RACHEL BIANCALANA COSTA

**Avaliação de algumas estratégias para o uso do metano como
doador de elétrons na desnitrificação**

Orientador:
Prof. Tit. Eugênio Foresti

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos

2016

RACHEL BIANCALANA COSTA

**Avaliação de algumas estratégias para o uso do metano como
doador de elétrons na desnitrificação**

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

Orientador:
Prof. Tit. Eugênio Foresti

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos

2016

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

C837a Costa, Rachel Biancalana
Avaliação de algumas estratégias para o uso do
metano como doador de elétrons na desnitrificação /
Rachel Biancalana Costa; orientador Eugênio Foresti.
São Carlos, 2016.

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,
2016.

1. oxidação do metano. 2. desnitrificação. 3.
doador de elétrons. 4. pós-tratamento. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Engenheira **RACHEL BIANCALANA COSTA**.

Título da tese: "Avaliação do potencial de utilização do metano como doador de elétrons para desnitrificação".

Data da defesa: 02/09/2016.

Comissão Julgadora:

Resultado:

Prof. Titular **Eugenio Foresti**
(Orientador)

(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Aprovada

Profa. Associada **Maria Bernadete Amâncio Varesche Silva**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Aprovada

Dra. **Valéria Maia Merzel**

(Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP)

Aprovada

Prof. Dr. **Guilherme Peixoto**

(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP - Araraquara)

Aprovada

Profa. Dra. **Juliana Calábria de Araujo**

(Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG)

Aprovada

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

Profa. Associada **Maria Bernadete A. Varesche Silva**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Associado **Luis Fernando Costa Alberto**

Aos meus pais, que me ensinaram a sempre manter a integridade de
espírito.

Ao Fabrício, com quem eu escolhi somar sonhos.

AGRADECIMENTOS

Confesso que eu pensei muito sobre a seção de agradecimentos ao longo dos últimos meses. Mais do que minha preocupação com a redação e o receio de esquecer alguém, pensar sobre os motivos e sobre as pessoas às quais eu sou grata foi uma estratégia nos momentos de desânimo, tão naturais a qualquer doutorando. Não que o processo de doutoramento seja triste, mas fazer ciência pressupõe que nunca estejamos na zona de conforto e isso pode ser um tanto quanto assustador em alguns momentos. O doutoramento é a fase em que esse desconforto é mais latente, pois é um processo desestabilizador de nossas certezas intelectuais e emocionais. E por isso, foi tão importante ter pessoas tão queridas ao meu lado.

Assim, sou profundamente grata ao meu melhor amigo e companheiro, Fabrício, pelo apoio, pelo cuidado, pela compreensão. Obrigada por compreender meus silêncios e meus desabafos, por ter mais fé em mim do que eu mesma, por me incentivar, cuidar de nós nas fases em que precisei me dedicar 24 horas por dia ao trabalho, e até por “puxar a minha orelha” quando foi preciso. Obrigada por acreditar num mundo mais justo e igualitário, e por construir isso comigo nas pequenas coisas cotidianas e nas grandes decisões das nossas vidas.

Agradeço aos meus pais, Érica e Nilson, que abdicaram de muitos de seus sonhos para que eu e minhas irmãs pudéssemos voar alto e sem limites. Obrigada por me ensinarem a manter a “mente aberta, a espinha ereta, o coração tranquilo”. Agradeço especialmente ao meu pai, por ter sido forte quando o “vento que entortou a flor passou pelo nosso lar”.

Agradeço às minhas irmãs, Marina e Júlia, por serem minhas grandes amigas e por sempre me falarem das coisas bonitas que eu acredito e que não deixarão de existir, não importa o quanto o adulto balance. Agradeço a Grace, que trouxe muita alegria e colorido para família. E aos cunhados mais que especiais, Bruno e Felipe, pelo afeto.

Agradeço ao meu orientador, Profº Eugênio Foresti, por ter confiado no meu trabalho. Obrigada por ser mais que um orientador acadêmico, por ser também um mentor para a vida toda. Agradeço pela generosidade ao compartilhar conhecimento e sabedoria. Sou especialmente grata por ter me formado num grupo de pesquisa onde as pessoas dividem os saberes e, por isso, vão

mais longe juntas. O senhor foi um líder idealizador e realizador desse grupo e espero que nós, que fomos alunos do LPB, possamos replicar isso.

Agradeço ao Prof^o Marcelo Zaiat e à Prof^a Márcia H. R. Z. Damianovic, pelas sugestões nas bancas de qualificação, pela oportunidade nas monitorias PAE e pela amizade. É uma alegria ter amizade de pessoas por quem também nutro grande admiração.

À prof^a Maria Bernadete Amâncio Varesche pela oportunidade da Iniciação Científica e à prof^a Lorena Lima de Oliveira, por ter me ensinado os procedimentos de laboratório, o básico e o não tão básico do tratamento de dados e da redação científica. Trabalhar com vocês foi enriquecedor e me estimulou a seguir a carreira acadêmica.

Sou muito grata ao meu grande amigo Guilherme Oliveira (GHDO). Além de ser que uma das mentes mais brilhantes que eu já conheci, é um amigo generoso. Obrigada pelas conversas filosóficas sobre a vida, pelas indicações de filmes, séries e livros, pelas discussões sobre ciência, pela parceria nas monitorias PAE, pelas sugestões ao longo do trabalho e por me perdoar da minha terrível falha de nunca ter assistido a saga completa de *Star Wars*.

Agradeço também à queridíssima Priscila Camiloti – Pri, Bi, Miga, la Priscilinha – não importa o apelido, você é minha amiga da alma e uma das pessoas que mais admiro. Você é corajosa para enfrentar os desafios pessoais e profissionais que se colocaram. Mais que isso, você é corajosa para olhar para si mesma e ajudar os amigos a fazerem o mesmo. Em meio a tantas coisas importantes e difíceis que aconteceram ao mesmo tempo na sua vida, você ainda foi capaz de, diversas vezes, deixar de lado a sua turbulência pessoal para me ajudar a organizar meus medos, anseios e confusões. Muito obrigada por sempre me ajudar a colocar as coisas sob nova perspectiva e me ensinar quando devo ser pragmática e quando devo sonhar alto. Você uma pessoa nobre, Bi, que, para além de toda ajuda, ainda me deu a felicidade de estar ao lado seu e do Tiago num dos momentos mais importantes e felizes da vida de vocês. Nunca vou agradecer o suficiente.

Sou grata ao Tiago Palladino pela amizade e à Carla Eloísa Diniz dos Santos (Carlinha), “parceira” para todas as horas, desde a operação do cromatógrafo até as cachaças da vida. Agradeço ao Du Penteado, um dos amigos mais leais que eu fiz, ao Leandro, Lucas e Carol Gil, por tornarem o dia a dia do laboratório tão leve e engraçado. Com vocês eu aprendi muito sobre

procedimentos de análise e tive mais crises de riso do que eu posso contar. Tem situações que me fazem rir até hoje!

Sou profundamente grata ao Prof^o Dagoberto Yukio Okada, pela amizade, pela fundamental ajuda na parte da biologia molecular e por todos os *hacks* de Excel, tratamento estatístico, redação científica e de pedal (porque a vida não pode ser só trabalho!). Agradeço ao amigo Tiago Henrique Martins (Tiagão), pelas conversas cheias de *insights* que sempre aguçaram minha curiosidade científica.

Agradeço aos amigos do laboratório. Conviver com vocês foi enriquecedor em diversos sentidos. Agradeço à Ana Flávia, que tem uma energia contagiante até quando o teto está caindo sobre as nossas cabeças. À Vivian, em quem eu descobri uma amiga doce e ao mesmo tempo forte. À Adriana Maluf (Drica), extremamente competente, solícita e divertida. Ao Lord Vuitik, afinal, não é sempre que a gente tem chance de trabalhar ao lado da realeza. *Valar morghulis, babe!* Agradeço também à Camila, tem uma família linda e inspiradora, e à Lívia, que mesmo de jaleco, está sempre divando pela vida. Ao Tiago “Cebola” por ter sempre uma história fantástica e por trazer os melhores doces e às sempre animadas Laís e Inaê. Agradeço ao Thiago “IQSC” pelos altos papos, à Mara Rúbia e à Mari Carosia pelos diversos momentos de descontração. Agradeço também à Ju Kawanishi e ao Fabrício, sempre solícitos, ao Marcus Vinícius, ao Bruno Giz, à Tainá e ao Prof. Paulo. Agradeço em especial a Valéria del Nery por ter sido sempre um exemplo de competência e bom humor e pela companhia nos *mojitos* da *Bodeguita del Medio*.

Agradeço à Janja, à Carol Sabatini e à Inês por todo apoio técnico e, principalmente, pelo apoio emocional. Sou grata à Isabel e à Elô por todo suporte técnico na parte de microbiologia e biologia molecular e pela agradável convivência.

Agradeço também aos amigos que eram doutorandos enquanto eu estava na graduação e que foram muito importantes para a minha formação como cientista e como pessoa. Agradeço à Prof^a Renata Rodriguez por ter sido companheira aqui em São Carlos e por ter me adotado. Agradeço à Dani Vich, que é capaz de pensar nas melhores tiradas numa velocidade maior que um piscar de olhos e ao Prof^o Theo Syrtó Octavio de Souza (ou *Theobacillus*, para os mais próximos), que mostra que ser compenetrado e eficiente no trabalho não tem nada a ver com sisudez. Muito pelo contrário, seu humor sagaz é capaz de deslocar o olhar e fazer com que vejamos as coisas sob nova perspectiva. Agradeço ainda ao Prof^o Gustavo Mockaitis, um

exemplo de conduta científica Muito obrigada por me mostrarem o quanto a ciência pode ser fantástica, estimulante e divertida!

Sou muito grata a Lê, Bru, Ju, Camis e Lu – as Joselitas - por serem a família que eu escolhi em São Carlos. Eu jamais poderia esperar, naquela primeira semana de aula da graduação, quando fomos morar juntas, que vocês estariam comigo para a vida toda. Amo vocês! Sou também grata aos meus amigos Anne e Márcio, pela amizade, pelos jantares, pelo aprendizado. Estar com vocês é sempre conhecer um mundo novo. Sou muito grata à Maria Luiza, por estar sempre presente. Não importa o quão diferente sejamos, nosso laço é forte. Afinal, não é com qualquer pessoa que se divide uma casa, quanto mais um carro-casa!

Agradeço ao Profº Benedito pelo incentivo e pela torcida. Obrigada a toda equipe do escritório onde eu estagiei – Eng. Maurício e Rui. O que eu aprendi com vocês contribuiu para a pessoa que eu sou hoje. Um agradecimento especial ao Matheus “Slot” e ao Marcelo “Alface”. Foi muito gratificante conviver com vocês na época da graduação e depois trabalhar com vocês. Fico contente de ver as pessoas e os profissionais que vocês são hoje.

Agradeço aos funcionários do departamento de Hidráulica e Saneamento e do prédio da Engenharia Ambiental. Agradeço à Rose, cuja simpatia é proporcional à eficiência, à Sá e à Priscila da secretaria do programa de pós-graduação, à Silvana, ao Fernando Moura, que salva a pátria e os nossos computadores pelo menos uma vez por semana, ao seu Antônio, à d. Rosa e à Andrea, que sempre com muita alegria e competência, contribuem para que a nossa estrutura de trabalho permaneça funcionando. Eu tenho certeza de que fazer ciência só é possível por causa do cuidado com que eles realizam seus trabalhos.

Agradeço ao Prof. Dr. Claudio Augusto Oller do Nascimento, que forneceu o sedimento marinho e o sedimento de mangue utilizados como inóculo na Etapa 1, à Dra. Adriana Miwa (BIOTACE) pelo auxílio na liofilização de amostras, e à Dra Marilda Keico Taciro(ICB-USP) pelo auxílio nas análises de PHB.

Agradeço a Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Processo FAPESP 2013/08527-8 - e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão das bolsas e pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa.

“A realidade sempre tem esse poder de surpresa. Surpreende-te com a resposta que dá a perguntas nunca formuladas. E que são as mais tentadoras. O grande estímulo para a vida está aí, na capacidade de adivinhar possíveis perguntas não formuladas”.

Eduardo Galeano, escritor uruguaio (1940-2015)

RESUMO

COSTA, R. B. **Avaliação de algumas estratégias para o uso de metano como doador de elétrons na desnitrificação.** 2016. 165 p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

O principal objetivo deste trabalho foi a avaliação de estratégias que viabilizassem o uso do metano como doador de elétrons para desnitrificação em ambiente anóxico, visando à aplicação de tecnologia para pós-tratamento de efluente de reatores de manta de lodo e fluxo ascendente (UASB) aplicado no tratamento de esgoto sanitário. O trabalho foi dividido em cinco etapas, sendo que em todas elas o metano foi fornecido como única fonte de carbono orgânico. Na Etapa 1, foram comparados dois inóculos, em reatores em batelada sequenciais (SBR) com biomassa imobilizada. Como inóculo, foi utilizada mistura de sedimento marinho e sedimento de mangue (SED-SBR) ou lodo de reator UASB (LAn-SBR). Na Etapa 2, foram avaliadas estratégias de enriquecimento da comunidade metanotrófica desnitrificante. Para tanto, foram operados dois SBRs: um com biomassa imobilizada (Imob-SBR) e outro com biomassa suspensa (Susp-SBR). Na Etapa 3, foi operado reator contínuo de leito fixo e estruturado e fluxo ascendente (Up-FSBR). Nas etapas 1 e 3, o metano suportou a ocorrência da desnitrificação e da manutenção celular. O consumo das formas nitrogenadas na Etapa 2 foi muito baixo e não foi possível concluir qual a melhor estratégia para enriquecimento da biomassa. Na Etapa 4, a biomassa retirada do Up-FSBR ao final da operação foi submetida a testes de endogenia. Foram operadas bateladas simples e, em cada uma, foi dosada apenas uma das formas nitrogenadas em condições com metano e sem metano. Os resultados mostraram que a redução das formas nitrogenadas é um processo paralelo à oxidação de metano. Na Etapa 5, foi avaliado o consumo de metano e de nitrato em SBR com biomassa suspensa em condições microaeradas e anóxicas. Foi observado que tanto a oxidação do metano quanto a redução do nitrato ocorrem em maior intensidade quando expostos a condições de microaerofilia. A análise dos resultados obtidos permite concluir que os organismos responsáveis pela redução de nitrato (MD) estabeleceram uma relação sintrófica com as bactérias oxidadoras de metano (MM). Observou-se que, quando as bactérias oxidadoras de metano foram estimuladas, a desnitrificação ocorreu em maior intensidade.

Palavras-chave: Oxidação do metano. Desnitrificação. Doador de elétrons. Pós-tratamento.

ABSTRACT

COSTA, R. B. **Evaluation of strategies to methane application as electron donor in denitrification process.** 2016. 165 p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

This work aimed to develop the methane (CH_4) application as electron donor to denitrification under anoxic conditions for post-treatment of Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) effluent, applied in sewage treatment systems. The study was conducted in five stages, in which methane was provided as the sole organic carbon source. In Stage 1, methanotrophic denitrification was assessed in Sequencing Batch Reactors (SBR) inoculated with a blend of marine and mangrove sediments (SED-SBR) or anaerobic sludge (LAn-SBR). For both inocula. In Stage 2, strategies for the enrichment of methanotrophic-denitrifying community were evaluated. Two SBRs were operated: in one of them, biomass was immobilized (Imob-SBR) while the other was inoculated with suspended biomass (Susp-SBR). In Stage 3, methanotrophic denitrification was addressed in an Upflow Fixed-Structured Bed Reactor (Up-FSBR). In Stages 1 and 3, methane supported denitrification and cellular maintenance. In Stage 2, the consumption of oxidized nitrogen compounds was too low, and it was not possible to conclude which is the better strategy for enrichment of the methanotrophic-denitrifying community. In Stage 4, the biomass withdrawn from Up-FSBR was subjected to endogeny tests, in batch reactors. In each batch reactor, only nitrite or nitrate was provided, and both methane and methane-free conditions were tested. It was observed that nitrite and nitrate reduction occurred as a marginal process. In Stage 5, methane oxidation coupled to denitrification was assessed under both anoxic and microoxic conditions and both processes were stimulated under the latter. The obtained data suggest denitrifiers established a syntrophic relationship with methane-oxidizers, and when the latter was stimulated, the denitrification also occurred in greater extent.

Keywords: Methane oxidation. Denitrification. Electron donor. Post-treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Ciclo do Nitrogênio.....	36
Figura 3.2 - Rota de oxidação do metano em organismos metanotróficos aeróbios.....	43
Figura 3.3 - Ilustração esquemática dos processos de oxidação anaeróbia do metano acopladas à desnitrificação, observados experimentalmente.....	47
Figura 3.4 - Possíveis relações sintróficas entre organismos DAMO e ANNAMOX	52
Figura 4.1 - Material suporte utilizado nos SBR da Etapa 1, antes da inoculação	59
Figura 4.2 - Linha do tempo da Etapa 1	60
Figura 4.3 - Instalação do Up-FSBR.....	68
Figura 4.4 - Desenho esquemático do Up-FSBR.....	69
Figura 4.5 - Distribuição do material suporte no Up-FSBR.....	70
Figura 4.6 - Linha do tempo da Etapa 3, com alterações dos parâmetros experimentais.....	72
Figura 4.7 - Esquema para troca de atmosfera do <i>headspace</i> dos SBR utilizados na Etapa 5: Ensaio em condições microaeradas	83
Figura 4.8 - Preparo do frasco para fornecimento de O ₂ ao SBR-MO ₂	84
Figura 4.9 - Resultados esperados no ensaio de condições microaeradas.....	85
Figura 5.1 - Consumo das formas nitrogenadas para os reatores em batelada sequencial (SRB) na Etapa 1	96
Figura 5.2 - Reatores em batelada sequencial ao final da operação da Etapa 1.....	97
Figura 5.3 - <i>Boxplot</i> da carga de nitrogênio removida (a) e da atividade desnitrificante específica (b)	98
Figura 5.4 - Concentrações de sulfato observadas ao longo do ensaio de perfil temporal para biomassa SED-TP e LAn-TP	99
Figura 5.5 - Perfis temporais realizados na Etapa 1 utilizando NO ₂ ⁻ como aceptor de elétrons.....	103
Figura 5.6 - Perfis temporais realizados na Etapa 1 utilizando NO ₂ ⁻ como aceptor de elétrons.....	104
Figura 5.7 - Diagrama de Venn das OTUs identificadas nos inóculos (Sed _{inóc} e LAn _{inóc}) e as amostras enriquecidas (SED-SBR e LAn-SBR).....	107
Figura 5.8 - Famílias mais abundantes nas amostras Sed-SBR e LAn-SBR.....	110
Figura 5.9 - Curva E (t) obtida no ensaio hidrodinâmico do Up-FSBR.....	115
Figura 5.10 - Consumo das formas nitrogenadas (NO ₂ ⁻ e NO ₃ ⁻) ao longo da operação do Up-FSBR.....	117
Figura 5.11 - <i>Boxplot</i> de nitrito e nitrato consumidos ao longo da operação do Up-FSBR	118
Figura 5.12 - Grade inferior do reator contínuo com acúmulo de biomassa, que dificultava a distribuição uniforme do aporte de gás metano.....	120

Figura 5.13 - <i>Boxplot</i> do oxigênio dissolvido nas linhas de alimentação e recirculação da fase líquida do Up-FSBR	121
Figura 5.14 - <i>Boxplot</i> de amônia e de sulfato no afluente e no efluente do Up-FSBR	122
Figura 5.15 - Apara de espuma de poliuretano trocada no 80º dia de operação (a) e depois, já colonizada, no 200º dia de operação.....	123
Figura 5.16 - Famílias mais abundantes na amostra de biomassa do Up-FSBR	124
Figura 5.17 - Análise dos resíduos da curva de calibração de metano no GC Shimadzu GC-2014 depois do tratamento estatístico	129
Figura 5.18 - <i>Boxplot</i> do consumo de metano na Etapa 5	133
Figura 5.19 - <i>Boxplot</i> do consumo de nitrato na Etapa 5	135
Figura 5.20 - Famílias mais abundantes no Anox-SBR e no MO ₂ -SBR ao final da Etapa 5	138

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Características físico-químicas do metano.....	41
Tabela 4.1 - Características físicas dos inóculos utilizados na Etapa 1 e concentração de sólidos nos SBR após a inoculação	60
Tabela 4.2 - Composição do meio nutricional utilizado nos reatores em bateladas sequenciais na Etapa 161	
Tabela 4.3 - Composição das soluções de micronutrientes utilizadas na Etapa 1	62
Tabela 4.4 - Características do Up-FSBR	68
Tabela 4.5 - Características físicas do inóculo utilizado no suporte do Up-FSBR.....	73
Tabela 4.6 - Meio de Cultura para enriquecimento de cultura metanotrófica desnitrificante utilizado no Up-FSBR	74
Tabela 4.7 - Composição das soluções de micronutrientes utilizadas no meio de cultura do Up-FSBR....	74
Tabela 4.8 - Meio de cultura utilizado nas Etapas 4 e 5.....	78
Tabela 4.9 - Análise de Variância para o ajuste de um modelo pelo método dos mínimos quadrados	81
Tabela 5.1 - Mediana dos parâmetros de monitoramento dos SBR da Etapa 1, para os 186 dias de ensaio96	
Tabela 5.2 - Carga das formas nitrogenadas oxidadas para o SED-SBR e o LAn-SBR, para as três.....	100
Tabela 5.3 - Taxas de consumo de N utilizando o CH ₄ como doador de elétrons.....	101
Tabela 5.4 - Quantidades de leitura e índices de diversidade α para amostras SED _{inóc} , Sed-SBR, LAn _{inóc} e LAn-SBR, Etapa 1.....	106
Tabela 5.5 - Somatório de todas as OTUs referentes a organismos metanotróficos, metilotróficos e metilotróficos facultativos	108
Tabela 5.6 - Parâmetros obtidos no ensaio hidrodinâmico do Up-FSBR.....	115
Tabela 5.7 - Parâmetros de monitoramento do Up-FSBR.....	118
Tabela 5.8 - Dados de temperatura atmosférica e amplitude térmica na cabine onde estava montado o Up-FSBR	120
Tabela 5.9 - Dados de sólidos ao final da operação do Up-FSBR.....	122
Tabela 5.10 - Quantidades de leitura e índices de diversidade α para amostras do Up-FSBR.....	124
Tabela 5.11 - Médias do consumo de nitrogênio no ensaio de endogenia	127
Tabela 5.12 - Análise de variância para o ajuste do modelo de calibração do metano no Shimadzu GC-2014.....	130
Tabela 5.13 - Medição OD em frasco água de torneira– validação da metodologia para fornecimento de condições microaeradas	131
Tabela 5.14 - Consumo de metano nos Anox-SBR e MO ₂ -SBR, com diferentes intervalos de tempo no <i>input</i> de O ₂ (Δt).....	132

Tabela 5.15 - Consumo de metano nos Anox-SBR e MO ₂ -SBR.....	133
Tabela 5.16 - Controle abiótico para verificação de vazamento de gás pela tampa de butila	134
Tabela 5.17 - Média do consumo de nitrogênio na Etapa 5	134
Tabela 5.18 - Conteúdo de sólidos na biomassa ao final da operação do Up-FSBR (Etapa 3) e depois ao final do Ensaio em condições microaeradas (Etapa 5)	136
Tabela 5.19 - Quantidade de leituras, índices de diversidade α e índice de Bray-Curtis para as amostras Anox-SBR e MO ₂ -SBR, extraídas ao final da Etapa 5	137
Tabela 5.20 - Abundância relativa dos organismos metanotróficos e metilotróficos nas amostras Anox- SBR e MO ₂ -SBR, extraídas ao final da operação da Etapa 5.....	139
Tabela 5.21 - Meios de cultura para organismos metanotróficos	141

LISTA DE QUADROS

Quadro 3.1 - Síntese dos possíveis doadores de elétrons para oxidação de metano em ambiente anóxico	46
Quadro 3.2 - Reações globais envolvendo oxidação de metano em ambiente anóxico e a energia livre de Gibbs correspondente	46
Quadro 3.3 - Condições experimentais para enriquecimento de organismos capazes de realizar a oxidação do metano em ambiente anóxico acoplada à desnitrificação	50
Quadro 4.1 - Hipóteses testadas	56
Quadro 4.2 - Esquema da estrutura experimental da pesquisa	57
Quadro 4.3 - Estratégias de operação de cada um dos reatores em batelada sequencial operados na Etapa 1	59
Quadro 4.4 - Condições testadas nos perfis temporais da Etapa 1	63
Quadro 4.5 - Alterações dos parâmetros de operação do Up-FSBR.....	72
Quadro 4.6 - Condições experimentais da Etapa 4 - Ensaio de Endogenia.....	78
Quadro 4.7 - Critérios para decisão dos testes estatísticos aplicados a curva de calibração do metano	81
Quadro 4.8 - Análises físico-químicas e cromatográficas para monitoramento das etapas experimentais .	87
Quadro 4.9 - Parâmetros da equação para correção da constante de Henry segundo a temperatura dos gases (Eq. 12)	91
Quadro 4.10 - Testes não paramétricos utilizados	93
Quadro 5.1 - Condições testadas nos perfis temporais da Etapa 1	103
Quadro 5.2 - Síntese dos resultados obtidos ao longo das etapas experimentais.....	146

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANAMMOX	<i>Anaerobic Ammonium Oxidation</i>
ABFSB	<i>Anaerobic Bioreactor with a Fixed-Structured Bed</i>
AeOM	Oxidação aeróbia do metano
AeOM-D	<i>Denitrifying aerobic methane oxidation</i>
AMO	Amônia monoxigenase
ANME	Arquéias metanotróficas
AnMO	Oxidação anóxica do metano
Anox-SBR	SBR sob condições anóxicas
DAMO	<i>Denitrifying anaerobic methane oxidation</i>
BRS	Bactérias Redutoras de Sulfato
CANON	<i>Completely Autotrophic Nitrogen removal Over Nitrite</i>
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
COMAMMOX	<i>Complete Ammonia Oxidizer</i>
CSTR	<i>Continuous Stirred Tank Reactor</i>
DGGE	<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
GC	<i>Gas Chromatography</i>
IC	<i>Ionic Chromatography</i>
LAN-C	SBR inoculado com lodo anaeróbio e de mangue, na ausência de doador de elétrons
LAN-SBR	SBR inoculado com lodo anaeróbio, com metano como doador de elétrons
LAN-TP	Perfil Temporal do LAN-SBR
LPB	Laboratório de Processos Biológicos
MBR	<i>Membrane Bioreactor</i>
MD	Microrganismos desnitrificantes
MDH	Metanol-desidrogenase
MM	Microrganismos metanotróficos
MMO	Metano monoxigenase
MO ₂ -SBR	SBR sob condições aeradas
NADH	Nicotinamida adenine dinucleotídeo
OD	Oxigênio Dissolvido
OLAND	<i>Oxygen Limited Nitrification Denitrification</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OTU	<i>Operational Taxonomic Units</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico

pMMO	MMO expressa na forma particulada
PQQ	Pirrolo quinonina quinona
PU	Poliuretano
PVC	Cloreto de Polivinila
q.s.p	Quantidade suficiente para
RANA	Redução assimilativa de nitrato a amônia
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
rRNA	RNA ribossomal
SBR	<i>Sequencing Batch Reactor</i>
SDMO	<i>Sulfate-Dependent Methane Oxidation</i>
SED-C	SBR inoculado com mistura de sedimento marinho e de mangue, na ausência de doador de elétrons
SED-SBR	SBR inoculado com mistura de sedimento marinho e de mangue, com metano como doador de elétrons
Sed-TP	Perfil Temporal do Sed-SBR
SHARON	<i>Single Reactor High Activity Ammonia Removal Over Nitrite</i>
sMMO	MMO expressa na forma solúvel
SND	<i>Simultaneous Nitrification Denitrification</i>
SNIS	Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento
ST	Sólidos Totais
STF	Sólidos Totais Fixos
STV	Sólidos Totais Voláteis
SVTLM	Sólidos Voláteis Totais no Licor Misto
TDH	Tempo de detenção hidráulica
UASB	<i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket</i>
Up-FSBR	<i>Up-flow Fixed-Structured Bed</i>
UV	Radiação ultravioleta
VSNF	Válvula Solenóide Normalmente Fechada

LISTA DE SÍMBOLOS

ΔG°	Energia Livre de Gibbs
C	Concentração
$C_{\text{máx}}$	Concentração máxima
$E(t)$	Curva de tempo de residência
F	$C(t)/C_{\text{máx}}$
F	Estatística da Análise de Variância (ANOVA)
Gg	Giga grama (10^9 grama)
H	Estatística do teste de Kruskal-Wallis
N	Parâmetro do modelo de N-CSTR em série
nc	Número de ciclos
nm	Número de medidas
p	Nível de significância
ϕ	Diâmetro
Q	Vazão [vol.t^{-1}]
QR	Vazão de recirculação
R	Constante universal dos gases
t	Tempo
T	Temperatura experimental
$T^\ominus$	Temperatura nas condições padrão (298 K ou 25°C)
U	Estatística do teste de Mann-Whitney
W	Estatística do teste de Wilcoxon
$-\Delta\text{CH}_4$	Consumo de metano
Δt	Intervalo de tempo
$\bar{\theta}_h$	TDH médio
σ_θ^2	Variância adimensional do TDH
σ^2	Variância
K_H	Constante de Henry nas condições experimentais
$K_H^\ominus$	Constante de Henry nas condições padrão
$\Delta_{\text{soln}}H$	Entalpia da solução

SUMÁRIO

<u>1. INTRODUÇÃO</u>	27
<u>2. OBJETIVOS</u>	31
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
<u>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u>	33
3.1. DESAFIOS DA REMOÇÃO DE NITROGÊNIO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS	33
3.2. CICLO DO NITROGÊNIO APLICADO AO TRATAMENTO DE ÁGUA RESIDUÁRIA	35
3.3. TECNOLOGIAS PARA REMOÇÃO DE NITROGÊNIO DE ÁGUA RESIDUÁRIA	37
3.3.1. REMOÇÃO CONVENCIONAL DE NITROGÊNIO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS	37
3.3.2. NITRIFICAÇÃO E DESNITRIFICAÇÃO SIMULTÂNEAS	37
3.3.3. NITRIFICAÇÃO PELA VIA CURTA E SHARON®	38
3.3.4. ANAMMOX	39
3.3.5. CANON® E OLAND®	40
3.3.6. DESNITRIFICAÇÃO AUTOTRÓFICA UTILIZANDO COMPOSTOS REDUZIDOS DE ENXOFRE	40
3.4. OXIDAÇÃO DO METANO	41
3.4.1. OXIDAÇÃO AERÓBIA DO METANO (AEOM)	42
3.4.2. OXIDAÇÃO ANÓXICA DO METANO	44
3.5. COMENTÁRIOS FINAIS	53
<u>4. MATERIAIS E MÉTODOS</u>	55
4.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	55
4.2. ETAPA 1: ENSAIO EM BATELADA SEQUENCIAL PARA AVALIAÇÃO DE INÓCULOS PARA OBTENÇÃO DE BIOMASSA METANOTRÓFICA DESNITRIFICANTE	58
4.2.1. CARACTERÍSTICAS DO INÓCULO, DO MEIO SUPORTE E PROCEDIMENTO DE INOCULAÇÃO	59
4.2.2. MEIO DE CULTURA	60
4.2.3. ESTRATÉGIA DE OPERAÇÃO	62
4.2.4. PERFIS TEMPORAIS	63

4.2.5. CARACTERIZAÇÃO MICROBIANA POR SEQUENCIAMENTO DO rRNA 16S – PLATAFORMA ION TORRENT®	64
4.3. ETAPA 2: ENSAIO EM BATELADA SEQUENCIAL PARA COMPARAÇÃO ENTRE ESTRATÉGIAS DE ENRIQUECIMENTO	65
4.4. ETAPA 3: OPERAÇÃO DO REATOR DE LEITO FIXO E ESTRUTURADO	67
4.4.1. INOCULAÇÃO DO REATOR	72
4.4.2. MEIO DE CULTURA	73
4.4.3. ENSAIO HIDRODINÂMICO	75
4.4.4. CARACTERIZAÇÃO MICROBIANA POR SEQUENCIAMENTO DO rRNA 16S – PLATAFORMA ILLUMINA MiSeq	76
4.5. ETAPAS 4 E 5: ENSAIOS EM BATELADA COM BIOMASSA DO REATOR UP-FSBR	77
4.5.1. ETAPA 4: TESTE DE ENDOGENIA	78
4.5.2. ETAPA 5: ENSAIO EM BATELADA SEQUENCIAL EM CONDIÇÃO MICROAERADA	79
4.6. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E CROMATOGRÁFICAS	87
4.6.1. ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA DE ÍONS (IC)	88
4.6.2. ANÁLISE DE METANO POR CROMATOGRAFIA GASOSA	89
4.6.3. ANÁLISES COLORIMÉTRICAS	91
4.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	92
<u>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	<u>95</u>
5.1. ETAPA 1: ENRIQUECIMENTO DE BIOMASSA METANOTRÓFICA DESNITRIFICANTE ANÓXICA A PARTIR DE DOIS DIFERENTES INÓCULOS	95
5.1.1. PERFIS TEMPORAIS	102
5.1.2. CARACTERIZAÇÃO MICROBIANA POR SEQUENCIAMENTO rRNA 16S – PLATAFORMA ION TORRENT®	105
5.1.3. SÍNTESE DOS RESULTADOS DA ETAPA 1	112
5.2. ETAPA 2: ENSAIO EM BATELADA SEQUENCIAL PARA AVALIAÇÃO DE ESTRATÉGIAS DE ENRIQUECIMENTO DE BIOMASSA METANOTRÓFICA DESNITRIFICANTE	113
5.2.1. SÍNTESE DOS RESULTADOS NA ETAPA 2	114
5.3. ETAPA 3: OPERAÇÃO REATOR CONTÍNUO DE LEITO FIXO E ESTRUTURADO (UP-FSBR)	114
5.3.1. ENSAIO HIDRODINÂMICO	114
5.3.2. MONITORAMENTO DO UP-FSBR	116

5.3.3. CARACTERIZAÇÃO MICROBIANA POR SEQUENCIAMENTO rRNA 16S – PLATAFORMA ILLUMINA (UP-FSBR)	124
5.3.4. SÍNTESE DA OPERAÇÃO DO UP-FSBR	126
5.4. ETAPA 4: ENSAIO DE ENDOGENIA	126
5.4.1. SÍNTESE DOS RESULTADOS DA ETAPA 4	128
5.5. ETAPA 5: CONSUMO DE METANO EM CONDIÇÕES MICROAERADAS	129
5.5.1. TESTES PRELIMINARES	129
5.5.2. ETAPA 5: CONDIÇÕES MICROAERADAS	132
5.5.3. CARACTERIZAÇÃO MICROBIANA POR SEQUENCIAMENTO DO rRNA 16S – PLATAFORMA ILLUMINA 136	
5.5.4. SÍNTESE DOS RESULTADOS DA ETAPA 5	140
5.6. CONSIDERAÇÕES ACERCA DAS NECESSIDADES NUTRICIONAIS	140
5.7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	144
 6. CONCLUSÕES	 147
 7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	 149
 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 151

1. INTRODUÇÃO

Este trabalho parte da constatação de que as exigências em termos de remoção de nitrogênio de águas residuárias têm se tornado cada vez mais restritivas. No entanto, observa-se a consolidação da aplicação de reatores de manta de lodo e fluxo ascendente (UASB, na sigla em inglês) para tratamento de esgoto sanitário, especialmente no Brasil (CHERNICHARO et al., 2015). Embora reatores UASB apresentem vantagens para remoção de matéria carbonácea, são insuficientes no que tange à remoção de nutrientes (FORESTI; ZAIAT; VALLERO, 2006).

Assim, é imperioso que sejam adotados sistemas de pós-tratamento do efluente do UASB. O método mais convencional utilizado é a nitrificação autotrófica e a desnitrificação heterotrófica, sendo que esses processos costumam ocorrer em reatores distintos (TCHOBANOGLIOUS; BURTON; STENSEL, 2003). A desnitrificação heterotrófica utiliza compostos orgânicos facilmente biodegradáveis como doadores de elétrons; contudo, o reator UASB produz, em geral, efluente com baixo teor de matéria orgânica prontamente biodegradável (FORESTI; ZAIAT; VALLERO, 2006). Em decorrência disso, pode ser necessário adicionar fonte de carbono exógena, o que representa um aumento no custo operacional capaz de inviabilizar sua operação.

Dessa forma, e considerando a ampla adoção da tecnologia anaeróbia como alternativa nos sistemas de tratamento de esgoto sanitário, diversos grupos de pesquisa têm se dedicado à compreensão de processos que não dependam da presença de matéria orgânica para redução do nitrato. Uma abordagem possível é o uso de subprodutos da digestão anaeróbia como doadores de elétrons para desnitrificação, o que eliminaria a necessidade de adição de doadores externos e, portanto, diminuiria os custos operacionais.

Uma dessas linhas de pesquisa indica a possibilidade de utilizar o sulfeto gerado na digestão anaeróbia para viabilizar a desnitrificação autotrófica (SOUZA, 2011). Esse processo é realizado por bactérias quimiolitotróficas e que utilizam compostos oxidados de nitrogênio como receptores de elétrons, ao passo que emprega compostos inorgânicos de enxofre como doadores de elétrons (SOUZA, 2011).

O metano (CH_4) é outro subproduto do tratamento anaeróbio que poder ser utilizado como doador de elétrons para desnitrificação. Além do CH_4 ser o principal componente do biogás

gerado nos reatores anaeróbios, o efluente de reatores anaeróbios frequentemente se apresentam superconcentrados de metano dissolvido (PAUSS et al., 1990), mesmo aqueles utilizados no tratamento de esgoto sanitário (SOUZA; CHERNICHARO; MELO, 2012). Isso poderia ser utilizado para potencializar a desnitrificação com metano como doador de elétrons, uma vez que a resistência à transferência do metano gasoso para a fase líquida é, possivelmente, um dos obstáculos a essa via de desnitrificação. Ressalta-se que o aproveitamento de metano dissolvido só seria efetivo se a câmara de desnitrificação estiver a montante da câmara nitrificante (aeróbia), recebendo o efluente nitrificado.

A oxidação do metano acoplada à desnitrificação (AOM-D) pode ocorrer seguindo diversas rotas, podendo ser aeróbia (AeOM-D) ou anóxica (DAMO). A mais conhecida é a aeróbia, em que organismos metanotróficos aeróbios convertem o metano em um intermediário orgânico, que desempenhará a função de doador de elétrons para os organismos desnitrificantes heterotróficos (KNOWLES, 2005). Os possíveis intermediários gerados na oxidação do metano são o metanol, o citrato e o acetato (ZHU et al., 2016). Recentemente, foi descoberta a *Methylomonas denitrificans*, um tipo de bactéria metanotrófica aeróbia capaz de utilizar o nitrato como aceptor de elétrons em condições anóxicas (KITS; KLOTZ; STEIN, 2015).

A oxidação anaeróbia do metano acoplada à desnitrificação (DAMO) pode ocorrer segundo duas vias conhecidas: na primeira delas, o metano é oxidado por oxigênio intracelular formado durante a reação de redução de nitrito a N_2 (ETTWIG et al., 2010). A segunda possibilidade é a ocorrência de um processo chamado “metanogênese reversa completa”, em que arqueias oxidam o metano a dióxido de carbono (CO_2) enquanto reduzem o NO_3^- a NO_2^- (HAROON et al., 2013). Os processos de oxidação anóxica do metano, acoplados à desnitrificação, tendem a ser mais eficientes que os aeróbios (MODIN; FUKUSHI; YAMAMOTO, 2007) em termos de mols de metano oxidado por mols de nitrogênio reduzido. Além disso, os processos anóxicos dispensam fornecimento de energia para aeração.

A descoberta recente de organismos DAMO ampliou a compreensão do ciclo do nitrogênio e de suas interações com o ciclo do carbono. Além disso, inaugurou uma nova possibilidade para a remoção de nitrogênio de águas residuárias. Não obstante o metabolismo DAMO seja conhecido, a viabilidade de sua aplicação em sistemas de tratamento de águas residuárias não foi plenamente explorada. As baixas velocidades de crescimento celular dos

organismos DAMO e a baixa atividade desnitrificante reportada na literatura permanecem desafios a serem superados para aplicação desse processo. Assim, o objetivo deste trabalho de pesquisa foi estudar estratégias que potencializassem e viabilizassem o uso de organismos DAMO para o pós tratamento de efluente de reatores UASB aplicados ao tratamento de esgoto sanitário.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi definir estratégias que viabilizassem o uso de metano como doador de elétrons para desnitrificação em ambiente anóxico como alternativa para pós-tratamento de efluente de UASB nitrificado, aplicado ao tratamento de esgoto sanitário.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar diferentes inóculos para obtenção de cultura metanotrófica desnitrificante;
- Comparar o uso de biomassa imobilizada e suspensa como estratégias para enriquecimento de comunidade metanotrófica desnitrificante;
- Avaliar a atividade desnitrificante em sistema descontínuo (reator de bateladas sequenciais) e em reator contínuo de leito fixo e estruturado, utilizando metano como doador de elétrons e como única fonte de carbono orgânico;
- Avaliar a oxidação de metano em ambiente anóxico e em ambiente microaerado;
- Caracterizar a comunidade microbiana envolvida na oxidação anóxica do metano acoplada à desnitrificação;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. DESAFIOS DA REMOÇÃO DE NITROGÊNIO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS

As atividades humanas têm sido responsáveis por diversas mudanças nos ciclos biogeoquímicos, incluindo o do nitrogênio, o que tem provocado a contaminação de águas superficiais e subterrâneas por esse nutriente. Estima-se que os impactos relativos ao excesso das formas nitrogenadas no ambiente custem à União Européia pelo menos 70 bilhões de euros por ano (SUTTON et al., 2011). A maior parcela desses custos é devida aos prejuízos à saúde humana oriundos da emissão atmosférica de NO_x e NH_3 , especialmente relacionados ao uso de fertilizantes agrícolas.

Em ambientes aquáticos, a presença de compostos nitrogenados está ligada à eutrofização dos corpos d'água, sendo altamente prejudicial à biodiversidade aquática (TCHOBANOGLIOUS; BURTON; STENSEL 2003). Sutton et al. (2011) estimam que 80% das águas superficiais na União Européia estão expostas a alto risco de perda de biodiversidade, devido à contaminação por nitrogênio. Acresce que o fenômeno da eutrofização está relacionado às florações de algas nocivas, podendo desencadear diversas doenças nas populações que ingerem essa água (NRC, 2000).

Lamparelli (2004) relaciona as alterações da qualidade das águas superficiais brasileiras e a ocorrência de florações de algas potencialmente tóxicas aos baixos índices de tratamento de esgoto doméstico observados no país. Segundo o Relatório de 2014 do Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS), o índice de tratamento de esgoto no Brasil é de 40,8% (BRASIL, 2014) e grande parte dos sistemas existentes não contempla remoção de nutrientes (LAMPARELLI, 2004).

Nesse contexto, a tecnologia anaeróbia para tratamento de águas residuária tem se consolidado como importante alternativa. Em um levantamento feito em 2.734 estações de tratamento de esgoto (ETE) em seis países da América Latina, incluindo o Brasil, verificou-se que a aplicação de reatores de manta de lodo e fluxo ascendente (UASB) foi a terceira tecnologia mais adotada, estando presente em 17% das ETES (NOYOLA et al., 2012). Chernicharo et al. (2015) destacam que a aplicação de reatores UASB para tratamento de esgoto sanitário é uma tecnologia relativamente recente e que um dos fatores para que já seja vastamente adotada são os

custos mais baixos. Os autores calculam que a adoção de reatores UASB em ETE representa economia de 20-50% do custo de instalação e de mais de 50% dos custos de operação, em comparação com um sistema de lodo ativado convencional.

No entanto, não há remoção significativa de nutrientes em reatores UASB. Estima-se que efluentes de reatores UASB tratando esgoto sanitário apresentem concentração de amônia entre 30 e 50 mg $\text{NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ (KOBAYASHI¹ et al., 1983 apud FORESTI; ZAIAT; VALLERO, 2006; TORRES; FORESTI, 2001). O padrão de disposição de águas residuárias tratadas é de 20 mg N- $\text{NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$, segundo a Resolução CONAMA 430/11 (BRASIL, 2011), e o padrão de qualidade de águas é de 3,7 mg N- $\text{NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ para águas classe 1 e classe 2, de acordo com a Resolução CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005). Logo, os efluentes de reatores UASB aplicados a tratamento de esgoto doméstico devem passar por pós-tratamento para remoção de nitrogênio.

Destaque-se que as outras formas nitrogenadas (NO_2^- e NO_3^-) também podem ser prejudiciais à vida aquática e à saúde humana, conforme previamente discutido. A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que a concentração de nitrato não ultrapasse 10 mg.L⁻¹ em água de abastecimento, sendo esse limite referendado pela *Environmental Policy Agency* (EPA) nos EUA (EPA, 2009) e pela legislação brasileira, através da portaria nº2.914/2011 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011).

A remoção biológica de nitrogênio pelo processo convencional é feita em duas etapas: (i) nitrificação, onde a amônia é convertida a nitrato e (ii) desnitrificação, onde a o nitrato é levado a nitrogênio gasoso, podendo também ocorrer redução parcial dos compostos oxidados, levando à produção de óxidos nítrico e nitroso. A primeira é realizada por bactérias autotróficas aeróbias, ao passo que a segunda é efetuada por bactérias heterotróficas facultativas, que utilizam compostos orgânicos como doador de elétrons (TCHOBANOGLIOUS; BURTON; STENSEL, 2003).

Tchobanoglous, Burton e Stensel (2003) citam três formas de fornecer fonte de carbono para a desnitrificação heterotrófica convencional, a saber: (i) proveniente do despejo a ser tratado, (ii) proveniente do próprio lodo (decaimento endógeno) e (iii) adição de compostos orgânicos externos. Os mesmos autores argumentam que, nesse último caso, é vantajosa a adoção de

¹ Kobayashi H. A.; Stenstrom M. K.; Mah R. A. (1983) Treatment of low strength wastewater using the anaerobic filter. Water Res. 17(8): 903–909

compostos que impliquem menores coeficientes de produção celular, visando obter baixa produção de lodo. Essa característica é observada em compostos orgânicos que contém poucos átomos de carbono, como o metanol.

Dentre as três alternativas para desnitrificação heterotrófica convencional, a mais vantajosa é a utilização de doadores de elétrons presentes no próprio despejo a ser tratado. Todavia, o efluente de reatores UASB é pobre em matéria orgânica prontamente biodegradável, sendo necessário adicionar fontes externas para desnitrificação (FORESTI; ZAIAT; VALLERO, 2006). A adição de fontes externas de doadores de elétrons para desnitrificação, por sua vez, representa aumento de custos de operação do sistema. Assim, uma alternativa é a utilização de doadores de elétrons alternativos, especialmente aqueles que são subprodutos do sistema do reator UASB (FORESTI; ZAIAT; VALLERO, 2006).

3.2. CICLO DO NITROGÊNIO APLICADO AO TRATAMENTO DE ÁGUA RESIDUÁRIA

O ciclo do nitrogênio convencional inclui a fixação do gás dinitrogênio (N_2), a nitrificação (oxidação da amônia a nitrato, via nitrito) e a desnitrificação (redução do nitrato ou nitrito a gás dinitrogênio), sendo que os dois últimos são de particular interesse para o tratamento de água residuária. No entanto, o avanço científico recente tem tornado o ciclo do nitrogênio mais complexo (Figura 3.1).

Os organismos responsáveis pela oxidação da amônia a nitrito, chamados nitritantes e ligados ao gênero *Nitrosomonas*, são versáteis no metabolismo do nitrogênio. Em condições aeróbias, eles realizam a oxidação da amônia a nitrito, mas, quando submetidos a condições microaeradas, são capazes de combinar hidroxilamina (NH_2OH) e nitrito para gerar óxido nitroso (N_2O), no processo conhecido por desamonificação (HIPPEL et al., 1997). Esses mesmos organismos, quando submetidos a ambiente anóxico e na presença de nitrito, são capazes de converter amônia a óxido nítrico (NO), N_2O e até a N_2 (SCHMIDT et al., 2002; SCHMIDT; VAN SPANING; JETTEN, 2004). No entanto, as conversões realizadas por organismos *Nitrosomonas* em condições microaeradas ou anóxicas não são de interesse para aplicação tecnológica, uma vez que geram subprodutos tóxicos ou caracterizados por seu potencial de contribuir com o efeito estufa (VAN LOOSDRECHT, 2008).

Figura 3.1 - Ciclo do Nitrogênio

Fonte: Adaptado de van Loosdrecht (2008)

→Ciclo Convencional →ANAMMOX→ *Nitrosomonas* sob condições anóxicas
→*Nitrosomonas* sob condições microaeradas

Uma das rotas que merece destaque é a oxidação anaeróbia da amônia utilizando o nitrito como doador de elétrons. O grupo microbiano capaz de realizar essa conversão foi chamado de ANAMMOX (acrônimo para *ANaerobic AMMonia OXidation*). Embora tenham sido reportados apenas em meados dos anos 90 (VAN DE GRAAF et al., 1995), estima-se que eles sejam responsáveis por cerca de 50% da desnitrificação ocorrida em ambientes naturais (STROUS; JETTEN, 2004). Ademais, a descoberta de processos ANAMMOX foi um ponto de inflexão no conhecimento do ciclo biogeoquímico do nitrogênio e também nas aplicações tecnológicas para tratamento de água residuária.

Destaque-se que não consta, na Figura 3.1, as possíveis interações entre o ciclo do nitrogênio e do enxofre (seção 3.3.6) e nem com o ciclo do carbono. A oxidação do metano acoplada à desnitrificação é uma possibilidade de interação entre os dois ciclos e será abordada na seção 3.4.

3.3. TECNOLOGIAS PARA REMOÇÃO DE NITROGÊNIO DE ÁGUA RESIDUÁRIA

Em água residuária, o nitrogênio geralmente está presente na forma de íon amônio (NH_4^+) ou nitrogênio orgânico, sendo que esse último é convertido a NH_4^+ em reatores anaeróbios (FORESTI; ZAIAT; VALLERO, 2006). Uma vez que o ciclo biogeoquímico do nitrogênio é complexo, as possibilidades de aplicação de tecnologias para sua remoção de águas residuária também são vastas. Os fundamentos das tecnologias conhecidas serão brevemente apresentados nesta seção. A desnitrificação utilizando metano como doador de elétrons será posteriormente discutida, em maior profundidade, na seção 3.4.

3.3.1. Remoção convencional de nitrogênio de águas residuárias

Conforme mencionado anteriormente, o processo convencional de remoção de nitrogênio de águas residuária ocorre em duas etapas: a nitrificação, em que a amônia é levada a nitrato por bactérias autotróficas aeróbias, e a desnitrificação, em que nitrato é reduzido a N_2 por organismos heterotróficos facultativos. Em síntese, a remoção biológica de nitrogênio é feita pela oxidação da amônia a nitrato, seguida da redução do nitrato a nitrogênio gasoso, sendo que essas etapas ocorrem, geralmente, em reatores separados (TCHOBANOGLIOUS; BURTON; STENSEL, 2003).

É conveniente mencionar que a etapa de nitrificação, convencionalmente, ocorre em duas etapas: a nitrificação, em que amônia é oxidada a nitrito e a nitratação, em que o nitrito é oxidado a nitrato (TCHOBANOGLIOUS; BURTON; STENSEL, 2003). Recentemente, no entanto, foram reportados organismos capazes de realizar a oxidação da amônia diretamente a nitrato, sem passar pela geração de nitrito. Esses organismos são chamados comammox (acrônimo para *Complete Ammonia Oxidizers*) e são bactérias pertencente ao gênero *Nitrospira* (SANTORO, 2016).

3.3.2. Nitrificação e Desnitrificação Simultâneas

Na nitrificação e desnitrificação simultâneas (SND, na sigla em inglês), conforme o nome diz, os processos de oxidação aeróbia da amônia e de redução do nitrato ocorrem em um mesmo reator aerado. A SND se fundamenta na tese de que o floco biológico possui zonas aeróbias e anóxicas, permitindo a coexistência dos microrganismos nitrificantes e desnitrificantes dentro do

mesmo reator. A limitação à transferência de oxigênio dentro do floco resultaria na criação de zonas anóxicas próximas ao centro do floco, permitindo, assim, o estabelecimento dos organismos desnitrificantes. (POCHANA; KELLER, 1999).

Uma forma de promover a SND é prevendo aeração intermitente, ou seja, o volume reacional é submetido a condições de aerobiose e anoxia alternadamente, permitindo que, na fase óxica, o nitrogênio amoniacal seja levado a nitrato e, na fase anóxica, o nitrato seja convertido a nitrogênio gasoso. Esse processo se mostrou viável para aplicação em reatores de leito fixo estruturado e fluxo ascendente para tratamento de água residuária sintética simulando esgoto sanitário (SANTOS et al., 2016), de esgoto sanitário real (MOURA, 2014) e para pós-tratamento de efluente de UASB aplicado ao tratamento de abatedouro de aves (BARANA et al., 2013).

3.3.3. Nitrificação pela via curta e SHARON®

A nitrificação pela via curta e o processo SHARON® se fundamentam na manipulação das rotas convencionais de conversão das formas nitrogenadas. O processo tradicional de nitrificação ocorre em duas etapas: a nitrificação, na qual a amônia é oxidada a nitrito, e a nitratação, onde o nitrito é oxidado a nitrato (TCHOBANOGLIOUS; BURTON; STENSEL, 2003). A supressão da etapa de nitratação possibilita que a desnitrificação aconteça utilizando apenas o nitrito como aceptor de elétrons, o que significa redução de 40% na demanda de DQO para desnitrificação e de 25% da demanda de oxigênio para nitrificação, quando comparado aos processos que empregam também a etapa de nitratação (YOO et al., 1999). A supressão da etapa de nitratação pode ser feita uma vez que os microrganismos nitratantes apresentam velocidades de crescimento mais baixas que os nitritantes e, portanto, é possível operar o reator em condições operacionais viáveis para o estabelecimento das últimas, ao mesmo tempo em que é prevista lavagem constante das nitritantes do reator (HELLINGA et al., 1998).

O sistema SHARON (acrônimo para *Single Reactor High Activity Ammonia Removal Over Nitrite*) é operado sem retenção celular, em uma faixa de temperatura entre 30°C e 40°C e de pH entre 7 e 8, sendo que, nessa faixa de operação, as bactérias nitritantes são mais ativas (HELLINGA et al., 1998). Nessas condições, os organismos nitritantes são capazes de predominar no reator, enquanto as bactérias nitratantes não conseguem se estabelecer.

O reator é operado sob aeração intermitente, com adição de doador de elétrons na fase anóxica. A desnitrificação que ocorre nessa fase é utilizada para controle de pH (VAN LOOSDRECHT, 2008), uma vez que a nitrificação consome alcalinidade e a desnitrificação gera alcalinidade (TCHOBANOGLIOUS; BURTON, STENSEL, 2003). No trabalho original, Hellinga et al. (1998) sugerem adição de metanol como doador de elétrons. Para contornar a demanda de adição de doadores de elétrons externos, existe a possibilidade de se operar um reator para acúmulo de nitrito de forma a recircular seu efluente para uma câmara pré-anóxica (TCHOBANOGLIOUS; BURTON, STENSEL, 2003).

3.3.4. ANAMMOX

As bactérias ANAMMOX são organismos autotróficos e estritamente anaeróbios, capazes de utilizar amônia como doador de elétrons para desnitrificação de nitrito. Embora essa rota metabólica tenha sido prevista através de cálculos termodinâmicos já na década de 70 (BRODA, 1977² apud KUENEN, 2008), ela foi considerada não existente na natureza por muito tempo (STROUS; JETTEN, 2004). O processo ANAMMOX foi observado pela primeira vez em 1995 (VAN DE GRAAF et al., 1995) e hoje é considerado responsável por 70% da ciclagem de nitrogênio em ambientes marinhos (STROUS; JETTEN, 2004). O uso de meio de cultura adequado e a retenção eficiente de biomassa foram considerados fatores chaves para o cultivo dos organismos ANAMMOX (STROUS; JETTEN, 2004).

Uma das dificuldades na aplicação de processos ANAMMOX é a lenta velocidade de crescimento desses microrganismos, sendo que seu tempo de duplicação é de duas semanas (KUENEN, 2008). Há relatos de que não foi detectada atividade ANAMMOX nos primeiros 800 dias de operação do primeiro reator ANAMMOX em escala plena, em Rotterdam, na Holanda. Nesse período, as bactérias capazes da oxidação anaeróbia da amônia foram observadas apenas pelo emprego de técnicas específicas de microbiologia molecular (VAN DER STAR et al., 2007).

Alternativa diversa para aplicação do processo ANAMMOX é a configuração que combina um reator SHARON e um reator para oxidação da amônia. Assim, o SHARON teria a função de acumular nitrito, sendo capaz de produzir efluente com nitrito e amônia na proporção

² BRODA, E. Two kinds of lithotrophs missing in nature. *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie* v. 17, n. 6, p. 491-493, 1977

50% : 50% (KUENEN, 2008), e, no segundo reator, a amônia seria convertida a nitrogênio gasoso utilizando o nitrito como aceptor de elétrons. Esse sistema é comumente referido como SHARON®/ANAMMOX na literatura (VAN LOOSDRECHT, 2008).

3.3.5. CANON® e OLAND®

A nitrificação (i.e, nitrificação pela via curta) e a conversão do nitrito por processo ANAMMOX podem ocorrer em um mesmo reator. Esse processo se estabelece através da interação sintrófica entre organismos *Nitrosomonas* (nitritantes) e organismos ANAMMOX em um único reator mantido com baixas concentrações de oxigênio dissolvido (THIRD et al., 2001). Esse processo foi chamado de OLAND® (acrônimo para *Oxygen Limited Nitrification-Denitrification*) (KUAI; VERSTRAETE, 1998) e de CANON® (*Completely Autotrophic Nitrogen removal Over Nitrite*) (THIRD et al., 2001). Van Loosdrecht (2008) esclarece que, na época em que foi publicado o trabalho de Kuai e Verstraete (1998), permanecia a noção de que os organismos *Nitrosomonas* eram responsáveis pela desnitrificação aeróbia e só depois foi confirmado que eram organismos ANAMMOX que realizavam o processo de conversão do nitrito em ambiente anóxico. É por isso que a manutenção de baixas concentrações de oxigênio dissolvido é indispensável para permitir o estabelecimento de zonas anóxicas no reator, viabilizando o estabelecimento de organismos ANAMMOX (THIRD et al., 2001).

3.3.6. Desnitrificação autotrófica utilizando compostos reduzidos de enxofre

A remoção de nitrogênio de águas residuárias pode também ser feita via desnitrificação autotrófica, realizada por bactérias quimiolitotróficas e que utilizam compostos oxidados de nitrogênio como receptores de elétrons, ao passo que emprega compostos inorgânicos de enxofre como doadores de elétrons (BERISTAIN-CARDOSO et al., 2006).

Como esse processo é autotrófico, ele apresenta a vantagem de não demandar fonte de matéria orgânica para desnitrificação, o que é particularmente interessante caso o despejo tenha pouca disponibilidade de doadores de elétrons, como é o caso dos efluentes pré-tratados em reator UASB. Acresce que os processos anaeróbios produzem sulfeto, que pode ser utilizado como doador de elétrons. Souza (2011) relatou a viabilidade de se proceder à desnitrificação autotrófica para pós-tratamento de reatores UASB tratando esgoto sanitário, embora tenha relatado dificuldades na manutenção do sulfeto na fase líquida.

Uma variação da desnitrificação autotrófica é o sistema DEAMOX (*Denitrifying Ammonia Oxidation*), que associa a utilização do sulfeto como doador de elétrons para produção de nitrito a partir de nitrato. O nitrito gerado pela via autotrófica é então utilizado comoceptor de elétrons na oxidação anaeróbia da amônia (processo ANAMMOX) (KALYUZHNYI et al., 2006).

3.4. OXIDAÇÃO DO METANO

A oxidação biológica do metano pode ocorrer tanto pela via aeróbia quanto pela via anóxica/anaeróbia. Antes de discutir o processo biológico, serão feitas algumas considerações sobre esse composto. O metano é um gás inodoro cuja emissão pode ser tanto natural quanto antrópica. Ele contribui para o efeito estufa diretamente, pela absorção de radiação de ondas longas, e indiretamente, participando da formação de ozônio troposférico e vapor de água (CICERONE; OREMLAND, 1988). Seu potencial para provocar o efeito estufa 21 vezes maior que o impacto do dióxido de carbono (CO_2) (SOLOMON et al., 2007). Algumas das características físico-químicas são apresentadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Características físico-químicas do metano	
Parâmetro	Valor tabelado
Densidade (0°C) ^(†)	$0,7168 \text{ g.L}^{-1}$
Solubilidade em água (17°C) ^(†)	$35 \text{ mL.L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$
Constante de Henry ^(▲)	$1,3 \cdot 10^{-3} \text{ mol. (L.atm)}^{-1}$
Fontes: ^(†) The Merck Index (1996) e ^(▲) Sander (1999)	

Uma das fontes antrópicas de emissão do metano é o tratamento anaeróbio de água residuária, já que o CH_4 é subproduto da digestão anaeróbia. No Brasil, a emissão de metano proveniente de tratamento de despejos líquidos (domésticos e industriais) foi estimada em 745.377 Gg CH_4 em 2012 (BRASIL, 2014). A contribuição dos sistemas de tratamento de esgoto doméstico foi calculada em 437.603 Gg CH_4 em 2012, parcela equivalente a aproximadamente 60% o total de emissão de CH_4 proveniente do tratamento de despejos líquidos no país (BRASIL, 2014).

Apesar da baixa solubilidade do metano, efluentes de reatores anaeróbios podem apresentar concentrações desse composto dissolvido entre 15 e 25 $\text{mg CH}_4.\text{L}^{-1}$ (SOUZA; CHERNICHARO; MELO, 2012), valores acima do que seria esperado pela aplicação das

constantes de Henry (HARTLEY; LANT, 2006). Pauss et al. (1990) mediram o coeficiente volumétrico global de transferência de massa em três reatores metanogênicos com diferentes configurações (batelada alimentada de mistura completa, UASB e um UASB híbrido em que a parte superior era composta por filtro) e concluíram que esses sistemas apresentam baixa eficiência de transferência de massa. Os autores mediram que a concentração de metano em efluentes de reatores anaeróbios pode ser até 12 vezes superior ao teórico, calculado pela aplicação das constantes de equilíbrio (PAUSS et al., 1990). Esses resultados sugerem que sistemas metanotróficos podem ser adequados para pós-tratamento de efluente de UASB, desde que o reator para oxidação do metano seja imediatamente a jusante do UASB.

3.4.1. Oxidação Aeróbia do Metano (AeOM)

Os organismos metanotróficos aeróbios são um subgrupo dos organismos metilotróficos, que utilizam compostos de um carbono e são incapazes de oxidar ligações C-C (carbono-carbono) (HANSON; HANSON, 1996). A aplicação de organismos metanotróficos tem ganhado importância para aplicações biotecnológicas, uma vez que podem produzir biopolímeros, lipídeos e metabólitos solúveis (como metanol e formaldeído) (STRONG; XIE; CLARKE, 2015).

Os organismos capazes de realizar a oxidação aeróbia do metano (AeOM) são divididos em três grupos: tipo I e tipo X, relacionados à classe *Gammaproteobacteria* e o tipo II, relacionados à classe *Alphaproteobacteria* (MODIN; FUKUSHI; YAMAMOTO, 2007). No entanto, essa classificação não é completamente acurada para categorizar todos os organismos metanotróficos, como os pertencentes à *Verrumicrobia* (ZHU et al., 2016).

Os organismos AeOM são característicos por possuírem a enzima metano monooxigenase (MMO), que catalisa a oxidação do metano a metanol. O metanol é então oxidado a formaldeído pela metanol-desidrogenase (MDH), que, por sua vez, depende da pirrolo quinonina quinona (PQQ) como cofator (HANSON; HANSON, 1996). Uma porção do formaldeído é assimilada pela rota da ribulosemonofosfato (RuMP) ou pelo ciclo da serina, liberando intermediários orgânicos (HANSON; HANSON, 1996). A porção de formaldeído que não foi assimilada é oxidada a CO₂ pela rota do formiato, que, por sua vez, gera a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) necessária à etapa inicial de oxidação do metano (Figura 3.2).

A enzima metano monoxigenase pode se expressar na forma particulada (pMMO) ou na forma solúvel (sMMO), embora nem todos os organismos sejam capazes de expressar essa última (MODIN; FUKUSHI; YAMAMOTO, 2007). A expressão de uma ou de outra está relacionada à concentração de cobre. Para concentrações de cobre (Cu^{2+}) de até $1,0 \mu\text{mol Cu}^{2+} \cdot \text{g célula seca}^{-1}$, a sMMO é preponderante. Para concentrações de Cu^{2+} mais altas, a pMMO se expressa, sendo que ela permite maiores rendimentos celulares (HANSON; HANSON, 1996).

Figura 3.2 - Rota de oxidação do metano em organismos metanotróficos aeróbios

Fonte: Modin, Fukushi e Yamamoto (2007)

PQQ é a pirrolo quinonina quinona, cofator da enzima metanol monoxigenase. sMMO é a metano monoxigenase (MMO) expressada na forma solúvel e a pMMO indica essa enzima expressa na forma particulada. $\downarrow[\text{Cu}^{2+}]$ indica baixa concentração de cobre (até $1,0 \mu\text{mol Cu}^{2+} \cdot \text{g célula seca}^{-1}$) e $[\text{Cu}^{2+}] \uparrow$ indica alta concentração de cobre.

A MMO apresenta semelhanças com a Amônia Monoxigenase (AMO), que é a enzima responsável pela oxidação da amônia em organismos nitrificantes. Assim, os organismos metanotróficos e os nitrificantes são versáteis para oxidar tanto o metano como a amônia (BÉDARD; KNOWLES, 1989). A presença de amônia pode provocar inibição competitiva da oxidação de metano, uma vez que, como a MMO tem habilidade de converter amônia a nitrito, parte da atividade enzimática é desviada para essa função, diminuindo a quantidade de metano consumido pelos organismos AeOM. Além disso, a oxidação da amônia por organismos AeOM gera hidroxilamina e nitrito como subprodutos, o que também pode inibir o consumo de metano (BODELIER; LAANBROEK, 2004). No entanto, há relatos de que a presença de amônia estimulou a oxidação aeróbia do metano, o que pode estar relacionado ao alto requerimento de nitrogênio dos organismos metanotróficos (BODELIER; LAANBROEK, 2004).

Os organismos AeOM apresentam versatilidade no metabolismo do nitrogênio, o que, possivelmente, é uma consequência da homologia entre as enzimas MMO e AMO (STEIN;

KLOTZ, 2011). Os organismos AeOM são capazes de assimilar NH_4^+ , NO_3^- e até N_2 (BODELIER; LAANBROEK, 2004) e de reduzir NO_3^- também por vias dissimilativas. Não obstante, o conhecimento do metabolismo das formas nitrogenadas permanece pouco explorado (HOEFMAN et al., 2014).

Oxidação Aeróbia do Metano acoplada à desnitrificação

A oxidação aeróbia do metano acoplada à desnitrificação (AeOM-D) em geral ocorre por meio de um consórcio microbiano, no qual organismos desnitrificantes heterotróficos utilizam os intermediários orgânicos excretados pelas bactérias metanotróficas aeróbias como fonte de energia (doador de elétrons) e carbono (KNOWLES, 2005). Outros autores já haviam observado o estabelecimento de dois grupos de microrganismos em ambientes de oxidação aeróbia de metano contendo nitrato (COSTA et al., 2000; EISENTRAEGER et al., 2001).

A utilização de processos AeOM-D tem sido considerada viável para tratamento de águas residuárias, lixiviado de aterro sanitário e água subterrânea contaminada com nitrato (ZHU et al., 2016). No entanto, existem alguns limitantes, como o risco de misturar dois gases inflamáveis (MODIN et al., 2008) e baixa solubilidade do metano (ZHU et al., 2016).

Recentemente, foi reportada a existência do *Methylomonas denitrificans*, um organismo metanotrófico aeróbio que, sob condições de anoxia, é capaz de reduzir nitrato a óxido nitroso (N_2O) (KITS; KLOTZ; STEIN, 2015). No entanto, essa via não é recomendada para aplicação tecnológica, uma vez que emite N_2O , um gás cujo efeito estufa potencial é 298 vezes o do dióxido de carbono (IPCC, 2007). Como o metabolismo do nitrogênio em organismos metanotróficos ainda não foi totalmente compreendido, é possível que existam outras alternativas de aplicação desses organismos para desnitrificação.

3.4.2. Oxidação Anóxica do Metano

A oxidação do metano em ambientes anóxicos (AnOM) foi sugerida pela primeira vez na década de 70, acoplada à redução de sulfato (REEBURGH, 1976). Não obstante, o metano foi considerado inerte na ausência de oxigênio durante a maior parte do século XX e apenas recentemente tem sido reconhecida a importância da AnOM para o ciclo do carbono. Estima-se hoje que 75% da oxidação do metano nos oceanos ocorra na ausência de oxigênio (STROUS; JETTEN, 2004). Algumas das dificuldades relacionadas à identificação desse processo é a

dificuldade em obter culturas puras e as baixas velocidades de crescimento celular, sendo que o tempo de duplicação de uma comunidade metanotrófica anóxica pode variar entre dias e meses (STROUS; JETTEN, 2004).

Hoehler et al. (1994) foram os primeiros a sugerir que a oxidação do metano acoplada à redução de sulfato (SDMO – *Sulfate-Dependent Methane Oxidation*) ocorria através de uma relação sintrófica bactérias redutoras de sulfato e de arqueias filogeneticamente relacionadas às arqueias metanogênicas. Dentre as bactérias redutoras de sulfato (BRS), as que são reportadas em ambientes de oxidação de metano são as pertencentes aos gêneros *Desulfosarcina*, *Desulfococcus* e *Desulfobulbus* (THAUER, 2011). As arqueias metanotróficas (ANME) encontradas em ambientes de SDMO costumam ser divididas em três grupos: aquelas relacionadas à ordem *Methanomicrobiales* (ANME-1) e outros dois grupos relacionados à ordem *Methanosarcinales* (ANME-2 e ANME-3) (THAUER, 2011). Destaque-se que, nas culturas em que as arqueias metanotróficas foram observadas, foi detectada alta concentração da metil-coenzima M redutase, responsável por catalisar a formação de metano em organismos metanogênicos. Isso sugere que a oxidação anóxica do metano nesses ambientes ocorre através de mecanismos de metanogênese reversa (THAUER, 2011).

A hipótese mais aceita é de que as arqueias produzam intermediários orgânicos que sejam utilizados como doadores de elétrons na redução de sulfato, embora nunca tenha sido observado nenhum composto intermediário (THAUER, 2011). Já foi sugerido que a transferência de elétrons entre as espécies possa ser direta, através de *nanowires* (STAMS; PLUGGE, 2009). A SDMO opera próxima do equilíbrio termodinâmico (THAUER, 2011), o que resulta em baixo saldo energético na relação sintrófica, mas compatível com a manutenção de células com crescimento lento (ALPERIN; HOEHLER, 2009).

A oxidação de metano em ambientes anóxicos (AnOM) pode ocorrer acoplado à redução de outros compostos, quase sempre sendo relatados em ambientes marinhos. Beal; House e Orphan (2009) relatam ter observado a oxidação do metano empregando ferro (como $\text{Fe}(\text{OH})_3$) e manganês (como MnO_2) como aceptores de elétrons, em reatores em batelada. A redução desses compostos em ambientes de oxidação anóxica do metano provavelmente auxilia na potencialização do rendimento energético da SDMO (SIVAN et al., 2014). A oxidação do metano acoplada à redução de óxidos de ferro e manganês também parece ocorrer em função de

relação sintrófica entre arqueias e bactérias, sendo que alguns organismos redutores de sulfato são capazes também de reduzir ferro (BEAL; HOUSE; ORPHAN, 2009) e manganês (HOUSE; BEAL; ORPHAN, 2011). Há também relatos de que todos esses processos (oxidação do metano, redução do sulfato, redução do ferro e do manganês) ocorram juntos com complexas interações entre eles, que ainda não foram totalmente compreendidas (SIVAN et al., 2014).

O Quadro 3.1 sintetiza as possíveis reações de oxidação do metano em ambiente anóxico, e o Quadro 3.2 apresenta as reações globais com a reação global e a energia livre de Gibbs atrelada a essa reação. Ressalta-se que oxidação anóxica do metano acoplada à desnitrificação (DAMO) será tratada em seção separada (seção 3.4.2.1), uma vez que é de particular interesse para este trabalho.

Aceptor de elétrons	Organismos envolvidos	Referência
SO_4^{2-}	Relação sintrófica entre arqueias metanotróficas (ANME) e BRS	(THAUER, 2011)
MnO_2	Relação sintrófica que inclui ANME, BRS e outros organismos não identificados	(BEAL; HOUSE; ORPHAN, 2009)
$Fe(OH)_3$	Relação sintrófica que inclui ANME, BRS e outros organismos não identificados	(BEAL; HOUSE; ORPHAN, 2009)
NO_2^-	<i>Candidatus Methyloirabilis oxyfera</i> (domínio Bacteria)	(ETTWIG et al., 2010)
NO_3^-	<i>Candidatus Methanoperedens nitroreducens</i> (domínio Archaea)	(HAROON et al., 2013)

Quadro 3.1 - Síntese dos possíveis doadores de elétrons para oxidação de metano em ambiente anóxico

Reação Global	Energia Livre de Gibbs (ΔG°) [kJ.mol ⁻¹]	Referência
$CH_4 + SO_4^{2-} \rightarrow HCO_3^- + HS^- + H_2O$	-14	(THAUER, 2011)
$CH_4 + 4 MnO_2 + 7 H^+ \rightarrow HCO_3^- + 4 Mn^{2+} + 5 H_2O$	-556	(BEAL; HOUSE; ORPHAN, 2009)
$CH_4 + 8 Fe(OH)_3 + 15 H^+ \rightarrow HCO_3^- + 8 Fe^{2+} + 21 H_2O$	-270,3	(BEAL; HOUSE; ORPHAN, 2009)
$3 CH_4 + 8 NO_2^- + 8 H^+ \rightarrow 3 CO_2 + 4 N_2 + 14 H_2O$	-928	(RAGHOEBARSING et al., 2006)
$CH_4 + 4 NO_3^- \rightarrow CO_2 + 4 NO_2^- + 2 H_2O$	-503	(HAROON et al., 2013)

Quadro 3.2 - Reações globais envolvendo oxidação de metano em ambiente anóxico e a energia livre de Gibbs correspondente

Oxidação Anaeróbia do Metano acoplada à Desnitrificação

A oxidação anóxica do metano acoplada à desnitrificação (DAMO) foi descoberta apenas na última década (RAGHOEBARSING et al., 2006). Diferentemente da oxidação do metano acoplada à redução do sulfato, do ferro e do manganês, o processo DAMO não foi reportado em relações sintróficas. Até hoje, foram encontrados dois tipos de organismos DAMO: bactérias identificadas como *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* (*M. oxyfera*) e arqueias reportadas como *Candidatus Methanoperedens nitroreducens* (*M. nitroreducens*). As reações realizadas pela *M. oxyfera* e pela *M. nitroreducens* estão ilustrados na Figura 3.3.

Figura 3.3 - Ilustração esquemática dos processos de oxidação anaeróbia do metano acopladas à desnitrificação, observados experimentalmente

(a) A *M. oxyfera* é capaz de reduzir NO_2^- a N_2 enquanto oxida completamente o CH_4 a CO_2 (b) *M. nitroreducens* reduz o NO_3^- a NO_2^- enquanto oxida completamente o CH_4 a CO_2

A *M. oxyfera* é uma espécie de bactéria afiliada ao filo NC10 e que oxidam o metano utilizando oxigênio formado dentro da célula (ETTWIG et al., 2010). Esse grupo microbiano é gram-negativo (WU et al., 2012) e é capaz de reduzir o nitrito (NO_2^-) a óxido nítrico (NO), que por sua vez é convertido em nitrogênio (N_2) e oxigênio molecular (O_2). O oxigênio molecular é então utilizado para oxidar o metano a CO_2 (ETTWIG et al., 2010). Os autores identificaram a presença da enzima metano-monooxigenase (MMO), responsável pela oxidação aeróbia do metano a metanol. O metanol é então oxidado a formaldeído pela MDH (metanol-desidrogenase), que, por sua vez, depende da PQQ (pirrolo quinonina quinona), um cofator que catalisa reações no periplasma de bactérias Gram-negativas (GOODWIN; ANTHONY, 1998). Curiosamente, não foram encontrados os genes que codificam a PQQ na *M. oxyfera*, o que pode indicar que ou esse organismo possui uma rota alternativa para síntese da PQQ ou ele utiliza da PQQ excretada por outros membros que estão em relação sintrófica (WU et al., 2012).

De forma similar, os dados genômicos obtidos da *M. oxyfera* mostram que esse organismo só poderiam proceder à desnitrificação até óxido nitroso (N_2O), uma vez que as enzimas responsáveis pelas etapa final de produção de nitrogênio molecular não pôde ser encontrada (WU et al., 2012). No entanto, os dados experimentais de diversos autores mostram a geração de N_2 marcado (ETTWIG et al., 2010; RAGHOEBARSING et al., 2006). É possível que essa seja mais uma evidência de que *M. oxyfera* estabeleça relações sintróficas e que as atividades catalíticas da reação global de oxidação de metano acoplada à desnitrificação completa sejam complementadas por outras bactérias (ETTWIG et al., 2010). Ressalta-se que o esquema apresentado na Figura 3.3 é uma simplificação das observações experimentais e não inclui as eventuais relações sintróficas que podem ser estabelecidas com outros organismos.

Embora o mecanismo defendido seja de formação do oxigênio molecular intracelularmente, Luesken et al. (2012) demonstraram que a *M. oxyfera* é inibida em condições de microaerofilia, com concentrações variando entre 0,2 e 0,8 mg OD.L⁻¹. Segundo os autores, os genes ligados ao metabolismo de redução do nitrito e a outras funções vitais da célula foram severamente desregulados nessas condições e a taxa de conversão do nitrito na presença de oxigênio foi de apenas 19% se comparada às taxas observadas na ausência de oxigênio.

Já o mecanismo de oxidação anaeróbia do metano acoplada a redução das formas nitrogenadas (DAMO) proposto por Haroon et al. (2013) é realizado por arqueias (*M. nitroductens*). Os autores identificaram um grupo de arqueias capaz de utilizar o metano num processo que foi chamado de metanogênese reversa completa, uma vez que o CH_4 é oxidado a CO_2 , utilizando o NO_3^- como aceptor de elétrons final. Nesse processo, no entanto, o NO_3^- é reduzido até a NO_2^- .

Apesar do potencial de aplicação tecnológica da DAMO, alguns fatores são muito limitantes. Os organismos envolvidos na DAMO são de crescimento lento, com tempo de duplicação reportados entre duas semanas (WU et al., 2011) até 25 dias (HE et al., 2013) e baixa atividade celular, quando comparado a organismos desnitrificantes heterotróficos não metanotróficos (HU et al., 2014; WU et al., 2011). Os longos tempos de enriquecimento confirmam a dificuldade de obtenção de cultura metanotrófica desnitrificante (Quadro 3.3). Há relatos de que o enriquecimento da comunidade metanotrófica anóxica levou 21 meses utilizando sedimento de canais de água doce como inóculo (KAMPMAN et al., 2012). Outros autores

reportam relatos de que a atividade desnitrificante não foi detectada nos primeiros 110 dias de operação dos reatores para enriquecimento (ETTWIG et al., 2009). A perda de biomassa durante a operação de reatores tem sido reportada como outro limitante para obtenção de culturas enriquecidas (HU et al., 2014; KAMPMAN et al., 2012). Assim, o crescimento lento e a baixa atividade celular, aliada à dificuldade para manutenção de biomassa no reator tem sido fatores limitantes para aplicação tecnológica desses microrganismos (HE et al., 2015d).

Outro aspecto importante para enriquecimento de comunidades é o inóculo. Observa-se que vários inóculos já foram utilizados para enriquecimento de comunidade DAMO (Quadro 3.3), o que sugere que esses organismos podem ser encontrados em vários ambientes. É possível que a dificuldade de identificar a *M. oxyfera* esteja relacionada a um viés nos *primers* de sequenciamento (LUESKEN et al., 2011c). Como os *primers* existentes se baseiam no conhecimento de sequências limitadas do filo NC10, eles podem deixar de identificar membros afiliados que apresentem composição de nucleotídeos ligeiramente diferente das posições dos *primers* (LUESKEN et al., 2011c).

A dispersão de organismos relacionados à *M. oxyfera* no ambiente é corroborada por pesquisadores que enriqueceram comunidades capazes de reduzir NO_2^- e oxidar CH_4 (relacionadas à *M. oxyfera*, portanto), a partir de lodo metanogênico, sedimento de campo de cultivo de arroz e sedimento de água doce (HE et al., 2015c). Embora os três inóculos tenham se mostrado adequados para enriquecimento da *M. oxyfera*, o sedimento de campo de cultivo de arroz, rico em metano, foi o que forneceu melhor resposta.

	Raghoebarsing et al. (2006)	Ettwig et al. (2009)	Hu et al. (2009)	Luesken et al. (2011c)	Hu et al. (2011)	Haroon et al. (2013)
Tipo de reator	SBR	SBR	SBR	SBR, com decantador externo	SBR	SBR
Inóculo utilizado	Sedimento de canal de água doce (Holanda)	Sedimento de canais que drenam terras agricultáveis, numa planície de inundação (Holanda)	Mistura de sedimento de lago (Austrália), lodo de digestor anaeróbio e lodo de sistema de lodo ativado	Lodo de digestores anaeróbios de lodo de ETE	Cultura obtida por Hu et al. (2009)	Cultura B de Hu et al. (2009) e ANAMMOX
Biomassa	Suspensa	Suspensa	Suspensa	Suspensa	Suspensa	Suspensa
Aceptor de e⁻	NO ₂ ⁻ e NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	NO ₂ ⁻ e NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	NO ₂ ⁻ (cultura A) e NO ₃ ⁻ (cultura B)	NO ₃ ⁻
Tempo de enriquecimento	16 meses	6 meses	220 dias [7 meses]	112 dias [4 meses]	150 dias* [5 meses]	350 dias [12 meses]
Atividade desnitrificante reportada	21,5 μmol N ₂ .h ⁻¹ ([●]) (medida em termos de produção de N ₂)	4,7 a 5,1 nmol NO ₂ ⁻ . mg proteína ⁻¹ .min ⁻¹	2,35 mmol N-NO ₃ ⁻ . g SSV ⁻¹ . dia ⁻¹	0,4 mmol. L ⁻¹ .dia ⁻¹	A: 7,2 mmol N-NO ₂ ⁻ . gSSV ⁻¹ .dia ⁻¹ B: 0,56 mmol N-NO ₃ ⁻ .gSSV ⁻¹ .L ⁻¹	3,5 mmol N-NO ₃ ⁻ .dia ⁻¹
Tipo de organismos enriquecido	Consórcio microbiano, envolvendo organismos dos domínios <i>Archaea</i> e <i>Bacteria</i>	<i>M. oxyfera</i> ([▲])	Consórcio microbiano, envolvendo <i>M. oxyfera</i> e organismos do domínio <i>Archaea</i>	<i>M. oxyfera</i>	A: <i>M. oxyfera</i> B: Consórcio de <i>M. oxyfera</i> e arqueias	<i>M. nitroreducens</i> ([†])

Quadro 3.3 - Condições experimentais para enriquecimento de organismos capazes de realizar a oxidação do metano em ambiente anóxico acoplada à desnitrificação

([●]) Medida em termos de produção de N₂; ([▲]) Categoricamente, a *M. oxyfera* só foi identificada no trabalho de Ettwig et al. (2010). No entanto, Ettwig et al. (2009) observaram o estabelecimento de bactérias afiliadas ao filo NC10, que foram identificadas como *M. oxyfera* no ano seguinte. (*)Período para que fosse observada as taxas reportadas.([†]) Primeira vez que esse organismo foi reportado.

Observa-se, no Quadro 3.3, que todos os autores citados utilizaram reator em batelada sequencial (SBR) e biomassa suspensa. A configuração de SBR foi considerada apropriada para cultivo de organismos ANAMMOX, sendo que as vantagens dessa configuração foram generalizadas para enriquecimento de organismos de lento crescimento (STROUS et al., 1998). Segundo os referidos autores, a distribuição homogênea dos substratos, a praticidade do aparato experimental e a boa retenção de biomassa são os pontos fortes da aplicação de SBR para enriquecimento de microrganismos de crescimento lento.

No entanto, conforme previamente citado, a perda de biomassa tem sido reportada como limitante à aplicação de sistemas DAMO (HU et al., 2014; KAMPMAN et al., 2012). Assim, para contornar esse problema, alguns autores tem proposto a adoção de sistemas com maior retenção de biomassa, como a aplicação de reatores de membranas (MBR, na sigla em inglês). Em um dos trabalhos que aplicou MBR não foi observada aumento efetivo da atividade desnitrificante ($32 \text{ mg N-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$), quando comparado aos sistemas SBR, sendo que os autores sugerem que além da dificuldade na retenção de biomassa, os meios de cultura tradicionais apresentem alguma deficiência nutricional (KAMPMAN et al., 2014). Cai et al. (2015), no entanto, obtiveram taxa de desnitrificação de $684 \text{ mg N} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ em sistema MBR. No entanto, esse é o único trabalho até o momento em que foram reportadas taxas aplicáveis. Apenas para efeito de comparação, a atividade desnitrificante teórica, calculada a partir de parâmetros usuais de operação (TCHOBANOGLIOUS; BURTON; STENSEL, 2003), em sistema heterotrófico utilizando metanol como doador de elétrons fornece atividade desnitrificante de $500 \text{ mg N} \cdot \text{g SVTLM}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ (WAKI et al., 2005).

Destaque-se que, do Quadro 3.3, também se depreende a viabilidade de associar diferentes organismos na oxidação de metano acoplada à desnitrificação (Figura 3.4), o que representa um horizonte interessante de aplicação tecnológica, pois indica a possibilidade de integração entre a oxidação anaeróbia do metano acoplada à desnitrificação e o processo ANAMMOX.

O trabalho de Haroon et al. (2013), confirma a possibilidade de associação de *M. nitroreducens* e organismos ANAMMOX. Os autores inocularam biomassa ANAMMOX para forçar o consumo do NO_2^- pela via ANAMMOX, assegurando-se de que todo metano foi consumido pela *M. nitroreducens*. Essa estratégia parece ter evitado o estabelecimento de

bactérias no filo NC10. É possível que a competição pelo nitrito entre organismos ANAMMOX e *M. oxyfera* seja desvantajoso para essas últimas em algumas condições. Em SBR inicialmente inoculado com mistura de culturas enriquecidas de *M. nitroreducens*, ANAMMOX e *M. oxyfera* essas últimas foram extintas (HU et al., 2015). No entanto, a associação entre organismos ANAMMOX e *M. oxyfera* já havia sido reportado (LUESKEN et al., 2011b) e a associação entre os dois organismos responsáveis pela DAMO e a ANAMMOX também já havia sido relatada (SHI et al., 2013).

Figura 3.4 - Possíveis relações sintróficas entre organismos DAMO e ANAMMOX

Fonte: adaptado de Haroon et al. (2013)

O trabalho de Haroon et al. (2013) fornece ainda uma explicação razoável para a população mista de arqueias e bactérias observada por Raghoebarsing et al. (2006), que dosaram tanto nitrito quanto nitrato, o que deve ter propiciado condições para estabelecimento tanto da *M. nitroreducens* quanto da *M. oxyfera*.

O trabalho de Hu et al. (2011) indica também a possibilidade de uma relação sintrófica entre as arqueias *M. nitroreducens* e *M. oxyfera*. O objetivo desses autores era estudar o efeito do nitrato e do nitrito na seleção de microrganismos capazes de desempenhar a DAMO. Assim, dois reatores em batelada sequencial foram inoculados com mistura de sedimento marinho, lodo de digestor anaeróbico e lodo de sistema de lodo ativado. Um deles foi alimentado apenas com nitrito e outro apenas com nitrato. No primeiro, foi observada a diminuição da quantidade de arqueias e predominância de bactérias similares àquelas descritas por Ettwig et al. (2009). Já no reator em

que era dosado NO_3^- estabeleceu-se uma comunidade mista de arqueias e bactérias relacionadas a *M. oxyfera*. A manutenção da população relacionada à *M. oxyfera* se explica uma vez que as arqueias que utilizam CH_4 reduzem NO_3^- a NO_2^- que, por sua vez, é substrato para *M. oxyfera*. Ou seja, o consumo de metano observado por Hu et al. (2011) é possivelmente uma combinação entre o metano utilizado pela *M. nitroreducens* e pela *M. oxyfera*.

3.5. COMENTÁRIOS FINAIS

Embora o processo de oxidação anóxica do metano acoplada à desnitrificação (DAMO) tenha sido recentemente descoberto, o conhecimento dos mecanismos através dos quais ele ocorre já avançou consideravelmente. Em contrapartida, a compreensão de alguns aspectos fundamentais, como os requerimentos nutricionais, e das possibilidades de aplicação tecnológica do processo permanecem limitadas. Não obstante, é importante reconhecer o potencial de aplicação da DAMO. É inevitável a comparação com o processo ANAMMOX, que também foi considerado não-existente na natureza, e é realizado por organismos de crescimento lento e difícil cultivo. Todavia, o processo ANAMMOX hoje é reconhecido como um dos processos principais de ciclagem de nitrogênio na natureza e sua aplicação transformou as tecnologias de tratamento de águas residuárias.

O presente trabalho buscou focar na avaliação da viabilidade de utilização do processo DAMO para pós-tratamento de reatores UASB aplicados ao tratamento de esgoto sanitário. Como o estabelecimento do processo DAMO é delicado, a etapa inicial teve por objetivo o enriquecimento de comunidade microbiana capaz de realizar a DAMO. Para tanto, foi utilizado um reator em batelada sequencial e biomassa imobilizada em espuma de poliuretano. Outros autores tentaram superar as baixas taxas de crescimento de organismos DAMO aplicando reatores de membrana (MBR) (CAI et al., 2015; SHI et al., 2013). No entanto, reatores MBR apresentam desvantagens, como o custo da membrana, o consumo de energia associado e a obstrução (*fouling*) das membranas, que, além do inconveniente operacional, representa outra fonte de custo (LIN et al., 2013; SKOUTERIS et al., 2012). A espuma de poliuretano é, por sua vez, utilizada como material suporte desde a década de 80 (HUYSMAN et al., 1983) e já foi aplicada em diferentes processos (MORAES; SOUZA; FORESTI, 2012; SARTI et al., 2009).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O objetivo central desta tese foi estudar a estratégias para viabilizar a utilização do metano como doador de elétrons para desnitrificação em ambiente anóxico. A hipótese central foi baseada na literatura disponível e divisava aplicação tecnológica para pós-tratamento de reatores anaeróbios. Em função dos resultados obtidos ao longo da etapa experimental, novas hipóteses foram levantadas e testadas. Assim, este projeto adquiriu um caráter mais exploratório, onde eram delineadas hipóteses a partir de um ensaio ou experimento anterior.

Em linhas gerais, este trabalho pode ser dividido em cinco etapas: dois ensaios em bateladas sequenciais iniciais (Etapas 1 e 2), operação de reator contínuo de leito fixo e estruturado (Up-FSBR) (Etapa 3) e ensaios em batelada utilizando a biomassa enriquecida no Up-FSBR (Etapas 4 e 5). Os objetivos de cada um dos ensaios estão sintetizados no Quadro 4.1 e o delineamento experimental é apresentado no Quadro 4.2. Ressalta-se que esse quadro é apenas indicativo e que as justificativas e metodologias referentes a cada um dos ensaios são detalhadas nas seções subsequentes do presente capítulo. A linha de hipóteses sugeridas indica quais hipóteses foram derivadas daquela etapa e que foram testadas em experimentos subsequentes.

Etapas	Ensaio em Bateladas Sequenciais		Etapa 3 Operação Up-FSBR	Ensaio em Batelada com Biomassa do Up-FSBR	
	Etapa 1	Etapa 2		Etapa 4	Etapa 5
Hipótese	É possível enriquecer biomassa metanotrófica desnitrificante a partir de diferentes inóculos	Utilizar biomassa suspensa é mais vantajoso para o enriquecimento de biomassa metanotrófica desnitrificante, pois reduz a resistência à transferência de massa (<i>oriunda da Etapa 1</i>)	O estabelecimento do processo de desnitrificação metanotrófica se dá mais facilmente em reatores contínuos, pois não há acúmulo de produtos inibitórios (<i>oriunda da Etapa 1</i>)	O consumo das formas nitrogenadas é apenas endógeno (<i>oriunda da Etapa 3</i>)	O consumo de metano é aeróbio, e não está acoplado à redução das formas nitrogenadas (<i>oriunda da Etapa 3</i>)
Resultados esperados	Indicar um tipo de inóculo mais adequado para enriquecimento de biomassa	Indicar qual estratégia de enriquecimento é mais vantajosa, se com biomassa suspensa ou imobilizada	Obtenção de maiores atividades de desnitrificação do que as observadas na Etapa 1	Consumo das formas nitrogenadas ocorre independente da oxidação do metano	Consumo de metano é maior em condições microaeradas
Hipóteses sugeridas	A baixa atividade desnitrificante pode ser causada pela alta resistência a transferência de massa, ou por o acúmulo de algum composto inibitório nos SBR		A biomassa enriquecida é metanotrófica aeróbia, mas não desnitrificante. O consumo de NO_2^- e NO_3^- é apenas endógeno		

Quadro 4.1 - Hipóteses testadas

	Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3	Etapa 4	Etapa 5
Configuração reator	Reator em bateladas sequenciais (SBR)	SBR	Reator de Leito Estruturado e fluxo ascendente (Up-FSBR)	Batelada simples	SBR
Condições experimentais	<p>Triplicata dos SBR</p> <p>CH₄ fornecido como única fonte de carbono</p> <p>NO₂⁻ e NO₃⁻ fornecidos como aceptores de elétrons</p> <p>Operação de SBR controle^(†), sem adição de metano (SED-C e LAn-C)</p> <p>Tempo de ciclo de três dias</p> <p>Biomassa imobilizada</p>	<p>Biomassa imobilizada (Imob-SBR) e biomassa suspensa (Susp-SBR)</p> <p>Tempo de ciclo de três dias</p> <p>CH₄ fornecido como única fonte de carbono</p> <p>NO₂⁻ e NO₃⁻ fornecidos como aceptores de elétrons</p>	<p>Tempo de detenção hidráulica de 12 horas</p> <p>CH₄ fornecido como única fonte de carbono</p> <p>NO₂⁻ e NO₃⁻ fornecidos como aceptores de elétrons</p>	<p>Cinco condições testadas: NO₃⁻ e CH₄, NO₃⁻ controle^(†), NO₂⁻ e CH₄, NO₂⁻ controle^(†), NH₄⁺ e CH₄</p> <p>Triplicata de cada condição</p> <p>Tempo de ciclo de sete dias</p>	<p>Reator em condições anóxicas e em condições microaeradas</p> <p>CH₄ fornecido como única fonte de carbono</p> <p>NO₃⁻ fornecido comoceptor de elétrons</p> <p>Tempo de ciclo de sete dias</p>
Tempo de operação	186 dias	80 dias	200 dias	15 dias	210 dias
Inóculos	Mistura de sedimento marinho e sedimento de mague (SED-SBR) Lodo UASB (LAn-SBR)	Mistura de sedimento marinho e sedimento de mague	Lodo de UASB	Biomassa enriquecida no Up-FSBR	Biomassa enriquecida no Up-FSBR
Meio de cultura utilizado	A, B e C (Tabela 4.2)	“C” (Tabela 4.2)	D e E (Tabela 4.6)	F (Tabela 4.8)	F (Tabela 4.8)
Dados experimentais	Monitoramento Perfis temporais Sequenciamento do rRNA 16S	Monitoramento	Monitoramento Sequenciamento do rRNA 16S	Monitoramento	Monitoramento Sequenciamento do rRNA 16S

Quadro 4.2 - Esquema da estrutura experimental da pesquisa

(†) Os reatores controle foram operados sem adição de metano e sem adição de qualquer outra fonte de carbono ou de doador de elétrons.

4.2. ETAPA 1: ENSAIO EM BATELADA SEQUENCIAL PARA AVALIAÇÃO DE INÓCULOS PARA OBTENÇÃO DE BIOMASSA METANOTRÓFICA DESNITRIFICANTE

A primeira etapa desse trabalho consistiu em ensaios em reatores em bateladas sequenciais (SBR), para avaliar a possibilidade de enriquecimento da população capaz de promover a desnitrificação utilizando o metano como doador de elétrons a partir de diferentes inóculos. Foram testados dois inóculos e para cada um deles foram operados reatores em triplicata.

O primeiro deles foi composto por uma mistura de sedimento marinho oriundo da praia do Gonzaga (Santos/SP) e sedimento de mangue, originário de Cubatão (SP) (SED). Esse inóculo foi escolhido porque a literatura aponta que solos ricos em metano e com interfaces óxicas-anóxicas tem potencial para enriquecimento de comunidades desnitrificantes metanotróficas (HE et al., 2015c).

O outro inóculo utilizado foi lodo proveniente de reator UASB empregado no tratamento de água residuária de abatedouro de aves (LAn). Culturas de organismos metanotróficos desnitrificantes já foram enriquecidas a partir de lodo de reatores anaeróbios (HE et al., 2015c; LUESKEN et al., 2011a). Ademais, o lodo de reatores anaeróbios é um inóculo acessível, o que é interessante do ponto de vista de aplicação da tecnologia.

Foram também mantidos dois controles: para cada tipo de inóculo: um reator SBR foi operado sem adição de metano, i.e, eram fornecidos apenas nutrientes e as formas nitrogenadas oxidadas (NO_2^- e NO_3^-) nas mesmas concentrações utilizadas para os demais SBR. A manutenção desse controle visava à quantificação de consumo de nitrito e nitrato pela respiração endógena. Esses reatores foram designados “SED-C” e “LAn-C”, indicando que nenhum doador de elétrons externo foi adicionado.

Os SBR eram compostos por frascos de vidro borosilicato com volume nominal de 1.000 mL, e volume efetivo de 1.129 ± 12 mL. Todos os reatores foram mantidos em câmara a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ e sob agitação de 130 rpm. As estratégias de cada um dos SBR operados estão esquematizadas no Quadro 4.3.

SBR	SED	SED-C	LAn	LAn-C
Inóculo	Mistura de sedimento marinho e sedimento de mangue		Lodo de UASB	
Objetivo	Enriquecimento de população metanotrófica desnitrificante	Monitoramento desnitrificação endógena	Enriquecimento de população metanotrófica desnitrificante	Monitoramento desnitrificação endógena
Submetido a fluxo de Ar	sim	sim	sim	sim
Fornecido CH ₄ (doador de elétrons)	sim	não	sim	não
Presença de acceptor de elétrons (NO ₂ ⁻ e NO ₃ ⁻)	sim	sim	sim	sim
Triplicata	sim	não	sim	não

Quadro 4.3 - Estratégias de operação de cada um dos reatores em batelada sequencial operados na Etapa 1

4.2.1. Características do inóculo, do meio Suporte e procedimento de inoculação

A biomassa foi fixada em meio suporte, segundo o procedimento de imobilização descrito por Zaiat et al. (1994). O meio suporte consistia em cubos de espuma de poliuretano com 12 mm de aresta, encaixados em espiral de PVC com 12 mm de diâmetro e altura de mesma dimensão. Foram utilizados $39,5 \pm 0,9$ g de material suporte, o que correspondia a aproximadamente 100 unidades de material suporte (Figura 4.1) por SBR.

Figura 4.1 - Material suporte utilizado nos SBR da Etapa 1, antes da inoculação

A quantidade de sólidos em cada um dos SBR foi avaliada medindo-se a massa do meio suporte antes e depois da inoculação. As características físicas do inóculo e da quantidade de sólidos nos SBR estão apresentadas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Características físicas dos inóculos utilizados na Etapa 1 e concentração de sólidos nos SBR após a inoculação

	SED	LAn
ST [g.g inóculo ⁻¹]	0,537 ± 0,030	0,054 ± 0,000
STV [g.g inóculo ⁻¹]	0,015 ± 0,001	0,036 ± 0,000
STV - SBR [g STV]	2,590 ± 0,322	2,844 ± 0,129
STV - SBR [g STV.g material suporte ⁻¹]	0,066 ± 0,009	0,073 ± 0,002

4.2.2. Meio de Cultura

Ao longo da Etapa 1 foram utilizados diferentes meios de cultura. As razões para essas alterações serão discutidas na seção 5.1. No entanto, a Figura 4.2 apresenta os intervalos de tempo em que ocorreram as modificações dos meios de cultura. Nos 60 primeiros dias de operação dos SBR, o meio reacional consistia em duas soluções de micronutrientes (Tabela 4.2 e Tabela 4.3), preparadas conforme Martins (2007), adaptado de Van de Graaf et al. (1996), e identificado como meio de cultura A na Tabela 4.2. Entre o 60º e o 156º dias de operação, o meio reacional incluiu também as dosagens de macronutrientes do meio de Van de Graaf (1996) (meio de cultura B – Tabela 4.2). Após o 156º dia de operação, as concentrações de macronutrientes foram revistas, e passou a ser utilizado o meio de cultura C (Tabela 4.2). Convém pontuar . os meios de cultura descritos na Tabela 4.2 eram preparados com água destilada. Já as soluções de micronutrientes eram preparadas com água deionizada.

Figura 4.2 - Linha do tempo da Etapa 1

O meio Van de Graaf (1996) foi inicialmente proposto visando o enriquecimento de biomassa ANAMMOX. Esse mesmo meio foi utilizado com sucesso em reator de nitrificação e desnitrificação simultâneas (NOCKO, 2008). Acresce que sua composição é similar à proposta por Raghoebarsing et al. (2006), autores do primeiro trabalho de enriquecimento de organismos desnitrificantes metanotróficos em ambiente anóxico.

Ao meio reacional era adicionado nitrito e nitrato. A concentração inicial das formas nitrogenadas foi definida em 1 mmol N.L⁻¹ (14 mg N.L⁻¹). A ideia era aumentar a concentração das formas nitrogenadas gradativamente, até que fossem compatíveis às observadas para efluente nitrificado de UASB tratando esgoto sanitário (23 mg N.L⁻¹ a 40 mg N.L⁻¹). Definiu-se, também, que seriam utilizados tanto o nitrito quanto o nitrato como aceptores de elétrons. Dessa forma, definiu-se por dosar 23 mg NO₂⁻.L⁻¹ (0,5 mmol NO₂⁻.L⁻¹ ou 7 mg N-NO₂⁻.L⁻¹) e 31 mg NO₃⁻.L⁻¹ (0,5 mmol NO₃⁻.L⁻¹ ou 7 mg N-NO₃⁻.L⁻¹). Em ambos os casos foram utilizados sais de sódio (NaNO₂ e NaNO₃).

Tabela 4.2 - Composição do meio nutricional utilizado nos reatores em bateladas sequenciais na Etapa 1

Componente ^(†)	“A” utilizado entre o 1º e o 60º dias de operação	“B” <i>Concentração van de Graaf et al. (1996)</i>	“C” Utilizado entre o 157º e o 186º dias de operação
		Utilizado entre o 61º e o 156º dias de operação	
NO ₂ ⁻	23 mg.L ⁻¹	23 mg.L ⁻¹	23 mg.L ⁻¹
NO ₃ ⁻	31 mg.L ⁻¹	31 mg.L ⁻¹	31 mg.L ⁻¹
Solução micronutriente 1	1 mL.L ⁻¹	1 mL.L ⁻¹	1 mL.L ⁻¹
Solução micronutriente 2	1 mL.L ⁻¹	1 mL.L ⁻¹	1 mL.L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	-	27,2	0,54
MgSO ₄ .7H ₂ O	-	300	6,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	-	180	3,6

^(†) q.s.p 1.000 mL de água destilada

Tabela 4.3 - Composição das soluções de micronutrientes utilizadas na Etapa 1

Solução micronutriente 1	
Componente	Concentração (g.L⁻¹)^(†)
EDTA	5
FeSO ₄	5
Solução micronutriente 2	
Componente	Concentração (g.L⁻¹)^(†)
EDTA	15
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,43
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,24
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,99
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,25
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,22
NiCl ₂ .6H ₂ O	0,19
Na ₂ SeO ₃ .5H ₂ O	0,09
H ₃ BO ₄	0,014

Fonte: Martins (2007), adaptado de van de Graaf et al. (1996)

^(†) q.s.p 1.000 mL de água deionizada

4.2.3. Estratégia de Operação

Os SBR foram operados em ciclos de três dias. A cada final de ciclo de operação dos reatores em bateladas sequenciais, o meio reacional era completamente drenado, com auxílio de um sifão, adicionando-se, na sequência, o novo meio, recém-preparado. É forçoso pontuar que a exposição da biomassa a oxigênio durante a transferência do material dos frascos não é prejudicial, conforme verificado por Ettwig et al. (2009). O meio era então submetido ao fluxionamento de argônio por aproximadamente 15 minutos, de forma a garantir condições anóxicas no frasco. Em seguida, era procedido ao fluxionamento de metano por três minutos, sendo esse a única fonte de carbono e de energia adicionada.

Após a troca do headspace, os SBR eram mantidos durante 30 minutos nas condições de operação, ou seja, a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ e sob agitação de 130 rpm. O *headspace* era então amostrado e era retirada 5 mL de amostra líquida para análise de nitrito e nitrato. A amostra líquida era coletada com o auxílio de uma seringa através da tampa de butila.

Nessa etapa foram realizadas análises de nitrato, nitrito, metano, pH, alcalinidade. Foram feitos também testes de ácidos voláteis e amônia, para identificação de eventuais intermediários

orgânicos e para verificar se poderia ocorrer a redução assimilativa de nitrato a amônia (RANA). As metodologias utilizadas para essas análises estão descritas na seção 4.6 - “Análises Físico-Químicas”.

4.2.4. Perfis temporais

Os perfis temporais foram realizados a fim de compreender a dinâmica do processo de consumo das formas nitrogenadas utilizando o metano como doador de elétrons. Além disso, esse ensaio forneceu elementos para comparação entre as velocidades de reação observadas para cada um dos inóculos testados.

Após 115 dias de operação dos SBR (Figura 4.2), o material suporte de uma das replicatas de cada um dos inóculos (SED-SBR e LAn-SBR) foi retirado para realização do ensaio de perfil temporal. A utilização da biomassa de apenas uma das replicatas foi considerada uma técnica adequada uma vez que a diferença entre as replicatas de mesmo inóculo não foi estatisticamente significativa (seção 5.1).

A biomassa de cada tipo de inóculo foi submetida a quatro condições (Quadro 4.4), sem replicata de cada condição. Os perfis temporais serão identificados como SED-TP e LAn-TP, conforme o tipo de inóculo testado.

Descrição	Aceptor de elétrons	Doador de elétrons
Condição (I)	NO_2^-	-
Condição (II)	NO_2^-	CH_4
Condição (III)	NO_3^-	-
Condição (IV)	NO_3^-	CH_4

Quadro 4.4 - Condições testadas nos perfis temporais da Etapa 1

Foram testados, portanto, oito reatores batelada. Os ensaios foram realizados com a utilização de frascos de vidro borosilicato com volume nominal de 500 mL e volume efetivo de 607 ± 7 mL. O volume de reação adotado foi de 250 mL. Foram utilizadas 25 unidades de material suporte, com biomassa já enriquecida, em cada uma das condições testadas. Para os perfis SED-TP foi utilizado $10,54 \pm 0,06$ g de material suporte ($0,045 \pm 0,01$ gSTV.g material suporte⁻¹). Já para os ensaios LAn-TP a massa de material suporte utilizada em cada uma das condições foi $10,26 \pm 0,12$ g ($0,083 \pm 0,013$ gSTV.g material suporte⁻¹).

Apenas as concentrações de nitrato e nitrito foram monitoradas ao longo do ensaio, por cromatografia de íons. No início e ao final do ensaio foram também feitas análises de metano por cromatografia gasosa.

Os procedimentos de fluxionamento de argônio (para todas as condições testadas) e metano (para as condições II e IV) foram feitos conforme o descrito na seção 4.2.3. Os ensaios cinéticos foram conduzidos em câmara com controle de temperatura (30 ± 2 °C) e sob agitação de aproximadamente 130 rpm.

A preparação do meio nutricional seguiu o apresentado na coluna “B” da Tabela 4.2. A adição de nitrito e nitrato foi feita com o uso de uma injeção de solução concentrada de nitrito ou nitrato de sódio, conforma a condição testada. A injeção foi dada após a amostragem inicial do *headspace*.

As bateladas foram operadas até que as concentrações de nitrato e nitrito ficassem abaixo do limite de quantificação do método ($5 \text{ mg N-NO}_x\text{.L}^{-1}$) ou até que a concentração se estabilizasse por três medições. O período de amostragem também mudou ao longo dos ensaios: nas primeiras seis horas, a amostragem foi feita a cada 60 minutos, e, entre 6 e 36 horas a amostragem foi feita a cada 6 horas. Após 36 horas de ensaio, a amostragem passou a ser feita a cada 12 horas. Em cada amostragem foi coletado 1 mL do meio líquido e foram retiradas no máximo 20 alíquotas (20 mL). A velocidade de consumo das formas nitrogenadas foi calculada conforme o método das velocidades iniciais.

4.2.5. Caracterização microbiana por sequenciamento do rRNA 16S – Plataforma Ion Torrent ®

Para caracterização microbiana dos organismos enriquecidos na Etapa 1, foram retiradas amostras de biomassa do SED-SBR e do LAn-SBR após 165 dias de operação dos reatores. Foram também retiradas amostras dos inóculos (SED-inóc e LAn-inóc).

Antes do procedimento de extração do DNA, as amostras foram lavadas com tampão fosfato (PBS 1x) e centrifugadas a 6.000 rpm e a 4°C durante dez minutos, sendo esse passo repetido por três vezes. Após a lavagem os *pellets* foram armazenados a -20°C (no caso dos inóculos) ou encaminhados para extração de DNA. O DNA foi extraído com uso de fenol tamponado com tris e clorofórmio (GRIFFITHS et al., 2000). Após a extração, a concentração de

DNA na amostra foi verificada com espectrofotômetro ND-2.000 (Nanodrop Inc., Wilmington, DE). A integridade do DNA extraído foi verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8% e TAE 1x e sua purificação foi realizada por meio do Kit Illustra GFX PCR DNA e Gel Band Purification (GE Healthcare).

O sequenciamento foi realizado pela empresa GenOne Biotechnologies, com sede na cidade do Rio de Janeiro. Todas as amostras enviadas possuíam concentração mínima de 10 ng.µL⁻¹ e pureza OD260/280 mínima de 1,8. O sequenciamento por meio da plataforma Ion Torrent® foi realizado em CHIP 318 V2 modo 400 bp. Os *primers* utilizados foram 577 F (5' – AYTGGGYSTAAAGNG – 3') e 924R (5' – CCGTCAATTCMTTTRAGT - 3') que amplificam para a região V4 do rRNA 16S.

As sequências foram processadas utilizando o Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) (CAPORASO et al., 2010). As quimeras foram filtradas utilizando o algoritmo *uchime* (EDGAR et al., 2011). As unidades taxonômicas operacionais (OTU) foram determinadas utilizando o método *uclust* com 97% de similaridade (EDGAR, 2010). Esse processamento foi feito no Ribosomal Database Project (RDP) Classifier, tendo sido adotado limite de confiança de 50% (WANG et al., 2007).

Os índices de diversidade alfa e beta foram calculados com base nas OTUs, tendo sido considerados os *singletons*. Na análise dos dados referentes às classificações taxonômicas, no entanto, os *singletons* foram removidos.

As sequências foram submetidas ao ENA (European Nucleotide Archive) sob os números de acesso ERS1201616 a ERS1201619 (projeto PRJEB14367).

4.3. ETAPA 2: ENSAIO EM BATELADA SEQUENCIAL PARA COMPARAÇÃO ENTRE ESTRATÉGIAS DE ENRIQUECIMENTO

A partir dos resultados obtidos na Etapa 1 (seção 5.1) foi levantada a hipótese que o emprego de biomassa imobilizada poderia ter dificultado o estabelecimento do processo devido à maior resistência à transferência de massa. Nesse caso, uma vez que o substrato estava na forma gasosa, o uso de biomassa suspensa poderia ser mais vantajoso, por oferecer melhor resistência à transferência de massa.

Assim, foi delineado um ensaio experimental a fim de comparar as duas estratégias de enriquecimento: biomassa suspensa ou biomassa imobilizada. O objetivo deste ensaio foi investigar se no caso do enriquecimento de comunidade metanotrófica desnitrificante era mais importante privilegiar a retenção celular ou mitigar ao máximo a resistência à transferência de massa.

Esse ensaio foi feito com dois frascos de vidro borosilicato de volume nominal de 1.000 mL, inoculados com mistura de sedimento marinho (Santos/SP) e sedimento de mangue (Cubatão/SP). Os frascos foram operados como reatores em bateladas sequenciais durante 80 dias e com tempo de ciclo de três dias. Em um deles foi utilizada biomassa imobilizada (reator “Imob-SBR”) em material suporte idêntico ao descrito na seção 4.1 (Figura 4.1). A imobilização da biomassa foi feita conforme o recomendado por Zaiat et al. (1994). Foram utilizadas 100 unidades de cubo de espuma de poliuretano e a massa do inóculo foi de 158,3 g, descontando-se a massa do material suporte.

O outro reator operado como batelada sequencial continha 169,3 g de inóculo em suspensão (reator “Susp-SBR”). Os demais parâmetros de operação seguiram o mesmo descrito na seção 4.1. Foi adotado o meio reacional “C” (Tabela 4.2 e Tabela 4.3). Os SBR foram mantidos em câmara a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ e sem agitação. Os SBR eram manualmente agitados de forma vigorosa de uma a três vezes ao dia.

A troca do meio reacional era feita a cada final de ciclo, tendo sido utilizada a mesma estratégia descrita na seção 4.1, ou seja, o meio era completamente drenado com o auxílio de um sifão e então substituído por solução recém-preparada. A solução era preparada sem adição de nitrito e nitrato. Em seguida, ambos os reatores eram submetidos ao fluxionamento com argônio por 15 minutos, recebendo, então, fluxo de metano por três minutos. O frasco era fechado e então eram dosadas soluções concentradas de nitrato e nitrito com auxílio de uma seringa, através da tampa de butila, de forma a obter as concentrações das formas nitrogenadas oxidadas apresentadas na Tabela 4.2. Os SBR eram manualmente agitados de forma vigorosa e era então coletada amostra líquida (5 mL) para análise. A amostragem era feita com auxílio de seringa.

Como depois da troca do meio, os SBR eram submetidos a fluxionamento do gás, havia um intervalo de tempo entre a troca do meio líquido, o fluxionamento de gás e a amostragem. Para evitar que o consumo do NO_2^- e do NO_3^- ocorresse nesse intervalo, prejudicando a

amostragem inicial, foi adotada essa estratégia de dosar pequenos volumes de soluções concentradas logo antes da amostragem. Assim, garantia-se que a amostragem do início de ciclo fornecesse as concentrações iniciais. Nesse ensaio foram monitoradas apenas as concentrações das formas nitrogenadas.

4.4. ETAPA 3: OPERAÇÃO DO REATOR DE LEITO FIXO E ESTRUTURADO

Após as Etapas 1 e 2, definiu-se por testar a viabilidade de metano como doador de elétrons para desnitrificação em um reator contínuo. Para essa etapa foi escolhida a configuração de leito fixo e estruturado e fluxo ascendente (Up-FSBR), baseado no reator anaeróbio de leito estruturado (ABFSB – *Anaerobic Bioreactor with a Fixed-Structure Bed*) (MOCKAITIS et al., 2014). A configuração do Up-FSBR garante boa retenção celular por um lado e, por outro, evita acúmulo excessivo de biomassa e o estabelecimento de caminhos preferenciais. Essa configuração também permite que sejam adotadas velocidades ascensionais mais altas, o que pode reduzir a resistência à transferência de massa do metano. A Figura 4.2 mostra o Up-FSBR instalado e a Figura 4.3 apresenta o desenho esquemático do mesmo. O reator foi construído em acrílico, com volume de 3.825 mL. Foram utilizadas 13 hastes de espuma de poliuretano como material suporte (Figura 4.4). Cada haste tinha formato de prisma retangular de base quadrada com 10 mm de aresta e comprimento de 520 mm. Com o material suporte, o volume útil do reator foi de 3.530 mL (Tabela 4.4).

O Up-FSBR foi operado por 200 dias e o aparato experimental foi montado na Área de Operação de Reatores, que é um prédio anexo ao Laboratório de Processos Biológicos (LPB). O reator foi mantido dentro de uma cabine fechada sem controle de temperatura, o que significa que ele só era exposto à luz nos momentos em que a câmara era aberta. A temperatura atmosférica era monitorada com o auxílio de um termômetro de máximo e mínimo, mantido ao lado do Up-FSBR.

(a)

(b)

Figura 4.3 - Instalação do Up-FSBR.

Em (a) o reator está passando por testes de estanqueidade e em (b) ele já está em operação. Os índices (1), (2), (3) – em (a) – e (4) – em (b) indicam, respectivamente, a entrada de gás na parte inferior do reator, a linha de alimentação do meio de cultura, a linha de recirculação do líquido e a linha de recirculação do gás, com destaque para o by-pass onde era feita a amostragem de gás.

Tabela 4.4 - Características do Up-FSBR

Parâmetro	
Volume reator	3.825 mL
Volume útil	3.530 mL
Vazão da corrente de alimentação líquida (Q)	4,90 mL.min ⁻¹
TDH	12 horas
Vazão da corrente de recirculação líquida (QR)	14,7 mL.min ⁻¹
QR/Q	3

Figura 4.4 - Desenho esquemático do Up-FSBR

Os números indicam as dimensões em milímetros. (—) linha de alimentação do CH_4 ; (—) linha de recirculação de gás do *headspace* (—) linha de alimentação do meio de cultura (—) linha de recirculação do meio de cultura (—) fluxionamento de argônio no meio de cultura; Meio suporte. As setas indicam o sentido do fluxo da linha de cor correspondente. (A) Temporizador; (B) Válvula solenoide normalmente fechada (VSNF), ligada ao temporizador; (C) válvula agulha; (D) válvula de retenção; (E) pedras porosas para fluxionamento de gás; (F) dispositivo para amostragem da linha de recirculação de gás do *headspace*; (G) conexão em “Y”; (H) ponto de entrada da alimentação de meio de cultura; (I) ponto de entrada da recirculação do meio de cultura; (J) pontos de amostragem; (K) ponto de saída da linha de recirculação do meio de cultura; (L) ponto de saída da linha de recirculação de gás do *headspace*; (M) dispositivo de saída de efluente do reator; (N) bomba peristáltica; (O) frasco de meio cultura

Figura 4.5 - Distribuição do material suporte no Up-FSBR

O reator contava com uma entrada do afluente, uma entrada de recirculação da corrente líquida e uma entrada de gás, sendo que esta ocorria de duas formas: (1) *inputs* de metano vindos diretamente do cilindro que ocorriam durante alguns minutos do dia e (2) recirculação do *headspace* do reator, que era mantida constantemente. Embora as entradas de gases pudessem se dar de duas formas, ambas ocorriam pela mesma entrada física do reator, indicado por (E) na Figura 4.3. A entrada de gás do reator estava localizada na parte inferior e era feita por meio de uma pedra porosa de aço inox, que fornece bolhas mais finas.

A intenção de manter as correntes de recirculação era permitir uma maior velocidade ascensional que pudesse contribuir para uma transferência de massa gás-líquido mais eficiente. Ao mesmo tempo, o aumento da velocidade poderia implicar um tempo de contato muito curto entre a bolha e o líquido. A recirculação de gás foi mantida a fim de manter uma determinada quantidade de metano dentro do sistema, sem a necessidade de manter o aporte de metano diretamente do cilindro ininterruptamente.

Todas as tubulações de ar foram feitas utilizando tubos fabricados em poliuretano (PU), próprios para gás, e diâmetros que variaram de 4 mm (na sucção da linha de recirculação) a 6 mm (no recalque da recirculação e em toda linha de alimentação de CH_4). As tubulações das correntes líquidas eram de mangueira de PVC flexível *Tygon*® com diâmetro interno de 3 mm, visando eliminar o aporte de oxigênio molecular para dentro do reator. Vale também explicitar que a linha de recirculação do *headspace* era equipada com *by-pass*, onde foi instalado um dispositivo amostrador da corrente gasosa (linha lilás, amostrador indicado por (F) na Figura 4.3). O dispositivo (F) era feito em acrílico com tampa de rosca, na qual era colocado septo igual ao

utilizado em análises por cromatografia gasosa. O *by-pass* só era utilizado para amostragem e as válvulas agulha permitiam que o septo do amostrador fosse trocado a cada duas amostragens.

Foi utilizada bomba peristáltica *Gilson Minipuls 3*[®] de oito canais, sendo que seis foram requisitados: um para alimentação de afluente, outro para a recirculação da fase líquida e quatro canais para a recirculação de gás. No rotor da bomba foi utilizada mangueira *Tygon*[®] de 2,79 mm de diâmetro interno (DI) no canal de alimentação da corrente líquida afluente. Os demais canais foram operados com mangueira *Tygon*[®] de 3,18 mm de DI. Ressalta-se que o único ponto da linha recirculação de gás onde não foi utilizado tubo PU foi no cabeçote da bomba.

O rotor da bomba foi mantido de forma que a linha de alimentação da corrente líquida mantivesse uma vazão (Q) de 4,90 mL/min e, por conseguinte, 12 horas de tempo de detenção hidráulica (TDH). A vazão de recirculação (QR) da corrente líquida era controlada pela diferença entre os diâmetros das tubulações. A razão QR/Q foi mantida em 3. A linha de recirculação da fase gasosa contava com quatro canais, pois foi a estratégia adotada para que a recirculação ocorresse de fato, uma vez que, com menos canais, o gás não era capaz de chegar até a entrada do reator.

O aporte de metano diretamente do cilindro era feito com o auxílio de uma válvula solenoide normalmente fechada (VSNF) própria para gás metano (item (B) na Figura 4.3), que, por sua vez, estava ligada a um temporizador digital (item (A) na mesma figura). Este temporizador foi programado para ligar de seis a oito vezes por dia, em períodos igualmente espaçados (i.e, um *input* em intervalos de três a quatro horas), em intervalos de 2 minutos. Entre o 168º e o 176º dias de operação, o metano foi fornecido durante 24 horas por dia. Essa alteração foi feita uma vez que foi levantada a hipótese de que maior fornecimento de metano potencializaria a redução das formas nitrogenadas oxidadas.

Além da mudança no fornecimento de metano, outros parâmetros de operação foram alterados ao longo da etapa experimental, em função dos resultados observados. As mudanças de parâmetros operacionais estão sintetizadas no Quadro 4.5 e na Figura 4.6 e serão oportunamente discutidas na seção 5.3.

O gás argônio passou a ser fluxionado na alimentação do reator, pois foi observada condição microaerada dentro do reator. O fluxionamento de argônio era ininterrupto e era feito com o auxílio de uma pedra porosa para aquário.

Figura 4.6 - Linha do tempo da Etapa 3, com alterações dos parâmetros experimentais

Alteração parâmetros		Quando?
Fluxionamento Ar na alimentação		A partir do 80º dia de operação
Concentração NO_2^-	23 mg $\text{NO}_2^-\cdot\text{L}^{-1}$	Até o 142º dia de operação
	46 mg $\text{NO}_2^-\cdot\text{L}^{-1}$	A partir do 143º dia de operação
Fornecimento de CH_4	8 minutos.dia ⁻¹	Até o 80º dia de operação
	16 minutos.dia ⁻¹	Entre o 81º e o 167º dias de operação Entre o 177º e o 200º dias de operação
	Ininterrupto	Entre o 168º e o 176º dias de operação
Meio de cultura (Tabela 4.6)	Meio de cultura “D”	Até o 178º dia de operação
	Meio de cultura “E”	A partir do 179º dia de operação

Quadro 4.5 - Alterações dos parâmetros de operação do Up-FSBR

4.4.1. Inoculação do Reator

O inóculo utilizado foi lodo de reator UASB que trata despejo de abatedouro de aves (Dacar – Tietê/SP). Os grânulos foram macerados misturados ao meio de cultura modificado numa proporção de 50%:50%. Essa mistura de lodo e meio de cultura foi deixada em contato com as aparas de espuma de poliuretano, já acomodadas dentro do reator, por um período de 15

horas. O reator foi então drenado, retirando o excesso de lodo que não estava imobilizado. O reator foi preenchido com meio de cultura com a bomba ligada na vazão de operação. O reator foi mantido em recirculação com meio de cultura por cinco dias.

Na inoculação do reator, utilizou-se 2,1 L da mistura de lodo e meio de cultura e após as 15 horas de contato, drenou-se 1,65 L da solução, restando, portanto, dentro do reator, 0,45 L. Considerando os dados de sólidos do inóculo (Tabela 4.5), o reator foi inoculado com 6,5 g STV ou 0,37 g STV.g material suporte⁻¹.

Tabela 4.5 - Características físicas do inóculo utilizado no suporte do Up-FSBR

Parâmetro	Concentração
Sólidos Totais Voláteis (STV) [g.L ⁻¹]	14,47 ± 0,24
Sólidos Totais Fixos (STF) [g.L ⁻¹]	5,20 ± 0,16
Sólidos Totais (ST) [g.L ⁻¹]	19,67 ± 0,40
Densidade [g.L ⁻¹]	1.006,5 ± 32,7

Obs.: A análise de sólidos foi feita da solução utilizada no procedimento de inoculação, i.e, 50% lodo macerado e 50% meio de cultura

O meio de cultura utilizado durante a fase de inoculação foi o meio “D” (Tabela 4.6), à exceção da concentração das formas nitrogenadas. Durante a fase de inoculação, não foi utilizado nitrogênio amoniacal e foram dosados 110,7 mg NO₃⁻.L⁻¹ e 16,4 mg NO₂⁻.L⁻¹. Concentrações mais altas dos aceptores foram adotadas nessa fase de forma a acelerar o consumo de material endógeno. Nessa fase, foram adotadas concentrações mais altas dos aceptores de forma a acelerar o consumo de material endógeno.

4.4.2. Meio de Cultura

Em função dos resultados obtidos na Etapa 1, foi definido o meio de cultura “D” (Tabela 4.6) para a Etapa 3 - operação do Up-FSBR. As soluções de micronutrientes foram modificadas conforme Ettwig et al. (2009). É conveniente pontuar que a composição dos micronutrientes é similar à utilizada na Etapa 1, à exceção do EDTA.

A partir do 179º dia de operação foi adotado o meio de cultura “E”. A composição do meio de cultura “E” foi apresentada por Ettwig et al. (2009), em trabalho sobre o enriquecimento de bactérias metanotróficas desnitrificantes pertencentes ao filo NC10. Esse meio foi

posteriormente adotado por outros pesquisadores (KAMPMAN et al., 2014; LUESKEN et al., 2011c). Os meios de cultura utilizados estão descritos na Tabela 4.6 e na Tabela 4.7.

Tabela 4.6 - Meio de Cultura para enriquecimento de cultura metanotrófica desnitrificante utilizado no Up-FSBR

Meio de cultura “D”		Meio de cultura “E”^(*)	
Utilizado entre o 1º e o 178º dias de operação		Utilizado entre o 179º e o 200º dias de operação	
Componente	Concentração^(†)	Componente	Concentração^(†)
KH ₂ PO ₄	0,544 mg.L ⁻¹	KH ₂ PO ₄	50 mg.L ⁻¹
MgCl ₂ .6H ₂ O	4,9 mg.L ⁻¹	MgSO ₄ .7H ₂ O	200 mg.L ⁻¹
CaCl ₂ .2H ₂ O	3,6 mg.L ⁻¹	CaCl ₂ .2H ₂ O	300 mg.L ⁻¹
NH ₄ Cl	14,7 mg.L ⁻¹	NH ₄ Cl	-
NO ₂ ⁻ (○)	23 a 46 ^(●) mg.L ⁻¹	NO ₂ ⁻ (○)	46 mg.L ⁻¹
NO ₃ ⁻ (○)	31 mg.L ⁻¹	NO ₃ ⁻ (○)	31 mg.L ⁻¹
Solução micronutriente 1’	1 mL.L ⁻¹	Solução micronutriente 1’	1 mL.L ⁻¹
Solução micronutriente 2’	1 mL.L ⁻¹	Solução micronutriente 2’	1 mL.L ⁻¹

(○) dosados na forma de NaNO_x

(●) a variação na concentração afluyente de NO₂⁻ será oportunamente discutida na seção 5.3.

(*) Fonte: Ettwig et al. (2009)

(†) q.s.p 1.000 mL de água de abastecimento

Tabela 4.7 - Composição das soluções de micronutrientes utilizadas no meio de cultura do Up-FSBR

Solução micronutriente 1’	
Componente	Concentração (g.L⁻¹)^(†)
FeSO ₄	2,085
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,068
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,120
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,500
CuSO ₄	0,320
NiCl ₂ .6H ₂ O	0,095
H ₃ BO ₄	0,014
Solução micronutriente 2’	
Componente	Concentração (g.L⁻¹)^(†)
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,22
Na ₂ SeO ₃ .5H ₂ O	0,09

A solução de micronutrientes (1) foi feita numa solução de 100 mM de HCl e a (2) em uma solução 10 mM de NaOH

Fonte: Adaptado de Ettwig et al. (2009)

(†) q.s.p 1.000 mL de água deionizada

O meio de cultura era preparado três vezes por semana: às segundas-feiras, quartas-feiras e sextas-feiras.

4.4.3. Ensaio Hidrodinâmico

Antes da inoculação do reator de leito fixo e estruturado, foi realizado ensaio hidrodinâmico a fim de avaliar as características de escoamento do sistema. O ensaio foi concebido com estímulo em degrau e cloreto de sódio foi utilizado como traçador. Deve-se pontuar que o ensaio hidrodinâmico foi realizado com todas as linhas de alimentação e recirculação, líquidas e gasosas, em funcionamento. A única diferença foi que, ao invés de se utilizar *inputs* de metano, foi utilizado um aerador de aquário ligado ao temporizador. A manutenção das correntes líquidas e gasosas era importante para a obtenção de resultados representativos do escoamento do Up-FSBR e, como o ensaio hidrodinâmico foi realizado em condições abióticas, o fluxionamento de ar não representou nenhum prejuízo ao processo biológico. Acresce que no espaço onde foi realizado o ensaio hidrodinâmico não havia linha de gás metano disponível.

O dispositivo de saída do reator foi conectado a um eletrodo de condutividade modelo COM-BTA da marca Vernier Software & Technology. O eletrodo foi acoplado a um dispositivo USB para aquisição de dados modelo Go!Link Vernier, que, por sua vez, estava ligado a um computador. Os dados foram armazenados pelo *software* Go!Link Vernier e foram posteriormente exportados em formato “*comma-separated values*” (extensão .csv). O eletrodo de condutividade foi calibrado com água de abastecimento (Ponto 0) e com a solução utilizada no ensaio (Ponto 1). A solução utilizada no ensaio foi preparada com água de torneira e com concentração de 10 g.L^{-1} de NaCl.

O eletrodo foi programado para realizar coletas a cada dois minutos durante 50 horas, ou seja, o período do ensaio foi de mais de quatro vezes o TDH teórico. O ensaio em degrau forneceu concentrações crescentes até que fosse atingida a concentração máxima da solução.

Os dados obtidos foram ajustados a uma curva sigmoideal de Boltzmann no *software* Origin 8.0. A partir dos dados ajustados, foi calculada a curva F , obtida pela razão entre a concentração obtida no tempo t e a concentração máxima (Eq. 1). A derivada da curva F em relação ao tempo forneceu a curva de distribuição do tempo de residência (DTR), também

chamada curva $E(t)$ (Eq. 2). A partir da curva E foi possível determinar o tempo de detenção hidráulica médio ($\bar{\theta}_h$) (Eq. 3), a variância (σ^2) (Eq. 4) e a variância adimensional (σ_θ^2) (Eq. 5).

$$F = \frac{C}{C_{m\acute{a}x}} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$E = \frac{dF}{dt} \quad (\text{Eq. 2})$$

$$\bar{\theta}_h = \int_0^\infty t E(t) dt \quad (\text{Eq. 3})$$

$$\sigma^2 = \int_0^\infty (t - \bar{\theta}_h)^2 E(t) dt \quad (\text{Eq. 4})$$

$$\sigma_\theta^2 = \frac{\sigma^2}{\bar{\theta}_h^2} \quad (\text{Eq. 5})$$

A partir da variância adimensional, ajustou-se o modelo de tanques de mistura completa (CSTR) em série, que é um modelo para avaliar os desvios de idealidade. Nesse modelo, o reator é aproximado para um conjunto de N-CSTR em série. Quanto mais próximo de 1, mais o reator se aproxima de um CSTR ideal. De forma análoga, quanto maior N, mais o reator se aproxima de um reator pistonado (PFR). O valor de N é calculado pela (Eq. 6).

$$N = \frac{1}{\sigma_\theta^2} \quad (\text{Eq. 6})$$

O equacionamento apresentado nesta seção segue o descrito por Levenspiel (1999). Todos os cálculos foram feitos no *software* Origin 8.0.

4.4.4. Caracterização microbiana por sequenciamento do rRNA 16S – Plataforma Illumina MiSeq

Foi retirada amostra de biomassa do reator contínuo após 80 dias de operação. Para isso, uma das aparas de espuma de poliuretano que compunham o material suporte foi removida do reator e substituída por uma nova. A espuma foi lavada com água destilada para retirada da biomassa aderida.

A extração de DNA foi feita no mesmo dia da coleta da biomassa. Os procedimentos de preparo de amostra (lavagem com tampão fosfato) e extração foram feitos seguindo os mesmos

procedimentos descritos na seção 4.2.5. As amostras foram enviadas ao Laboratório de Biotecnologia Animal, Departamento de Zootecnia (ESALQ/USP), em Piracicaba –SP.

O sequenciamento de DNA foi feito utilizando a plataforma MiSeq Illumina 2x250 bp. Foram utilizados os *primers* universais para os domínios *Bacteria* e *Archaea* CCTACGGGNGGCWGCAG 16S (S-D-Bact-0341-b-S-17) e GACTACHVGGGTATCTAATCC (S-D-Bact-0785-a-A-21), específicos para as regiões V3 e V4 do gene rRNA 16S.

O pré-processamento foi feito com suporte do *software* CASAVA 1.8.2, fornecido pela Illumina. A filtragem das leituras foi feita utilizando o *software* Seqclean³. Foi definida qualidade mínima de 24 e comprimento mínimo de 65 pares de bases. Os procedimentos para remoção de *singletons*, determinação das sequências representativas e classificação taxonômica foram feitos de forma análoga ao descrito na seção 4.2.5 e adotando os mesmos parâmetros ali descritos.

4.5. ETAPAS 4 E 5: ENSAIOS EM BATELADA COM BIOMASSA DO REATOR UP-FSBR

Os ensaios batelada finais foram feitos com a biomassa enriquecida no Up-FSBR a fim de elucidar quais processos ocorriam no reator contínuo, já que os principais parâmetros de monitoramento (nitrito e nitrato) indicavam que a atividade desnitrificante era baixa e ocorria apenas como um processo marginal. Os ensaios foram feitos em batelada, porque essa configuração permite melhor controle das formas gasosas. É importante notar que, nesses ensaios, foi utilizada biomassa suspensa porque era a forma mais prática de utilizar a biomassa que foi retirada do material suporte no reator contínuo.

Em ambos os ensaios, foi utilizado o meio apresentado na Tabela 4.8. Novamente, em função dos resultados obtidos no Up-FSBR, o meio de cultura foi modificado. As concentrações de nitrito e nitrato serão apresentadas nas seções específicas (seção 4.5.1 e seção 4.5.2).

³ Disponível em <https://bitbucket.org/izhbannikov/seqclean>. Acessado em 08/07/2016.

Tabela 4.8 - Meio de cultura utilizado nas Etapas 4 e 5

Componente	Meio de cultura “F” Concentração ^(†)
KH ₂ PO ₄	8,1 mg.L ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O	24,5 mg.L ⁻¹
CaCl ₂ .2H ₂ O	3,6 mg.L ⁻¹
NH ₄ Cl	14,7 mg.L ⁻¹
Solução micronutriente 1'	1 mL.L ⁻¹
Solução micronutriente 2'	1 mL.L ⁻¹

As soluções de micronutrientes 1' e 2' são as mesmas apresentadas na Tabela 4.7

^(†) q.s.p 1.000 mL de água destilada

4.5.1. Etapa 4: Teste de Endogenia

A Etapa 4 consistiu em ensaios de endogenia, a fim de determinar se as formas nitrogenadas eram reduzidas a partir da oxidação do metano ou se ocorriam apenas em função da respiração de material endógeno. A hipótese de que toda redução das formas nitrogenadas ocorria devido à endogenia surgiu reiteradas vezes ao longo do trabalho, uma vez que a taxa da atividade desnitrificante ficava sempre muito próxima da desnitrificação endógena. Essas questões serão mais profundamente discutidas na seção 5.3.

Após o desligamento do Up-FSBR, a biomassa foi retirada do meio suporte e utilizada para inocular reatores em batelada. Foram testadas cinco condições (Quadro 4.6), sendo cada uma delas em triplicata, totalizando, então, 15 reatores em batelada. Cada uma das condições foi testada em apenas um ciclo (i.e, foram operadas bateladas simples).

Condição	Descrição
A	Dosagem de NO ₃ ⁻ e CH ₄
B	Dosagem de NO ₃ ⁻ e nenhum doador de elétrons
C	Dosagem de CH ₄ e NH ₄ ⁺ como fonte de N
D	Dosagem NO ₂ ⁻ e CH ₄
E	Dosagem NO ₂ ⁻ e nenhum doador de elétrons

Quadro 4.6 - Condições experimentais da Etapa 4 - Ensaio de Endogenia

A condição (C) buscou elucidar a ocorrência de redução assimilativa de nitrato a amônia (RANA). A concentração de nitrogênio amoniacal na corrente de alimentação do Up-FSBR era baixa e uma das hipóteses que foi levantada era de que as formas de nitrogênio mais oxidadas pudessem ser utilizadas para funções assimilativas. Se o consumo de nitrogênio amoniacal fosse

similar ao consumo das formas nitrogenadas fornecidas nas outras condições, seria uma evidência de que o nitrito e nitrato eram usados em funções assimilativas. Esse resultado confirmaria a hipótese de ocorrência da RANA. Por isso, na condição (C) foi adicionado NH_4^+ e nenhuma forma nitrogenada oxidada. Outro objetivo do estudo dessa condição foi o de verificar o consumo de metano na ausência de formas nitrogenadas oxidadas.

Os ensaios foram feitos em frascos Duran de 250 mL (volume efetivo de $308,3 \pm 5,2$ mL). O volume reacional adotado foi de $205,4 \pm 0,8$ mL, e o volume do *headspace* foi de $103,2 \pm 4,8$ mL para todos os quinze frascos testados (triplicata das cinco condições). Os frascos Duran foram mantidos em câmara com temperatura fixada em $30 \pm 2^\circ\text{C}$, mas sem agitação. Os frascos eram agitados manualmente entre uma e três vezes por dia.

A cada uma das replicatas foi adicionada biomassa suspensa, tendo sido utilizados $49,71 \pm 0,33$ g de biomassa enriquecida em cada batelada, ou $0,409 \pm 0,003$ g STV ($8,2$ g STV.kg lodo⁻¹). A concentração de nitrogênio foi fixada em 25 mg N.L⁻¹, ou 110 mg NO_3^- .L⁻¹ (condições A e B), 82 mg NO_2^- .L⁻¹ (condição D e E) e 32 mg NH_4^+ .L⁻¹ (condição C). O fornecimento de N foi feito na forma de NaNO_x , no caso do nitrato (condições A e B) e do nitrito (condições D e E) e na forma de NH_4Cl na condição C.

O ciclo das bateladas teve duração de sete dias e a pressão parcial inicial de metano (nos frascos em que esse foi adicionado) foi de $1,29 \pm 0,13$ atm. Nos bateladas em que não foi adicionado metano, i.e, condições B e D, foi mantida pressão de argônio equivalente. O meio de cultura utilizado seguiu a composição apresentada na Tabela 4.7 e na Tabela 4.8.

4.5.2. Etapa 5: Ensaio em Batelada Sequencial em condição microaerada

Esse ensaio foi delineado para verificar o consumo de metano em condições microaeradas controladas, bem como o comportamento do consumo do nitrato nessas condições.

O delineamento experimental desse ensaio exigiu diversas etapas. Foram feitos vários testes preliminares, antes de se chegar ao delineamento experimental que foi adotado na Etapa 5. Os testes preliminares foram realizados a fim de definir os procedimentos de amostragem e análise da composição do *headspace* no reator, bem como a melhor estratégia de fornecimento de oxigênio e os intervalos de injeção de O_2 a fim de manter o reator em condições microaeradas ao

longo do ciclo da batelada. Os resultados obtidos nesses testes preliminares foram utilizados para definir o delineamento experimental do ensaio de condições microaeradas (seção 4.5.2.4).

A metodologia utilizada no desenvolvimento de cada um dos testes preliminares será apresentada nas seções 4.5.2.1 a 4.5.2.3 e a discussão será feita na seção 5.5. No entanto, parte dos resultados dos testes preliminares será citada na seção 4.5.2.4, onde será apresentado o delineamento experimental adotado para o ensaio de condições microaeradas.

4.5.2.1. Testes Preliminares: Quantificação de Metano

Um dos principais desafios ao longo do desenvolvimento de todo projeto de pesquisa foi o de medir o consumo de metano. Ao longo de todas as etapas experimentais, essa medição foi pouco confiável, porque o baixo consumo de metano ficava sempre dentro do intervalo de erro do método. Para superar esse problema, foram adotadas duas abordagens: (A) ajustes na curva de calibração de metano no GC e (B) ajustes nas condições experimentais.

A abordagem (A) incluiu novo tratamento estatístico a fim de calcular novo ajuste para a curva de calibração, que resultasse em um intervalo de confiança mais acurado. As curvas de calibração foram construídas injetando diferentes volumes de uma composição de gás conhecida. Conhecidos o volume injetado e a pressão a que o gás estava submetido, foi possível calcular o número de mols teórico de gás em cada injeção, aplicando a lei de gases ideais (Eq. 7). Foi injetado gás com 25% CH₄, 25% N₂, 25% CO₂ e 25% H₂ e os volumes injetados variaram entre 10 µL e 1.000 µL. Para construção da curva, cada um dos pontos foi injetado em triplicata por três operadores, totalizando nove repetições para cada ponto.

$$PV = nRT \quad (\text{Eq. 7})$$

É forçoso esclarecer que os procedimentos de injeção foram realizados pela equipe técnica do laboratório. O presente trabalho apenas utilizou os dados obtidos no novo tratamento estatístico. Optou-se por descrever brevemente os procedimentos apenas para garantir melhor compreensão do processo de construção da curva de calibração.

Com os dados das injeções padrão, foi possível construir uma curva de calibração que relacionasse o número de mols à área do pico (Eq. 8), onde **y** é a área do pico (resposta do equipamento), **x** é o número de mols e os parâmetros do modelo são representados por **a** e **b**.

$$y = a.x + b \quad (\text{Eq. 8})$$

Para o tratamento estatístico foram aplicados testes de significância da regressão e da falta de ajuste (PIMENTEL; BARROS NETO, 1996). Foi utilizada Análise de Variância a fim de avaliar a significância da regressão e o ajuste da curva (Tabela 4.9 e Quadro 4.7). Além da análise de variância, foi feita também a análise dos resíduos.

Tabela 4.9 - Análise de Variância para o ajuste de um modelo pelo método dos mínimos quadrados

Fonte	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática
Modelo	$SQ_{reg} = \sum n_i [(y_e)_i - y_m]^2$	p-1	$MQ_{reg} = SQ_{reg}/(p - 1)$
Residual	$SQ_r = \sum \sum [y_{ij} - (y_e)_i]^2$	n-p	$MQ_r = SQ_r/(n - p)$
Falta de ajuste	$SQ_{faj} = \sum n_i [(y_e)_i - y_{im}]^2$	m-p	$MQ_{faj} = SQ_{faj}/(m - p)$
Erro puro	$SQ_{ep} = \sum \sum [y_{ij} - (y_e)_i]^2$	n-m	$MQ_{ep} = SQ_{ep}/(n - m)$
Total	$SQ_t = \sum \sum [y_{ij} - y_m]^2$	n-1	

n_i : número de repetições no nível i ; m : número de níveis distintos da variável x ; n : $\sum n_i$ ou número total de medidas; p : parâmetros do modelo. O índice i indica o nível da variável x ; o índice j refere-se às medidas repetidas da variável y em um dado nível x . O segundo somatório das expressões para SQ_r , SQ_{ep} e SQ_t vai de $j = 1$ até $j = n_i$. Os outros somatórios vão de $i = 1$ até $i = m$. y_m é a média de todos os valores y ; y_{im} é a média das determinações repetidas no nível i ; $(y_e)_i$ é o valor de y estimado pela curva de calibração no nível i

Fonte: Pimentel e Barros Neto (1996)

	Cálculo F	Análise resultado
Teste de significância da regressão	$\frac{MQ_{reg}}{MQ_r}$	Se $F < F_{crítico}$, $MQ_{reg} = MQ_r$, o que significa que ambas refletem apenas o erro aleatório Se $F > F_{crítico}$, $MQ_{reg} > MQ_r$, e há evidência de uma relação linear entre x e y .
Teste da falta de ajuste	$\frac{MQ_{faj}}{MQ_{ep}}$	Se $F < F_{crítico}$, $MQ_{faj} = MQ_{ep}$ e ambas são uma estimativa dos erros aleatórios. Há indício de que o modelo está bem ajustado.

Quadro 4.7 - Critérios para decisão dos testes estatísticos aplicados a curva de calibração do metano

Obtidos os parâmetros da curva de calibração e feitos os testes de significância da regressão e da falta de ajuste, foi calculado o erro padrão s (Eq. 9) Para cada amostra era calculado o intervalo de confiança (Eq. 10).

$$s = (\text{MQr})^{1/2} \quad (\text{Eq. 9})$$

$$x_o = x_e \pm \left(\frac{t \cdot s}{a} \right) \cdot \left\{ \frac{1}{n} + \frac{1}{q} + \left[\frac{(x_e - x_m)^2}{\sum (x_i - x_m)^2} \right] \right\}^{1/2} \quad (\text{Eq. 10})$$

Na (Eq. 10) x_o é o valor real do analito de interesse (no caso, o número de mols de CH_4), x_e é a estimativa do valor do analito dada pela curva de calibração, x_m é a média de todas as concentrações empregadas no ajuste do modelo, s é a estimativa do erro padrão, t é o ponto da distribuição de Student para 95% de confiança e $n-2$ graus de liberdade, sendo n o número total de medidas feitas na calibração. Por fim, a é o coeficiente angular da reta de calibração e q é o número de replicatas feitas numa mesma medida.

Outra modificação foi a substituição da seringa para injeções, por uma seringa de 100 uL. Até então, era utilizada seringa de 1.000 uL, que é a seringa de volume padrão para os ensaios de produção de hidrogênio e metano. A substituição por uma seringa com menor volume visou à melhora da resolução dos picos.

Além da questão analítica, a dificuldade em medir o consumo de metano foi relacionada ao fato de o processo metanotrófico ser um processo lento, e o consumo de metano ser baixo. Tentamos resolver essas questões fazendo ajustes nas condições experimentais – abordagem (B).

Assim, para o delineamento do ensaio em condições microaeradas, foram feitas diversas considerações, buscando-se aperfeiçoar a medida de consumo de metano. As condições experimentais foram ajustadas de forma a potencializar o consumo de metano:

- Optou-se por utilizar apenas dois reatores em batelada sequencial, o que permitiu que cada um deles contivesse mais biomassa. A maior concentração de sólidos voláteis no reator tende a resultar em maior consumo de metano. Um dos frascos foi submetido a condições anóxicas (Anox-SBR) e o outro a condições microaeradas (MO_2 -SBR)
- Optou-se pela utilização de *headspaces* menores, que possibilitaram maior concentração do gás e favoreceram a amostragem. O volume do *headspace* foi fixado em 100 mL;

- A pressão parcial do metano no início dos ciclos foi mantida em torno de 1,15 atm. Maiores pressões parciais de metano permitem maior concentração de metano dissolvido que, por sua vez, aumenta a velocidade de consumo do composto, permitindo melhor resolução nas análises.

A definição dessas condições foi testada. Para isso foram operados dois reatores em batelada por duas semanas a fim de verificar se esses parâmetros eram adequados.

4.5.2.2. Testes Preliminares: Estratégia de Microaeração

Ambos os reatores foram mantidos em condições anóxicas antes da injeção de oxigênio no MO₂-SBR. Eles eram submetidos a dez minutos de fluxionamento de argônio com o uso de uma pedra porosa de aço inox. Em seguida, eram submetidos ao fluxionamento de metano por um minuto, com auxílio da mesma pedra porosa.

Os frascos eram então fechados e o *headspace* era trocado por três minutos, com auxílio de duas agulhas, sendo uma equipada com uma válvula *gas-tight* e conectada à linha de metano (agulha 1 – Figura 4.5) e a outra mantida aberta para atmosfera (agulha 2). Passado esse tempo, à agulha 2 era acoplado o medidor de pressão, até que a pressão relativa atingisse cerca de 0,2 atm (pressão total de 1,15 atm). A válvula de gás era então fechada e as agulhas retiradas da tampa de butila.

Figura 4.7 - Esquema para troca de atmosfera do *headspace* dos SBR utilizados na Etapa 5: Ensaio em condições microaeradas

Para a dosagem de O₂ foi utilizado um frasco de antibiótico de 50 mL, lacrado e cheio de água. Na tampa de butila, eram colocadas duas agulhas, sendo uma delas ligada a um cilindro de

O₂ puro e a outra deixada aberta para atmosfera. Com o fluxo de O₂ aberto, assegurava-se que o volume do frasco era completamente trocado por O₂ (Figura 4.6).

Figura 4.8 - Preparo do frasco para fornecimento de O₂ ao SBR-MO₂

Após o escoamento de todo volume de água, o fluxo de oxigênio era mantido por mais três minutos. Retirava-se a agulha que estava aberta para atmosfera e mantinha-se o fluxo de oxigênio dentro do frasco de antibiótico por mais 10 segundos, de forma a deixá-lo pressurizado. Com o auxílio de uma seringa acoplada a uma válvula de gás para evitar vazamento, coletava-se 10 mL de O₂, que era injetado no MO₂-SBR através da tampa de butila.

A concentração de oxigênio dissolvido promovida com o uso desse protocolo foi testada em frascos Duran (V_{nominal}: 1 L) contendo um litro com água de torneira. Após a dosagem de oxigênio, o frasco era manualmente agitado e colocado a 30°C por 30 minutos a fim de que as fases gasosa e líquida pudessem entrar em equilíbrio.

Passado esse tempo, o frasco era aberto e media-se o oxigênio dissolvido (OD) com uma sonda de luminescência Hach modelo LDO10101, acoplada a um medidor portátil (HQ40d). Esse teste foi feito em triplicata com água de torneira e repetido em triplicata com o reator em carga, ou seja, contendo biomassa e meio de cultura.

4.5.2.3. Testes Preliminares: Definição dos intervalos de injeção de O₂

Neste ensaio, esperava-se que o consumo de metano aumentasse, até um valor que fosse mensurável por cromatografia gasosa. A Figura 4.7 esquematiza os resultados esperados.

Figura 4.9 - Resultados esperados no ensaio de condições microaeradas

A dificuldade, para desenvolvimento do delineamento experimental, era definir o Δt no qual deveria ser dada uma nova injeção de oxigênio. Para definir o intervalo de tempo, foram operados ciclos de sete dias com apenas uma injeção de O_2 , injeções de O_2 a cada 48 horas e a cada 24 horas. O monitoramento da concentração de metano na fase gasosa foi feita no mesmo intervalo das injeções de O_2 . Assim, nos ciclos em que foram feitas apenas uma injeção, a amostragem foi feita no início e ao final do ciclo. De forma análoga, nos ciclos em que o oxigênio foi injetado a cada 48 horas, o *headspace* foi amostrado nesse mesmo intervalo de tempo. Por fim, nos ciclos em que as injeções de O_2 foram dadas a cada 24 horas, a análise do *headspace* se deu nesse mesmo intervalo. Cada um desses ciclos foi operado em triplicata (no mínimo). Nesse período foi também operado o Anox-SBR, sem injeções de O_2 .

4.5.2.4. Delineamento Experimental Etapa 4 – Ensaio em condição microaerada

Foi estabelecido então que, para realização do ensaio em condições microaeradas, seriam utilizados frascos Duran de 1 L (volume efetivo de $1.120,0 \pm 0,89$ mL) com 1.000 mL de meio reacional e 120 mL de *headspace*. Os frascos foram mantidos em câmara sob temperatura controlada ($30 \pm 2^\circ\text{C}$) e sem agitação. A agitação foi feita manualmente três vezes ao dia.

O meio de cultura utilizado foi o mesmo que consta na Tabela 4.7 e na Tabela 4.8. Apenas as concentrações das formas nitrogenadas oxidadas foram modificadas. A concentração de nitrogênio foi fixada em 25 mg N.L^{-1} e apenas o nitrato foi utilizado neste ensaio, na forma de NaNO_3 . Deve-se salientar que foi utilizada biomassa suspensa, proveniente do reator contínuo e que havia sido previamente usada nos ensaios de respiração endógena.

É importante esclarecer que, pelo fato de terem sido utilizados apenas dois frascos, em um deles foi adicionado oxigênio (condição microaerada- MO_2 -SBR) e no outro não, tendo sido operado como frasco controle (Anox-SBR). Para obter um número de medidas que seja estatisticamente confiável, os reatores foram operados como bateladas sequenciais (SBR).

Para comparação do consumo de metano, foi delineado que os ciclos seriam de sete dias, com amostragem do *headspace* diária. Após a amostragem do *headspace*, era feita a repressurização do mesmo com gás metano de forma a manter a pressão total em 1,15 atm (pressão relativa de 0,20 atm). Só aí era dada a nova injeção de oxigênio no MO_2 -SBR. Depois desse momento, era refeita a amostragem.

Além dos reatores, foram operados dois frascos controle em condições abióticas para verificar eventuais perdas físicas de gás pela tampa de butila. Foram utilizados dois frascos Duran de 1L, com 1.000 mL de água de torneira e aproximadamente 100 mL de *headspace*. O líquido foi submetido a fluxionamento de argônio (Ar – 99%) (10 min), metano (CH_4 - 99%) (1 min) e troca de *headspace* por 3 minutos (com auxílio das agulhas) e pressurização do *headspace*. Foi feita uma triplicata sem adição de O_2 (imitando as condições do Anox-SBR) e uma triplicata com adição de O_2 (análogo às condições do MO_2 -SBR).

4.5.2.5. Caracterização microbiana por sequenciamento do rRNA 16S – Plataforma Illumina

Ao final do ensaio em condições microaeradas, foram retiradas amostras de biomassa dos reatores Anox-SBR e MO_2 -SBR. As amostras foram lavadas com tampão fosfato e foi feito a extração de DNA na sequência. Foram aplicados os mesmos procedimentos descritos na seção 4.2.5.

As amostras foram enviadas para sequenciamento no MRDNA Lab, em Shallowater, Texas, EUA. Foi feito sequenciamento do rRNA 16S com a plataforma MiSeq Illumina 2x250 bp. Foram utilizados os *primers* 515F (5'-CACGACG TTGTAACGACGTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') e 806R (5'-CAGGAAAC AGCTATGACCGGACTACVSGGGTATCTAAT-3'), específicos para a região V4 do rRNA.

O processamento das amostras foi feito utilizando o MR DNA *pipeline*. Foram removidas as sequências com menos de 150 pares de bases. As OTUs foram determinadas adotando 97% de

similaridade. Foram removidos *singletons* e quimeras. As OTUs finais foram classificadas utilizando bases de dados derivadas do GreenGenes (DESANTIS et al., 2006), RDP11⁴ e NCBI⁵.

4.6. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E CROMATOGRÁFICAS

As análises físico-químicas realizadas durante as etapas experimentais são apresentadas no Quadro 4.8.

Parâmetro	Método	Referência	Frequência de análise
pH	Potenciométrico	APHA (2005)	Rotina ^(*)
Alcalinidade	Titulométrico	RIPLEY et al. (1986)	Rotina
Série de Sólidos	Gravimétrico	APHA (2005)	Ocasional ^(†)
Nitrato	Cromatografia iônica (IC)	-	Rotina
	Colorimétrico	WEST & RAMACHADRAN, (1966)	
Nitrito	Cromatografia iônica (IC)	-	Rotina
	Colorimétrico	APHA (2005)	
Sulfato	Cromatografia iônica (IC)	-	Ocasional
Nitrogênio Amoniacal	Cromatografia iônica (IC)	-	Ocasional
Sulfeto	Colorimétrico	APHA (2005)	Ocasional
Metano	Cromatografia gasosa (GC)	ADORNO et al. (2014a)	Rotina
Vazão de metano	Bolhômetro	-	Rotina
Ácidos Orgânicos Voláteis	Cromatografia gasosa (GC)	ADORNO et al. (2014b)	Ocasional

Quadro 4.8 - Análises físico-químicas e cromatográficas para monitoramento das etapas experimentais

^(*) As análises de rotina eram realizadas a cada início e final de ciclo para os reatores em batelada. No caso do Up-
FSBR, as análises de rotina eram realizadas duas vezes por semana.

^(†) As análises com frequência ocasional foram feitas buscando compreender o processo biológico que estava ocorrendo nos reatores.

⁴ <http://rdp.cme.msu.edu>. Acessado em 08/07/2016

⁵ www.ncbi.nlm.nih.gov. Acessado em 08/07/2016

As análises apresentadas no Quadro 4.8 foram realizadas em todas as etapas experimentais, à exceção da medida de vazão do metano, que só foi realizada na Etapa 3. No entanto, é necessário fazer algumas considerações:

- a) As análises com frequência ocasional foram feitas buscando compreender o processo que estava ocorrendo no reator. A justificativa para realização dessas análises será oportunamente discutida ao longo do capítulo 5.
- b) As análises de rotina para os reatores em batelada e em batelada sequencial eram feitas no início e no final de cada ciclo, exceto quando indicado (como no caso dos perfis temporais, cujo intervalo de amostragem foi apresentado na seção 4.2.4).
- c) As análises de rotina na Etapa 3 (operação do Up-FSBR) eram feitas duas vezes por semana.
- d) A vazão de metano foi feita diariamente durante a Etapa 3 tanto na linha de alimentação de gás quanto na linha de recirculação de gás. As saídas das linhas eram acopladas ao bolhômetro e era cronometrado o tempo em que a bolha levava para percorrer o volume marcado no bolhômetro. As medidas eram realizadas sempre em triplicata.

4.6.1. Análises por cromatografia de íons (IC)

4.6.1.1. Análise de ânions por cromatografia de íons

A análise de ânions por cromatografia de íons foi feita em equipamento Dionex ICS – 5.000, equipado com supressora de ânions, operada com corrente de 25 mA e detecção por condutividade. O método analítico utilizado é capaz de quantificar Cl^- , F^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- , SO_4^{2-} e PO_4^{3-} na mesma corrida cromatográfica.

Foi utilizada coluna Dionex AS23 ϕ 4 mm e supressora ASRS ϕ 4 mm. Foi utilizada eluição isocrática com vazão de $1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e a fase móvel consistia numa solução de carbonato de sódio ($4,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) e bicarbonato de sódio ($0,8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) em água deionizada. A amostragem era feita através de amostrador automático Dionex AS e o *loop* de injeção era de $10 \mu\text{L}$. A coluna foi mantida a 35°C e o detector de condutividade operava a 30°C .

As curvas de calibração foram feitas utilizando padrão Seven Anion da Dionex® (ref. 057590), contendo F^- ($20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), Cl^- ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), NO_2^- ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), Br^- ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), NO_3^-

PO_4^{3-} (200) e SO_4^{2-} . Os limites mínimos e máximo das curvas de calibração eram de 2,5 mg.L⁻¹ a 50 mg.L⁻¹ para o NO_2^- , NO_3^- e SO_4^{2-} . Antes de serem injetadas, as amostras foram filtradas em membrana de fibra de vidro de porosidade 0,22 µm. Foram utilizados filtros para seringa Chromafil® GF/PET da Macherey-Nagel, GE.

4.6.1.2. Análise de nitrogênio amoniacal por cromatografia de íons (IC)

A análise de nitrogênio amoniacal por cromatografia de íons foi feita em Dionex ICS – 5.000, equipado com supressora de cátions (operada com corrente de 59 mA) e detecção por condutividade. Foi utilizada coluna Dionex CS 12 φ 4 mm e supressora de cátions CSRS φ 4 mm. Foi utilizada, como fase móvel, solução de 12 mmol H₂SO₄.L⁻¹ em água deionizada e eluição isocrática com vazão de 1,0 mL.min⁻¹. A coluna era mantida a 30°C durante toda corrida, e o detector a 35°C. A injeção das amostras era feita através de amostrador automático Dionex AS com *loop* de injeção de 10 µL.

As curvas de calibração foram construídas a partir de uma solução mãe de 500 mg NH₄⁺.L⁻¹, preparada com sal NH₄Cl da Sigma-Aldrich® em água deionizada. A partir da solução mãe, eram construídas duas curvas de calibração: (i) a curva baixa, com intervalo de concentração entre 0,5 mg NH₄⁺.L⁻¹ e 5,0 mg NH₄⁺.L⁻¹ e (ii) a curva alta, com intervalo de concentração entre 5,0 mg NH₄⁺.L⁻¹ e 40,0 mg NH₄⁺.L⁻¹. Para o preparo dessas soluções foi utilizada água deionizada. Antes de serem injetadas, as amostras foram filtradas em membrana de fibra de vidro de porosidade 0,22 µm. Foram utilizados filtros para seringa Chromafil® GF/PET da Macherey-Nagel, GE.

4.6.2. Análise de metano por cromatografia gasosa

As análises de metano por cromatografia gasosa foram realizadas em dois equipamentos. Durante as etapas 1 e 2 (seções 4.2 e 4.3), a análise de cromatografia gasosa foi realizada em cromatógrafo gasoso GC-2010 SHIMADZU, equipado com coluna *Carboxen* 1010 PLOT (30 m x 0,53 mm de diâmetro interno e 40,0 µm de espessura de filme) e detector de condutividade térmica (TCD) (corrente 35mA, polaridade negativa) e utilizando argônio como gás de arraste (Q: 12 mL.min⁻¹). As temperaturas no injetor e no detector foram mantidas constantes a 220°C, 230°C, respectivamente. A temperatura da coluna variou entre 130°C e 135°C, com uma taxa de 46°C.min⁻¹. Esse método permite que sejam identificados picos de hidrogênio, nitrogênio, metano

e dióxido de carbono. Os limites de quantificação e o ponto máximo das curvas de calibração eram de 0,10 e 10,11 μmol .

Nas Etapas de 3 a 5 a análise de metano pelo GC foi feita em equipamento SHIMADZU GC-2014, equipado com coluna HP-PLOT/Q (30 m x 0,53 mm de diâmetro interno e 40,0 μm de espessura de filme) detector de condutividade térmica (corrente de 180 mA e polaridade positiva). O gás de arraste era o hidrogênio com vazão de 4,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A temperatura no injetor foi mantida em 160°C e a do detector em 170°C. A temperatura no forno da coluna variou entre 35°C (2 min) até 170°C (1 min), com taxa de aumento de temperatura de 60°C. min^{-1} (tempo total de corrida de 5,25 min). Esse método permite que sejam identificados picos de nitrogênio, metano, dióxido de carbono e sulfeto de hidrogênio. O limite de quantificação do metano era de 0,91 μmol e o ponto máximo da curva de calibração era de 9,1 μmol .

4.6.2.1. Cálculo da quantidade de metano no headspace

As análises de gás realizadas no GC forneciam áreas a partir das quais era calculada a quantidade de metano no volume de injeção. A quantidade de metano presente no *headspace* era então calculada aplicando-se proporcionalidade direta. Esse procedimento de cálculo é confiável, uma vez que a seringa de amostragem estava equipada com uma válvula *gas-tight*, garantindo que a amostra na seringa estava nas mesmas condições de temperatura e pressão do *headspace*.

Na sequência, calculava-se também a quantidade de metano dissolvido. Para isso, determinava-se inicialmente a pressão parcial do metano, através da aplicação da lei de gases ideais (Eq. 7). Conhecendo-se a pressão parcial do metano, aplicava-se a Lei de Henry, segundo a qual a solubilidade de um gás dissolvido é diretamente proporcional à pressão parcial daquele gás no *headspace* (Eq. 11).

$$P = KX \quad (\text{Eq. 11})$$

Na (Eq. 11), P é a pressão parcial do gás, X é a concentração desse gás no meio líquido e K a constante de Henry. As constantes de Henry tabeladas, em geral, são apresentadas para a condição padrão, i.e, temperatura de 298 K (ou 25°C). Como os ensaios foram realizados a temperatura controlada de 30 ± 2 °C, a constante de Henry para o metano foi corrigida de acordo com a (Eq. 12), consultado o documento “*Compilation of Henry’s Law Constants for Inorganic e*

Organic Species of Potential Importance in Environmental Chemistry”, disponibilizado pelo *Air Chemistry Department*, do *Max-Planck Institute of Chemistry* e compilado por Sander (1999).

$$K_H = K_H^\theta \times \exp\left(\frac{\Delta_{soln}H}{R} \times \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T^\theta}\right)\right) \quad (\text{Eq. 12})$$

Onde:

Parâmetro	Descrição	Unidade
K_H	Constante de Henry nas condições experimentais	$\text{mol.}(\text{L.atm})^{-1}$
K_H^θ	Constante de Henry tabelada nas condições padrão	$\text{mol.}(\text{L.atm})^{-1}$
$\frac{\Delta_{soln}H}{R}$	Entalpia da solução (tabelado)	1/K
T	Temperatura experimental	K
T^θ	Temperatura nas condições padrão	K

Quadro 4.9 - Parâmetros da equação para correção da constante de Henry segundo a temperatura dos gases (Eq. 12)

4.6.3. Análises colorimétricas

Durante a operação das Etapas 4 e 5 (teste de endogenia e ensaio em condições microaeradas, respectivamente), o cromatógrafo de íons esteve inoperante por motivos técnicos. Devido a esse inconveniente, nesses ensaios foram adotados os métodos colorimétricos descritos no Quadro 4.8.

O método colorimétrico do nitrito se baseia na reação deste composto com sulfanilamida em meio ácido (pH 2,0 a 2,5), que forma um composto de coloração roxo-avermelhada (BENDSCHNEIDER; ROBINSON, 1952). O método está descrito por APHA (2005). A maior limitação desse método é a pequena faixa de concentração em que a Lei de Beer é válida. As curvas de calibração foram preparadas para concentrações entre 0,01 mg $\text{NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$ e 0,10 mg $\text{NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$. Os pontos da curva de calibração foram preparados em triplicatas autênticas a partir de solução mãe de 10 mg $\text{NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$. A solução mãe, por sua vez, foi preparada a partir da diluição de uma solução padrão de 100 mg $\text{NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$, preparada com NaNO_2 da Sigma Aldrich. As leituras foram feitas em espectrofotômetro Hach DR/4000U em comprimento de onda (λ) de 543 nm. Todas as análises feitas por esse método foram feitas com triplicatas autênticas.

O método do ácido cromotrópico foi adotado como alternativa à análise cromatográfica para análise de nitrato. O método do ácido cromotrópico foi proposto inicialmente por West e Ramachandran (1966) e se baseia na coloração amarela que resulta da reação do íon nitrato com o ácido cromotrópico (ácido 1,8-dihidroxi-3,6-naftalenodissulfônico) na presença de ácido sulfúrico forte. A coloração amarela é mais intensa para solução de H_2SO_4 entre 13 e 14 mol.L^{-1} (ROBINSON; HSU, 1969). A vantagem desse método em comparação a outros métodos colorimétricos é que ele é seguro para o operador, diferente do método que usa redução de cádmio, e não sofre interferência de compostos orgânicos, como o método de absorção ultravioleta.

Para análise de nitrato pelo método do ácido cromotrópico foi utilizado o kit Hach® (ref. 26053.45). O kit da Hach® é composto por tubos contendo H_2SO_4 na concentração de 12,5 mol.L^{-1} e um sachê contendo o ácido cromotrópico e outros reagentes (ureia, sulfito de sódio e antimônio) para remoção de interferentes (nitrito, cloreto e agentes oxidantes). As leituras foram feitas em espectrofotômetro Hach DR/4000U, já equipado com a curva de calibração para uso do kit.

A concentração máxima da curva de calibração fornecida pela Hach® é de 30 $\text{mg N-NO}_3^- .\text{L}^{-1}$. Para testar o kit e a resposta da curva de calibração instalada no espectrofotômetro, foram feitas análises de solução padrão de NaNO_3 nas concentrações de 5 $\text{mg N-NO}_3^- .\text{L}^{-1}$, 12 $\text{mg N-NO}_3^- .\text{L}^{-1}$ e 25 $\text{mg N-NO}_3^- .\text{L}^{-1}$. Para cada um dos níveis de concentração, foram testadas triplicatas autênticas a partir de solução mãe de 100 $\text{mg N-NO}_3^- .\text{L}^{-1}$, preparada com NaNO_3 da Sigma Aldrich. Os resultados obtidos nos testes foram precisos e exatos, com coeficiente de variação entre as replicatas de mesma concentração inferior a 10%. Embora o limite inferior testado seja superior ao limite de quantificação do método de cromatografia de íons, essa diferença não prejudicou as análises, uma vez que foram utilizadas concentração na faixa dos 25 $\text{mg N-NO}_3^- .\text{L}^{-1}$ nas etapas 4 e 5 deste trabalho.

4.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os testes estatísticos foram realizados utilizando o *software* ActionStat, integrado ao Excel®. Para testar a normalidade dos conjuntos amostrais obtidos para atividade desnitrificante,

foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk, considerado o mais robusto dentre os testes de normalidade (RAZALI; WAH, 2011).

Como na maior parte dos conjuntos de dados ou a distribuição não era normal ou o conjunto amostral era inferior a 20 medições, foram utilizados testes não paramétricos. Os testes aplicados são descritos no Quadro 4.10. A situação onde foi utilizado cada teste está explicitada ao longo do Capítulo 5 – “Resultados e Discussão”. Para todos os testes foi adotado nível de confiança de 95%.

Teste não paramétrico	Tipo de análise	Teste paramétrico equivalente
Teste de Wilcoxon	Comparar duas amostras pareadas	Teste t de Student para amostras pareadas (dependentes)
Teste de Mann-Whitney	Comparar duas amostras não pareadas	Teste t de Student para amostras não pareadas (independentes)
Teste de Kruskal-Wallis	Comparar três ou mais amostras não pareadas	<i>One-way</i> ANOVA

Quadro 4.10 - Testes não paramétricos utilizados

Como medidas de posição central foram adotadas a média e a mediana, sendo essa última utilizada nos casos em que a dispersão era muito alta. As medidas de dispersão utilizadas foram o desvio padrão (quando a medida de posição central foi a média) ou o desvio mediano absoluto (para os casos em que foi adotada a mediana). A utilização de uma ou de outra é explicitada ao longo da discussão dos resultados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ETAPA 1: ENRIQUECIMENTO DE BIOMASSA METANOTRÓFICA DESNITRIFICANTE ANÓXICA A PARTIR DE DOIS DIFERENTES INÓCULOS

Nesse ensaio foram utilizados dois inóculos para enriquecimento de organismos metanotróficos desnitrificantes (ver seção 4.2). Foram utilizados mistura de sedimento marinho e sedimento de mangue (SED) e lodo de reator UASB empregado em tratamento de água residuária de abatedouro de aves (LAn). Cada um dos inóculos foi testado em triplicata, e serão doravante identificados como SED-SBR e LAn-SBR. O teste de Kruskal Wallis mostrou que o consumo das formas nitrogenadas entre as replicatas inoculadas com mesmo material não apresentou diferença estatisticamente significativa (H: -216; p : 1 para SED-SBR and H: -192; p : 1 para LAn-SBR). Para cada um dos inóculos foi ainda mantido um controle sem adição de doadores de elétrons, a fim de monitorar o consumo endógeno das formas nitrogenadas (SED-C e LAn-C).

Os resultados de monitoramento são apresentados na Tabela 5.1 e sugerem que a oxidação do metano permitiu o consumo de nitrito e nitrato. Embora as taxas de desnitrificação tenham se mantido baixas elas foram significativamente superiores que os seus respectivos controles. O teste de Mann-Whitney (nível de confiança de 95%) mostra que as diferenças entre os reatores nos quais foi dosado metano e os respectivos reatores controle é estatisticamente significativa (U: 226.5, p : $1,05 \cdot 10^{-6}$ para o SED-SBR and U: 927, p : $4,0 \cdot 10^{-6}$ para o LAn-SBR). No entanto, as medidas de consumo do metano por GC ficaram dentro do erro do método e, portanto, não foi possível fazer quantificá-lo com segurança.

É interessante notar que o consumo das formas nitrogenadas no LAn-SBR foi superior ao LAn-C para durante todo o tempo de operação dos SBR. Foi observado que nos primeiros 60 dias de ensaio, aproximadamente, houve consumo das formas nitrogenadas no LAn-C, possivelmente devido ao material endógeno presente no inóculo. Nos primeiros dois meses de ensaio, a mediana do consumo das formas nitrogenadas foi de $0,868 \pm 0,609$ mg N.dia⁻¹ no LAn-C e de $1,758 \pm 0,293$ mg N.dia⁻¹ e o teste de Mann-Whitney indica que essa diferença é estatisticamente significativa (U: 57; p : 0,02). Ressalta-se que o consumo das formas nitrogenadas oxidadas no LAn-C apresentou tendência decrescente ao longo do ensaio (Figura 5.1)

Tabela 5.1 - Mediana dos parâmetros de monitoramento dos SBR da Etapa 1, para os 186 dias de ensaio

	SED-SBR	SED-C	LAn-SBR	LAn-C
Consumo N [mg N.dia^{-1}]	$1,14 \pm 0,68$	$0,17 \pm 0,17$	$1,66 \pm 0,43$	$0,48 \pm 0,48$
Eficiência remoção N [%]	$49,9 \pm 27,0$	$10,4 \pm 10,4$	$86,1 \pm 11,5$	$3,29 \pm 3,29$
pH inicial	$6,8 \pm 0,1$	$7,5 \pm 0,1$	$6,7 \pm 0,2$	$7,4 \pm 0,2$
pH final	$7,0 \pm 0,1$	$7,0 \pm 0,1$	$7,0 \pm 0,1$	$7,4 \pm 0,2$
Alcalinidade total inicial [$\text{mgCaCO}_3.\text{L}^{-1}$]	$18,5 \pm 8,7$	$8,9 \pm 1,2$	$16,2 \pm 7,1$	$13,1 \pm 0,3$
Alcalinidade total final [$\text{mgCaCO}_3.\text{L}^{-1}$]	$45,1 \pm 3,5$	$11,9 \pm 4,0$	$45,6 \pm 8,1$	$12,6 \pm 2,0$

Outro ponto interessante é que, nos SBR, houve geração de alcalinidade. No caso dos LAn-SBR a alcalinidade no final do ciclo foi de 2,5 a 3,0 vezes superior à inicial. Tanto a oxidação do metano quanto a redução das formas nitrogenadas oxidadas são reações que geram alcalinidade, e assim, essa é uma evidência de que estivesse ocorrendo ao menos um desses processos nos SBR.

Figura 5.1 - Consumo das formas nitrogenadas para os reatores em batelada sequencial (SRB) na Etapa 1

Os SBR inoculados com mistura de sedimento marinho e sedimento de mangue (Sed-SBR) e com lodo de reator UASB (LAn-SBR) e seus reatores controles (Sed-c e LAn-c). Os reatores controle correspondem àqueles em que não foi dosado nenhum doador de elétrons. O período (i) corresponde ao período em que foi utilizado o meio de cultura “A”. No período indicado por (ii), foi utilizado o meio de cultura “B” e, de forma análoga, no período (iii) foi dosado o meio de cultura “C” (Tabela 4.2)

O metano não apenas permitiu a ocorrência de desnitrificação, como também sustentou o crescimento celular para os LAn-SBR. No início do experimento a massa de sólidos totais voláteis (STV) nos LAn-SBR era $2,844 \pm 0,129$ gSTV ($0,073 \pm 0,002$ g STV.g material suporte⁻¹). Ao final do ensaio a quantidade de sólidos foi determinada em $3,156 \pm 0,482$ gSTV ($0,083 \pm 0,013$ g STV.g material suporte⁻¹), o que representa 10% de aumento na massa de STV. Houve aumento também na relação entre os sólidos totais voláteis e os sólidos totais (STV/ST), ou seja, houve decréscimo no teor de sólidos fixos (SF). O teor de STV no inóculo LAn era 66% dos ST, mas ao final do período de enriquecimento esse teor era de 82% nos LAn-SBR.

Em contrapartida, no SED-SBR, foi observada diminuição de cerca de 30% no teor de STV. Ele foi de $2,590 \pm 0,322$ gSTV ($0,066 \pm 0,009$ gSTV.g material suporte⁻¹) no inóculo para $1,822 \pm 0,220$ gSTV ($0,045 \pm 0,005$ gSTV.g material suporte⁻¹) ao final da operação. Contudo, a relação STV/ST foi de 2,8% no inóculo para 18,5% na cultura enriquecida. Deve-se ressaltar que o teor de STV era similar para todos SBR no início do experimento, independente do inóculo. Ao final do ensaio, porém, não foi possível analisar o teor de sólidos para os reatores controle (SED-C e LAn-C), pois quase não havia biomassa. A Figura 5.2 permite observar visualmente a diferença na quantidade de biomassa entre o SBR e seu controle, operado sem a adição de doador de elétrons. Essas informações permitem inferir que o metano foi responsável pelo crescimento celular de cerca de 10% nos LAn-SBR. O teor de STV diminuiu nos SED-SBR, mas em menor grau que nos SBR controle, nos quais o conteúdo de sólidos praticamente se extinguiu.

Figura 5.2 - Reatores em batelada sequencial ao final da operação da Etapa 1.

(a) SED-SBR, i.e, SBR inoculados com mistura de sediment marinho e de mangue; **(b)** LAn-SBR, i.e, SBR inoculados com lodo de UASB. Tanto em (a) quanto em (b) o frasco posicionado à esquerda corresponde ao

controle, operado sem adição de doador de elétrons. **Obs.:** O material suporte do SBR-LAn que aparece em (b) corresponde ao utilizado em mais de uma replicata. No momento da foto, eles já haviam sido misturados.

Ademais, a diferença entre consumo de nitrogênio nos LAn-SBR e nos SED-SBR foi estatisticamente significativa, segundo o teste de Mann-Whitney (U: 370, p : 0,01). No entanto, essa diferença parece estar relacionada ao teor de sólidos voláteis. A atividade desnitrificante específica foi de $0,623 \pm 0,373 \text{ mgN.gSTV}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ para os SED-SBR e de $0,420 \pm 0,107 \text{ mgN.gSTV}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ para os LAn-SBR. Apesar da diferença numérica, o teste de Mann-Whitney mostra que essa diferença é estatisticamente desprezível (U: 211; p : 0,681). Dessa forma, existe diferença estatisticamente significativa entre os dois inóculos quando se considera a carga de nitrogênio removida, mas essa diferença é desprezível em termos de atividade desnitrificante específica.

É digno de nota que a mediana de consumo da atividade específica tenha sido superior para o SED-SBR, embora se deva destacar que a dispersão de dados para esses reatores tenha sido muito alta. A Figura 5.3 mostra o *boxplot* de consumo das formas nitrogenadas em termos de carga de nitrogênio removida e em termos de atividade desnitrificante específica. Destaca-se ainda que o consumo das formas nitrogenadas no SED-SBR decaiu ao longo do ensaio e que a resposta dos LAn-SBR foi mais consistente durante o todo ensaio (Figura 5.1 e Tabela 5.2).

Figura 5.3 - *Boxplot* da carga de nitrogênio removida (a) e da atividade desnitrificante específica (b)

Observou-se queda na atividade desnitrificante para os SBR de ambos inóculos entre os dias 70 e 112, período identificado como (ii) na Figura 5.1. Nesse período, foi adotado o meio de cultura “B” (Tabela 4.2). Uma hipótese é que a dosagem de macronutrientes, especialmente o sulfato tenha influenciado na biodisponibilidade de algum nutriente essencial. Essa hipótese foi

reforçada a partir dos resultados do perfil temporal, no qual foi possível observar que na primeira hora de ensaio a concentração de sulfato diminuiu em cerca de 50% e depois permaneceu aproximadamente constante durante todo perfil temporal (Figura 5.4), que durou entre 40 e 60 horas (seção 5.1.1).

Figura 5.4 - Concentrações de sulfato observadas ao longo do ensaio de perfil temporal para biomassa SED-TP e LAn-TP

Diversos autores haviam levantado a hipótese de que o lento crescimento dos organismos metanotróficos desnitrificantes estava ligado à deficiência nutricional (ETTWIG et al., 2009; KAMPMAN et al., 2012; RAGHOEBARSING et al., 2006). Em geral, esses autores sugeriam que a falta de algum nutriente específico importante era um obstáculo ao estabelecimento da comunidade responsável pela oxidação anóxica do metano acoplada à desnitrificação (DAMO). Os resultados obtidos até este ponto deste trabalho, no entanto, indicavam outra hipótese possível – a questão nutricional não estava ligada à deficiência de um nutriente, mas ao excesso de algum composto, que poderia, de alguma forma, inibir o estabelecimento do processo DAMO. A nossa hipótese foi de que o sulfato precipitasse com outro micronutriente, tornando-o indisponível aos microrganismos. Convém pontuar que a concentração de sulfato utilizada no meio de cultura “B” é compatível à utilizada por outros pesquisadores que estudaram o enriquecimento de organismos metanotróficos desnitrificantes (ETTWIG et al., 2009; RAGHOEBARSING et al., 2006). A partir desses resultados, optou-se por diminuir a concentração dos macronutrientes, de forma a manter o fornecimento de nutrientes essenciais, mas sem prejudicar o processo. Passou a ser

adotado, então, o meio de cultura C (Tabela 4.2). A Tabela 5.2 apresenta o consumo das formas nitrogenadas em termos de atividade desnitrificante e de eficiência de remoção. Nota-se que depois que a concentração dos macronutrientes foi diminuída a atividade desnitrificante voltou a aumentar para os LAn-SBR, o que reforça a hipótese de que algum nutriente estava menos biodisponível no (ii).

Tabela 5.2 - Carga das formas nitrogenadas oxidadas para o SED-SBR e o LAn-SBR, para as três

Fase	Meio de cultura utilizado	Sed-SBR			LAn-SBR		
		Atividade (mg N.dia ⁻¹)	Eficiência (%)	N inicial (mg.L ⁻¹)	Atividade (mg N.dia ⁻¹)	Eficiência (%)	N inicial (mg.L ⁻¹)
i	A	1,55 ± 0,24	89,6 ± 10,4	9,3 ± 0,8	1,76 ± 0,29	96,6 ± 0,6	8,9 ± 1,1
ii	B	0,46 ± 0,30	47,9 ± 16,7	9,7 ± 1,2	1,35 ± 0,40	92,0 ± 8,0	9,8 ± 0,7
iii	C	0,42 ± 0,42	25,0 ± 18,1	13,5 ± 3,2	1,67 ± 0,90	71,3 ± 9,2	12,9 ± 2,6

É forçoso discutir uma aparente incoerência entre o aumento da atividade desnitrificante e a diminuição da eficiência para os LAn-SBR, que esteve possivelmente relacionada à estratégia de adição dos aceptores de elétrons. Até o momento do ensaio cinético (que ocorreu no 115º dia de operação) o meio era preparado já com as dosagens de nitrato e nitrito. No entanto, no perfil temporal foi identificado que o consumo das formas nitrogenadas seguia primeira ordem, nas condições experimentais (seção 5.1.2). Como o procedimento no início dos ciclos era de esperar 30 minutos antes de fazer a amostragem do *headspace* e só então amostrar a fase líquida, era possível que estivesse se perdendo o consumo inicial das formas nitrogenadas. Assim, passou-se a dosar o nitrito e nitrato após as amostragens do *headspace*. Para isso, eram preparadas soluções concentradas de nitrito e nitrato de sódio, separadamente e dosadas com o auxílio de uma seringa através da butila. Essa alteração foi feita a partir do 115º dias de operação, e praticamente coincidiu com a operação da fase (iii) (Tabela 5.2). Com isso, as concentrações iniciais de nitrogênio mensuradas passaram a ser mais altas, o que afetou o cálculo da eficiência. De fato, as concentrações iniciais após a mudança de estratégia de fornecimento dos aceptores de elétrons, ficaram mais próximas à concentração inicial teórica (de 14 mg N.L⁻¹).

O desempenho dos SED-SBR decaiu ao longo de toda operação, não tendo sido observada recuperação depois que a dosagem dos macronutrientes foi diminuída. Assim, não se pode afirmar com certeza se a dosagem de macronutrientes realmente interferiu ou se foi outro fator, como acúmulo de algum composto tóxico aos microrganismos ou até mesmo ao esgotamento de algum elemento que já estava presente no inóculo.

De forma geral, a atividade desnitrificante específica se manteve muito baixa ao longo de toda operação, tendo permanecido dentro da faixa usual de desnitrificação heterotrófica endógena, i.e., abaixo dos 30 mg N dia⁻¹ g STV⁻¹ (TCHOBANOGLIOUS et al., 2003).

Dentre os dados apresentados na Tabela 5.3, apenas Cai et al. (2015) e Hu et al. (2011) obtiveram taxas mais altas. Nos dois casos, os reatores foram operados por longos tempos. Cai et al. (2015) relatam que a atividade descrita foi alcançada após 453 dias de operação, partindo de biomassa já enriquecida com organismos metanotróficos desnitrificantes. Essa remoção de nitrato foi obtida em reatores de membrana, que aumentam a quantidade de biomassa no sistema e assim contornam as baixas atividades específicas. Esses autores, no entanto, não apresentam a taxa desnitrificante específica, o que dificulta a comparação.

Tabela 5.3 - Taxas de consumo de N utilizando o CH₄ como doador de elétrons

Referência	Condição	Atividade desnitrificante
Este trabalho	Metanotrófica anóxica	SED-SBR: 0,62 ± 0,37 mgN.gSTV ⁻¹ .dia ⁻¹ LAn-SBR: 0,42 ± 0,11 mgN.gSTV ⁻¹ .dia ⁻¹
Gavazza et al. (2004)	Metanotrófica anóxica	1,44 mgN.gSTVLM ⁻¹ .dia ⁻¹
Hu et al. (2011)	Metanotrófica anóxica	31,1 mg N.gSSV ⁻¹ .dia ⁻¹
He et al. (2015a)	Metanotrófica anóxica	1,38 mgN.gSSV ⁻¹ .dia ⁻¹
Cai et al. (2015)	Metanotrófica anóxica	684 mgN.L ⁻¹ .dia ⁻¹
Liu et al. (2014)	Metanotrófica microaerada	2,5 mgN.gSSV ⁻¹ .d ⁻¹
Waki et al. (2005)	Metanotrófica aerada	13,2 mgN.gSSV ⁻¹ .d ⁻¹

Da Tabela 5.3 depreende-se que a atividade desnitrificante específica obtida neste trabalho é mais baixa que a obtida por outros autores que trabalharam em condições afins (GAVAZZA DOS SANTOS et al., 2004; HE et al., 2015a). Esses autores trabalharam com biomassa suspensa e assim, foi levantada a hipótese de que o emprego de biomassa imobilizada pudesse dificultar o estabelecimento do processo DAMO devido a maior resistência à transferência de massa. A Etapa 2 buscou esclarecer essa hipótese (seção 5.2).

Foi também levantada a hipótese de que a baixa atividade desnitrificante específica estava associada a eventual acúmulo de inibidor nos SBR. Em uma das possíveis rotas de oxidação anóxica do metano acoplada à desnitrificação pode haver formação de formaldeído (ETTWIG et al., 2010), o que poderia inibir a atividade microbiana (GONZALEZ-GIL et al., 1999). Assim, optou-se por testar o emprego de reator contínuo para estabelecimento do processo DAMO.

Ademais, as baixas taxas de atividade desnitrificante e as eficiências relativamente satisfatórias, especialmente para o LAn-SBR, podem estar relacionadas à adoção de concentrações iniciais baixas das formas nitrogenadas. Essa estratégia, por sua vez, foi escolhida porque o objetivo inicial do trabalho divisava a aplicação tecnológica para tratamento de esgoto sanitário e por isso as concentrações escolhidas foram coerentes às encontradas em esgoto nitrificado. Acresce que a faixa de concentração das formas nitrogenadas está em acordo com as concentrações inicialmente utilizadas por outros autores que procederam ao enriquecimento de organismos anóxicos metanotróficos desnitrificantes (ETTWIG et al., 2008; RAGHOEBARSING et al., 2006).

5.1.1. Perfis temporais

Os perfis temporais foram testados em quatro condições para cada um dos inóculos, conforme a seção 4.2.4. Para realização do perfil foi utilizada a biomassa presente em uma das replicatas dos SBR da Etapa 1. Assim, o perfil temporal identificado como SED-TP utilizou biomassa proveniente do SED-SBR e o LAn-TP utilizou biomassa do LAn-SBR. Como não havia diferença estatisticamente significativa entre as replicatas dos SBR, segundo o teste de Kruskal-Wallis (seção 5.1), o uso da biomassa contida em uma das replicatas pode ser considerado representativo. As amostras foram coletadas até que a concentração do nitrito ou do nitrato se estabilizasse entre duas amostras. O tempo total de ensaio foi de 50 horas para as condições (I) e (II), onde o nitrito foi utilizado como aceptor de elétrons e de 40 horas para as condições (III) e (IV), nas quais o nitrato foi o aceptor de elétrons.

Para facilitar o acompanhamento da discussão, as condições são novamente apresentadas no Quadro 5.1, que repete as informações previamente apresentadas no Quadro 4.4. Os perfis temporais de consumo das formas nitrogenadas foram similares para ambos os inóculos (Figura 5.5 e Figura 5.6). Além disso, o ensaio corroborou que o processo de desnitrificação ocorre apenas na presença de metano, visto que o consumo de nitrito e nitrato ocorre numa menor extensão nas condições (II) e (IV), ainda que tenha sido utilizada biomassa enriquecida no ensaio.

Descrição	Aceptor de elétrons	Doador de elétrons
Condição (I)	NO_2^-	-
Condição (II)	NO_2^-	CH_4
Condição (III)	NO_3^-	-
Condição (IV)	NO_3^-	CH_4

Quadro 5.1 - Condições testadas nos perfis temporais da Etapa 1

Figura 5.5 - Perfis temporais realizados na Etapa 1 utilizando NO_2^- comoceptor de elétrons
 Condição (I) nitrito (NO_2^-) e metano foram fornecidos comoceptor e doador de elétrons, respectivamente. Condição (II): apenas NO_2^- foi fornecido comoceptor de elétrons e não foi adicionado doador de elétrons. Foram utilizadas as biomassas enriquecidas provenientes do inóculo de mistura de sedimentos (SED) e de lodo de reator anaeróbio (LAn)

Figura 5.6 - Perfis temporais realizados na Etapa 1 utilizando NO_2^- como aceptor de elétrons

Condição (III) nitrato (NO_2^-) e metano foram fornecidos como aceptor e doador de elétrons, respectivamente.

Condição (IV): apenas NO_3^- foi fornecido como aceptor de elétrons e não foi adicionado doador de elétrons. Foram utilizadas as biomassas enriquecidas provenientes do inóculo de mistura de sedimentos (SED) e de lodo de reator anaeróbio (LAn)

A velocidade máxima de consumo das formas nitrogenadas, calculada a partir dos pontos iniciais do perfil, foi de $8,9 \text{ mg N-NO}_2^-\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ e $10,2 \text{ mg N-NO}_3^-\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ para os SED-TP. Já nos LAn-TP, a velocidade máxima de desnitrificação foi de $5,7 \text{ mg N-NO}_2^-\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ e de $6,0 \text{ mg N-NO}_3^-\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Portanto, a velocidade máxima de consumo das formas nitrogenadas foi maior no Sed-TP. Considerando que massa de sólidos voláteis era maior nos LAn-SBR (seção 5.1), esses resultados confirmam que a diferença entre as atividades desnitrificantes dos dois inóculos, previamente discutidas na seção 5.1, estão relacionadas à concentração de sólidos. De fato, os resultados obtidos nos perfis temporais indicam que virtualmente a biomassa SED tem maior potencial para desnitrificação.

As velocidades máximas de desnitrificação também indicam que é possível obter taxas aplicáveis dessas culturas. Se a cultura metanotrófica desnitrificante for mantida operando em torno de sua atividade máxima, as taxas de desnitrificação se aproximam daquelas descritas para outros doadores de elétrons. As taxas de desnitrificação utilizando o etanol como doador de elétrons, por exemplo, foram reportadas em $9,9 \text{ mgNO}_3^-\cdot\text{N}\cdot\text{h}^{-1}$ (GAVAZZA DOS SANTOS et al., 2004). Assim, parece ser possível obter taxas de desnitrificação compatíveis com as aplicações tecnológicas.

Com relação à diferença entre o consumo de nitrito e de nitrato, os dados do perfil temporal sugerem que o consumo inicial do primeiro seja mais rápido. Apesar disso, os dados de monitoramento dos SBR ao longo dos 186 dias de operação mostram que não há diferença no consumo entre eles. A mediana de consumo de nitrito foi de $0,953 \pm 0,423 \text{ mg N-NO}_2^-.L^{-1}$ e de $0,720 \pm 0,530 \text{ mg N-NO}_3^-.L^{-1}$ para os SED-SBR. Já nos LAn-SBR o consumo foi de $0,750 \pm 0,181 \text{ mg N-NO}_2^-.L^{-1}$ e de $0,835 \pm 0,236 \text{ mg N-NO}_3^-.L^{-1}$. O teste de Wilcoxon mostra que não há diferença entre o consumo das formas nitrogenadas (W: 298, p : 0,588 para o SED-SBR e W: 171, p : 0,473 para LAn-SBR).

5.1.2. Caracterização microbiana por sequenciamento rRNA 16S – Plataforma Ion Torrent ®

Após 165 dias de operação dos reatores de bateladas sequenciais (SBR) da Etapa 1, foram coletadas amostras para extração de DNA e sequenciamento por meio da Plataforma IonTorrent, a fim de verificar o procedimento de enriquecimento, bem como permitir melhor compreensão acerca dos processos estabelecidos nos SBR. Essas amostras estão identificadas como SED e LAn. Foram sequenciadas também amostras dos inóculos, identificadas como SED_{Inóc} e LAn_{Inóc}.

A Tabela 5.4 apresenta os índices α , que são indicadores da diversidade intra-amostra. Conforme esperado, a amostra SED_{inóc} foi a que apresentou maiores riqueza e diversidade, evidenciado pelo alto valor de Chao-1 (que é uma medida da riqueza) e pelo baixo valor de Simpson (D), que é um indicador da uniformidade da amostra, sendo que o índice D está relacionado à dominância. Assim, o inóculo de sedimento marinho possui uma quantidade bastante grande de espécies, mas, ao mesmo tempo, baixa uniformidade, i.e, nenhuma espécie é dominante na amostra.

Tabela 5.4 - Quantidades de leitura e índices de diversidade α para amostras SED inóc, Sed-SBR, LAn inóc e LAn-SBR, Etapa 1

	SED inóc	SED-SBR	LAn inóc	LAn-SBR
No. Sequências	46.125	37.257	12.466	63.197
OTUS	8.462	1.360	485	1.023
Dominance_D	0,002±0	0,032±0,001	0,053±0,003	0,061±0,001
Simpson_1-D	0,998±0	0,968±0,001	0,947±0,003	0,939±0,001
Shannon_H	7,61±0,02	4,77±0,03	4,05±0,04	3,87±0,02
Chao-1	15.790±304	1.936±87	871±59	1.564±127
Singletons	4.448	477	195	418
Cobertura (Good' coverage)	90.36%	98.72%	98.44%	99.34%
OTUs sem singletons	4.014	883	290	605

O diagrama de Venn (Figura 5.7) mostra as diferenças e similaridades entre as quatro amostras. As duas amostras enriquecidas (SED-SBR e LAn-SBR) compartilharam 152 OTUs, o que corresponde a 25% das OTUs identificadas para o LAn-SBR e a 17% das OTUs identificadas na amostra SED-SBR. Na comparação entre as amostras enriquecidas e seus respectivos inóculos, observou-se que entre o

O cálculo do índice mostrou baixa similaridade entre elas, mas também indicou uma tendência convergente entre as amostras enriquecidas. A similaridade entre as amostras enriquecidas e seus respectivos inóculos foi de 6%. No entanto, a similaridade entre as amostras enriquecidas SED e LAn foi de 12%, sendo que elas compartilham 115 unidades taxonômicas (OTU) ou 2,20% das OTUs. Embora o valor seja baixo, a similaridade entre as amostras enriquecidas é superior a similaridade entre essas e seus respectivos inóculos. Isso sugere que o procedimento de enriquecimento foi capaz de modificar a comunidade microbiana ao longo da operação dos SBR, resultando em comunidades com maior quantidade de membros em comum.

Figura 5.7 - Diagrama de Venn das OTUs identificadas nos inóculos (Sed_{inóc} e LAn_{inóc}) e as amostras enriquecidas (SED-SBR e LAn-SBR)

Embora o índice de Bray-Curtis tenha apontado para baixa similaridade, muitos dos grupos microbianos que estão entre os mais abundantes possuem capacidades metabólicas parecidas, como os pertencentes às famílias *Methylomonas*, *Methylophilaceae* e *Anaerolinaceae*. Observou-se, por exemplo, aumento da presença de organismos metanotróficos e metilotróficos, cuja abundância passou de patamares praticamente desprezíveis (<1%) para valores em torno de 5-9% (Tabela 5.5). Assim, as amostras enriquecidas não compartilham exatamente as mesmas unidades taxonômicas, mas grupos microbianos com capacidades metabólicas similares, o que reforça a hipótese de que os procedimentos operacionais pressionaram as comunidades microbianas para que membros com tal habilidade fosse favorecidos.

Tabela 5.5 - Somatório de todas as OTUs referentes a organismos metanotróficos, metilotróficos e metilotróficos facultativos

Identificação amostra	Metanotróficos estritos ^(*)		Metilotróficos ^(†)	
	Nº de leituras	Abundância relativa (%)	Nº de leituras	Abundância relativa (%)
SED _{inóc}	48	0,12%	143	0,34%
SED-SBR	1.901	5,17%	3.499	9,51%
LAn _{inóc}	0	0,00%	2	0,02%
LAn-SBR	3.103	4,94%	5.071	8,04%

^(*) Foram considerados os organismos afiliados às famílias *Methylococcaceae* e *Methylocystaceae*.

^(†) Foram considerados organismos afiliados à família *Methylophilaceae* e ao gênero *Methylophaga*, pertencente à família *Rhodocyclaceae*.

Dentre os organismos metanotróficos enriquecidos, aqueles afiliados à família *Methylococcaceae* e, mais especificamente, ao gênero *Methylomonas* foram mais proeminentes. Nas amostras enriquecidas apresentam abundância relativa de 3,69% para o Sed-SBR e a 4,07% LAn-SBR. Todas as espécies descritas para o gênero *Methylomonas* são capazes de utilizar o NO_3^- em funções assimilativas (GARRITY, 2005). A utilização do nitrato e do nitrito para funções assimilativas poderia explicar as taxas de redução das formas nitrogenadas compatíveis aos valores descritos para endogenia, enquanto os dados de sólidos voláteis indicam que houve manutenção celular.

Os organismos afiliados ao gênero *Methylomonas* são descritos como aeróbios (GARRITY, 2005) e mesmo já tendo reportada sua capacidade de se estabelecer em baixas concentrações de oxigênio (KALYUZHNYA et al., 1999), é curioso que tenham sido capazes de não só desenvolver, mas também de sustentar uma comunidade com outros microrganismos, em ambiente predominante anóxico. Ressalta-se que os SBR foram submetidos à fluxionamento de argônio para manter o ambiente anóxico.

Considerando que o tempo de ciclo foi de três dias, e que um eventual residual de oxigênio seria rapidamente consumido pelos organismos aeróbios, é razoável inferir que o ambiente dos SBR foi mantido anóxico a maior parte do tempo. Outros autores que trabalharam com organismos metanotróficos aeróbios submetidos a condições de microaeração precisaram fornecer oxigênio continuamente para manter concentrações de oxigênio na faixa do 0,2 mg $\text{O}_2\cdot\text{L}^{-1}$

¹ (LIU et al., 2014). O resultado apresentado por Liu et al. (2014) indica que o oxigênio residual

eventualmente presente depois do fluxionamento de argônio seria rapidamente consumido nos SBR.

Além do gênero *Methylomonas*, outro grupo enriquecido foi a família *Methylophilaceae*, descrito como metilotrófico não metanotrófico (GARRITY et al., 2005). OTUs afiliadas a essa família correspondem a 4,2% no -SBR e a 1,91% no LAn-SBR, embora não tenham sido identificadas nos inóculos. Os membros dessa família também são descritos como estritamente aeróbios e foram previamente descritos em ambiente metanotróficos e com pouca disponibilidade de oxigênio (HERNANDEZ et al., 2015). Algumas espécies classificadas dentro da família *Methylophilaceae* são capazes de assimilar metanol apenas quando submetidas a condições desnitrificantes (KALYUZHNYA et al., 2009). De fato, membros afiliados a essa família foram descritas em um reator metanotrófico desnitrificante microaerado (LIU et al., 2014).

Existem relatos de que a disponibilidade do oxigênio é um fator norteador na composição de comunidades microbianas metanotróficas (HERNANDEZ et al., 2015). Vale pontuar que o grupo do gênero *Methylomonas* já foi reportado em condições em que o oxigênio era limitante (KALYUZHNYA et al., 1999; OSHKIN et al., 2015). Outros pesquisadores reportaram que em ambientes de baixas concentrações de oxigênio, foi também estabelecida uma relação entre *Methylomonas* e *Methylophilaceae* (HERNANDEZ et al., 2015; LIU et al., 2014). Assim, os resultados obtidos neste trabalho são consistentes com outros da literatura. No entanto, deve-se salientar a versatilidade dos grupos enriquecidos nesse estudo, mantidos durante longos períodos de tempo em ambiente anóxico.

Figura 5.8 - Famílias mais abundantes nas amostras Sed-SBR e LAn-SBR

A categoria identificada como “Outros” se refere a OTUs cujas afiliações somam abundância relativa inferior a 0,5%. Já na categoria “Não identificados” estão agrupadas as OTUs cuja identificação não chegou ao nível taxonômico de família.

As unidades taxonômicas pertencentes ao filo *Chroloflexi*, que inclui a família *Anaerolinaceae* e o gênero *Longilinea* foram reportadas nas amostras como abundâncias relativas de 14,7% e de 34,1% para os inóculos de sedimento marinho e de lodo anaeróbio, respectivamente. Dentre as amostras enriquecidas, a abundância relativa das unidades taxonômicas relativas ao *Chroloflexi* foi de 19,3% para Sed e de 24,9% para LAn. Esse grupo é descrito como quimiorganotrófico não metilotrófico e incapaz de utilizar nitrato (YAMADA et al., 2006). Ou seja, organismos afiliados ao filo *Chroloflexi* são incapazes de utilizar metano. Não obstante, foram encontrados em abundância numa área de oxidação anaeróbia do metano no Oceano Índico (BLAZEJAK; SCHIPPERS, 2010), e foram também reportados em biomassa metanotrófica enriquecida a partir de lodo anaeróbio (SINISCALCHI et al., 2015). Esses últimos autores relacionaram a presença de *Chroloflexi* à degradação de produtos microbianos solúveis.

Essas informações indicam que mesmo que o metano seja o único doador de elétrons, os organismos que o utilizam são capazes de fornecer condições para outras bactérias heterotróficas se manterem, indicando o estabelecimento de uma comunidade sintrófica.

Assim, o metano como único doador de elétrons e fonte de carbono orgânico forneceu condições para o estabelecimento de uma relação sintrófica, envolvendo organismos metanotróficos, metilotróficos e outros quimiorganotróficos não metilotróficos. Outros pesquisadores já haviam relatado o estabelecimento de relações sintróficas entre metanotróficos e metilotróficos (BECK et al., 2013). Kalyuzhnaya et al. (2013) haviam demonstrado que os organismos metanotróficos fornecem fontes de carbono orgânico para outros membros da comunidade microbiana e a literatura sugere que os organismos metanotróficos são capazes de estabelecer interações com uma grande diversidade de espécies microbianas (ORPHAN et al., 2002), o que poderia até incluir organismos desnitrificantes (COSTA et al., 2000).

A relação entre organismos metanotróficos e outros heterotróficos é uma via de mão dupla. Por um lado, os organismos metanotróficos fornecem fontes de carbono orgânico para os heterótrofos. Por outro lado, os organismos associados podem evitar a inibição mediada pelo acúmulo de metabólitos ou excretando substâncias que estimulem a oxidação do metano (VAN DER HA et al., 2013; WU et al., 2011).

Oshkin et al. (2015) defendem que a dinâmica entre as populações de uma comunidade microbiana são mais importante na ciclagem do metano que o tamanho da população metanotrófica. Os resultados obtidos neste trabalho são consistentes com o reportados por Oshkin et al. (2015). Assim, a compreensão de como se dá a relação sintrófica entre esses grupos de microrganismos deverá contribuir para a compreensão do potencial de tecnologias baseadas no metabolismo metanotrófico.

Quanto às bactérias desnitrificantes, deve-se primeiramente pontuar que esse metabolismo é bastante disperso entre os procariontes. Muitos membros pertencentes às famílias *Rhodocyclaceae* e *Comamonadaceae* são capazes de reduzir o nitrato e o nitrito (VILAR-SANZ et al., 2013) e membros afiliados a essas taxonomias estão entre os mais abundantes nas amostras enriquecidas (Figura 5.8). No caso dos membros afiliados a família *Rhodocyclaceae* corresponderam a 4,64% das leituras no SED-SBR e a 21,07% no LAn-SBR. Já os organismos pertencentes à família *Comamonadaceae* foram responsáveis por 3,76% das leituras no SED-SBR

e por 6,09% das leituras no LAn-SBR. No entanto, considerando as baixas taxas de consumo das formas nitrogenadas, previamente discutidas na seção 5.1, os organismos afiliados a essas taxonomias presentes nas amostras enriquecidas provavelmente se mantiveram ali através de outras vias metabólicas que não a desnitrificação.

5.1.3. Síntese dos Resultados da Etapa 1

O objetivo da Etapa 1 era enriquecer biomassa metanotrófica desnitrificante utilizando biomassa imobilizada. Para isso foram utilizados reatores em batelada sequencial (SBR) e dois tipos de inóculos: SED e LAn. O metano foi fornecido como única fonte de carbono e energia.

O metano suportou manutenção celular e atividade desnitrificante ao longo de todo experimento para os dois inóculos. Ainda que o consumo das formas nitrogenadas oxidadas tenha sido baixo ($<2,0 \text{ mgN.dia}^{-1}$), ele foi superior ao consumo das formas nitrogenadas nos reatores controle, i.e, onde não eram dosados nenhum doador de elétrons. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre o consumo de NO_2^- e de NO_3^- ao longo dos 186 dias de operação dos SBR. Além disso, a presença de sulfato em concentrações compatíveis às geralmente encontradas nos meios de cultura prejudicou a redução das formas nitrogenadas oxidadas.

Os dados de biologia molecular mostraram que organismos metanotróficos reportados como aeróbios da família *Methylococcaceae* foram os únicos organismos identificados capazes de assimilar o CH_4 diretamente. Os membros da família *Methylococcaceae* são capazes de utilizar NO_3^- para funções assimilativas, o que pode explicar as baixas taxas de consumo das formas nitrogenadas. Ademais, esses organismos provavelmente criaram as condições para o estabelecimento de outros quimiorganotróficos, como da família *Methylophilaceae* e *Anaerolinaceae*.

Considera-se que o objetivo inicial desta etapa foi parcialmente cumprido, uma vez que a redução do NO_2^- e do NO_3^- foi suportada pela oxidação do metano. No entanto, a atividade desnitrificante específica manteve-se baixa. Foi levantada a hipótese de que a utilização de biomassa imobilizada pudesse oferecer maior resistência à transferência de massa e prejudicar a captação do metano pelos organismos metanotróficos, e, por conseguinte, a atividade

desnitrificante. A outra hipótese é que nos SBR pudesse haver acúmulo de algum composto tóxico aos microrganismos, o que pode ser verificado alterando a configuração do reator.

5.2. ETAPA 2: ENSAIO EM BATELADA SEQUENCIAL PARA AVALIAÇÃO DE ESTRATÉGIAS DE ENRIQUECIMENTO DE BIOMASSA METANOTRÓFICA DESNITRIFICANTE

Uma das hipóteses derivadas da Etapa 1 é que a resistência a transferência de massa era maior com biomassa imobilizada, o que poderia prejudicar a atividade desnitrificante. Assim, foi feito um ensaio em reatores de batelada sequencial sendo que um foi inoculado com biomassa imobilizada (Imob-SBR) e o outro com biomassa suspensa (Susp-SBR).

Foi escolhida a mistura de sedimento marinho como inóculo porque, na Etapa 1 foi observado que ambos obtiveram desempenhos similares no início da operação. Ademais, o SED não possui material endógeno e, assim, a desnitrificação observada desde os primeiros ciclos se deve ao uso do metano. Isso pode ser verificado pelos dados do SED-controle, operado na Etapa 1 (seção 5.1).

A mediana do consumo das formas nitrogenadas oxidadas foi de $0,33 \pm 0,33$ mg N.dia⁻¹ para o Imob-SBR e $0,0 \pm 0,0$ mg N.dia⁻¹ para o Susp-SBR. As atividades de redução das formas nitrogenadas foram inferiores às obtidas para o Sed-SBR na Etapa 1. O teste de Mann-Whitney revelou que a diferença de desempenho entre os dois reatores não é estatisticamente significativa (U: 121,5; p : 0,18).

Assim, esse ensaio não permitiu confirmar se o uso de biomassa imobilizada é desvantajoso. Alguns equívocos podem ser discutidos, no entanto. O inóculo utilizado, por exemplo, foi a mistura de sedimento marinho com sedimento de mangue. Esse inóculo foi escolhido por possuir pouca matéria orgânica que poderia ser utilizada como material endógeno. Tanto que a diferença entre o SED-C e os SED-SBR foi visível desde o início da Etapa 1. A ideia da Etapa 2 era fazer um teste relativamente rápido, apenas para responder a questão da estratégia de manutenção da biomassa. No entanto, esse inóculo contém alto teor de sólidos fixos. Na prática, esses sólidos fixos servem como material suporte, ou seja, pode-se considerar que a biomassa contida nos dois reatores utilizados nesse ensaio estava imobilizada, embora o frasco identificado como Imob-SBR usasse os cubos de espuma de poliuretano.

Outro ponto interessante de discutir é que nesse ensaio os frascos foram mantidos sem agitação, devido à indisponibilidade de equipamentos agitadores. Isso certamente contribuiu para que o desempenho do reator com biomassa imobilizada fosse inferior ao observado na Etapa 1, no que se refere ao consumo das formas nitrogenadas oxidadas (NO_2^- e NO_3^-).

Já foi reportado que a taxa de agitação possui uma importante influência sobre o estabelecimento de determinados grupos microbianos em ambientes metanotróficos aeróbios. Cantera et al. (2016) relataram que a predominância de organismos afiliados ao gênero *Methylomonas* foi significativamente superior reatores de bateladas sequenciais quando esses foram submetidos à agitação de 650 rpm, comparados à agitação de 300 rpm. Os autores defendem que a maior agitação está associada a transferência de massa mais eficiente. Os autores argumentam, ainda, que o perfil da população heterotrófica associada também foi influenciado por diferentes graus de agitação. Assim, é possível que a falta de agitação dos SBR operados durante a Etapa 2 tenha representado um obstáculo para o estabelecimento de comunidade metanotrófica e para que se confirmasse a melhor estratégia de enriquecimento de organismos DAMO.

5.2.1. Síntese dos Resultados na Etapa 2

A hipótese da Etapa 2 não pôde ser confirmada nem refutada. O consumo das formas nitrogenadas foi muito baixo tanto para o SBR com biomassa imobilizada quanto para o SBR com biomassa suspensa. Os resultados obtidos para o Imob-SBR foram inferiores àqueles obtidos pelo SED-SBR na Etapa 1. A principal hipótese é que essa diferença esteja relacionada à falta de agitação dos SBR na Etapa 2.

5.3. ETAPA 3: OPERAÇÃO REATOR CONTÍNUO DE LEITO FIXO E ESTRUTURADO (UP-FSBR)

5.3.1. Ensaio Hidrodinâmico

A curva de função do tempo de residência (curva $E(t)$) é apresentada na Figura 5.9 e os parâmetros obtidos são apresentados na Tabela 5.6.

Figura 5.9 - Curva E (t) obtida no ensaio hidrodinâmico do Up-FSBR

Tabela 5.6 - Parâmetros obtidos no ensaio hidrodinâmico do Up-FSBR

Parâmetro	
$\bar{\theta}_h$	680,9 minutos
N	1,24

Considerando que o tempo de detenção hidráulico teórico ($\theta_{h \text{ teórico}}$) era de 720 minutos, a diferença entre $\bar{\theta}_h$ e $\theta_{h \text{ teórico}}$ é de apenas 5,4%, o que indica que o Up-FSBR não apresenta anomalias de escoamento graves.

O parâmetro N, que indica o número de reatores CSTR em série foi de 1,24, muito próximo de 1, que seria um CSTR ideal. Assim, o Up-FSBR operado neste trabalho se aproxima de um reator de mistura perfeita. A manutenção de linhas de recirculação da fase líquida numa razão de recirculação igual a 3 ($Q_r/Q = 3$) e da fase gasosa certamente contribuíram para que o reator se aproximasse de um CSTR. Esse resultado está em acordo com o observado por Moura (2015), que verificou que para razões de recirculação igual a 3 em reator de leito estruturado e fluxo ascendente, o modelo de escoamento se aproximava de CSTR. Taxas de recirculação mais altas não provocaram diferença significativa no parâmetro N, calculado segundo o modelo de N-CSTR em série. Ademais, a manutenção das linhas de recirculação auxilia em velocidades de escoamento mais altas, o que auxilia na diminuição da resistência à transferência de massa.

5.3.2. Monitoramento do Up-FSBR

O reator contínuo foi operado ao longo de 200 dias. Antes de iniciar a discussão dos resultados dessa etapa, é importante esclarecer porque o meio de cultura foi novamente modificado (seção 4.4.2). Entre o 1º e o 178º dias de operação, os macronutrientes foram dosados em baixas concentrações, seguindo o meio de cultura “D” (Tabela 4.6). Vale comentar que esse meio é parecido com o meio “C” (Tabela 4.2), mas o $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ foi substituído por $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, pois optou-se por retirar o sulfato totalmente do meio. Ademais, a solução de micronutrientes foi modificada (Tabela 4.7), seguindo o proposto por Ettwig et al. (2008). Os sais presentes na solução de micronutrientes 1’ e 2’ (Tabela 4.7) são os mesmos utilizados nas soluções utilizadas nas etapas anteriores (Tabela 4.3). No entanto, as soluções descritas na Tabela 4.7 não contém EDTA. O EDTA, que é um agente quelante, pode causar danos à membrana externa de células gram-negativas (HANCOCK, 1984) e a *Candidatus Methylophilus oxyfera* é gram-negativa (WU et al., 2012).

O monitoramento do consumo de nitrito e nitrato está apresentado na Figura 5.10. A mediana de consumo das formas nitrogenadas foi de $11,0 \pm 10,3 \text{ mgN.dia}^{-1}$ e a atividade desnitrificante específica foi $3,35 \pm 3,14 \text{ mgN.gSTV}^{-1}\text{dia}^{-1}$. A atividade desnitrificante específica ficou mais próxima ao apresentado na literatura para desnitrificação metanotrófica em ambiente microaerado (Tabela 5.3).

Figura 5.10 - Consumo das formas nitrogenadas (NO_2^- e NO_3^-) ao longo da operação do Up-FSBR
As linhas pontilhadas marcam as alterações dos parâmetros operacionais (Quadro 4.5). A partir de (i) houve aumento da concentração de nitrito no meio, que permaneceu até o final da operação; a partir de (ii) houve alteração do meio de cultura, que permaneceu até o final da operação; entre (iii) e (iv) o CH_4 foi fornecido ininterruptamente

Os dados de consumo de nitrogênio apresentaram alta dispersão (Figura 5.11) e não há diferença estatisticamente significativa entre o consumo de nitrito e nitrato, segundo o teste de Wilcoxon ($W: 320; p: 0,64$). Isso indica que, assim como observado na Etapa 1, a desnitrificação não era o processo principal que ocorria no reator. A bibliografia relata experimentos de desnitrificação metanotrófica em que o consumo de das formas nitrogenadas se manteve baixo por muitos meses. São relatados tempos de enriquecimento entre 6 meses (ETTWIG et al., 2008) e 21 meses (KAMPMAN et al., 2012).

Além disso, o perfil temporal discutido na seção 5.1.1 sugeria que a cinética aparente de consumo das formas nitrogenadas seguia primeira ordem. Em função dos longos tempos de enriquecimento reportados na literatura e do perfil temporal da concentração do nitrito obtido na seção 5.1.1, optou-se por aumentar a concentração de nitrito afluente. A hipótese era que o aumento da concentração do substrato pudesse contribuir para o aumento das velocidades de reação. Pretendia-se, assim, auxiliar o estabelecimento do processo de desnitrificação acoplado à oxidação anaeróbia do metano.

Essa mudança foi feita a partir do 142º dia de operação, identificada pela linha pontilhada (i) na Figura 5.10. A concentração afluyente de nitrito passou de 23 mgNO₂⁻.L⁻¹ (7,0 mg N-NO₂.dia⁻¹ ou 0,5 mmol N-NO₂⁻.L⁻¹) para 46,0 mgNO₂⁻.L⁻¹ (14,0 mg N-NO₂.dia⁻¹ ou 1,0 mmol N-NO₂⁻.L⁻¹). A concentração de nitrato permaneceu em 31,0 mg NO₃⁻.L⁻¹ (7,0 mg N-NO₃⁻.L⁻¹ ou 0,5 mmol N-NO₃⁻.L⁻¹). Portanto a concentração teórica de nitrogênio total a partir de (i) era de 21,0 mg N.L⁻¹ (1,5 mmol N.L⁻¹) ou 10,2 mmol N.dia⁻¹. Embora o perfil para o nitrito e o nitrato tenham sido similares, optou-se por aumentar apenas a concentração de nitrito, uma vez que até este momento a rota mais bem estabelecida de oxidação anóxica do metano acoplada à desnitrificação usava nitrito e não nitrato (ETTWIG et al., 2010).

No entanto, conforme pode ser observado na Figura 5.10, o aumento da concentração do nitrito não provocou aumento significativo no consumo das formas nitrogenadas.

Tabela 5.7 - Parâmetros de monitoramento do Up-FSBR

Parâmetros	
Consumo N [mg N.dia ⁻¹]	11,0 ± 10,3
Eficiência remoção N [%]	11,0 ± 9,1
pH inicial	7,3 ± 0,3
pH final	7,4 ± 0,2
Alcalinidade total afluyente [mgCaCO ₃ .L ⁻¹]	37,3 ± 13,4
Alcalinidade total efluente [mgCaCO ₃ .L ⁻¹]	42,0 ± 14,1

Figura 5.11 - Boxplot de nitrito e nitrato consumidos ao longo da operação do Up-FSBR

Outra possibilidade é que essa alta variação na atividade desnitrificante esteja relacionada a problemas na transferência de massa do metano, o que dificulta sua disponibilidade como doador de elétrons. A falta de disponibilidade do metano tem duas origens possíveis. Uma estava relacionada à manutenção da recirculação do *headspace* do reator, pois as mangueiras Tygon® utilizadas na bomba se desgastavam muito rapidamente, e precisavam ser trocadas com muita frequência, o que nem sempre era possível de ser feito. Quando as mangueiras estavam desgastadas, o gás tinha dificuldade em vencer a perda de carga, especialmente devida à válvula de retenção e à pedra porosa. Assim, o metano não era fornecido constantemente: apenas quando ocorria um acúmulo de gás suficiente para vencer a perda de carga era que ocorria o aporte de gás pela linha de recirculação.

Na linha de alimentação do gás, por sua vez, havia a dificuldade em controlar a vazão de metano. A média da vazão de metano fornecida ao Up-FSBR foi de $1.284 \pm 628 \text{ mL.dia}^{-1}$. Um dos problemas identificados foi a amplitude térmica, que chegou a variar 18°C num mesmo dia (Tabela 5.8), sendo que era muito difícil ajustar a vazão de metano nessas condições. Medições da vazão de gás com uso do bolhômetro realizadas em um mesmo dia mostraram que o fluxo de gás poderia ir de 70 mL.min^{-1} a $2,4 \text{ mL.min}^{-1}$. A suposição é de que a variação da temperatura atmosférica tenha provocado a dilatação das válvulas agulha utilizadas para ajuste da vazão de entrada.

A proposta para contornar esse problema foi manter a vazão de alimentação do metano (i.e, vindo do cilindro) ininterrupta durante 24 horas por dia, o que foi feito entre o 168º e o 176º dias de operação, identificado entre as linhas pontilhadas (iii) e (iv) da Figura 5.10. Dessa forma, o aporte do metano seria independente da capacidade de recirculação do gás do *headspace* e as alterações em função da abertura da válvula seriam amortizadas. Como essa estratégia não forneceu melhora significativa na atividade desnitrificante e o aporte contínuo de metano no reator representava um risco de operação, os aportes de metano voltaram a ser dados com uso de válvula solenoide.

Tabela 5.8 - Dados de temperatura atmosférica e amplitude térmica na cabine onde estava montado o Up-FSBR

	Temperatura atmosférica (°C)	Amplitude térmica (°C)
Mínima	14	3
Média	26	10,1
Máxima	37	18

Outro problema está ligado ao tamanho das bolhas. Sabe-se que bolhas menores permitem uma melhor transferência de massa gás-líquido. Devido à dificuldade em controlar a vazão, muitas vezes o input de metano era muito elevado, provocando desprendimento da biomassa do leito. Essa biomassa ficava presa na grade inferior do reator, onde ficavam presas as hastes do material suporte, formando uma camada sólida que dificultava a passagem do gás, que acabava escoando por caminhos preferenciais.

O reator foi aberto em três ocasiões para limpeza dessa grade. A Figura 5.12 ilustra a grade no dia que o reator foi desligado.

Figura 5.12 - Grade inferior do reator contínuo com acúmulo de biomassa, que dificultava a distribuição uniforme do aporte de gás metano

Outro problema identificado ao longo da operação do Up-FSBR foi a manutenção de condições microaeradas. Mesmo com fluxionamento ininterrupto de argônio no galão do meio de cultura, não era possível eliminar todo oxigênio dissolvido da alimentação. Foi feito

monitoramento do OD nas linhas de alimentação e de recirculação. Esse monitoramento indicou que a concentração de OD na linha de alimentação variava bastante, apresentando média de $1,43 \pm 1,20 \text{ mg.L}^{-1}$. Essa variação se explica pelos dias em que era feita troca de meio, uma vez que a água de abastecimento utilizada para preparo apresentava concentrações de OD próximas da saturação. Na linha de recirculação, no entanto, o OD se manteve $0,30 \pm 0,19 \text{ mg.L}^{-1}$, o que indica a ocorrência de consumo de oxigênio. A Figura 5.13 mostra a heterogeneidade dos resultados relativos ao OD na linha de alimentação do reator e, ao mesmo tempo, a baixa dispersão observada na linha de recirculação para esse mesmo parâmetro.

Figura 5.13 - Boxplot do oxigênio dissolvido nas linhas de alimentação e recirculação da fase líquida do Up-FSBR

Outra hipótese testada foi a de que as concentrações de macronutrientes estavam muito baixas.

A partir do 179º dia de operação, identificado pela linha pontilhada (ii) na Figura 5.10, foi adotada a composição do meio utilizada por Ettwig et al. (2008), que é o meio de cultura “E” (Tabela 4.6). No entanto, depois de trocado meio, a redução de nitrato cessou, ainda que tenha sido observada redução do nitrito.

Ressalta-se que as análises de sulfato realizadas ao longo de toda operação não forneceram respostas que pudessem indicar que este composto estivesse sendo usado, pois as concentrações afluente e efluente eram muito similares, dentro da resolução do método. Da mesma forma, não foi possível detectar a formação de H_2S em nenhum momento.

Os dados de nitrogênio amoniacal tampouco sugerem ocorrência de redução assimilativa de nitrato a amônia, conforme pode ser visto no *boxplot* representado na Figura 5.14. Não foram identificados intermediários orgânicos nas análises de cromatografia e também não foi possível medir o consumo de metano por GC, pois as medidas sempre caíram dentro do erro do método.

Figura 5.14 - Boxplot de amônia e de sulfato no afluente e no efluente do Up-FSBR

Ao final do experimento foi feita também análise de sólidos. Os dados são apresentados na Tabela 5.9.

Tabela 5.9 - Dados de sólidos ao final da operação do Up-FSBR

Parâmetro	
Sólidos totais (ST)	$13,9 \pm 0,2 \text{ g ST.L}^{-1}$
Sólidos totais fixos (STF)	$5,7 \pm 0,1 \text{ g STF.L}^{-1}$
Sólidos totais voláteis(STV)	$8,2 \pm 0,1 \text{ g STV.L}^{-1}$
	3,3 g STV
STV no Up-FSBR ao final da operação	$0,2 \text{ g STV.g material suporte}^{-1}$

Os dados do final da operação sugerem que não houve manutenção celular, já que na inoculação a quantidade de sólidos no Up-FSBR era de 6,5 g STV (Tabela 4.5). Contudo, nos primeiros dias de operação do reator, houve perda de sólidos, que não foi quantificada. Ao longo da operação, o material suporte manteve-se completamente tomado por biomassa, apesar do eventual desprendimento da mesma devido às altas velocidades das bolhas de metano, previamente discutida. Assim, embora não tenha sido possível quantificar o crescimento da biomassa, é razoável inferir que houve perda de sólidos no início da operação, mas que a biomassa que se estabeleceu foi capaz de crescer e se manter no reator. Um fato que corrobora esse argumento é que no 80º dia de operação uma das aparas de espuma de poliuretano foi

retirada e substituída por uma nova. Ao final da operação (dia 200º), essa apara completamente preenchida por biomassa, de forma que não era possível distingui-la das outras. Só foi possível identificá-la devido a uma marcação no acrílico do reator (Figura 5.15).

Figura 5.15 - Apara de espuma de poliuretano trocada no 80º dia de operação (a) e depois, já colonizada, no 200º dia de operação

Assim, como na Etapa 1, metano foi fornecido como único doador de elétrons e única fonte de carbono. O processo de desnitrificação não se estabeleceu de forma predominante, embora a atividade desnitrificante tenha ficado próxima aos valores relatados pela literatura relativos à desnitrificação metanotrófica em ambiente microaerado. O consumo de nitrogênio foi maior no Up-FSBR, comparado aos consumos obtidos na Etapa 1. Isso pode estar relacionado à manutenção de condição microaerada constante no Up-FSBR, que pode ter estimulado a oxidação de metano por metanotróficas aeróbias e, por conseguinte, estimulado outros grupos microbianos. Uma segunda hipótese é que a resistência à transferência de massa no Up-FSBR estava submetido foi menor do que no SBR da Etapa 1.

5.3.3. Caracterização microbiana por sequenciamento rRNA 16S – Plataforma Illumina (Up-FSBR)

Após 80 dias de operação do reator contínuo, foi extraída biomassa para sequenciamento de DNA por meio da plataforma Illumina, tendo sido utilizado *primer* universal para identificação dos domínios *Archaea* e *Bacteria*. Os índices α são apresentados na Tabela 5.10 e as famílias mais abundantes na Figura 5.16.

Tabela 5.10 - Quantidades de leitura e índices de diversidade α para amostras do Up-FSBR

Up-FSBR	
No. Sequências	51.042
OTUS	1.843
Dominance_D	0,038 $\pm$ 0,001
Simpson_1-D	0,962 $\pm$ 0,001
Shannon_H	4,42 $\pm$ 0,02
Chao-1	3.519 $\pm$ 134
Singletons	950
Cobertura (Good' coverage)	98,14%
OTUs sem singletons	893

Figura 5.16 - Famílias mais abundantes na amostra de biomassa do Up-FSBR

A categoria identificada como “Outros” se refere a OTUs cujas afiliações somam abundância relativa inferior a 2,5%. Já na categoria “Não identificados” estão agrupadas as OTUs cuja identificação não chegou ao nível taxonômico de família.

Com relação às arqueias, o gênero *Methanosaeta* (da família *Methanoseaceae*) foi o único a ser identificado, tendo apresentado 13,2% da abundância relativa ao total de leituras. Organismos da ordem *Methanosarcinales*, à qual pertence o referido gênero, também já foram reportados em ambientes metanotróficos (HINRICHS et al., 1999; ORPHAN et al., 2001). Os primeiros autores relataram organismos afiliados à ordem *Methanosarcinales* associados a bactérias redutoras de sulfato (SRB). Os resultados obtidos por Orphan et al. (2001), no entanto, sugerem que esse grupo de arqueias pode se estabelecer de forma independente de uma relação sintrófica com redutoras de sulfato.

Membros afiliados a família *Methylococcaceae* (10,8%) foram os únicos organismos identificados que são capazes de utilizar o metano diretamente. De forma similar ao observado na identificação microbiana da Etapa 1 (seção 5.1.2), organismos capazes de utilizar diretamente o metano não apresentaram uma abundância relativa alta. Esse resultado está de acordo com o reportado na literatura. Van der Ha et al. (2013) identificaram uma rede de organismos heterotróficos que dependiam indiretamente do metano, fornecido como única fonte de carbono e de energia. Organismos metanotróficos, no entanto, não correspondiam a maior proporção das taxonomias identificadas.

Membros da família *Methylophilaceae* também foram identificados (7,0%), sendo que esses resultados são consistentes com o observado na Etapa 1. Novamente, vale salientar que a relação entre organismos pertencentes à *Methylococacceae* e à *Methylophilaceae* já foi reportada por outros autores (HERNANDEZ et al., 2015; KALYUHNAYA et al., 2009). Oshkin et al. (2015) defendem que a cooperação entre esses grupos parece envolver o compartilhamento de carbono e, potencialmente, de outros metabólitos

O grupo bacteriano com maior abundância, no entanto, é aquele pertencente à família *Chitinophagaceae*. Essa família é descrita como aeróbia ou anaeróbia facultativa (GARRITY, 2005), e já foi identificada como um dos heterótrofos associados ao gênero *Methylomonas* (da família *Methylocacceae*) em reatores metanotróficos (VAN DER HA et al., 2013).

A categoria “Outros” corresponde a 14,0% do total de leituras e abrange as OTUs que identificaram famílias com abundância relativa individual de no máximo 2,5%. Já a categoria “não classificadas” (18,3%) compreende as OTUs cuja identificação não chegou ao nível taxonômico de família.

É digno de nota que os perfis taxonômicos da amostra do Up-FSBR sejam semelhantes aos observados na amostra do SBR da Etapa 1. Isso sugere que a estrutura de relação entre os organismos metanotróficos e os quimiorganotróficos associados não é aleatória (OSHKIN et al., 2015). Se essas interações não são aleatórias, elas podem ser manipuladas por meio de técnicas de engenharia (VANWONTERGHEM et al., 2014), o que é uma perspectiva interessante do ponto de vista das aplicações tecnológicas.

5.3.4. Síntese da operação do Up-FSBR

A operação do Up-FSBR mostrou que o metano presente como única fonte de carbono orgânico suportou a manutenção celular. Foi estabelecida comunidade metanotrófica aeróbia e outros grupos microbianos. O consumo das formas nitrogenadas foi baixo, mas foi superior ao observado nos SBR, o que indica que o emprego de reator contínuo foi mais eficiente para desnitrificação dependente da oxidação do metano. Isso possivelmente está relacionado à manutenção de condições microaeradas, que, por sua vez, estimularam a oxidação do metano e, por conseguinte, os outros metabolismos dependentes. É também possível que a resistência à transferência de massa tenha sido menor no Up-FSBR.

5.4. ETAPA 4: ENSAIO DE ENDOGENIA

O ensaio de endogenia foi feito para testar se o consumo das formas nitrogenadas no Up-FSBR ocorria independente da oxidação do metano. As médias de consumo de nitrogênio obtidas nos ensaios de endogenia são apresentadas na Tabela 5.11.

Tabela 5.11 - Médias do consumo de nitrogênio no ensaio de endogenia

Condição	Forma Nitrogenada	Fornecimento CH ₄	Média de consumo de N [mgN.(dia.gSTV) ⁻¹]	CV (%)
A	NO ₃ ⁻	Sim	1,46 ± 0,09	6,4%
B	NO ₃ ⁻	Não	1,32 ± 0,10	7,8%
C	NH ₄ ⁺	Sim	0,13 ± 0,05	36%
D	NO ₂ ⁻	Sim	1,24 ± 0,09	7,5%
E	NO ₂ ⁻	Não	1,22 ± 0,02	1,5%

Da Tabela 5.11 depreende-se que a redução tanto do nitrito quanto do nitrato pela biomassa proveniente do reator contínuo era um processo independente da oxidação do metano. Esses resultados podem parecer contraditórios quando comparados aos obtidos na Etapa 1 (seção 5.1). Naquele ensaio, foi observada diferença estatisticamente significativa entre os reatores operados com e sem metano para os dois inóculos testados (SED-SBR e SED-C; LAn-SBR e LAn-C). No entanto, a comparação foi feita ao longo de 186 dias de operação. Na Etapa 4 foi operado apenas um ciclo de sete dias. Assim, é razoável inferir que as bactérias metanotróficas possam ter propiciado condições para o estabelecimento de outros grupos de microrganismos, sendo que alguns desses utilizaram as formas nitrogenadas oxidadas. Os resultados obtidos indicam que a desnitrificação foi apenas um processo marginal no Up-FSBR.

Não foi possível mensurar a quantidade de metano consumido, mesmo nas condições A e D. Convém pontuar, contudo, que o consumo de metano teórico, considerando a massa de N consumida seria de apenas 0,19 mmol e 0,10 mmol, para as condições A e D, respectivamente, e considerando a estequiometria de uma reação em que o metano é usado diretamente como doador de elétrons para desnitrificação (Eq. 13) e (Eq. 14). Esses valores estão dentro do erro do método.

A condição C foi operada para verificar se o consumo das outras formas nitrogenadas era para funções assimilatórias, i.e, se ocorria a redução assimilativa (RANA). No entanto, o consumo de nitrogênio amoniacal na condição C ficou muito abaixo do consumo de N nas outras condições. Assim, a redução das formas nitrogenadas oxidadas ocorre em maior extensão que oxidação da amônia. Isso indica que a redução do nitrito e do nitrato não é apenas para funções

assimilativas. É possível que o consumo de nitrito e nitrato tenha ocorrido em função de outros grupos metabólicos associados à presença de organismos metanotróficos, mas que não foram capazes de estabelecer de forma predominante na comunidade microbiana. Isso explica o consumo das formas nitrogenadas na ausência de metano e, ao mesmo tempo, que esse consumo tenha sido o superior ao esperado para as funções assimilativas.

Destaque-se que nas Etapas 4 e 5 foi utilizado o meio de cultura da Tabela 4.7 e da Tabela 4.8. Optou-se por voltar a dosagem de sulfato em baixas concentrações, mas superiores às utilizadas no meio C (Tabela 4.2).

5.4.1. Síntese dos Resultados da Etapa 4

O ensaio de respiração endógena permitiu concluir que a redução das formas nitrogenadas ocorre independentemente da oxidação do metano e, portanto, a hipótese deste ensaio foi confirmada. O consumo de nitrogênio amoniacal foi inferior ao consumo das outras formas nitrogenadas, o que sugere que a redução do nitrito e do nitrato não é apenas para funções assimilativas.

5.5. ETAPA 5: CONSUMO DE METANO EM CONDIÇÕES MICROAERADAS

5.5.1. Testes Preliminares

Testes Preliminares: Tratamento Estatístico da curva de calibração do metano

Para se proceder a um melhor ajuste, os pontos mais baixos da curva foram retirados, já que, nessa região, o ajuste do modelo era pior, o que resultou em melhor distribuição dos resíduos, conforme pode ser visto na Figura 5.17.

Figura 5.17 - Análise dos resíduos da curva de calibração de metano no GC Shimadzu GC-2014 depois do tratamento estatístico

A Figura 5.17 mostra que o modelo ajustado é homoscedástico, i.e, os resíduos estão uniformemente distribuídos. A Análise de Variância permite avaliar que o modelo fornece um bom ajuste (Tabela 5.12).

Tabela 5.12 - Análise de variância para o ajuste do modelo de calibração do metano no Shimadzu GC-2014

Fonte	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	F tabelado	
Modelo	$5,17.10^{10}$	1	$5,17.10^{10}$	8,412,93	4,196	<i>Significância da regressão</i> <i>Ok</i>
Residual	$1,72.10^8$	28	$6,14.10^6$			
Falta de Ajuste	$5,13.10^7$	4	$1,28.10^7$	0,805	2,776	<i>Ajuste</i> <i>Ok</i>
Erro Puro	$3,82.10^8$	24	$1,59.10^7$			
Total	$5,19.10^{10}$	29				

A curva de calibração reajustada está apresentada na equação (Eq. 15), onde y é a área e x é o número de mols.

$$y = 14.286,83 x \pm 3.684,04 \quad (\text{Eq. 15})$$

Para a quantidade de metano presente no *headspace*, nas condições do ensaio (volume, pressão, temperatura), o intervalo de confiança dessa curva foi calculado em $\pm 0,36$ mmol.

A definição das condições de operação que aparecem no item 4.5.2 foi feita com auxílio de testes prévios. Foram operados dois reatores batelada por duas semanas a fim de verificar se esses parâmetros eram adequados. No teste prévio, o consumo de metano foi de $2,01 \pm 0,59$ mmol nas condições citadas.

Testes Preliminares: Estratégia de microaeração

Foram feitas medições de oxigênio dissolvido a fim de verificar a estratégia de microaeração. Esses testes foram conduzidos em meio abiótico (i.e., apenas frasco com água) e também com os frascos utilizados como SBR (ou seja, com biomassa e meio de cultura). Foram feitas medidas de OD em situações em que não foi feita injeção de O_2 (Abiótico Anox e SBR Anox) para verificar eventual contaminação de O_2 . Nas situações em que foi dada injeção de O_2 , os frascos foram deixados em repouso e a 30°C durante meia hora (“Abiótico MO_2 30” e “SBR MO_2 30”). As concentrações obtidas nesses ensaios são apresentadas na Tabela 5.13.

Vale notar que, mesmo as medições de OD feitas antes da injeção de oxigênio (frasco “Abiótico”), ie, quando os frascos tinham sido submetidos apenas ao fluxionamento de argônio e metano, os resultados indicam contaminação de oxigênio. Essa contaminação pode ser explicada pelo fato de o meio utilizado ser oligotrófico e só poderia ser suprimida por meio de utilização de

agente sequestrante. A adição do oxigênio, no entanto, produziu resultados reprodutíveis, indicando que o método é adequado.

Tabela 5.13 - Medição OD em frasco água de torneira– validação da metodologia para fornecimento de condições microaeradas

	Abiótico Anox	Abiótico MO₂ – 30'	SBR Anox	SBR MO₂-30'	SBR MO₂ . 10'
Média (mg.L ⁻¹)	0,26	0,82	0,23	0,33	0,42
Desvio padrão (mg.L ⁻¹)	0,06	0,08	0,03	0,06	0,12
CV (%)	24,0%	9,70%	11,5%	18,1%	27,6%

Os valores 30' e 10' indicam o intervalo de tempo (em minutos) entre a injeção de O₂ e a medição do OD.

Nota-se que, no caso do SBR Anox-30', a resposta foi semelhante à obtida com água de torneira, o que permite admitir que 0,25 mg O₂.L⁻¹ é a concentração mínima de oxigênio obtida a partir de fluxionamento de gás inerte no meio. É conveniente comentar que a sonda de OD tem resolução de $\pm 0,1$ mg.L⁻¹ e que limite de quantificação é 0,0 mg O₂.L⁻¹. Ademais, a sonda de luminescência não sofre interferência de sólidos ou da presença de outros compostos (alguns gases interferem na leitura de OD pelo método eletroquímico, por exemplo).

No caso dos SBR, observou-se que a média de OD, após trinta minutos de injeção de O₂, está muito abaixo do valor obtido para o controle abiótico (Tabela 5.13), sendo que, se for considerado o desvio padrão, a concentração de oxigênio dissolvido fica próxima à obtida nos frascos controle.

Foram feitas novas medições (também em triplicata) no SBR MO₂ após dez minutos de injeção de O₂ (SBR MO₂-10'), pois foi levantada a hipótese de que, em 30 minutos, o oxigênio já tivesse sido consumido. Mesmo após dez minutos, a concentração de OD também estava abaixo da média obtida com água.

Descartou-se a hipótese de que as diferenças nos valores obtidos pudessem estar relacionadas a algum interferente na medição. Como o método para injeção do oxigênio mostrou resposta adequada nos testes realizados com água de torneira, admitiu-se que o método era adequado para fornecimento de oxigênio e que as dificuldades na medição de OD no frasco eram devidas à dinâmica biológica existente no SBR.

Foi definido, também, que a estimativa de oxigênio no início do ciclo seria calculada pelas condições de injeção, a saber: o volume e a pressão da injeção de oxigênio e pelo aumento de pressão provocada no SBR pela injeção de O₂.

Testes Preliminares: Definição dos intervalos de injeção de O₂

Os resultados dos testes em que se variou o intervalo de tempo (Δt) de injeção de oxigênio estão sintetizados na Tabela 5.14 onde “nc” identifica o número de ciclos de batelada que foram utilizados no cálculo.

Tabela 5.14 - Consumo de metano nos Anox-SBR e MO₂-SBR, com diferentes intervalos de tempo no *input* de O₂ (Δt)

		$O_2(\Delta t)$				
		Anox-SBR	MO ₂ -SBR			
			Δt : 1 x na semana	Δt : 48 horas	Δt : 24 horas	Δt : 24 horas Renovando headspace
Média [mmol]	(-ΔCH ₄)	0,72	0,51	1,84	2,22	5,48
Desvio [mmol]	padrão	0,47	0,29	0,09	0,68	0,96
CV [%]		65,3%	57,8%	4,9%	30,6%	17,5%
nc		11	5	3	3	5

CV: coeficiente de variação
nc: número de ciclos considerados nos cálculos

Os resultados obtidos para definição do intervalo de tempo de injeção de O₂ indicam que as injeções feitas a cada 24 horas promovem um aumento da quantidade de metano consumida. Outro fator teve influência no consumo de metano foi a pressão parcial desse gás. O consumo de metano foi cerca de 2,5 vezes maior nos ciclos em que a pressão de metano foi reestabelecida antes da nova injeção de oxigênio, com intervalo de 24 horas entre as injeções.

5.5.2. Etapa 5: Condições Microaeradas

Com base nos testes preliminares, foi definido que o ensaio em condições microaeradas seria feito com ciclos de sete dias, trocando-se o gás do *headspace* para reestabelecer a pressão de metano tanto no Anox-SBR quanto no MO₂-SBR. Nesse último, ainda, seria fornecido O₂ para manter as condições microaeradas em intervalos de 24 horas. Os resultados do consumo de metano para os dois SBR são apresentados na Tabela 5.15 e na Figura 5.18.

Tabela 5.15 - Consumo de metano nos Anox-SBR e MO₂-SBR

	Anox-SBR	MO ₂ -SBR
Média (-ΔCH ₄) [mmol]	3,14	5,32
Desvio padrão [mmol]	0,78	0,94
CV [%]	24,9%	17,7%
nc	7	7

CV: coeficiente de variação

nc: número de ciclos considerados nos cálculos

O teste de Mann-Whitney (nível de confiança de 95%) revela que a diferença de consumo entre o Anox-SBR e o MO₂-SBR é estatisticamente significativa (-2,172, p : 0,03). Os resultados obtidos mostram que o consumo de metano ocorre preferencialmente na presença de oxigênio.

Figura 5.18 - Boxplot do consumo de metano na Etapa 5

Destaca-se que o consumo de metano também ocorreu em ambiente anóxico. Isso está em acordo com os resultados obtidos na Etapa 1 (seção 5.1). Embora a metanotrofia seja potencializada em ambiente microaerado, os organismos metanotróficos são capazes de se manter ativos mesmo sob anoxia. Além disso, chama a atenção que a manutenção das pressões parciais de metano seja um parâmetro mais importante do que a manutenção de oxigênio dissolvido. O consumo de metano no Anox-SBR na Etapa 5 (i.e, com restabelecimento da pressão parcial do metano a cada 24 horas) foi cerca de quatro vezes superior ao consumo do Anox-SBR durante os testes preliminares (Tabela 5.14,) quando não foi feito o restabelecimento das pressões parciais

de metano. Esse resultado se explica uma vez que maiores pressões parciais do metano no *headspace* implicam maior solubilidade do gás e, por conseguinte, maior biodisponibilidade. Assim, manter a pressão parcial de metano relativamente alta pode ser considerado fator importante importante na operação de reatores metanotróficos.

Foram mantidos dois frascos abióticos apenas para acompanhar eventuais perdas físicas de metano através da tampa de butila (Tabela 5.16). Individualmente, todos os dados ficaram dentro do erro do método. Assim, esses dados confirmam que o consumo de metano medido nos SBR deve-se ao consumo biológico do mesmo.

Tabela 5.16 - Controle abiótico para verificação de vazamento de gás pela tampa de butila

-ΔCH₄	ABIÓTICO	ABIÓTICO
	sem injeção de O₂	com injeção de O₂
Mínimo [mmol]	-0,060	0,02
Média [mmol]	- 0,040	0,060
Máximo [mmol]	-0,01	0,13
Desvio padrão [mmol]	0,027	0,064
CV [%]	-66,68%	106,96%
nm	3	3

CV: coeficiente de variação
nm indica o número de medidas feitas

O consumo de nitrogênio, por sua vez, foi de $0,59 \pm 0,29$ mg N.dia⁻¹ ($0,31 \pm 0,16$ mg N.gSTV⁻¹.dia⁻¹) para o Anox-SBR e de $1,47 \pm 0,26$ mgN.dia⁻¹ ($0,71 \pm 0,10$ mg N.gSTV⁻¹.dia⁻¹) para o MO₂-SBR (Tabela 5.17). O teste de Mann-Whitney indica que não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois SBR (W: 75,5; *p*: 0,31), o que possivelmente está relacionado a algumas ocorrências mais dispersas. O *boxplot* sugere que o consumo de N foi superior no SBR mantido em condições microaeradas (Figura 5.19).

Tabela 5.17 - Média do consumo de nitrogênio na Etapa 5

-ΔN	Anox-SBR	MO₂-SBR
Média [mgN.ciclo ⁻¹]	$4,01 \pm 2,04$	$9,37 \pm 2,54$
CV [%]	50,8%	27,1%

Figura 5.19 - Boxplot do consumo de nitrato na Etapa 5

Esse resultado não era esperado, uma vez que, na Etapa 4 (teste de endogenia), foi observado que o consumo das formas nitrogenadas ocorria paralelamente à oxidação do metano. Naquele ensaio, no entanto, foi levantada a hipótese de que, embora os dois processos não fossem realizados por um mesmo tipo de microrganismos e ocorressem de forma paralela, havia uma dependência entre os grupos microbianos. Os resultados obtidos na Etapa 5 sugerem que maior oxidação de metano estimula a atividade desnitrificante. Considerando a discussão feita anteriormente, do estabelecimento de relações sintróficas entre organismos metanotróficos e outros grupos (nas seções 5.1.2 e 5.3.4), é possível que uma maior atividade dos primeiros estimulasse toda a comunidade microbiana. Assim, como em condições microaeradas o consumo de metano é maior, é razoável que outros processos também sejam potencializados.

Vale notar a diferença entre o consumo específico das formas nitrogenadas entre as Etapas 3 (operação Up-FSBR) e Etapa 5 (ensaio em condições microaeradas). Conforme discutido na seção 5.3.2, o consumo de N no reator contínuo foi de $3,3 \pm 3,1 \text{ mg N.gSTV}^{-1}\text{.dia}^{-1}$. Na Etapa 5, esse valor foi de $0,71 \pm 0,10 \text{ mgN.gSTV}^{-1}\text{.dia}^{-1}$. Considerando que na Etapa 5 foi utilizado biomassa proveniente do Up-FSBR, era esperado que o consumo de nitrogênio fosse similar ao observado naquele reator. A diferença observada pode estar ligada à mudança das condições de operação. A manutenção das linhas de recirculação no Up-FSBR promoveu maior velocidade ascensional, o que deve ter auxiliado em transferência de massa mais eficiente. Os SBR operados durante a Etapa 5, contudo, foram mantidos sem agitação, o que pode ter

dificultado a transferência de massa, e, por conseguinte, diminuído a extensão da oxidação do metano. Menos metano biodisponível para os organismos metanotróficos, por sua vez, restringiu a ocorrência de outros metabolismos dependentes.

Com relação à manutenção celular, foi observado que a concentração de sólidos manteve-se a mesma ao longo da operação das Etapas 4 e 5 (Tabela 5.18). Esses resultados indicam que, se não houve crescimento celular, ao menos houve manutenção celular. Destaque-se que todos os ensaios em batelada (incluindo os testes preliminares para delineamento da Etapa 5) levaram vários meses e que a diferença entre o final da operação do Up-FSBR e da Etapa 5 foi de 9 meses.

Tabela 5.18 - Conteúdo de sólidos na biomassa ao final da operação do Up-FSBR (Etapa 3) e depois ao final do Ensaio em condições microaeradas (Etapa 5)

	Final operação Up-FSBR	Final operação Etapa 5	
		Anox-SBR	MO ₂ -SBR
ST (mg.L ⁻¹)	13,9 ± 0,2	13,1 ± 0,6	13,4 ± 0,5
STF (mg.L ⁻¹)	5,7 ± 0,1	4,9 ± 0,5	4,6 ± 0,2
STV (mg.L ⁻¹)	8,2 ± 0,1	8,2 ± 0,1	8,8 ± 0,3

Os resultados obtidos na Etapa 5 mostram que a comunidade microbiana selecionada é metanotrófica aeróbia, da mesma forma que o observado nas Etapas 1 e 3. A atividade desnitrificante se manteve baixa, embora tenha sido possível relacioná-la à manutenção de condições microaeradas e à melhor condição de mistura.

5.5.3. Caracterização microbiana por sequenciamento do rRNA 16S – Plataforma Illumina

Ao final da operação da Etapa 5, foram coletadas amostras de biomassa do Anox-SBR e do MO₂-SBR para caracterização da comunidade microbiana por meio do sequenciamento do rRNA 16S, tendo sido utilizado primer universal para identificação dos domínios Archaea e Bacteria. Os índices α e o índice de Bray-Curtis são apresentados na Tabela 5.19.

Tabela 5.19 - Quantidade de leituras, índices de diversidade α e índice de Bray-Curtis para as amostras Anox-SBR e MO2-SBR, extraídas ao final da Etapa 5

	Anox-SBR	MO ₂ -SBR
No. Sequencias	60.358	65.955
OTUS	632	627
Dominance_D	0,084±0,002	0,092±0,002
Simpson_1-D	0,916±0,002	0,908±0,002
Shannon_H	3,74±0,02	3,7±0,02
Chao-1	652±27	646±28
<i>Singletons</i>	950	576
Cobertura (Good' coverage)	98,43%	99,13%
Bray-Curtis	82,6%	

A alta similaridade entre as duas amostras mostra que foram selecionados grupos microbianos similares, a despeito da diferença entre as estratégias de operação (condições anóxica e microaerada) e também das diferenças no consumo de metano e nitrato observadas. As famílias mais abundantes são apresentadas na Figura 5.20.

Figura 5.20 - Famílias mais abundantes no Anox-SBR e no MO₂-SBR ao final da Etapa 5

A categoria identificada como “Outros” se refere a OTUs cujas afiliações somam abundância relativa inferior a 2,5%. Já na categoria “Não identificados” estão agrupadas as OTUs cuja identificação não chegou ao nível taxonômico de família.

Tanto para o Anox-SBR quanto para o MO₂-SBR (Figura 5.20), a família que mais de destacou foi a *Nitrosomonadaceae*, com abundância relativa de 26,6% para o Anox-SBR e de 32,9% para o MO₂-SBR. Organismos afiliados à família *Nitrosomonadaceae* são descritos como litoautotróficos aeróbios e nitritantes (i.e, oxidam amônia a nitrito) (GARRITY et al., 2005). É muito curioso que tenha aparecido um grupo nitrificante, sendo que a dosagem de NH₄⁺ era de 5 mg.L⁻¹ no meio de cultura. Devido à homologia entre as enzimas amônia monoxigenase (presente em organismos nitritantes) e a metano monoxigenase (presente em organismos metanotróficos), tanto as bactérias nitrificantes quanto as oxidadoras aeróbias de metano são capazes de oxidar a amônia e o metano (HANSON; HANSON, 1996). Organismos pertencentes à família *Nitrosomonadaceae* são capazes de assimilar o carbono proveniente do metano oxidado (HANSON; HANSON, 1996). A variabilidade metabólica desses organismos foi inicialmente reportada em culturas puras na década de 80 (BÉDARD; KNOWLES, 1989; JONES; MORITA, 1983). A oxidação do metano por organismos nitrificantes também já foi reportada em solos. No entanto, no solo os dois tipos de organismos costumam existir, o que dificulta identificar a

contribuição de cada um dos grupos microbianos (nitrificantes ou metanotróficos) na oxidação do metano (BODELIER; FRENZEL, 1999).

Os organismos metanotróficos e metilotróficos corresponderam a apenas 2,0% da abundância relativa na amostra MO₂-SBR (Tabela 5.20). Considerando que membros afiliados à família *Methylococcaceae* estavam entre os mais abundantes na amostra do Up-FSBR (seção 5.3.4), e que a biomassa desse reator foi utilizado na Etapa 5, era esperado que os organismos metanotróficos estivessem entre os mais abundantes ao menos para a amostra MO₂-SBR. É possível que a mudança na estratégia de operação tenha influenciado o perfil taxonômico da comunidade microbiana. A biomassa foi inicialmente mantida imobilizada em espuma de poliuretano em reator Up-FSBR com recirculação, mas a Etapa 5 foi conduzida em reator SBR sem agitação e com biomassa suspensa. Conforme previamente discutido, diferentes gradientes de mistura tem efeito sobre a estrutura de comunidades metanotróficas (CANTERA et al., 2016).

Tabela 5.20 - Abundância relativa dos organismos metanotróficos e metilotróficos nas amostras Anox-SBR e MO₂-SBR, extraídas ao final da operação da Etapa 5

OTUS metanotróficas ou metilotróficas	Anox-SBR	MO ₂ -SBR
<i>Methylococcaceae</i>	0,2%	1,7%
<i>Methylophilaceae</i>	0,2%	0,3%
<i>Methylocystaceae</i>	0,0%	0,1%

A segunda OTU mais abundante foi a *Anaerolinaceae*, que é um organismo quimiorganotrófico anaeróbio. Organismos afiliados a essa família foram constantes a todas as análises de caracterização microbiana de deste trabalho e já haviam sido reportados em ambientes metanotróficos por outros autores (BLAZEJAK; SCHIPPERS, 2010; SINISCALCHI et al., 2015). Isso pode indicar que esse organismo é um simbionte típico em processos metanotróficos (independente da metanotrofia ser feita por metanotrófos ou por nitrificantes versáteis).

Dentre as outras famílias que aparecem entre os organismos mais abundantes, observa-se organismos quimiorganotróficos tanto aeróbios e anaeróbios. Os que são relatados como aeróbios pertencem às famílias *Hyphomicrobiaceae* (GARRITY et al., 2005), *Solibacteraceae* (WARD et al., 2009), e *Gemmatimonadaceae* (ZHANG et al., 2003). Essa última foi isolada a partir de um reator SBR operado em intermitência de condições aeróbias e anóxicas para remoção de fósforo (ZHANG et al., 2003). Dentre os anaeróbios estritos, estão os organismos afiliados às famílias

Dehalococcoidaceae (GROSTERN; EDWARDS, 2006), *Geobacteraceae*, *Hyphomicrobiaceae* (GARRITY et al., 2005) e *Solibacteraceae* (GARRITY et al., 2005).

Para as duas amostras, entre as OTUs mais abundantes, estão as arqueias pertencentes à família *Methanosaetaceae*. Organismos afiliados à ordem *Methanosarcinales* (à qual pertence a família *Methanosaetaceae*) foram descritas em ambiente metanotróficos associados a bactérias redutoras de sulfato (ORPHAN et al., 2001).

5.5.4. Síntese dos Resultados da Etapa 5

O consumo de metano foi estimulado em condições microaeradas, o que confirma a hipótese do ensaio. No entanto, o consumo de metano também foi observado em condições anóxicas, o que atesta para a versatilidade do processo de oxidação do metano.

O consumo de nitrato também foi maior em condições microaeradas. Possivelmente, esse resultado está relacionado às maiores taxas de oxidação do metano. Como o metano era a única fonte de carbono orgânico fornecida, os organismos metanotróficos eram capazes de fornecer condições para manter outros quimiorganotróficos. Assim, um estímulo do metabolismo de oxidação do metano poderia estimular outros processos, dentre eles a redução do nitrato.

Os resultados de caracterização microbiana mostraram que um dos grupos mais abundantes foram as *Nitrosomonas*, que são capazes de oxidar metano devido a homologia entre as enzimas metano monoxigenase e amônia monoxigenase. Isso mostra que não são só os organismos metanotróficos são versáteis, como já previamente discutido nas seções 5.1.2 e 5.3.4, mas o metabolismo de oxidação do metano é versátil e difundido no ambiente, uma vez que pode também ser realizado por organismos tipicamente nitritantes.

5.6. CONSIDERAÇÕES ACERCA DAS NECESSIDADES NUTRICIONAIS

Uma das questões que surgiu diversas vezes ao longo do trabalho foi a demanda nutricional específica para que ocorresse a desnitrificação heterotrófica com o uso de metano. Outros autores já haviam levantado a questão de deficiência nutricional como um limitante ao enriquecimento de bactérias metanotróficas desnitrificantes pertencentes ao filo NC10 (KAMPMAN et al., 2012). Nesta seção pretende-se apresentar um breve panorama da questão nutricional para organismos metanotróficos.

Conforme discutido na seção 5.1, a partir do momento em que foram dosados os macronutrientes nas mesmas concentrações típicas dos meios de cultura (Tabela 5.21), a atividade desnitrificante diminuiu muito. Esse resultado voltou a ser observado entre o 179º e o 200º dia de operação do Up-FSBR. Assim, foi definido que deveriam ser diminuídas as concentrações de macronutrientes, de forma que eles estivessem presentes, mas que não prejudicassem a atividade desnitrificante. No entanto, é possível que essas concentrações tenham sido reduzidas em excesso, o que pode ter prejudicado o crescimento celular. Por exemplo, embora o cálcio (Ca^{2+}) não seja essencial para o crescimento de muitos microrganismos (MADIGAN et al., 2009), ele ajuda a estabilizar a parede celular e sua concentração intracelular costuma estar entre 100 e 300 mmol.L^{-1} (230 a 690 $\text{mg Ca}^{2+}.\text{L}^{-1}$) para células procariontes (DOMINGUEZ, 2004). No caso dos meios utilizados neste trabalho, essa concentração foi muito abaixo da faixa recomendada.

Tabela 5.21 - Meios de cultura para organismos metanotróficos

Componente	Referências				
	Este trabalho (Tabela 4.8)	Van de Graaf et al. (1996)	Islas-Lima et al. (2004)	Ettwig et al (2009)	Ojala et al. (2011)
KHCO_3 [mg.L^{-1}]	100	500	-	500-1500	-
NaHCO_3 [mg.L^{-1}]	-	-	-	-	3.780,0
KH_2PO_4 [mg.L^{-1}]	8,1	27,2	300	5	108,8
$\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$ [mg.L^{-1}]	3,6	180	75	300	200
$\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ [mg.L^{-1}]	24,7	300	6	200	1.000
FeSO_4 [mg.L^{-1}]	2,1	5		1,05	
NaNO_3 [mg.L^{-1}]	110,7			425	
KNO_3 [mg.L^{-1}]	-	-		-	1.000
Cultura de interesse	Desnitrificante metanotrófica anóxica	ANAMMOX	Desnitrificante metanotrófica aeróbia	Desnitrificante metanotrófica anóxica	Metanotrófica aeróbia

À exceção do meio van de Graaf, todas as outras referências na Tabela 5.21 são de meios metanotróficos. O meio van de Graaf foi citado porque foi um dos meios testados no início do trabalho e também porque já foi utilizado com sucesso em outros trabalhos de remoção de nitrogênio que não necessariamente envolviam o processo ANAMMOX (NOCKO, 2008). O meio de Ettwig et al. (2009) foi utilizado por diversos outros autores que pesquisaram organismos desnitrificantes metanotróficos em ambiente anóxico (KAMPMAN et al., 2014; LUESKEN et al.,

2011c). Da mesma forma, o trabalho de Ojala et al. (2011) foi utilizado por diversos outros pesquisadores que investigaram processos metanotróficos aeróbios (KALYUZHNYAYA et al., 2013; OSHKIN et al., 2015).

Um dos aspectos que se destaca na Tabela 5.21 é a baixa concentração de sais de sulfato utilizadas neste trabalho, em comparação com os outros meios. Conforme discutido na seção 5.1, a partir do momento da dosagem da solução de macronutrientes de van de Graaf et al. (1996), houve uma queda na atividade desnitrificante, atribuída à presença de sulfato. No entanto, os meios metanotróficos utilizaram concentrações de sulfato que vão desde 78 mg $\text{SO}_4^{2-} \cdot \text{L}^{-1}$ (Ettwig et al., 2009) até 390 mg $\text{SO}_4^{2-} \cdot \text{L}^{-1}$ (Ojala et al., 2011). Esses autores, no entanto, utilizaram concentrações altas de nitrato. Destaque-se que o meio descrito por Ojala et al. (2011) não era desnitrificante e que Ettwig et al. (2009) argumentam que a comunidade enriquecida em seu trabalho é incapaz de utilizar nitrato como aceptor de elétrons. Raghoebarsing et al. (2006), cujo trabalho serviu como base para a pesquisa desenvolvida por Ettwig et al. (2009), mantiveram a concentração de nitrato acima dos 93 mg $\text{NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$. Segundo os autores, isso foi feito para evitar a ocorrência de redução de sulfato, que foi a mesma utilizada por Ettwig et al. (2009).

No entanto, existem relatos que a presença de nitrito ou de nitrato gera o enriquecimento de comunidades diferentes (HU et al., 2011). Esses autores utilizaram o mesmo meio de Raghoebarsing et al. (2006), mas operaram reatores apenas com nitrito ou apenas com nitrato. Eles obtiveram comunidade pertencente ao filo NC10 no primeiro (*Candidatus Methylophilus oxyfera*) e uma comunidade de archaea no segundo (*Candidatus Methanoperedens nitroreducens*). A diferença para o trabalho de Ettwig et al. (2009), que selecionou apenas a *M. oxyfera*, que é capaz apenas de utilizar nitrito, pode estar na adição de tungstênio na solução de micronutrientes, uma vez que esse elemento inibe a nitrato redutase (KIETZIN; ADAMS, 1996).

Vale também notar que, nos meios metanotróficos, não é fornecido nitrogênio amoniacal. Neste trabalho, foi feita a opção por dosar baixas concentrações de nitrogênio amoniacal, uma vez que, em geral, essa forma de nitrogênio é utilizada para assimilação e as formas mais oxidadas, são utilizadas no processo de geração de energia para a célula. Possivelmente, o motivo pelo qual não se dosa nitrogênio amoniacal nos meios metanotróficos está ligado à inibição competitiva da metanomonoxigenase (MMO) pela amônia. Essa inibição está ligada à proximidade evolutiva entre a MMO, que é a enzima responsável pela oxidação aeróbia do

metano, e a amônia-monooxigenase (AMO), responsável pela oxidação da amônia (BODELIER; LAANBROEK, 2004). No entanto, sabe-se também que a demanda de nitrogênio para assimilação é alta nas bactérias metanotróficas aeróbias. Tanto que existem relatos de estímulo no crescimento de bactérias metanotróficas com a adição de uréia e até da supressão do processo de oxidação da amônia pelas metanotróficas em solos (BODELIER; LAANBROEK, 2004).

A questão nutricional para os organismos metanotróficos continua aberta e poderá ser tratada em outros estudos. Considera-se prioritário avaliar a influência do sulfato e do nitrogênio amoniacal sobre o estabelecimento e a manutenção de comunidades metanotróficas.

5.7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo inicial deste projeto de pesquisa foi avaliar diferentes estratégias de utilização do metano como doador de elétrons para desnitrificação, com foco no pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios aplicados a tratamento de esgoto sanitário. Como a comunidade metanotrófica desnitrificante de ambiente anóxico é bastante específica, foi feita uma primeira tentativa de enriquecê-la a partir de dois diferentes inóculos. No entanto, devido aos resultados obtidos ao longo dessa etapa experimental, o trabalho adquiriu caráter mais exploratório. O Quadro 5.2 sintetiza as hipóteses testadas e os principais resultados qualitativos obtidos neste trabalho.

Em todas as etapas experimentais, o consumo de nitrogênio foi baixo. No entanto, em todas as etapas experimentais, o metano foi fornecido como única fonte de carbono e de energia (doador de elétrons). A comunidade metanotrófica se desenvolveu mesmo em ambiente predominantemente anóxico e sustentou outros grupos quimiorganotróficos com diferentes capacidades metabólicas.

Assim, este trabalho mostrou que os organismos metanotróficos são versáteis, sobrevivendo em condições ambientais adversas e, ainda assim, dando suporte para o estabelecimento de comunidade microbiana com capacidades metabólicas diversas. Esse resultado indica que esse tipo de organismo pode desempenhar funções importantes em aplicações tecnológicas. Em contrapartida, os organismos metanotróficos pouco estudados e apenas recentemente tem se compreendido as possibilidades atreladas ao emprego de comunidades metanotróficas.

Dentre as possíveis aplicações tecnológicas está a remoção de nutrientes. É possível que as baixas atividades desnitrificantes obtidas estejam relacionadas a condições experimentais que, por sua vez, foram adotadas em função do pouco conhecimento disponível desse tipo de metabolismo. À luz dos resultados obtidos, a desnitrificação de esgoto sanitário poderia ser descartada, mas não o tratamento de outros tipos de água.

Outra aplicação tecnológica de interesse é a da remoção de metano de emissões gasosas em que a quantidade de gás é insuficiente para seu aproveitamento energético, como ocorre em muitos sistemas de tratamento de esgoto sanitário baseados na tecnologia anaeróbia. Nesse caso,

o desenvolvimento de populações metilotrófica em unidades de pós-tratamento alimentadas com gás metano poderia apresentar interesse na redução das emissões atmosféricas do metano gerado.

Etapa	Hipótese	Resultado obtido
Etapa 1	É possível enriquecer biomassa metanotrófica desnitrificante a partir de diferentes inóculos	Hipótese parcialmente confirmada. O metano foi capaz de suportar a manutenção celular e a desnitrificação, ainda que numa baixa extensão, para os dois inóculos testados. Foi estabelecida comunidade microbiana metanotrófica aeróbia que sustentou outros quimiorganotróficos A partir dessa etapa, foram delineadas as hipóteses testadas nas Etapas 2 e 3.
Etapa 2	Utilizar biomassa suspensa é mais vantajoso para o enriquecimento de biomassa metanotrófica desnitrificante, pois reduz a resistência a transferência de massa	O consumo de nitrogênio foi baixo nas duas situações e não foi possível confirmar ou refutar a hipótese.
Etapa 3	O estabelecimento do processo de desnitrificação metanotrófica se dá mais facilmente em reatores contínuos, pois não há acúmulo de produtos inibitórios	Hipótese parcialmente confirmada Metano suportou a manutenção celular e a redução das formas nitrogenadas oxidadas. Embora a atividade desnitrificante tenha permanecido baixa, os valores foram maiores que os obtidos na Etapa 1, o que sugere que aplicação de reator contínuo foi mais eficaz que o reator em batelada sequencial. Foi estabelecida comunidade microbiana aeróbia que sustentou outros organismos quimiorganotróficos.
Etapa 4	O consumo das formas nitrogenadas é apenas endógeno	Hipótese confirmada. Foi também observado que a redução das formas nitrogenadas provavelmente não se deve apenas à redução assimilativa
Etapa 5	O consumo de metano é aeróbio, e não está acoplado à redução das formas nitrogenadas	Hipótese confirmada. No entanto, o consumo das formas nitrogenadas foi superior nas condições microaeradas.

Quadro 5.2 - Síntese dos resultados obtidos ao longo das etapas experimentais

6. CONCLUSÕES

- Para os dois inóculos testados na Etapa 1, o metano foi capaz de suportar a manutenção celular e a redução das formas nitrogenadas. Embora a atividade desnitrificante tenha sido de apenas $1,14 \pm 0,68 \text{ mg N.dia}^{-1}$ no Sed-SBR e de $1,66 \pm 0,43 \text{ mg N.dia}^{-1}$, ela foi estatisticamente superior ao observado nos reatores controle. Ressalta-se que a biomassa se extinguiu nos reatores controle.
- Na caracterização microbiana feita por meio de sequenciamento do rRNA 16S os únicos organismos capazes de assimilar diretamente o metano foram os metanotróficos aeróbios, tanto no Sed-SBR quanto no LAn-SBR. Embora esses organismos tenham apresentado abundância relativa em torno de 5% nas duas amostras, as evidências indicam que eles foram capazes de fornecer condições de manutenção para outros grupos quimiorganotróficos. Destaca-se a sua versatilidade, uma vez que foram mantidos em condições predominantemente anóxicas.
- Na Etapa 2 o consumo das formas nitrogenadas foi muito baixo ($< 0,5 \text{ mg N.dia}^{-1}$) tanto para o Imob-SBR quanto para o Susp-SBR e não foi possível indicar a melhor estratégia para enriquecimento de comunidade metanotrófica. Possivelmente a falta de agitação dos frascos prejudicou a transferência de massa do metano da fase gasosa para a fase líquida, o que pode também ter tido influência na redução das formas nitrogenadas.
- O consumo das formas nitrogenadas no Up-FSBR, operado na Etapa 3, apresentou grande dispersão de valores ($11,0 \pm 10,3 \text{ mg N.dia}^{-1}$). Não foi possível manter o reator sob condições anóxicas. O metano foi fornecido como única fonte de carbono orgânico e suportou a manutenção celular. De forma semelhante à Etapa 1, organismos metanotróficos aeróbios foram identificados. Novamente, as evidências sugerem que esses organismos foram capazes de fornecer condições para manutenção de outros organismos quimiorganotróficos. Organismos desnitrificantes não foram identificados.
- A Etapa 4 forneceu evidência de que a redução das formas nitrogenadas no Up-FSBR era um processo marginal à oxidação do metano. No entanto, não se pode afirmar que eram processos independentes. Uma vez que apenas metano era fornecido como fonte

externa de carbono e de energia, todos os processos que se estabeleceram no reator dependiam, ainda que indiretamente, da oxidação do metano.

- A Etapa 5 forneceu evidência de que a oxidação do metano ocorria preferencialmente em condição microaerada. Conforme previsto, maior atividade de oxidação do metano resultou em maior atividade desnitrificante, o que indica que, ainda que esses processos não estejam diretamente atrelados, um depende indiretamente do outro. Uma condição operacional importante para a oxidação do metano é a manutenção da pressão parcial do gás, que potencializou seu consumo mesmo em condições anóxicas.
- O sequenciamento do rRNA 16S mostrou que um dos organismos mais abundantes ao final da Etapa 5 eram afiliados ao grupo *Nitrosomonas* tanto no MO₂-SBR (abundância relativa 32,9%) quanto no Anox-SBR (abundância relativa de 26,6%). Possivelmente esses organismos se estabeleceram uma vez que a enzima de oxidação da amônia é análoga à enzima responsável pela oxidação aeróbia do metano, o que permite que oxidadoras de amônia também oxidem metano. Esse resultado mostra que, não apenas os organismos metanotróficos são versáteis, mas que o processo de metanotrofia é amplamente disperso na natureza.
- Embora não tenha sido possível confirmar a hipótese central do projeto de pesquisa, este trabalho contribui para a compreensão da versatilidade dos processos metanotróficos, o que indica que eles tem potencial para aplicação tecnológica.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir dos resultados obtidos e considerando as dificuldades encontradas ao longo das etapas experimentais, são formuladas algumas sugestões para trabalhos futuros relacionados à oxidação do metano acoplada à desnitrificação. Destaque-se que as sugestões seguem tanto uma linha de pesquisa mais fundamental, relacionada às rotas metabólicas, quanto uma linha de pesquisa mais aplicada.:

- Avaliar a resposta de biomassa metanotrófica em suspensão e imobilizada em espumas de poliuretano para diferentes gradientes de mistura;
- Avaliar a interferência de médio e longo prazo de concentrações mais altas de sulfato ($>78 \text{ mg SO}_4^{2-} \cdot \text{L}^{-1}$) sobre a biomassa, comparado a uma biomassa mantida em baixas concentrações de sulfato;
- Avaliar a interferência de diferentes concentrações de NH_4^+ no enriquecimento e na manutenção de culturas microbianas capazes de realizar a oxidação do metano acoplada à desnitrificação em ambiente anóxico;
- Testar o enriquecimento de organismos metanotróficos com concentrações mais altas das formas nitrogenadas oxidadas.
- Investigar as relações entre os vários microrganismos presentes em cultura mista de cultura metanotróficas a fim de melhor compreender as relações entre eles. Isso pode ser feito com a utilização de técnicas que empreguem $^{13}\text{CH}_4$ e ^{15}N ;
- Estudar a resposta de culturas metanotróficas desnitrificantes quando submetidos a meios de cultura de simulem águas residuárias reais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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. 05, n. 07, p. 406–414, 2014.

ADORNO, M.A. et al. “Development and validation of method (GC/TCD) to determine N₂, CH₄, CO₂ and H₂S in biogas. In: TALLER Y SIMPOSIO LATINOAMERICANO DE DIGESTIÓN ANAEROBIA 11.,2014, La Habana, 2014.

ALPERIN, M. J.; HOEHLER, T. M. Anaerobic Methane Oxidation by Archaea/Sulfate-Reducing Bacteria Aggregates: 1. Thermodynamic and Physical Constraints. **American Journal of Science**, v. 309, p. 869–957, Dec. 2009.

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.

BEAL, E. J.; HOUSE, C. H.; ORPHAN, V. J. Manganese- and iron-dependent marine methane oxidation. **Science**, v. 325, p. 184–187, July 2009.

BECK, D. A. C. et al. A Metagenomic insight into freshwater methane-utilizing communities and evidence for cooperation between the *Methylococcaceae* and the *Methylophilaceae*. **PeerJ**, v. 1, p. e23, 2013.

BÉDARD, C.; KNOWLES, R. Physiology, biochemistry, and specific inhibitors of CH₄, NH₄⁺, and CO oxidation by methanotrophs and nitrifiers. **Microbiological Reviews**, v. 53, n. 1, p. 68–84, 1989.

BENDSCHNEIDER, K.; ROBINSON, R. J. A New Spectrometric Method for the Determination of Nitrite in Sea Water. **Journal of Marine Research**, v. 11, p. 87-96, 1952.

BERISTAIN-CARDOSO, R. et al. Sulfide Oxidation Under Chemolithoautotrophic Denitrifying Conditions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 95, n. 6, p. 1149–1157, 2006.

BLAZEJAK, A.; SCHIPPERS, A. High abundance of JS-1- and *Chloroflexi* -related bacteria in deeply buried marine sediments revealed by quantitative, real-time PCR. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 72, n. 2, p. 198–207, 2010.

BODELIER, P. L. .; LAANBROEK, H. J. Nitrogen as a regulatory factor of methane oxidation in soils and sediments. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 47, n. 3, p. 265–277, 2004.

BODELIER, P. L. E.; FRENZEL, P. Contribution of methanotrophic and nitrifying bacteria to CH_4 and NH_4^+ oxidation in the rizosphere of rice plants as determined by new methods of discrimination. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 5, p. 1826–1833, 1999.

BRASIL. Ministério das Cidades. Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental – SNSA. Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento. **Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos – 2014**. Brasília: SNSA/MCIDADES, 2016. Disponível em: <<http://www.snis.gov.br/>>. Acesso em: 10 jul 2016.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. **Estimativas anuais de emissões de gases de efeito estufa no Brasil – 2ª edição**. Brasília, 2014. Disponível em: <http://www.mct.gov.br/upd_blob/0235/235580.pdf>. Acesso em: 19 set 2016.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente . **Resolução 357**, 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes e dá outras providências. Diário Oficial da União nº 053, 18 mar. 2005, p. 58-63 Disponível em: <<http://www.mma.gov.br> > Acesso em: 10 jul. 2016.

_____. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução 430**, 13 de março de 2011. Dispõe sobre condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução CONAMA nº 357/2005. Diário Oficial da União, nº 92, 16 maio 2011 de 16/05/2011, p. 89. Disponível em: < <http://www.mma.gov.br>>. Acesso em: 10 jul 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. **Portaria nº 2.914**, 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da União, nº 239, 14 dez 2011, seção 1, p. 39-46. Disponível em <<http://portalsaude.saude.gov.br/>>. Acesso em: 25 jul 2016.

CAI, C. et al. Nitrate reduction by denitrifying anaerobic methane oxidizing microorganisms can reach a practically useful rate. **Water Research**, v. 87, p. 211–217, 2015.

CANTERA, S. et al. Evaluation of the influence of methane and copper concentration and methane mass transport on the community structure and biodegradation kinetics of methanotrophic cultures. **Journal of Environmental Management**, v. 171, p. 11–20, 2016.

CAPORASO, J. G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, v. 7, n. 5, p. 335–336, 2010.

CHERNICHARO, C. A. L. et al. Anaerobic sewage treatment: state of the art, constraints and challenges. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 649–679, 2015.

CICERONE, R. J. .; OREMLAND, R. S. Biogeochemical aspects of atmospheric methane. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 2, n. 4, p. 299–327, 1988.

COSTA, C. et al. Denitrification with methane as electron donor in oxygen-limited bioreactors. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 53, p. 754–762, 2000.

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.

DOMINGUEZ, D. C. Calcium signalling in bacteria. **Molecular microbiology**, v. 54, n. 2, p. 291–7, 2004.

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

EDGAR, R. C. et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. **Bioinformatics**, v. 27, n. 16, p. 2194–2200, 2011.

EISENTRAEGER, A. . et al. denitrification of groundwater with methane as sole hydrogen donor. **Water Research**, v. 35, n. 9, p. 2261–2267, 2001.

EPA U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. National primary water regulations. 2009. Disponível em <www.epa.gov/safewater/>. Acesso em: 26 jul 2016.

ETTWIG, K. F. et al. Denitrifying bacteria anaerobically oxidize methane in the absence of Archaea. **Environmental microbiology**, v. 10, n. 11, p. 3164–3173, 2008.

ETTWIG, K. F. et al. enrichment and molecular detection of denitrifying methanotrophic bacteria of the NC10 Phylum. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 11, p. 3656–3662, 2009.

ETTWIG, K. F. et al. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. **Nature**, v. 464, n. 7288, p. 543–548, 2010.

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

GARRITY, G. M. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2nd ed. East Lansing, MI, USA: Department of Microbiology and Molecular Genetics. Michigan State University, 2005.

GAVAZZA DOS SANTOS, S. et al. Comparison of methanol, ethanol, and methane as electron donors for denitrification. **Environmental Engineering Science**, v. 21, n. 3, p. 313–320, 2004.

GONZALEZ-GIL, G. et al. Toxicity effects of formaldehyde on methanol degrading sludge and its anaerobic conversion in biobed (R) expanded granular sludge bed (EGSB) reactors. **Water Science and Technology**, v. 40, n. 8, p. 195–202, 1999.

GOODWIN, P. M.; ANTHONY, C. The biochemistry, physiology and genetics of PQQ and PQQ-containing enzymes. **Advances in Microbial Physiology** 40, v. 40, n. 1, p. 1–80, 1998.

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, 2000.

GROSTERN, A.; EDWARDS, E. A. Growth of *Dehalobacter* and *Dehalococcoides* spp. during degradation of chlorinated ethanes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 1, p. 428–436, 2006.

HANCOCK, R. E. W. Alterations in structure of the cell envelope. **Annual Review of Microbiology**, v. 38, p. 237–264, 1984.

HANSON, R. S.; HANSON, T. E. Methanotrophic bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 60, n.

2, p. 439–71, 1996.

HAROON, M. F. et al. Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage. **Nature**, v. 500, n. 7464, p. 567–570, 2013.

HARTLEY, K.; LANT, P. Eliminating non-renewable CO₂ emissions from sewage treatment: an anaerobic migrating bed reactor pilot plant study. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 95, n. 3, p. 384–398, 2006.

HE, Z. et al. Modeling a nitrite-dependent anaerobic methane oxidation process: parameters identification and model evaluation. **Bioresource Technology**, v. 147, p. 315–20, 2013.

HE, Z. et al. Nitrogen removal from wastewater by anaerobic methane-driven denitrification in a lab-scale reactor: heterotrophic denitrifiers associated with denitrifying methanotrophs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 24, p. 10853–10860, 2015a.

HE, Z. et al. The Short and long-term effects of environmental conditions on anaerobic methane oxidation coupled to nitrite reduction. **Water Research**, v. 68, p. 554–562, 2015b.

HE, Z. et al. Effect of inoculum sources on the enrichment of nitrite-dependent anaerobic methane-oxidizing bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 2, p. 939–946, 2015c.

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, 2015d.

HELLINGA, C. et al. The SHARON process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich wastewater. **Water Science & Technology**, v. 39, n. 7, p. 135–142, 1998.

HERNANDEZ, M. E. et al. Oxygen availability is a major factor in determining the composition of microbial communities involved in methane oxidation. **PeerJ**, v. 3, p. e801, 2015.

HINRICHS, K. U. et al. Methane-consuming archaeobacteria in marine sediments. **Nature**, v. 398, n. 6730, p. 802–805, 1999.

HIPPEN, A. et al. Aerobic deammonification: A new experience in the treatment of wastewaters.

Water Science & Technology, v. 35, n. 10, p. 111–120, 1997.

HOEFMAN, S. et al. Niche differentiation in nitrogen metabolism among methanotrophs within an operational taxonomic unit. **BMC Microbiology**, v. 14, p. 83, 2014.

HOEHLER, T. M. et al. Field and laboratory studies of methane oxidation in an anoxic sediment: evidence for a methanogen-sulfate-reducer consortium. **Global Biogeochem Cycles**, v. 8, n. 4, p. 451–464, 1994.

HOUSE, C. H.; BEAL, E. J.; ORPHAN, V. J. The Apparent involvement of ANMEs in mineral dependent methane oxidation, as an analog for possible martian methanotrophy. **Life**, v. 1, p. 19–33, 2011.

HU, S. et al. Enrichment of denitrifying anaerobic methane oxidizing microorganisms. **Environmental Microbiology Reports**, v. 1, n. 5, p. 377–384, 2009.

HU, S. et al. Effect of nitrate and nitrite on the selection of microorganisms in the denitrifying anaerobic methane oxidation process. **Environmental Microbiology Reports**, v. 3, n. 3, p. 315–319, 2011.

HU, B. et al. Cultivation of nitrite-dependent anaerobic methane-oxidizing bacteria: Impact of reactor configuration. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 18, p. 7983–7991, 2014.

HU, S. et al. A laboratory investigation of interactions between denitrifying anaerobic methane oxidation (DAMO) and anammox processes in anoxic environments. **Scientific Reports**, v. 5, p. 8706, 2015.

HUYSMAN, P. et al. Factors affecting the colonization of non porous and porous packing materials in model upflow methane reactors. **Biotechnology Letters**, v. 5, n. 9, p. 643–648, 1983.
JONES, R. D.; MORITA, R. Y. Methane oxidation by *Nitrosomonas europaea*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 401–410, 1983.

KALYUZHNAJA, M. G. et al. *Methylobacter scandinavica* sp.nov., a new methanotrophic psychrotrophic bacterium isolated from deep igneous rock ground water of Sweden. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 565–572, 1999.

KALYUZHNAJA, M. G. et al. *Methylobacteriaceae* link methanol oxidation to denitrification in

freshwater lake sediment as suggested by stable isotope probing and pure culture analysis. **Environmental Microbiology Reports**, v. 1, n. 5, p. 385–392, 2009.

KALYUZHNYA, M. G. et al. Highly efficient methane biocatalysis revealed in a methanotrophic bacterium. **Nature Communications**, v. 4, p. 2785, May, 2013.

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

KAMPMAN, C. et al. Enrichment of denitrifying methanotrophic bacteria for application after direct low-temperature anaerobic sewage treatment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 227–228, p. 164–171, 2012.

KAMPMAN, C. et al. Enrichment of denitrifying methanotrophic bacteria from municipal wastewater sludge in a membrane bioreactor at 20°C. **Journal of Hazardous Materials**, v. 274, p. 428–435, 2014.

KIETZIN, A.; ADAMS, M. W. W. Tungsten in biological systems. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 18, n. 1, p. 5–63, 1996.

KITS, K. D.; KLOTZ, M. G.; STEIN, L. Y. Methane oxidation coupled to nitrate reduction under hypoxia by the Gammaproteobacterium *Methylomonas denitrificans*, sp. nov. type strain FJG1. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 9, p. 3219–3232, 2015.

KOBAYASHI H. A.; STENSTRON M. K.; MAH R. A. Treatment of low strength wastewater using the anaerobic filter. **Water Research**. v. 17, n. 8, p. 903–909, 1983.

KNOWLES, R. Denitrifiers associated with methanotrophs and their potential impact on the nitrogen cycle. **Ecological Engineering**, v. 24, n. 5, p. 441–446, 2005.

KUAI, L.; VERSTRAETE, W. Ammonium removal by the oxygen-limited autotrophic nitrification- denitrification system. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 11, p. 4500–4506, 1998.

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

LAMPARELI, M. C. **Grau de trofia em corpos d'água no estado de São Paulo: avaliação dos métodos de monitoramento.** 2004. 238 p. Tese (Doutorado). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

LEVENSPIEL, O. **Chemical Reaction Engineering.** 3rd ed. New York: John Wiley 1999.

LIN, H. et al. A review on anaerobic membrane bioreactors: applications, membrane fouling and future perspectives. **Desalination**, v. 314, p. 169–188, Apr. 2013.

LIU, J. et al. Molecular characterization of a microbial consortium involved in methane oxidation coupled to denitrification under micro-aerobic conditions. **Microbial Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 64–76, 2014.

LUESKEN, F. A. et al. pmoA Primers for Detection of Anaerobic Methanotrophs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 11, p. 3877–3880, 2011a.

LUESKEN, F. A. et al. Simultaneous Nitrite-Dependent Anaerobic Methane and Ammonium Oxidation Processes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 19, p. 6802–6807, 1 out. 2011b.

LUESKEN, F. A. et al. Diversity and enrichment of nitrite-dependent anaerobic methane oxidizing bacteria from wastewater sludge. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, n. 4, p. 845–854, 2011c.

LUESKEN, F. A. et al. Effect of oxygen on the anaerobic methanotroph “*Candidatus Methyloirabilis oxyfera*”: kinetic and transcriptional analysis. **Environmental microbiology**, v. 14, n. 4, p. 1024–1034, 2012.

MADIGAN, M. T. et al. **Brock biology of microorganisms.** 4th ed., Glenview, Pearson Education, 2009.

MARTINS, T. H. **Enriquecimento de consórcios microbianos em quimiostatos sob condições anammox.** 2007. 72 p. Dissertação (Mestrado), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

MENDONÇA, L. C. **Microbiologia e cinética de sistema de lodos ativados como pós-tratamento de efluente de reator anaeróbio.** 2002. 240 p. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

MOCKAITIS, G. et al. Continuous anaerobic bioreactor with a fixed-structure bed (ABFSB) for wastewater treatment with low solids and low applied organic loading content. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 7, p. 1361–1368, 2014.

MODIN, O.; FUKUSHI, K.; YAMAMOTO, K. Denitrification with methane as external carbon source. **Water Research**, v. 41, n. 12, p. 2726–2738, 2007.

MODIN, O. et al. Performance of a membrane biofilm reactor for denitrification with methane. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 8054–8060, 2008.

MORAES, B. S.; SOUZA, T. S. O.; FORESTI, E. Effect of sulfide concentration on autotrophic denitrification from nitrate and nitrite in vertical fixed-bed reactors. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 9, p. 1395–1401, 2012.

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

MURRAY, R. G. E. **Manual of Methods for General Microbiology**. Washington: American Society for Microbiology, 1981.

NOCKO, L. M. **Remoção de carbono e nitrogênio em reator de leito móvel submetido à aeração intermitente**. (2008). 102 p. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008

NOYOLA, A. et al. Typology of municipal wastewater treatment technologies in latin america. **Clean Soil, Air, Water**, v. 40, n. 9, p. 926–932, 2012.

OJALA, D. S.; BECK, D. A. C.; KALYUZHNYAYA, M. G. Genetic systems for moderately halo(alkali)philic bacteria of the genus *Methylobacterium*. **Methods in Enzymology** v. 495, p. 99–118, 2011.

ORPHAN, V. J. et al. Methane-consuming archaea revealed by directly coupled isotopic and phylogenetic analysis. **Science**, v. 293, n. 5529, p. 484–487, 2001.

ORPHAN, V. J. et al. Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold seep sediments. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 11, p. 7663–7668, 2002.

OSHKIN, I. Y. et al. Methane-fed microbial microcosms show differential community dynamics and pinpoint taxa involved in communal response. **The ISME Journal**, v. 9, n. 5, p. 1119–1129, 2015.

PAUSS, A. et al. Liquid-to-gas mass transfer in anaerobic processes: inevitable transfer limitations of methane and hydrogen in the biomethanation process. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1636–1644, 1990.

PIMENTEL, M. F.; BARROS NETO, B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**, v. 19, n. 4, p. 268–277, 1996.

POCHANA, K.; KELLER, J. Study of factors affecting simultaneous nitrification and denitrification (SND). **Water science and technology**, 1999.

RAGHOEBARSING, A. A. et al. A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. **Nature**, v. 440, n. 7086, p. 918–921, 2006.

RAZALI, N. M.; WAH, Y. B. Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests. **Journal of Statistical Modeling and Analytics**, v. 2, n. 1, p. 21–33, 2011.

REEBURGH, W. S. Methane consumption in Cariaco Trench waters and sediments. **Earth and Planetary Science Letters**, v. 28, n. 3, p. 337–344, 1976.

RIPLEY, L.E.; BOYLE, W.C. CONVERSE, L.C. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. **Journal WPCF**, v. 58, p. 106–111, 1986

ROBINSON, J. W.; HSU, C. J. The Spectroscopic studies of the chromotropic acid-nitrate reaction. **Analytica Chimica Acta**, v. 44, p. 51–58, 1969.

SANDER, R. Compilation of Henry's Law Constants for Inorganic and Organic Species of Potential Importance in Environmental Chemistry. 1999. Disponível em: <www.henryslaw.org/henry-3.0.pdf>. Acesso em: 26 jul. 2016.

- SANTORO, A. E. The do-it-all nitrifier. **Science**, v. 351, n. 6271, p. 342-343, 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. 519–24, 2016.
- SARTI, A. et al. The Treatment of sulfate-rich wastewater using an anaerobic sequencing batch biofilm pilot-scale reactor. **Desalination**, v. 249, n. 1, p. 241–246, 2009.
- SCHMIDT, I. et al. Anaerobic ammonia oxidation in the presence of nitrogen oxides (NO_x) by two different lithotrophs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 11, p. 5351–5357, 2002.
- SCHMIDT, I.; VAN SPANNING, R. J. M.; JETTEN, M. S. M. Denitrification and ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea* wild-type, and NirK- and NorB-deficient mutants. **Microbiology**, v. 150, n. 12, p. 4107–4114, 2004.
- SHI, Y. et al. Nitrogen removal from wastewater by coupling Anammox and methane-dependent denitrification in a membrane biofilm reactor. **Environmental Science Technology**, v. 47, p. 11577–11583, 2013.
- SINISCALCHI, L. A. B. et al. Enrichment and activity of methanotrophic microorganisms from municipal wastewater sludge. **Environmental Technology**, v. 36, n. 12, p. 1563–1575, 2015.
- SIVAN, O. et al. Iron oxides stimulate sulfate-driven anaerobic methane oxidation in seeps. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 40, p. E4139–E4147, 2014.
- SKOUTERIS, G. et al. Anaerobic membrane bioreactors for wastewater treatment: A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 198-199, p. 138–148, 2012.
- SOLOMON, S. et al. (Ed.). **Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**, 2007, Cambridge: Cambridge University Press, 2007. (IPCC Fourth Assessment Report: Climate Change 2007). Disponível em: <https://www.ipcc.ch/publications_and_data/ar4/wg1/en/ch2s2-10-2.html>. Acesso em: 19 jul. 2016
- SOUZA, C. L.; CHERNICHARO, C. A. L.; MELO, G. C. B. Methane and hydrogen sulfide

emissions in UASB reactors treating domestic wastewater. **Water Science and Technology**, v. 65, n. 7, p. 1229–37, 2012.

SOUZA, T. S. O. **Desnitrificação autotrófica usando sulfeto como doador de elétrons para remoção de nitrogênio de efluentes de reatores anaeróbios utilizados no tratamento de esgoto sanitários**. 2011. 167 p. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

STAMS, A. J. M.; PLUGGE, C. M. Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 8, p. 568–577, 2009.

STEIN, L. Y.; KLOTZ, M. G. Nitrifying and denitrifying pathways of methanotrophic bacteria. **Biochemical Society Transactions**, v. 39, n. 6, p. 1826–1831, 2011.

STRONG, P. J.; XIE, S.; CLARKE, W. P. Methane as a resource: can the methanotrophs add value? **Environmental Science and Technology**, v. 49, n. 7, p. 4001–4018, 2015.

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

STROUS, M.; JETTEN, M. S. M. Anaerobic oxidation of methane and ammonium. **Annual review of microbiology**, v. 58, p. 99–117, 2004.

SUTTON, M. A et al. Too much of a good thing. **Nature**, v. 472, n. 7342, p. 159–161, 2011.

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

THAUER, R. K. Anaerobic oxidation of methane with sulfate: on the reversibility of the reactions that are catalyzed by enzymes also involved in methanogenesis from CO₂. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, p. 292–299, 2011.

THIRD, K. A. . et al. The CANON System (Completely Autotrophic Nitrogen-removal Over Nitrite) under Ammonium Limitation : **Systematic and Applied Microbiology**, v. 596, p. 588–596, 2001.

TORRES, P.; FORESTI, E. Domestic sewage treatment in a pilot system composed of UASB and SBR reactors. **Water Science and Technology**, v. 44, n. 4, p. 247–253, 2001.

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.

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

VAN DER HA, D. et al. Selection of associated heterotrophs by methane-oxidizing bacteria at different copper concentrations. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 103, n. 3, p. 527–537, 2013.

VAN DER STAR, W. R. L. et al. Startup of reactors for anoxic ammonium oxidation: experiences from the first full-scale anammox reactor in Rotterdam. **Water Research**, v. 41, n. 18, p. 4149–4163, 2007.

VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Innovative nitrogen removal. In: HENZE, M. et al. (Ed.). **Biological wastewater treatment – principles, modelling and design**. Londres, IWA Publishing, Cambridge University Press, 2008. Capitulo 5, p.87-138

VANWONTERGHEM, I. et al. Linking microbial community structure, interactions and function in anaerobic digesters using new molecular techniques. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 55–64, 2014.

VILAR-SANZ, A. et al. Denitrifying bacterial communities affect current production and nitrous oxide accumulation in a microbial fuel cell. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. e63460, 2013.

WAKI, M. et al. Methane-dependent denitrification by a semi-partitioned reactor supplied separately with methane and oxygen. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 8, p. 921–927, 2005.

WANG, Q. et al. Naive bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 16, p. 5261–5267, 2007.

WARD, N. L. et al. Three genomes from the phylum *Acidobacteria* provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 7, p. 2046–2056, 2009.

WEST, P. W.; RAMACHANDRAN, T. P. introduced a specific and sensitive spot test for nitrate based on its reaction with a solution of chromotropic acid (x,8-dihydroxy-3,G- naphthalene

disulfonic acid) in concentrated sulfuric acid. **Analytica Chimica Acta**, v. 35, p. 317–324, 1966.

WU, M. L. et al. A New intra-aerobic metabolism in the nitrite-dependent anaerobic methane-oxidizing bacterium Candidatus “*Methyloirabilis oxyfera*”. **Biochemical Society Transactions**, v. 39, n. 1, p. 243–248, 2011.

WU, M. L. et al. Ultrastructure of the denitrifying methanotroph “Candidatus *Methyloirabilis oxyfera*,” a novel polygon-shaped bacterium. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 2, p. 284–291, Jan. 2012.

YAMADA, T. et al. *Anaerolinea thermolimsa* sp. nov., *Levilinea saccharolytica* gen. nov., sp. nov. and *Leptolinea tardivitalis* gen. nov., sp. nov., novel filamentous anaerobes, and description of the new classes *Anaerolineae* classis nov. and *Caldilineae* classis nov. in the. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1331–1340, June 2006.

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.

ZAIAT, M., CABRAL, A.K.A., FORESTI, E. Reator anaeróbio horizontal de leito fixo para tratamento de águas residuárias: concepção e avaliação preliminar de desempenho. **Revista Brasileira de Engenharia – caderno de engenharia química** 11, n. 2, p. 33–42, 1994.

ZHANG, H. et al. *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov., a Gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum Gemmatimonadetes phyl. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 1155–1163, 2003.

ZHU, J. et al. Microbiology and potential applications of aerobic methane oxidation coupled to denitrification (AME-D) process: A review. **Water Research**, v. 90, p. 203–215, 2016.