de elétrons. Assim, o processo pode seguir a via heterotrófica, no qual a matéria orgânica atua como fonte de carbono e de energia para a atividade dos microrganismos. Nesse caso os gêneros de microrganismos envolvidos são *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Hypomicrobium*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Paracoccus*, *Propionibacterium*, *Pseudomonas*,

Rhizobium, *Rhodopseudomonas*, *Spirillum* e *Vibrio* (TCHOBANOGLIOUS; BURTON; STENSEL, 2003). Ou a via autotrófica, na qual os elétrons provenientes de substâncias inorgânicas, como por exemplo, os compostos reduzidos de enxofre (sulfeto ou enxofre elementar) são envolvidos na redução do NO_2^- e NO_3^- . Assim, alguns dos microrganismos desnitrificantes autotróficos reportados na literatura são *Thiobacillus denitrificans*, *Thiomicrospira denitrificans*, *Beggiatoa*, *Paracoccus pantotrophus*, *Sulfurimonas denitrificans*, *Thioalkalivibrio denitrificans*, *Thiobacillus thiooxidans*, *Arcobacter*, *Pseudomonas stutzeri* (BERISTAIN-CARDOSO et al., 2006; MAHMOOD et al., 2009; SHAO; ZHANG; FANG, 2010), *Thauera phenylacetica* sp., *Thauera aminoaromatica* sp., *Azoarcus buckelii* sp. (MECHICHI et al., 2002), entre outras.

As Equações 4 e 5 apresentam a estequiometria do processo, caso a desnitrificação seja baseada na redução do NO_2^- (desnitrificação via nitrito) ou na redução do NO_3^- (desnitrificação via nitrato), respectivamente (TCHOBANOGLIOUS, BURTON, STENSEL, 2003).

Segundo Tchobanoglous, Burton e Stensel (2003), as condições ambientais que exercem influência neste processo são: a concentração de OD, a temperatura e o pH. Tais autores relatam que a velocidade de desnitrificação heterotrófica é máxima para uma faixa de pH entre 6,5 e 8 e que para valores abaixo de 6 e acima de 9 há uma diminuição considerável na atividade desnitrificante. Os autores observaram também que a velocidade de desnitrificação aumenta com a temperatura, sendo que o processo ocorre em uma faixa de temperatura de 20°C e 35°C. Com relação ao oxigênio dissolvido, estudos apontam inibição da desnitrificação heterotrófica em concentração superior a 0,5 $\text{mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ (RITTMANN; LANGELAND, 1985). Porém, a biomassa imobilizada ou floculenta pode suportar concentrações mais elevadas, devido ao gradiente de concentração entre o meio líquido e o interior do biofilme ou flocos (TCHOBANOGLIOUS; BURTON; STENSEL, 2003).

Desde o isolamento dos primeiros grupos de bactérias nitrificantes, acreditou-se que apenas bactérias autotróficas aeróbias estavam envolvidas na oxidação de N-NH_4^+ e N-NO_2^- . Entretanto, van de Graaf et al. (1995) apresentaram uma nova classe de microrganismos

oxidadores de amônia, as bactérias anammox, as quais são capazes de oxidar NH_4^+ utilizando NO_2^- comoceptor de elétrons sob condições anaeróbicas. Könneke et al. (2005) reportaram que o metabolismo de oxidação de NH_4^+ também pode ser realizado por microrganismos do domínio Archaea, constituindo o grupo das arqueas oxidadoras de amônia (AOA). Dentre as AOA destacam-se os filos *Crenarchaeota* (KÖNNEKE et al., 2005) e *Thaumarchaeota* (HATZENPICHLER, 2012). Além disso, Daims et al. (2015) mostraram a existência de bactérias nitrificantes completas, pertencentes ao gênero *Nitrospira*, as quais são capazes de oxidar N-NH_4^+ até N-NO_3^- .

3.2 NITRIFICAÇÃO E DESNITRIFICAÇÃO SIMULTÂNEAS

Vários estudos têm sido conduzidos com intuito de desenvolver sistemas compactos capazes de integrar os processos de remoção de nitrogênio e matéria orgânica em uma única unidade a partir da nitrificação e desnitrificação simultânea (NDS) (CHIU et al., 2007; LIU et al., 2010; MENG et al., 2008; MOURA et al., 2018; MOURA; DAMIANOVIC; FORESTI, 2012). Dentre as explicações existentes para ocorrência desse processo combinado, a mais aceita é a física, a qual descreve que o conceito básico do processo é a criação de gradiente de concentração de oxigênio no biofilme. Como pode ser visualizado na Figura 1, bactérias aeróbicas tendem a ocupar as regiões mais superficiais do biofilme, na qual a concentração de oxigênio é maior. Dentro do biofilme, a menor concentração de OD favorece o desenvolvimento de organismos de metabolismo anaeróbio ou anóxico (WIJFFELS; TRAMPER, 1995). Outro ponto importante é que a concentração de OD, além de influenciar diretamente nas reações aeróbicas, pode limitar a distribuição de substrato nas camadas mais internas do biofilme (LI et al., 2008; YUAN; GAO, 2010).

Figura 1 - Esquema de um floco de lodo ativado com regiões aeróbias e anóxicas.

Fonte: Zeng et al. (2003)

Existe também a explicação biológica, a qual baseia-se na existência de microrganismos capazes de nitrificar heterotroficamente e desnitrificar aerobiamente. Dentre os grupos de microrganismos com este metabolismo diferenciado destacam-se *Thiosphaera pantotropha*, *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus* sp., *Providencia rettgeri*, *Agrobacterium* sp., *Achromobacter* sp. e *Comamonas* (ANDERSON et al., 1993; CHEN; NI, 2011; JOONG et al., 2005; ROBERTSON; KUENEN, 1988; YE et al., 2016).

Reator em batelada sequencial (RBS) foi o primeiro sistema a ser empregado no estudo do processo NDS devido a possibilidade de alternar períodos aerados e não-aerados para ocorrência da nitrificação e desnitrificação, respectivamente (CHIU et al., 2007; LI et al., 2008; POCHANA; KELLER, 1999). Nessa configuração, o efluente obtido ao final de cada ciclo é descartado para o início do ciclo posterior e dependendo das características finais deve ser encaminhado para pós-tratamento.

Sistemas que operam com NDS são capazes de manter o pH do reator, dispensando a adição de fonte externa de ácido ou base. Durante o processo de nitrificação, a alcalinidade é consumida, porém parte é repostada pela desnitrificação, mantendo-se um pH equilibrado e assim, promovendo o desenvolvimento de diferentes populações de microrganismos em um único reator (YOO et al., 1999).

A disponibilidade de substrato orgânico também é um fator crucial para o estabelecimento do processo NDS, devido presença de diferentes microrganismos com diferentes funções competindo pelos mesmos substratos. Assim, estudos apontam a relação C/N de aproximadamente 10 como ideal para garantir o equilíbrio entre as taxas de nitrificação e desnitrificação (CHIU et al., 2007; VON MÜNCH; LANT; KELLER, 1996; ZENG et al., 2003). Meng et al. (2008) avaliaram os efeitos da relação C/N sobre a NDS em

reator RBS, alimentado com efluente sintético similar ao esgoto doméstico. A carga orgânica afluyente foi mantida constante e três diferentes relações C/N foram testadas (4,77; 10,04 e 15,11), a partir da variação da carga nitrogenada aplicada. O melhor resultado em termos de eficiência de remoção de N-total foi obtido com relação C/N de 10,04. Moura, Damianovic e Foresti (2012) operaram reator LEAI para a remoção conjunta de matéria orgânica e nitrogênio. O sistema foi alimentado com efluente sintético com características de esgoto sanitário, caracterizado por relação C/N de 11,2. Três diferentes tempos de detenção hidráulicos (TDHs) foram analisados: 8, 10 e 12 horas. O melhor resultado em termos de eficiência de remoção de nitrogênio total (N-total) e DQO foi de 82 e 89%, respectivamente, com TDH de 12 horas.

Em condições de baixa relação C/N, Chiu et al. (2007) e Hooper et al. (1997) observaram o acúmulo de compostos intermediários (NO_2^- e NO_3^-), indicando que a nitrificação foi a rota metabólica predominante. Nesse caso, a remoção de N-total foi limitada pela ausência de doadores de elétrons biodisponíveis para desnitrificação heterotrófica. Sob reduzida disponibilidade de elétrons e presença de NH_4^+ e NO_2^- , o processo anammox pode ser umas das vias de remoção de nitrogênio, complementar à desnitrificação heterotrófica (BARANA et al., 2013). Barana et al. (2013), Santos et al. (2016) e Almeida et al. (2018) aplicaram reatores LEAI ao tratamento de águas residuárias ricas em nitrogênio (baixa relação C/N). Nesses estudos, o processo anammox foi estabelecido como rota alternativa de remoção de nitrogênio, concomitante à ocorrência do processo NDS.

Portanto, os resultados dos estudos citados apontam que a utilização de biomassa imobilizada ou floculenta permite o desenvolvimento e manutenção de comunidades aeróbias, anaeróbias e anóxicas em um único sistema, as quais permitem adequada remoção da fração nitrogenada de diversos tipos de águas residuárias.

3.3 PÓS-TRATAMENTO DE EFLUENTES DE REATORES ANAERÓBIOS: REMOÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

Tecnologias anaeróbias têm sido amplamente aplicadas como alternativa ao tratamento aeróbio no processamento de efluentes com baixa carga orgânica até aqueles de elevada carga (FORESTI; ZAIAT; VALLERO, 2006; TCHOBANOGLOUS; BURTON; STENSEL, 2003). As reações metabólicas características da digestão anaeróbia são realizadas

por bactérias especializadas e organismos do domínio Archaea, os quais utilizam uma série de aceptores de elétrons para a produção de hidrogênio e metano, sob condições anaeróbias.

Devido às condições energéticas do processo, a taxa de produção de biomassa é cerca de seis a oito vezes inferior ao que ocorre nos sistemas aeróbios (TCHOBANOGLIOUS; BURTON; STENSEL, 2003). Além disso, o processo é caracterizado pela produção de compostos energéticos (metano e hidrogênio) e a presença de fosfatos, nitrogênio e compostos reduzidos de enxofre, os quais podem ser recuperados a partir da implantação de sistemas de pós-tratamento (FORESTI; ZAIAT; VALLERO, 2006; VELA et al., 2015).

Com relação à remoção de nitrogênio, a adoção dos processos convencionais de nitrificação e desnitrificação não é economicamente viável quando o efluente foi previamente tratado em sistema anaeróbio. Isso deve-se ao fato de que a fração de matéria orgânica no efluente do reator anaeróbio é insuficiente para garantir a desnitrificação heterotrófica do N-amoniacal oxidado na nitrificação. Além disso, esta fração orgânica residual nem sempre é prontamente biodegradável (FORESTI; ZAIAT; VALLERO, 2006), sendo necessária a adição de fontes externas de carbono. Tal escolha acarreta no aumento dos custos operacionais do tratamento, devido aquisição de químicos e a possível produção de lodo adicional (PANTOJA FILHO et al., 2014); justificando assim, a busca por métodos alternativos de pós-tratamento destes efluentes.

A Tabela 1 apresenta possíveis rotas metabólicas para remoção de compostos nitrogenados de efluentes de sistemas anaeróbios (VELA et al., 2015). A adoção de uma ou mais rotas associadas depende dos objetivos do tratamento, recursos disponíveis e padrões de lançamento do efluente final. Assim, dentre todas as rotas metabólicas elencadas na Tabela 1 será dado mais enfoque àquelas que tem maior ligação com o presente trabalho, ou seja, relacionadas aos processos nos quais têm-se a metabolização de subprodutos da digestão anaeróbia associada à remoção de nitrogênio.

Tabela 1 – Possíveis rotas metabólicas para remoção biológica de nitrogênio de efluentes de sistemas anaeróbio.

Metabolismo	Reação estequiométrica	Energia livre de Gibbs, ΔG (kJ mol ⁻¹)*
Oxidação de amônia	$NH_4^+ + 1,5 O_2 \rightarrow NO_2^- + 2 H^+ + H_2O$	-190
Oxidação de nitrito	$NO_2^- + 0,5 O_2 \rightarrow NO_3^-$	-79
Anammox	$NH_4^+ + NO_2^- \rightarrow N_2 + H_2O$	-360
Oxidação anóxica do metano acoplada	$3CH_4 + 8NO_2^- + 2H^+ \rightarrow 4N_2 + 3CO_2 + 10H_2O$	-1050
à desnitrificação (DAMO)	$5CH_4 + 8NO_3^- + 8H^+ \rightarrow 4N_2 + 5CO_2 + 14H_2O$	-830
Desnitrificação a partir do sulfeto	$3HS^- + 5H^+ + 8NO_2^- \rightarrow 3SO_4^{2-} + 4N_2 + 4H_2O$	-990
	$5HS^- + 3H^+ + 8NO_3^- \rightarrow 5SO_4^{2-} + 4N_2 + 4H_2O$	-770
	$3CH_3COO^- + 8NO_2^- + 11H^+ \rightarrow 4N_2 + 6CO_2 + 10H_2O$	-1100
Desnitrificação heterotrófica	$5CH_3COO^- + 8NO_3^- + 13H^+ \rightarrow 4N_2 + 10CO_2 + 14H_2O$	-910
Oxidação do metano	$CH_4 + 2O_2 \rightarrow CO_2 + 2H_2O$	-820
Oxidação do sulfeto	$HS^- + 2O_2 \rightarrow SO_4^{2-} + H^+$	-760
Oxidação heterotrófica	$CH_3COO^- + 2O_2 + H^+ \rightarrow 2CO_2 + 2H_2O$	-890
Redução do sulfato	$CH_3COO^- + SO_4^{2-} + 2H^+ \rightarrow HS^- + 2CO_2 + 2H_2O$	-140

*Considerou-se nos cálculos condição de 1 atm e 25° C.

Fonte: Adaptado de Vela et al. (2015)

Em presença de concentrações reduzidas de OD, o metano, produzido na etapa anaeróbia de tratamento, pode ser incorporado ao processo de desnitrificação, seguindo dois mecanismos principais. Em condições de baixa pressão parcial de oxigênio, bactérias metanotróficas oxidam CH₄, liberando compostos orgânicos intermediários (como o metanol), os quais são metabolizados na desnitrificação heterotrófica. Outra possibilidade é o uso direto do CH₄ como doador de elétrons na redução de NO₂ ou NO₃⁻ como aceptores de elétrons, que ocorre sob condições anóxicas. Tal rota está incluída na Tabela 1 e é chamada de oxidação

anóxica do metano acoplada à desnitrificação (DAMO) (HAROON et al., 2013). Entretanto, devido ao crescimento lento (HE et al., 2013), baixa atividade celular e dificuldades na manutenção da biomassa em reatores (HE et al., 2015), a aplicação tecnológica do processo DAMO ainda é limitada.

Outro processo apresentado na Tabela 1 que é de interesse à integração da digestão anaeróbia à remoção de nitrogênio é a redução biológica do sulfato a sulfeto. Em um sistema anaeróbio de tratamento, a remoção de matéria orgânica também pode ocorrer através da redução do sulfato a sulfeto. Contudo, nas situações em que a disponibilidade de sulfato é reduzida (alta relação DQO/sulfato), a fração orgânica remanescente é removida pela via metanogênica.

Assim, a adoção de tecnologias anaeróbias de tratamento de águas residuárias prevê a coexistência das bactérias redutoras de sulfato (BRS) e arqueas metanogênicas (AM), as quais competem pelos substratos orgânicos. Tal disputa impacta na eficiência do tratamento, características do efluente final, qualidade e composição do biogás (HULSHOFF POL et al., 1998) e na produção de sulfetos (HS^- , H_2S , S^{2-}), os quais são usados como doadores de elétrons inorgânicos na desnitrificação. Um fato a se ressaltar quando compara-se as BRS com as AM, é diversidade metabólica das primeiras, as quais são capazes de degradar vários substratos e atuam como acetogênicas, produzindo substratos para a etapa metanogênica (MUYZER; STAMS, 2008). Além disso, a atuação das BRS na metabolização de matéria orgânica independe da pressão parcial de hidrogênio (LENS et al., 1998), o que traz maior robustez aos sistemas sulfetogênicos combinados com metanogênicos, perante variações na carga orgânica.

3.4 COMPOSTOS REDUZIDOS DE ENXOFRE COMO DOADORES DE ELÉTRONS NA DESNITRIFICAÇÃO AUTOTRÓFICA

Compostos reduzidos de enxofre, tais como sulfetos (HS^- , H_2S , S^{2-}), enxofre elementar (S^0), tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) e sulfito (SO_3^{2-}) são oxidados utilizando NO_2^- ou NO_3^- como aceptores de elétrons. Essas reações bioquímicas são mediadas por bactérias desnitrificantes quimiolitotróficas, tais como *Thiobacillus denitrificans*, *Thiomicrospira denitrificans*, *Beggiatoa*, *Paracoccus pantotrophus*, *Sulfurimonas denitrificans*, *Thioalkalivibrio denitrificans*, *Thiobacillus thiooxidans*, *Arcobacter*, *Pseudomonas stutzeri* (BERISTAIN-CARDOSO et al., 2006; MAHMOOD et al., 2009; SHAO; ZHANG; FANG, 2010), *Thauera*

phenylacetica sp., *Thauera aminoaromatica* sp., *Azoarcus buckelii* sp. (MECHICHI et al., 2002), entre outras.

Dentre os compostos sulfurosos, produzidos em ambiente anaeróbio, destaca-se o HS^- pelo seu efeito tóxico e corrosivo, além do odor característico. Por ser altamente reativo em presença de NO_3^- , sua oxidação pela desnitrificação autotrófica tem sido explorada por tecnologias de adequação ambiental. Sulfato (Equação 6) e enxofre elementar (Equação 7) são os dois possíveis produtos da oxidação anaeróbia do sulfeto. A produção de um em detrimento do outro depende de da concentração de doadores e aceptores de elétrons no meio, resultando nas seguintes equações estequiométricas (BERISTAIN-CARDOSO et al., 2006):

A desnitrificação autotrófica também pode ocorrer a partir da metabolização do nitrito comoceptor de elétrons, como apresentado nas Equações 8 e 9 (MAHMOOD et al., 2007).

Quando a concentração de sulfeto é maior que a demanda estequiométrica (relações NO_x/HS^- de 1,6 e 2,7 para NO_3^- e NO_2^- , respectivamente), tem-se a oxidação parcial, caracterizada pela formação de S^0 . Por outro lado, a oxidação completa acontece quando se tem a formação de sulfato, nos casos em que as demandas estequiométricas são respeitadas (BERISTAIN-CARDOSO et al., 2006).

Para o caso da oxidação do enxofre elementar a sulfato, Koenig e Liu (1996) propuseram a Equação 10:

Os primeiros estudos na temática da integração entre os ciclos do nitrogênio e enxofre foram realizados utilizando reatores verticais contendo diferentes câmaras, nas quais o tanque anóxico recebe uma mistura de efluente anaeróbio (rico em compostos reduzidos de enxofre dissolvidos) com efluente nitrificado (PANTOJA FILHO et al., 2014; PELAZ et al., 2017; SAIA et al., 2016). Sistemas horizontais diretamente conectando câmaras aeróbias e anóxicas também tem sido implementados, como o reator horizontal aeróbio-anóxico e com leito fixo (MAAFBR) (GUERRERO; ZAIAT, 2018).

Neste contexto, uma tecnologia patenteada para remoção de matéria orgânica e nitrogênio a partir da associação com a etapa anaeróbia de redução de sulfato a sulfeto é o processo SANI® (Sulfate reduction, autotrophic denitrification, and nitrification integrated process) (LAU et al., 2006; LU et al., 2012; WANG et al., 2009). Este processo é baseado na existência de um reator UASB para a redução de sulfato associado a reator anaeróbio para ocorrência da desnitrificação autotrófica, seguido por reator aeróbio nitrificante. Recentemente, após uma série de estudos preliminares, tal configuração foi implementada em escala plena (vazão afluente variando entre 800 e 1000 m³ d⁻¹) e sua eficiência no tratamento de esgoto salino de Hong Kong foi confirmada, a partir do enquadramento das características do efluente final aos parâmetros de lançamento de efluentes previstos na China (WU et al., 2016). Além da eficiência na remoção de matéria orgânica e nitrogênio, Lu et al. (2012) destacam como vantagens adicionais da tecnologia SANI®: (i) a produção reduzida de lodo, uma vez que o processo depende exclusivamente da manutenção de grupos microbianos autotróficos; (ii) 35% de redução nos custos com aporte energético e (iii) 36% de redução na emissão de CO₂ quando comparado aos bioprocessos convencionais de remoção de nitrogênio.

Assim como no caso do processo SANI, outros trabalhos disponíveis na literatura utilizam a fração dissolvida do sulfeto produzido na digestão anaeróbia na redução de NO₂⁻ ou NO₃⁻. Contudo, existe a possibilidade do uso do biogás produzido no reator anaeróbio como doador de elétrons direto no reator desnitrificante (FORESTI; ZAIAT; VALLERO, 2006; VELA et al., 2015). Tal fato foi explorados nos trabalhos executados por Guerrero e Zaiat (2018) e Pantoja Filho et al. (2014), aplicando-se diferentes configurações de reatores.

Pantoja Filho et al. (2014) observaram a ocorrência concomitante da remoção da DQO residual e dos processos de nitrificação e desnitrificação em reator aeróbio-anóxico de leito fixo (RAALF) aplicado ao pós-tratamento de efluente de UASB. Biogás (CH₄ e H₂S) foi injetado na câmara anóxica e permitiu o estabelecimento de biofilme mixotrófico, capaz de

metabolizar H_2S na desnitrificação autotrófica e CH_4 na desnitrificação heterotrófica (oxidação aeróbia a metanol, o qual foi usado como doador de elétrons orgânico na desnitrificação). Lavagem do biogás e máxima eficiência de remoção de N-total (70%) foram obtidas com H_2S em excesso no biogás e tempo de detenção hidráulica de 5 h.

Guerrero e Zaiat (2018) avaliaram a remoção de N-total de esgoto sanitário pré-tratado em reator horizontal MAAFBR. Neste caso, mistura gasosa sintética de $\text{N}_2/\text{H}_2\text{S}$ foi injetada na zona anóxica, testando-se concentrações de sulfeto (0-797,7 ppmv) similares ao conteúdo de H_2S produzido por sistemas anaeróbios. A eficiência máxima de remoção de N-total foi de 98,9% (aporte de 764,4 ppmv de H_2S), resultando na remoção total de $0,065 \text{ kgN m}^{-3}\text{d}^{-1}$. Como em boa parte do período operacional o H_2S foi adicionado em excesso, comparando-se com a fração de NO_3^- produzida na câmara anóxica, a via da oxidação parcial do sulfeto a S^0 foi a preferencialmente estabelecida no sistema (Equação 7), resultando na produção de 34,9 a 43,4% de S^0 . Policloreto de alumínio (PAC) foi injetado na câmara anóxica, possibilitando a deposição de S^0 em tanque decantador e sua recuperação. Desta forma, outra vantagem associada ao uso do sulfeto como doador de elétrons é a possibilidade de recuperar S^0 , elemento de grande valia à produção de inseticidas, ácido sulfúrico e fertilizantes.

Outra alternativa que também tem sido apresentada na literatura é a integração da desnitrificação autotrófica a partir do sulfeto com o processo anammox para o tratamento de águas residuárias ricas em nitrogênio e sulfato. Este processo é conhecido como DEAMOX (DEnitrifying AMmonium OXidation) (KALYUZHNYI et al., 2006). Em termos práticos, três reatores em série são necessários para a remoção do conteúdo nitrogenado e sulfuroso: (i) reator anaeróbio para a redução de SO_4^{2-} a HS^- ; (ii) reator aeróbio nitrificante e (iii) reator anóxico para ocorrência dos processos de desnitrificação autotrófica e anammox (KALYUZHNYI et al., 2006). Esse processo surgiu com o intuito de facilitar a produção de nitrito, que é utilizado como aceptor de elétrons na reação metabólica anammox. Convencionalmente a produção de nitrito está associada à prévia nitrificação do efluente; entretanto devido a dificuldades operacionais relacionadas ao estabelecimento da nitrificação parcial, o processo DEAMOX permite a obtenção de nitrito pela desnitrificação parcial do NO_3^- em NO_2^- .

O processo contínuo de desnitrificação baseado no uso do S^0 como material suporte e doador de elétrons e do calcário (CaCO_3) como fonte de carbono aplicado à remoção de nitrato de diferentes tipos de águas residuárias também tem sido aplicado, sendo conhecido como SLAD (sulfur-limestone autotrophic denitrification) (ZHANG; LAMPE, 1999; ZHOU et al., 2011). Este processo pode ser obtido a partir do uso de dois reatores, sendo que no

primeiro tem-se o material suporte de S^0 e o efluente é continuamente recirculado para um segundo tanque, no qual dispõem-se o leito de calcário. Ou empregando-se um único biofiltro, no qual o material suporte para a adesão microbiana é constituído de uma mistura entre calcário e S^0 .

3.5 PROCESSO NDS APLICADO AO PÓS-TRATAMENTO DE EFLUENTES DE SISTEMAS ANAERÓBIOS: EFEITO TÓXICO DO SULFETO

A taxa de crescimento dos organismos nitrificantes é considerada um fator limitante na implantação de sistemas compactos de tratamento de águas residuárias, uma vez que qualquer redução na atividade deste grupo pode ser extremamente significativa em termos de eficiência global de remoção de nitrogênio. Assim, apesar da viabilidade da remoção de nitrogênio por meio da desnitrificação autotrófica a partir do sulfeto, um ponto que merece ser considerado na adoção desta rota metabólica acoplada ao NDS é o efeito tóxico do sulfeto às bactérias nitrificantes.

Ainda existem dúvidas acerca dos mecanismos associados aos efeitos inibitórios dos sulfetos dissolvidos sobre o processo de nitrificação. Dentre as possíveis explicações, pode-se listar:

- i. Redução na disponibilidade de O_2 para o metabolismo nitrificante devido à oxidação química e/ou biológica do sulfeto, que é favorecida na competição pelo OD do meio líquido (GONZÁLEZ-SÁNCHEZ; REVAH, 2007; NIELSEN; VOLLERTSEN; HVITVED-JACOBSEN, 2006);
- ii. Redução na disponibilidade de cofatores metálicos da enzima amônia monooxigenase (AMO) devido a formação de sulfetos metálicos. Esta enzima é responsável por catalisar a reação de oxidação de $N-NH_4^+$ a hidroxilamina (NH_2OH), que é a primeira etapa do processo de nitrificação. Com a redução na disponibilidade dos cofatores enzimáticos (principalmente o cobre) ocorre redução na atividade nitrificante (ENSIGN; HYMAN; ARP, 1993);
- iii. Adesão da molécula de sulfeto ao sítio ativo da enzima AMO, resultando em inativação desta e consequente redução na atividade nitrificante. Tal caso caracteriza-se por um fenômeno de inibição não-competitiva (SEARS et al., 2004).

Um dos trabalhos mais completos na avaliação dos efeitos tóxicos do sulfeto sobre a nitrificação foi o realizado por Sears et al. (2004). Estes autores observaram a completa inibição da atividade das bactérias oxidadoras de amônia expostas por 2 horas em condições aeradas à concentração de sulfeto de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ em RBS inoculado com biomassa nitrificante suspensa. Cessando-se a exposição ao sulfeto, o reestabelecimento da atividade das bactérias oxidadoras de amônia (BOA) só ocorreu após 24 horas (SEARS et al., 2004). Em condições anóxicas, concentração de sulfeto de 5 mg L^{-1} inibiu a atividade das BOA em 72% (SEARS et al., 2004). Contrariamente, Erguder et al. (2008) não observaram efeito inibitório tão marcante como o identificado por Sears et al. (2004). Em condições anóxicas, os testes realizados por Erguder et al. (2008) mostraram que a atividade nitrificante só começou a ser inibida com concentração de sulfeto de 45 mg L^{-1} . Erguder et al. (2008) atribuíram o melhor desempenho da nitrificação perante os efeitos tóxicos do sulfeto à existência de grupos de arqueas nitrificantes tolerantes ao sulfeto. De fato, análises de DGGE (eletroforese em gel de gradiente desnaturante) com amostras de DNA da biomassa utilizada nos testes com sulfeto apontaram resultados positivos para genes amoA de arqueas (ERGUDER et al., 2008). Genes amoA de arqueas foram identificados Park et al. (2006) em amostras de biomassa retirada de diferentes biorreatores, nos quais a concentração média de sulfeto variava entre 3,2 e 16 mg L^{-1} .

A Tabela 2 compara as faixas de concentração de sulfeto nas quais foi observado efeito tóxico ao processo de nitrificação. Todos os trabalhos listados foram realizados com biomassa suspensa.

Tabela 2 – Efeito de concentrações variáveis de sulfeto sobre o processo de nitrificação.

Concentração de sulfeto relacionada à inibição (mg L ⁻¹)	Biomassa	Tipo de reator	Concentração de OD (mgO ₂ L ⁻¹)	Principais efeitos observados	Referência
1,9 – 3,2	Sedimento de estuarino	Teste em batelada	4,8 – 6,4	Queda na taxa de produção de NO ₂ ⁻ e NO ₃ ⁻	Joye e Hollibaugh (1995)
45 - 82,5	Lodo nitrificante (2,7 gSSV L ⁻¹)	RBS	6,5 -7,9	Acúmulo de NO ₂ ⁻	Erguder et al. (2008)
0,5 – 3,6	Lodo nitrificante (1 gSSV L ⁻¹)	RBS	2 - 6	Queda na taxa de consumo de NH ₄ ⁺	Sears et al. (2004)
1,7 - 18	Lodo nitrificante (3,5 gSSV L ⁻¹)	Teste em batelada	4,5 -5,5	Queda na taxa de consumo de NH ₄ ⁺ e redução na produção de NO ₃ ⁻	Beristain-Cardoso et al. (2010)
3,1 - 112	Lodo nitrificante (0,32 gSSV L ⁻¹)	Batelada	6,1	Queda na taxa de produção de NO ₃ ⁻ e acúmulo de NO ₂ ⁻	Ortiz et al. (2013)
5 - 55	Lodo oriundo de sistema de lodos ativados	RBS	1 – 2,5	Redução na produção de NO ₃ ⁻	Moraes, Orrú e Foresti (2013)

Fonte: Adaptado de ORTIZ et al. (2013)

3.6 PROCESSO NDS APLICADO AO PÓS-TRATAMENTO DE EFLUENTES DE SISTEMAS ANAERÓBIOS: APLICAÇÕES E DESAFIOS

Como evidenciado na Tabela 1, os ciclos do nitrogênio e enxofre estão interligados, o que representa a real possibilidade da remoção simultânea de ambos os compostos pela desnitrificação autotrófica, especialmente no caso de efluentes de reatores anaeróbios (SOUZA, 2011). Neste contexto, há uma lacuna na literatura acerca da viabilidade do processo NDS com desnitrificação autotrófica. Os trabalhos existentes, visando reduzir o efeito tóxico do sulfeto à comunidade nitrificante, foram realizados com reatores em batelada, com a adição de sulfeto apenas nos períodos operacionais não-aerados (MORAES; ORRÚ; FORESTI, 2013; PÉREZ et al., 2007).

Pérez et al. (2007) avaliaram o pós-tratamento de efluente de sistema anaeróbio a partir dos processos autotróficos de nitrificação parcial e desnitrificação via nitrito em reator de bateladas sequenciais. Sulfeto de sódio hidratado ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) foi usado como doador de elétrons para desnitrificação. Tal componente foi dosado nas fases não-aeradas de cada batelada, numa proporção de 80-85% da relação estequiométrica $\text{HS}^-/\text{N-NO}_2^-$ (Equação 8), com intuito de prevenir acúmulo de sulfeto no meio. Apesar da alta eficiência de remoção de N-total (95%) alcançada nesse estudo, acúmulo de cerca de $30 \text{ mgN-NO}_2\text{L}^{-1}$ foi identificado ao final de cada ciclo (já que a disponibilidade de doador de elétrons foi inferior à demanda estequiométrica).

Moraes, Orrú e Foresti (2013) investigaram a viabilidade do processo NDS acoplado à oxidação do sulfeto em reator sequencial de bateladas alimentadas (RSBA) e submetido a aeração intermitente para o tratamento de efluente pré-tratado em reator UASB. Duas estratégias de alimentação do RSBA foram testadas. Considerando a estratégia de alimentação da batelada no início do ciclo (fase aerada), para concentração de $11,6 \pm 5,8 \text{ mgSTD L}^{-1}$, a eficiência de oxidação de NH_4^+ caiu para 72,3%. Quando a alimentação do RSBA passou a ocorrer apenas nas fases anóxicas (reduzir efeito tóxico do sulfeto sobre bactérias nitrificantes), a eficiência de oxidação de NH_4^+ observada foi de 85,7% para concentração de $53,3 \pm 2,9 \text{ mgSTD L}^{-1}$, resultando em remoção de N-total de 53%.

Considerando os trabalhos supracitados, observa-se que ambos não obtiveram a completa remoção de nitrogênio nas condições operacionais adotadas, devido dificuldade operacional em estabelecer a nitrificação e a desnitrificação autotrófica em um único reator. Um fator que pode ter corroborado para esse resultado foi o arranjo da biomassa associado ao

regime de batelada adotado nestes trabalhos prévios. Parkin e Speece (1983) apontam que o uso de materiais suportes para a adesão microbiana permitem a obtenção de biomassa mais resistente à toxicidade do sulfeto do que os sistemas em que a biomassa está suspensa no meio reacional. O principal motivo que justifica tal resistência é produção de material polimérico extracelular, o qual age como uma barreira à difusividade do sulfeto na célula (GARRETT; BHAKOO; ZHANG, 2008; VYRIDES; STUCKEY, 2009). Além disso, destaca-se que reatores operando em modo contínuo e com recirculação permitem diluição dos tóxicos no meio líquido.

Com relação ao processo de desnitrificação, Pantoja Filho et al. (2014) apontam que o sucesso no estabelecimento de vias alternativas de desnitrificação está intimamente relacionado ao estabelecimento de população mixotrófica no sistema. Santos et al. (2016) obteve eficiência de remoção de N-total de 81, 5% no tratamento de efluente sintético rico em nitrogênio (relação C/N de 2,9 e carga nitrogenada aplicada de $0,421 \text{ kgN m}^{-3}\text{d}^{-1}$) em reator LEAI. O processo anammox foi identificado como uma via alternativa de remoção de nitrogênio, sendo responsável pela remoção de 27% da carga máxima de nitrogênio removida, que foi de $0,386 \text{ kgN m}^{-3}\text{d}^{-1}$. Tal fato sinaliza a potencialidade do reator LEAI no tratamento de águas residuárias com reduzido conteúdo orgânico, uma vez que o sistema permite o desenvolvimento de microrganismos responsáveis por diferentes rotas metabólicas.

O potencial de oxidação-redução (POR) tem sido utilizado com sucesso como parâmetro de controle de processo em sistemas biológicos para remoção de nitrogênio (CHEN et al., 2002; MARTÍN DE LA VEGA et al., 2012). Em condições normais de cargas nitrogenadas afluentes, o valor de POR se eleva a medida que a nitrificação ocorre, atingindo um *plateau* (+100 to +350 mV) quando a reação bioquímica se completa (GONCHARUK et al., 2010). Com o início da desnitrificação, o valor de POR cai até a zona negativa, característica de ambientes reduzidos. Assim, qualquer mudança no perfil POR esperado pode indicar condições operacionais nas quais a remoção de N-total pode ser prejudicada, como excesso e/ou falta de substrato e, excesso ou falta de aeração (TANWAR et al., 2008). Portanto, o parâmetro POR pode ser essencial para a compreensão da dinâmica dos processos combinados em reator LEAI, no qual a presença constante de sulfeto encaminhada de um sistema anaeróbio prévio pode afetar tanto os metabolismos aeróbios, quanto os anóxicos/anaeróbios.

Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a remoção de nitrogênio de efluente anaeróbio em reator de leito fixo e estruturado submetido à aeração intermitente e

recirculação, baseando-se na redução do nitrato pela via da desnitrificação autotrófica, utilizando-se o sulfeto como doador de elétrons. Perfis temporais foram utilizados para melhor elucidar os mecanismos associados à inibição do sulfeto na nitrificação e a dinâmica dos processos combinados. Destaca-se que este é o primeiro trabalho a investigar o estabelecimento do processo NDS acoplado à desnitrificação autotrófica em reator contínuo e também o primeiro a realizar testes temporais com monitoramento do POR para o esclarecimento da dinâmica dos processos combinados.

4. INSTALAÇÕES E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental do presente trabalho parte do princípio de que os processos concomitantes de nitrificação e desnitrificação autotrófica a partir do sulfeto compreendem uma alternativa tecnológica a ser investigada para o pós-tratamento de efluentes de sistemas anaeróbios. Assim, o objetivo central da tese foi avaliar a viabilidade do pós-tratamento de efluente pré-tratado em sistema anaeróbio, explorando o processo NDS em reator de leito estruturado submetido a aeração intermitente (LEAI), utilizando sulfeto como doador de elétrons na redução do nitrogênio oxidado remanescente. A definição deste objetivo central foi baseada em resultados satisfatórios previamente obtidos com o reator de leito estruturado submetido a aeração intermitente e também pela busca por aplicação tecnológica desta configuração de reator no pós-tratamento de reatores anaeróbios. Entretanto, em função dos resultados verificados ao longo das etapas experimentais, o trabalho adquiriu caráter exploratório, influenciando o delineamento das sub-hipóteses. Assim, de maneira geral, este trabalho foi dividido em duas etapas experimentais distintas, conforme simplificado na linha do tempo retratada na Figura 2, totalizando 567 dias de operação.

Fonte: A Autora

A primeira Etapa Experimental consistiu na operação de um sistema com dois reatores em série, constituído por um reator anaeróbio (RAn) produzindo o efluente a ser pós-tratado no reator LEAI. O período total de operação dessa configuração foi de 424 dias. Neste período, os 296 dias iniciais foram subdivididos em quatro condições experimentais distintas.

Diferentes cargas de matéria orgânica e sulfato foram testadas, mantendo-se a relação DQO/sulfato próxima a 2. Assim que o processo de redução do sulfato a sulfeto atingiu estabilidade e alta eficiência, o reator LEAI teve sua operação iniciada. Testes específicos para avaliar os processos combinados de nitrificação e desnitrificação, além dos impactos da presença de sulfeto ao sistema LEAI foram realizados durante os 128 dias finais da operação do sistema com os reatores em série utilizados na primeira etapa experimental.

A segunda etapa experimental foi iniciada no 425º dia de operação, tendo duração total de 143 dias, na qual água residuária sintética simulando as características do efluente de RAn foi utilizada para a alimentação direta do reator LEAI. O sulfeto, anteriormente produzido pelo metabolismo das BRS no reator anaeróbio da Etapa 1, passou a ser adicionado por bombeamento de solução concentrada de sulfeto de sódio apenas nas fases não-aeradas do ciclo de aeração intermitente. Duas estratégias de adição do sulfeto foram testadas ao longo de 115 dias de operação. Na Estratégia I (59 dias de operação), os volumes de solução de sulfeto necessários para resultar nas concentrações finais de STD pretendidas foram adicionados como pulsos únicos, com tempo de bombeamento total de 15 minutos. Já na Estratégia II (56 dias de operação), os volumes de solução de sulfeto associados às concentrações finais de sulfetos dissolvidos (STD) foram adicionados continuamente ao longo dos 90 minutos restantes de cada fase não-aerada do ciclo de aeração intermitente. Ao final do período operacional, perfis temporais foram realizados para elucidar a ocorrência dos processos simultâneos de nitrificação e desnitrificação (28 dias de operação). As Figuras 3 e 4 retratam o fluxograma de cada etapa experimental avaliada neste trabalho.

Figura 3 - Fluxograma experimental da Etapa 1.

Fonte: A Autora

Figura 4 - Fluxograma experimental da Etapa 2.

Fonte: A Autora

4.2 ETAPA 1: OPERAÇÃO DOS REATORES EM SÉRIE

4.2.1 REATORES BIOLÓGICOS

O aparato experimental utilizado na Etapa 1 deste trabalho foi constituído de dois reatores biológicos, construídos em tubos de acrílico com diâmetro interno de 14 cm e 90 cm de altura (20 cm de *headspace*). Os reatores contavam com base cônica de 13 cm de altura, implementadas com o objetivo de facilitar o descarte de lodo e material suspenso durante o experimento. A Figura 5 representa esquematicamente o sistema descrito e a Tabela 3 sintetiza as características físicas dos reatores.

Figura 5 - Esquema dos reatores em escala de bancada: 1- reservatório de água residuárias sintética; 2- bomba de alimentação; 3- reator anaeróbio (RAn); 4- amostragem do efluente do reator anaeróbio; 5- selo hídrico; 6- reator LEAI; 7- pedra porosa (aeração intermitente); 8- bomba de recirculação; 9- efluente final; 10 - aerador.

Fonte: A Autora

Os dois reatores foram operados em escoamento ascendente e com alimentação contínua, com a entrada localizada nas bases. A partir da Condição III (Etapa Experimental 1), os reatores foram conectados entre si por mangueiras de poliuretano, de maneira a garantir

a alimentação contínua do reator LEAI com o efluente do reator anaeróbio (RAn). Além do ponto de alimentação, a zona inferior do reator LEAI contava com entrada independente para a vazão de recirculação. Uma haste porosa conectada à tubulação de aço inox foi usada para provimento da aeração no reator LEAI (ponto 7 da Figura 5). A oxigenação do meio líquido foi obtida utilizando-se aerador de aquário Big Air A420 (vazão de $1,4 \text{ LO}_2 \text{ min}^{-1}$) conectado a temporizador analógico TMA-101.

A alimentação do reator RAn e a recirculação no LEAI foram feitas por meio de bombas peristálticas dosadoras Gilson (modelo Minipuls 3) e ProMinent (modelo Concept B), respectivamente. A razão de recirculação adotada no reator LEAI foi de 5:1 ($Q_R:Q_A$), visando equalizar a qualidade do efluente final, apesar da aeração intermitente. Os reatores foram mantidos em uma câmara climatizada a $30 \pm 1^\circ\text{C}$.

Tabela 3 - Características físicas dos reatores biológicos.

Parâmetro físico	Valor
Altura útil	70 cm
Diâmetro interno	14 cm
Volume total	11 L
Volume útil	9,6 L

Fonte: A Autora

4.2.2 MATERIAL SUPORTE E INOCULAÇÃO

Em função dos resultados obtidos no ensaio com microsensor de oxigênio dissolvido realizados por Santos (2014), adotou-se a redução do diâmetro das estruturas cilíndricas de espuma de poliuretano (densidade aparente de 23 g L^{-1} e porosidade de 92%) de 3 cm (BARANA et al., 2013; MOURA; DAMIANOVIC; FORESTI, 2012; SANTOS et al., 2016) para 1,5 cm de diâmetro. Treze estruturas para suporte da biomassa foram mantidas nos reatores conforme trabalhos prévios realizados no Laboratório de Processos Biológicos da EESC/USP. Hastes verticais de PVC foram utilizadas para a fixação das estruturas cilíndricas de espuma (60 cm de altura) às extremidades superior e inferior de cada reator.

O reator anaeróbio (RAn) foi inoculado com lodo de estação anaeróbia de tratamento de efluente da Avícola Ideal (Pereiras/SP). Sakamoto et al. (2016) observaram, via sequenciamento genético massivo (Illumina MiSeq), a presença de microrganismos ligados aos metabolismos da sulfetogênese e metanogênese neste inóculo. Os grânulos anaeróbios

foram previamente desagregados em liquificador e misturados com a água residuária sintética (proporção de 1:2), resultando em volume total de 9,6 L. Esta mistura foi inserida no reator e o mesmo foi deixado em repouso durante 24 horas, como recomendado por Godoi, Foresti e Damianovic (2017).

O reator LEAI foi inoculado considerando mistura (50% em volume) dos seguintes tipos de inóculos: lodo oriundo de reator UASB aplicado ao tratamento de águas residuárias da Avícola Dacar (Tietê/SP) e lodo proveniente de sistema de lodos ativados com atividade nitrificante, da estação de tratamento de águas residuárias da Fábrica de Motores da Volkswagen (São Carlos/SP). Santos (2014) obteve grande diversidade microbiana no biofilme em sistema inoculado com a mistura dos lodos citados anteriormente, assim o uso da mistura de inóculos foi mantido no presente trabalho. O procedimento de imobilização da biomassa no reator LEAI consistiu em dispor as hastes cilíndricas em recipiente plástico e adicionar a mistura de lodo. Após um período de 2 horas, retirou-se o excesso de lodo das estruturas e elas foram inseridas no reator, como recomendado por Zaiat, Cabral e Foresti (1994). As características físicas dos inóculos utilizados neste trabalho estão listadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Caracterização física dos inóculos.

Paramêtros físicos	Lodo anaeróbio Avícola Ideal	Lodo anaeróbio Avícola Dacar	Lodo aeróbio Volkswagen
Sólidos Totais (gST L ⁻¹)	48,3	51	5,4
Sólidos Totais Voláteis (gSTV L ⁻¹)	40,9	43,5	1,4

Fonte: A Autora

Amostras dos lodos biológicos anaeróbio e aeróbio utilizados na inoculação do reator LEAI foram adequadamente preparadas e armazenadas a -20°C para a posterior extração de DNA e sequenciamento da região V4 do gene 16S do RNAr utilizando a plataforma *Ion Torrent*. Detalhes da metodologia utilizadas nestes procedimentos estão descritos no item 4.3.6.

4.2.3 ALIMENTAÇÃO E SUBSTRATO SINTÉTICO

Para o adequado estabelecimento da sulfetogênese no reator anaeróbio (RAn), relação DQO/sulfato de aproximadamente 2 foi mantida ao longo de toda a operação dessa unidade.

Inicialmente, o esgoto sintético manteve a caracterização físico-química semelhante a esgoto doméstico forte (TCHOBANOGLIOUS; BURTON; STENSEL, 2003). Nas demais condições experimentais (Condições II, III e IV), diferentes cargas afluentes de matéria orgânica e sulfato foram aplicadas, diferentes da composição usual de esgoto doméstico. A alta salinidade da água residuária sintética foi mantida a partir da adição de solução salina específica durante todo o período operacional. A composição dessa solução foi definida considerando a infiltração de água do mar na rede de esgotamento de uma cidade costeira, considerando a infiltração na rede de coleta de esgoto e a vazão de esgoto produzida.

A água do mar contém uma ampla variedade de elementos sendo composta por 96,7% de água e 3,3% de sais dissolvidos. Dentre estes compostos dissolvidos, destacam-se os íons cloreto (Cl^-), sódio (Na^+), sulfato (SO_4^{2-}), magnésio (Mg^{2+}), cálcio (Ca^{2+}) e potássio (K^+). Segundo Langmuir (1997) as concentrações típicas desses sais no Oceano Atlântico são (em mg L^{-1}): 2700 (SO_4^{2-}), 19000 (Cl^-), 1350 (Mg^{2+}), 10500 (Na^+), 410 (Ca^{2+}) e 390 (K^+). Tais compostos estão presentes em proporções aproximadamente constantes no mar aberto, uma vez que suas concentrações são estritamente controladas por processos físicos associados ao movimento da água, tais como transporte pelas correntes marítimas, mistura por turbulência, evaporação e chuvas (LANGMUIR, 1997).

De acordo com levantamento realizado por Tsutyia e Além Sobrinho (2011), a taxa de contribuição de infiltração (Q_{INF}) para cidades costeiras brasileiras varia entre 0,1 e 0,6 $\text{L s}^{-1} \text{ km}^{-1}$. Assim, adotou-se o valor de 0,2 $\text{L s}^{-1} \text{ km}^{-1}$ nos cálculos efetuados no presente estudo. Para a estimativa da taxa de contribuição do esgoto (Q_{E}), uma rua com extensão de 100 m e subdividida em oito lotes de cada lado foi adotada. Em cada lote, considerou-se a construção de uma residência abrigando quatro habitantes com consumo per capita de água de 200 $\text{L hab}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. O coeficiente de retorno água/esgoto (C) adotado foi de 0,8, como estabelecido na NBR ABNT 9649 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS E TÉCNICAS - ABNT, 1986). Sendo assim, o valor final de Q_{ESG} foi de 1,19 $\text{L s}^{-1} \text{ km}^{-1}$. Assim, a concentração final de cada um dos íons de interesse (Cl^- , Na^+ , SO_4^{2-} , Mg^{2+} , Ca^{2+} e K^+) na água residuária sintética foi obtida a partir da Equação 11:

$$C = \frac{(C_I \times Q_{\text{INF}}) + (C_E \times Q_E)}{Q_{\text{INF}} + Q_E} \quad (\text{Eq. 11})$$

Em que:

C = concentração final do íon de interesse (mg L^{-1});

C_I = concentração do íon de interesse na água do mar (mg L^{-1});

C_E = concentração do íon de interesse no esgoto doméstico forte ou concentração definida de acordo com os objetivos do trabalho (mg L^{-1})

A caracterização físico-química da água residuária sintética utilizada em cada uma das condições experimentais adotadas na Etapa 1 está apresentada na Tabela 5. Como as quatro etapas operacionais iniciais englobam a operação dos dois reatores ligados em série, cloreto de amônia e sacarose foram utilizados como fontes de nitrogênio e de matéria orgânica, respectivamente. Bicarbonato de sódio (NaHCO_3) foi usado como agente alcalinizante, seguindo a dosagem de 1,2 g de NaHCO_3 por cada 1 g de DQO. Ao final de 296 dias de operação, perfis temporais foram realizados no reator LEAI para elucidar a ocorrência dos processos combinados, conforme será detalhado no item 4.2.5.

Tabela 5 - Caracterização da água residuária sintética durante a Etapa Experimental 1.

Componentes	Concentrações médias por condição operacional			
	I	II	III	IV
N- NH_4^+ (mg L^{-1})	$71,5 \pm 5,1$	$72 \pm 4,8$	$72 \pm 5,1$	$144 \pm 6,8$
DQO (mg L^{-1})	842 ± 32	1021 ± 35	$1885 \pm 51,4$	$1911 \pm 122,4$
SO_4^{2-} (mg L^{-1})	$431 \pm 43,3$	480 ± 16	$858 \pm 28,9$	$854 \pm 33,7$
Cl^- (mg L^{-1})	2810	2810	2810	2810
pH	$7,9 \pm 0,1$	$8,0 \pm 0,02$	$7,9 \pm 0,2$	$7,8 \pm 0,2$
Alcalinidade total ($\text{mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$)	608 ± 27	647 ± 33	1424 ± 48	1655 ± 29
Relação DQO/sulfato	$1,95 \pm 0,12$	$2,11 \pm 0,18$	$2,19 \pm 0,15$	$2,18 \pm 0,17$

Fonte: A Autora

A Tabela 6 mostra a composição da água residuária sintética em cada uma das condições experimentais da Etapa 1. Os macronutrientes (sais minerais) e micronutrientes foram adicionados a partir de soluções-estoque, considerando volumes de 5 e 1 mL para cada litro de afluente preparado, respectivamente. A composição dessas soluções está apresentada nas Tabelas 7 e 8.

Tabela 6 - Composição da água residuária sintética em cada condição experimental.

Constituintes	Concentrações médias por condição operacional (mg L⁻¹)			
	I	II	III (a,b)	IV
Sacarose	763	892	1693	1693
Cloreto de amônio (NH ₄ Cl)	278	278	278	535
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ 7H ₂ O)	1100	1235	2200	2200
Bicarbonato de Sódio (NaHCO ₃)	1015	1220	2260	1230
Cloreto de Sódio (NaCl)	3300	3300	3300	3300

Fonte: Adaptado de Torres (1992)

Tabela 7 - Composição da solução de macronutrientes.

Constituintes	Concentração (g L⁻¹)
Cloreto de Magnésio (MgCl ₂ .6H ₂ O)	142,2
Cloreto de potássio (KCl)	17,6
Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄)	11,3

Fonte: Adaptado de Torres (1992)

Tabela 8 - Composição da solução de micronutrientes.

Constituintes	Concentração (g L⁻¹)
Ácido nitrilotriacético (NTA)	12,800
FeCl ₃ 6H ₂ O	1,350
MnCl ₂ 4H ₂ O	0,100
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,024
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,100
ZnCl ₂ 4H ₂ O	0,100
CuCl ₂ 2H ₂ O	0,025
H ₃ BO ₃	0,010
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,024
Na ₂ SeO ₃ 5H ₂ O	0,026
NiCl ₂ 6H ₂ O	0,120

Fonte: Adaptado de Torres (1992)

Uma vez preparado, o substrato era armazenado sob refrigeração (4°C) para evitar a fermentação garantindo a preservação de suas características físico-químicas. No entanto, para evitar possíveis erros na caracterização do afluente, análises de monitoramento foram realizadas utilizando substrato por período de armazenamento máximo de 2 dias.

4.2.4 ESTRATÉGIA DE OPERAÇÃO

Após a fixação das hastes de espuma no reator anaeróbio e a consequente inoculação do lodo, deu-se a partida desse sistema (RAn). O reator anaeróbio foi alimentado com efluente sintético (relação DQO/sulfato de $1,95 \pm 0,12$), conforme exposto na Tabela 5. Durante os primeiros 5 dias de operação o RAn foi mantido sob recirculação constante e não foi realizada a troca do afluente inicial. A partir do 6º dia de operação, a alimentação passou a ser contínua, com TDH de 18 horas, resultando em vazão média afluente de 12,8 L d⁻¹. Tais

valores de TDH e vazão afluyente foram mantidos ao longo de todo o período operacional do RAn. Para adequado o estabelecimento da sulfetogênese em RAn a relação DQO/sulfato foi mantida em valores próximos a 2 ao longo de toda a operação do sistema anaeróbio. Essa relação é maior do que a relação estequiométrica de 0,67 (LENS et al., 1998), permitindo o estabelecimento e manutenção da metanogênese associada à sulfetogênese (DAMIANOVIC; FORESTI, 2009; GODOI; FORESTI; DAMIANOVIC, 2015; 2017). Entretanto, diferentes cargas afluentes de matéria orgânica e sulfato foram aplicadas (Tabela 5). A inoculação do reator LEAI foi realizada apenas no 117º dia de operação do RAn (Condição III), período no qual desempenho satisfatório do processo de redução de sulfato pelas bactérias BRS foi atingido, ou seja, a sulfetogênese foi estabelecida a partir do lodo metanogênico.

O reator LEAI foi inoculado com a mistura de inóculos previamente descrita, como recomendado por Santos et al. (2016). Nos primeiros dez dias de operação, o reator LEAI foi mantido sob regime de recirculação (5 vezes superior à vazão de alimentação), aeração contínua e TDH de 24 horas. Neste período, o reator LEAI foi alimentado com a mesma água residuária salina utilizada para alimentação do reator anaeróbio. O objetivo desta fase preliminar foi permitir o desenvolvimento da biomassa nitrificante autotrófica, a qual possui velocidade de crescimento menor do que a biomassa desnitrificante heterotrófica. Determinou-se o final desta fase no momento em que 50% do N-amoniaco adicionado foi oxidado a nitrato.

Finalizada a fase de adaptação e as dificuldades operacionais de se manter os dois reatores em série (abordadas no Capítulo 5 da tese), o reator passou a ser alimentado continuamente com o efluente produzido pela unidade anaeróbia. Durante este período de operação dos sistemas em série, o reator LEAI também foi mantido com TDH de 18 horas, preservando-se a razão de recirculação de 5. O ciclo de aeração intermitente adotado na execução da primeira etapa do trabalho (sistemas em série) foi de 2 horas aeradas e 1 hora sem aeração (Condições III e IV), como definido no trabalho de Moura, Damianovic e Foresti (2012). Sob tal regime de aeração, procurou-se garantir que a concentração de OD no meio permanecesse em torno 2,0 a 3,5 mgO₂ L⁻¹ nos períodos aerados e próxima a zero nos períodos não aerados.

O final de cada condição experimental foi determinado a partir do momento que ambos os reatores apresentaram características efluentes constantes (variação de $\pm 15\%$). As coletas de amostras para análises de sulfato, sulfeto, DQO, nitrogênio amoniacal, nitrito, nitrato, pH e alcalinidade foram realizadas duas vezes por semana. As análises de série de

sólidos e determinação de ácidos orgânicos voláteis (efluente do reator anaeróbio) foram realizadas quinzenalmente.

Além do monitoramento das variáveis físico-químicas, ao final da operação dos reatores em série, foram realizados ensaios específicos para elucidar a dinâmica dos processos combinados de nitrificação e desnitrificação autotrófica no reator LEAI e o efeito de toxicidade do sulfeto sobre a comunidade nitrificante. Ademais, a morfologia do biofilme estabelecido em RAn ao final da Condição IV também foi investigada em ensaios de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

4.2.5 PERFIS TEMPORAIS DE CONCENTRAÇÕES

No final do período operacional dos reatores em série (296º dia de operação), cinco testes (Tabela 9) foram realizados com o intuito de avaliar a dinâmica dos processos combinados de nitrificação e desnitrificação autotrófica e os impactos do sulfeto sobre o desempenho do reator LEAI durante as fases aeradas e não-aeradas. As condições operacionais implementadas em cada teste estão resumidamente descritas na Tabela 9.

Os testes descritos na Tabela 9 foram realizados diretamente no reator LEAI, considerando seu volume útil (9,6 L) e alimentação contínua com efluente proveniente do reator anaeróbio (RAn). Nos Testes 2,4 e 5 a composição do substrato sintético foi alterada pela exclusão de sulfato, sacarose e amônia na composição, respectivamente (Tabela 9), a fim de possibilitar a investigação dos objetivos específicos de cada teste. Pulsos iniciais dos substratos de interesse foram aplicados no início de cada teste (Tabela 9). Cloreto de amônio, nitrato de sódio (NaNO_3), $\text{Na}_2\text{S } 9\text{H}_2\text{O}$ e ácido acético foram usados como fontes de amônia, nitrato, sulfeto e matéria orgânica, respectivamente. As massas de NH_4Cl e NaNO_3 adicionadas nos Testes 1, 2, 3 e 4 foram calculadas considerando a massa molar de cada composto, as concentrações finais desejadas no meio líquido e o volume útil do reator. Procedimento similar foi adotado para a dosagem inicial de ácido acético no Teste 4, utilizando-se a densidade deste composto ($1,05 \text{ kg L}^{-1}$) e o volume útil do reator para dosagem de 331 mgDQO L^{-1} . Para o caso dos testes envolvendo pulsos de sulfeto (Testes 3 e 5), uma solução-mãe de $\text{Na}_2\text{S } 9\text{H}_2\text{O}$ (concentração de $56,6 \text{ g STD L}^{-1}$) foi preparada e diferentes volumes da mesma foram adicionados ao reator, resultando nas concentrações finais indicadas na Tabela 9.

Tabela 9 – Caracterização inicial dos perfis temporais realizados no reator LEAI após encerramento da Condição IV.

Teste	Objetivo do teste	Pulsos iniciais	Aeração	Alimentação
1	Limitação de OD para nitrificação completa e atividade das bactérias nitrificantes na presença de sulfeto	$\text{N-NH}_4^+ = 43 \text{ mgN L}^{-1}$	Contínua	Efluente do RAn
2	Atividade das bactérias nitrificantes na ausência de sulfeto	$\text{N-NH}_4^+ = 140 \text{ mgN L}^{-1}$	Contínua	Água residuária sintética sem sulfato
3	Uso do sulfeto como doador de elétrons na desnitrificação autotrófica	$\text{N-NO}_3^- = 100 \text{ mgN L}^{-1}$ $\text{STD} = 260 \text{ mg L}^{-1}$	Desligada	Efluente do RAn
4	Potencial da desnitrificação heterotrófica	$\text{N-NO}_3^- = 22 \text{ mgN L}^{-1}$ $\text{DQO} = 331 \text{ mg L}^{-1}$	Contínua	Água residuária sintética com ácido acético como doador de elétrons
5	Avaliação da oxidação do sulfeto e stripping em condições aeróbias	$\text{STD} = 77,6 \text{ mg L}^{-1}$	Contínua	Água residuária sintética sem amônia

Fonte: A Autora

Apesar de cada teste ter sido realizado em período reduzido de tempo (120 a 400 minutos), a investigação completa da dinâmica dos processos combinados teve duração total de 128 dias. Como a biomassa presente no reator LEAI foi submetida a condições adversas, intervalos de tempo de “operação normal” entre os testes foram necessários para a recuperação das eficiências de nitrificação e de remoção de N-total, conforme obtido na Condição IV. Além disso, alguns testes tiveram de ser repetidos devido problemas operacionais em sua execução, como erros na amostragem, erros no preparo da alimentação e falhas no armazenamento de dados nos sensores de OD e POR.

A estratégia dos pulsos dos compostos de interesse associada à alimentação contínua teve como objetivo promover uma melhor visualização dos processos bioquímicos estabelecidos no reator LEAI, uma vez que o regime hidráulico era de mistura completa, ou seja, as concentrações efluentes dos compostos de interesse eram constantes ao longo do

tempo. O potencial de óxido-redução (POR) e a concentração de OD foram monitorados a partir dos sensores Intellical ORP-Redox MTC 101 (Hach) e LDO HQ10 (Hach). Tais dispositivos foram mantidos no meio reacional durante a execução dos testes.

Amostras para determinação analítica de N-amoniacal, N-nitrato, N-nitrito, DQO e sulfetos totais dissolvidos (STD) foram retiradas do reator LEAI, dependendo do objetivo de cada teste. Previamente à análise dos resultados de cada teste, fator de diluição de 0,0556 hora⁻¹ foi aplicado para verificar se o padrão temporal da concentração de cada composto de interesse esteve relacionado à ocorrência dos processos metabólicos ou foi resultado apenas do efeito de diluição. Este fator foi obtido a partir da razão entre a vazão afluente ($Q_A = 0,53 \text{ L h}^{-1}$) e o volume útil do reator (9,6 L). Tal análise se fez necessária, uma vez que o reator LEAI foi continuamente alimentado com efluente proveniente do RAn e a diluição dos pulsos devido à alimentação contínua poderia ter efeito sobre o consumo e/ou formação de compostos de interesse. Como resultado notou-se que, em todos os testes executados, a diluição não teve efeito significativo sobre o consumo e formação de N-amoniacal, N-nitrato, N-nitrito, DQO e STD. Este fato confirmou a real atividade dos microrganismos nitrificantes e desnitrificantes presentes no biofilme estabelecido no reator LEAI. Para a correta obtenção das eficiências de remoção/oxidação em cada teste, as concentrações finais dos compostos de interesse foram corrigidas, aplicando-se o fator de diluição mencionado anteriormente.

4.2.6 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Além das análises de parâmetros operacionais do reator, fragmentos de espuma (2 cm de altura) foram retirados de diferentes zonas do reator anaeróbio ao final de sua operação para análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Para fins de avaliação qualitativa da ocupação dos poros da espuma pelo biofilme, fragmentos de espuma sem uso também foram analisados.

Previamente à observação no microscópio eletrônico de varredura, as amostras foram submetidas à tratamento específico, como indicado por Araújo (1995). Tal tratamento consistiu das seguintes etapas: fixação, desidratação e secagem.

Primeiramente, cada amostra foi colocada em um frasco Falcon e mergulhadas em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1 M (pH = 7,3). Os tubos Falcon foram armazenados em geladeira (temperatura de 4°C) durante, aproximadamente, 12 horas. Em seguida, cada amostra foi submetida a três lavagens com tampão fosfato (0,1 M e pH 7,8) sendo que cada uma destas lavagens teve duração de 10 minutos. No intervalo entre cada

lavagem, os tubos Falcon foram agitados, com o objetivo de garantir a homogeneização. Posteriormente, cada amostra foi desidratada em soluções de etanol de diversas concentrações (50%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100%); permanecendo em cada uma delas por 10 minutos. A desidratação em etanol 100% foi mantida durante cerca de 1 hora.

Após a desidratação, as amostras de espuma foram fixadas com hexametildisilazano (HMDS), durante 30 segundos. Em seguida, foram colocadas em estufa (temperatura de 60°C) para a secagem completa do material. Cada amostra foi fixada em suporte de alumínio, com o auxílio de esmalte incolor para unhas e, encaminhada ao processo de cobertura com ouro. Para a análise, utilizou-se o microscópio eletrônico de varredura Inspect F-50 (FEI, Netherlands) e metalizadora Sputtering Q150R ES (Quorum Technologies, USA). Tais equipamentos estão disponíveis no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Engenharia de Materiais da Escola de Engenharia de São Carlos.

4.3 ETAPA 2: OPERAÇÃO DO REATOR LEAI COM EFLUENTE SINTÉTICO SIMULANDO AS CARACTERÍSTICAS DO EFLUENTE ANAERÓBIO PRÉ-TRATADO

4.3.1 REATOR BIOLÓGICO

Na Etapa Experimental 2, o reator anaeróbio foi desligado e o reator LEAI passou a ser operado de maneira independente. A alimentação, com água residuária simulando as características do efluente pré-tratado na unidade anaeróbia (Condição I da Etapa Experimental 1), passou a ser realizada pela bomba peristáltica Gilson (modelo Minipuls 3). A vazão de recirculação adotada anteriormente ($Q_R = 5Q_A$) foi mantida.

Na Etapa 2, o equipamento destinado ao fornecimento de oxigênio foi um compressor de ar (BOYU ACQ003), ajustado para provimento de vazão de ar de 10 L O₂ min⁻¹. Adaptações no aparato experimental foram realizadas (Figura 6) de maneira a permitir a dosagem de solução concentrada de sulfeto de sódio nonahidratado (Na₂S 9H₂O) no reator LEAI.

Figura 6 - Esquema de adição de sulfeto no reator LEAI a partir de solução concentrada de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$: 1- reservatório de água residuária sintética simulando efluente pré-tratado; 2- bomba de alimentação; 3- reator LEAI; 4- efluente final; 5- bomba de recirculação; 6- pedra porosa; 7- solução concentrada de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$; 8- bomba de alimentação de sulfeto; 9- coletores plásticos contendo $\text{N}_{2(g)}$; 10 – compressor de ar.

Fonte: A Autora

A dosagem de sulfeto foi realizada por meio de bomba dosadora ProMinent (modelo Concept B) conectada à temporizador analógico, garantindo a adição desse composto somente nos períodos pré-estabelecidos. Um frasco Duran de 2 L foi utilizado para a armazenagem da solução concentrada de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$. O mesmo foi lacrado com tampa de borracha. A tampa continha duas vias de saída com mangueiras de poliuretano. A primeira via, ligava o frasco à bomba de alimentação e a segunda à dois coletores plásticos de urina *Biobag* com volume de 2 L cada. Tais coletores foram periodicamente inflados com $\text{N}_{2(g)}$, gás que era gradativamente transferido ao frasco Duran conforme a solução de sulfeto era bombeada para o reator, garantido o consumo do volume completo de solução e evitando a ocorrência de vácuo no frasco.

4.3.2 ALIMENTAÇÃO E SUBSTRATO SINTÉTICO

Nesse sentido, solução estoque concentrada de ácido acético e etanol (DQO média de 52 mg L⁻¹) foi preparada e utilizada como fonte de matéria orgânica residual, já que estes foram principais subprodutos do reator anaeróbio na Condição I da Etapa Experimental 1. Tal solução estoque foi preparada considerando fator de concentração de 5000x, o que resultou na proporção de 0,2 mL para cada 1 L de afluente preparado.

A concentração afluente de alcalinidade passou a ser definida de maneira a suprir a demanda exigida para a oxidação completa da carga nitrogenada aplicada (7,14 mg CaCO₃ por mg de N-NH₄⁺ oxidado). Uma solução de Na₂S 9H₂O foi semanalmente preparada e armazenada no frasco Duran (ponto 7 da Figura 6), variando-se a concentração final de sulfetos dissolvidos no reator a partir de ajustes na vazão da bomba de dosagem. A concentração inicial da solução mãe de sulfeto de sódio era verificada no momento de seu preparo, implicando no volume de solução a ser adicionado para manutenção da concentração desejada. A Tabela 10 apresenta a caracterização físico-química da água residuária implementada na Etapa Experimental 2. Assim, como na Etapa 1, o substrato sintético contou com a adição das mesmas soluções de sais e micronutrientes, em uma proporção de 5 e 1 mL para cada litro de afluente preparado, respectivamente (Tabelas 7 e 8). Uma vez preparado, o substrato foi armazenado sob refrigeração (4°C). Para evitar possíveis erros na caracterização do afluente, análises de monitoramento da Etapa 2 também foram realizadas utilizando substrato por período de armazenamento máximo de 2 dias.

Tabela 10 - Caracterização da água residuária sintética durante a Etapa Experimental 2.

Componentes	Concentrações médias por estratégia operacional	
	I	II
N-NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹)	74,0 ± 4,1	73,7 ± 3,5
DQO (mg L ⁻¹)	53,4 ± 3,2	54,1 ± 3,5
SO ₄ ²⁻ (mg L ⁻¹)	0,0	0,0
Cl ⁻ (mg L ⁻¹)	2810	2810
pH	7,6 ± 0,1	7,6 ± 0,1
Alcalinidade total (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	506 ± 6,7	511 ± 12,2
STD* (mg L ⁻¹)	22 - 53	42 - 61

*adicionado diretamente à corrente de alimentação do reator.

Fonte: A Autora

4.3.3 ESTRATÉGIA DE OPERAÇÃO

Como o reator LEAI já havia sido submetido a condições extremas para a execução dos perfis temporais da Etapa 1, antes de iniciar o período operacional previsto na Etapa 2, 500 mL de lodo foram adicionados ao reator. Tal volume compreendeu a mistura de lodo oriundo de reator UASB aplicado ao tratamento de águas residuárias da Avícola Dacar (370 mL) e lodo rico em biomassa desnitrificante autotrófica (130 mL), retirada da zona anóxica do reator horizontal de leito estruturado aeróbio/anóxico (MAAFBR) operado por Guerrero e Zaiat (2018). A concentração de sólidos da mistura foi de $29,1 \text{ gST L}^{-1}$ e 15 g SSV L^{-1} . Essa mistura foi desagregada em misturador mecânico, misturada com 9 L de meio sintético, adicionada ao reator e mantida sob recirculação durante 5 dias.

Na Etapa Experimental 2, a água residuária sintética simulando as características do efluente de RAn foi utilizada para a alimentação direta do reator LEAI (Tabela 10). Em trabalho prévio, Santos (2014) obteve eficiente remoção de matéria orgânica e nitrogênio em reator LEAI operado com TDH de $11,2 \pm 0,6 \text{ h}$ aplicado ao tratamento de efluente sintético com alto teor proteico. Assim, o reator LEAI passou a ser operado com TDH reduzido (média de $12,2 \pm 0,1 \text{ h}$) em comparação à etapa anterior e com regime de aeração intermitente com 1 hora aerada e 2 horas sem aeração. A vazão de recirculação de 5 ($Q_R = 5 Q_A$), continuou sendo adotada. O aerador de aquário (vazão máxima de $1,4 \text{ LO}_2 \text{ min}^{-1}$) que antes vinha sendo utilizado no provimento da oxigenação no meio líquido foi substituído por compressor de ar ($10 \text{ LO}_2 \text{ min}^{-1}$). O sulfeto, anteriormente produzido pelo metabolismo das BRS no reator anaeróbio, passou a ser adicionado por bombeamento de solução concentrada de sulfeto de sódio nonahidratado ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$). A referida solução era preparada semanalmente e a vazão de recalque calculada com base na concentração desejada e no regime de alimentação previstos nas Estratégias I e II. Destaca-se que o volume armazenado no frasco (ponto 7 da Figura 6) era repostado antes de ser totalmente esgotado, visando garantir a dosagem de sulfeto desejada.

Como o sulfeto pode ser facilmente oxidado em contato com oxigênio (LENS et al., 1998), um aparato especial para o armazenamento da solução e consequente bombeamento foi construído e conectado ao reator LEAI (Figura 6). A adição deste composto foi realizada apenas nas fases não-aeradas do ciclo de aeração intermitente, sendo iniciada após os 30 minutos iniciais de cada etapa não-aerada. Após este tempo garantiu-se o completo consumo do OD remanescente da etapa aerada anterior. Para o controle da dosagem de sulfeto ao longo do tempo, um temporizador analógico (TMA-101) foi conectado à bomba dosadora.

Duas estratégias de adição do sulfeto foram testadas e subdivididas em quatro condições cada, de acordo com a concentração final de STD envolvida. Na Estratégia I, a cada período não aerado, os volumes de solução de sulfeto necessários para resultar nas concentrações finais de STD pretendidas foram adicionados em pulsos com duração de 15 minutos (tempo mínimo do temporizador analógico). Já na Estratégia II, os volumes de solução de sulfeto associados às concentrações finais de STD foram adicionados de maneira contínua ao longo dos 90 minutos restantes de cada fase não-aerada do ciclo de aeração intermitente. Assim, as concentrações de STD testadas em cada estratégia de adição de sulfeto estão apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11 – Concentrações de sulfeto testadas nas duas estratégias operacionais.

Período de adição Condições STD (mg L ⁻¹)	Estratégia I				Estratégia II			
	Pulso único durante 15 minutos				Adição contínua durante 90 minutos			
	IA	IB	IC	ID	IIA	IIB	IIC	IID
	38±0,1	53±0,1	22±0,3	39±0,1	50±0,1	61±0,1	42±0,1	55±0,1

Fonte: A Autora

Nesta Etapa Experimental as coletas de amostras (afluente e efluente) para análises de sulfato, sulfeto, DQO, nitrogênio amoniacal, nitrito, nitrato, pH e alcalinidade foram realizadas de 3 a 4 vezes por semana. Já as análises de série de sólidos foram realizadas quinzenalmente.

Assim como na Etapa 1, no final da Etapa Experimental 2 foram realizados ensaios específicos para elucidar a ocorrência do processo combinado de nitrificação e desnitrificação (autotrófica e heterotrófica), a partir de pulsos com substratos específicos e monitoramento do potencial de óxido-redução e/ou concentração de OD. Ao final da operação, amostras de biomassa aderida ao meio suporte do reator LEAI foram coletadas para análise de MEV e sequenciamento genético massivo (*Ion Torrent*). Frações do biofilme aderido à espuma foram espacialmente separadas (camada externa e camada interna) para caracterização do mesmo quanto ao arranjo dos microrganismos e também aos grupos estabelecidos em cada zona. Uma comparação da diversidade microbiana final no reator com os grupos microbianos presentes nos inóculos também foi realizada e será apresentada no item 5.2.4.

4.3.4 PERFIS TEMPORAIS DE CONCENTRAÇÕES

Ao final da operação da Etapa Experimental 2 (116º dia de operação), três testes foram realizados (Tabela 12) com o intuito de avaliar a dinâmica dos processos de nitrificação e desnitrificação autotrófica, além do potencial de atividade da comunidade desnitrificante heterotrófica. As condições operacionais implementadas em cada teste estão sintetizadas na Tabela 12.

Tabela 12 - Caracterização inicial dos perfis temporais realizados no reator LEAI após encerramento da Estratégia 2.

Teste	Objetivo do teste	Pulsos iniciais	Aeração
1	Atividade das bactérias nitrificantes na ausência de sulfeto	$\text{N-NH}_4^+ = 231 \text{ mgN L}^{-1}$	Contínua
2	Uso do sulfeto como doador de elétrons na desnitrificação autotrófica	$\text{N-NO}_3^- = 80 \text{ mgN L}^{-1}$ $\text{STD} = 68 \text{ mg L}^{-1}$	Desligada
3	Potencial da desnitrificação heterotrófica	$\text{N-NO}_3^- = 62 \text{ mgN L}^{-1}$ $\text{DQO} = 442 \text{ mg L}^{-1}$	Desligada

Fonte: A Autora

Tais testes foram realizados diretamente no reator LEAI, considerando seu volume útil (8,9 L). Para evitar a preocupação com o efeito da diluição (como descrito no item 4.2.5), desta vez a alimentação do reator foi interrompida, caracterizando assim testes em regime de batelada. Assim, como nos testes realizados na Etapa Experimental 1, a investigação completa da dinâmica dos processos combinados na Etapa 2 demandou tempo adicional, com duração total de 28 dias. Como a biomassa presente no reator LEAI foi submetida às condições adversas, intervalos de tempo de “operação normal” (2 ou 3 dias) entre os testes foram necessários para a recuperação das eficiências de nitrificação e de remoção de N-total.

Assim, pulsos iniciais dos substratos de interesse foram aplicados no início de cada teste (Tabela 12). Cloreto de amônio, nitrato de sódio, sulfeto de sódio nonahidratado e ácido acético foram usados como fontes de amônia, nitrato, sulfeto e matéria orgânica, respectivamente. As massas de NH_4Cl e NaNO_3 foram calculadas considerando a massa molar de cada composto, as concentrações finais desejadas no meio líquido e o volume útil do reator. Procedimento similar foi adotado para a dosagem inicial de ácido acético no Teste 4,

utilizando-se a densidade deste composto ($1,05 \text{ kg L}^{-1}$) e o volume útil do reator. Para o caso do teste de desnitrificação autotrófica (Teste 2), uma solução-mãe de $\text{Na}_2\text{S } 9\text{H}_2\text{O}$ (concentração de $4,5 \text{ g STD L}^{-1}$) foi preparada e 220 mL desta solução foi adicionada ao reator, resultando na concentração final indicada na Tabela 11. O potencial de óxido-redução (POR) e a concentração de OD (Teste 1) foram monitorados a partir dos sensores Intellical ORP-Redox MTC 101 (Hach) e LDO HQ10 (Hach). Amostras para determinação analítica de N-amoniacal, N-nitrato, N-nitrito, DQO e sulfetos totais dissolvidos (STD) foram retiradas do reator LEAI, dependendo do objetivo de cada teste.

4.3.5 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Além dos perfis temporais descritos anteriormente, foram realizados ensaios de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de amostras de biofilme retiradas do reator LEAI ao final de sua operação.

Fragmento de espuma (2 cm de altura) utilizada como meio suporte no reator LEAI ao final de sua operação foi analisado por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Assim como realizado na Etapa Experimental 1, para fins de avaliação qualitativa da ocupação dos poros da espuma por biofilme, fragmentos de espuma sem uso também foram observados. O protocolo de preparo das amostras à observação em microscópio eletrônico de varredura e os equipamentos envolvidos na análise foram similares aos descritos no item 4.2.6.

4.3.6 CARACTERIZAÇÃO MICROBIANA POR SEQUENCIAMENTO DO rRNA 16S – PLATAFORMA ION TORRENT

Para caracterização microbiana dos organismos desenvolvidos no reator LEAI via sequenciamento massivo, amostras de biomassa foram retiradas no 143º dia de operação da Etapa Experimental 2. Com o intuito de diferenciar espacialmente os microrganismos aderidos nas zonas aeróbia (externa) e anóxica (interna) do meio suporte (diâmetro médio de 1,5 cm), amostras de espuma foram cortadas em círculos (2 cm de altura) e congeladas em nitrogênio líquido. Este processo foi realizado com auxílio de pinça metálica e o tempo médio de exposição ao nitrogênio líquido foi de 10 segundos.

Cortes foram realizados nas frações de espuma congelada, utilizando lâmina metálica para separar as frações externa e interna do biofilme. Considerou-se que a espessura da fração aeróbia foi de 1 mm. A definição deste valor teve como base a espessura da zona aeróbia observada por Santos (2014) em biofilme estabelecido em reator LEAI tratando efluente com

alto conteúdo proteico via ensaios com microsensor de OD. A Figura 7 ilustra o processo de exposição das amostras de espuma ao nitrogênio líquido e posterior corte com lâmina.

Figura 7 – Processo de congelamento em nitrogênio líquido (A) e corte da espuma (B) para obtenção de biomassa das frações externa e interna do biofilme.

Fonte: A Autora

As frações de espuma, tanto da zona aeróbia quanto da zona anóxica, foram armazenadas em tubos Falcon de 50 mL. Em ambos os casos, 10 mL de água destilada foi adicionado à cada tubo. Para a extração da biomassa referente à superfície de espuma (zona aeróbia), agitação constante durante 3 minutos foi realizada a partir da introdução de *glass beads* (diâmetro aproximado de 150-212 μm) ao tubo Falcon. Já no caso da retirada da biomassa aderida à espuma na zona interna do biofilme (anóxica), utilizou-se bastão de vidro. Em seguida, as frações de espuma foram separadas da biomassa com auxílio de pinça metálica e água destilada foi usada para a lavagem superficial das espumas.

Previamente ao procedimento de extração do DNA, as amostras foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS 1x) e centrifugadas a 6000 rpm e 4°C durante dez minutos, sendo este passo repetido por três vezes. Após essas lavagens, os *pellets* foram armazenados a -20°C. Tal processo também foi realizado com amostras dos inóculos do reator LEAI (lodos Dacar e Volkswagen) usados na Etapa Experimental 1.

A extração do DNA total das amostras foi realizada utilizando fenol e clorofórmio de acordo com o protocolo de Griffiths et al. (2000) modificado pela adição de pérolas de vidro (150-212 μm Sigma). A qualidade do DNA extraído foi verificada por eletroforese em gel de agarose (1,2%) em tampão Tris-Acetato-EDTA 1X (Tris 1x - 4,84 g Tris, 1,14 mL ácido acético e 0,74 g EDTA para 1 L de $d\text{H}_2\text{O}$) corado com *Blue Green Loading Dye I*, de acordo com as instruções do fabricante.

O sequenciamento das amostras foi realizado utilizando a plataforma Ion Torrent no Laboratório de Ecologia Microbiana no Departamento de Bioquímica e Genômica Microbiana do Instituto de Pesquisas Biológicas Clemente Estable (Montevideo, Uruguai). Para tanto, foram enviadas amostras de DNA genômico em concentração mínima de 10 ng μL^{-1} e pureza (relação 260/280) de 1,8 determinados em espectrofotômetro ND-2000 (Nanodrop Inc., Wilmington, DE).

A integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose (1,2 %) em TAE 1X. A amplificação da região V4 do gene rRNA 16S, foi realizada por PCR utilizando os primers 520F (AYTGGGYDTAAAGNG) e 802R (TACNVGGGTATCTAATCC) gerando fragmentos de tamanho médio de 347 pb (RDP's Pyrosequencing Pipeline: <http://pyro.cme.msu.edu/pyro/help.jsp>). As sequencias foram analisadas utilizando as ferramentas disponíveis no RDP (COLE et al., 2014). Foram ainda realizadas análises dos dados brutos a partir do software QIIME versão 1.9.1 (CAPORASO et al., 2010). A qualidade das bases sequenciadas consistiu em comprimento mínimo de 200 pb e critério de qualidade $Q>25$. A remoção de quimeras foi realizada utilizando USEARCH6.1 (EDGAR, 2010). As OTUs foram agrupadas por similaridade de 97%. As sequencias foram alinhadas pelo algoritmo de PyNAST (CAPORASO et al., 2010). Atribuições taxonômicas foram realizadas pelo algoritmo Uclast (EDGAR, 2010) utilizando o conjunto de dados de referência rRNA 16S do banco de dados Greengenes (DESANTIS et al., 2006). As sequências foram depositadas no NCBI com o número de acesso SRP133772 e SRP133774.

4.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E CROMATOGRÁFICAS

As determinações analíticas realizadas durante as Etapas Experimentais deste trabalho estão apresentadas na Tabela 13.

Tabela 13 - Análises físico-químicas realizadas na pesquisa.

Variável/Unidade	Método	Referência	Frequência de análise
pH	Potenciométrico	APHA (2012)	Rotina
Alcalinidade (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	Titulométrico	Dilallo e Albertson (1961) modificado por Ripley, Boyle e Converse (1986); Kapp (1984)	Rotina
Alcalinidade do sulfeto (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	Titulométrico	Godoi et al. (2017)	Rotina
N-NH ₄ ⁺ (mgN L ⁻¹)	Colorimétrico	APHA (2012)	Rotina
N-NO ₂ ⁻ (mg N L ⁻¹)	Colorimétrico	APHA (2012)	Rotina
N-NO ₃ ⁻ (mg N L ⁻¹)	Colorimétrico	WEST; RAMACHADRAN (1966)	Rotina
	Turbidimétrico	APHA (2012)	
DQO	Colorimétrico	APHA (2012); TZENG E CHEN (1993)	Rotina
Sulfetos totais dissolvidos (mgSTD L ⁻¹)	Colorimétrico	APHA (2012)	Rotina
Ácidos Orgânicos Voláteis	Cromatografia gasosa	ADORNO; HIRASAWA; VARESCHE (2014)	Ocasional
Série de Sólidos (mg L ⁻¹)	Gravimétrico	APHA (2012)	2x por mês
Cloreto (mg L ⁻¹)	Cromatografia iônica	Costa et al. (2018)	Caracterização
Oxigênio Dissolvido (mg L ⁻¹)	Luminescência	-	Ocasional
Condutividade (mS cm ⁻¹)	Condutometria	-	Ocasional
Potencial de óxido-redução (mV vs Ag/AgCl)	Potenciométrico	-	Ocasional

Fonte: A Autora

Boa parte das análises citadas na Tabela 13 foram realizadas em ambas Etapas Experimentais. Entretanto, no caso da produção de ácidos voláteis, o monitoramento foi feito apenas na Etapa Experimental 1, na qual operou-se o reator anaeróbio previamente ao reator LEAI. Ademais, nitrito e nitrato foram monitorados apenas com o início da operação do reator LEAI (Condição IIIb da Etapa Experimental 1). Entretanto, houve algumas diferenças quanto à frequência das análises ao longo da execução deste trabalho:

- i. As análises com frequência ocasional eram realizadas assim que cada mudança de condição operacional era feita ou então nos momentos em que buscava-se compreender o comportamento do reator LEAI;
- ii. Como a dosagem das fontes de cloreto não foi alterada, a determinação de cloreto foi realizada apenas na caracterização inicial da água residuária sintética.
- iii. Na Etapa 1 as análises de rotina eram realizadas duas vezes por semana. Já na Etapa 2 a frequência de análises foi alterada para quatro vezes na semana, uma vez que havia limitação na disponibilidade de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ e por isso, seu uso foi reduzido para o menor período operacional possível.

4.4.1 ANÁLISES COLORIMÉTRICAS

As determinações dos compostos nitrogenados ao longo da execução deste trabalho foram realizadas a partir de métodos colorimétricos descritos em APHA (2012). No caso do nitrito, foi aplicado o método da reação deste composto com sulfanilamida em meio ácido, formando um composto de coloração roxo-avermelhada (BENDSCHNEIDER; ROBINSON, 1952). Devido à pequena concentração em que a Lei de Beer é válida para esta reação, as curvas de calibração do método foram preparadas para concentrações variando entre 0,05 e 0,5 mg N- NO_2 L⁻¹. Prepararam-se triplicatas autênticas para cada ponto das curvas de calibração, utilizando solução mãe com concentração de 0,5 mgN- NO_2 L⁻¹. Após 10 minutos de reação, as leituras de absorbância foram feitas em espectrofotômetro Macherey-Nagel Nanocolor VIS em comprimento de onda de 543 nm. As análises de monitoramento do nitrito no reator LEAI também foram realizadas em triplicatas autênticas.

O método do fenol foi aplicado para a determinação do nitrogênio amoniacal das duas etapas experimentais estudadas. Neste método a amônia reage com fenol e hipoclorito de sódio 5% (água sanitária comercial) em solução alcalina, resultando em composto intensamente azul com absorção em 640 nm (APHA, 2012). A reação é catalisada pelo nitroprussiato de sódio e, com intuito de garantir maior estabilidade à solução e evitar interferências dos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} , adiciona-se citrato trissódico. As curvas de calibração foram preparadas para concentrações variando entre 0,1 e 0,7 mg N- NH_4 L⁻¹. Prepararam-se triplicatas autênticas para cada ponto das curvas de calibração, utilizando solução mãe com concentração de 5 mgN- NH_4 L⁻¹. Cloreto de amônio Sigma Aldrich foi utilizado. Após 2 horas de reação no escuro, as leituras de absorbância foram feitas em espectrofotômetro

Macherey-Nagel Nanocolor VIS em comprimento de onda de 640 nm. As análises de monitoramento do N-amoniaco foram realizadas em triplicatas autênticas.

A metodologia de determinação do nitrato variou ao longo da execução deste trabalho. Durante a Etapa Experimental 1 (Condições IIIb e IV), aplicou-se o método do ácido cromotrópico, proposto por West e Ramachandran (1966). Tal método baseia-se na reação de redução do NO_3^- com o ácido cromotrópico (ácido 1,8-dihidroxi-3,6-naftalenodissulfônico) em condição ácida. Como resultado, há formação de composto de coloração amarelada. As curvas de calibração foram preparadas para concentrações variando de 1 a 20 $\text{mgN-NO}_3 \text{ L}^{-1}$ e solução mãe de nitrato de 100 $\text{mgN-NO}_3 \text{ L}^{-1}$, a partir de nitrato de sódio Sigma Aldrich. Cada ponto da curva de calibração foi determinado a partir de triplicatas autênticas. Assim, para 1 mL de amostra previamente homogeneizada em 8,5 mL de solução de H_2SO_4 (70%), efetuou-se a leitura do “branco” em espectrofotômetro Macherey-Nagel Nanocolor VIS em comprimento de onda de 410 nm. Em seguida, adicionou-se o conteúdo de um sachê Nitrover Hach (referência 26055.46). Após 10 minutos de reação, efetuou-se a leitura referente à concentração de nitrato de cada amostra.

Na Etapa Experimental 2, a concentração de matéria orgânica na água residuária sintética foi de 53,4 e 54,1 $\text{mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ para as Estratégias I e II, respectivamente. Sendo assim, o monitoramento do nitrato passou a ser realizado pelo método da absorção ultravioleta (APHA, 2012), o qual é mais simples e menos custoso do que o anterior, uma vez que baseia-se apenas na prévia acidificação da amostra com solução de HCl 1M e posterior leitura da absorbância em dois comprimentos de onda (220 e 275 nm). Tal método não foi adotado na Etapa 1, em virtude do teor orgânico mais elevado do efluente produzido no reator anaeróbio, que confere interferência ao método. As curvas de calibração compreendiam variação de 1 a 7 $\text{mgN-NO}_3 \text{ L}^{-1}$ e foram preparadas a partir de solução mãe de nitrato de 100 $\text{mgN-NO}_3 \text{ L}^{-1}$ (reagente Sigma Aldrich). Cada ponto das curvas de calibração também foi obtido com triplicatas autênticas. Transferiu-se uma alíquota da amostra para cubeta de quartzo e efetuou-se a leitura da absorbância nos comprimentos de onda citados, utilizando espectrofotômetro Hach DR/4000U. As análises de monitoramento do nitrato na Etapa Experimental 2 foram realizadas em triplicatas autênticas.

Com o objetivo de impedir a interferência do cloreto na análise de DQO, uma vez que o substrato sintético adotado no trabalho possuía alta salinidade, protocolo de precipitação prévia do cloreto a partir da reação com nitrato de prata foi adotado para a determinação de DQO de amostras afluentes e efluentes ao longo de todo período experimental. Tal protocolo

foi baseado no trabalho desenvolvido por Tzeng e Chen (1993). Assim, 8 mL de amostra foram colocados em tubo Falcon, recebendo quatro gotas de solução de nitrato de prata (1M). Em seguida, a solução foi centrifugada durante 5 minutos, sob agitação de 5000 rpm. O sobrenadante foi utilizado para a análise de DQO e o precipitado, encaminhado para descarte adequado.

4.4.2 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

O monitoramento de ácidos orgânicos voláteis ocorreu somente na Etapa Experimental 1, na qual o reator anaeróbio foi operado. Tal análise foi realizada em cromatógrafo a gás Shimadzu GC-2010 (Kyoto, Japan) equipado com detector de ionização por chamas (GC/FID), amostrador automático e coluna capilar HP-INNOWAX (30m x 0,25mm x 0,25 μ m). Hidrogênio (H₂) ultrapuro foi utilizado como gás de arraste. As temperaturas do detector e injetor foram de 280° e 250°C, respectivamente. Tal método permitia a determinação de sete ácidos orgânicos (acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico e capróico), acetona, metanol, etanol e n-butanol (ADORNO; HIRASAWA; VARESCHE, 2014).

Na caracterização inicial do efluente sintético de estudo foi determinada a concentração do íon Cl⁻ em cromatógrafo de íons Dionex ICS 5000 equipado com detector de condutividade e coluna IonPac® AG23 *Anion-Exchange Column*. Este equipamento foi operado à temperatura de 30°C. O fluxo adotado foi de 1,0 mLmin⁻¹ e a fase móvel para determinação de ânions constou de solução de carbonato de sódio e bicarbonato de sódio (4,5 e 0,8 mM, respectivamente), conforme descrito em Costa et al. (2018).

4.4.3 ANÁLISES TITULOMÉTRICAS

O monitoramento das frações de alcalinidade total e alcalinidade a bicarbonato é essencial para a operação de reatores anaeróbios e NDS, já que um ambiente mixotrófico deve ser mantido nas duas situações e assim, garantir o balanço entre os metabolismos envolvidos. Tal monitoramento se dá por procedimentos titulométricos baseados na titulação com ácido forte (APHA, 2012; RIPLEY; BOYLE; CONVERSE, 1986). Embora estes métodos permitam obter a capacidade de tamponamento dos sistemas, não é possível determinar a contribuição específica do sulfeto na alcalinidade, uma vez que o íon HS⁻ é titulado concomitantemente com o HCO₃⁻. Assim, utilizou-se as equações propostas por Godoi et al.

(2017) para determinação da alcalinidade devida ao sulfeto nas amostras efluentes do RAn, durante a Etapa Experimental 1.

4.4.4 CONCENTRAÇÃO DE OD, MONITORAMENTO DA CONDUTIVIDADE E DO POR

O potencial de óxido-redução e a concentração de OD foram monitorados a partir dos sensores Intellical ORP-Redox MTC 101 (Hach) e LDO HQ10 (Hach), ambos acoplados a medidor HQ40d (Hach). Já para o monitoramento da condutividade da água residuária sintética, condutivímetro Digimed DM-31 foi utilizado.

4.5 CÁLCULOS DE CARGAS VOLUMÉTRICAS APLICADAS E EFICIÊNCIAS DE REMOÇÃO

A partir dos resultados obtidos nas análises físico-químicas previamente descritas, os seguintes cálculos foram efetuados para a adequada interpretação dos resultados. As cargas aplicadas de matéria orgânica e sulfato ao reator anaeróbio foram determinadas de acordo com as Equações 12 e 13, respectivamente. Já a eficiência de oxidação de matéria orgânica nesta unidade está indicada na Equação 14:

$$C_{DQO\ APLICADA} = \frac{[DQO]_{AF} \times Q_A}{V_{\acute{U}TIL}} \quad (\text{Eq. 12})$$

$$C_{SO_4\ APLICADA} = \frac{[SO_4^{2-}]_{AF} \times Q_A}{V_{\acute{U}TIL}} \quad (\text{Eq. 13})$$

$$Ef. remoção\ DQO = \frac{[DQO]_{AF} - [DQO]_{EF}}{[DQO]_{AF}} \times 100 \quad (\text{Eq. 14})$$

Em que:

$C_{DQO\ APLICADA}$ = Carga de matéria orgânica aplicada ao reator anaeróbio [$\text{kgO}_2\ \text{m}^{-3}\text{dia}^{-1}$];

$C_{SO_4\ APLICADA}$ = Carga de sulfato aplicada ao reator anaeróbio [$\text{kgSO}_4\ \text{m}^{-3}\text{dia}^{-1}$];

Q_A = Vazão de alimentação [L d^{-1}];

$V_{\acute{U}TIL}$ = Volume útil do reator anaeróbio [L].

Ef. Remoção DQO = Eficiência de remoção de DQO no reator anaeróbio [%];

$[DQO]_{AF}$ = Concentração afluente de DQO $[mg\ L^{-1}]$;

$[DQO]_{EF}$ = Concentração efluente de DQO $[mg\ L^{-1}]$.

$[SO_4^{2-}]_{AF}$ = Concentração afluente de sulfato $[mg\ L^{-1}]$;

A fração de DQO removida pelas bactérias redutoras de sulfato foi estimada considerando a relação estequiométrica proposta por Lens et al. (1998) (Equação 15). A fração removida de DQO restante é atribuída à ocorrência da metanogênese e de outros processos biológicos, como mostrado pela Equação 16.

$$DQO_{SO4} = 0,67 \times SO_4^{2-}{}_{REMOVIDO} \quad (\text{Eq. 15})$$

$$DQO_{CH4} = DQO_{REMOVIDA} - DQO_{SO4} \quad (\text{Eq. 16})$$

Em que:

$DQO_{REMOVIDA}$ = é o montante total de DQO removida no reator anaeróbio $[g\ dia^{-1}]$;

DQO_{CH4} = é o montante de DQO removida pela metanogênese e outros processos biológicos no reator anaeróbio $[g\ dia^{-1}]$;

DQO_{SO4} = é o montante de DQO removida devido à redução de sulfato no reator anaeróbio $[g\ dia^{-1}]$;

$SO_4^{2-}{}_{REMOVIDO}$ = é o montante de sulfato removido no reator anaeróbio $[g\ dia^{-1}]$.

Em condições de pH neutro, o valor de sulfeto total dissolvido (STD) medido em uma amostra contempla as formas H_2S e HS^- (LEWIS, 2010) (Equação 17). Assim, a concentração de sulfeto molecular (H_2S) e ionizado (HS^-) foram estimadas de acordo com as Equações 18 e 19.

$$[H_2S] = \frac{[STD]}{1 + 10^{pH - pK_a}} \quad (\text{Eq. 18})$$

$$HS^- = [STD] - [H_2S] \quad (\text{Eq. 19})$$

Para o cálculo das eficiências de oxidação de N-amoniaco e de remoção de N-total observadas no reator LEAI foram utilizadas as Equações 20 e 21. A eficiência de oxidação de N-amoniaco foi calculada comparando-se as concentrações de $N-NH_4^+$ afluentes e efluentes. A concentração de N-total foi obtida pela soma das concentrações de nitrogênio nas formas de $N-NH_4^+$, $N-NO_2^-$ e $N-NO_3^-$.

$$Ef.Ox.N - amoniacal = \frac{[N-NH_4^+]_{AF} - [N-NH_4^+]_{EF}}{[N-NH_4^+]_{AF}} \times 100 \quad (Eq. 20)$$

Em que:

Ef. Ox. N-amoniaco = Eficiência de oxidação de N-amoniaco [%];

$[N-NH_4^+]_{AF}$ = Concentração afluente de $N-NH_4^+$ [$mg\ L^{-1}$];

$[N-NH_4^+]_{EF}$ = Concentração efluente de $N-NH_4^+$ [$mg\ L^{-1}$].

Ef. Rem. N

$$= \frac{([N - NH_4^+] + [N - NO_2^-] + [N - NO_3^-])_{AF} - ([N - NH_4^+] + [N - NO_2^-] + [N - NO_3^-])_{EF}}{([N - NH_4^+] + [N - NO_2^-] + [N - NO_3^-])_{AF}} \times 100$$

(Eq. 21)

Em que:

Ef. Rem. N = Eficiência de remoção de nitrogênio total;

$([N - NH_4^+] + [N - NO_2^-] + [N - NO_3^-])_{AF}$ = Soma das concentrações de $N-NH_4^+$, $N-NO_2^-$ e $N-NO_3^-$ afluente [$mg\ L^{-1}$];

$([N - NH_4^+] + [N - NO_2^-] + [N - NO_3^-])_{EF}$ = Soma das concentrações de $N-NH_4^+$, $N-NO_2^-$ e $N-NO_3^-$ efluente [$mg\ L^{-1}$].

A eficiência de desnitrificação também foi determinada, conforme mostrado na Equação 22.

$$E_{DESNITRIFICAÇÃO} = \left(1 - \frac{([N-NO_2^-] + [N-NO_3^-])_{EF}}{([N-NH_4^+]_{AF} \times E_{OX.N-AMONICAL})} \right) \quad (Eq. 22)$$

Em que:

$([N - NO_2^-] + [N - NO_3^-])_{EF}$ = Soma das concentrações efluentes de N- NO_2^- e N- NO_3^- [mg L⁻¹];

Para adequada comparação do desempenho da remoção de nitrogênio observada em cada etapa experimental, cálculos de cargas aplicadas (Equação 23) e cargas removidas (Equações 24 e 25) foram realizados.

$$CN_{APLICADA} = \frac{[N-NH_4^+]_{AF} \times Q_A}{V_{\acute{U}TIL}} \quad (\text{Eq. 23})$$

$$CN_{NH_4 \text{ oxidado}} = \frac{([N-NH_4^+]_{AF} - [N-NH_4^+]_{EF}) \times Q_A}{V_{\acute{U}TIL}} \quad (\text{Eq. 24})$$

$$CN_{removido} = CN_{NH_4 \text{ oxidado}} \times E_{\text{DESNITRIFICAÇÃO}} \quad (\text{Eq. 25})$$

Em que:

$CN_{APLICADA}$ = Carga nitrogenada aplicada [kgN m⁻³ dia⁻¹];

$CN_{NH_4 \text{ oxidado}}$ = Carga de N-NH₄ que foi oxidada [kgN m⁻³ dia⁻¹];

$CN_{removido}$ = Carga de N-total que foi convertida a N₂ [kgN m⁻³ dia⁻¹];

Q_A = Vazão de alimentação [L h⁻¹];

$[N-NH_4^+]_{AF}$ = Concentração afluenta de N-NH₄⁺ [mg L⁻¹];

$[N-NH_4^+]_{EF}$ = Concentração efluente de N-NH₄⁺ [mg L⁻¹];

$V_{\acute{U}TIL}$ = Volume útil do reator LEAI [L].

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Além da aplicação dos cálculos de estatística descritiva básica (média e desvio padrão), alguns dados importantes para a compreensão geral dos processos estabelecidos nos sistemas operados neste trabalho foram analisados por meio de diagramas *boxplot*. Dentre estes incluem-se os dados referentes às eficiências de remoção de matéria orgânica e redução de sulfato do reator anaeróbio na Etapa 1. As eficiências de oxidação de N-amoniacal, desnitrificação e remoção de N-total no reator LEAI em ambas Etapas Experimentais também foram dispostos em gráficos *boxplot*. Os gráficos *boxplot* foram gerados com auxílio do software *Origin 9.1*.

Ademais, foi utilizado o software *BioEstat 5.3* para a avaliação da normalidade e existência de diferença estatisticamente significativa entre as eficiências de oxidação de N-amoniacal, desnitrificação e remoção de N-total no reator LEAI em ambas Etapas Experimentais. Como os conjuntos amostrais referentes à eficiência de oxidação de N-amoniacal, desnitrificação e remoção de N-total da Etapa Experimental 1, em alguns casos, continham número de medições inferior à 20, o teste não-paramétrico de *Mann-Whitney* foi utilizado para análise da diferença estatística entre as amostras. Para testar a normalidade das eficiências de oxidação de N-amoniacal, desnitrificação e remoção de N-total obtidas na Etapa Experimental 2 utilizou-se o *Teste de Lilliefors*. Uma vez detectado que os conjuntos de dados apresentavam distribuição normal, a ferramenta *ANOVA: um critério* associada ao *Teste de Tukey* foi utilizada para análise da variância.

A situação em que cada teste foi utilizado será mencionada no Capítulo 5. Para todos os testes foi considerado nível de significância de 95% ($\alpha = 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 ETAPA EXPERIMENTAL 1: CARACTERÍSTICAS GERAIS

Neste item são apresentados os resultados observados ao longo da Etapa Experimental 1. A Etapa 1 foi dividida nas seguintes condições operacionais (dispostas em ordem cronológica): Condição I, Condição II, Condição III e Condição IV. As características de cada uma das condições estudadas e os resultados analíticos serão apresentados nos itens subsequentes. O reator anaeróbio (RAn) foi operado ao longo de todas as condições operacionais da Etapa 1, totalizando 296 dias. Já o reator de leito estruturado submetido à aeração intermitente (LEAI) foi inoculado no 118º dia de operação do RAn (meados da Condição III) e operado até o 424º dia.

Como o objetivo do trabalho era analisar a viabilidade do uso do sulfeto produzido no sistema anaeróbio como doador de elétrons para a desnitrificação autotrófica no reator LEAI, não foi possível utilizar um tanque coletor intermediário e proceder a alimentação do LEAI por bombeamento. Tal artifício, provavelmente, ocasionaria a oxidação do sulfeto presente no efluente à sulfato, no contato com oxigênio da atmosfera. Dessa maneira, optou-se por conectar a saída do RAn à base do reator LEAI, utilizando uma mangueira de poliuretano, operando os sistemas em série. Partiu-se do princípio de que a alimentação seria governada pela gravidade, resultando na manutenção do TDH almejado (aproximadamente 18 horas) nos dois sistemas. Entretanto, devido a dificuldades em manter os dois sistemas nivelados, de maneira que a saída da unidade do reator RAn (ponto 4 da Figura 5) permanecesse afogada e com seu *headspace* pressurizado, o adequado funcionamento dos dois sistemas em série e o consequente início do monitoramento físico-químico da Condição III do LEAI só foi estabelecido a partir do 168º dia de operação.

O monitoramento do TDH ao longo da Etapa Experimental 1 foi realizado durante a coleta das amostras efluentes e o controle da vazão foi feito por ajustes na rotação da bomba de alimentação. Assim, as vazões e TDH médios para cada uma das condições experimentais da Etapa 1 estão listados na Tabela 14.

Tabela 14 – Vazão e TDH médios em cada uma das condições experimentais.

Condição	Relação DQO/sulfato	Período operacional (dias)	Vazão (L h⁻¹)	TDH (h)
I	1,95 ± 0,12	1-37	0,53 ± 0,03	18,1 ± 0,5
II	2,11 ± 0,18	38-81	0,52 ± 0,03	18,5 ± 0,6
III	2,19 ± 0,15	82-201*	0,51 ± 0,02	18,8 ± 0,6
IV	2,18 ± 0,17	202-296	0,51 ± 0,02	18,8 ± 0,5

* O período operacional da Condição III para reator LEAI foi de 168-202.

Fonte: A Autora

Pode ser observado que o TDH obtido em cada condição operacional de maneira geral, manteve-se semelhante ao TDH teórico (18 horas). Outro ponto que pode ser observado é a baixa variação (desvios-padrão) da vazão de alimentação durante a operação, indicando que as cargas de matéria orgânica e sulfato no sistema foram controladas para cada condição do estudo.

Diferentes cargas afluentes de matéria orgânica e sulfato foram adotadas em cada condição, mantendo-se a relação DQO/sulfato próxima a 2. Essa relação é maior do que a relação estequiométrica de 0,67 (LENS et al., 1998), permitindo o estabelecimento e manutenção da metanogênese associada à sulfetogênese (DAMIANOVIC; FORESTI, 2009; GODOI; FORESTI; DAMIANOVIC, 2015; 2017). A Tabela 15 traz uma caracterização geral das cargas aplicadas aos reatores em série em cada condição experimental.

Tabela 15 – Médias das cargas aplicadas de matéria orgânica, sulfato e nitrogênio em cada uma das condições experimentais.

Variáveis	Condições Experimentais			
	I	II	III	IV
Carga carbonácea				
aplicada	1,12±0,04	1,33±0,04	2,40±0,07	2,44±0,01
(kg DQO m ⁻³ dia ⁻¹)				
Carga de sulfato				
aplicada	0,57±0,06	0,63±0,03	1,09±0,04	1,13±0,02
(kg SO ₄ ²⁻ m ⁻³ dia ⁻¹)				

Fonte: A Autora

Ao final da Condição IV, os dois reatores foram operados por período adicional de 128 dias para execução dos perfis temporais abordados no item 4.2.5, totalizando 424 dias. Além disso, amostras de biomassa do reator anaeróbio (final da Condição IV) foram submetidas à ensaios microscópicos específicos para identificação de morfologias de grupos microbianos envolvidos (MEV). Tais resultados serão discutidos ao longo deste capítulo.

5.1.1 MONITORAMENTO DO REATOR ANAERÓBIO E ESTABELECIMENTO DA SULFETOGENESE

5.1.1.1 REMOÇÃO DE MATÉRIA ORGÂNICA E SULFATO

As Figuras 8 e 9 apresentam o perfil temporal das concentrações afluentes e efluentes de DQO e sulfato no reator anaeróbio. Além disso, está evidenciado nessas figuras o perfil das eficiências médias de remoção de DQO e redução de sulfato ao longo do tempo, respectivamente.

Figura 8 – Perfil temporal das concentrações de DQO afluente e efluente e da eficiência de remoção de DQO no reator anaeróbio.

Fonte: A Autora

Figura 9 - Perfil temporal das concentrações de sulfato afluente e efluente e da eficiência de remoção no reator anaeróbio.

Fonte: A Autora

É possível notar que eficiências de remoção de matéria orgânica superiores a 90% foram alcançadas ao longo de toda a operação do reator RAn (Figura 8). Entretanto, nas condições I e II observou-se certa instabilidade tanto na eficiência de remoção de DQO (Figura 8) quanto na

eficiência de redução de sulfato (Figura 9). A fim de melhor analisar a estabilidade do sistema anaeróbio quanto às eficiências de remoção de matéria orgânica e remoção de sulfato, procedeu-se à análise estatística desses dados por meio dos diagramas *boxplot* (Figura 10). A ferramenta estatística *boxplot* permite a visualização da distribuição dos pontos amostrados, apresentando no box a mediana (50%), o primeiro quartil (25%) e o terceiro quartil (75%). Na zona externa ao box, são discriminados os valores máximos e mínimos da distribuição. Portanto, nesse tipo de representação, quanto maior a altura do box interior, maior é a heterogeneidade da amostra; acarretando diretamente em maior desvio-padrão.

Figura 10 – Gráficos *boxplot* das eficiências de redução de sulfato (A) e remoção de DQO(B) no reator anaeróbio.

Fonte: A Autora

A maior variabilidade observada para a remoção de matéria orgânica ocorreu na Condição I (Figura 10B), podendo estar relacionada à adaptação do inóculo às características da água residuária de estudo. Na Condição I, o reator anaeróbio (RAn) foi alimentado com substrato sintético cuja caracterização físico-química foi semelhante à de esgoto doméstico forte, conforme descrito por Tchobanoglous et al. (2003). Tal composição físico-química associada ao regime hidráulico do sistema (TDH de $18,1 \pm 0,5$ horas) resultou em menor eficiência de redução do sulfato e também em alta variabilidade, como observado no box da Figura 10A. Isso provavelmente aconteceu porque a comunidade de BRS, inicialmente presente no lodo anaeróbio utilizado para inoculação do RAn, ainda era reduzida; exigindo tempo adicional de operação para seu desenvolvimento. A partir da análise de

sequenciamento genético massivo (Illumina MiSeq), a presença de microrganismos ligados aos metabolismos da sulfetogênese e metanogênese foi observada neste inóculo por Sakamoto et al. (2016). Entretanto, microrganismos pertencentes à classe *Deltaproteobacteria* apresentaram baixa abundância relativa, quando comparados à abundância relativa de outras classes de microrganismos de anaeróbios estritos ou facultativos (SAKAMOTO et al., 2016). A classe *Deltaproteobacteria* compreende organismos estritamente anaeróbios com crescimentos quimiorganotrófico, quimioheterotrófico ou fermentativo, nos quais encontram-se as bactérias BRS (GARRITY et al., 2005).

Um fator que pode auxiliar na pressão de seleção da comunidade BRS é adoção de cargas orgânicas afluentes mais elevadas (LENS et al., 2000). Assim, ajustes foram feitos na composição da água residuárias sintética nas demais condições experimentais (Condições II, III e IV). Cargas afluentes de matéria orgânica e sulfato mais elevadas foram aplicadas, diferenciando cada vez mais o substrato sintético da composição de esgoto doméstico (Tabela 5). Entretanto, a relação DQO/sulfato próxima à 2 foi mantida. Avaliando as eficiências nas demais fases operacionais (principalmente nas Condições III e IV) notou-se que o processo de redução de sulfato foi mais efetivo (Figura 10A). A carga orgânica afluente passou de 1,11 (Condição I) para 2,40 e 2,47 kg DQO m⁻³ dia⁻¹ nas Condições III e IV, resultando em eficiências médias de redução de sulfato de 85 e 94%, respectivamente (Figura 10A).

Com o objetivo de elucidar a contribuição da metanogênese e sulfetogênese para a remoção de matéria orgânica observada no reator anaeróbio, as porcentagens médias de matéria orgânica oxidada por cada via foram calculadas aplicando-se as Equações 15 e 16 apresentadas no item 4.5. Tais resultados estão sumarizados na Tabela 16.

Tabela 16 – Fluxo estimado de elétrons conforme equações dispostas no item 4.5

Condição	Carga carbonácea aplicada (kgDQO m ⁻³ dia ⁻¹)	Carga de sulfato aplicada (kgSO ₄ ²⁻ m ⁻³ dia ⁻¹)	DQO removida via metanogênese (%)	DQO removida via redução do sulfato (%)
I	1,11	0,57	82	18
II	1,33	0,62	76	24
III	2,40	1,10	72	28
IV	2,47	1,12	69	31

Fonte: A Autora

Como a produção de biogás não foi monitorada, não foi possível determinar o exato montante de DQO oxidado pela via metanogênica. Portanto, a fração remanescente de DQO removida, subtraindo-se a contribuição da atividade das BRS (Figura 11), pode ser relacionada à ocorrência da metanogênese e também de processos complementares como assimilação de matéria orgânica para crescimento e manutenção celular (MICHAUD et al., 2002).

Na partida do reator (Condição I), o metabolismo BRS foi responsável por 18% da matéria orgânica removida (Tabela 16). Nas condições posteriores, a via da redução de sulfato passou a ser responsável por percentagens crescentes de remoção de matéria orgânica: 24 % (Condição II), 28% (Condição III) e 31% (Condição IV), indicando a efetividade no estabelecimento da sulfetogênese (Tabela 16). Para sintetizar, a Figura 11 ilustra o fluxo de elétrons no sistema anaeróbico estudado ao longo de todo o período operacional.

Figura 11 - Fluxo de elétrons entre os processos biológicos estabelecidos no reator anaeróbico ao longo de toda operação.

Fonte: A Autora

5.1.1.2 SULFETO DISSOLVIDO

Como já mostrado na Figura 11, a sulfetogênese foi gradualmente se estabelecendo em RAn, atingindo nas Condições III e IV, grande participação na metabolização de matéria orgânica. A Tabela 17 apresenta os valores referentes à produção de sulfeto total dissolvido

(STD) em cada condição operacional. A Figura 12 apresenta a comparação da produção estequiométrica de sulfeto a partir dos montantes de sulfato reduzido (1 mol de sulfeto produzido por mol de sulfato reduzido) com as concentrações efluentes de STD determinadas analiticamente.

Tabela 17 – Concentrações de sulfato removido e sulfeto (STD) no reator anaeróbico em cada condição operacional.

Variáveis	Condições Experimentais			
	I	II	III	IV
Sulfato removido (mgSO ₄ ²⁻ L ⁻¹)	213 ± 39	336 ± 26	734 ± 45	829 ± 30
STD (mg L ⁻¹)	71 ± 3	90 ± 5	220 ± 18	231 ± 25

Fonte: A Autora

Figura 12 - Perfil temporal da comparação entre sulfeto medido (STD) e sua produção teórica ao longo da operação do reator anaeróbico.

Fonte: A Autora

No geral, as concentrações de STD monitoradas ao longo da operação de RAn mantiveram-se próximas às concentrações esperadas, obtidas a partir da estequiometria de reação realizada pelas BRS (Figura 12).

De acordo com o pH do meio líquido, o sulfeto produzido pelo metabolismo das BRS pode ser distribuído nas formas: íon sulfeto (S²⁻), íon bissulfeto (HS⁻) e sulfeto de hidrogênio

(H₂S). Assim, em condições de pH neutro, a fração de sulfeto que permanece dissolvido é relacionada às formas molecular (H₂S) e ionizada (HS⁻) (LEWIS, 2010). A forma ionizada apresenta menor toxicidade aos microrganismos quando comparada à forma molecular, uma vez que o H₂S pode ser facilmente absorvido pelas células e alterar o metabolismo assimilatório do enxofre e o pH intracelular (HULSHOFF POL et al., 1998).

A Figura 13 apresenta o gráfico das frações de HS⁻, H₂S e STD e os valores de pH efluente ao longo das quatro condições testadas. As concentrações de HS⁻ e H₂S foram calculadas pelas Equações 18 e 19 e seus valores médios, para cada condição operacional, são apresentados na Tabela 18.

Figura 13 – Perfil temporal das espécies de sulfeto (ionizada e molecular) e do pH efluente no reator anaeróbio.

Fonte: A Autora

Tabela 18 – Estimativa das concentrações médias de HS⁻ e H₂S em cada condição operacional.

Variáveis	Condições Experimentais			
	I	II	III	IV
STD (mg L ⁻¹)	71 ± 3	90 ± 5	220 ± 18	231 ± 25
HS ⁻ (mg L ⁻¹)	48 ± 9	58 ± 9	154 ± 18	158 ± 24
H ₂ S (mg L ⁻¹)	19 ± 4	31 ± 6	66 ± 12	75 ± 14

Fonte: A Autora

Como o pH efluente no reator anaeróbio manteve-se na faixa neutra (variou entre 7,0 e 7,3), a concentração de H_2S foi mantida em valores inferiores a 80 mg L^{-1} (Tabela 18), o que pode ser avaliado como adequado quanto à prevenção de efeitos tóxicos. Isa et al. (1986) observaram efeito tóxico do H_2S em reatores com biomassa imobilizada submetidos a concentrações superiores a $100 \text{ mgH}_2\text{S L}^{-1}$. Além disso, observando as concentrações de STD obtidas nos primeiros dias de operação da Condição III (Figura 13), notou-se grande incremento na atividade das BRS em relação às etapas anteriores. Este resultado, associado com o aumento da participação da sulfetogênese no fluxo de elétrons evidenciado na Figura 11 (Condição III), confirmaram a efetividade no estabelecimento desta rota metabólica no reator anaeróbio. Baseado nessa evidência, o reator LEAI foi inoculado no 117º dia de operação de RAn para composição do sistema combinado de remoção de nitrogênio e do sulfeto produzido.

5.1.1.3 ALCALINIDADE E PH

A Figura 14 retrata a variação das concentrações afluentes e efluente de alcalinidade parcial observadas na operação do RAn. Os valores médios de pH e das frações de alcalinidade parcial e total em cada uma das condições operacionais estão listados na Tabela 19.

Figura 14 – Perfil da alcalinidade parcial em amostras afluentes e efluente.

Fonte: A Autora

Tabela 19 – Valores médios e respectivos desvios-padrão da alcalinidade parcial em amostras afluyente e efluente ao longo da operação do reator anaeróbio.

Condição	pH		Alcalinidade Parcial (mgCaCO ₃ L ⁻¹)		Alcalinidade Total (mgCaCO ₃ L ⁻¹)	
	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente
I	7,9 ± 0,1	7,3 ± 0,1	475 ± 29	567 ± 31	608 ± 27	759 ± 41
II	8,0 ± 0,1	7,2 ± 0,2	511 ± 52	653 ± 58	647 ± 33	863 ± 46
III	8,0 ± 0,2	7,3 ± 0,1	1149 ± 87	1413 ± 110	1424 ± 48	1971 ± 149
IV	7,9 ± 0,2	7,2 ± 0,1	1310 ± 41	1527 ± 60	1655 ± 29	2072 ± 56

Fonte: A Autora

A estabilidade do processo metanogênico está intrinsicamente ligada ao equilíbrio entre produção e consumo de ácidos orgânicos. Qualquer desequilíbrio nesse fator, leva a queda do pH, podendo causar a completa falência do sistema biológico anaeróbio. A manutenção da alcalinidade no meio líquido em um sistema anaeróbio tratando efluente com alta carga orgânica é importante para tamponar eventuais acúmulos de ácidos, produzidos na etapa de acidogênese, uma vez que o crescimento da microbiota acidogênica é mais rápido que o da comunidade metanogênica (ANDERSON; YANG, 1992). Entretanto, pontua-se que o acúmulo de ácidos requer providências para que o equilíbrio do sistema seja restabelecido e que a neutralização dos ácidos pelo agente tamponante tem como função proteger os microrganismos de danos celulares. Os sistemas anaeróbios geram alcalinidade, por exemplo na metanogênese acetoclástica (Equação 26) e na sulfetogênese (Equação 27), contribuindo para alcalinidade do sistema (HARPER; POHLAND, 1986).

A dosagem média de 1,2 g NaHCO₃ para cada 1g de DQO foi adotada na operação do RAn, de maneira que, aproximadamente, 0,9 g do íon HCO₃⁻ foi garantida para cada 1 g de DQO afluyente, visando neutralizar os ácidos eventualmente acumulados. O perfil da alcalinidade à bicarbonato e da relação A_I/A_P nas amostras efluentes do reator anaeróbio em cada condição operacional está ilustrado na Figura 15.

Figura 15 – Perfil temporal da alcalinidade a bicarbonato e da relação A_I/A_P em amostras efluentes do reator anaeróbio.

Fonte: A Autora

Os valores médios da relação A_I/A_P nas Condições I, II, III e IV foram: $0,34 \pm 0,04$; $0,35 \pm 0,05$; $0,38 \pm 0,05$ e $0,35 \pm 0,04$, respectivamente. A reduzida variabilidade observada na relação A_I/A_P indica a estabilidade do sistema, ou seja, que os ácidos produzidos foram consumidos. Os valores de alcalinidade a bicarbonato obtidos nas amostras do RAn indicam geração de alcalinidade, associada à sulfetogênese e metanogênese acetoclástica em todas as condições experimentais, e são considerados adequados para a etapa de nitrificação em unidade subsequente.

Como já mencionado no item 4.5, o valor de pK_a do par H_2S/HS^- é de 6,99 (a 25°C e 1 atm). Sendo assim, o íon HS^- também pode atuar comoceptor de íons H^+ , produzindo H_2S . Tal fato acarreta em contribuição extra de alcalinidade por parte do sulfeto em sistemas biológicos sulfetogênicos (GODOI et al., 2017). Entretanto, no caso de pós-tratamento de efluentes obtidos em reatores sulfetogênicos, essa porção de alcalinidade adicional é perdida assim que o íon HS^- é metabolizado. Portanto, as frações teóricas de alcalinidade devida a sulfeto produzidas no reator anaeróbio em cada uma das condições operacionais da Etapa 1 foram calculadas a partir da concentração molar de HS^- detectado no efluente de RAn (Tabela 20) e desconsideradas para a etapa sequencial em reator sob aeração. A descrição completa dos cálculos utilizados para a determinação deste parâmetro e da importância de seu monitoramento em sistemas anaeróbios está apresentada em Godoi et al. (2017).

Tabela 20 - Valores médios e respectivos desvios-padrão da alcalinidade devida ao sulfeto em amostras efluentes do reator anaeróbio.

Condição	HS ⁻ (mmol L ⁻¹)	Alcalinidade teórica devida ao sulfeto (mgCaCO ₃ L ⁻¹)	Alcalinidade Parcial (mgCaCO ₃ L ⁻¹)
I	1,5 ± 0,3	73 ± 13	567 ± 31
II	1,7 ± 0,3	88 ± 14	653 ± 58
III	4,6 ± 0,6	229 ± 30	1413 ± 110
IV	4,8 ± 0,7	239 ± 37	1527 ± 60

Fonte: A Autora

5.1.1.4 PRODUTOS INTERMEDIÁRIOS

Com relação à produção de ácidos orgânicos no reator anaeróbio (Figura 16) observou-se o predomínio do ácido acético ao longo de todo o período operacional. A produção de etanol também foi detectada ao longo da operação de RAn (Figura 16), entretanto sempre em baixas concentrações.

Figura 16 – Valores médios da produção de ácidos orgânicos voláteis em cada condição operacional.

Fonte: A Autora

A estabilidade do sistema (associada a não ocorrência de acidificação), já indicada pela reduzida variabilidade da relação A_I/A_P (Figura 15), também ficou evidente a partir da análise dos subprodutos da digestão anaeróbia (Figura 16), uma vez que o acúmulo de ácido acético observado ocorreu pela inabilidade das arqueias metanogênicas em convertê-lo a metano.

Uma característica marcante das bactérias redutoras de sulfato é sua capacidade de metabolizar compostos produzidos na etapa acidogênica, tais como butirato, propionato, ácidos graxos de cadeia longa e ramificada, fumarato, lactato, etanol, maleato, compostos aromáticos e succinato (COLLERAN; FINNEGAN; LENS, 1995), sem a necessidade de crescimento balanceado com a acetogênese, uma vez que não dependem da pressão parcial de hidrogênio do meio. Além disso, a reação também é favorecida pelo fato de que tais ácidos orgânicos não são diretamente usados pelas arqueias metanogênicas. Assim, a presença de ácido acético ao longo de todo o período experimental indica que, provavelmente, a rota preferencial de degradação da matéria orgânica pelas bactérias BRS foi a incompleta, na qual acetato e sulfeto são os produtos finais da redução do sulfato (LENS et al., 1998). Sob tais condições, o metabolismo sulfetogênico é classificado como colaborador do estabelecimento da metanogênese acetoclástica (MUYZER; STAMS, 2008).

5.1.1.5 CONCENTRAÇÕES DE SÓLIDOS NO AFLUENTE, EFLUENTE E NA BIOMASSA PRESENTE AO FINAL DA OPERAÇÃO DO REATOR ANAERÓBIO

As concentrações médias de sólidos do afluente e do efluente do reator durante todas as condições experimentais avaliadas nesse trabalho estão apresentadas nas Tabelas 21 e 22. A Figura 17 compara tais concentrações de sólidos ao longo da operação do RAn.

Tabela 21 - Concentrações médias de sólidos na água residuárias sintética nas quatro condições experimentais testadas.

Concentrações Afluentes (mg L⁻¹)				
	Condição I	Condição II	Condição III	Condição IV
ST	983±115	1002±129	992±104	1008±139
STF	675±79	712±92	689±73	724±76
STV	308±27	290±33	303±35	284±35
SST	28±15	31±12	30±13	32±14
SSF	17±6	22±8	19±8	21±8
SSV	11±5	9±4	11±5	11±6

Fonte: A Autora

Tabela 22 - Concentrações médias de sólidos no efluente do reator anaeróbios nas quatro condições experimentais testadas.

Concentrações Efluentes (mg L⁻¹)				
	Condição I	Condição II	Condição III	Condição IV
ST	486±176	476±160	480±289	512±109
STF	432±71,3	432±27	435±134	469±85
STV	54±11	44±18	45±36	43±22
SST	119±37	104±16	125±44	145±35
SSF	33±6	30±14	46±21	66±26
SSV	86±7	74±18	79±18	79±31

Fonte: A Autora

Figura 17 - Variação da concentração de sólidos no afluente e efluente produzido pelo reator anaeróbio nas condições experimentais testadas.

Fonte: A Autora

A análise dos resultados da série de sólidos a partir do gráfico de barras (Figura 17) permite a observação de informações importantes. Pode-se observar que o reator foi eficiente para remover a fração de sólidos presente no afluente e a parcela formada a partir da conversão da matéria orgânica em células (Figura 17).

As elevadas concentrações de STF devem-se à presença dos sais minerais adicionados à água residuária sintética, os quais não foram totalmente metabolizados ou retidos no reator anaeróbio.

Após a finalização da operação do RAn foram realizadas estimativas da concentração de sólidos aderidos ao material suporte e também da concentração de material suspenso depositado no fundo do reator (aspecto pastoso). A Figura 18 mostra a deposição deste material próximo à base metálica que servia de sustentação para as hastes de espuma utilizadas como meio suporte.

Figura 18 – Deposição de biomassa suspensa no fundo do reator anaeróbio ao final de sua operação.

Fonte: A Autora

Para a estimativa da biomassa aderida em RAn a biomassa presente em uma haste (diâmetro de 1,5 cm e altura de 60 cm) foi retirada do reator. Esta haste foi cortada em porções menores e a fração mais superficial biomassa aderida foi retirada manualmente com auxílio de pipeta de vidro, béquer e água destilada. Após este procedimento, as porções de espuma foram colocadas em béquer com água e submetidas a banho de ultrassom (Branson, B2510R MT) por 10 minutos, para retirada da biomassa remanescente nos poros da espuma. Determinou-se que a massa de espuma em cada uma das 13 hastes era de 3,6257 g; que o volume aproximado de cada haste era 0,108 L e que a concentração de ST e STV em cada haste era de 5,81 e 4,5 g L⁻¹, respectivamente. Logo, após 320 dias de operação alcançaram-se concentrações de 2,25 kg STkg espuma⁻¹ e 1,77 kg STV kg espuma⁻¹. Cálculos semelhantes foram realizados para determinar a concentração de sólidos na biomassa suspensa depositada no fundo de RAn. O volume de material suspenso retirado do RAn foi de 0,9 L. A concentração de STV deste material foi de 13,2 g L⁻¹, resultando em concentração média de STV de 11,9 g STV L⁻¹.

5.1.2 MONITORAMENTO DO REATOR LEAI

5.1.2.1 FASE DE ADAPTAÇÃO

A fase de adaptação da biomassa do reator LEAI teve duração de 10 dias. Neste período o TDH foi ajustado para $24,1 \pm 0,2$ horas e o sistema foi mantido sob recirculação e aeração contínua. A alimentação inicial do reator foi feita com 9,6 L (volume útil) de água

residuária salina utilizada como substrato afluente ao reator anaeróbio na Condição III (Tabela 10). O objetivo desta fase preliminar foi permitir o desenvolvimento da biomassa nitrificante autotrófica. Determinou-se o final desta fase no momento em que 50% do N-amoniacal adicionado foi oxidado a nitrato, assim como realizado por Santos (2014).

As variações nas concentrações de N-amoniacal, N-nitrito e N-nitrato neste período são apresentadas na Figura 19.

Figura 19 - Variação das concentrações efluentes de N-amoniacal, N-nitrito e N-nitrato durante fase de adaptação.

Fonte: A Autora

No terceiro dia de operação já foi possível coletar amostra efluente do reator LEAI, uma vez que não foi observado excesso de biomassa no líquido de saída. O aumento progressivo da concentração de N-nitrato acompanhado pelo decaimento na concentração de N-amoniacal (superior a 50%) foi observado ao longo deste período (Figura 19). Além disso, houve queda da concentração de N-nitrito até zero. Tal situação justificou a mudança para operação do sistema LEAI com aeração intermitente e TDH reduzido.

5.1.2.2 BREVE RELATO DAS DIFICULDADES OPERACIONAIS PARA OPERAÇÃO DOS SISTEMAS EM SÉRIE

Após detectada ocorrência da nitrificação (128º dia de operação do reator anaeróbio e 10º dia de operação do reator LEAI), o reator LEAI passou a ser diretamente alimentado com o efluente produzido no reator anaeróbio. Como os reatores possuíam as mesmas dimensões, manteve-se o TDH teórico adotado na Etapa Experimental 1 (aproximadamente 18 h).

Entretanto, devido a dificuldades em manter os dois sistemas nivelados, de maneira que a saída da unidade do reator RAn permanecesse afogada e com *headspace* pressurizado, o adequado funcionamento dos dois sistemas em série e consequente início do monitoramento físico-químico da Condição III do LEAI só foi estabelecido a partir do 168º dia de operação.

A vazão de efluente anaeróbio encaminhada ao reator LEAI variou muito neste intervalo (entre 128º e 167º dia de operação), provavelmente submetendo o sistema recém inoculado à sobrecargas de sulfeto. Frequentemente a tubulação de conexão entre os dois sistemas encontrava-se obstruída pelos sólidos desprendidos do RAn. Com o passar dos dias, o reator LEAI passou a adquirir coloração esbranquiçada e o monitoramento das concentrações afluente e efluente de N-NH_4^+ indicavam ausência de atividade nitrificante. No 140º dia de operação, as hastes de espuma foram retiradas do reator LEAI. Constatou-se o depósito de material sólido esbranquiçado (semelhante a enxofre elementar), sobre o meio suporte, como pode ser visualizado na Figura 20. A oxidação do sulfeto dissolvido afluente à enxofre elementar provavelmente ocorreu durante a etapa aerada do ciclo de aeração intermitente (2 horas com aeração e 1 hora sem aeração), uma vez que condições de microaeração podem ter sido estabelecidas no reator LEAI.

Figura 20 – Depósito de enxofre elementar sobre a superfície das hastes de espuma utilizadas como material suporte no reator LEAI.

Fonte: A Autora

Após a raspagem do material depositado, as hastes foram reinseridas no reator LEAI e 1,5 L de lodo aeróbio Volks foram adicionados, com intuito de estabelecer maior disponibilidade de biomassa nitrificante no reator. O sistema foi alimentado com efluente do RAn e mantido sob aeração constante e recirculação fechada até a detecção de completa

oxidação de N-NH_4^+ . Concomitante com esse período, os problemas hidráulicos da operação dos reatores em série foram solucionados, viabilizando o início da operação da Condição III para o reator LEAI, a partir do 168º dia de operação.

O intervalo temporal, entre o 128º e o 167º dias de operação, faz parte da Condição IIIa e portanto, não foi incorporado ao período de monitoramento do reator LEAI que será descrito a seguir. Entretanto acredita-se que tal período foi essencial para garantir a adaptação inicial da biomassa nitrificante ao sulfeto, a qual impactou nas eficiências de nitrificação das fases operacionais posteriores.

5.1.2.3 REMOÇÃO DE NITROGÊNIO: EFICIÊNCIAS DE OXIDAÇÃO DE AMÔNIA, DESNITRIFICAÇÃO E REMOÇÃO DE N-TOTAL

Estabelecido o adequado funcionamento dos reatores em série, o reator LEAI passou a ser operado com TDH de $18,8 \pm 0,6$ horas e aeração intermitente (2 horas com aeração e 1 hora sem aeração). Além disso, ajustou-se a vazão de recirculação de efluente no LEAI para cinco vezes superior à vazão de alimentação, como sugerido por Moura, Damianovic e Foresti (2012).

Como a água residuária de estudo foi previamente tratada no reator anaeróbio (RAn), decréscimos médios de 11% e 6% na concentração de N-NH_4^+ do efluente desta unidade primária, quando comparado à caracterização afluyente (Tabela 5), foram observados nas Condições III e IV, respectivamente. Tal decréscimo está ligado ao consumo de nitrogênio para crescimento celular dos microrganismos anaeróbios na unidade primária de tratamento (TCHOBANOGLIOUS; BURTON; STENSEL, 2003). Na Tabela 23 estão comparadas as concentrações de N-NH_4^+ medidas no substrato sintético afluyente ao reator anaeróbio armazenado sob refrigeração com o efluente produzido pelo RAn nas Condições IIIb e IV. Também indicam-se nesta Tabela a concentração de DQO e a relação C/N no efluente de RAn nas condições testadas.

Tabela 23 – Características físico-químicas do substrato sintético e do efluente produzido no reator anaeróbio.

Condição	Período operacional (dias)	N-NH₄⁺ meio sintético (mgN L⁻¹)	DQO saída do RAn (mg L⁻¹)	N-NH₄⁺ saída do RAn (mgN L⁻¹)	Relação C/N
IIIb	168 - 201	72 ± 5,1	92 ± 8,8	63,9 ± 4,6	1,44
IV	202 - 296	144 ± 6,8	131 ± 27,4	135,3 ± 8,6	0,97

Fonte: A Autora

Considerando que as eficiências de remoção de matéria orgânica alcançadas em RAn foram superiores a 90% (Figura 9), outro ponto de grande mudança no efluente a ser pós-tratado no reator LEAI foi a relação C/N, como evidenciado na Tabela 23. As relações C/N adotadas nas Condições IIIb e IV foram de 1,44 e 0,97, respectivamente. Philips, Laanbroek e Verstraete (2002) apontam que a relação C/N adequada para a ocorrência da desnitrificação heterotrófica é de, pelo menos, 4. Tal fato permitiu explorar o estabelecimento da desnitrificação autotrófica como via principal de remoção de N-total no reator LEAI. Essa questão será melhor discutida a seguir. A Tabela 24 mostra os valores médios das concentrações afluente e efluente de N-amoniacal, N-nitrito, N-nitrato, N-total, STD, sulfato e DQO para a Condição IIIb. As eficiências médias de oxidação de NH₄⁺ e remoção de N-total também são apresentadas.

Tabela 24 - Concentrações afluyente e efluente de N-amoniacal, N-nitrito, N-nitrato, N-total, STD, sulfato e DQO e eficiências médias de oxidação de NH_4^+ e remoção de N-total da Condição IIIb.

Variáveis	Afluente		Efluente	
	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão
N- NH_4^+ (mg L ⁻¹)	63,9	4,6	27,0	8,6
N- NO_2^- (mg L ⁻¹)	0,04	0,05	0,1	0,2
N- NO_3^- (mg L ⁻¹)	0,04	0,02	2,4	1,0
N-total (mg L ⁻¹)	64,2	4,6	29,5	8,7
STD (mg L ⁻¹)	220	17,8	-	-
SO_4^{2-} (mg L ⁻¹)	122	40,4	34	10,4
DQO (mg L ⁻¹)	92	8,8	-	-
Eficiência de oxidação de N-NH_4^+			57 ± 14,1%	
Eficiência de desnitrificação			93 ± 3,8%	
Eficiência de remoção de N-total			54 ± 14,6%	

(-) Valores abaixo do limite de quantificação.

Fonte: A Autora

O melhor desempenho das bactérias oxidadoras de amônia pode ser alcançado em sistemas submetidos a maiores concentrações afluentes de N- NH_4^+ , até valores inferiores aos considerados tóxicos (FU et al., 2009; SANTOS et al., 2016). Sendo assim, na Condição IV aumentou-se a carga nitrogenada afluyente de 0,081 (Condição IIIb) para 0,173 kgN m⁻³ d⁻¹ (Condição IV). A Tabela 25 mostra os valores médios das concentrações afluyente e efluente de N-amoniacal, N-nitrito, N-nitrato, N-total, STD e DQO para a Condição IV.

Tabela 25 - Concentrações afluente e efluente de N-amoniaco, N-nitrito, N-nitrato, N-total, STD, sulfato e DQO e eficiências médias de oxidação de NH_4^+ e remoção de N-total da Condição IV.

Variáveis	Afluente		Efluente	
	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão
N- NH_4^+ (mg L ⁻¹)	135,3	8,6	54,6	17,7
N- NO_2^- (mg L ⁻¹)	0,02	0,05	2,7	1,9
N- NO_3^- (mg L ⁻¹)	0,00	0,00	3,8	3,4
N-total (mg L ⁻¹)	135,4	8,6	61,0	16,0
STD (mg L ⁻¹)	231	25,3	-	-
SO_4^{2-} (mg L ⁻¹)	50	26,2	81	15,9
DQO (mg L ⁻¹)	131	27,4	-	-
Eficiência de oxidação de NH_4^+			60 ± 12,2%	
Eficiência de desnitrificação			92 ± 4,5%	
Eficiência média de remoção de N-total			55 ± 10,8%	

(-) Valores abaixo do limite de detecção.

Fonte: A Autora

Apesar da eficiência de oxidação de N- NH_4^+ na Condição IV ter sido mantida ao mesmo nível que na etapa anterior (Tabelas 24 e 25), a carga de N-total removido na Condição IV foi de 0,095 kgN m⁻³d⁻¹ (Tabela 26). Na Condição IIIb, a carga de N-total removido foi de 0,041 kgN m⁻³d⁻¹. A fração de N- NH_4^+ oxidado (mgN L⁻¹) aumentou de 132 para 273,5 mgN L⁻¹ quando a concentração afluente de amônia foi aumentada de 200 para 400 mgN L⁻¹, em reator de membrana modificada aplicado ao tratamento de água residuária sintética (FU et al., 2009).

Como já mencionado, Sears et al. (2004) observaram a completa inibição da atividade das bactérias oxidadoras de amônia (BOA) expostas por 2 horas em condições aeradas à concentração de 0,5 mgSTD L⁻¹ em RBS inoculado com biomassa nitrificante suspensa. Em condições anóxicas, concentração de 5 mgSTD L⁻¹ inibiu a atividade das BOA em 72% (SEARS et al., 2004). Entretanto, Erguder et al. (2008) não observaram efeito inibitório tão marcante como o identificado por Sears et al. (2004). Em condições anóxicas e operando RBS com biomassa nitrificante suspensa, os testes realizados por Erguder et al. (2008) mostraram que a atividade nitrificante só começou a ser inibida com concentração de 45 mgSTD L⁻¹.

A Figura 21 retrata a variação da concentração de N-NH_4^+ nas amostras afluente, efluente e a eficiência de oxidação de N-NH_4^+ ao longo de todo o período experimental.

Figura 21 - Variação da concentração de N-NH_4^+ nas amostras afluente, efluente e a eficiência de oxidação de N-NH_4^+ ao longo da operação do reator LEAI na Etapa Experimental 1.

Fonte: A Autora

Como pode ser observado na Figura 21, a eficiência de oxidação de N-NH_4^+ foi variável ao longo da operação do reator LEAI. Com intuito de elucidar as razões pelas quais esse desequilíbrio ocorreu, um gráfico confrontando o perfil da eficiência de oxidação de N-NH_4^+ com a concentração de sulfetos dissolvidos presente no efluente de RAn foi preparado (Figura 22). A instabilidade do reator LEAI quanto às eficiências de oxidação de N-NH_4^+ também pode ser visualizada em *boxplot*, como mostrado na Figura 23.

Figura 22 – Perfil temporal da concentração de sulfetos dissolvidos presente no efluente e da eficiência de nitrificação alcançada no reator LEAI na Etapa Experimental 1.

Fonte: A Autora

Pelos dados expostos na Figura 22 observou-se que toda variação brusca na concentração de sulfetos dissolvidos (em termos de mg STD L^{-1}) advindos do reator RAn impactou na eficiência de oxidação de N-NH_4^+ do LEAI. Tal impacto pode ser positivo, como observado no 188º dia de operação, quando queda na concentração de sulfeto resultou em eficiência de oxidação de N-NH_4^+ de, aproximadamente, 80%. Entretanto, o efeito negativo da variação da concentração de sulfeto sobre a nitrificação é que foi mais acentuado ao longo da operação do reator LEAI (Figura 22), como o retratado no 273º dia de operação.

Figura 23 - *Boxplot* da eficiência de oxidação de amônia no reator LEAI em cada condição operacional da Etapa Experimental 1.

Fonte: A Autora

O efeito inibitório do sulfeto aos microrganismos nitrificantes também foi observado por Moraes, Orrú e Foresti (2013) na operação de reator RSBA para ocorrência do processo NDS via desnitrificação autotrófica. Após o estabelecimento da biomassa nitrificante, cuja eficiência média de oxidação de NH_4 foi de $97 \pm 8\%$, Moraes, Orrú e Foresti (2013) passaram a operar o sistema sob regime de aeração intermitente e adicionando concentrações crescentes de sulfeto. Duas estratégias de alimentação do RSBA foram testadas. Considerando a estratégia de alimentação da batelada no início do ciclo (fase aerada), para concentração de $11,6 \pm 5,8 \text{ mgSTD L}^{-1}$, a eficiência de oxidação de NH_4 caiu para 72%. Quando a alimentação do RSBA passou a ocorrer apenas nas fases anóxicas (reduzir efeito tóxico do sulfeto sobre bactérias nitrificantes), a eficiência de oxidação de NH_4^+ observada foi de 86% para concentração de $53,3 \pm 2,9 \text{ mgSTD L}^{-1}$.

No presente estudo, o reator LEAI foi submetido a concentrações de sulfetos dissolvidos de $220 \pm 17,8$ e $231 \pm 25,3 \text{ mgSTD L}^{-1}$ nas Condições III e IV, respectivamente (Tabelas 24 e 25). Tais concentrações foram cerca de 10 vezes mais altas do que a máxima concentração testada por Moraes, Orrú e Foresti (2013) ($23,6 \pm 7,2 \text{ mgSTD L}^{-1}$). Apesar do desempenho da ordem de 60% na eficiência de oxidação de N-NH_4^+ (Figura 23), pode-se inferir que o arranjo do material suporte e as condições operacionais testadas foram, de certa maneira, mais eficientes na manutenção do processo de nitrificação no presente estudo. De acordo com Parkin e Speece (1983), sistema de biomassa aderida são mais resistentes à

toxicidade do sulfeto do que os sistemas com biomassa suspensa. Isso é possível devido ao alcance de elevados tempos de residência celular (TRC) mesmo em condição de baixo TDH (PARKIN; SPEECE, 1983) e à produção de material polimérico extracelular, o qual age como uma barreira à difusividade do sulfeto na célula (GARRETT; BHAKOO; ZHANG, 2008; VYRIDES; STUCKEY, 2009). Outro fator que deve ser considerado é a maior resistência à transferência de massa de compostos tóxicos, fenômeno inerente ao arranjo da biomassa aderida à materiais suportes (MAILLACHERUVU et al., 1993; O'FLAHERTY et al., 1998).

A Figura 23 mostra que a eficiência de desnitrificação foi significativa em ambas as condições experimentais. As cargas de N-total removidas (Tabela 26) nas Condições III e IV evidenciam a conversão quase completa do N-NH_4^+ previamente oxidado na fase aerada do ciclo de aeração intermitente, o que resultou em eficiências médias de remoção de N-total de $54 \pm 14,6$ e $55 \pm 10,8\%$ nas Condições III e IV, respectivamente (Figura 24).

Figura 24 - Boxplot das eficiências de desnitrificação e remoção de N-total no reator LEAI na Etapa Experimental 1.

Fonte: A Autora

Tabela 26 - Valores médios das cargas aplicadas e removidas no reator LEAI durante a Etapa Experimental 1.

Variáveis	Condição III	Condição IV
Carga nitrogenada aplicada ($\text{kg N m}^{-3} \text{ dia}^{-1}$)	0,081±0,006	0,173±0,011
Carga de amônia oxidada ($\text{kg N m}^{-3} \text{ dia}^{-1}$)	0,047±0,012	0,103±0,020
Carga de N-total removido ($\text{kg N m}^{-3} \text{ dia}^{-1}$)	0,044±0,012	0,095±0,018

Fonte: A Autora

Apesar do reator anaeróbio (RAn) ter exibido altas eficiências de remoção de matéria orgânica (acima de 90%, como demonstrado na Figura 8 e discutido na seção 5.1.1), uma parcela de matéria orgânica residual foi encaminhada ao reator LEAI (Tabela 23). Essa fração residual de matéria orgânica foi completamente removido no reator LEAI (Tabelas 24 e 25).

Como a nitrificação autotrófica é geralmente lenta se comparada com o metabolismo heterotrófico aeróbio, é provável que uma fração da DQO remanescente de RAn tenha sido prioritariamente metabolizada ainda durante a etapa aerada do ciclo de aeração intermitente aplicado no sistema LEAI. Situação semelhante foi observada por Pantoja Filho et al. (2014) no estudo do pós-tratamento de efluente de sistema anaeróbio em reator de leito fixo compartimentado (câmara aerada seguida por câmara anóxica). Os autores citados observaram que a DQO residual do sistema anaeróbio foi completamente removida na câmara aerada por ação da biomassa heterotrófica aeróbia, concomitantemente com a nitrificação (PANTOJA FILHO et al., 2014). Todavia, como no reator LEAI os bioprocessos de nitrificação e desnitrificação aconteciam simultaneamente, uma fração da DQO remanescente do reator anaeróbio pode também ter sido utilizada como doador de elétrons na desnitrificação heterotrófica. De acordo com Tchobanoglous, Burton e Stensel (2003) a reação de desnitrificação com nitrato como acceptor de elétrons e acetato (principal ácido orgânico volátil acumulado em RAn) é dada pela Equação 28.

Assim, o fator de equivalência oxigênio/nitrato (também expresso como relação DQO/N- NO_3^-) para o acetato é de 4,3 mg DQO mg^{-1} N- NO_3^- . A Tabela 27 apresenta a DQO requerida teoricamente para desnitrificação heterotrófica nas Condições III e IV, utilizando acetato como doador de elétrons.

Tabela 27 - Cálculos estequiométricos de demanda por elétrons para desnitrificação heterotrófica utilizando acetato como doador de elétrons.

Variáveis	Condição III	Condição IV
N-total removido (mgN L ⁻¹)	34,7 ± 9,7	74,3 ± 14,0
DQO requerida na desnitrificação heterotrófica (mg L ⁻¹)	149 ± 50	319 ± 60
DQO afluente (mg L ⁻¹)	92 ± 9	132 ± 27

Fonte: A Autora

Observando os resultados dos cálculos estequiométricos da Tabela 27 nota-se o déficit de doador de elétrons para desnitrificação heterotrófica sob baixa relação C/N (Condições III e IV). Tal fato sinaliza o efetivo uso do sulfeto, presente no efluente do RAn, como doador de elétrons na redução do nitrato, como será discutido a seguir.

Além da representação em *Box-plot*, foi utilizado o software *BioEstat* para a avaliação da existência de diferença estatística entre as eficiências de oxidação de N-NH₄⁺, desnitrificação e remoção de N-total nas condições experimentais III e IV. As tabelas com os resultados da aplicação deste teste paramétrico estão disponíveis no Apêndice A – Testes Estatísticos. Como os conjuntos amostrais dessas variáveis eram inferiores a 20 medições, aplicou-se o teste não-paramétrico de *Mann-Whitney*, com nível de significância de 95%. Como resultado, não foi detectada diferença estatisticamente significativa entre as amostras das Condições III e IV com relação às eficiências de nitrificação, desnitrificação e remoção de N-total. Isto foi constatado porque os valores de p-valor (bilateral) obtidos nas análises das eficiências de nitrificação, desnitrificação e remoção de N-total (0,2899, 0,700 e 0,7530, respectivamente) foram superiores à 0,05 (Tabela A1), aceitando a hipótese H₀ de que as médias são iguais.

A Figura 25 retrata a variação no potencial de óxido-redução (POR) ao longo de dois ciclos de aeração completos (1 hora com aeração e 2 horas sem aeração). Segundo Chang, Cheng e Chao (2004), em condições normais de operação de um sistema NDS o valor de POR se eleva durante a nitrificação e atinge um *plateau*, o qual indica que a máxima capacidade de oxidação de N-NH₄⁺ foi atingida. Após este ponto o valor de POR começa a cair, estabilizando-se com valores negativos, resultado da redução de NO₃⁻ pelos microrganismos desnitrificantes (CHANG; CHENG; CHAO, 2004).

Figura 25 – Perfil do potencial de óxido-redução durante ciclos de aeração intermitente.

Fonte: A Autora

Observando a Figura 25 nota-se que, mesmo nas etapas aeradas, o potencial de óxido-redução no reator LEAI não atingiu valores positivos, como esperado para as reações de oxidação de N-NH_4^+ e de oxidação aeróbia de matéria orgânica. Tal comportamento deve-se à presença constante de compostos reduzidos de enxofre, como os sulfetos dissolvidos. Interessante notar que mesmo movendo-se na zona de valores negativos, há uma tendência do valor de POR ficar próximo de zero (Figura 25) durante as etapas aeradas do ciclo de aeração intermitente. Por outro lado, quando a aeração é interrompida (período off), o valor de POR cai (Figura 25), indicando o estabelecimento de ambiente anóxico/anaeróbico. Tal situação evidencia o uso do NO_3^- comoceptor final de elétrons pelos microrganismos oxidadores de sulfeto, uma vez que mudanças no valor de POR em condições anóxicas estão associadas ao consumo de compostos reduzidos presentes no meio líquido (LI; BISHOP, 2004).

Tais evidências indicam a efetiva atuação do sulfeto como doador de elétrons no presente estudo, permitindo o estabelecimento de microrganismos desnitrificantes autotróficos os quais foram responsáveis pela remoção de N-total nas duas condições operacionais testadas. Em condições anóxicas, sulfato e enxofre elementar (S^0) são os dois possíveis produtos da oxidação anaeróbia do sulfeto utilizando NO_3^- comoceptor final de elétrons (MAHMOOD et al., 2007), como expostos nas Equações 6 e 7 apresentadas no item 3.4.

Na Tabela 28 apresenta-se o balanço de massa da produção de sulfato a partir da oxidação completa de sulfeto utilizando nitrato comoceptor final de elétrons. Para o adequado entendimento desse balanço, vale ressaltar que, apesar das concentrações elevadas de sulfeto dissolvido proveniente de RAn nas Condições III e IV, a disponibilidade real de

sulfeto como doador de elétrons na desnitrificação autotrófica foi bem menor. Isto aconteceu porque durante as fases aeradas do ciclo de aeração intermitente, parte do sulfeto afluente foi aerobiamente oxidado à sulfato ou então, arrastado do sistema pelo *stripping* com o oxigênio.

Ademais, para os cálculos do balanço de massa (Tabela 28), estimaram-se as concentrações médias de sulfeto (HS^-) envolvidas no processo de desnitrificação autotrófica a partir das frações de N-total removido. As frações médias de N-total removido foram de $34,7 \pm 9,7$ e $74,4 \pm 14,0 \text{ mgN L}^{-1}$ para as Condições III e IV, respectivamente. As concentrações de sulfeto teóricas foram determinadas considerando que o N-nitrato foi completamente reduzido via desnitrificação autotrófica. Assim, nas Condições III e IV as concentrações de sulfeto teórico foram $51,3$ e $109,8 \text{ mgHS}^- \text{ L}^{-1}$, respectivamente (Tabela 28). Tais concentrações foram obtidas considerando a relação estequiométrica de 1 mol de HS^- oxidado para cada 1,6 mol de NO_3 reduzido (Equação 6). Cálculos similares foram realizados para estimar a produção de sulfato pela oxidação completa do sulfeto na desnitrificação autotrófica (1 mol de SO_4^{2-} produzido para cada 1 mol de HS^- oxidado, como mostra a Equação 6).

Kuenen (1975) apresentou as reações estequiométricas da oxidação do sulfeto em condições aeradas (Equações 27 e 28).

Como a concentração de OD no meio líquido do reator LEAI durante as etapas aeradas do ciclo de aeração intermitente variou entre $2,0$ a $3,5 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$, a principal rota metabólica de oxidação de sulfeto em condições aeróbias foi a retratada na Equação 30. A partir das concentrações de HS^- provenientes no efluente do RAn e considerando a relação estequiométrica 1 mol de SO_4^{2-} produzido para cada 1 mol de HS^- oxidado (Equação 30), foi calculada a porção de sulfato produzida na etapa aerada (Tabela 28).

Tais estimativas foram necessárias uma vez que o sulfeto é um forte agente redutor e assim, as reações nas quais esse composto está envolvido são muito rápidas, dificultando seu monitoramento. Pantoja Filho (2011) também observou rápida oxidação do sulfeto na redução anóxica de nitrato em reator aeróbio-anóxico de leito fixo (RAALF) aplicado ao pós-tratamento de efluente de sistema anaeróbio.

Tabela 28 – Estimativa das frações de sulfato produzido pela oxidação completa de sulfeto com nitrato como aceptor de elétrons e pela oxidação aeróbia do sulfeto.

Condição	HS⁻ afluyente (mgHS⁻ L⁻¹)	Demanda de sulfeto na desnitrificação autotrófica (mgHS⁻ L⁻¹)*	Produção teórica de sulfato pela desnitrificação autotrófica (mgSO₄²⁻ L⁻¹)	Sulfato teórico produzido pela oxidação aeróbia do sulfeto (mgSO₄²⁻ L⁻¹)
III	154	51	149	300
IV	158	110	319	141

*os cálculos foram realizados com base no N-nitrato removido, considerando a via autotrófica.

Fonte: A Autora

Para a estimativa das concentrações de sulfato teóricas considerou-se o somatório da concentração de sulfato residual previamente presente no afluyente (122 e 50 mgSO₄²⁻ L⁻¹ para as Condições III e IV, respectivamente), a concentração de sulfato produzida na desnitrificação autotrófica (149 e 319 mgSO₄²⁻ L⁻¹ para as Condições III e IV, respectivamente) e a concentração de sulfato produzido na etapa aerada (300 e 141 mgSO₄²⁻ L⁻¹ para as Condições III e IV, respectivamente). A Tabela 29 apresenta a comparação das concentrações efluentes de sulfato observada e teórica nas Condições III e IV.

Tabela 29 - Concentrações afluyente e efluente de sulfato determinadas analiticamente e concentração de sulfato no efluente determinada teoricamente.

Condição	Sulfato afluyente (mgSO₄²⁻ L⁻¹)	Sulfato efluente observado (mgSO₄²⁻ L⁻¹)	Sulfato efluente teórico (mgSO₄²⁻ L⁻¹)
III	122 ± 40,4	454 ± 44,5	571
IV	50 ± 26,2	434 ± 27,3	510

Fonte: A Autora

De acordo com os resultados da Tabela 29, observou-se que simultaneamente aos consumos de sulfeto e nitrato identificados nas Condições III e IV, ocorreu aumento na concentração de sulfato, quando comparado às concentrações provenientes de RAn. Além disso, considerando as reações pelas quais o sulfeto foi metabolizado no reator LEAI, tanto

em condições aeróbias quanto em condições anóxicas, pode-se observar que as concentrações efluentes de sulfato medidas foram inferiores às concentrações esperadas (Tabela 29). Tal fato pode estar relacionado (i) à ocorrência do *stripping* de parte do sulfeto disponível durante a etapa aerada; (ii) à redução de uma fração do NO_3^- produzido via desnitrificação heterotrófica ou (iii) à formação de S^0 . Ensaios com o objetivo de elucidar a ocorrência de tais fenômenos foram realizados diretamente no reator LEAI ao final da Etapa Experimental 1. As características e resultados desses ensaios serão discutidas no item 5.1.3.

5.1.2.4 ALCALINIDADE E PH

Os valores médios de pH e de alcalinidade total medidos no efluente produzido no reator anaeróbio (afluente) e na saída do reator LEAI (efluente) nas Condições III e IV estão apresentados na Tabela 30.

Tabela 30 – Valores médios e respectivos desvios-padrão da alcalinidade total em amostras afluente e efluente ao longo da operação do reator LEAI na Etapa Experimental 1.

Condição	pH		Alcalinidade Parcial ($\text{mgCaCO}_3 \text{ L}^{-1}$)	Alcalinidade Total ($\text{mgCaCO}_3 \text{ L}^{-1}$)
	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente
			(efluente do RAn)	
III	$7,3 \pm 0,1$	$8,0 \pm 0,4$	1413 ± 110	997 ± 45
IV	$7,2 \pm 0,1$	$8,1 \pm 0,3$	1527 ± 60	741 ± 200

Fonte: A Autora

De acordo com Tchobanoglous, Burton e Stensel (2003), o processo de nitrificação consome 7,14 mg de alcalinidade em função de CaCO_3 por mg de amônia oxidada; ocasionando queda na alcalinidade do meio líquido. Considerando que o sulfeto presente no efluente do reator RAn foi oxidado no reator LEAI, deve-se subtrair da alcalinidade parcial afluente a porção de alcalinidade devida ao sulfeto, estimada no item 5.1.1.3.

A Tabela 31 apresenta a demanda prevista (alcalinidade consumida pela nitrificação) e a alcalinidade observada em cada uma das condições operacionais da Etapa 1.

Tabela 31 - Alcalinidade parcial afluente e estimativas da alcalinidade devida ao sulfeto e da alcalinidade consumida na nitrificação e alcalinidade efluente no reator LEAI em cada condição experimental testada na Etapa 1.

Condição	Alcalinidade parcial afluente (mg CaCO₃ L⁻¹)	Alcalinidade devida ao sulfeto (mg CaCO₃ L⁻¹)	Demanda de alcalinidade na nitrificação (mg CaCO₃ L⁻¹)	Alcalinidade efluente observada (mg CaCO₃ L⁻¹)
III	1413 ± 110	229 ± 30	246	997 ± 45
IV	1527 ± 60	239 ± 37	577	741 ± 200

Fonte: A Autora

Os dados apresentados na Tabela 31 permitem inferir que a alcalinidade parcial proveniente do reator RAn (descontando-se as frações devida aos ácidos e ao sulfeto) foi suficiente para permitir a ocorrência da nitrificação no reator LEAI.

5.1.2.5 CONCENTRAÇÕES DE SÓLIDOS NO EFLUENTE DO REATOR LEAI

As concentrações médias de sólidos do afluente (efluente do RAn) e do efluente do reator LEAI durante as Condições III e IV estão apresentadas na Tabela 32. A Figura 26 apresenta a comparação tais concentrações de sólidos ao longo da operação dos sistemas em série.

Tabela 32 – Concentrações de sólidos nas saídas do reator anaeróbio (afluente) e no efluente final obtido no reator LEAI nas Condições III e IV.

	Concentrações na saída do reator anaeróbio (mg L⁻¹)		Concentrações na saída do reator LEAI (mg L⁻¹)	
	Condição III	Condição IV	Condição III	Condição IV
ST	480±289	512±109	624±8	523±82
STF	435±134	469±85	554±5	419±52
STV	45±36	43±22	70±4	104±32
SST	125±44	145±35	220±11	225±48
SSF	46±21	66±26	180±22	177±52
SSV	79±18	79±31	40±5	48±21

Fonte: A Autora

Figura 26 – Variação da concentração de sólidos nos efluentes produzidos pelos reatores anaeróbio e LEAI nas Condições III e IV.

Fonte: A Autora

Primeiramente, pode-se observar que, a concentração de STF presente na água residuária manteve-se no efluente dos reatores, uma vez que está associada aos sais minerais adicionados em seu preparo (Tabela 32).

Com relação à parcela de sólidos suspensos, a análise da Figura 26 indica que as concentrações efluentes de SSV foram baixas para ambos sistemas ao longo de todo o período operacional. Silva et al. (2018) operaram reator LEAI como unidade de pós-tratamento do efluente produzido em reator UASB tratando esgoto sanitário, observando concentrações de SSV de $14 \pm 9 \text{ mg L}^{-1}$ no efluente final da unidade LEAI e apontam que tais concentrações de SSV são compatíveis ao efluente obtido nos decantadores secundários de sistemas de lodos ativados (SILVA et al. 2018). Tal fato confirma que a adoção de leito estruturado de espuma de poliuretano permite uma adequada retenção da biomassa imobilizada, tanto na operação em condição estritamente anaeróbia (RAn) quando sob regime de aeração intermitente (LEAI). Resultados similares, em termos de retenção da biomassa, também foram alcançados nos estudos desenvolvidos por Moura, Damianovic e Foresti (2012), Moura (2014) e Santos (2014).

5.1.3 PERFIS TEMPORAIS DE CONCENTRAÇÕES

Ao final do período operacional (296 dias de operação), testes baseados na obtenção de perfis temporais de concentrações de compostos orgânicos, nitrogenados e sulfurosos (Testes 1 até 5) foram realizados para investigar a dinâmica dos processos combinados de nitrificação e desnitrificação autotrófica e os impactos do sulfeto sobre o desempenho do

reator LEAI durante as fases aeradas e não-aeradas. As características operacionais iniciais de cada teste foram apresentadas na Tabela 9 (seção 4.2.5). Vale ressaltar que a discussão dos resultados obtidos nestes testes será dividida em grupos. Primeiro serão tratados os testes focados na etapa de nitrificação (Testes 1 e 2). Em seguida, serão apresentados os resultados dos testes referentes à investigação da desnitrificação autotrófica e da remoção de N-total (Testes 3, 4 e 5). Por último tratar-se-á do teste realizado para investigar os processos de oxidação aeróbia de sulfeto e *stripping* pelo O_2 (Teste 6).

Os perfis temporais obtidos tiveram como base, além do monitoramento das concentrações dos substratos de interesse, o acompanhamento do valor de POR. O POR tem sido reportado na literatura como parâmetro eficiente para o controle de sistemas biológicos aplicados à remoção de nutrientes (CHEN et al., 2002; CLAROS et al., 2012; MARTÍN DE LA VEGA et al., 2012).

Como mencionado na seção 4.2.5, previamente à análise dos resultados de cada teste, fator de diluição de $0,0556 \text{ hora}^{-1}$ (equivalente à razão entre Q_E e V_{UTIL}) foi aplicado para verificar se o padrão temporal da concentração de cada composto de interesse esteve relacionado à ocorrência dos processos metabólicos ou foi resultado apenas do efeito de diluição. Para todos os testes notou-se que a diluição não teve efeito significativo sobre o consumo e/ou formação dos compostos de interesse. Tal fato confirmou a atividade real dos microrganismos nitrificantes e desnitrificantes presentes no biofilme do reator LEAI.

A Figura 27 apresenta o perfil temporal de oxidação de N-amoniacal e consequente aumento da concentração dos compostos reduzidos intermediários (NO_2^- e NO_3^-) ao longo do Teste 1.

Figura 27 – Perfis da oxidação de $N-NH_4^+$ e POR obtidos no Teste 1, sob aeração contínua.

Fonte: A Autora

Pela Figura 27 pode-se observar que a concentração inicial de N-NH_4^+ foi oxidada quase que completamente até N-NO_2^- (nitritação) durante os 400 minutos de teste. Apesar da concentração de OD medida no meio líquido no início do Teste 1 ter sido de $2,86 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$, uma porção mais reduzida de OD pode estar disponível para a atuação dos microrganismos nitrificantes, localizados na zona mais externa do biofilme estabelecido no reator LEAI. Tal diferença entre a concentração de OD medida no meio líquido e a concentração prontamente disponível às bactérias nitrificantes está relacionada às limitações na transferência de massa do oxigênio (WILÉN; GAPES; KELLER, 2004). Wilén, Gapes e Keller (2004) mostraram que a resistência à transferência de massa de OD entre o meio líquido e a superfície do biofilme causou uma queda de 22 a 80% na concentração de OD disponível em grânulos com organismos nitrificantes. Tal fato associado à resistência à transferência de massa interna no biofilme resultou em limitação na disponibilidade de O_2 à nitrificação (WILÉN; GAPES; KELLER, 2004). Portanto, no intuito de evitar a limitação na disponibilidade de OD à microbiota nitrificante do reator LEAI, o aerador de aquário que vinha sendo empregado no provimento de O_2 foi substituído por um compressor de ar. O compressor de ar foi empregado na execução dos Testes 2 e 3, resultando em concentração de OD no meio líquido de $5,0 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$.

Com relação à variação do POR no Teste 1, é interessante notar que POR não se ajustou à faixa típica da nitrificação (+100 to +350 mV, GONCHARUK et al., 2010) mesmo em condição de contínua aeração (Figura 27). Como cada valor de POR medido representa um valor médio global de todas as reações bioquímicas realizadas em um reator biológico (LI; BISHOP, 2004), os baixos valores de POR observados no Teste 1 provavelmente estão relacionados às altas concentrações de compostos reduzidos. O principal composto reduzido que esteve constantemente presente na operação do reator LEAI foi o sulfeto, produzido pelas bactérias BRS no reator anaeróbio.

Com objetivo de confirmar a interferência do sulfeto no perfil global do POR do reator LEAI, o Teste 2 foi realizado. Tal teste teve por princípio não adicionar sulfato na água residuárias sintética, de maneira a impedir a ocorrência da sulfetogênese no RAn e, consequentemente, a interferência do sulfeto na nitrificação. Além disso, a aeração do sistema LEAI foi mantida ao longo da execução do teste. A Figura 28 retrata os perfis dos compostos nitrogenados e a variação do POR ao longo do Teste 2.

Figura 28 - Perfis da oxidação de N-NH_4^+ e POR obtidos na ausência de sulfeto e sob aeração contínua (Teste 2).

Fonte: A Autora

A Figura 28 mostra que, quando o sulfeto não está presente, os valores de POR aumentam gradualmente até faixas neutras/positivas, acompanhando a oxidação de N-NH_4^+ . Valor de POR de 50 mV (vs Ag/AgCl) foi atingido após 250 minutos de teste (Figura 28). É interessante salientar também que, no Teste 2, 56,4% da concentração inicial de amônia foi oxidado nos primeiros 135 minutos. A taxa média de oxidação deste composto neste período foi de $0,56 \text{ mg N L}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Contudo, a taxa de oxidação de amônia caiu drasticamente ($0,12 \text{ mg N L}^{-1} \text{ min}^{-1}$) nos últimos 100 minutos do Teste 2 mesmo com a presença de aproximadamente 60 mg N L^{-1} como N-NH_4^+ . Neste período final do Teste 2, a concentração de N-NO_2^- acumulada foi de 33 mg N L^{-1} . Tal fato sugere a ocorrência de efeitos inibitórios do nitrito sobre as bactérias oxidadoras de amônia. Muller, Stouthamer e Van Verseveld (1995) observaram redução de 50% na taxa média de oxidação de amônia de biomassa floculenta retirada de sistema de lodos ativados submetida à substrato com concentração de nitrito variando entre 42 a $70 \text{ mg N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$ (MULLER; STOUTHAMER; VAN VERSEVELD, 1995).

Além da inibição da atividade da atividade nitrificante pelo nitrito, observou-se que amônia livre pode também ter inibido este metabolismo. Estudos prévios reportaram que os gêneros *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*, relativos à bactérias oxidadoras de amônia e oxidadoras de nitrito, podem ser inibidos por concentrações de amônia livre variando entre 10-150 e 0,1-4 mg L^{-1} , respectivamente (ANTHONISEN et al., 1976; BAE et al., 2001; LIU; TAY, 2001). Como a concentração de amônia livre no Teste 2 variou de 11,6 e $3,9 \text{ mg L}^{-1}$, o acúmulo de NO_2^- observado no reator LEAI também está relacionado à sensibilidade das bactérias

oxidadoras de nitrito à presença de amônia livre. As concentrações de amônia livre foram calculadas utilizando-se a Equação 31 (FORD; CHURCHWELL; KACHTICK, 1980), na qual adotou-se temperatura ambiente de 30°C e valor de pH de 8,0.

$$\text{Amônia livre (mg L}^{-1}\text{)} = \frac{[N-NH_4^+] \times 10^{pH}}{\exp[6334/273+T] + 10^{pH}} \quad (\text{Eq. 31})$$

Com objetivo de elucidar o potencial efetivo de uso de sulfetos dissolvidos como doador de elétrons para redução de NO_3^- no reator LEAI, o Teste 3 foi realizado submetendo o reator LEAI à pulsos iniciais de N-nitrato e sulfeto de 100 mgN L^{-1} e 260 mg STD L^{-1} , respectivamente (Tabela 9). Os perfis de consumo de N- NO_3^- e sulfeto ao longo deste teste estão ilustrados na Figura 29.

Figura 29 – Perfis da concentração de N-nitrato e sulfeto total dissolvido ao longo do Teste 3, sob condições anóxicas.

Fonte: A Autora

Durante o Teste 3, POR manteve-se constante no valor de -500 mV (vs Ag/AgCl). Como apresentado na Figura 29, 23% da concentração inicial de sulfeto foi rapidamente oxidada e 67% da concentração inicial de N-nitrato foi reduzida nos primeiros sete minutos do Teste 3. Pantoja Filho (2011) também observou a rápida oxidação de sulfeto por meio da redução de nitrato em câmara anóxica de reator RAALF aplicado ao pós-tratamento de efluente de reator anaeróbio. Bill, Bott e Murthy (2009) compararam a desnitrificação

heterotrófica com o uso de metanol, etanol e glicerol como doadores de elétrons e a autotrófica com sulfeto em reatores de leito móvel. A taxa máxima de redução do nitrato foi obtida a partir da oxidação de sulfeto ($3,6 \text{ gN m}^{-2} \text{ d}^{-1}$), superior à taxa de oxidação obtida para o etanol (taxa de $2,2 \text{ gN m}^{-2} \text{ d}^{-1}$).

Nos sete minutos iniciais do teste, 67 mg N L^{-1} foram reduzidos a partir do uso do sulfeto como doador de elétrons (Figura 29), resultando em taxa de redução de NO_3^- de $9,56 \text{ mg N L}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Após este período não houve mais redução de NO_3^- (Figura 29). Tal fato pode estar relacionado à sensibilidade das bactérias desnitrificantes autotróficas às altas concentrações de sulfeto dissolvido, como reportado por Beristain-Cardoso et al. (2006), Wang et al. (2005) e Lu et al. (2018). Lu et al. (2018) realizaram estudos em bateladas para investigar a toxicidade de sulfetos dissolvidos nos processos de desnitrificação autotrófica e oxidação de sulfeto em condições anóxicas. Estes autores observaram que em concentrações de sulfeto superiores a $200 \text{ mg STD L}^{-1}$, a redução de nitrato foi a etapa limitante no metabolismo autotrófico desnitrificante utilizando sulfeto como doador de elétrons. Em altas concentrações, o sulfeto se combina com os cofatores metálicos envolvidos na redução do nitrato, causando inibição temporária da atividade dos microrganismos desnitrificantes autotróficos (LU et al., 2018). Vale ressaltar que, a concentração de N-NO_2^- ao longo do Teste 3 manteve-se abaixo de 1 mgN L^{-1} , o que implica que não houve inibição adicional causada por nitrito. Tal resultado comprova que o sulfeto foi o único composto responsável pela inibição da redução do nitrato no Teste 3.

A Figura 29 também revela que, apesar da interrupção na redução de nitrato, o sulfeto continuou a ser oxidado até 37 minutos de andamento do Teste 3. A provável explicação para este resultado é que, em condições anóxicas, bactérias oxidadoras de sulfeto podem utilizar reações de transporte de elétrons alternativas, as quais não são afetadas pelo sulfeto, como a cadeia respiratória do fumarato (KELLER et al., 2015). Esta tendência de busca por cadeias transportadoras de elétrons alternativas também foi observada nos experimentos conduzidos por Lu et al. (2018).

Wang et al. (2005) avaliaram o efeito do sulfeto no processo de desnitrificação autotrófica a partir de cultura pura de *Thiobacillus denitrificans*. Tais autores observaram queda crescente na eficiência de oxidação de sulfeto quando a biomassa foi exposta às concentrações de sulfeto de 100, 200, 300 e 400 mgSTD L^{-1} . Eficiência mínima de oxidação de sulfeto (22,9%) foi obtida quando a concentração inicial de sulfeto aplicada foi de 400 mgSTD L^{-1} (WANG et al., 2005). No Teste 3, eficiência média de oxidação de sulfeto de 60% foi alcançada, considerando concentração inicial de 260 mgSTD L^{-1} . Wang et al. (2005)

salientam que a concentração limite de sulfeto, a qual acarreta em redução drástica na eficiência de oxidação de sulfeto, pode ser alterada a partir da adaptação da biomassa à presença de sulfeto dissolvidos.

Outro fator que provavelmente interferiu na atividade das bactérias desnitrificantes autotróficas foi o elevado pH do meio líquido durante o Teste 3. Medições realizadas no início e ao final do teste mostraram que o pH variou entre 10 e 9,54. Isto ocorreu devido a liberação de íons OH^- relacionados à dissolução do $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ no líquido. Bactérias da espécie *Thiobacillus denitrificans* tem atividade ótima na faixa de pH entre 6 e 8 (SCHLEGEL, 1995). Já a atividade dos microrganismos *Thiomicrospira denitrificans* ocorrem a pH próximo a 7 (TAKAI et al., 2006).

Com o objetivo de avaliar a contribuição da atividade desnitrificante heterotrófica o Teste 4 foi realizado, submetendo o sistema LEAI à pulsos iniciais de N-nitrato e ácido acético (relação DQO/N inicial de 15), em condições anóxicas (Tabela 9). Os perfis de consumos de ambos compostos são apresentados na Figura 30.

Figura 30 – Perfis temporais das concentrações de DQO e N-nitrato no Teste 4, sob condições anóxicas.

Fonte: A Autora

Ao final do Teste 4 (300 minutos) foi observada remoção de 15,6 mg N L⁻¹ de N-nitrato e de 288 mg DQO L⁻¹ (Figura 30), resultando em taxa de redução de NO_3^- de 0,05 mg N L⁻¹ min⁻¹. Comparando-se as taxas de redução de NO_3^- obtidas nos Teste 3 e 4 foi possível

notar que, apesar da detecção de atividade heterotrófica desnitrificante, o sulfeto mostrou-se maior potencial de ser utilizado como doador de elétrons na redução de nitrato no reator. Este resultado é similar ao retratado em trabalhos anteriores. Furumai, Tagui e Fujita (1996) e Reyes-Avila, Razo-Flores e Gomez (2004) observaram que a velocidade de conversão de NO_3^- a NO_2^- é mais rápida na via da desnitrificação autotrófica do que na desnitrificação heterotrófica. Ao contrário, a taxa de conversão de NO_2^- a N_2 é mais rápida considerando a via da desnitrificação heterotrófica. Tal resultado confirma o adequado estabelecimento da comunidade desnitrificantes autotrófica no biofilme mixotrófico desenvolvido no reator LEAI.

O Teste 5 foi realizado com objetivo de avaliar o processo de remoção biológica e/ou química do sulfeto no reator LEAI na fase aerada do ciclo de aeração intermitente. Para tanto o temporizador conectado ao compressor de ar foi ajustado para funcionar continuamente e o teste só foi iniciado quando a concentração de STD no meio líquido do reator LEAI era zero. O pulso com solução de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ resultou em concentração inicial de sulfeto de 78 mg STD L^{-1} e elevou o pH do meio líquido para 9,3. Ao final do teste (duração de 20 minutos), a concentração residual de sulfeto foi de $4,3 \text{ mg STD L}^{-1}$.

Trabalhos desenvolvidos por Janssen et al. (1995;1997) mostraram que a oxidação do sulfeto a S^0 ocorre quando a concentração de OD no meio líquido é inferior a $0,1 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$, caracterizado como condições de microaeração. Como a concentração de OD no Teste 5 foi de $5,0 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$, inferiu-se que a reação de oxidação completa do sulfeto a sulfato (Equação 28) foi principal rota responsável pela remoção do sulfeto do meio líquido durante as fases aeradas. Como não é possível experimentalmente mensurar a fração de STD arrastada para o meio gasoso devido à aeração, a estimativa das percentagens de sulfeto perdida por *stripping* e aerobiamente oxidada foram realizadas a partir do balanço do sulfato no Teste 5 (Tabela 33).

Tabela 33- Estimativa das frações de sulfeto envolvidas na oxidação aeróbia a sulfato e arrastada do meio líquido a partir do *stripping* com O₂ (Teste 5).

Variáveis	Teste 5
pH inicial	9,3
pH final	9,1
Sulfeto removido (mg STD L ⁻¹)	73
Sulfato observado ao final do teste (mg SO ₄ ²⁻ L ⁻¹)	148
Sulfato calculado pela estequiometria da reação de oxidação do sulfeto (mg SO ₄ ²⁻ L ⁻¹)	220
Diferença entre concentrações de sulfato observada e teórica (mg SO ₄ ²⁻ L ⁻¹)	72
Perda de sulfeto por stripping com O ₂ (%)	31
Sulfeto oxidado a sulfato (%)	69

Fonte: A Autora

Observou-se que a concentração de sulfato detectada ao final do experimento (148 mgSO₄²⁻ L⁻¹) foi inferior à concentração teórica de 220 mgSO₄²⁻ L⁻¹, calculada a partir da oxidação do sulfeto inicialmente presente no meio. Assim, a diferença entre estas concentrações de sulfato (considerando que 1 mol de sulfeto oxidado produz 1 mol de sulfato) representa a porção de sulfeto que foi arrastado do meio líquido. Logo, obteve-se as percentagens médias de sulfeto oxidado biologicamente e arrastado por stripping de 69 e 31%, respectivamente (Tabela 33).

5.1.4 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Os exames de microscopia eletrônica de varredura apresentados neste item foram realizados a partir de amostras de biofilme coletadas ao final do período de operação do reator anaeróbio. Assim, buscou-se correlacionar o desenvolvimento da biomassa aderida em diferentes porções do meio suporte com os resultados físico-químicos obtidos. A Figura 31 evidencia a colonização microbiana na espuma retirada de RAn, comparando-a com a espuma nova (sem colonização).

Figura 31 – Comparação entre colonização microbiana na espuma de poliuretano: espuma nova (A), espuma ao final da operação do reator anaeróbio (B).

Fonte: A Autora

Amostras de espuma (corte em uma das hastes, na altura entre 30 e 40 cm) foram retiradas do reator RAn para a investigação das principais morfologias e arranjos presentes no biofilme estabelecido em RAn. Na Figura 32A observa-se a presença de bacilos alongados e com extremidades retas, os quais assemelham-se às arqueas metanogênicas do gênero *Methanosaeta*. Morfologia de cocos semelhante a organismos do gênero *Methanosarcina* também foi identificada (Figura 32C). *Methanosaeta* e *Methanosarcina* são comumente encontradas em sistemas de tratamento anaeróbio e são responsáveis, conjuntamente, pelo uso do acetato como substrato na metanogênese (SMITH; INGRAM-SMITH, 2007). Bacilos com formato encurvado semelhantes a bactérias redutoras de sulfato também foram identificados, conforme visualizado na Figura 32B. Tais morfologias também foram observadas em análises microscópicas de biofilmes estabelecidos nos estudos desenvolvidos por Araújo Júnior (2006) e Cubas (2004).

Figura 32 - Imagens da microscopia eletrônica de varredura de amostras coletadas ao final da operação do reator anaeróbio: bacilos alongados e com extremidades retas semelhantes a *Methanosaeta* (A); bacilos curvos (B); cocos (C) e bacilos em filamentos (D).

Fonte: A Autora

Durante o procedimento de coleta de frações de espuma para análise de MEV, observou-se acúmulo de S^0 (material esbranquiçado) nas porções superiores das hastes de espuma e também nas paredes do reator (região do *headspace*), como retratado na Figura 33A. Assim, uma amostra foi utilizada para análise em MEV (Figura 33B).

Figura 33 – Acúmulo de enxofre elementar nas paredes do reator anaeróbio e no material suporte (A); corte de espuma para análise de MEV (B).

Fonte: A Autora

Figura 34 - Imagens da microscopia eletrônica de varredura de amostras coletadas ao final da operação do reator anaeróbio: vista da parte superior, evidenciando o acúmulo de enxofre elementar (A); bacilos curvos (B).

Fonte: A Autora

A Figura 34 mostra a vista da superfície da espuma, na qual pode-se notar o acúmulo do enxofre elementar como uma camada recobrendo os microrganismos aderidos ao meio suporte. Interessante observar, a partir de zoom (Figura 34B), a existência de orifícios sobre

esta camada, indicando provavelmente, os caminhos de escape do biogás produzido pelo metabolismo anaeróbico (CH_4 , H_2S , N_2 e outros) para o *headspace* do reator.

5.1.5 SÍNTESE DOS RESULTADOS DA ETAPA 1

O objetivo da Etapa Experimental 1 foi avaliar o desempenho do reator de leito estruturado submetido à aeração intermitente (LEAI) na remoção de nitrogênio de efluente pré-tratado em sistema anaeróbico (RAn), via processo NDS e desnitrificação autotrófica utilizando sulfeto como doador de elétrons. Para isso, as duas unidades de tratamento foram operadas em série e o reator LEAI foi alimentado continuamente com sulfeto (doador de elétrons), como mostrado na Figura 5.

O período total de operação dessa configuração foi de 424 dias. Neste período, os 296 dias iniciais foram subdivididos em quatro condições experimentais distintas, como apresentado no fluxograma da Figura 3 (item 4.1). Além disso, o reator LEAI foi operado sob ciclo de aeração intermitente (2 h aeradas e 1 h sem aeração). Diferentes cargas de matéria orgânica e sulfato foram testadas, mantendo-se a relação DQO/sulfato próxima a 2. Assim que o processo de redução do sulfato a sulfeto atingiu estabilidade e alta eficiência, o reator LEAI teve sua operação iniciada. A síntese das características iniciais da água residuária sintética e dos principais resultados obtidos na operação dos reatores anaeróbico e LEAI está apresentada nas Tabelas 34, 35 e 36.

Tabela 34 – Caracterização afluyente da água residuária tratada no reator anaeróbio na Etapa Experimental 1.

Variáveis	Condições Experimentais			
	I	II	III (a e b)	IV
Período operacional (dias)	1 - 37	38 - 80	81 – 167 (a) 16 – 201 (b)	202 - 29
DQO (mg L ⁻¹)	842 ± 32	1021 ± 35	1885 ± 51,4	1911 ± 122,4
N-NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹)	71,5 ± 5,1	72 ± 4,8	72 ± 5,1	144 ± 6,8
SO ₄ ²⁻ (mg L ⁻¹)	431 ± 43,3	480 ± 16	858 ± 28,9	854 ± 33,7
pH	7,9 ± 0,1	8,0 ± 0,02	7,9 ± 0,2	7,8 ± 0,2
Alcalinidade total (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	608 ± 27	647 ± 33	1424 ± 48	1655 ± 29
SSV (mg L ⁻¹)	11 ± 5	9 ± 4	11 ± 5	11 ± 6
Relação DQO/sulfato	1,95 ± 0,12	2,11 ± 0,18	2,19 ± 0,15	2,18 ± 0,17

Fonte: A Autora

Este trabalho compreendeu, primeiramente, a operação de RAn até o adequado estabelecimento da sulfetogênese (167 dias de operação). Tal constatação foi realizada pela comparação da produção teórica de sulfeto a partir da redução de sulfato com as concentrações de sulfetos totais dissolvidos detectadas no efluente deste sistema. Assim, na Condição III, foi observado que cerca de 90% da produção teórica de sulfeto era mantida na fração líquida do efluente (como H₂S e HS⁻) (Tabela 35). O fluxo de elétrons relacionados à oxidação de matéria orgânica pelos processos de metanogênese e sulfetogênese também indicou a crescente participação do metabolismo BRS na metabolização de DQO ao longo do tempo. A presença de microrganismos com morfologias semelhantes aos microrganismos responsáveis por tais metabolismos foi observada na análise de microscopia eletrônica de varredura. A partir desses resultados iniciou-se a operação do reator LEAI.

Tabela 35 – Características do efluente gerado pelo reator anaeróbio, o qual foi usado como afluente do reator LEAI na Etapa Experimental 1.

Variáveis	Condições Experimentais			
	I	II	III (a e b)	IV
Período operacional (dias)	1 - 37	38 - 80	81 - 201	202 - 296
DQO (mg L ⁻¹)	52 ± 25,8	93 ± 12,5	92 ± 8,8	131 ± 27,4
N-NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹)	66 ± 4,5	68 ± 4,1	64 ± 4,6	135 ± 8,6
SO ₄ ²⁻ (mg L ⁻¹)	213 ± 31,3	155 ± 19,1	122 ± 40,4	50 ± 26,2
STD (mgSTD L ⁻¹)	71 ± 3	90 ± 5	220 ± 18	231 ± 25
HS ⁻ (mg L ⁻¹)	48 ± 9	58 ± 9	154 ± 18	158 ± 24
H ₂ S (mg L ⁻¹)	19 ± 4	31 ± 6	66 ± 12	75 ± 14
pH	7,3 ± 0,1	7,2 ± 0,2	7,3 ± 0,1	7,2 ± 0,1
Alcalinidade parcial (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	567 ± 31	653 ± 58	1413 ± 110	1527 ± 60
Ácidos orgânicos voláteis (mgDQO L ⁻¹)	59 ± 6,5	28 ± 3,4	63 ± 15,5	75 ± 8
SSV (mg L ⁻¹)	86 ± 7	74 ± 18	79 ± 18	79 ± 31
Eficiência de redução de SO ₄ ²⁻ (%)	49 ± 6,6	68 ± 2,5	85 ± 4,4	94 ± 2,9
Eficiência de remoção de DQO (%)	93 ± 3,0	93 ± 1,0	91 ± 1,0	92 ± 5,2

Fonte: A Autora

A presença de sulfetos dissolvidos no efluente produzido pelo reator anaeróbio inibiu parcialmente a atividade das bactérias nitrificantes no LEAI, mesmo quando maior carga nitrogenada afluente foi aplicada (Condição IV) (Tabela 36). Essa hipótese foi reforçada pelo teste estatístico, no qual não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as eficiências de nitrificação nas duas condições operacionais. A inibição causada pelo sulfeto resultou em eficiência de oxidação de N-NH₄⁺ de 60 ± 12% na Condição IV (Tabela 36). O monitoramento do POR ao longo do ciclo de aeração intermitente mostrou que a variação do potencial redox se manteve abaixo da faixa ótima reportada na literatura para a ocorrência concomitante dos processos de nitrificação e desnitrificação.

Tabela 36 – Características do efluente, eficiências de remoção e cargas nitrogenadas metabolizadas no reator LEAI nas Condições III e IV da Etapa Experimental 1.

Variáveis	Condições Experimentais	
	IIIb	IV
Período operacional (dias)	168 - 201	202 - 296
DQO (mg L ⁻¹)	-	-
N-NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹)	27 ± 8,6	54,6 ± 17,7
N-NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	0,1 ± 0,2	2,7 ± 1,9
N-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	2,4 ± 1,0	3,8 ± 3,4
SO ₄ ²⁻ (mg L ⁻¹)	454 ± 44,5	434 ± 27,3
STD (mg L ⁻¹)	-	-
pH	8,0 ± 0,4	8,1 ± 0,3
Alcalinidade total (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	997 ± 45	741 ± 200
SSV (mg L ⁻¹)	40±5	48±21
Eficiência de oxidação de N-NH ₄ ⁺ (%)	57 ± 14,1	60 ± 12
Eficiência de remoção de N-total (%)	54 ± 14,6	55 ± 10,8
Eficiência de desnitrificação (%)	93 ± 3,8	92 ± 4,5
Carga de amônia oxidada (kg N m ⁻³ dia ⁻¹)	0,047±0,012	0,103±0,020
Carga de N-total removido (kg N m ⁻³ dia ⁻¹)	0,044±0,012	0,095±0,018

(-) Valores abaixo do limite de detecção.

Fonte: A Autora

A partir de testes de perfil temporal de concentrações realizados em condições anóxicas e visando a redução de NO₃⁻ a partir de doadores de elétrons inorgânico (sulfeto) e orgânico (ácido acético) comprovou-se o potencial dos metabolismos desnitrificantes autotrófico e heterotrófico da biomassa estabelecida do reator LEAI. Entretanto, a taxa de redução de NO₃⁻ quando sulfeto foi utilizado como doador de elétrons (9,56 mgN L⁻¹ min⁻¹) foi muito superior à taxa de redução obtida com o doador de elétrons orgânico (0,05 mgN L⁻¹ min⁻¹). No teste específico para investigação da desnitrificação autotrófica observou-se efeito tóxico do sulfeto (260 mg STD L⁻¹) ao metabolismo das bactérias desnitrificantes autotróficas. Tal fato pode ter sido potencializado pelo pH elevado (variou entre 10 e 9,54) no meio líquido após a adição da fonte de sulfeto (sulfeto de sódio nonahidratado).

Portanto, ressalta-se que os resultados obtidos nesta fase permitem confirmar as sub-hipóteses 1 e 2 elencadas inicialmente: **“a adoção de relação DQO/sulfato de**

aproximadamente 2 permite o adequado estabelecimento da sulfetogênese no reator anaeróbio, a qual associada à metanogênese, acarreta a geração de sulfeto em concentrações compatíveis à demanda exigida pela desnitrificação autotrófica no reator NDS” e “a aplicação de reator de leito estruturado submetido à aeração intermitente (LEAI) como unidade única de pós-tratamento do efluente obtido em sistema anaeróbio permite a remoção de nitrogênio pelos processos simultâneos de nitrificação e desnitrificação autotrófica a partir do sulfeto”.

Verificou-se que a metabolização parcial do nitrogênio amoniacal presente na água residuária a partir do processo combinado de nitrificação e desnitrificação autotrófica foi causada pela limitação da nitrificação, a qual foi relacionada à contínua presença de sulfeto no efluente pré-tratado. O sulfeto dissolvido foi efetivamente utilizado como doador de elétrons na desnitrificação autotrófica no reator LEAI, resultando em carga máxima de N-total removida de $0,095 \pm 0,018 \text{ kgN m}^{-3}\text{d}^{-1}$ (Tabela 35). Essa carga removida é compatível aquela alcançada por Lu et al. (2012) ($0,096 \text{ kgN m}^{-3}\text{d}^{-1}$) operando sistema SANI em escala piloto aplicado ao tratamento de esgoto salino na cidade de Hong Kong (China). Como o sistema SANI consiste de três reatores operando em série (reator anaeróbio, reator anóxico para ocorrência da desnitrificação autotrófica e reator aeróbio para nitrificação), destaca-se a importância tecnológica do presente trabalho na remoção das frações nitrogenada e sulfurosa de efluente rico em sulfato em duas unidades de tratamento sequenciais.

Os resultados obtidos nesta etapa experimental foram sintetizados no artigo “Dynamics of the nitrification and sulfide-driven autotrophic denitrification processes in a single reactor using oxidation-reduction potential as an indicator of the process effectiveness”(SANTOS et al., 2018).

5.2 ETAPA EXPERIMENTAL 2: CARACTERÍSTICAS GERAIS

Neste item são apresentados os resultados observados ao longo da Etapa Experimental 2. Nesta Etapa, o reator anaeróbio foi desligado e o reator LEAI passou a ser operado de maneira independente, com água residuária sintética simulando as características do efluente pré-tratado na unidade anaeróbia na Condição I da Etapa 1. Nesse sentido, solução estoque concentrada de ácido acético e etanol (DQO média de 52 mg L^{-1}) foi preparada e utilizada como fonte de matéria orgânica residual, já que estes foram principais subprodutos do reator anaeróbio na Condição I da Etapa 1. A caracterização da água residuária sintética adotada na Etapa 2 foi apresentada na Tabela 10 (item 4.3.2).

Como o reator LEAI já havia sido submetido a condições extremas para a execução dos perfis temporais da Etapa 1, antes de iniciar o período operacional previsto na Etapa 2, o sistema recebeu uma mistura de lodo Dacar e lodo rico em biomassa desnitrificante autotrófica (GUERRERO; ZAIAT, 2018). Tal adição visou o melhor estabelecimento da comunidade desnitrificante autotrófica no sistema, visto a limitação/toxicidade do sulfeto a este grupo microbiano observado no teste de desnitrificação autotrófica da Etapa 1 (Figura 29). Após a recirculação do lodo no sistema, o reator foi drenado para retirada do excesso de biomassa e verificou-se redução no volume útil do mesmo de 9,6 para 8,9 L. Tal fato deve-se provavelmente ao crescimento da biomassa desde a inoculação do sistema e a colmatção do leito.

Na Etapa 2, o reator LEAI foi operado com ciclo de aeração intermitente de 3 h, sendo 1 h com aeração e 2 h sem aeração. Além disso, manteve-se a vazão de recirculação de efluente cinco vezes superior à vazão de alimentação e o sulfeto passou a ser adicionado nas fases não-aeradas do ciclo de aeração, a partir de solução concentrada de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$. Duas estratégias de dosagem de sulfeto foram testadas (Estratégias I e II) e subdivididas de acordo com a concentração final de STD envolvida, mantendo-se a carga nitrogenada afluente média de $0,146 \pm 0,008 \text{ kg N m}^{-3}\text{d}^{-1}$. As concentrações de sulfeto testadas em cada estratégia operacional foram apresentadas na Tabela 11.

Na Estratégia I, os volumes de solução de sulfeto necessários para resultar nas concentrações finais de STD pretendidas foram adicionados como pulsos com duração de 15 minutos. Já na Estratégia II, os volumes de solução de sulfeto associados às concentrações finais de STD foram adicionados de maneira contínua ao longo dos 90 minutos restantes de cada fase não-aerada do ciclo de aeração intermitente. Nesta Etapa Experimental o reator

LEAI foi operado por 143 dias, nos quais 115 foram dedicados ao monitoramento físico-químico das estratégias testadas. Nos 28 dias finais, os testes de perfis temporais descritos no item 4.3.4 foram realizados. As características de cada uma das condições estudadas e os resultados analíticos estão apresentados nos itens subsequentes.

O monitoramento do TDH ao longo da Etapa Experimental 2 foi realizado durante a coleta das amostras efluentes e o controle da vazão foi feito por ajustes na rotação da bomba de alimentação. As vazões e TDH médios para cada uma das condições experimentais da Etapa 2 estão listados na Tabela 37.

Tabela 37 - Vazão e TDH médios em cada uma das estratégias operacionais testadas na Etapa 2.

Estratégia	Adição de sulfeto	Período operacional (dias)	Vazão (L h⁻¹)	TDH (h)
I	Pulso único (15 min)	1-59	0,74±0,01	12,1±0,1
II	Adição contínua (90 minutos)	60-115	0,74±0,01	12,2±0,2

Fonte: A Autora

Ao final da operação, amostras de biomassa aderida ao meio suporte do reator LEAI foram coletadas para análise de MEV e sequenciamento genético massivo (Illumina Ion Torrent).

5.2.1 MONITORAMENTO DO REATOR LEAI

5.2.1.1 REMOÇÃO DE NITROGÊNIO: EFICIÊNCIAS DE OXIDAÇÃO DE AMÔNIA, DESNITRIFICAÇÃO E REMOÇÃO DE N-TOTAL

Considerando que a composição da água residuária utilizada para alimentação do sistema LEAI baseou-se na caracterização do efluente obtido no reator anaeróbio na Condição I da Etapa 1 (Tabela 10), a baixa relação C/N também foi um fator marcante nesta etapa experimental. O valor médio deste parâmetro foi de $0,73 \pm 0,07$ na Etapa 2.

Vale ressaltar que será observado nos gráficos, deste ponto em diante, um intervalo de seis dias, nos quais não houve monitoramento físico-químico do desempenho do reator LEAI, entre o final da operação da Estratégia I e o início da operação da Estratégia II. Neste período o reator foi alimentado continuamente com o efluente sintético (Tabela 10) e o aporte de

sulfeto foi suspenso, possibilitando a recuperação da atividade da biomassa nitrificante. Além disso, tal intervalo foi utilizado para executar ajustes operacionais na bomba de dosagem de sulfeto. As Tabelas 38 e 39 mostram os valores médios das concentrações afluente e efluente de N-amoniaco, N-nitrito, N-nitrato, N-total, STD, sulfato e DQO nas condições testadas durante as Estratégias 1 e 2, respectivamente. As eficiências de oxidação de N-NH₄⁺, desnitrificação e remoção de N-total referentes à cada condição também são apresentadas.

Tabela 38 - Concentrações dos compostos nitrogenados, STD, sulfato e DQO e eficiências médias de oxidação de NH₄⁺, desnitrificação e remoção de N-total na Estratégia I.

Variáveis		Condições Experimentais			
		IA	IB	IC	ID
AFLUENTE	Período (dias)	1-14	15-24	25-53	54-59
	STD (mg L ⁻¹)	38±0,1	53±0,1	22±0,3	39±0,1
	N-NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹)	74,5±3,3	73,7±6,1	74,0±2,2	73,2±3,5
	DQO (mg L ⁻¹)	55±2,4	52±3,2	52±1,5	51±2,8
EFLUENTE	N-NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹)	26,4±10,6	35,8±5,8	26,4±10,1	38,7±6,4
	N-NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	16,9±4,6	6,0±10,2	29,8±11,4	6,9±6,7
	N-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	3,4±6,0	1,3±2,5	1,2±3,0	1,7±0,9
	N-total (mg L ⁻¹)	46,8±3,6	42,8±8,3	51,0±18,1	47,3±2,8
	STD (mg L ⁻¹)	-	-	-	-
	SO ₄ ²⁻ (mg L ⁻¹)	94±4,7	143±12,7	69±30,5	114±8,5
	DQO (mg L ⁻¹)	-	-	-	-
Eficiência de oxidação de N-NH ₄ ⁺ (%)		65±13,5	55±14,6	67±14,8	46±12,4
Eficiência de desnitrificação (%)		59±12,0	76±30,7	37±22,2	77±10,7
Eficiência de remoção de N-total (%)		37±3,4	38±11,1	22±3,0	35±8,2

(-) Valores abaixo do limite de detecção.

Fonte: A Autora

Tabela 39 - Concentrações dos compostos nitrogenados, STD, sulfato e DQO e eficiências médias de oxidação de NH_4^+ , desnitrificação e remoção de N-total na Estratégia II.

Variáveis		Condições Experimentais			
		IIA	IIB	IIC	IID
AFLUENTE	Período (dias)	66-85	86-100	101-107	108-115
	STD (mg L^{-1})	50±0,1	61±0,1	42±0,3	55±0,1
	N- NH_4^+ (mg L^{-1})	74,8±2,0	74,6±3,8	71,6±4,4	73,2±1,2
	DQO (mg L^{-1})	54±3,3	54±2,9	54±4,1	54±3,9
EFFLUENTE	N- NH_4^+ (mg L^{-1})	28,1±4,4	25,2±3,9	20,8±6,9	29,7±6,6
	N- NO_2^- (mg L^{-1})	12,7±3,9	5,4±6,7	15,4±4,0	8,3±7,9
	N- NO_3^- (mg L^{-1})	3,3±3,0	4,0±1,9	5,2±1,1	6,1±3,4
	N-total (mg L^{-1})	44,1±4,8	34,6±8,0	41,5±7,2	44,1±3,9
	STD (mg L^{-1})	-	-	-	-
	SO_4^{2-} (mg L^{-1})	138±11,5	161±9,2	126±12,2	14±6,0
	DQO (mg L^{-1})	-	-	-	-
Eficiência de oxidação de N- NH_4^+ (%)		62±5,9	66±5,1	71±8,0	59±8,5
Eficiência de desnitrificação (%)		66±10,5	72±13,1	59±7,9	69±18,7
Eficiência de remoção de N-total (%)		41±5,0	54±10,2	42±8,4	40±6,2

(-) Valores abaixo do limite de detecção.

Fonte: A Autora

A partir dos dados expostos nas Tabelas 38 e 39, diferentemente do que foi observado na Etapa Experimental 1, a remoção de N-total na Etapa 2 foi limitada pelo processo de desnitrificação, uma vez que nitrito e nitrato foram detectados no efluente final nas duas

estratégias testadas. Tal fato está relacionado ao aporte limitado de sulfeto ao sistema, que visou reduzir o efeito tóxico deste composto à comunidade nitrificante. Além disso, é interessante ressaltar que, nas situações em que maior concentração de sulfetos dissolvidos foram oferecidas (Condições IB, IIB e IID), as concentrações efluentes de nitrito e nitrato foram reduzidas (Tabelas 38 e 39). Em tais condições também houve maior formação de sulfato, que está relacionado à maior atividade dos microrganismos desnitrificantes autotróficos que utilizam sulfeto como doador de elétrons. Moraes, Orrú e Foresti (2013) também observaram decréscimo nas concentrações efluentes de nitrito e nitrato quando submeteram um reator de bateladas sequenciais operado sob aeração intermitente à de sulfeto compatível à concentração de aceptores de elétrons presentes no meio líquido. Tais autores também adicionavam o sulfeto nas etapas não-aeradas do ciclo.

Para iniciar a avaliação dos efeitos das duas estratégias de adição de sulfeto sob o processo de nitrificação, apresentam-se a variação da concentração de N-NH_4^+ nas amostras afluente, efluente e a eficiência de oxidação de N-NH_4^+ ao longo de todo o período experimental (Figura 35). A Figura 36 confronta o perfil da eficiência de oxidação de N-NH_4^+ com a variação na concentração de sulfetos dissolvidos. Vale ressaltar que no 29º dia de operação, uma falha no ajuste da vazão da bomba dosadora de sulfeto ocasionou um pico de sulfeto (48 mg STD L^{-1}), resultando em queda da eficiência de nitrificação de 65% para 30%. Após este episódio o aporte de sulfeto foi normalizado (concentração média de 22 mgSTD L^{-1}) e observou-se a recuperação da eficiência de oxidação de N-NH_4^+ (Figura 36).

Figura 35 - Concentrações afluente e efluente de N-NH_4^+ e sua eficiência de oxidação na Etapa Experimental 2.

Fonte: A Autora

Figura 36 - Perfil temporal da concentração de sulfetos dissolvidos presente no efluente e da eficiência de nitrificação alcançada no reator LEAI na Etapa Experimental 2.

Fonte: A Autora

De maneira geral, assim como observado na Etapa Experimental 1, as mudanças na concentração de sulfetos dissolvidos (em termos de mg STD L^{-1}) impactaram na eficiência de

oxidação de N-NH_4^+ . As Figuras 35 e 36 indicam que, apesar de não ter sido limitante para remoção de N-total, a nitrificação foi instável, principalmente durante a Estratégia I, na qual sulfeto era adicionado de maneira mais concentrada após os 30 minutos iniciais da etapa não-aerada. Ou seja, mesmo com a adição da solução de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ acompanhando a intermitência no aporte de oxigênio, o sulfeto continuou afetando a nitrificação. Isto se dá pelo fato de que o processo NDS ocorre a partir de estratificação do biofilme, ou seja, concomitantemente processos aeróbios e anaeróbios/anóxicos estão ocorrendo em porções distintas do biofilme. Tal fato também foi relatado no estudo de Sears et al. (2004). Estes autores observaram redução de 72% na atividade das BOA ao expor uma cultura pura de microrganismos nitrificantes (biomassa suspensa) à concentração de 5 mgSTD L^{-1} e sem provimento de aeração.

Gráficos *boxplot* retratando as eficiências globais de nitrificação, desnitrificação e remoção de N-total nas duas estratégias de adição de sulfeto são apresentados nas Figuras 37 e 38.

Figura 37 - *Boxplot* das eficiências de oxidação de amônia no reator LEAI em cada estratégia testada na Etapa Experimental 2.

Fonte: A Autora

Figura 38 – Boxplot das eficiências de desnitrificação e remoção de N-total no reator LEAI nas duas estratégias avaliadas na Etapa 2.

Fonte: A Autora

A análise dos diagramas *boxplot* das eficiências de oxidação de N-NH_4^+ na Etapa 2 (Figura 37) mostra claramente que na Estratégia II, o processo de nitrificação apresentou maior eficiência média ($65 \pm 7,8\%$) e estabilidade quando comparado ao desempenho obtido na Estratégia I ($59 \pm 14,7\%$).

Além da representação em *Box-plot*, foi utilizado o software *BioEstat* para a avaliação da normalidade e existência de diferença estatística entre as eficiências de oxidação de N-NH_4^+ , desnitrificação e remoção de N-total nas duas estratégias de adição da solução concentrada de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$. Primeiramente, verificou-se a normalidade dos dados pelo *Teste de Lilliefors* ($\alpha = 0,05$). Em seguida, aplicou-se os testes paramétricos *ANOVA: um critério* e *Teste de Tukey* ($\alpha = 0,05$), cujos resultados finais estão disponíveis no Apêndice A – Testes Estatísticos. A Tabela 40 apresenta as eficiências médias de oxidação de N-NH_4^+ , desnitrificação e remoção de N-total e as cargas nitrogenadas oxidada e removida. Nesta tabela, as eficiências médias (%) seguidas por coeficientes diferentes indicam diferença estatística significativa entre os dados.

Tabela 40 - Valores médios das eficiências dos processos e cargas aplicadas e removidas na Etapa Experimental 2.

Variáveis	Estratégia I	Estratégia II
Eficiência de Nitrificação (%)	59±14,7 ^A	65±7,8 ^a
Eficiência de Desnitrificação (%)	61±26,6 ^B	69±13,5 ^B
Eficiência de Remoção N-total (%)	32±9,7 ^C	47±9,9 ^c
Carga nitrogenada aplicada (kgN m ⁻³ d ⁻¹)	0,146±0,008	0,146±0,007
Carga N-NH ₄ ⁺ oxidado (kgN m ⁻³ d ⁻¹)	0,086±0,022	0,095±0,011
Carga N-total removido (kgN m ⁻³ d ⁻¹)	0,047±0,015	0,065±0,015

A: coeficiente estatístico para nitrificação; B: coeficiente estatístico para desnitrificação; C: coeficiente estatístico para remoção de N-total.

Fonte: A Autora

A análise estatística das eficiências de nitrificação e remoção de N-total (Tabela 40) revelou diferença significativa entre os desempenhos observados nas duas estratégias de adição do sulfeto durante as etapas não-aeradas do ciclo de aeração, uma vez que os valores de p-valor foram inferiores a 0,05 (Tabelas A3 e A5). Assim, é possível inferir que a adição de sulfeto de maneira mais diluída ao longo do tempo (Estratégia II) teve efeitos menos agressivos na fase subsequente (etapa aerada), refletindo em maior estabilidade e maior eficiência média ao processo de oxidação de N-NH₄⁺ (Tabela 40, Figura 37). Outro resultado interessante que pode ser derivado dos resultados do teste estatístico foi que, quando sulfeto foi continuamente adicionado ao longo de 90 minutos (Estratégia II), maior eficiência de remoção de N-total foi obtida, resultando em diferença estatisticamente significativa, com relação ao desempenho obtido na Estratégia I (Tabela 40, Figura 38). Esta diferença na remoção de N-total pode estar associada ao aumento da disponibilidade do sulfeto para ser usado como doador de elétrons pela comunidade desnitrificante autotrófica nos períodos anóxicos da Estratégia II. Assim, na Estratégia II maiores cargas de N-NH₄⁺ oxidado e N-total removido foram alcançadas, quando comparado ao desempenho obtido com a Estratégia I (Tabela 40). O único processo que não apresentou diferença estatisticamente significativa, comparando-se os desempenhos alcançados nas Estratégias I e II, foi a desnitrificação (Tabela 40). Isto foi constatado porque p-valor obtido (0,1638) foi superior à 0,05 (Tabela A4).

Assim como discutido na Etapa 1, a matéria orgânica presente na água residuária tratada (Tabelas 38 e 39) pode ter sido metabolizada de duas maneiras diferentes: (i) oxidação aeróbia à CO₂ na fase aerada do ciclo de aeração intermitente e (ii) usada como doador de

elétrons na desnitrificação heterotrófica durante as etapas não-aeradas do ciclo. Como o acetato foi o principal ácido orgânico volátil utilizado como fonte de carbono na Etapa 2, uma estimativa da DQO requerida teoricamente para desnitrificação heterotrófica do N-NH_4^+ oxidado nas Estratégias I e II foi realizada e os resultados são apresentados na Tabela 41.

Nesta estimativa considerou-se o fator de equivalência oxigênio/nitrato de 4,3 mg DQO mg^{-1} N-NO_3^- , obtido a partir da Equação 28 (TCHOBANOGLIOUS; BURTON; STENSEL, 2003). Como as concentrações de sulfeto aplicadas nas Estratégias I e II variaram entre 22-53 e 42-61 mgSTD L^{-1} , respectivamente, a análise da DQO requerida para o processo de desnitrificação heterotrófica foi realizada para cada sub-condição de cada estratégia.

Tabela 41 - Cálculos estequiométricos de demanda por elétrons para desnitrificação heterotrófica nas condições testadas na Etapa 2.

	Condição	N-total removido (mgN L^{-1})	DQO requerida na desnitrificação heterotrófica (mg L^{-1})	DQO afluyente (mg L^{-1})
ESTRATÉGIA I	IA	27,7	98,7 $\pm$ 19,7	54,7 $\pm$ 2,4
	IB	30,9	86,8 $\pm$ 17,1	52,4 $\pm$ 3,2
	IC	23,1	47,3 $\pm$ 7,5	52,0 $\pm$ 1,5
	ID	25,9	73,9 $\pm$ 21,6	51,0 $\pm$ 2,8
ESTRATÉGIA II	IIA	30,7	87,4 $\pm$ 9,0	53,9 $\pm$ 3,3
	IIB	40,0	113,9 $\pm$ 23,6	54,4 $\pm$ 2,9
	IIC	30,1	85,8 $\pm$ 18,0	53,8 $\pm$ 4,1
	IID	29,1	82,8 $\pm$ 14,5	54,4 $\pm$ 3,9

Fonte: A Autora

Observando os resultados dos cálculos estequiométricos da Tabela 41 nota-se o déficit de doador de elétrons para desnitrificação heterotrófica em praticamente todas as condições. Tal fato sinaliza o efetivo uso o sulfeto, presente no efluente do RAn, como doador de elétrons na redução do nitrato, como será discutido na sequência. Apenas na Condição IC é que a DQO afluyente (55 mg L^{-1}) seria teoricamente suficiente para garantir a demanda de doador de elétrons orgânico exigida para a redução de NO_3^- (47 mg N L^{-1}).

A Figura 39 retrata a variação no potencial de óxido-redução (POR) ao longo do ciclo de aeração completos (1 hora com aeração e 2 horas sem aeração) na Estratégia II.

Figura 39 - Perfil do potencial de óxido-redução durante ciclos de aeração intermitente na Estratégia II.

Fonte: A Autora

Assim como ocorreu na Etapa Experimental 1 (Figura 25), detectou-se queda no valor de POR quando a aeração foi interrompida (período off), indicando o estabelecimento de ambiente anóxico/anaeróbico (Figura 39). Como já mencionado, tal situação evidencia o uso do NO_3^- comoceptor final de elétrons pelos microrganismos oxidadores de sulfeto, uma vez que mudanças no valor de POR em condições anóxicas estão associadas ao consumo de compostos reduzidos presentes no meio líquido (LI; BISHOP, 2004).

Todavia, diferentemente do que ocorreu na fase aerada do perfil POR obtido na Etapa Experimental 1 (Figura 25), o patamar de POR positivo foi atingido (valor máximo de +22 mV) (Figura 38). Na Etapa 1, o reator LEAI foi continuamente alimentado com efluente de sistema anaeróbico, o qual continha concentração média de 225 mgSTD L^{-1} . Assim, pode-se inferir que estratégia de adição de sulfeto apenas nas etapas não-aeradas foi mais efetiva para garantir ambiente mais oxidado para a nitrificação (etapa aerada), quando comparado à situação na qual sulfeto era continuamente encaminhado ao reator LEAI (Figura 25). Além disso, o perfil POR retratado na Figura 39 indica a efetiva atuação do sulfeto como doador de elétrons na Etapa Experimental 2, relacionada à atividade da comunidade desnitrificante autotrófica presente no biofilme do reator LEAI. Moraes, Orrú e Foresti (2013) observaram variação no perfil do POR ao longo das fases aeradas e não-aeradas em reator RBS aplicado ao tratamento de efluente de reator UASB, no qual sulfeto era bombeado apenas na fase anóxica. Durante as fases aeradas, o valor de POR chegou +200 mV e na fase anóxica, caiu até +45 mV.

Na Tabela 42 apresenta-se o balanço de massa da produção de sulfato a partir da oxidação completa de sulfeto utilizando nitrato como aceptor final de elétrons. Tal balanço foi realizado levando em conta as mesmas considerações mencionadas na Etapa 1 (item 5.1.2.3). As concentrações médias de sulfeto (HS^-) envolvidas no processo de desnitrificação autotrófica foram estimadas a partir das frações de N-total removido em cada condição operacional (Tabela 42) e considerando a relação estequiométrica de 1 mol de HS^- oxidado para cada 1,6 mol de NO_3 reduzido (Equação 6). Cálculos similares foram realizados para estimar a produção de sulfato pela oxidação completa do sulfeto na desnitrificação autotrófica (1 mol de SO_4^{2-} produzido para cada 1 mol de HS^- oxidado, como mostra a Equação 6).

Tabela 42 - Estimativa das frações de sulfato produzido pela oxidação completa de sulfeto com nitrato como aceptor de elétrons.

	Condição	N-total removido (mgN L ⁻¹)	Demanda de sulfeto na desnitrificação autotrófica (mgHS ⁻ L ⁻¹)*	Produção teórica de sulfato pela desnitrificação autotrófica (mgSO ₄ ²⁻ L ⁻¹)
ESTRATÉGIA I	IA	27,7	41	119
	IB	30,9	46	132
	IC	23,1	34	99
	ID	25,9	38	111
ESTRATÉGIA II	IIA	30,7	45	132
	IIB	40,0	59	171
	IIC	30,1	44	129
	IID	29,1	43	125

*os cálculos foram realizados com base no N-nitrato removido, considerando a via autotrófica.

Fonte: A Autora

A Tabela 43 apresenta as concentrações efluentes de sulfato observadas em cada condição e as respectivas frações de sulfeto aplicado (HS^-) e N-total removido em cada condição.

Tabela 43 – Concentrações de sulfeto adicionadas ao reator LEAI, frações de N-total removido e respectivas concentrações de sulfato observadas no efluente em cada condição operacional.

	Condição	HS ⁻ adicionado ao reator (mgHS ⁻ L ⁻¹)	N-total removido (mgN L ⁻¹)	Sulfato efluente observado (mgSO ₄ ²⁻ L ⁻¹)
ESTRATÉGIA I	IA	38	27,7	94
	IB	48	30,9	143
	IC	19	23,1	69
	ID	37	25,9	114
ESTRATÉGIA II	IIA	46	30,7	138
	IIB	56	40,0	161
	IIC	39	30,1	126
	IID	52	29,1	114

Fonte: A Autora

Comparando os resultados das Tabelas 42 e 43, observou-se que para as Condições IA, IC, IIB e IID as concentrações de sulfato no efluente final foram inferiores à concentração de sulfato teórica. A diferença entre as concentrações medida e esperada nas Condições IIB e IID foi de 6 e 8,5%, respectivamente e, pode ser devida à erros analíticos na determinação de sulfato. Já nas Condições IA e IC, essa diferença foi mais significativa (da ordem de 21 e 30%, respectivamente), possivelmente em função da ocorrência de processo de óxido-redução adicional. Como mostrado na Tabela 11, baixas concentrações de sulfeto foram adicionadas ao reator LEAI na Etapa 1 com o objetivo de reduzir o efeito tóxico deste composto à comunidade nitrificante. Portanto, descarta-se a possibilidade de ocorrência da oxidação parcial do sulfeto à enxofre elementar a partir da redução do NO₃⁻ (Equação 7).

A comparação entre as frações de sulfeto teóricas envolvidas na desnitrificação autotrófica (Tabela 42) e as concentrações de sulfeto aplicadas nas Condições IA e IC (Tabela 42) revelou déficit no aporte de HS⁻. Assim, a hipótese mais coerente para explicar a diferença entre as concentrações de sulfato teórica e observada nestas condições foi que uma parcela da redução de NO₃⁻ pode ter ocorrido pela via da desnitrificação heterotrófica, uma vez que a água residuária possuía concentração de DQO afluente de $54,7 \pm 2,4$ e $52,0 \pm 1,5$ mg L⁻¹ nas Condições IA e IC, respetivamente (Tabela 38).

5.2.1.2 ALCALINIDADE E PH

Os valores médios de pH e de alcalinidade total medidos no afluente e no efluente do reator LEAI na Etapa Experimental 2 estão dispostos na Tabela 44.

Tabela 44 - Valores médios e respectivos desvios-padrão da alcalinidade total em amostras afluente e efluente ao longo da operação do reator LEAI na Etapa Experimental 2.

Estratégia	pH		Alcalinidade Total (mgCaCO ₃ L ⁻¹)	
	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente
I	7,6 ± 0,1	7,84 ± 0,2	505 ± 7	278 ± 74
II	7,6 ± 0,1	8,04 ± 0,2	511 ± 12	283 ± 34

Fonte: A Autora

De acordo com Tchobanoglous, Burton e Stensel (2003), o processo de nitrificação consome 7,14 mg de alcalinidade em função de CaCO₃ por mg de amônia oxidada; ocasionando queda na alcalinidade do meio líquido. Contudo, não foi observada redução no pH provavelmente devido ao uso do Na₂S 9H₂O como fonte de sulfeto no sistema. Este composto é altamente alcalino, impactando no pH do meio líquido quando utilizado.

Assim, a Tabela 45 apresenta a demanda prevista (alcalinidade consumida pela nitrificação) e as alcalinidades observada e teórica em cada uma das estratégias avaliadas na Etapa 2. A fração de alcalinidade efluente teórica foi obtida subtraindo-se a demanda da nitrificação da alcalinidade total afluente.

Tabela 45 - Alcalinidade afluente e estimativas da alcalinidade consumida e da alcalinidade produzida no reator LEAI em cada condição experimental testada na Etapa 2.

Estratégia	Alcalinidade total afluente (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	Demanda de alcalinidade na nitrificação (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	Alcalinidade efluente teórica (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	Alcalinidade efluente observada (mg CaCO ₃ L ⁻¹)
I	505 ± 7	331 ± 82	182 ± 86	278 ± 74
II	511 ± 12	359 ± 44	161 ± 37	283 ± 34

Fonte: A Autora

Os dados da Tabela 45 mostram que a alcalinidade média efluente observada nas duas estratégias foi superior aos valores de alcalinidade teórica, que contabilizaram a fração consumida pela nitrificação. Tal diferença pode ser atribuída à ocorrência da via heterotrófica da desnitrificação como rota metabólica complementar de remoção de nitrogênio no sistema. A ocorrência deste processo já havia sido sinalizada pelo balanço de sulfato apresentado nas Tabelas 42 e 43.

5.2.1.3 CONCENTRAÇÕES DE SÓLIDOS NO AFLUENTE E EFLUENTE DO REATOR LEAI

As concentrações médias de sólidos do afluente e do efluente do reator LEAI durante a Etapa Experimental 2 estão apresentadas na Tabela 46. A Figura 40 apresenta a comparação tais concentrações de sólidos ao longo da operação do reator.

Tabela 46 - Concentrações de sólidos no afluente e no efluente final obtido no reator LEAI nas Estratégias I e II.

	Concentrações na água residuária sintética (mg L ⁻¹)		Concentrações na saída do reator LEAI (mg L ⁻¹)	
	Estratégia I	Estratégia II	Estratégia I	Estratégia II
ST	996±69,7	991±79,3	609±30	584±35
STF	700±49	715±57,2	547±27	501±30
STV	296±35,6	276±24,8	62±9	83±7
SST	30±3,6	32±8	188±22	196±29
SSF	20±4,7	19±3,8	148±17	148±16
SSV	11±2,6	13±2,5	40±8	48±12

Fonte: A Autora

Figura 40 - Variação da concentração de sólidos no afluente e efluente do reator LEAI nas Estratégias I e II testadas na Etapa 2.

Fonte: A Autora

Assim como relatado na Etapa Experimental 1, pode-se observar que, para as duas estratégias operacionais testadas, a concentração de STF presente na água residuária manteve-se no efluente do reator LEAI, uma vez que está associada aos sais minerais adicionados em seu preparo (Tabela 32).

Com relação à parcela de sólidos suspensos, a análise da Figura 39 indica que as concentrações efluentes de SSV foram baixas ao longo de todo o período operacional, assim como observado durante a Etapa 1 (Figura 26). Silva et al. (2018) operaram reator LEAI como unidade de pós-tratamento do efluente produzido em reator UASB tratando esgoto sanitário. Estes autores também detectaram baixas concentrações de SSV ($14 \pm 9 \text{ mg L}^{-1}$) no efluente final da unidade LEAI e apontam que tais concentrações de SSV são compatíveis ao efluente obtido nos decantadores secundários de sistemas de lodos ativados (SILVA et al. 2018). Resultados similares, em termos de retenção da biomassa, também foram alcançados nos estudos desenvolvidos por Moura, Damianovic e Foresti (2012), Moura (2014) e Santos (2014).

5.2.2 PERFIS TEMPORAIS DE CONCENTRAÇÕES

Ao final do período operacional da Etapa Experimental 2 (115 dias de operação), testes baseados na obtenção de perfis temporais de concentrações de compostos orgânicos,

nitrogenados e sulfurosos (Testes 1 até 3) foram realizados para investigar a dinâmica dos processos combinados de nitrificação e desnitrificação autotrófica e potencial de atividade da comunidade desnitrificante heterotrófica. As características operacionais iniciais de cada teste foram apresentadas na Tabela 12 (seção 4.3.4).

Os testes foram realizados diretamente no reator LEAI, considerando seu volume útil (8,9 L). Para evitar a preocupação com o efeito da diluição (como descrito no item 4.2.5), desta vez a alimentação do reator foi interrompida. Vale ressaltar que a discussão dos resultados obtidos nestes testes seguirá a seguinte ordem: etapa de nitrificação na ausência de sulfeto (Teste 1). Em seguida, serão apresentados os resultados dos testes referentes à investigação da desnitrificação pela via autotrófica (Teste 2) e heterotrófica (Teste 3). Assim como na Etapa Experimental 1, ao longo da execução dos testes que serão descritos nesta seção, foi realizado o monitoramento do valor de POR e de OD (exclusivamente no Teste 1); além do acompanhamento das variáveis físico-químicas de interesse.

A Figura 41 apresenta o perfil temporal de POR, OD e de oxidação de N-amoniacal e consequente aumento da concentração dos compostos reduzidos intermediários (NO_2^- e NO_3^-) ao longo do Teste 1. A concentração de OD e o valor de POR no início do teste foram de $4,6 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ e 9 mV, respectivamente.

Figura 41 - Perfis da oxidação de N-NH_4^+ (A), POR e OD (B) obtidos no Teste 1.

Fonte: A Autora

Com relação ao processo de nitrificação observa-se, a partir da Figura 40, que uma fração total de 209 mgN L^{-1} foi oxidada e que 49,3% da concentração inicial de amônia foi oxidado nos primeiros 60 minutos. A taxa média de oxidação deste composto neste período foi de $1,7 \text{ mgN L}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Contudo, a taxa de oxidação de amônia caiu drasticamente ($0,25 \text{ mgN L}^{-1} \text{ min}^{-1}$) nos 420 minutos restantes mesmo com a presença de residual de aproximadamente 113 mgN L^{-1} como N-NH_4^+ . Assim, no final do Teste 1, a concentração de N-NO_2^- acumulada foi de $105,6 \text{ mgN L}^{-1}$, o que sugere a ocorrência de efeitos inibitórios do

nitrito sobre as bactérias oxidadoras de amônia, assim como observado no teste para avaliar a nitrificação na Etapa 1 (Figura 28). Como apresentado na seção 5.1.3, Muller, Stouthamer e Van Verseveld (1995) observaram redução de 50% na taxa média de oxidação de amônia de biomassa floculenta retirada de sistema de lodos ativados submetida à substrato com concentração de nitrito variando entre 42 a 70 mg N-NO₂⁻ L⁻¹.

Além da inibição da atividade da atividade nitrificante pelo nitrito, observou-se que a amônia livre também inibiu o metabolismo nitrificante. A concentração de amônia livre no início do Teste 1 foi de 16,4 mg L⁻¹, uma vez que o pH inicial foi de 7,96. Já no final do teste, devido ao consumo de alcalinidade pelo processo de oxidação de N-NH₄⁺, o pH caiu para 6,35, mantendo a concentração de amônia livre nula. As concentrações foram calculadas utilizando-se a Equação 29 (FORD; CHURCHWELL; KACHTICK, 1980), na qual adotou-se temperatura ambiente de 30°C e valores de pH anteriormente mencionados. Estudos prévios reportaram que os gêneros *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*, relativos à bactérias oxidadoras de amônia e oxidadoras de nitrito, podem ser inibidos por concentrações de amônia livre variando entre 10-150 e 0,1-4 mg L⁻¹, respectivamente (ANTHONISEN et al., 1976; BAE et al., 2001; LIU; TAY, 2001).

Com objetivo de elucidar o potencial efetivo de uso de sulfetos dissolvidos como doador de elétrons para redução de NO₃⁻ no reator LEAI, o Teste 2 foi realizado submetendo o reator LEAI à pulsos iniciais de N-nitrato e sulfeto de 80 mgN L⁻¹ e 68 mg STD L⁻¹, respectivamente (Tabela 12). Vale ressaltar que, como na operação contínua do reator LEAI na Etapa Experimental 2 testou-se a concentração máxima de sulfeto de 61,1 mgSTD L⁻¹ (Tabela 39), concentração similar deste composto foi utilizada no teste de atividade que será discutido a seguir. Assim, não foi observada grande elevação do pH do meio líquido no reator LEAI (pH inicial do Teste 2 = 7,93) devido o pulso de solução concentrada de Na₂S.9H₂O. Com esta medida buscou-se evitar a possível interferência do pH sobre a atividade ótima das bactérias desnitrificantes autotróficas, que está na faixa entre pH 6 e 8 (TAKAI et al., 2006; SCHLEGEL, 1995). Os perfis de consumo de N-NO₃⁻ e sulfeto ao longo deste teste estão ilustrados na Figura 42. No início do Teste 2 a concentração de OD era de 0 mgO₂ L⁻¹.

Figura 42 – Perfis da concentração de N-nitrato e sulfeto total dissolvido ao longo do Teste 2, sob condições anóxicas.

Fonte: A Autora

Durante o Teste 2, POR manteve-se constante no valor de -400 mV (vs Ag/AgCl). Como apresentado na Figura 42, é possível observar que nos sete minutos iniciais do Teste 2, 24% da concentração inicial de N-nitrato foi reduzida utilizando sulfeto como doador de elétrons. A taxa média de redução de NO_3^- neste período foi de $2,75 \text{ mgN L}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Ao contrário do que ocorreu no teste de desnitrificação autotrófica realizado na Etapa Experimental 1 (Figura 29), o processo de redução do nitrato continuou a ocorrer nos 26 minutos subsequentes, porém a taxa média de reação caiu para $0,36 \text{ mgN L}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Como nos 30 minutos finais do Teste 2, não houve redução significativa de N- NO_3^- , a percentagem total de sulfeto que foi oxidada a partir do uso do nitrato como aceptor final de elétrons foi de 58,6% e a taxa média de redução de NO_3^- foi de $0,87 \text{ mgN L}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

Entretanto, apesar da interrupção na redução de nitrato, o sulfeto continuou a ser oxidado até o final do Teste 2 (30 minutos finais). A provável explicação para este resultado é que, em condições anóxicas, bactérias oxidadoras de sulfeto podem utilizar reações de transporte de elétrons alternativas, como a cadeia respiratória do fumarato (KELLER et al., 2015). Tal fato também foi observado no perfil do potencial da desnitrificação autotrófica realizado na Etapa 1 (Figura 29).

Com o objetivo de avaliar a contribuição da atividade desnitrificante heterotrófica o Teste 3 foi realizado, submetendo o sistema LEAI a pulsos iniciais de N-nitrato e ácido

acético (relação DQO/N inicial de 7,2), em condições anóxicas (Tabela 12). Os perfis de consumos de ambos compostos são apresentados na Figura 43.

Figura 43 - Perfis temporais das concentrações de DQO e N-nitrato no Teste 3, sob condições anóxicas.

Fonte: A Autora

Ao final do Teste 2 (240 minutos) foi observada remoção de 43,2 mg N L⁻¹ de N-nitrato e de 357 mg DQO L⁻¹ (Figura 43), resultando em taxa de redução de NO₃⁻ de 0,18 mg N L⁻¹ min⁻¹. Comparando-se as taxas de redução de NO₃⁻ obtidas nos Teste 2 e 3 foi possível notar que, apesar da detecção de atividade heterotrófica desnitrificante, o sulfeto mostrou-se maior potencial de ser utilizado como doador de elétrons na redução de nitrato no reator. Tal fato também foi observado na Etapa Experimental 1.

5.2.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Os exames de microscopia eletrônica de varredura apresentados neste item foram realizados a partir de amostras de biofilme coletadas ao final do período de operação do reator LEAI. A Figura 44 evidencia a colonização microbiana na espuma retirada do reator LEAI, comparando-a com a espuma nova (sem colonização).

Figura 44 - Comparação entre colonização microbiana na espuma de poliuretano: espuma nova (A), espuma ao final da operação do reator LEAI (B).

Fonte: A Autora

A análise dos resultados obtidos nas Etapas Experimentais 1 e 2 indicou o estabelecimento de comunidades microbianas distintas no reator LEAI. Assim, buscou-se correlacionar o desenvolvimento da biomassa aderida a partir das microscopias MEV em diferentes porções do meio suporte (zonas externa e interna) com os resultados físico-químicos obtidos. As hastes de espuma empregadas como material suporte no presente estudo apresentaram, em média, diâmetro de 1,5 cm. Na observação do biofilme estabelecido no reator LEAI com microscópio eletrônico de varredura, pode-se ter uma noção visual da profundidade na qual se deu a aderência de microrganismos ao meio suporte (1,1 mm), como indicado na Figura 45.

Figura 45 – Corte vertical sobre a espuma de poliuretano no qual observa-se a profundidade média de ocupação dos poros por biofilme.

Fonte: A Autora

A fração externa da espuma foi investigada primeiramente e as principais morfologias de microrganismos encontradas nesta zona podem ser visualizadas na Figura 46.

Figura 46 – Imagens da microscopia eletrônica de varredura evidenciando parte externa do biofilme estabelecido no reator LEAI: bactéria filamentosa, cocos e bacilos (A); *Euglypha tuberculata* (B).

Fonte: A Autora

A Figura 46A evidencia bactéria heterotrófica filamentosa semelhante a *Sphaerotilus natans*. A presença deste microrganismo está associada à manutenção de condições microaeradas e de deficiência de fósforo (JENKIS et al., 2003). Além disso, na mesma

imagem foi possível identificar aglomerados de cocos, com morfologia semelhante a *Nitrosococcus* (BRENNER; KRIEG; STALEY, 2005). Semelhança com tal gênero bacteriano também foi inferida a partir da análise microscópica de biofilme dos reatores operados por Moura (2011) e Santos (2014), os quais também adotaram espuma de poliuretano como meio suporte para a remoção biológica de nitrogênio. Ameba semelhante ao gênero *Euglypha tuberculata*, microrganismo caracterizado pela ausência de carapaça e pelo revestimento celular formado por escamas sobrepostas, também foram identificadas na região mais superficial do biofilme (Figura 46B). Segundo Fernandes et al. (2013), a presença de desse microrganismo é indicativa da ocorrência de nitrificação, devido sua considerável sensibilidade à altas concentrações de matéria orgânica e amônia. Tal microrganismo também pode ser observado via MEV no biofilme estabelecido em reator LEAI tratando efluente de baixa relação C/N (SANTOS, 2014). A Figura 47 retrata a diversidade microbiana presente na área mais interna do biofilme.

Figura 47 - Imagem da microscopia eletrônica de varredura evidenciando parte interna do biofilme estabelecido no reator LEAI.

Fonte: A Autora

5.2.4 CARACTERIZAÇÃO MICROBIANA POR SEQUENCIAMENTO DO rRNA 16S – PLATAFORMA ION TORRENT

Após 143 dias de operação do reator LEAI na Etapa 2 foram coletadas amostras de biomassa para extração de DNA e sequenciamento da região V4 do gene 16S rRNA na plataforma Ion Torrent, a fim de verificar os grupos microbianos estabelecidos na fração

suspensa e nas zonas externa (aeróbia) e interna (anóxica) do biofilme. Foram sequenciadas também amostras dos inóculos, identificadas como lodo anaeróbio (Dacar) e lodo aeróbio (Volks).

No lodo aeróbio foram observadas 824 OTU's enquanto que no anaeróbio observaram-se 1598 OTUS, sendo que em ambos os inóculos, 34% corresponderam a *singletons*. Com relação às análises das frações de biofilme das zonas externa, interna e na biomassa suspensa, observaram-se 1257, 774 e 770 OTU's das quais 45,11%, 42,12% e 39,61% corresponderam a *singletons*, respectivamente.

5.2.4.1 INÓCULOS

No lodo aeróbio o filo Proteobacteria teve abundância relativa de 91,26%. Em relação ao lodo anaeróbio, a maior abundância relativa (51,7%) foi referente ao filo Synergistetes. Militon et al. (2015) e Vartoukian, Palmer e Wade (2007) salientam que membros deste filo desempenham função importante na degradação de matéria orgânica, sendo encontrados em sistemas anaeróbios de tratamento de águas residuárias. A Figura 48 apresenta os principais gêneros encontrados nos inóculos do reator LEAI, considerando os grupos com abundâncias relativas superiores a 1%.

Figura 48 – Principais gêneros identificados nos inóculos do reator LEAI.

Fonte: A Autora

Como indicado na Figura 48, no lodo aeróbio o gênero predominante foi *Pseudomonas*. Os microrganismos pertencentes a este gênero são bacilos retos ou levemente curvos, gram negativos e aeróbios que podem utilizar diversas fontes de carbono e converter nitrogênio inorgânico como amônio, nitrato e nitrito em gás nitrogênio. Por exemplo, He et al. (2016) demonstraram que *Pseudomonas tolaasii* cepa Y-11 possui alta capacidade de remoção tanto via nitrificação heterotrófica utilizando amônio quanto via desnitrificação aeróbia com nitrato ou nitrito.

Já no lodo anaeróbio observou-se dez gêneros (E6, PD-UASB-13, *VadinCA02*, *Sulfuricurvum*, *Aminiphilus*, *Kosmotoga*, *Dehalobacterium*, *Crenothrix*, SJA-88 e HA73) com abundância relativa superior a 1% (22,64%, 14,52%, 9,41%, 2,97%, 2,49%, 2,09%, 1,53%, 1,37%, 1,36% e 1,00%, respectivamente) (Figura 48).

O gênero E6 faz parte do ramo filogenético não cultivado pertencente à família TTA-B6, a qual participou de rede filogenética complexa de microrganismos relacionados a degradação de tereftalato em reator anaeróbio metanogênico (NOBU et al., 2015). Segundo Ito et al. (2011) nos grupos PD-UASB-13 e HA73 encontram-se microrganismos não cultivados pertencentes ao filo Synergistetes descritos no “grupo 4 – lodo de digestor anaeróbio”. Os membros do gênero HA73 ainda não tem função metabólica conhecida (GABY; ZAMANZADEH; HORN, 2017; ITO et al., 2011), entretanto sabe-se que os pertencentes ao gênero PD-UASB-13 atuam em sintrofia com os organismos metanogênicos hidrogenotróficos na oxidação de aceto (ITO et al., 2011). No mesmo sentido, o gênero *VadinCA02*, pertence a linhagens bacterianas não cultivadas e indefinidas em vários níveis taxonômicos, as quais tem sido encontrada em reatores mesofílicos (GABY; ZAMANZADEH; HORN, 2017).

O gênero *Aminiphilus* é composto por bactérias anaeróbias estritas, degradadoras de aminoácidos, cuja espécie *A. circumscriptus* foi identificada em reator UASB (DÍAZ et al., 2007). Os gêneros *Kosmotoga*, SJA-88 e *Dehalobacterium* também estão envolvidos na digestão anaeróbia, atuando na metabolização de diferentes compostos. *Kosmotoga* reúne microrganismos termofílicos e salino-tolerantes capazes de fermentar carboidratos e peptídeos (NUNOURA et al., 2010). O gênero SJA-88 contempla microrganismos aeróbios obrigatórios ou microaeróbios (pertencentes à ordem *Leptospirales*) que utilizam ácidos orgânicos ou álcoois de cadeias longas como fontes de carbono e energia (BUETTNER; NOLL, 2018; GUPTA; MAHMOOD; ADEOLU, 2013). Já os membros do gênero *Dehalobacterium* são capazes de degradar o 4-clorofenol a partir da redução de ferro (LI et al., 2014). O acetato é

um dos subprodutos da reação, o qual é usado como substrato por outros microrganismos anaeróbios.

De acordo com OSWALD et al. (2017) membros do gênero *Crenothrix* são oxidadores de metano raros, cujos metabolismo e função nos ciclos biogeoquímicos ainda não são totalmente conhecidos. O gênero *Sulfuricurvum* engloba bactérias quimioautotróficas oxidantes de enxofre (KODAMA; WATANABE, 2004). Em ambientes salinos com alto teor de sulfato, Martínez-Santos et al. (2018) observaram a coexistência de bactérias dos gêneros *Sulfuricurvum* e *Thiobacillus*, resultando na oxidação de sulfeto acoplada a redução de nitrato.

5.2.4.2 BIOMASSA ADERIDA E SUSPensa DO REATOR LEAI

O filo Proteobacteria também foi o predominante nas amostras de biomassa aderida (frações externa e interna do material suporte) e também na biomassa suspensa do reator LEAI, com abundâncias relativas de 58,21%, 74,51 e 88,02%, respectivamente. Este filo é considerado um dos maiores do domínio Bactéria agrupando mais de duzentos gêneros (GUPTA, 2000; STACKEBRANDT; MURRAY; TRUPER, 1988), sendo muitos deles relacionados aos ciclos do nitrogênio e do enxofre. As Figuras 49 e 50 apresentam as principais famílias e gêneros encontrados no reator LEAI, considerando os grupos com abundâncias relativas superiores a 1%.

Figura 49 - Principais famílias identificadas nas frações de biomassa aderida (zonas interna e externa) e suspensa do reator LEAI.

Fonte: A Autora

Figura 50 – Principais gêneros identificados nas frações de biomassa aderida (zonas interna e externa) e suspensa do reator LEAI.

Fonte: A Autora

Com relação às comunidades microbianas estabelecidas no reator LEAI ao final de sua operação, observa-se na Figura 50 que os gêneros *Thauera*, *Thiobacillus*, *Azoarcus* e *Luteimonas* foram identificados tanto nas frações de biomassa aderida quanto na biomassa suspensa. A atuação conjunta desses grupos está relacionada à conversão do N-NH_4^+ a N_2 , observada nas duas Etapas Experimentais avaliadas neste trabalho. Os gêneros *Thauera*, *Thiobacillus* e *Azoarcus* incluem organismos desnitrificantes de metabolismo autotrófico (*Thiobacillus*) e heterotrófico (*Thauera* e *Azoarcus*) amplamente identificados em reatores biológicos para remoção de nitrogênio (MECHICHI et al., 2002; SHAO; ZHANG; FANG, 2010). Tais microrganismos atuaram na redução do NO_2^- e NO_3^- produzido no reator LEAI, utilizando primordialmente o sulfeto como doador de elétrons e nas situações em que este não estava disponível, matéria orgânica foi oxidada.

Já o metabolismo do gênero *Luteimonas* ainda não é totalmente conhecido na literatura. Alguns membros do gênero são classificados como desnitrificantes, uma vez que são capazes de reduzir NO_2^- a óxido nitroso (N_2O). Por exemplo, *Luteimonas mephitis* foi isolada por Finkmann et al. (2018), conjuntamente com outros microrganismos produtores de N_2O , do biofilme estabelecido em biofiltros utilizado para o tratamento do efluente gasoso produzido em uma indústria de processamento de carne bovina. Entretanto Li e Lu (2017)

observaram que membros do gênero *Luteimonas* também estavam associados ao processo de nitrificação em sistema combinado de filtro anóxico seguido por contator biológico auto-rotativo com quatro estágios de queda d'água aplicado ao pós-tratamento de esgoto doméstico. O gênero *Luteimonas* faz parte da família *Xanthomonadaceae* do grupo das Gamaproteobacterias, membros desta família estão envolvidos no processo de nitrificação em baixas concentrações de OD, como observado por Fitzgerald et al. (2015). Como indicado na Figura 48, a família *Xanthomonadaceae* também foi identificada tanto na fração aderida quanto na fração suspensa da biomassa do reator LEAI.

Portanto, a coexistência de microrganismos das famílias *Xanthomonadaceae* e *Nitrosomonadaceae* nas amostras de biomassa do reator LEAI (Figura 49) confirma o desenvolvimento e manutenção do metabolismo nitrificante no sistema. A família *Nitrosomonadaceae* contém os microrganismos autotróficos dos gêneros *Nitrosomonas*, *Nitrosolobus* e *Nitrospira*, os quais são capazes de oxidar NH_4^+ (BRENNER et al., 2005).

Além destes quatro gêneros que foram comuns às frações de biomassa aderida e suspensa, outros grupos de microrganismos também foram identificados de maneira isolada na análise de sequenciamento massivo por Ion Torrent (Figura 50). No caso da biomassa suspensa, destaca-se a presença do gênero *Candidatus Xiphinematobacter*, com abundância relativa de 1,61%. *Candidatus Xiphinematobacter* é um simbiote citoplasmático obrigatório pertencente ao filo Verrucomicrobia. (KRIEG et al., 2010)

Na amostra de biomassa aderida retirada da zona superficial do material suporte (Figura 50) identificou os gêneros *Ignavibacterium* e *Kosmotoga*, com abundâncias relativas de 1,23% e 1,00%, respectivamente. O gênero *Ignavibacterium* compreende microrganismos anaeróbios moderadamente termofílicos e de metabolismo heterotrófico (IINO et al., 2010). Por exemplo, a espécie *Ignavibacterium álbum* foi isolada de amostra de biofilme formada em riachos de águas termais de Yumata, no Japão por Iino et al. (2010). Já o gênero *Kosmotoga*, como descrito no item 5.2.4.1, engloba microrganismos termofílicos e salino-tolerantes capazes de fermentar carboidratos e peptídeos (NUNOURA et al., 2010).

Vale ressaltar que, dentre os gêneros com abundância relativa superior a 1% identificados nos inóculos, o gênero *Kosmotoga* foi o único que manteve-se no reator LEAI até o final de sua operação. É possível que salinidade mais acentuada da água residuária utilizada no presente trabalho tenha possibilitado sua manutenção no reator LEAI, uma vez que este grupo apresenta tolerância à salinidade.

5.2.5 SÍNTESE DOS RESULTADOS DA ETAPA 2

O objetivo da Etapa Experimental 2 foi avaliar o desempenho do reator de leito estruturado submetido à aeração intermitente (LEAI) na remoção de nitrogênio via processo NDS e desnitrificação autotrófica utilizando sulfeto como doador de elétrons, sob diferentes estratégias de fornecimento de sulfeto. Entretanto, visto a problemática da presença do sulfeto observada na Etapa 1, na Etapa 2 buscou-se investigar como seria a dinâmica dos processos envolvidos na remoção de nitrogênio a partir da dosagem de sulfeto apenas nas etapas não-aeradas do ciclo de aeração intermitente. O reator LEAI foi operado com TDH médio de $12,2 \pm 0,2$ h e ciclo de aeração intermitente de 3 h, sendo 1 h com aeração e 2 h sem aeração.

A Etapa 2 teve duração total de 143 dias, na qual água residuária sintética simulando as características do efluente de RAn foi utilizada para a alimentação direta do reator LEAI. Uma solução estoque concentrada de ácido acético e etanol (DQO média de 52 mg L^{-1}) foi preparada e utilizada como fonte de matéria orgânica residual, já que estes foram principais subprodutos do reator anaeróbico na Condição I da Etapa Experimental 1. Bicarbonato de sódio foi adicionado como agente tampão ao sistema, na concentração necessária para suprir a demanda exigida para a oxidação completa da carga nitrogenada aplicada ($7,14 \text{ mg CaCO}_3$ por mg de N-NH_4^+ oxidado).

O sulfeto, anteriormente produzido pelo metabolismo das BRS no reator anaeróbico da Etapa 1, passou a ser adicionado por bombeamento de solução concentrada de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ apenas nas fases não-aeradas do ciclo de aeração intermitente. Duas estratégias de adição do sulfeto foram testadas ao longo de 115 dias de operação, como apresentado no fluxograma da Figura 4 (item 4.1). Na Estratégia I, os volumes de solução de sulfeto necessários para resultar nas concentrações finais de STD pretendidas foram adicionados como pulsos únicos, com tempo de bombeamento total de 15 minutos. Já na Estratégia II, os volumes de solução de sulfeto associados as concentrações finais de STD foram adicionados de maneira contínua ao longo dos 90 minutos restantes de cada fase não-aerada do ciclo de aeração intermitente.

A síntese das características iniciais da água residuária sintética e dos principais resultados obtidos na operação do reator LEAI na Etapa Experimental 2 é apresentada nas Tabelas 47 e 48, respectivamente.

Tabela 47 - Caracterização afluyente da água residuária tratada no reator LEAI na Etapa Experimental 2.

Variáveis	Estratégias	
	I	II
Período operacional (dias)	1 - 59	60 - 115
DQO (mg L ⁻¹)	53 ± 3,2	54 ± 3,5
N-NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹)	74,0 ± 4,1	73,7 ± 3,5
SO ₄ ²⁻ (mg L ⁻¹)	0,0	0,0
STD* (mg L ⁻¹)	22 - 53	42 - 61
pH	7,6 ± 0,1	7,6 ± 0,1
Alcalinidade total (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	506 ± 6,7	511 ± 12,2
SSV (mg L ⁻¹)	11 ± 5	9 ± 4
Relação C/N	0,74 ± 0,06	0,74 ± 0,07
Carga nitrogenada aplicada (kgN m ⁻³ d ⁻¹)	0,146±0,008	0,146±0,007

*adicionado diretamente à corrente de alimentação do reator.

Fonte: A Autora

Tabela 48 – Características do efluente final do reator LEAI na Etapa Experimental 2.

Variáveis	Estratégias	
	I	II
Período operacional (dias)	1 - 59	60 - 115
DQO (mg L ⁻¹)	-	-
N-NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹)	30,2 ± 10,3	25,7 ± 6,2
N-NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	17,7 ± 13,3	10,7 ± 6,8
N-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	1,9 ± 3,9	4,4 ± 2,6
SO ₄ ²⁻ (mg L ⁻¹)	99 ± 34,5	138 ± 19,8
STD (mg L ⁻¹)	-	-
pH	7,84 ± 0,25	8,04 ± 0,20
Alcalinidade total (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	278 ± 74	283 ± 34
SSV (mg L ⁻¹)	40 ± 8	48 ± 12
Eficiência de oxidação de N-NH ₄ ⁺ (%)	59±14,7	65±7,8
Eficiência de remoção de N-total (%)	61±26,6	69±13,5
Eficiência de desnitrificação (%)	32±9,7	47±9,9
Carga de amônia oxidada (kg N m ⁻³ dia ⁻¹)	0,086±0,022	0,095±0,011
Carga de N-total removido (kg N m ⁻³ dia ⁻¹)	0,047±0,015	0,065±0,015

(-) Valores abaixo do limite de detecção.

Fonte: A Autora

Na Etapa 1, as eficiências de oxidação de N-NH₄⁺ no reator LEAI continuamente alimentado com efluente contendo sulfeto foram de 57% e 60%, para as Condições III e IV, respectivamente. Na Etapa 2, o aporte deste composto ao reator LEAI foi realizado apenas nos períodos não aerados, buscando-se uma melhoria na remoção de N-total. Entretanto observou-se que ainda assim o sulfeto foi tóxico à comunidade nitrificante, uma vez que as eficiências de oxidação de N-NH₄⁺ nas duas estratégias testadas foram de 59 e 65%, respectivamente (Tabela 48).

Além disso, observou-se que a remoção de N-total na Etapa 2 foi limitada pelo processo de desnitrificação, uma vez que nitrito e nitrato foram detectados no efluente final nas duas estratégias testadas (Tabela 48). O desempenho do LEAI esteve relacionado ao aporte limitado de doadores de elétrons ao sistema. No caso do sulfeto (doador de elétrons inorgânico), a limitação no aporte esteve associada ao limite de toxicidade à comunidade

nitrificante. Assim, a concentração máxima de sulfetos dissolvidos testada foi de 61 mgSTD L⁻¹ na Estratégia II (Tabela 47).

A partir do balanço da DQO requerida para a redução das frações totais de N-total removido em ambas estratégias (Tabela 40), foi observado o déficit de doador de elétrons orgânico para a desnitrificação heterotrófica. Esses resultados permitiram classificar a rota de desnitrificação heterotrófica como um processo secundário de remoção de nitrogênio no sistema, como evidenciado pelos balanços de massa do sulfato (Tabelas 42 e 43) e alcalinidade (Tabela 45).

A variação dos valores de POR no ciclo de aeração intermitente mostrou-se compatível à faixa ótima reportada na literatura para ocorrência da nitrificação e desnitrificação. Na etapa aerada, atingiu-se valor de POR máximo de +22 mV (Figura 39). Na Etapa Experimental 1, no qual o reator LEAI foi continuamente alimentado com efluente de sistema anaeróbio (concentração média de 225 mgSTD L⁻¹), observou-se que, mesmo em condições aeradas, o POR não atingiu a faixa positiva. Portanto, a estratégia de adição de sulfeto apenas nas etapas não-aeradas (Etapa 2) mostrou-se mais efetiva para garantir ambiente oxidado para a nitrificação (etapa aerada), quando comparado à operação do reator LEAI recebendo continuamente o efluente do reator anaeróbio (Etapa 1).

Com relação às estratégias de adição de sulfeto nos períodos não-aerados, observou-se que a adição de sulfeto de forma mais diluída ao longo do tempo (Estratégia II) interferiu menos na fase aerada subsequente, permitindo que ambiente mais oxidado fosse garantido durante as etapas aeradas (valores positivos de POR). Assim, as condições impostas na Etapa II refletiram em maior estabilidade e aumento da eficiência média de nitrificação de $59 \pm 14,7$ para $65 \pm 7,8\%$, para as Estratégias I e II (Tabela 47). Além disso, houve aumento da eficiência média de remoção de N-total de $32 \pm 9\%$ (Estratégia I) para $47 \pm 9,9\%$ (Estratégia II), como apresentado na Tabela 47. Esse resultado pode estar relacionado ao aumento na disponibilidade do sulfeto para ser usado como doador de elétrons devido à sua adição durante tempo prolongado.

A partir de testes de perfil temporal de concentrações realizados em condições anóxicas e visando a redução de NO₃⁻ a partir de doadores de elétrons inorgânico (sulfeto) e orgânico (ácido acético) comprovou-se o potencial dos metabolismos desnitrificantes autotrófico e heterotrófico da biomassa estabelecida do reator LEAI. Entretanto, a taxa média de redução de NO₃⁻ quando sulfeto foi utilizado como doador de elétrons (0,87 mgN L⁻¹ min⁻¹) foi superior à taxa média de redução obtida com o doador de elétrons orgânico (0,18 mgN L⁻¹ min⁻¹).

Desta forma, os resultados obtidos na Etapa Experimental 2 também permitem confirmar a segunda sub-hipótese elencada - **“a aplicação de reator de leito estruturado submetido à aeração intermitente (LEAI) como unidade única de pós-tratamento do efluente obtido em sistema anaeróbio permite a remoção de nitrogênio pelos processos simultâneos de nitrificação e desnitrificação autotrófica a partir do sulfeto”**. Além disso, confirmou-se a sub-hipótese 3 - **“o aporte de sulfetos dissolvidos exclusivamente nas etapas não-aeradas do ciclo de aeração intermitente do reator LEAI pode reduzir sua inibição sobre a comunidade nitrificante, resultando em melhorias na remoção de nitrogênio total”**.

Verificou-se que a metabolização parcial do nitrogênio amoniacal presente na água residuária a partir do processo combinado de nitrificação e desnitrificação autotrófica foi causada pela toxicidade do sulfeto à nitrificação e pela limitação da desnitrificação, a qual foi relacionada ao aporte reduzido de HS^- ao sistema. O sulfeto dissolvido foi efetivamente utilizado como doador de elétrons na desnitrificação autotrófica no reator LEAI, resultando em carga máxima de N-total removida de $0,065 \pm 0,015 \text{ kgN m}^{-3} \text{d}^{-1}$ (Tabela 47).

A análise de biologia molecular confirmaram que os processos de nitrificação e desnitrificação (autotrófica e heterotrófica) foram os envolvidos na remoção de nitrogênio no reator LEAI. Sequências relacionadas a microrganismos dos gêneros *Luteimonas*, *Thauera*, *Azoarcus* e *Thiobacillus* foram identificadas nas frações aderida e suspensa da biomassa desenvolvida no reator.

Assim, os resultados da Etapa Experimental 2 também indicam que o reator LEAI é uma configuração relevante para obtenção da remoção de nitrogênio associada à metabolização de sulfeto de efluentes anaeróbios e que a adição de sulfeto nos períodos não-aerados do ciclo de aeração intermitente permite reduzir os efeitos tóxicos do sulfeto sob a nitrificação.

5.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS ACERCA DO POTENCIAL DE APLICAÇÃO TECNOLÓGICA DO SISTEMA ESTUDADO E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A hipótese central avaliada neste trabalho foi que os processos combinados de nitrificação e desnitrificação autotrófica a partir do sulfeto compreendem uma alternativa tecnológica a ser aplicada ao pós-tratamento de efluentes de sistemas anaeróbios. Tal hipótese foi investigada a partir da operação do reator de leito estruturado submetido à aeração

intermitente (LEAI) em duas etapas experimentais distintas, diferenciadas pelo tempo de contato dos sulfetos dissolvidos com a biomassa presente no biofilme.

Assim, o presente trabalho mostrou que é possível estabelecer a via autotrófica da desnitrificação atuando conjuntamente com a nitrificação, resultando na remoção de cargas de nitrogênio compatíveis com aquelas obtidas em sistemas nos quais estes dois processos ocorrem em tanques separados. Além disso, os resultados obtidos no presente trabalho reforçaram a ideia, que já vinha sendo mostrada por trabalhos prévios desenvolvidos no Laboratório de Processos Biológicos desde 2012, de que o reator LEAI permite a obtenção de biofilme mixotrófico e o estabelecimento de rotas alternativas de remoção de nitrogênio.

Tratando especificadamente da aplicação tecnológica associada aos resultados do presente trabalho, é possível traçar dois cenários. Na Etapa 1, o reator LEAI foi posicionado de maneira a receber continuamente o efluente pré-tratado no sistema anaeróbio, culminando na presença contínua de sulfetos dissolvidos no efluente a ser pós-tratado. Este seria o cenário real da aplicação desta tecnologia como unidade de pós-tratamento, nos casos em que o sulfeto produzido via redução anaeróbia de sulfato fica mantido na fração dissolvida do efluente do reator anaeróbio.

Na Etapa 2, em contrapartida, o sulfeto foi dosado no reator LEAI em momentos pré-definidos (etapas não-aeradas do ciclo de aeração intermitente) a partir de solução concentrada de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$. Sob o ponto de vista prático, a adoção desta estratégia operacional requer processo prévio de arraste do sulfeto biogênico produzido na unidade anaeróbia para a fração gasosa, seu armazenamento em condições adequadas e consequente dosagem no reator LEAI. Uma alternativa que poderia ser testada neste caso é a adoção de um tanque totalmente selado, recebendo o efluente do reator anaeróbio, no qual os sulfetos dissolvidos poderiam ser transferidos para fase gasosa a partir de ajustes no pH ou pela injeção de gás nitrogênio. O H_2S por sua vez, seria coletado em *bag* e ficaria disponível para dosagem no reator LEAI. No caso da operação de sistemas anaeróbios em escala piloto, poderia ser avaliada a coleta e armazenagem direta do H_2S juntamente com o metano produzido no biogás pela unidade anaeróbia. Um fator a ser avaliado nesse caso seria a injeção do biogás no reator LEAI, uma vez que o uso de bombas não é o ideal devido ao teor corrosivo do sulfeto aos componentes metálicos destes equipamentos.

Neste contexto, são formuladas algumas sugestões para trabalhos futuros relacionados à integração dos ciclos do nitrogênio e enxofre. Tais sugestões levam em conta dois aspectos (i) o caráter exploratório/fundamental das rotas metabólicas envolvidas e (ii) linha de pesquisa mais aplicada.

- Investigar a eficiência da nitrificação e desnitrificação a partir do uso de outros períodos de aeração e não-aeração, buscando-se a redução dos efeitos inibitórios do sulfeto sobre a comunidade nitrificante;
- Avaliar a remoção de nitrogênio no sistema aplicando-se o potencial de oxidação-redução (POR) e a concentração de OD como parâmetros de controle contínuo do processo combinado;
- Avaliar o estabelecimento da rota de oxidação do sulfeto à enxofre elementar, aplicando cargas mais elevadas de sulfeto nas etapas não-aeradas do ciclo de aeração intermitente.

6. CONCLUSÕES

Associando os objetivos propostos aos resultados obtidos, as principais conclusões oriundas do presente trabalho incluem:

- Na Etapa 1, a adoção de relação DQO/sulfato próxima a 2,0 superior à relação estequiométrica (0,67) mostrou-se uma estratégia eficiente para alcance para obtenção de equilíbrio entre os processos de metanogênese e sulfetogênese, resultando em eficiência de remoção de matéria orgânica superior a 90% em todo o período operacional do reator anaeróbio (RAn). Além disso, o aumento das cargas aplicadas de matéria orgânica e sulfato nas Condições III e IV, permitiu melhoria no desempenho das bactérias redutoras de sulfato;
- Com relação à operação do reator LEAI na Etapa 1, observou-se que a faixa de variação do potencial de óxido-redução (POR) manteve-se abaixo dos valores reportados na literatura. Tal fato está correlacionado à presença contínua de sulfeto advinda de RAn. Entretanto, mesmo movendo-se na zona de valores negativos, o valor de POR ficou próximo de zero durante as etapas aeradas do ciclo de aeração intermitente, associado à ocorrência da nitrificação. Por outro lado, quando a aeração foi interrompida, o valor de POR caiu, indicando o estabelecimento de ambiente anóxico/anaeróbio;
- Na Etapa 1, a presença contínua de sulfeto no efluente do RAn inibiu parcialmente a atividade dos microrganismos nitrificantes, mesmo quando maior carga nitrogenada afluenta foi aplicada (Condição IV). Esta inibição resultou em eficiência de oxidação de N-NH_4^+ de $60 \pm 12\%$;
- Na Etapa 2, a forma de administração de sulfeto reduziu sua inibição à comunidade nitrificante, alcançando eficiência de oxidação de N-NH_4^+ de $65 \pm 7,8\%$. Entretanto, a remoção de N-total no reator LEAI foi limitada pela etapa de desnitrificação, uma vez que aporte de doador de elétrons inorgânico (sulfeto) manteve-se abaixo da demanda estequiométrica, nas duas estratégias de adição de sulfeto testadas;
- Observou-se que a adição de sulfeto de forma mais diluída ao longo do período não aerado (Estratégia II) interferiu menos na fase aerada subsequente, permitindo que ambiente mais oxidado fosse garantido durante as etapas aeradas. Tal fato refletiu em maior estabilidade e aumento da eficiência média de nitrificação de $59 \pm 14,7$ para $65 \pm 7,8\%$;

- Um aumento da eficiência média de remoção de N-total de $32\pm 9\%$ (Estratégia I) para $47\pm 9,9\%$ (Estratégia II) também foi observado na Etapa 2. Tal fato pode estar relacionado ao aumento na disponibilidade do sulfeto para ser usado como doador de elétrons devido à sua adição durante tempo prolongado;
- O sulfeto dissolvido foi efetivamente utilizado como doador de elétrons em ambas as Etapas Experimentais, resultando em carga máxima de N-total removido de $0,095 \text{ kgN m}^{-3} \text{d}^{-1}$, alcançada na Condição IV da Etapa Experimental 1;
- A caracterização das comunidades microbianas ao final da operação do reator LEAI revelou a atuação conjunta de microrganismos de quatro gêneros principais na conversão do N-NH_4^+ a N_2 . O gênero *Luteimonas* faz parte da família Xanthomonadaceae, membros desta família estão envolvidos no processo de nitrificação em baixas concentrações de OD. Já os gêneros *Thauera*, *Azoarcus* e *Thiobacillus* incluem organismos desnitrificantes de metabolismo autotrófico e heterotrófico amplamente identificados em reatores biológicos para remoção de nitrogênio.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT. **NBR 9649 Projeto de redes coletoras de esgoto sanitário** Associação Brasileira de Normas e Técnicas. Rio de Janeiro, 1986.
- ADORNO, M. A. T.; HIRASAWA, J. S.; VARESCHE, M. B. A. Development and Validation of Two Methods to Quantify Volatile Acids (C2-C6) by GC/FID: Headspace (Automatic and Manual) and Liquid-Liquid Extraction (LLE). **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 5, n. 7, p. 406–414, 2014.
- ALMEIDA, R. G. B. DE et al. Nitrogen removal by simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification (SNAD) in a structured-bed reactor treating animal feed processing wastewater: Inhibitory effects and bacterial community. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 133, p. 108–115, 2018.
- ANDERSON, G. K.; YANG, G. Determination volatile acid of bicarbonate a simple total concentration using in anaerobic titration digesters. **Water Environment Research**, v. 64, n. 1, p. 53–59, 1992.
- ANDERSON, I. C. et al. A comparison of NO and N₂O production by the autotrophic nitrifier *Nitrosomonas-Europaea* and the heterotrophic nitrifier *Alcaligenes-Faecalis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 11, p. 3525–3533, 1993.
- ANTHONISEN, A. C. et al. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. **Journal Water Pollution Control Federation**, v. 48, n. 5, p. 835–852, 1976.
- APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water**. first ed. Washington DC: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environmental Federation, 2012.
- ARAÚJO, J. C. **Caracterização e evolução do biofilme em reator anaeróbio de leito fluidificado com esgoto sanitário sintético**. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1995.
- ARAÚJO JÚNIOR, M. M. **Reator combinado anaeróbio-aeróbio de leito fixo para remoção de matéria orgânica e nitrogênio de água residuárias de indústria produtora de lisina**. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
- BAE, W. et al. Optimal operational factors for nitrite accumulation in batch reactors. **Biodegradation**, v. 12, n. 5, p. 359–366, 2001.
- BARANA, A. C. et al. Nitrogen and organic matter removal in an intermittently aerated

fixed-bed reactor for post-treatment of anaerobic effluent from a slaughterhouse wastewater treatment plant. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 1, n. 3, p. 453–459, 2013.

BERISTAIN-CARDOSO, R. et al. Sulfide Oxidation Under Chemolithoautotrophic Denitrifying Conditions. **Biotechnology and Bioengineering**, n. 2, p. 1148–1157, 2006.

BILL, K. A.; BOTT, C. B.; MURTHY, S. N. Evaluation of alternative electron donors for denitrifying moving bed biofilm reactors (MBBRs). **Water Science and Technology**, v. 60, n. 10, p. 2647–2657, 2009.

BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. The Proteobacteria (volume 2). In: G. M. GARRITY (Ed.). . **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. New York: Springer, 2005.

BUETTNER, C.; NOLL, M. Differences in microbial key players in anaerobic degradation between biogas and sewage treatment plants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 133, p. 124–132, 2018.

CAPORASO, J. G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature methods**, v. 7, n. 5, p. 335–6, 2010.

CHANG, C. N.; CHENG, H. B.; CHAO, A. C. Applying the Nernst Equation to Simulate Redox Potential Variations for Biological Nitrification and Denitrification Processes. **Environmental Science and Technology**, v. 38, n. 6, p. 1807–1812, 2004.

CHEN, K. C. et al. Real-time control of an immobilized-cell reactor for wastewater treatment using ORP. **Water Research**, v. 36, n. 1, p. 230–238, 2002.

CHEN, Q.; NI, J. Heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by novel isolated bacteria. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 9, p. 1305–1310, 2011.

CHIU, Y.-C. et al. Control of carbon and ammonium ratio for simultaneous nitrification and denitrification in a sequencing batch bioreactor. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 59, n. 1, p. 1–7, jan. 2007.

CLAROS, J. et al. Real-time control strategy for nitrogen removal via nitrite in a SHARON reactor using pH and ORP sensors. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 10, p. 1510–1515, 2012.

COLE, J. R. et al. Ribosomal Database Project: Data and tools for high throughput rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, 2014.

COLLERAN, E.; FINNEGAN, S.; LENS, P. Anaerobic treatment of sulphate-containing waste streams. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 67, p. 29–46, 1995.

COSTA, R. B. et al. Matrix effect assessment of an ion chromatographic method to determine inorganic anions in wastewater. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 229, n. 7, p. 212, 15 jul.

2018.

CUBAS, S. A. **Influência do tamanho da biopartícula e da agitação no desempenho de reatores anaeróbio em bateladas sequenciais, contendo biomassa utilizada, para tratamento de águas residuárias.** 129 p. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

DAIMS, H. et al. Complete nitrification by Nitrospira bacteria. **Nature**, v. 528, n. 7583, p. 504–509, 2015.

DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; FORESTI, E. Dynamics of sulfidogenesis associated to methanogenesis in horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 9, p. 1050–1054, 2009.

DESANTIS, T. Z. et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 5069–5072, 2006.

DÍAZ, C. et al. Aminiphilus circumscriptus gen. nov., sp. nov., an anaerobic amino-acid-degrading bacterium from an upflow anaerobic sludge reactor. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 1914–1918, 2007.

DILALLO, R.; ALBERTSON, O. E. Volatile acids by direct titration. **Journal Water Pollution Control Federation**, v. 33, n. 4, p. 356–365, 1961.

EDGAR, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**, v. 26, n. 19, p. 2460–2461, 2010.

ENSIGN, S. A.; HYMAN, M. R.; ARP, D. J. In vitro activation of ammonia monooxygenase from Nitrosomonas europaea by copper. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 7, p. 1971–1980, 1993.

ERGUDER, T. H. et al. Partial nitrification achieved by pulse sulfide doses in a sequential batch reactor. **Environmental Science and Technology**, v. 42, n. 23, p. 8715–8720, 2008.

FERNANDES, H. et al. Full-scale sequencing batch reactor (SBR) for domestic wastewater: performance and diversity of microbial communities. **Bioresource Technology**, v. 132, p. 262–268, mar. 2013.

FILHO, J. LU. R. P. **Remoção de Matéria Orgânica Carbonácea e Nitrogênio em Reator Aeróbio-Anóxico de Leito Fixo (RAALF) Aplicado ao Pós- Tratamento de Efluente de Reator Anaeróbio.** p. 173, Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

FINKMANN, W.; ALTENDORF, K.; STACKEBRANDT, E. Characterization of N₂O-

producing *Xanthomonas* -like isolates from biofilters as *Stenotrophomonas nitritireducens* sp. nov., *Luteimonas mephitis* gen. nov., sp. nov. and *Pseudoxanthomonas broegbernensis* gen. nov., sp. nov. n. 2000, p. 273–282, 2018.

FITZGERALD, C. M. et al. Ammonia-oxidizing microbial communities in reactors with efficient nitrification at low-dissolved oxygen. **Water Research**, v. 70, p. 38–51, 2015.

FORD, D. L.; CHURCHWELL, R. L.; KACHTICK, J. W. Comprehensive analysis of nitrification of chemical processing wastewaters. **Water Environment Federation**, v. 52, n. 11, p. 2726–2746, 1980.

FORESTI, E.; ZAIAT, M.; VALLERO, M. Anaerobic Processes as the Core Technology for Sustainable Domestic Wastewater Treatment: Consolidated Applications, New Trends, Perspectives, and Challenges. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 5, n. 1, p. 3–19, fev. 2006.

FU, Z. et al. Control of COD/N ratio for nutrient removal in a modified membrane bioreactor (MBR) treating high strength wastewater. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 136–41, 2009.

FURUMAI, H.; TAGUI, H.; FUJITA, K. Effects of pH and alkalinity on sulfur-denitrification in a biological granular filter. **Water Science and Technology**, v. 34, n. 1–2, p. 355–362, 1996.

GABY, J. C.; ZAMANZADEH, M.; HORN, S. J. The effect of temperature and retention time on methane production and microbial community composition in staged anaerobic digesters fed with food waste. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, p. 302, 2017.

GARRETT, T. R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, v. 18, n. 9, p. 1049–1056, 2008.

GODOI, L. A. G. DE; FORESTI, E.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z. Down-flow fixed-structured bed reactor: An innovative reactor configuration applied to acid mine drainage treatment and metal recovery. **Journal of Environmental Management**, v. 197, p. 597–604, 2017.

GODOI, L. A. G. et al. Evaluating and Refining Alkalinity Calculations Due to Sulfide and Bicarbonate Accessed by Titration in Anaerobic Sulfate-Reducing Bioreactors. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 228, n. 9, p. 1–12, 2017.

GODOI, L. A. G.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; FORESTI, E. Sulfidogenesis interference on methane production from carbohydrate-rich wastewater. **Water Science and Technology**, v. 72, n. 9, p. 1644–1652, 2015.

GONCHARUK, V. V. et al. The use of redox potential in water treatment processes. **Journal**

of Water Chemistry and Technology, v. 32, n. 1, p. 1–9, 2010.

GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, A.; REVAH, S. The effect of chemical oxidation on the biological sulfide oxidation by an alkaliphilic sulfoxidizing bacterial consortium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 2, p. 292–298, 2007.

GRIFFITHS, R. I. et al. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5488–5491, dez. 2000.

GUERRERO, R. B. S.; ZAIAT, M. Wastewater post-treatment for simultaneous ammonium removal and elemental sulfur recovery using a novel horizontal mixed aerobic-anoxic fixed-bed reactor configuration. **Journal of Environmental Management**, v. 215, p. 358–365, 2018.

GUPTA, R. S. The phylogeny of proteobacteria: relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 367–402, 2000.

GUPTA, R. S.; MAHMOOD, S.; ADEOLU, M. A phylogenomic and molecular signature based approach for characterization of the phylum spirochaetes and its major clades: proposal for a taxonomic revision of the phylum. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1–18, 2013.

HAROON, M. F. et al. Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage. **Nature**, v. 500, p. 567–570, 2013.

HARPER, S. R.; POHLAND, F. G. Recent developments in hydrogen management during anaerobic biological wastewater treatment. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 28, n. 4, p. 585–602, 1986.

HATZENPICHLER, R. Diversity, physiology, and niche differentiation of ammonia-oxidizing archaea. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 21, p. 7501–7510, 2012.

HE, Q. et al. Simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus removal in an aerobic granular sequencing batch reactor with mixed carbon sources: reactor performance, extracellular polymeric substances and microbial successions. **Chemical Engineering Journal**, v. 331, p. 841–849, 2018.

HE, T. et al. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by *Pseudomonas tolaasii* Y-11 without nitrite accumulation during nitrogen conversion. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 493–499, 2016.

HE, Z. et al. Modeling a nitrite-dependent anaerobic methane oxidation process: Parameters

- identification and model evaluation. **Bioresource Technology**, v. 147, p. 315–320, 2013.
- HE, Z. et al. Improvement of the trace metal composition of medium for nitrite-dependent anaerobic methane oxidation bacteria: Iron (II) and copper (II) make a difference. **Water Research**, v. 85, p. 235–243, 2015.
- HOOPER, A. B. et al. Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 71, p. 59–67, 1997.
- HULSHOFF POL, L. W. et al. Anaerobic treatment of sulphate-rich wastewaters. **Biodegradation**, v. 9, p. 213–224, 1998.
- IINO, T. et al. *Ignavibacterium album* gen. nov., sp. nov., a moderately thermophilic anaerobic bacterium isolated from microbial mats at a terrestrial hot spring and proposal of Ignavibacteria classis nov., for a novel lineage at the periphery of green sulfur bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 6, p. 1376–1382, 2010.
- ISA, Z.; GRUSENMEYER, S.; VERSTRAETE, W. Sulfate Reduction Relative to Methane Production in High-Rate Anaerobic Digestion: Technical Aspects. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 572–579, 1986.
- ITO, T. et al. Identification of a novel acetate-utilizing bacterium belonging to Synergistes group 4 in anaerobic digester sludge. **The ISME Journal**, v. 5, n. 12, p. 1844–1856, 2011.
- JANSSEN, A. J. H. et al. Biological sulphide oxidation in a fed-batch reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 47, n. 3, p. 327–333, 1995.
- JANSSEN, A. J. H. et al. Performance of a sulfide-oxidizing expanded-bed reactor supplied with dissolved oxygen. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 53, n. 1, p. 32–40, 1997.
- JOONG, K. K. et al. Aerobic nitrification-denitrification by heterotrophic Bacillus strains. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 17, p. 1897–1906, 2005.
- JOYE, S. B.; HOLLIBAUGH, J. T. Influence of sulfide inhibition of nitrification on nitrogen regeneration in sediments. **Science**, v. 270, p. 623–625, 1995.
- KALYUZHNYI, S. et al. DEAMOX - New biological nitrogen removal process based on anaerobic ammonia oxidation coupled to sulphide-driven conversion of nitrate into nitrite. **Water Research**, v. 40, n. 19, p. 3637–3645, nov. 2006.
- KELLER, A. H. et al. Metagenome-based metabolic reconstruction reveals the ecophysiological function of Epsilonproteobacteria in a hydrocarbon-contaminated sulfidic aquifer. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. DEC, p. 1–14, 2015.
- KODAMA, Y.; WATANABE, K. *Sulfuricurvum kujiense* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic, chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium isolated from an underground

- crude-oil storage cavity. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 2297–2300, 2004.
- KOENIG, A.; LIU, L. H. Autotrophic denitrification of landfill leachate using elemental sulphur. **Water Science and Technology**, v. 34, n. 5–6, p. 469–476, 1996.
- KÖNNEKE, M. et al. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. **Nature**, v. 437, n. 7058, p. 543–546, 2005.
- KRIEG, N. R. et al. The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes (volume 4). In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. New York: [s.n.]. p. 949.
- KUENEN, J. G. Colourless sulfur bacteria and their role in the sulfur cycle. **Plant and Soil**, v. 43, n. 1, p. 49–76, 1975.
- LANGMUIR, D. **Aqueous Environmental Geochemistry**. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hal, 1997.
- LAU, G. N. et al. Integration of sulphate reduction, autotrophic denitrification and nitrification to achieve low-cost excess sludge minimisation for Hong Kong sewage. **Water Science and Technology**, v. 53, n. 3, p. 227–235, 2006.
- LENS, P. N. L. et al. Biotechnological treatment of sulfate-rich wastewaters. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 41–88, 1998.
- LENS, P. N. L. et al. Biological removal of sulfurous compounds from inorganic wastewaters. In: LENS, P. N. L.; HULSHOFF POL, L. W. (Eds.). **Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution: Principles and Engineering**. London, UK: IWA Publishing, 2000. p. 153–173.
- LEWIS, A. E. Review of metal sulphide precipitation. **Hydrometallurgy**, v. 104, n. 2, p. 222–234, 2010.
- LI, B.; BISHOP, P. L. Oxidation-Reduction Potential Changes in Aeration Tanks and Microprofiles of Activated Sludge Floc in Medium- and Low-Strength wastewaters. **Water Environment Research**, v. 76, n. 5, p. 394–403, 2004.
- LI, J.; LU, X. Performance and microbial diversity in a low-energy ANF-WDSRBC system for the post-treatment of decentralized domestic wastewater. **Water**, v. 9, p. 330, 2017.
- LI, Y. et al. DO diffusion profile in aerobic granule and its microbiological implications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 4–5, p. 349–354, out. 2008.
- LI, Z. et al. Anaerobic 4-chlorophenol mineralization in an enriched culture under iron-

reducing conditions. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 118, n. 5, p. 529–532, 2014.

LIU, Y. et al. Study of operational conditions of simultaneous nitrification and denitrification in a Carrousel oxidation ditch for domestic wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 3, p. 901–6, fev. 2010.

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

LU, H. et al. The demonstration of a novel sulfur cycle-based wastewater treatment process: Sulfate reduction, autotrophic denitrification, and nitrification integrated (SANI®) biological nitrogen removal process. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 11, p. 2778–2789, 2012.

LU, H. et al. Elucidating the stimulatory and inhibitory effects of dissolved sulfide on sulfur-oxidizing bacteria (SOB) driven autotrophic denitrification. **Water Research**, v. 133, p. 165–172, 2018.

MA, W. et al. Enhanced nitrogen removal from coal gasification wastewater by simultaneous nitrification and denitrification (SND) in an oxygen-limited aeration sequencing batch biofilm reactor. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 84–91, 2017.

MAHMOOD, Q. et al. Comparison of Anoxic Sulfide Biooxidation Using Nitrate/Nitrite as Electron Acceptor. **Environmental Progress**, v. 26, n. 2, p. 169–177, 2007.

MAHMOOD, Q. et al. Isolation and characterization of *Pseudomonas stutzeri* QZ1 from an anoxic sulfide-oxidizing bioreactor. **Anaerobe**, v. 15, n. 4, p. 108–115, 2009.

MAILLACHERUVU, K. Y. et al. Sulfide Toxicity in Anaerobic Systems Fed Sulfate and Various Organics. **Water Environment Research**, v. 65, n. 2, p. 100–109, 1993.

MANCONI, I.; CARUCCI, A.; LENS, P. Combined Removal of Sulfur Compounds and Nitrate by Autotrophic Denitrification in Bioaugmented Activated Sludge System. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 98, n. 3, p. 551–560, 2007.

MARTÍN DE LA VEGA, P. T. et al. New contributions to the ORP & DO time profile characterization to improve biological nutrient removal. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 160–167, 2012.

MARTÍNEZ-SANTOS, M. et al. Treated and untreated wastewater effluents alter river sediment bacterial communities involved in nitrogen and sulphur cycling. **Science of the Total Environment**, v. 633, p. 1051–1061, 2018.

MECHICHI, T. et al. Phylogenetic and metabolic diversity of bacteria degrading aromatic

compounds under denitrifying conditions, and description of *Thauera phenylacetica* sp. nov., *Thauera aminoaromatica* sp. nov., and *Azoarcus buckelii* sp. nov. **Archives of Microbiology**, v. 178, n. 1, p. 26–35, 2002.

MENG, Q. et al. Effects of COD / N ratio and DO concentration on simultaneous nitrification and denitrification in an airlift internal circulation membrane bioreactor. **Journal of Environmental Sciences**, v. 20, n. 2, p. 933–939, 2008.

MICHAUD, S. et al. Methane yield as a monitoring parameter for the start-up of anaerobic fixed film reactors. **Water Research**, v. 36, n. 5, p. 1385–1391, 2002.

MILITON, C. et al. Ecological significance of Synergistetes in the biological treatment of tuna cooking wastewater by an anaerobic sequencing batch reactor. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 18230–18238, 2015.

MORAES, B. S.; ORRÚ, J. G. T.; FORESTI, E. Nitrogen and sulfide removal from effluent of UASB reactor in a sequencing fed-batch biofilm reactor under intermittent aeration. **Journal of Biotechnology**, v. 164, n. 3, p. 378–385, 2013.

MOURA, R. B. DE. **Remoção de matéria orgânica e nitrogênio de esgoto sanitário em reator de leito estruturado submetido à aeração intermitente e recirculação do efluente**. p. 132, Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos 2014.

MOURA, R. B. et al. Carbon-nitrogen removal in a structured-bed reactor (SBRRIA) treating sewage: Operating conditions and metabolic perspectives. **Journal of Environmental Management**, v. 224, p. 19–28, 2018.

MOURA, R. B.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; FORESTI, E. Nitrogen and carbon removal from synthetic wastewater in a vertical structured-bed reactor under intermittent aeration. **Journal of Environmental Management**, v. 98, p. 163–167, 15 maio 2012.

MULLER, E. B.; STOUTHAMER, A. H.; VAN VERSEVELD, H. W. A novel method to determine maximal nitrification rates by sewage sludge at a non-inhibitory nitrite concentration applied to determine maximal rates as a function of the nitrogen load. **Water Research**, v. 29, n. 4, p. 1191–1197, 1995.

MUYZER, G.; STAMS, A. J. M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 441–454, 2008.

NIELSEN, A. H.; VOLLERTSEN, J.; HVITVED-JACOBSEN, T. Kinetics and stoichiometry of aerobic sulfide oxidation in wastewater from sewers-effects of pH and temperature. **Water Environment Research**, v. 78, n. 3, p. 275–283, 2006.

- NOBU, M. K. et al. Microbial dark matter ecogenomics reveals complex synergistic networks in a methanogenic bioreactor. **The ISME Journal**, v. 9, p. 1710–1722, 2015.
- NUNOURA, T. et al. *Kosmotoga arenicorallina* sp. nov. a thermophilic and obligately anaerobic heterotroph isolated from a shallow hydrothermal system occurring within a coral reef, southern part of the Yaeyama Archipelago, Japan, reclassification of *Thermococcoides shengliensis*. **Archives of Microbiology**, v. 192, n. 10, p. 811–819, 2010.
- O'FLAHERTY, V. et al. Effect of pH on growth kinetics and sulphide toxicity thresholds of a range of methanogenic, syntrophic and sulphate-reducing bacteria. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 5, p. 555–569, 1998.
- ORTIZ, D. I. B. et al. Inhibitory effect of sulfide on the nitrifying respiratory process. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 88, n. 7, p. 1344–1349, 2013.
- OSWALD, K. et al. Crenothrix are major methane consumers in stratified lakes. **The ISME Journal**, v. 11, n. 9, p. 2124–2140, 2017.
- PANTOJA FILHO, J. L. R. et al. Nitrogen and residual organic matter removal from anaerobic reactor effluent in a fixed-bed reactor with biogas for denitrification. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 90, n. 12, p. 2227–2233, 2014.
- PARK, H. D. et al. Occurrence of ammonia-oxidizing archaea in wastewater treatment plant bioreactors. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 8, p. 5643–5647, 2006.
- PARKIN, G. F.; SPEECE, R. E. Attached versus suspended growth anaerobic reactors: Response to toxic substances. **Water Science and Technology**, v. 15, n. 8–9, p. 261–289, 1983.
- PELAZ, L. et al. Denitrification of the anaerobic membrane bioreactor (AnMBR) effluent with alternative electron donors in domestic wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 1173–1179, 2017.
- PÉREZ, R. et al. Biological Nitrogen Removal (BNR) using sulfides for autotrophic denitrification in a Sequencing Batch Reactor (SBR) to treat reject water. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 46, n. 21, p. 6646–6649, 2007.
- PHILIPS, S.; LAANBROEK, H. J.; VERSTRAETE, W. Origin, causes and effects of increased nitrite concentrations in aquatic environments. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 1, n. 2, p. 115–141, jun. 2002.
- POCHANA, K.; KELLER, J. Study of factors affecting simultaneous nitrification and denitrification (SND). **Water Science and Technology**, v. 39, n. 6, p. 61–68, 1999.
- REYES-AVILA, J.; RAZO-FLORES, E.; GOMEZ, J. Simultaneous biological removal of nitrogen, carbon and sulfur by denitrification. **Water Research**, v. 38, n. 14–15, p. 3313–

3321, 2004.

RIPLEY, L. E.; BOYLE, W. C.; CONVERSE, J. C. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. **Journal of the Water Pollution Control Federation**, v. 58, n. 5, p. 406–411, 1986.

RITTMANN, B. E.; LANGE LAND, W. E. Simultaneous denitrification with nitrification in single-channel oxidation ditches. **Journal Water Pollution Control Federation**, v. 57, n. 4, p. 300–308, 1985.

ROBERTSON, L. A.; KUENEN, J. G. Heterotrophic Nitrification in Thiosphaera pantotropa: oxygen uptake and enzyme studies. **Journal of General Microbiology**, v. 134, p. 857–863, 1988.

SAIA, F. T. et al. Microbial community in a pilot-scale bioreactor promoting anaerobic digestion and sulfur-driven denitrification for domestic sewage treatment. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, n. 2, p. 341–352, 2016.

SAKAMOTO, I. K. et al. **Microbial community characterization of granulated sludge from UASB reactors (full-scale) used in poultry slaughterhouse wastewater treatment systems by Illumina Miseq sequencing**. XII Latin American Workshop and Symposium on Anaerobic Digestion (DAAL). **Anais...**Cusco, Peru: 2016

SANTOS, C. E. D. et al. Influence of COD/N ratio and carbon source on nitrogen removal in a structured-bed reactor subjected to recirculation and intermittent aeration (SBRRIA). **Journal of Environmental Management**, v. 166, p. 519–524, 2016.

SANTOS, C. E. D. et al. Dynamics of the nitrification and sulfide-driven autotrophic denitrification processes in a single reactor using oxidation-reduction potential as an indicator of the process effectiveness. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, p. 9, 2018.

SCHLEGEL, H. G. **General Microbiology**. 7th. ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1995.

SEARS, K. et al. Impacts of reduced sulfur components on active and resting ammonia oxidizers. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 369–378, 2004.

SHAO, M. F.; ZHANG, T.; FANG, H. H. P. Sulfur-driven autotrophic denitrification: Diversity, biochemistry, and engineering applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 88, n. 5, p. 1027–1042, 2010.

SILVA, B. G.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; FORESTI, E. Effects of intermittent aeration

periods on a structured-bed reactor continuously fed on the post-treatment of sewage anaerobic effluent. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 20, p. 1–6, 2018.

SMITH, K. S.; INGRAM-SMITH, C. Methanosaeta, the forgotten methanogen? **Trends in Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 150–155, 2007.

SOUZA, T. S. O. **Desnitrificação autotrófica utilizando sulfeto como doador de elétrons para remoção de nitrogênio de efluentes de reatores anaeróbios utilizados no tratamento de esgotos sanitários**. Tese (Doutorado), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

STACKEBRANDT, E.; MURRAY, R. G. E.; TRUPER, H. G. Proteobacteria classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the “purple bacteria and their relatives”. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 38, n. 3, p. 321–325, 1988.

TAKAI, K. et al. *Sulfurimonas paralvinellae* sp. nov., a novel mesophilic, hydrogen- and sulfur-oxidizing chemolithoautotroph within the Epsilonproteo-bacteria isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete nest, reclassification of *Thiomicrospira denitrificans* as *S. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 56, n. 8, p. 1725–1733, 2006.

TANWAR, P. et al. Correlating on-line monitoring parameters, pH, DO and ORP with nutrient removal in an intermittent cyclic process bioreactor system. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 16, p. 7630–7635, 2008.

TCHOBANOGLOUS, G.; BURTON, F. L.; STENSEL, H. D. **Metcalf & Eddy Wastewater Engineering Treatment and Reuse**. 4. ed. New York: McGraw Hill Education, 2003.

TORRES, P. **Desempenho de um reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) de bancada no tratamento de substrato sintético simulando esgotos sanitários**. Dissertação (Mestrado), Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1992.

TSUTYIA, M. T.; SOBRINHO, P. A. **Coleta e transporte de esgoto sanitário**. Rio de Janeiro: ABES – Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2011.

TZENG, J.-H.; CHEN, S.-C. Preliminary Silver Chloride Separation for Chemical Oxygen Demand Analysis in Saline Water Samples. **Journal of Chinese Institute of Environmental Engineering**, v. 3, n. 4, p. 237–240, 1993.

VAN DE GRAAF, A. A. et al. Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1246–1251, 1995.

VARTOUKIAN, S. R.; PALMER, R. M.; WADE, W. G. The division “Synergistes”. **Anaerobe**, v. 13, p. 99–106, 2007.

- VELA, J. D. et al. Prospects for biological nitrogen removal from anaerobic effluents during mainstream wastewater treatment. **Environmental Science and Technology**, v. 2, n. 9, p. 234–244, 2015.
- VON MÜNCH, E.; LANT, P.; KELLER, J. Simultaneous nitrification and denitrification in bench-scale sequencing batch reactors and literature. **Water Research**, v. 30, n. 2, p. 277–284, 1996.
- VYRIDES, I.; STUCKEY, D. C. Adaptation of anaerobic biomass to saline conditions: Role of compatible solutes and extracellular polysaccharides. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, n. 1, p. 46–51, 2009.
- WANG, A. J. et al. An innovative process of simultaneous desulfurization and denitrification by *Thiobacillus denitrificans*. **Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, v. 40, n. 10, p. 1939–1949, 2005.
- WANG, J. et al. A novel sulfate reduction, autotrophic denitrification, nitrification integrated (SANI) process for saline wastewater treatment. **Water Research**, v. 43, p. 2363–2372, 2009.
- WIJFFELS, R. H.; TRAMPER, J. Nitrification by immobilized cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, p. 482–492, 1995.
- WILÉN, B.-M.; GAPES, D.; KELLER, J. Determination of external and internal mass transfer limitation in nitrifying microbial aggregates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 86, n. 4, p. 445–457, 2004.
- WU, D. et al. Large-scale demonstration of the sulfate reduction autotrophic denitrification nitrification integrated (SANI®) process in saline sewage treatment. **Water Research**, v. 100, p. 496–507, 2016.
- YE, J. et al. Nitrogen removal by *Providencia rettgeri* strain YL with heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. **Environmental Technology**, v. 37, n. 17, p. 2206–2213, 2016.
- YOO, H. et al. Nitrogen removal from synthetic wastewater by simultaneous nitrification and denitrification (SND) via nitrite in an intermittently-aerated reactor. **Water Research**, v. 33, n. 1, p. 145–154, 1999.
- YUAN, X.; GAO, D. Effect of dissolved oxygen on nitrogen removal and process control in aerobic granular sludge reactor. **Journal of Hazardous Materials**, v. 178, n. 1–3, p. 1041–1045, 15 jun. 2010.
- ZAIAT, M.; CABRAL, A. K. A.; FORESTI, E. Reator anaeróbio de leito fixo para tratamento

de águas residuárias: Concepção e avaliação preliminar do desempenho. **Revista Brasileira de Engenharia – Caderno de Engenharia Química**, v. 11, p. 33, 1994.

ZENG, R. J. et al. Simultaneous nitrification, denitrification, and phosphorus removal in a lab-scale sequencing batch reactor. **Biotechnology and bioengineering**, v. 84, n. 2, p. 170–8, 20 out. 2003.

ZHANG, T. C.; LAMPE, D. G. Sulfur:limestone autotrophic denitrification processes for treatment of nitrate-contaminated water: Batch experiments. **Water Research**, v. 33, n. 3, p. 599–608, 1999.

ZHOU, W. et al. Autotrophic denitrification for nitrate and nitrite removal using sulfur-limestone. **Journal of Environmental Sciences**, v. 23, n. 11, p. 1761–1769, 2011.

APÊNDICE A – TESTES ESTATÍSTICOS

Tabela A1 – *Teste Mann-Whitney* para dados de eficiências de oxidação de N-NH_4^+ , desnitrificação e remoção de N-total na Etapa Experimental 1.

	Oxidação de N-NH_4^+		Desnitrificação		Remoção de N-total	
Resultado	Condição III	Condição IV	Condição III	Condição IV	Condição III	Condição IV
Tamanho da amostra	12	18	12	18	11	18
Soma dos postos (R_i)	161.0	304.0	201.5	294.5	158.0	277.0
Mediana	59.65	63.95	94.40	93.20	56.10	59.00
U	83.00		104.50		92.00	
Z(U)	1.0583		0.3853		0.3146	
p-valor (unilateral)	0.1450		0.3500		0.3765	
p-valor (bilateral)	0.2899		0.700		0.7530	

Tabela A2 – *Teste de Lilliefors* para análise da normalidade dos dados de eficiências de oxidação de N-NH₄⁺, desnitrificação e remoção de N-total na Etapa Experimental 2.

	Oxidação de N-NH ₄ ⁺		Desnitrificação		Remoção de N-total	
Resultado	Estratégia	Estratégia	Estratégia	Estratégia	Estratégia	Estratégia
	I	II	I	II	I	II
Tamanho da amostra	22	28	22	28	22	28
Desvio máximo	0.1093	0.1156	0.1744	0.1443	0.1567	0.1111
Valor crítico (0.05)	0.1860	0.1686	0.1860	0.1686	0.1860	0.1686
Valor crítico (0.01)	0.2198	0.1934	0.2198	0.1934	0.2198	0.1934
p-valor	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Tabela A3 – Ferramenta ANOVA: um critério e Teste de Tukey para análise da diferença estatisticamente significativa das eficiências de oxidação de N-NH₄⁺ na Etapa Experimental 2.

Fontes de variação	GL	SQ	QM
Tratamentos	1	736.440	736.440
Erro	48	70.9e+02	147.764
F	4.9839		
p-valor	0.0285		
Média (Estratégia I)	58.900		
Média (Estratégia II)	65.2679		
Tukey	Diferença	Q	p-valor
Médias (I a II)	7.7315	3.1572	<0.05

Tabela A4 – Ferramenta *ANOVA*: um critério para análise da diferença estatisticamente significativa das eficiências de desnitrificação na Etapa Experimental 2.

Fontes de variação	GL	SQ	QM
Tratamentos	1	887.266	887.266
Erro	48	21.7e+03	451.075
F	1.9670		
p-valor	0.1638		

Tabela A5 – Ferramenta ANOVA: um critério e Teste de Tukey para análise da diferença estatisticamente significativa das eficiências de remoção de N-total na Etapa Experimental 2.

Fontes de variação	GL	SQ	QM
Tratamentos	1	18.2e+02	18.2e+02
Erro	48	46.9e+02	97.771
F	18.6157		
p-valor	0.0002		
Média (Estratégia I)	32.5455		
Média (Estratégia II)	46.600		
Tukey	Diferença	Q	p-valor
Médias (I a II)	12.1545	6.1018	<0.01