Renata Medici Frayne Cuba

**UTILIZAÇÃO DO METANO COMO DOADOR DE ELÉTRONS PARA
REMOÇÃO DE NITROGÊNIO VIA NITRIFICAÇÃO E
DESNITRIFICAÇÃO EM REATOR OPERADO EM BATELADAS
SEQUENCIAIS**

Tese apresentada à Escola de
Engenharia de São Carlos da Universidade
de São Paulo para a obtenção do Título de
Doutor em Engenharia: Hidráulica e
Saneamento

Orientador: Prof. Titular Eugenio Foresti

São Carlos
2008

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

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

C962u Cuba, Renata Medici Frayne
Utilização do metano como doador de elétrons para
remoção de nitrogênio via nitrificação e desnitrificação
em reator operado em bateladas sequenciais / Renata
Medici Frayne Cuba ; orientador Eugenio Foresti. -- São
Carlos, 2008.

Tese (Doutorado-Programa de Pós-Graduação e Área de
Concentração em Hidráulica e Saneamento) -- Escola de
Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo,
2008.

1. Desnitrificação. 2. *Methylobacter* sp. 3. Oxidação
anóxica do metano. 4. Nitrato. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Bacharel **RENATA MEDICI FRAYNE CUBA**

Tese defendida e julgada em 19/09/2008 perante a Comissão Julgadora:

Prof. Titular **EUGENIO FORESTI (Orientador)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

Aprovada

Prof. Associado **MARCELO ZAIAT**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

Aprovada

Prof.^a Dr.^a **MARIA BERNADETE AMANCIO VARESCHE SILVA**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

Aprovada

Prof.^a Dr.^a **CATARINA SIMONE ANDRADE DO CANTO**
(Escola de Engenharia de Mauá/EEM)

APROVADA

Dr.^a **SILVANA DE QUEIROZ SILVA**
(Universidade Federal de Minas Gerais/UFGM)

Aprovada

Prof. Associado **MARCELO ZAIAT**
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em
Engenharia (Hidráulica e Saneamento)

Prof. Associado **GERALDO ROBERTO MARTINS DA COSTA**
Presidente da Comissão da Pós-Graduação da EESC

*Ao meu esposo, Francisco, e minhas filhas, Carolina e Ana
Laura, cuja paciência, compreensão e apoio foram essenciais
para a realização deste trabalho*

AGRADECIMENTOS

Início agradecendo a Deus que com sua infinita sabedoria e bondade tem guiado meus passos e colocado no meu caminho pessoas maravilhosas que têm me ajudado a crescer como ser humano e profissional.

Agradeço ao meu marido Francisco, eterno companheiro, amigo e confidente, pela paciência e apoio incondicionais e também pelos deliciosos sanduíches de presunto e queijo que me levava nas longas noites de perfil.

Às minhas filhas, Caro e Anita, por me ajudarem quando o “papi” viajava e entre nós três dividíamos todas as tarefas para que eu pudesse ir trabalhar. Amo vocês queridas.

Ao Professor Dr. Eugenio Foresti, alma nobre e generosa, pela sua orientação, pelo apoio nas horas difíceis, por se fazer presente mesmo quando ausente; e, principalmente, por ter confiado em mim, há cinco anos, quando vim prestar o mestrado; obrigada pela chance que me deu e que me trouxe até aqui. Foi uma honra ser sua orientada.

Ao Professor Dr. Marcelo Zaiat, sempre disposto a ajudar; suas observações no Exame de Qualificação foram muito oportunas e significativas.

À Professora. Dra. Maria Bernadete pelo apoio dado para a execução do projeto científico, e, principalmente, por não ter permitido que minhas análises de biologia molecular se tornassem história. Sua firmeza de conduta é admirável.

À Professora Dra. Iolanda Duarte pelas contribuições feitas a este trabalho durante o Exame de Qualificação e também pela ajuda nas interpretações dos resultados microbiológicos.

À Dra. Kátia Saavedra pelo apoio, paciência e perseverança nas análises de biologia molecular.

Ao Professor Dr. Luiz Daniel pelo apoio no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino.

À Dra. Eloisa Pozzi, profissional competente e prestativa, que me ensinou e me acompanhou, pacientemente, nos ensaios de NMP.

À Professora Beth Moraes; acredito que nunca poderei pagar tudo o que ela fez por mim. Deus abençoe e ilumine seu caminho.

À amiga Janja pela ajuda nas análises físico-químicas e pelas palavras de encorajamento quando tudo parecia dar errado.

Ao amigo Luiz Ricardo pelas análises de microscopia óptica.

Ao professor Benedito Rodrigues e sua esposa Vera por estarem sempre presentes nas horas difíceis.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa de doutorado concedida e apoio financeiro do projeto de pesquisa.

À Flávia, da contabilidade, por me auxiliar na execução e prestação de contas do projeto.

Às secretárias Sá e Pavi pela cooperação na parte administrativa.

Aos companheiros do Laboratório de Processos Biológicos: Bruna, Lorena, Lissa, Sandra M., Magdalena, Tiago Martins, Alexandre Ono, Arnaldo Sarti, Joel, Maurício, Guilherme, Lucas, Amanda, Dagoberto, Karina, Daniella, Luana, Gunther, Leonardo, Gabriel Souto, Glauce, Márcia D., Mércia, enfim, a todos que, de uma forma ou de outra, fizeram parte deste período tão importante da minha vida.

CARTÃO DE VISITAS

(Fato ocorrido em 1892)

Um senhor de 70 anos viajava de trem tendo ao seu lado um jovem universitário, que lia o seu livro de ciências.

O senhor, por sua vez, lia um livro de capa preta.
Foi quando o jovem percebeu que se tratava da Bíblia
e estava aberta no livro de Marcos.

Sem muita cerimônia o jovem interrompeu a leitura do velho e perguntou:
- O senhor ainda acredita neste livro cheio de fábulas e crendices?

- Sim, mas não é um livro de crendices.
É a Palavra de Deus. Estou errado?

- Mas é claro que está!
Creio que o senhor deveria estudar a História Universal.

Veria que a Revolução Francesa, ocorrida há mais de 100 anos, mostrou a miopia da religião. Somente pessoas sem cultura ainda crêem que Deus tenha criado o mundo em seis dias.

O senhor deveria conhecer um pouco mais sobre o que os nossos cientistas pensam e dizem sobre tudo isso.

- É mesmo? E o que pensam e dizem os nossos cientistas sobre a Bíblia ?

- Bem, respondeu o universitário, como vou descer na próxima estação, falta-me tempo agora, mas deixe o seu cartão que eu lhe enviarei o material pelo correio com a máxima urgência.

O velho então, cuidadosamente, abriu o bolso interno do paletó e deu o seu cartão ao universitário.

Quando o jovem leu o que estava escrito, saiu cabisbaixo sentindo-se pior que uma ameba.

No cartão estava escrito:

PROFESSOR DOUTOR LOUIS PASTEUR,
DIRETOR GERAL DO INSTITUTO DE PESQUISAS CIENTÍFICAS
UNIVERSIDADE NACIONAL DA FRANÇA.

*"Um pouco de ciência nos afasta de Deus.
Muito, nos aproxima."
Louis Pasteur.*

RESUMO

CUBA, R.M.F. **Utilização do metano como doador de elétrons para remoção de nitrogênio via nitrificação e desnitrificação em reator operado em bateladas seqüenciais.** 2008. 136 f. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

A remoção de nitrogênio via processos biológicos de nitrificação e desnitrificação foi estudada utilizando-se um reator operado em bateladas seqüenciais submetido a períodos aeróbios e anóxicos. Metano foi adicionado como doador de elétrons na etapa desnitrificante nos períodos anóxicos. Foram testadas diferentes condições operacionais e nutricionais com o objetivo de se alcançar a melhor eficiência de remoção de nitrogênio. Quando o reator operou com elevadas concentrações de biomassa em suspensão (6 g L^{-1}), a oxidação completa do nitrogênio amoniacal foi alcançada sob períodos aeróbios de 6 e 3 horas e anóxicos de 16,5 e 4 horas adotados nas etapas 1 e 2, respectivamente. Porém, a desnitrificação foi principalmente associada com o uso de subprodutos metabólicos no lugar do metano. De forma a diminuir o consumo de material endógeno, a biomassa foi imobilizada em material suporte (espuma de poliuretano) e os períodos aeróbios e anóxicos foram diminuídos para 3 horas cada (etapa 3) e posteriormente, 0,5 h e 1,5 h (etapa 4). Nesta última etapa, as maiores eficiências de remoção de nitrogênio, ($\sim 35 \%$) foram verificadas somente nos primeiros dias de operação. O processo de desnitrificação utilizando metano como doador de elétrons também foi estudado sob condições anóxicas tendo nitrato e, posteriormente, nitrito como fontes de nitrogênio oxidadas. Nesses experimentos, as eficiências de remoção de nitrogênio foram de 75 % e 90 %, porém foram obtidos baixos valores de constantes cinéticas aparentes de primeira ordem, $k_{\text{NO}_3^-} = 0,007 \text{ h}^{-1}$ e $k_{\text{NO}_2^-} = 0,0278 \text{ h}^{-1}$, respectivamente, para ambos os aceptores de elétrons. Os resultados obtidos a partir de ensaios de número mais provável (NMP) para a quantificação dos organismos metanotróficos resultaram em $5,1 \times 10^3$ (etapa 3, biomassa em suspensão) e $3,5 \times 10^7$ NMP g^{-1} sólidos totais voláteis (etapa 4, biomassa aderida). Portanto, a presença de meio suporte para a adesão de biomassa aliado aos ciclos de aeração mais freqüentes favoreceram o crescimento dessas bactérias. Sulfato e cloreto, nas concentrações de, aproximadamente, 100 mg.L^{-1} , afetaram a eficiência de remoção de nitrogênio quando associado ao processo metanotrófico. Os resultados das análises de biologia molecular revelaram a presença de organismos metanotróficos semelhantes a *Methylobomonas* sp. tanto em amostras de biomassa retiradas do reator quando este operou sob condições desnitrificantes na presença de oxigênio, como também, naquelas retiradas quando o reator operou em condições anóxicas.

Palavras-chave: Desnitrificação, *Methylobomonas* sp., Metano, Oxidação anóxica do metano, Nitrato.

ABSTRACT

CUBA, R.M.F. **Nitrogen removal by biological nitrification and denitrification using methane as electron donor in a sequencing batch aerobic/anoxic reactor.** 2008. 136 f. Thesis (Doctorate) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

Nitrogen removal via biological nitrification and denitrification was studied in a sequencing batch reactor submitted to aerate and anoxic periods. Methane was added as electron donor for denitrification in the anoxic periods. Different operational and nutritional conditions referred to as stages in this text were tested aiming to achieve the best nitrogen removal efficiency. When the reactor operated with high suspended biomass concentration (6 g.L^{-1}), complete ammonia nitrogen oxidation was obtained in 6 to 3 hours aerobic periods and 16.5 to 4 hours anoxic periods defined for stage 1 and stage 2, respectively. However, denitrification was mainly associated with the use of endogenous metabolic byproducts instead of methane. In order to diminish endogenous material uptake, the biomass was immobilized in support material (polyurethane foam) and aerobic and anaerobic periods were reduced to 3 hours each (stage 3), followed by another reduction to 0.5 and 1.5 hours, respectively (stage 4). The highest nitrogen removal efficiencies ($\sim 35\%$) were identified in this last stage, but only during the initial days of operation. The denitrification process using methane as electron donor was also studied under anoxic conditions, separately from nitrification by adding nitrate and nitrite as the oxidized nitrogen sources. In these experiments, nitrogen removal efficiencies were of 75 % and 90 %, but very low first order kinetic constants $k_{\text{NO}_3^-} = 0,007 \text{ h}^{-1}$ e $k_{\text{NO}_2^-} = 0,0278 \text{ h}^{-1}$, respectively, were obtained with both the electron acceptors. The most probable number (MPN) tests carried out for methanotrophic bacteria quantification resulted in $5,1 \times 10^3 \text{ MPN.gVSS}^{-1}$ (stage 3 - suspended biomass) and $3,5 \times 10^7 \text{ MPN.gVSS}^{-1}$ (stage 4 - attached biomass). Therefore, the presence of a support media for biomass adhesion as well as more frequent aeration cycles enhanced the growth of such bacteria. Sulfate and chloride at concentrations of 100 mg.L^{-1} , approximately, affected the nitrogen removal efficiency associated to methanotrophic process. The presence of methanotrophs identified by molecular biology tests as *Methylobacter* sp was observed in samples taken from reactor in presence of oxygen and under anoxic operational conditions.

Key words: Denitrification, *Methylobacter* sp, anoxic oxidation of methane, nitrate.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Rotas metabólicas da oxidação do metano e assimilação do formaldeído por organismos metanotróficos.....	14
Figura 2. Esquema experimental das condições operacionais e nutricionais testadas em laboratório.....	31
Figura 3 - Esquema do sistema utilizado para desenvolvimento da parte experimental.....	33
Figura 4 - Foto do sistema utilizado para desenvolvimento da parte experimental	35
Figura 5. Foto da espuma de poliuretano utilizada como meio suporte no reator.....	40
Figura 6 - Valores de concentração de nitrato (N-NO_3^-) e nitrito (N-NO_2^-) após seis horas de aeração.....	63
Figura 7 - Eficiência de remoção de N-NO_3^- no final do ciclo anóxico durante a etapa 1.....	64
Figura 8 - Variação temporal da concentração de metano no <i>headspace</i> do reator.	66
Figura 9 - Fotos de microscopia óptica comum feitas do inóculo do reator no final da fase B.	69
Figura 10 - Variação temporal das concentrações de N-NH_4^+ e N-NO_3^- no final da etapa 1.	69
Figura 11 - Eficiência de remoção do N-NO_3^- durante etapa 2.....	71
Figura 12. Fotos de microscopia óptica tiradas de amostra de lodo no final da etapa 2.	73
Figura 13 - Resultado do monitoramento das formas nitrogenadas presentes no efluente do reator no período aeróbio. Tempo de ciclo = 6 horas.....	75
Figura 14 - Resultado das variações temporais das concentrações de N-NO_3^- , N-NO_2^- e N-NH_4^+ obtidos durante o ciclo aeróbio.	76
Figura 15 - Perfil da concentração de oxigênio dissolvido (OD).....	77
Figura 16 - Variação temporal da alcalinidade durante etapa aeróbia de adaptação.....	78
Figura 17- Resultados das análises das concentrações das formas nitrogenadas no efluente aeróbio do reator antes e depois do início dos períodos anóxicos. Tempo de ciclo = 6 h.....	79

Figura 18 - Resultados das análises das concentrações de nitrato (N-NO_3^-) obtidos a partir de amostras de efluente aeróbio e anóxico do reator durante a etapa 3. Tempo de ciclo = 6 h	81
Figura 19 - Resultados da eficiência de remoção de nitrogênio no final de cada ciclo. Tempo de ciclo = 6 h	81
Figura 20 - Variação temporal das concentrações de N-NO_3^- e N-NH_4^+ durante o ciclo de operação da etapa 3.....	82
Figura 21 - Fotos de microscopia óptica comum tiradas de amostra do inóculo aderido à espuma.....	86
Figura 22 - Resultados das concentrações de amônia (N-NH_4^+) e nitrato (N-NO_3^-) presentes no efluente do reator durante o monitoramento realizado durante a etapa 4.....	87
Tempo de ciclo = 12 horas	87
Figura 23 - Eficiência de remoção de nitrogênio total durante o monitoramento (etapa 4)....	88
Tempo de ciclo = 12 h.....	88
Figura 24 - Variação temporal da concentração de N-NH_4^+ durante o ciclo de 12 h.....	89
Figura 25 - Variação temporal da concentração de nitrato (N-NO_3^-) durante o ciclo de 12 h.	90
Figura 26 - Variação temporal da concentração de N-NO_3^- na presença e ausência de metano.	92
Figura 27 - Variação temporal da concentração de N-NO_2^-	94
Figura 28 - Resultados da concentração de N_2O nos reatores alimentados com N-NO_2^-	97
Figura 29 - Resultados da concentração de N_2O nos reatores alimentados com N-NO_3^-	98
Figura 30 - Resultados da concentração de N_2O nos reatores alimentados com N-NO_3^- e N-NO_2^- na presença de metano e oxigênio molecular	98
Figura 31 - Resultados da concentração de N_2O nos reatores alimentados com N-NO_3^- , N-NO_2^- e metano na ausência de oxigênio molecular.	99
Figura 32 - Ajuste cinético para a remoção do N-NO_3^- na presença de sulfato	103

Figura 33 - Ajuste cinético para a remoção do N-NO_3^- na presença de cloreto	103
Figura 34 - Ajuste cinético para a remoção do N-NO_3^- na ausência de cloreto e sulfato	104
Figura 35 - Velocidades de consumo de N-NO_3^-	105
Figura 36 - Resultados da variação de metano nos <i>headspaces</i> dos reatores.....	105
Figura 37 - Imagens de MEV feitas em amostras de espuma retiradas do reator no final da parte experimental.	108
Figura 38 - Gel de DGGE (gradiente 30%-60%) com <i>primers</i> para o Domínio <i>Bacteria</i> (etapa 1, fases A e B)	109
Figura 39 - Gel de DGGE (gradiente 30%-60%) com <i>primers</i> para o Domínio <i>Bacteria</i> (etapas 2 a 6).....	110
Figura 40 - Árvore filogenética de consenso baseado nas seqüências das bandas recortadas do DGGE com <i>primers</i> para o Domínio <i>Bacteria</i>	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Principais fatores apontados como responsáveis pelo acúmulo de nitrito.	8
Tabela 2 - Valores inibitórios de concentração de amônia apresentados na literatura.....	10
Tabela 3 - Principais características dos organismos metanotróficos do tipo I e tipo II.	16
Tabela 4. Resultados de pesquisas com organismos metanotróficos sob diferentes condições ambientais.....	20
Tabela 5 - Valores de concentrações de oxigênio dissolvido utilizadas em ensaios para desnitrificação associada a organismos metanotróficos.	24
Tabela 6 - Tempo de operação em cada etapa.....	32
Tabela 7 - Composição do substrato sintético utilizado nas fases A e B	36
Tabela 8 - Solução de metais I adicionada ao substrato sintético durante etapa 1 (fase A). ...	36
Tabela 9. Solução de metais II adicionada ao substrato sintético etapa 1 (fase B).	36
Tabela 10 - Composição do substrato sintético utilizado na etapa 2.....	37
Tabela 11 - Composição da solução de sais de ácidos orgânicos, utilizada etapa 2.....	37
Tabela 12 - Composição do substrato sintético utilizado nas etapas 3 e 4.....	38
Tabela 13 - Composição do substrato sintético utilizado nas etapas 5 e 6.....	38
Tabela 14 - Parâmetros e metodologias de análise.....	41
Tabela 15 - Condições analisadas nos ensaios de atividade desnitrificantes.....	44
Tabela 16 - Condições de estudo para os diferentes reatores utilizados no ensaio com sulfato e cloreto.	49
Tabela 17 - Características do meio de cultura específico para organismos metanotróficos ..	55
Tabela 18 -: <i>Primers</i> filogenéticos utilizados para o Domínio <i>Bacteria</i>	58
Tabela 19 -: Condições utilizadas na programação do aparelho para amplificação por PCR.	59
Tabela 20 - Resultados das análises de sólidos presentes no reator durante a etapa 1	64

Tabela 21 - Resultados de NMP realizados durante etapa 1 – final fase A para estimativa do número de organismos, nitrificantes, desnitrificantes e metanotróficos.	65
Tabela 22 - Resultados de NMP realizados durante a etapa 1 – final da fase B para estimativa do número de organismos, nitrificantes, desnitrificantes e metanotróficos.	68
Tabela 23 - Variação na concentração de sólidos no reator no início e final da etapa 2.....	71
Tabela 24 - Resultados de NMP realizados no final das etapas 1 e 2 para os organismos, nitrificantes, desnitrificantes e metanotróficos.....	72
Tabela 25 - Condições de operação adotadas durante a adaptação do inóculo	74
Tabela 26 - Variação na concentração de sólidos aderidos à espuma.	84
Tabela 27 - Resultados de NMP para os organismos, nitrificantes, desnitrificantes e metanotróficos realizados durante a etapa 3 nos seguintes intervalos: (a) no final da fase aeróbia e (b) no final da fase aeróbia/anóxica.	84
Tabela 28 - Resultados de NMP realizados no final das etapas 3 e 4 para os organismos, nitrificantes, desnitrificantes e metanotróficos.....	90
Tabela 29 - Resultados de sólidos aderidos à espuma no início e final da etapa 4.	91
Tabela 30 - Resultados das concentrações de sólidos aderidos à espuma no início e final da etapa 5.....	93
Tabela 31 - Resultados de NMP realizados na etapa 4 e 5 para os organismos desnitrificantes e metanotróficos.	93
Tabela 32 - Resultados obtidos para ajuste cinético da remoção de N-NO_2^- no final da etapa 6 – (A) na presença de metano e (B) na ausência de metano.	95
Tabela 33 - Resultados de sólidos aderidos à espuma no início e final da etapa 6.	95
Tabela 34 - Resultados de NMP obtidos no final das etapas 5 e 6 para os organismos desnitrificantes e metanotróficos.	96

Tabela 35 - Resultados obtidos para o ensaio da atividade desnitrificante com biomassa adaptada durante a etapa 4.....	99
Tabela 36 - Resultados obtidos nos ensaios de atividade desnitrificante a partir de biomassa coletada no final das etapas 5 e 6.	101
Tabela 37 - Ajuste cinético para diferentes condições nutricionais.	104
Tabela 38 Resultados do sequenciamento das bandas recortadas no DGGE com <i>primers</i> para o Domínio <i>Bacteria</i>	111

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMO.	Enzima Amôniamonooxigenase
ATP	Adenosina Trifosfato
DGGE	Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
FADH	Formaldeídodesidrogenase;
FDH	Formiatodesidrogenase;
FIA	Análise por Injeção de Fluxo
MDH-	Metanoldesidrogenase
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MMO	Enzima Metanomonooxigenase
MMOs	Enzima Metanomonooxigenase Solúvel
MMOp)	Enzima Metanomonooxigenase Particulada
MON	Microrganismos Oxidantes de Nitrito
MOA	Microrganismos Oxidantes da Amônia
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NMP	Número Mais Provável
OD	Oxigênio Dissolvido
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RNA	Ácido Ribonucleico
RMP	Ribulose Monofosfato
SBR	Reator Sequencial em Batelada
SFA	Sólidos Fixos Aderidos
SVA	Sólidos Voláteis Aderido
ST	Sólidos Totais
STA	Sólidos Totais Aderidos
STF	Sólidos Totais Fixos
STV	Sólidos Totais Voláteis
UASB	Upflow Anaerobic Sludge Blanket

LISTA DE SÍMBOLOS

N- NH_4^+	nitrogênio amoniacal
NO_2^-	nitrito
NO_3^-	nitrato
N- NO_2^-	nitrogênio na forma de nitrito
N- NO_3^-	nitrogênio na forma de nitrato
pH	potencial hidrogeniônico
N_2	nitrogênio gasoso
NH_3	amônia
N_2O	óxido nitroso
HNO_2	ácido nitroso
C_{OD}	concentração de oxigênio dissolvido
$\text{C}_{\text{N-NH}_4}$	concentração de nitrogênio amoniacal
$\text{C}_{\text{N-NH}_3}$	concentração de amônia
T	temperatura
°C	graus Celcius
SO_4^{2-}	íon sulfato
Cl^-	íon cloreto
ΔG°	variação da energia livre padrão de Gibbs
UV	ultravioleta
R^2	coeficiente de correlação
k'_{NO_3}	constante cinética aparente para conversão de nitrato
k'_{NO_2}	constante cinética aparente para conversão de nitrito
R_{NO_2}	concentração residual de nitrito

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVOS.....	4
2.1	Objetivo geral	4
2.2	Objetivos específicos.....	4
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	5
3.1	Aspectos gerais	5
3.2	Nitrificação	6
3.2.1	Nitrificação convencional.....	6
3.2.2	Nitrificação parcial a nitrito.....	7
3.3	Desnitrificação.....	11
3.4	Organismos metanotróficos aeróbios	13
3.4.1	Aspectos gerais	13
3.4.2	Assimilação do formaldeído	14
3.4.3	Classificação dos organismos metanotróficos.....	15
3.4.4	Enzimas metanomonooxigenase (MMO).....	17
3.4.5	Fatores ambientais relevantes ao metabolismo metanotrófico	19
3.4.5.1	pH e temperatura	19
3.4.5.2	Variações na concentração de oxigênio e metano	20
3.4.5.3	Efeito inibitório do sulfato e cloreto na oxidação do metano.....	22
3.5	Aspectos importantes na integração dos processos de nitrificação e desnitrificação em reator operado em batelada seqüencial tendo metano como fonte de carbono na etapa desnitrificante	22
3.5.1	Aspectos gerais	23
3.5.2	Fatores relevantes ao processo	24
3.5.2.1	Concentração de oxigênio dissolvido (OD).....	24
3.5.2.2	Concentração de nitrogênio amoniacal ($N-NH_4^+$)	25
3.5.2.3	Acúmulo de nitrito.....	27
4	MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1	Aspectos gerais	30
4.2	Instalação experimental	32
4.3	Substrato sintético	35
4.3.1	Etapa 1	35
4.3.2	Etapa 2	37
4.3.3	Etapas 3 e 4.....	38
4.3.4	Etapas 5 e 6.....	38
4.4	Inóculo	39
4.4.1	Etapas 1 (fases A e B) e 2.....	39
4.4.2	Etapa 3 a 6	39

4.5	Controle Operacional.....	40
4.6	Amostragem	47
4.6.1	Etapas 1 e 2.....	47
4.6.2	Etapas 3 a 6.....	48
4.7	Influências do sulfato e cloreto na cinética de desnitrificação associada a organismos metanotróficos.	48
4.8	Análises microbiológicas.....	50
4.8.1	Caracterização morfológica.....	50
4.8.2	Quantificação de organismos pela técnica de Número Mais Provável (NMP)	51
4.8.2.1	Organismos nitrificantes.....	52
4.8.2.2	Organismos desnitrificantes	53
4.8.2.3	Organismos metanotróficos.....	54
4.8.3	Análise da diversidade microbiana.....	57
4.8.3.1	Amostragem.....	57
4.8.3.2	Extração de DNA.....	58
4.8.3.3	Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	58
4.8.3.4	Eletroforese em gel de agarose (DGGE).....	59
4.8.3.5	Sequenciamento.....	60
4.8.3.6	Análise filogenética	60
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1	Análises físico-químicas e biológicas	62
5.1.1	Etapa 1 (fases A e B)	62
5.1.2	Etapa 2	70
5.1.3	Etapa 3	73
5.1.3.1	Etapa de adaptação aeróbia.....	73
5.1.3.2	Etapa aeróbia/anóxica.....	79
5.1.4	Etapa 4	86
5.1.5	Etapa 5	91
5.1.6	Etapa 6	94
5.2	Ensaio de atividade desnitrificante	96
5.2.1	Final da etapa 4.....	97
5.2.2	Etapas 5 e 6.....	101
5.3	Influência do sulfato e cloreto na cinética de desnitrificação associada a organismos metanotróficos.	102
5.4	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	107
5.5	Análises de biologia molecular	108
5.5.1	Etapa 1 (fases A e B)	108
5.5.2	Etapas 2 a 6.....	110
6	CONCLUSÕES.....	114
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	116
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	117

1 INTRODUÇÃO

A minimização dos custos envolvidos no tratamento de águas residuárias, tanto domésticas como industriais, deve ser promovida sem o prejuízo da qualidade final do efluente a ser lançado no corpo receptor.

Para tal, tecnologias que visam o baixo custo no tratamento devem estar bem fundamentadas no que concerne ao conhecimento dos processos físicos, químicos e microbiológicos envolvidos e baseados em resultados de pesquisas em diferentes escalas.

Neste contexto, os processos biológicos para remoção de compostos nitrogenados, apesar de proporcionarem resultados técnicos satisfatórios, ainda apresentam limitações com relação aos custos envolvidos para a realidade econômica de muitas cidades e indústrias, principalmente em países em desenvolvimento.

O tratamento biológico ocorre comumente em duas etapas principais - nitrificação seguida pela desnitrificação, que resultam na formação de nitrogênio gasoso como produto final, que é eliminado na atmosfera.

O processo global requer a disponibilidade no meio de alcalinidade e oxigênio, para a etapa de nitrificação, bem como de doador de elétrons (em geral, matéria orgânica) para a desnitrificação, representando aumento significativo nos custos do tratamento.

No entanto, segundo Münch *et al.* (1996), Pochana e Keller (1999) e Yoo *et al.* (1999), quando os processos de nitrificação e desnitrificação são executados no mesmo reator, as vantagens econômicas aumentam devido à diminuição do número ou do tamanho dos reatores. Por outro lado, se for possível controlar o processo de maneira a se obter a nitrificação somente até a produção de nitrito, para sua posterior desnitrificação, a economia com oxigênio e fonte de carbono pode chegar a 25 % e 40 %, respectivamente.

Adicionalmente, a minimização de custos relacionados com a suplementação de fonte de carbono necessária durante o processo de desnitrificação poderia ser conseguida através da utilização de subprodutos gerados em etapas anteriores à remoção de nutrientes, como é o caso do gás metano.

Estudos mais aprofundados sobre esta fonte de carbono podem auxiliar no desenvolvimento e aperfeiçoamento de unidades de tratamento terciário com grande potencial de sustentabilidade, já que o metano é o principal constituinte do biogás gerado no processo anaeróbio.

Destaque-se que a viabilidade técnica e econômica da adoção de reatores anaeróbios como primeira unidade de tratamento para a remoção de matéria orgânica de águas residuárias em geral, incluindo-se os esgotos sanitários, principalmente em países em desenvolvimento de regiões de clima tropical ou subtropical, tem sido amplamente demonstrada.

Além disso, o aproveitamento do metano, ao invés de sua queima, viria ao encontro das metas do desenvolvimento sustentável que visam, entre outros fatores, a minimização de resíduos a serem tratados por meio do seu aproveitamento dentro do próprio processo de produção.

De acordo com a literatura, a remoção de nitrogênio associada à oxidação aeróbia do metano é possível devido à associação sintrófica entre organismos desnitrificantes e metanotróficos.

Desta forma, acredita-se que é possível obter a remoção de nitrogênio em reatores biológicos operados em bateladas sequenciais, sob regime de aeração intermitente, promovendo-se a nitrificação autotrófica nas etapas aeradas e, posteriormente, a desnitrificação heterotrófica associada ao metabolismo metanotrófico nas etapas não aeradas.

No entanto, devido ao fato de a maioria dos experimentos terem sido executados em recipientes com pequena capacidade volumétrica, assim como, sob condições nutricionais específicas, de maneira a favorecer o enriquecimento de culturas metanotróficas, poucos são os resultados relatados a partir de pesquisas realizadas em reatores biológicos operados em bateladas seqüenciais.

Há algum tempo, o Laboratório de Processos Biológicos da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo vem desenvolvendo pesquisas que visam à remoção de nutrientes. Mais recentemente, estudos baseados na utilização do metano como fonte de carbono para o processo de desnitrificação identificaram limitações do processo associadas com as características do reator utilizado (CUBA, 2005; SANTOS, 2003).

Devido ao exposto, este trabalho teve por objetivo principal avaliar a viabilidade da utilização do metano como o doador de elétrons e fonte de carbono para a síntese celular na etapa de desnitrificação utilizando reator aeróbio/anóxico operado em bateladas seqüenciais sob diferentes condições operacionais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi o de avaliar a viabilidade de uso do metano como doador de elétrons para a desnitrificação durante o processo de remoção de nitrogênio, via nitrificação/desnitrificação, em reator operado em bateladas seqüenciais.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

1. Verificar as melhores condições operacionais que permitam a ocorrência da nitrificação e desnitrificação em reator operado em bateladas seqüenciais em condições controladas em laboratório, utilizando-se substrato sintético e gás metano.
2. Determinar os valores das constantes cinéticas dos processos nas condições operacionais em que o reator foi estudado.
3. Identificar a comunidade microbiana presente no reator durante as diferentes etapas operacionais, utilizando técnicas de biologia molecular.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Aspectos gerais

Como resultado das normas mais restritivas com relação à emissão de nutrientes nos corpos receptores, os sistemas de tratamento de águas residuárias (domésticas e industriais) estão sendo ampliados em suas funções, incorporando etapas para remoção de constituintes específicos, de maneira que a qualidade de seus efluentes satisfaça às exigências estabelecidas por lei.

Porém, para que esta nova realidade não se traduza em custos de tratamentos cada vez mais elevados, muitos pesquisadores estão direcionando sua atenção para o estudo e desenvolvimento de processos voltados não somente para a qualidade final do efluente, mas, também, que demandem menores recursos financeiros.

O tratamento anaeróbio, apesar de atender às exigências econômicas, ainda apresenta algumas restrições relacionadas com a qualidade de seus efluentes, principalmente com relação à presença de microrganismos patogênicos e nutrientes, em especial o nitrogênio (maior parte na forma de nitrogênio amoniacal).

Sistemas que utilizam os processos biológicos de nitrificação e desnitrificação vêm apresentando bons resultados no tratamento de efluentes de reatores anaeróbios, embora a necessidade de adição de fonte de carbono na etapa de desnitrificação possa aumentar os custos operacionais do processo.

No entanto, os processos anaeróbios geram efluentes que, potencialmente, podem ser utilizados como doadores de elétrons em processos biológicos, dentre os quais efluentes gasosos, constituídos principalmente por metano.

O metano, apesar de ser uma molécula relativamente estável, pode ser oxidado por bactérias aeróbias denominadas metanotróficas que o utilizam como fonte de carbono e energia.

Considerando-se os avanços e conhecimentos recentes nos processos de nitrificação e desnitrificação (incluindo a participação de organismos metanotróficos) apresenta-se, inicialmente, a revisão sobre os principais aspectos desses processos de interesse para este projeto de pesquisa.

3.2 Nitrificação

3.2.1 Nitrificação convencional

De acordo com Metcalf e Eddy (2003) a nitrificação é o termo utilizado para designar o processo biológico de conversão do nitrogênio amoniacal (N-NH_4^+) a nitrato (NO_3^-) sendo esse processo considerado o primeiro passo para a remoção biológica de nitrogênio de águas residuais.

O processo global consiste de duas etapas distintas; Na primeira etapa (nitritação) o íon amônio é oxidado a nitrito (NO_2^-) enquanto que a segunda etapa (nitratação) caracteriza-se pela oxidação do nitrito a nitrato. As reações bioquímicas para ambas as etapas encontram-se apresentadas nas equações (1) e (2).

As equações apresentadas permitem verificar que há expressivo consumo de oxigênio. Nesse sentido, as altas demandas de oxigênio para oxidação de nitrogênio amoniacal. (RUIZ

et al., 2002) e de bicarbonato para suplementação de carbono inorgânico durante a síntese celular, são, provavelmente, os principais fatores relevantes no aspecto econômico.

Os microrganismos envolvidos no processo são autotróficos quimiosintetizantes, ou seja, eles utilizam o CO_2 como fonte de carbono inorgânico para formação de novas células enquanto que a energia é obtida através da oxidação de substratos inorgânicos, como o íon amônio (NH_4^+), o nitrito (NO_2^-) e o nitrato (NO_3^-).

Os organismos comumente citados na literatura como os responsáveis pela oxidação do íon amônio (MOA) são: *Nitrosomonas*, mais especificamente os gêneros *N. europea* e *N. monocella*. e as *Nitrospira*. Enquanto que a oxidação do nitrito é realizada pelas *Nitrobacter*. De acordo com Metcalf e Eddy (2003) os organismos do gênero *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrospina* e *Nitroeystis* também são capazes de obterem energia por meio da oxidação do nitrito.

Conforme a literatura, fatores ambientais como pH, temperatura, concentração de oxigênio dissolvido e presença de inibidores podem acarretar dificuldades ao processo, devido à sensibilidade das bactérias a esses fatores.

3.2.2 Nitrificação parcial a nitrito

Há tempos, pesquisadores vêm concentrando seus esforços para a obtenção do nitrito e não nitrato como produto final da nitrificação.

De acordo com Yoo *et al.* (1999), quando a segunda etapa do processo de nitrificação ($\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$) é inibida, de maneira que haja o acúmulo do nitrito para posteriormente, ser reduzido a nitrogênio gasoso (N_2) na etapa de desnitrificação, o processo global permite: (a) 40 % de redução na demanda de fonte de carbono durante a desnitrificação; (b) Redução de 25 % no consumo de oxigênio; (c) aumento de até 63 % nas velocidades de desnitrificação.

No entanto, como durante a nitrificação a oxidação do nitrogênio amoniacal é a etapa limitante do processo (HENZE *et al.*, 1997) o acúmulo de nitrito (concentrações maiores que 1 mg. L^{-1}) em sistemas convencionais geralmente não é observado.

Desta forma, torna-se necessário inibir o processo de oxidação do nitrito a nitrato, sem prejudicar a oxidação da amônia.

Na Tabela 1, encontram-se listadas algumas referências que tiveram como base o estudo dos fatores responsáveis pelo acúmulo de nitrito.

Tabela 1- Principais fatores apontados como responsáveis pelo acúmulo de nitrito.

Referência	Substrato/ $\text{N} - \text{NH}_4^+$ afluente	Reator/retenção de biomassa/Capacidade volumétrica	Causa(s) Provável (is)	Observações
Garrido <i>et al.</i> (1997)	Sintético/ 200 mg.L^{-1}	Airlift/biomassa em suspensão/3L	¹ OD	OD > 2,5 → formação de NO_3^- OD $\approx 1,5$ → Acúmulo NO_2^- OD < 1,0 → Baixa oxidação de NH_4^+
Münch <i>et al.</i> (1996)	² Esg. dom/ 33 mg.L^{-1}	³ RBS (aeróbio/anóxico)/ biomassa suspensa/ 12 L	Concentração de NH_3 e pH elevado	Nitrito acumulou mesmo a altas concentrações de OD (≈ 7)
Helmer e Kunst (1998)	Sintético/ 60 mg.L^{-1}	Contadores biológicos rotatórios	Concentração de NH_3	Ensaio nitrificação/desnitrificação com biomassa de reator utilizado para tratamento de chorume. OD ≈ 1
Yoo <i>et al.</i> (1999)	Sintético/ 41 mg.L^{-1}	RBS (aeróbio/anóxico)/ biomassa aderida/17 L	Concentrações de OD e NH_3 e pH	$1,0 < \text{OD} < 1,5$ (valor considerado ideal)
Bernet <i>et al.</i> (2001)	Sintético/ 250 mg.L^{-1}	SBR(aeróbio)/biomassa aderida/5L	Concentração de OD e formação de HNO_2	OD = 0,5 (acúmulo de N- NO_2^-)

¹OD – Concentração de oxigênio dissolvido (mg.L^{-1})

²Esg. dom. – esgoto doméstico

³SBR – Reator Sequencial em Bateladas

A seguir, apresenta-se breve discussão sobre as causas comumente citadas para favorecer o acúmulo de nitrito apresentadas na Tabela 1.

Concentração de Oxigênio Dissolvido

Wiesmann¹ (1994) *apud* Bernet *et al.* (2001) a partir de resultados obtidos em ensaios cinéticos, demonstrou que baixas concentrações de oxigênio dissolvido (OD) afetam mais significativamente às velocidades de crescimento dos microrganismos responsáveis pela oxidação do nitrito (MON) do que dos microrganismos oxidantes da amônia (MOA). Sendo assim, é de se esperar que sob condições limitantes de concentração de OD a velocidade de oxidação da amônia supere a do nitrito, acumulando-o no meio.

Como apresentado na Tabela 1, a concentração de OD usualmente encontrada para o acúmulo de nitrito situa-se no intervalo de 1 mg L⁻¹ a 1,5 mg L⁻¹, apesar de haver casos relatados na literatura onde o acúmulo de nitrito foi detectado em concentrações de OD de 4 mg L⁻¹ (GEE; KIM, 2004).

Por outro lado, valores muito baixos de oxigênio, além de poderem inibir a oxidação de nitrogênio amoniacal, podem, igualmente, favorecer a formação de subprodutos indesejáveis, como por exemplo, o óxido nitroso (N₂O).

Garrido *et al.* (1996), verificaram a diminuição na eficiência de conversão do nitrogênio amoniacal a nitrito e nitrato para concentrações de OD inferiores a 1 mg L⁻¹.

Concentração de amônia (NH₃)

Conforme a literatura, a forma não ionizada do íon amônio (NH₃) também possui efeito inibitório sobre o processo de nitrificação, sendo os MON mais sensíveis.

A Tabela 2 apresenta algumas referências para diferentes valores de concentração de amônia.

¹ WIESMANN, U.(1994) Biological nitrogen removal from wastewater. *Adv. Bioch. Eng. Biotechnol.*, v. 51, p. 113-154.

Tabela 2 - Valores inibitórios de concentração de amônia apresentados na literatura

Referência	Concentração de N-NH ₃ (mg L ⁻¹)	pH	Sistema reacional	Etapa inibida
Abeling e Seyfried (1992)	1 a 5	8,3 a 8,5	Anóxico / aeróbio (biomassa aderida)	nitratação
Mauret <i>et al.</i> (1996)	6,6 a 8,9	7 e 8,5	Aeróbio (biomassa suspensa)	nitratação
Yoo <i>et al.</i> (1998)	< 1	6,5 a 7,5	Aeróbio (biomassa suspensa)	nitratação
Bae <i>et al.</i> (2002)	4	8 e 9	Ensaio em bateladas com biomassa de sistema de lodos ativados.	nitratação

Porém, Çeçen (1996), verificou que os efeitos das relações $^2C_{OD}/^3C_{N-NH_4}$ e $C_{OD}/^4C_{N-NH_3}$ foram muito mais relevantes para o acúmulo de nitrito que a concentração de amônia livre. O autor ainda destaca que esta última relação deve ser menor a 10 para se alcançar a inibição por amônia livre.

Adicionalmente, devido à adaptação dos microrganismos às concentrações de amônia, torna-se difícil manter a inibição do processo de nitratação por longo período de operação (GARRIDO *et al.*, 1997, VAN LOOSDRECHT; JETTEN, 1998).

Outras formas de se controlar a oxidação do nitrito, relatadas na literatura, são: a elevação do pH ou da temperatura e a diminuição no tempo de retenção de sólidos (utilização de biomassa aderida), sendo que, a utilização de biofilmes leva ao aumento na relação bactérias oxidantes de amônia e bactérias oxidantes de nitrito no sistema devido às maiores

² C_{OD} – concentração de oxigênio dissolvido
³ C_{N-NH₄} – concentração de nitrogênio amoniacal
⁴ C_{N-NH₃} – concentração de amônia

velocidades de crescimento das oxidantes de amônia (BERNET, *et al.* 2001), enquanto que o pH e a temperatura favorecem a formação de amônia livre.

Bae *et al.* (2002), ao estudarem a influência do pH, temperatura e oxigênio dissolvido no acúmulo e oxidação do nitrito em a partir de ensaios feitos em bateladas com biomassa de sistemas de lodos ativados e 50 mg.L⁻¹ de N-NH₄⁺ e N-NO₂⁻, encontraram como valores ótimos: pH = 8, temperatura = 30 °C e OD = 1,5 mg.L⁻¹, com remoção de aproximadamente 77 % de amônia acumulada na forma de nitrito.

Outro método, também citado na literatura para promover o acúmulo de nitrito, seria a utilização de culturas puras. No entanto, esta técnica torna-se inviável no âmbito operacional de estações de tratamento de águas residuárias.

Acúmulo de ácido nitroso (HNO₂)

⁵Anthonisen *et al.* (1976) *apud* Çeçen (1996) relataram que o acúmulo de ácido nitroso no sistema podem inibir os organismos oxidantes de nitrito, mesmo quando presentes em baixas concentrações (entre 0,2 e 2,8 mg.L⁻¹)

Bernet *et al.* (2001) ao estudarem o efeito da concentração de oxigênio no processo de nitrificação em reatores tipo RBS e com biomassa aderida, verificaram que além das baixas concentrações de OD empregadas (entre 0,4 e 0,5 mg. L⁻¹) o acúmulo de, aproximadamente, 1,5 mg. L⁻¹ de HNO₂ favoreceram a diminuição na oxidação do nitrito.

3.3 Desnitrificação

Devido ao fato de o processo de nitrificação biológica não remover o nitrogênio do meio, comumente utiliza-se a desnitrificação biológica para alcançar esse objetivo.

⁵ ANTHONISEN, A.C. *et al.* (1976) Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Journal WPCF*, v.48, n.5, p.835-852

De acordo com Schmidt *et al.* (2003), a desnitrificação biológica pode ser descrita como uma classe de respiração anóxica onde os elétrons provenientes, por exemplo, da matéria orgânica, de compostos reduzidos de enxofre ou do hidrogênio molecular, são transferidos para os compostos de nitrogênio oxidados em vez do oxigênio, transformando-os em compostos reduzidos como N_2O ou N_2 , liberando-os do meio líquido.

Por esse motivo, o processo de desnitrificação deve ocorrer preferencialmente em ambientes onde o oxigênio molecular não esteja presente, pois sua presença implicaria no favorecimento da respiração aeróbia. Esse fato pode ser explicado quando se compara o potencial de redução do par NO_3^-/NO_2^- com o do par O_2/H_2O , sendo este último maior.

Já a necessidade da introdução de fonte exógena de carbono no sistema, durante a etapa de desnitrificação, principalmente no de tratamento de esgotos sanitários, se dá devido ao fato de a remoção de nitrogênio ser realizada, principalmente, por microrganismos heterotróficos e em unidades onde a maior parte da matéria orgânica já foi oxidada.

Diversas são as fontes de carbono que podem ser utilizadas no processo, porém, segundo Hanaki e Polprasert (1989), Mosquera-Corral *et al.* (2001), há preferência por compostos orgânicos de baixa massa molecular, como por exemplo, o metanol ou acetato, devido às suas propriedades não fermentativas.

Desta forma, a complementação de fonte de carbono implica em aumento considerável nos custos de operação, sendo imprescindível, portanto, a escolha de compostos que satisfaçam às necessidades econômicas e de eficiência. Nesse sentido, a utilização de fontes endógenas de carbono provenientes de etapas anteriores ao pós-tratamento, como por exemplo, o metano, pode apresentar-se como alternativa para a minimização de custos.

Costa *et al.* (2000), Houbroun *et al.* (1999), Rajapakse e Scutt (1999) e Santos (2003), demonstraram a capacidade do metano como agente redutor no processo de desnitrificação.

Os microrganismos capazes de utilizarem metano como fonte de carbono e de energia são denominados metanotróficos. No entanto, de acordo com Knowles (2005), ainda não se tem dados na literatura de que esses organismos possam realizar a desnitrificação diretamente.

Conforme a literatura, o processo de desnitrificação na presença de metano é possível devido à associação sintrófica entre os organismos metanotróficos e os desnitrificantes sob condições aeróbias. Nessas condições o metano é primeiramente oxidado por bactérias metanotróficas aeróbias que liberam compostos orgânicos solúveis no meio que podem ser utilizados como fonte de carbono pelas bactérias desnitrificantes.

Porém, a revisão da literatura sobre o uso de metano como doador de elétrons para a desnitrificação e sobre a diversidade e participação das bactérias metanotróficas envolvidas no processo permite verificar que há aspectos do processo que não estão totalmente esclarecidos e que merecem estudo mais aprofundado.

3.4 Organismos metanotróficos aeróbios

3.4.1 Aspectos gerais

Bactérias metanotróficas são organismos capazes de utilizarem metano como única fonte de carbono e energia e assimilarem, como carbono celular, compostos orgânicos metabolizados a partir do formaldeído (KNOWLES, 2005).

No entanto, conforme Hanson e Hanson (1996), a presença de enzimas conhecidas como, metanomonooxigenase (MMO), responsáveis por catalisarem a oxidação do metano, é a característica que define tais bactérias.

Essas enzimas encontram-se presentes em todos os organismos metanotróficos, podendo se apresentar na forma solúvel (MMOs), ou na forma particulada ligada à membrana (MMOp).

As enzimas MMO são as responsáveis pela ruptura da ligação O–O da molécula de O_2 e, enquanto um dos átomos de oxigênio é reduzido para formar água, o outro é incorporado na molécula de metano para formar o metanol.

A Figura 1 ilustra de maneira resumida as rotas metabólicas de oxidação do metano e assimilação do formaldeído por organismos metanotróficos

Figura 1. Rotas metabólicas da oxidação do metano e assimilação do formaldeído por organismos metanotróficos.

Legenda: MMO-metanomonooxigenase; MDH-metanol desidrogenase; FADH formaldeído desidrogenase; FDH-formato desidrogenase; RMP – Ribulose monofosfato; CH_4 – metano; CH_3OH – metanol; $HCHO$ – formaldeído; $HCOOH$ – ácido fórmico

Fonte: Adaptado de Lidstrom (1992)

Observa-se que a rota para a oxidação do metano apresenta o formaldeído como intermediário comum para as reações de catabolismo e anabolismo destas células. No entanto, devido à baixa especificidade da metanomonooxigenase, estes organismos podem co-metabolizar outros compostos intermediários formados durante o processo, mas que não serão utilizados para o crescimento (HANSON; HANSON, 1996).

Desta forma, para manutenção do co-metabolismo por períodos relativamente longos, é necessária a constante complementação de fontes redutoras para a monooxigenase e carbono para o crescimento celular, caso contrário, o processo pode levar à exaustão das fontes de energia, acúmulo de produtos tóxicos e à interrupção do crescimento microbiano (MALASHENKO *et al.*, 2000).

3.4.2 Assimilação do formaldeído

Como foi apresentada na Figura 1, a oxidação do metano e do metanol pelos organismos metanotróficos leva à formação de formaldeído que será, então, assimilado por essas bactérias e sequencialmente utilizado na biosíntese de material celular.

A síntese de carbono para material celular a partir do formaldeído pode ocorrer por meio de duas rotas, a rota da ribulosemonofosfato (RMP) ou o ciclo da serina.

No ciclo da RMP, são necessários 3 mols de formaldeído para formar o intermediário de três carbonos utilizado na biosíntese celular, enquanto que no ciclo da serina são necessários 2 mols de formaldeído e 1 mol de dióxido de carbono.

As reações globais para a RMP e o ciclo da serina são apresentadas a seguir nas equações (3) e (4) respectivamente.

Como apresentado nas equações 3 e 4, a necessidade energética requerida para a síntese de compostos celulares é maior nos organismos que realizam a síntese via rota serina

do que a via da RMP. Como consequência, de acordo com Madigan (1998), o rendimento celular (gramas de células por mol de metano oxidado) é maior nos organismos do Tipo I.

3.4.3 Classificação dos organismos metanotróficos

Os principais gêneros de organismos metanotróficos, atualmente reportados, são: *Methylomonas sp.*, *Methylobacter sp.*, *Methylococcus sp.*, *Methylocystis sp.* e *Methylosinus sp.* Esta classificação foi proposta por Whittenbury *et al.* (1970),⁶ *apud* (HANSON; HANSON, 1996) e baseou-se nas diferentes morfologias, nas formas apresentadas durante estágio de latência, na estrutura das membranas intracitoplasmáticas e em algumas características fisiológicas.

Os gêneros classificados também são divididos em outros três grupos específicos de acordo com a rota utilizada para a assimilação do formaldeído na biosíntese: (a) metanotróficas do tipo I, rota RMP; (b) metanotróficas do tipo II, ciclo da serina e (c) metanotróficas do tipo X, organismos similares às *Methylococcus capsulatus* (tipo I) que, apesar de utilizarem preferencialmente a rota RMP para a assimilação do formaldeído, possuem baixos níveis de enzimas do ciclo da serina.

A Tabela 3 apresenta as principais características dos organismos metanotróficos do tipo I e tipo II.

⁶ Whittenbury, R.; Phillips, K.C. e Wilkinson, J.G. (1970) Enrichment, isolation and some properties of methane utilizing bacteria. J. Gen. Microbiol. 61: 205-218.

Tabela 3 - Principais características dos organismos metanotróficos do tipo I e tipo II.

Característica	Tipo I	Tipo II
Micrografia eletrônica <i>Diâmetro aproximado - 1µm</i> Fonte. Madigan (1998).	<i>Methylococcus capsulatus</i>	<i>Methylosinus</i>
Gênero	<i>Methylomonas sp.</i> , <i>Methylobacter sp.</i> e <i>Methylococcus sp.</i>	<i>Methylocystis sp.</i> e <i>Methylosinus sp.</i>
Morfologia celular	bacilos curtos, usualmente individuais; cocos ou elipsóides	bacilos “forma crescente”; bacilos, forma de “pêra”, algumas na forma de roseta.
Arranjo de membranas internas	feixe de vesículas discóides distribuídas por toda a célula	sistema de membranas alinhado na parte periférica ao longo de toda a célula
Estágio de latência		
Esporos	não	algumas espécies
Cistos	algumas espécies	algumas espécies
Rota metabólica	ribulose monofosfato	serina
Fixação de nitrogênio	não	sim

Ainda de acordo com Visscher e Cleemput (2003), os organismos do tipo I possuem maior velocidade de crescimento em ambiente onde o nitrogênio inorgânico, como por exemplo, o nitrato, não é limitante, enquanto que, na presença de nitrogênio amoniacal (N-NH_4^+), os organismos do tipo II são favorecidos. (KING; SCHNELL, 1994).

3.4.4 Enzimas metanomonooxigenase (MMO)

Como dito anteriormente, as metanomonooxigenase são as enzimas responsáveis pela oxidação inicial do metano a metanol e se apresentam em duas formas distintas, a forma solúvel (MMOs) e a particulada (MMOp).

Segundo Hanson e Hanson (1996), todas as metanotróficas conhecidas podem produzir a MMOp, enquanto que a capacidade de produzir a MMOs é observada em algumas espécies de metanotróficas dos tipos II e X, como por exemplo *Methylococcus capsulatus* (tipo X), *Methylosinus sporium* e *Methylocystis* sp., ambas do tipo II.

Zahn e DiSpirito (1996), purificaram o complexo enzimático MMOp a partir de *Methylococcus capsulatus* e verificaram que tanto o ferro como o cobre fazem parte do sítio catalítico destas enzimas.

Téllez *et al.* (1998) verificaram que, além da participação do cobre na função enzimática, outra grande parte deste metal encontra-se fracamente ligado ao complexo, cuja função secundária estaria relacionada, por exemplo, com a estabilização da enzima, reserva de cobre e manutenção do estado redox específico.

Nas espécies capazes de produzirem ambas as formas da MMO, a predominância entre a solúvel e a particulada encontra-se associada à concentração de cobre durante o crescimento.

Choi *et al.* (2003) demonstraram em seus estudos que a presença de cobre regula tanto a mudança metabólica entre as duas formas das MMOs como a expressão da MMOp.

De forma geral, encontra-se apresentado na literatura que, sob condições limitantes de cobre, a atividade de oxidação do metano é observada na fração solúvel enquanto que em maiores relações a oxidação passa a ter lugar na estrutura ligada à membrana, a MMOp.

No entanto, os valores para concentração de cobre variam de acordo com o organismo e as condições estudadas.

Mohanty *et al.* (2000) ao estudarem a influência de diferentes metais pesados na oxidação do metano a partir de amostras de solo provenientes de arrozais, verificaram que $20 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{solo}}$ de cobre estimulou a população metanotrófica aumentando, desta forma, a concentração de metano oxidado quando comparada com a concentração nos frascos controles.

⁷Burrows *et al.* (1984) *apud* Bender e Conrad (1995) concluíram que em culturas puras de metanotróficas a MMO ligada à membrana (MMO_p) foi induzida a concentrações de Cu^{2+} de 1 a 5 μM .

Sendo assim, a presença de cobre no ambiente pode ser fundamental no âmbito da competição de organismos semelhantes que ocupam o mesmo nicho.

De acordo com Hanson e Hanson (1996), as células de metanotróficas que possuem ativadas as MMO_p têm maior afinidade com o metano e maior rendimento celular quando comparadas com os organismos que utilizam a MMOs. A razão é que as MMOs usam somente o NADH como agente redutor, enquanto que as MMO_p podem utilizar elétrons provenientes, por exemplo, de álcoois (MALASHENKO *et al.*, 2000).

Contrariamente, em ambiente onde a relação cobre/biomassa não é adequada para ativação da MMO_p dos organismos presentes, a tendência é o predomínio das espécies que apresentem, também, a forma solúvel da enzima.

⁷ Burrows, K. *et al* (1984) Substrate specificities of the soluble and particulate methane mono-oxygenases of *Methylosinus trichosporium* OB3b *Journal of General Microbiology* v. 130, p. 3327-3333

Sendo assim, a síntese de MMOs presente em algumas espécies de metanotróficas, pode ser um mecanismo de sobrevivência em muitos ambientes onde a concentração de cobre é limitada (HANSON; HANSON, 1996).

3.4.5 Fatores ambientais relevantes ao metabolismo metanotrófico

3.4.5.1 pH e temperatura

De acordo com resultados de pesquisas encontrados na literatura, pode-se verificar que os organismos metanotróficos são capazes de crescer em ambientes com diferentes condições de temperatura e pH.

No entanto, conforme Hanson e Hanson (1996), apesar das evidências sobre a possibilidade da presença desses organismos na natureza, em condições distintas de pH e temperatura, a maioria das culturas puras disponíveis é de organismos mesofílicos e neutrófilos.

A Tabela 4 apresenta alguns resultados obtidos em pesquisas realizadas com organismos metanotróficos sob distintas condições ambientais.

Tabela 4. Resultados de pesquisas com organismos metanotróficos sob diferentes condições ambientais.

Referência	Condições ambientais estudadas		Observações
	pH	T (°C)	
Dunfield <i>et al.</i> (1993)	6 a 7	0 a 5 e 25	<ul style="list-style-type: none"> - Maior oxidação de metano a 25 °C. - No intervalo de 0 a 5 °C houve diminuição de 10 a 38 % no consumo de metano com relação ao consumo máximo (25 °C)
Omel'chenko <i>et al</i> (1993)	neutro	3,5; 10 e ≥15	<ul style="list-style-type: none"> - Das três espécies de metanotróficas isoladas, todas cresceram a 3,5 e 10 °C - Crescimento ótimo a 10 °C ou menor. - Uma das espécies não cresceu a temperaturas de 15 °C ou acima.
Bender e Conrad (1995)	4,5 a 8,1	4 e 45	<ul style="list-style-type: none"> - pH ótimo – entre 7,0 e 7,5 - temperatura ótima – entre 25 e 35 °C - Abaixo e acima destes intervalos houve brusca diminuição na velocidade de oxidação de metano
Hanson e Hanson (1996)	< 5,5	-	<ul style="list-style-type: none"> - Não conseguiram êxito nas tentativas de isolamento e enriquecimento.

3.4.5.2 Variações na concentração de oxigênio e metano

A consequência mais citada na literatura com respeito à variação da concentração de oxigênio no meio de cultivo de organismos metanotróficos é a competição entre organismos do tipo I e tipo II

Para verificarem a influência do oxigênio no processo e na predominância de certos tipos de metanotróficas, Amaral e Knowles (1995) utilizaram uma coluna de agarose semi-sólida com difusão de metano e ar em contra corrente.

Os autores identificaram, no topo da coluna, onde havia a maior concentração de oxigênio, predominância de organismos pertencentes ao grupo do tipo I, enquanto que, na parte central, onde a concentração de O₂ era menor, foi possível identificar organismos do tipo II. Os resultados levaram os pesquisadores a associarem a presença de organismos metanotróficos do tipo II a baixas concentrações de oxigênio e elevadas de metano e os do tipo I a altas concentrações de oxigênio e baixas de metano.

Graham *et al.* (1993), ao estudarem a competitividade entre *Methylosinus trichosporium* OB3b, bactéria metanotrófica do tipo II, e *Methylobacterium* BG8I, metanotrófica do tipo I, em reator de fluxo contínuo, observaram a necessidade de se manter, com ar, concentrações de oxigênio inferiores a 30 % de saturação para a predominância da *Methylosinus trichosporium* OB3b sob condições limitantes de nitrogênio inorgânico.

Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Bussmann *et al.* (2003), que, visando a aperfeiçoar a atmosfera de incubação para organismos metanotróficos do tipo II, obtiveram melhores resultados de incubação quando a relação de mistura de O₂ e CO₂ foi da ordem de 17 % e 3 % . No entanto, variações nas concentrações de metano (6 a 32 % na mistura) não surtiram efeito sobre os organismos estudados.

Situação diferente foi constatada por Pawlowska e Stepniewski (2006), que, a partir de ensaios para obtenção de parâmetros cinéticos da oxidação do metano, constataram que o aumento da sua concentração no ar (de 2 para 16 % v/v) aumentou em aproximadamente 2,3 vezes a atividade dos organismos metanotróficos.

No entanto, para o trabalho em questão, as concentrações de oxigênio e metano deverão ser específicas para sustentar o metabolismo metanotrófico, além de permitir a manutenção do processo de desnitrificação.

Sendo assim, uma revisão mais detalhada sob o ponto de vista da associação sintrófica destes organismos com organismos desnitrificantes será abordada mais adiante.

3.4.5.3 Efeito inibitório do sulfato e cloreto na oxidação do metano

O efeito inibitório dos íons sulfato (SO_4^{2-}) e cloreto (Cl^-) na atividade dos organismos metanotróficos presentes em solos foi reportado na literatura (KING; SCHNELL, 1994; KING; SCHNELL, 1998; VISSCHER; CLEEMPUT, 2003) como uma possível causa na diminuição da taxa de oxidação do metano, sob certas condições.

King e Schnell (1998), apesar de atribuírem maior parte do efeito inibitório ao fenômeno de dessorção de N-NH_4^+ , não afastam a hipótese de o cloreto possuir efeito inibitório tóxico extrínseco.

Visscher e Cleemput (2003), em seus ensaios para determinar a influência do sulfato (170 mg.L^{-1}) e cloreto (126 mg.L^{-1}) na comunidade metanotrófica presente em amostras de solo, não observaram efeito inibitório do sulfato. No entanto, a inibição pelo cloreto na presença de altas concentrações de metano (entre 50 e $250 \mu\text{L.L}^{-1}$) foi verificada depois de 20 a 30 dias de incubação, alcançando um efeito inibitório de até 50 % (quando comparado com os controles) depois de 60 dias incubação.

Esses resultados levaram os autores a concluir que os organismos do tipo II foram mais sensíveis à presença do cloreto que os do tipo I sob as condições testadas.

Bussmann *et al.* (2004), ao estudarem diferentes condições nutricionais para desenvolver um meio de cultura mais eficiente para o crescimento de organismos metanotróficos, observaram inibição no crescimento microbiano para concentrações de sulfato superiores a 1 mM (96 mg.L^{-1}).

3.5 Aspectos importantes na integração dos processos de nitrificação e desnitrificação em reator operado em batelada seqüencial tendo metano como fonte de carbono na etapa desnitrificante

3.5.1 Aspectos gerais

A integração dos processos de nitrificação e desnitrificação biológica em um único reator, neste caso, um reator operado em bateladas seqüenciais, pode ser possível quando o processo é realizado sob condição de aeração intermitente.

Esse sistema permite o estabelecimento da nitrificação biológica durante a etapa de aeração e, posteriormente, após a interrupção do fornecimento de ar, ocasionando a diminuição da concentração de oxigênio dissolvido, dá-se início à fase anóxica propiciando que ocorra a desnitrificação.

Adicionalmente, o processo de desnitrificação, quando associado à atividade de organismos metanotróficos, tem se mostrado atraente devido à possibilidade de diminuições nos custos relacionadas, principalmente, à suplementação de fonte de carbono necessário para o crescimento dos organismos desnitrificantes (COSTA *et al.*, 2000; HOUBRON *et al.*, 1999; RAJAPAKSE; SCUTT, 1999; WAKI *et al.*, 2005).

Apesar de haver evidências da capacidade dos organismos metanotróficos atuarem na oxidação do N-NH_4^+ podendo produzir óxidos nítrico e nitroso durante este processo (nitrificação), tais organismos não podem atuar diretamente no processo de desnitrificação (EISENTRAEGER *et al.*, 2001).

Contudo, as bactérias metanotróficas podem fornecer carbono extracelular e substratos energéticos, incluindo metanol, que podem suportar o crescimento e atividade das bactérias desnitrificantes (KNOWLES, 2005).

Ainda, a partir do consumo do oxigênio pelas metanotróficas, obtém-se um microambiente favorável à desnitrificação, realizado pelas bactérias desnitrificantes (KNOWLES, 2005; THALASSO *et al.*, 1997).

Dessa forma, acredita-se que a desnitrificação possa ser realizada a partir de associações sintróficas entre bactérias desnitrificantes e metanotróficas.

3.5.2 Fatores relevantes ao processo

3.5.2.1 Concentração de oxigênio dissolvido (OD)

Provavelmente, o parâmetro mais importante e complexo a ser controlado no sistema quando o processo tem por objetivo a nitrificação e desnitrificação, mediada por organismos metanotróficos em um mesmo reator, é a escolha de uma adequada concentração de oxigênio dissolvido a ser disponibilizado no meio.

Em uma primeira etapa, a concentração de oxigênio deve ser suficiente para promover a nitrificação autótrofa enquanto que, na etapa seguinte, essa concentração deve ser suficiente para permitir o crescimento dos organismos metanotróficos, sem, no entanto, inibir o metabolismo das desnitrificantes.

A Tabela 5 apresenta alguns valores de concentração de oxigênio utilizados em ensaios que visaram à remoção de nitrato associada à oxidação do metano.

Tabela 5 - Valores de concentrações de oxigênio dissolvido utilizadas em ensaios para desnitrificação associada a organismos metanotróficos.

Referência	Concentração de Oxigênio (mg.L ⁻¹)
Werner e Kayser (1991)	< 1
Houbron <i>et al.</i> (1999)	< 1
Lee <i>et al.</i> (2001)	1 a 2,5
Waki <i>et al.</i> (2004)	< 0,31

No entanto, a desnitrificação associada à oxidação anóxica do metano (na ausência de oxigênio molecular) também é reportada na literatura.

As reações para esse processo, tendo nitrato e nitrito como os receptores de elétrons, conforme Raghoebarsing *et al.* (2006), são apresentadas nas equações 5 e 6, respectivamente.

Islas-Lima *et al.* (2004) estudaram a redução dissimilativa do nitrato na presença de metano sob condições anóxicas. A máxima velocidade de desnitrificação obtida foi da ordem de $0,25 \text{ g N-NO}_3^- \text{ g SSV}^{-1} \text{ d}^{-1}$ para pressões parciais de metano iguais ou superiores a 8,8 kPa, enquanto que, para pressões inferiores, a velocidade foi de $4,9 \times 10^{-3} \text{ g N-NO}_3^- \text{ g SSV}^{-1} \text{ d}^{-1}$, o que levou os pesquisadores a concluir que a remoção de nitrato foi dependente da disponibilidade de doador de elétrons no sistema.

Raghoebarsing *et al.* (2006) purificaram e identificaram um consórcio microbiano capaz de oxidar metano a dióxido de carbono e promover a desnitrificação do nitrato e nitrito sob condições anaeróbicas. O consórcio era constituído por dois microrganismos: uma bactéria não cultivada e uma arqueia, esta última remotamente relacionada com arqueias metanotróficas marinhas.

Os resultados obtidos revelaram que o nitrito foi utilizado, preferencialmente, como o receptor de elétrons com velocidade total de desnitrificação da ordem de $28,8 \pm 2 \mu\text{mol N}_2 \text{ h}^{-1}$ e taxa de oxidação de metano de $13,4 \pm 1 \mu\text{mol CH}_4 \text{ h}^{-1}$.

3.5.2.2 Concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH_4^+)

A interferência do N-NH_4^+ na oxidação do metano por organismos metanotróficos tem sido questionada na literatura (BENDER; CONRAD, 1995; BYKOVA *et al.*, 2007; KING;

SCHNELL, 1994; LEE *et al.*, 2001; WAKI *et al.*, 2002) devido, principalmente, à similaridade metabólica entre os organismos metanotróficos e os oxidantes de amônia, assim como entre suas enzimas as metanomonooxigenases (MMOs e MMOp) e a enzima responsável pela oxidação da amônia, a amôniamonooxigenase (AMO).

Tais similaridades podem levar à competição destes organismos pelo oxigênio dissolvido no meio (LEE *et al.*, 2001), ou à formação de compostos inibitórios como, por exemplo, o nitrito (KING; SCHNELL, 1998; WAKI *et al.*, 2002)

A competição pelo oxigênio dá-se devido ao fato de as MMO das metanotróficas também serem capazes de catalisarem a oxidação do N-NH_4^+ e vice-versa, ou seja, as oxidantes de amônia podem oxidar o metano.

Um dos resultados mais discutidos é a diminuição na velocidade de consumo de metano pelos organismos metanotróficos.

Bender e Conrad (1995), estudando a influência da concentração de N-NH_4^+ nas taxas de consumo de metano, em diferentes tipos de solo, observaram que concentrações deste íon entre 10 a 60 mM e atmosfera de $0,1 \text{ mL.CH}_4.\text{L}^{-1}$ estimularam o processo, enquanto que concentrações maiores o inibiram.

King e Schnell (1994), ao estudarem a taxa de consumo de metano em culturas puras de *Methylobacter albus* BG8 (metanotrófica tipo I) e *Methylosinus trichosporium* OB3b (metanotrófica tipo II) na presença de N-NH_4^+ (200 μM e 2000 μM) e atmosfera de $1,7$ à $100 \text{ mL.CH}_4.\text{L}^{-1}$, observaram diminuições de aproximadamente 40 % e 80 %, respectivamente, nas taxas de consumo de metano, quando comparadas com o controle, em ambas as culturas.

No entanto, segundo King e Schnell (1994), a inibição pelo N-NH_4^+ não se restringe somente à competição pelo substrato em nível das MMO, mas sim, a um efeito conjunto deste com a formação de metabólitos intermediários da sua oxidação, como por exemplo, a hidroxilamina e o nitrito.

Os autores defendem essa hipótese devido aos resultados obtidos em seus ensaios com 500 μM de N-NH_4^+ e diferentes concentrações de metano no *headspace*.

Eles verificaram que a inibição nas velocidades de oxidação do metano aumentou progressivamente com o aumento da concentração deste substrato (1,7 a 100 ppm); no entanto, essa relação não teve um comportamento linear.

Para concentrações na faixa de 250 a 1000 ppm, a inibição foi diminuindo, provavelmente, devido à diminuição na ligação entre o N-NH_4^+ e as MMO e, conseqüentemente, à diminuição dos metabólitos tóxicos da oxidação deste redutor

3.5.2.3 Acúmulo de nitrito

Apesar de o nitrito, sob certas circunstâncias, ter apresentado efeito inibitório no processo de oxidação do metano em culturas puras de metanotróficas (KING; SCHNELL, 1994) e em culturas provenientes de diferentes tipos de solo (DUNFIELD; KNOWLES, 1995; WHALEN, 2000), acredita-se que esse efeito possa diminuir ou até mesmo cessar, quando o processo metanotrófico for associado à desnitrificação.

Essa hipótese baseia-se nas observações de Yoo *et al.* (1999), com relação à desnitrificação via nitrito. Os autores atestam um aumento de até 63 % nas velocidades de desnitrificação via nitrito quando comparadas com as velocidades via nitrato.

Desta forma, o nitrito, se formado na etapa aeróbia, poderia ser rapidamente consumido pelos organismos desnitrificantes sem afetar, significativamente, os organismos metanotróficos.

Waki *et al* (2002), em ensaios com reatores metanotrófico/desnitrificante alimentados com nitrito (200 mg.L^{-1}) e, posteriormente, com nitrito e N-NH_4^+ (nas concentrações de 100

mg.L⁻¹ cada), não verificaram efeito inibitório em nenhum dos casos nas temperaturas de 20 e 35 °C e pressão parcial de 0,16 atm de metano e 0,12 atm de oxigênio.

O efeito inibitório do nitrito somente foi verificado quando os ensaios foram realizados à temperatura de 10 °C.

3.6 Considerações finais

A revisão da literatura permitiu constatar que a maioria das pesquisas sobre desnitrificação biológica associada ao metabolismo metanotrófico foi desenvolvida com o intuito de elucidar aspectos fundamentais da microbiologia e da bioquímica do processo.

Os ensaios relatados e discutidos na maioria dos artigos pesquisados sobre o uso de metano como doador de elétrons para a desnitrificação foram realizados em recipientes com pequena capacidade volumétrica, assim como sob condições nutricionais específicas, de maneira a favorecer o enriquecimento de culturas metanotróficas. Pesquisas em reatores biológicos visando à aplicação do processo são incipientes na literatura consultada.

Devido a isso, a remoção de nitrogênio de águas residuárias, tanto industriais quanto domésticas, a partir da associação sintrófica de organismos metanotróficos e desnitrificantes, ainda apresenta muitos aspectos a serem esclarecidos.

Entre os aspectos que merecem especial atenção pode-se citar: (a) viabilidade do processo quando este é conduzido em reatores de maiores escala; (b) configuração do reator; (c) condições operacionais e nutricionais mais adequadas; (d) possibilidade de competição pelo substrato por organismos pertencentes a um mesmo nicho; (e) possíveis efeitos inibitórios de compostos, normalmente, presentes nos efluentes domésticos ou industriais.

É importante salientar que a compreensão destes fatores é de extrema importância para o desenvolvimento de tecnologia de remoção de nitrogênio de águas residuárias, baseada no uso de metano como doador de elétrons para a desnitrificação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos gerais

Durante a etapa experimental foram estudadas diferentes condições operacionais e nutricionais de maneira a se obter maior eficiência de remoção de nitrogênio, o que resultou no total de seis etapas distintas.

As condições operacionais testadas nas etapas 1 a 4 foram: (a) células em suspensão, (b) células imobilizadas e (c) variação nos períodos aeróbios e anóxicos, visando a se obter a nitrificação e a desnitrificação em um único reator.

As etapas 5 e 6 enfocaram somente o processo de desnitrificação na ausência de oxigênio molecular tendo como aceptores de elétrons o nitrato e, posteriormente, o nitrito.

Cabe aclarar que as etapas foram estudadas separadamente e de forma consecutiva. As alterações realizadas tanto na parte operacional, quanto nutricional do sistema, basearam-se nos resultados físico-químicos e microbiológicos obtidos durante cada etapa operacional.

A Figura 2 apresenta, de forma simplificada, as diferentes condições operacionais e nutricionais estudadas.

Figura 2. Esquema experimental das condições operacionais e nutricionais testadas em laboratório
Abreviaturas: STV – sólidos totais voláteis; SVA – sólidos voláteis aderido

Na Tabela 6 são apresentados os tempos de operação de cada etapa.

Tabela 6 - Tempo de operação em cada etapa.

Etapa	*T.O (dias)	Observações
1 (A e B)	120	Nos primeiros 20 dias, foram adotados ciclos aeróbio e anóxico de aproximadamente 11,5 h cada, respiração de 0,5 h e sedimentação de 0,5 h.
2	50	Depois dos 10 primeiros dias, o tempo de sedimentação foi aumentado para 40 minutos.
3	100	Nos primeiros 30 dias, o sistema foi operado somente sob condições aeróbias. Foram adotados 4 ciclos de 6 h cada.
4	30	-
5	120	-
6	120	-

*Tempo aproximado de operação

4.2 Instalação experimental

Na Figura 3, encontra-se apresentado o esquema do sistema que foi utilizado para desenvolvimento da parte experimental.

Figura 3 - Esquema do sistema utilizado para desenvolvimento da parte experimental.

O reator (1) foi construído em acrílico com área superficial de 78 cm^2 e altura de coluna líquida de 20 cm, totalizando volume de aproximadamente 1,6 L.

Para melhorar a transferência de massa entre a fase líquida (meio) e gasosa (oxigênio (ar)/metano) aumentando, desta forma, a solubilização destes gases no meio líquido, foram utilizados dois compressores de ar (2) conectados a válvulas na parte superior do reator (3). Ar, na vazão média de 109 L.h^{-1} , era introduzido diretamente no meio líquido pelo fundo do reator através de difusores (4). O compressor utilizado para o metano, que fornecia a vazão média 144 L. h^{-1} , foi adaptado de maneira que o gás era circulado do *headspace* para o meio líquido e, igualmente, introduzido no fundo do reator através de difusores. Desta forma, o sistema pôde funcionar fechado para a atmosfera durante o período anóxico.

Para injeção de metano no reator e vedação do sistema durante o período anóxico, foram utilizadas válvulas solenóides específicas para gás (5) (somente uma encontra-se visível

no esquema apresentado na Figura 3). A vazão deste gás no reator foi de aproximadamente $3,84 \text{ L min}^{-1}$.

Nas etapas 1 a 4, o metano era injetado uma única vez, por 3 minutos, no início de cada ciclo anóxico. Nas etapas 5 e 6, esse gás passou a ser injetado no reator a cada três horas.

Um agitador magnético (6) foi utilizado para melhorar a mistura no reator.

As operações de enchimento e esvaziamento foram executadas por meio de duas bombas tipo pistão (7).

A medida de oxigênio foi realizada no próprio reator, utilizando-se um oxímetro portátil (8). Na sua parte superior, o reator era provido de um septo (9) para retirada de amostra gasosa do *headspace*.

As operações de abertura e fechamento de válvulas, assim como o acionamento de bombas, foram comandadas por *timers*.

Todo o sistema foi mantido dentro de uma câmara climatizada a 30°C .

Nas etapas 5 e 6, em que o sistema operou na ausência de oxigênio, o compressor utilizado para circulação de metano foi substituído por um submerso alocado no fundo do reator com vazão de recirculação de 90 L.h^{-1} .

Na Figura 4, é apresentada uma foto do sistema utilizado para a parte experimental.

Figura 4 - Foto do sistema utilizado para desenvolvimento da parte experimental
 – (1) Reator, (2) agitador magnético, (3) oxímetro portátil, (4) válvula solenóide para injeção de metano, (5) bombas para enchimento e descarga, (6) compressores de ar.

4.3 Substrato sintético

4.3.1 Etapa 1

A primeira etapa do trabalho foi desenvolvida em duas fases: (A) - aproximadamente os 50 primeiros dias de operação e (B) – até o final da etapa 1.

A diferença entre cada fase foi, basicamente, a composição da solução de metais.

Nas Tabelas 7 e 8, encontram-se detalhadas as características dos substratos sintéticos (simulando afluente de reator anaeróbio) utilizados na etapa 1 (fases A e B).

No caso específico da solução de metais, foram adicionados 5 mL de solução concentrada para cada litro de substrato.

Tabela 7 - Composição do substrato sintético utilizado nas fases A e B.

Composto	¹ Concentração (mg.L ⁻¹)
NH ₄ Cl	40,0 (N-NH ₄ ⁺)
KH ₂ PO ₄	18 (PO ₄ ³⁻)
Na ₂ S	7,0 (S-S ²⁻)
NaHCO ₃	800

¹ Concentração esperada no reator

Tabela 8 - Solução de metais I adicionada ao substrato sintético durante etapa 1 (fase A).

Composto	¹ Concentração (mg.L ⁻¹)
FeCl ₂ .6H ₂ O	0,235 (Fe)
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,017 (Mn)
NiCl ₂ .6H ₂ O	0,012 (Ni)
CrCl ₃ .6H ₂ O	0.02 (Cr)

Fonte: Adaptado de Passig e Campos (2004)

¹ Concentração esperada no reator

Tabela 9. Solução de metais II adicionada ao substrato sintético etapa 1 (fase B).

Composto	¹ Concentração
FeCl ₂ .6H ₂ O	0,269 mg.L ⁻¹ (Fe)
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,03 mg.L ⁻¹ (Mn)
NiCl ₂ . 6H ₂ O	0,02 mg.L ⁻¹ (Ni)
CuCl ₂ .2H ₂ O	16 µg.L ⁻¹ (Cu)
H ₃ BO ₃	10 µg.L ⁻¹ (H ₃ BO ₃)
NaMoO ₄ .2H ₂ O	13 µg.L ⁻¹ (Mo)
CaCl ₂ .2H ₂ O	5,4 mg.L ⁻¹ (Ca)
MgCl.6H ₂ O	24 mg.L ⁻¹ (Mg)
CoCl ₂ .6H ₂ O	50 µg.L ⁻¹ (Co)
Ácidonitroloacético (NTA)	12,8 mg.L ⁻¹ (NTA)

Fonte. EISENTRAEGER *et al.*(2001)

¹ Concentração esperada no reator

4.3.2 Etapa 2

A composição do substrato sintético utilizado nesta etapa encontra-se apresentada na Tabela 10.

Tabela 10 - Composição do substrato sintético utilizado na etapa 2

Composto	^{1,2} Concentração
NH ₄ Cl	40 (N-NH ₄ ⁺)
KH ₂ PO ₄	18 (PO ₄ ³⁻)
Na ₂ S	7 (S-S ²⁻)
NaHCO ₃	800
Sol. metais (II)	5 mL.L ⁻¹
Sol. ácidos orgânicos	5 mL.L ⁻¹

¹ As unidades não especificadas encontram-se em mg.L⁻¹

² Concentração esperada no reator

A solução concentrada de ácidos, cuja composição se encontra detalhada na Tabela 11, foi preparada com sais de ácidos orgânicos. Alíquotas de 25 mL eram armazenadas em congelador e descongeladas no ato da preparação do substrato.

Tabela 11 - Composição da solução de sais de ácidos orgânicos, utilizada etapa 2.

Composto	¹ Concentração (mg.L ⁻¹)
Acetato de sódio	25 (acetato)
Propionato de sódio	15 (propionato)
Butirato de sódio	10 (butirato)

¹ Concentração esperada no reator

4.3.3 Etapas 3 e 4

O substrato utilizado para ambas as etapas foi o mesmo e sua composição encontra-se detalhada na Tabela 12.

Tabela 12 - Composição do substrato sintético utilizado nas etapas 3 e 4.

Composto	¹ Concentração (mg.L ⁻¹)
NH ₄ Cl	40 (N-NH ₄ ⁺)
KH ₂ PO ₄	18 (PO ₄ ³⁻)
Na ₂ S	7 (S-S ²⁻)
NaHCO ₃	500
Levedura	10
Solução metais (II)	5 mL.L ⁻¹

¹ Concentração esperada no reator

4.3.4. Etapas 5 e 6

Na Tabela 13 encontram-se apresentadas as características dos substratos utilizados. Note-se que a única diferença entre essas etapas foi a substituição do nitrato de potássio (KNO₃) utilizado na etapa 5 pelo nitrito de sódio (NaNO₂) na etapa 6.

Tabela 13 - Composição do substrato sintético utilizado nas etapas 5 e 6.

Composto	¹ Concentração (mg.L ⁻¹)
KNO ₃ /NaNO ₂	40 (N-NO _x ⁻)
KH ₂ PO ₄	18 (PO ₄ ³⁻)
Na ₂ SO ₄	7 (S-SO ₄ ²⁻)
NaHCO ₃	100
Extrato de levedura	10
Solução metais (II)	5 mL.L ⁻¹

1-Concentração esperado no reator

4.4 Inóculo

4.4.1. Etapas 1 (fases A e B) e 2

Na fase A da etapa 1, o reator foi inoculado com dois lodos de origens distintas, sendo uma parte do inóculo proveniente do reator UASB da avícola Dacar, situada na cidade de Tietê – SP, e outra parte proveniente do tanque de aeração do sistema de lodos ativados empregado para o tratamento de águas residuárias domésticas da fábrica de motores da Volkswagen, situada na cidade de São Carlos. O objetivo desta operação foi o de tentar garantir maior diversidade microbiana, de maneira a atender às necessidades do processo proposto.

No entanto, ao se iniciar a fase B, foi preciso aumentar a concentração de lodo no reator. Neste caso, optou-se pelo lodo anaeróbio devido à sua maior concentração de sólidos voláteis e grande diversidade microbiana.

No início da etapa 2, como também foi preciso aumentar a concentração de lodo no reator o material escolhido também foi o anaeróbio devido às mesmas razões apresentadas anteriormente.

4.4.2. Etapa 3 a 6

Na etapa 3 também foi utilizado o lodo anaeróbio proveniente do abatedouro de aves Dacar Industrial S/A. No entanto, para as demais não foi feita nova inoculação do sistema. A biomassa utilizada foi mantida durante todas as etapas alterando-se somente as condições de operação do reator.

O material utilizado para meio suporte foi espuma de poliuretano com densidade de 20 kg.m^{-3} e na forma de cubos de 5 mm de lado, aproximadamente (ver foto apresentada na Figura 5).

Figura 5. Foto da espuma de poliuretano utilizada como meio suporte no reator.

Foram utilizados cerca de 7g de espuma que ocuparam aproximadamente 5 cm do reator.

Para a imobilização do inóculo nas espumas, utilizou-se método proposto por Zaiat *et al.* (1994), que consiste em misturar uniformemente, em um recipiente, as espumas com o lodo e em seguida deixá-las submersas por 2 horas. Decorrido esse tempo, as matrizes são peneiradas para eliminar o excesso de lodo e transferidas para o reator.

Como o lodo anaeróbio se apresentava na forma de grânulos, procedeu-se à sua desintegração em liquidificador doméstico e a massa homogeneizada foi utilizada para a imobilização nas espumas.

4.5 Controle Operacional

Os parâmetros analisados durante a fase experimental, assim como as metodologias, encontram-se apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Parâmetros e metodologias de análise

Parâmetro/Unidade	Metodologia	² Referência
pH	Potenciométrico	-
Alcalinidade (mg CaCO ₃ .L ⁻¹)	Titulométrico	2320 B
N-NH ₄ ⁺ (mgN.L ⁻¹)	Método do Fenato ¹ (FIA) e destilação/titulométrico	4500 NH ₃ G e 4500 NH ₃ B/ 4500 NH ₃ C
N-NO ₂ ⁻ (mgN.L ⁻¹)	Colorimétrico (FIA) e Colorimétrico	4500 NO ₃ ⁻ I e 4500 NO ₂ ⁻ B
N-NO ₃ ⁻ (mgN.L ⁻¹)	Método de redução por cádmio (FIA) e Espectrofotométrico UV	4500 NO ₃ ⁻ I / 4500 NO ₃ ⁻ B
ST (mg.L ⁻¹)	Gravimétrico	2540 B
STF (mg.L ⁻¹))	Gravimétrico	2540 E
STV(mg.L ⁻¹)	Gravimétrico	2540 E
S-SO ₄ ⁻² (mg.L ⁻¹)	Turbidimétrico	4500 - SO ₄ ⁻² E
O ₂ dissolvido (mg.L ⁻¹)	Potenciométrico	-

¹ Análise por injeção de fluxo

² Todas as análises com referência especificada foram realizadas de acordo com técnicas descritas no Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater (1995).

Para a obtenção das variações temporais das concentrações de nitrato (N-NO₃⁻), nitrito (N-NO₂⁻) e nitrogênio amoniacal (N-NH₄⁺), foi utilizada a metodologia de análise por injeção de fluxo (FIA) por permitir a utilização de menores volumes de amostras.

Algumas análises complementares foram realizadas ao longo do período, cujas metodologias encontram-se descritas a seguir.

a. Determinação de metano (CH₄)

Metano foi determinado por meio de cromatografia gasosa utilizando-se cromatógrafo gasoso (Gow-Mac), com detector de condutividade térmica, coluna Porapak Q de 2 m de comprimento e 1/4" de diâmetro. A temperatura do forno durante a análise foi de 50°C e o gás de arraste foi hidrogênio (60 mL.min⁻¹).

As curvas de calibração foram realizadas, em média, a cada seis meses.

b. Sólidos aderidos nas espumas (etapas 3 a 6)

Para a determinação dos sólidos aderidos nas espumas, foram retiradas amostras de espumas do reator, transferidas para um tubo falcon (15 mL) e os sólidos removidos com o auxílio de um bastão de vidro e água destilada.

O volume de enxágüe foi transferido para cápsulas de porcelana e o procedimento se repetiu até que as mesmas se apresentassem visivelmente limpas.

A determinação dos sólidos foi feita de acordo com Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater (1995).

A determinação da massa das espumas foi feita após a secagem das mesmas em estufa a 100 °C.

c. Medida da atividade desnitrificante

A técnica de inibição da redução enzimática do N_2O a N_2 pelo acetileno, descrita por Tiedje (1982), tem se mostrado eficiente para verificar a capacidade desnitrificante de um inóculo.

Neste caso, após a adição do acetileno, o N_2O acumulado pode ser medido por meio de cromatografia gasosa.

No entanto, de acordo com Hanson e Hanson (1996), o acetileno também é capaz de inibir a metanomonooxigenase (MMO), resultando, portanto, na incapacidade dos organismos metanotróficos de oxidarem o metano.

Para o trabalho em questão, a hipótese levantada foi a de que, através da inibição da MMO, o metano não seria oxidado a metanol, resultando, portanto, na carência de substrato orgânico para as desnitrificantes, o que implicaria na ausência de N_2O no meio.

O ensaio para verificar a atividade desnitrificante do lodo utilizado no experimento foi realizado em três diferentes etapas: no final da etapa 4, quando o lodo estava adaptado à presença de oxigênio molecular no meio reacional durante a etapa desnitrificante; no final das

etapas 5 e 6, quando a biomassa estava adaptada a ciclos anóxicos na ausência de oxigênio molecular, porém na presença de diferentes receptores de elétrons, nitrato e nitrito, respectivamente.

O material e procedimento utilizados encontram-se descrito a seguir:

- Reatores

Para realização do ensaio foram utilizados como reatores frascos de antibióticos com capacidade volumétrica aproximada de 100 mL.

Como os ensaios eram realizados em diferentes condições e em triplicata, os frascos foram padronizados com pérolas de vidro para minimizar a diferença entre os volumes dos *headspaces* dos mesmos.

- Meio de cultura

Com exceção da concentração dos sais de nitrogênio, o meio de cultura utilizado teve a mesma composição que a do substrato sintético apresentado anteriormente na Tabela 13.

Para os ensaios realizados com nitrato, utilizou-se 1 g.L⁻¹ de KNO₃ enquanto que nos ensaios com nitrito utilizou-se 0,84 g.L⁻¹ de NaNO₂.

As concentrações de nitrato e nitrito tiveram que ser maiores que as utilizadas no reator, pois conforme Tiedje (1982), estes não podem ser fatores limitantes no ensaio.

- Inóculo

Como esses ensaios foram realizados somente a partir da terceira etapa, os reatores foram inoculados com amostras de espumas colonizadas provenientes do reator (total de 42 espumas)

Optou-se em não extrair o inóculo da espuma para garantir a integridade e diversidade do mesmo.

- Fonte de carbono orgânico

Metano 99,5% de pureza (o mesmo utilizado no reator)

- *Condições estudadas*

Na Tabela 15 encontram-se apresentadas as características das condições testadas conforme a etapa.

Tabela 15 - Condições analisadas nos ensaios de atividade desnitrificantes

Etapa	Condição	Inóculo	Metano	O ₂ (puro)	Acetileno
4	I	sim	sim	sim	sim
	II	sim	sim	não	sim
5	-	sim	sim	não	sim
6	-	sim	sim	não	sim
Todas	Controle	sim	não	não	sim

Nesses ensaios os reatores controles foram incubados para verificar a desnitrificação sustentada por material endógeno.

- *Procedimento*

- i. Depois de preparado, o substrato sintético era dividido em duas partes; uma para inocular os reatores desnitrificantes e outra para inocular os reatores controles.
- ii. No substrato utilizado nos reatores desnitrificantes, borbulhava-se metano através de uma pedra porosa, por aproximadamente 20 minutos. Em seguida, cada reator recebia 60 mL desse substrato.
- iii. Os reatores eram lacrados e submetidos por 3 minutos a um fluxo de metano de 1,3 L.min⁻¹ para troca de atmosfera
- iv. Os reatores que recebiam oxigênio tinham 15 % do volume do seu *headspace* substituído por este gás.
- v. Nos reatores controles, o substrato e os *headspaces* não recebiam metano nem oxigênio, e a atmosfera era substituída por nitrogênio.

- vi. 10 % da atmosfera dos *headspaces* era substituída por acetileno (inclusive nos controles).
- vii. Alíquotas de 1 mL da fase gasosa dos reatores eram retiradas ao longo do tempo para determinação do N₂O acumulado.
- viii. As determinações de N₂O foram realizadas por técnica de cromatografia gasosa e para sua quantificação foi feita uma curva de calibração a partir de volumes conhecidos deste gás. Para cada etapa analisada foi elaborada nova curva de calibração.
- ix. O cromatógrafo utilizado para determinação do N₂O foi o mesmo utilizado para determinação de metano, porém a temperatura do forno durante a análise foi de 30 °C.

d. Ácidos Voláteis

As análises de ácidos voláteis foram realizadas de acordo com metodologia proposta por Adorno *et al.* (2006), que se baseia na extração dos mesmos com éter seguido por análise por cromatografia gasosa.

O equipamento utilizado foi um cromatógrafo gasoso HP 6890 equipado com detector de ionização de chama e coluna HP – INNOWAX – 30 m x 0,25 mm (diâmetro interno) x 0,25 µm (espessura de filme).

e. Metanol

Para análise de metanol, alíquotas de 12 mL eram retiradas do reator durante os períodos anóxicos e transferidas para frascos de antibióticos com capacidade volumétrica de 20 mL e, logo após serem lacrados, tais recipientes eram submetidos ao ultra-som por dez minutos para liberação do metanol solubilizado.

Em seguida, 1 mL de amostra do *headspace* desses frascos era retirada e analisada por cromatografia gasosa.

O tempo de duração do ensaio foi estabelecido de acordo com o período da etapa anóxica aplicado no reator

O equipamento utilizado foi o mesmo cromatógrafo gasoso utilizado para a determinação de ácidos voláteis desta mesma seção.

f. Concentração de oxigênio dissolvido

A concentração de oxigênio dissolvido foi determinada diretamente no reator por meio de oxímetro portátil ORION® modelo 810 A.

No período anóxico das etapas 1 a 4, não foi utilizado nenhum procedimento para manter a concentração em níveis constantes, visto que a intenção deste trabalho foi a de promover o processo de desnitrificação com a quantidade de oxigênio resultante da nitrificação.

g. Concentração de amônia livre

A concentração de amônia livre foi estimada em função da concentração de nitrogênio amoniacal ($N-NH_4^+$), pH e temperatura, aplicando-se a equação (7) apresentada por ⁸Anthonisen (1976) *apud* Çeçen (1996).

$$N - NH_3 = (mg.L^{-1}) = \frac{17}{14} * \frac{N - amoniacal * 10^{pH}}{e^{(6344 / (273 + T))} + 10^{pH}} \quad (7)$$

Sendo:

$N-NH_3$ = concentração de amônia livre, na forma de nitrogênio.

T = temperatura (°C).

⁸ ANTHONISEN, A.C. *et al.* (1976) Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Journal WPCF*, v.48, n.5, p.835-852

h. Concentração de ácido nitroso

A concentração de ácido nitroso foi calculada a partir da equação apresentada por ⁶Anthonisen (1976) *apud* Çeçen (1996), (equação 8), que leva em consideração a concentração de nitrito, pH e temperatura.

$$HNO_2(mg.L^{-1}) = \frac{46}{14} * \frac{N - Nitrito}{e^{(-2300/(273+T))} * 10^{pH}} \quad (8)$$

Sendo

HNO_2 = concentração de ácido nitroso na forma de nitrogênio.

T = temperatura (°C).

4.6 Amostragem

4.6.1 Etapas 1 e 2

Nas etapas em que o reator foi operado com sólidos em suspensão, a amostragem do afluente, efluentes aeróbio e anóxico seguiram o procedimento descrito a seguir:

- Afluente

Após o enchimento e homogeneização do meio, a aeração era desligada por aproximadamente 2 minutos para sedimentação do lodo abaixo do nível de coleta.

- Efluente aeróbio

As amostras eram coletadas no final do tempo destinado à respiração

- Efluente anóxico

A coleta foi feita durante o descarte do efluente.

Em todos os casos, depois de coletadas, as amostras eram centrifugadas por 5 minutos à velocidade rotacional de 2.500 rpm.

4.6.2 Etapas 3 a 6

Nas etapas em que se trabalhou com material imobilizado, foi adotado o mesmo procedimento de coleta, no entanto, não houve a necessidade da centrifugação das mesmas.

4.7 Influências do sulfato e cloreto na cinética de desnitrificação associada a organismos metanotróficos.

Como o substrato sintético utilizado para alimentar o reator era preparado a partir de sais de cloreto, o presente ensaio foi realizado com o intuito de averiguar se os organismos presentes no reator em operação eram suscetíveis às concentrações de cloreto utilizadas no preparo do substrato.

Já os ensaios com sulfato foram realizados para verificar a possibilidade em se mudar a fonte de nitrogênio inorgânico.

O ensaio foi realizado no final da etapa 4 e o procedimento para sua realização encontra-se descrito a seguir;

- Reatores

Frascos de antibiótico com capacidade volumétrica de 100 mL, sendo que 60 mL foram ocupados com o meio de cultura, 10 mL com inóculo e o restante foi deixado para o *headspace*.

O ensaio foi realizado em triplicata para cada condição estudada.

- Meio de cultura

A composição do meio de cultura nitrificado utilizado em todas as condições testadas foi semelhante ao substrato sintético utilizado nas etapas 5 e 6 , apresentado anteriormente na Tabela 13. Nos ensaios na presença de sulfato e cloreto, foram adicionados de K_2SO_4 ($170 \text{ mg.L}^{-1} - \text{SO}_4^{2-}$) e KCl ($100 \text{ mg.L}^{-1} - \text{Cl}^-$), respectivamente.

- Inóculo

Para o ensaio foram retiradas do reator 42 espumas e a biomassa foi removida deste material suporte utilizando-se o mesmo procedimento apresentado na seção 4.5 - Sólidos aderidos à espuma, no entanto, ao invés de água destilada foi utilizado água de diluição para as lavagens.

A água de diluição foi preparada conforme apresentado por Schmidt e Belser (1984): 2 mL de solução K_2HPO_4 0,2M + 0,5 mL de solução KH_2PO_4 0,2 M e o volume completado para 500 mL com água ultrapurificada.

Após inocular os reatores, os sólidos totais voláteis foram determinados de acordo com metodologia apresentadas no Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater (1995).

- Composição do headspace

Metano 99,5 % de pureza e 15 % de oxigênio.

- Condições analisadas

As condições analisadas encontram-se apresentadas na Tabela 16

Tabela 16 - Condições de estudo para os diferentes reatores utilizados no ensaio com sulfato e cloreto.

Condição	KCl	K ₂ SO ₄	CH ₄	O ₂	Inóculo	Objetivo
1	sim	não	sim	sim	sim	Influência cloreto
2	não	sim	sim	sim	sim	Influência sulfato
3	não	não	sim	sim	sim	Controle
4	sim	não	não	não	sim	Desnitrificação endógena (cloreto)
5	não	sim	não	não	sim	Desnitrificação endógena (sulfato)
6	não	não	sim	sim	não	Solubilidade do metano

- Procedimento

Depois de receberem o substrato, os frascos foram tampados com papel alumínio, esterilizados em autoclave à pressão de 1 atmosfera e a 121 °C de temperatura por 20 minutos.

Os reatores foram inoculados com 10 mL do inóculo que foi removido das espumas.

Depois de fechados com tampa de butila e lacrados, os frascos tiveram sua atmosfera trocada por metano e adicionou-se oxigênio, conforme procedimento apresentado nos itens iii e iv da seção c) Medida da atividade desnitrificante, descrita em 4.5 Controle operacional.

Amostras da fase gasosa do *headspace* foram retiradas de cada reator e analisadas no cromatógrafo (Gow-Mac), para determinação da concentração de metano.

Paralelamente à amostragem de gás, também foram feitas análises de nitrato e nitrito. No final do ensaio, foi feita a determinação da concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH_4^+).

4.8 Análises microbiológicas

4.8.1 Caracterização morfológica

A caracterização morfológica e a diversidade microbiana foram analisadas, ao longo do tempo, por meio de microscopia óptica comum e contraste de fase utilizando Microscópio Olympus BX60, acoplado a câmara com captura de imagem e software para análise de imagem *Image-Pro Plus*.

Também foi utilizada técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) no final do experimento em amostras de espumas retiradas do reator. O microscópio utilizado foi LEO – 440 DSM – 9601.

A técnica utilizada para as análises de MEV foi proposta por Nation (1983), e adaptada para biofilme por Araújo (1995) que consiste basicamente em: (1) fixar as amostras em glutaraldeído a 2,5 % em tampão fosfato 0,1 M a pH 7,3 gelado; (2) manter as amostras à temperatura de 4 °C por 12 horas; (3) lavar as amostras, por duas vezes, com tampão fosfato gelado 0,1 M a pH 7,3 por 10 minutos cada lavagem; (4) desidratar as amostras deixando-as de molho sucessivamente, por 10 minutos, em álcool etílico com as seguintes concentrações: 50, 60, 70, 80, 90, 95 e 100 %; (5) fixar as amostras nos suportes de MEV e deixar secar por 10 minutos em estufa à temperatura de 40 °C; (6) recobrir as amostras com ouro para análise.

4.8.2 Quantificação de organismos pela técnica de Número Mais Provável (NMP)

A estimativa da quantidade de organismos foi feita a partir dos resultados dos ensaios de NMP para os organismos nitrificantes, desnitrificantes e os metanotróficos.

As análises foram feitas no final de cada etapa, com a intenção de se verificar a ocorrência e magnitude das populações diante das diferentes condições a que foram submetidas.

Para os organismos nitrificantes, a quantificação foi feita somente nas etapas 1 a 4; a dos demais microrganismos foi feita para todas as etapas.

Nas etapas em que o inóculo apresentou-se em suspensão, este foi homogeneizado, e em seguida era retirada quantidade suficiente para o ensaio.

Para as etapas em que o inóculo apresentou-se imobilizado em espumas, o mesmo foi removido das matrizes conforme metodologia apresentada por Daniel (2005), e adequada para o trabalho em questão. A metodologia empregada encontra-se descrita a seguir:

- i. Foram retiradas, aleatoriamente, 42 espumas do reator e transferidas para um tubo falcon (15 mL) onde foram lavadas com aproximadamente 45 mL de água de diluição.
- ii. Para auxiliar na remoção dos sólidos, um bastão de vidro foi utilizado durante as lavagens.
- iii. As águas de lavagem foram transferidas para balão volumétrico de 50 mL e seu volume completado, também com água de diluição.
- iv. Parte do volume total de enxágüe foi utilizada para incubar os tubos de diluições decimais seriadas e o restante, após ser medido, foi transferido para cápsula de porcelana para determinação dos sólidos totais voláteis conforme metodologia descrita no Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater (1995).
- v. Os resultados foram expressos em NMP.g^{-1} de sólidos voláteis. Utilizou-se metodologia específica para cada organismo; no entanto, a quantificação das populações microbianas foi feita de acordo com Alexander (1982), que considera a combinação das respostas positivas, utilizando-se de uma tabela padrão de probabilidade.

A seguir, são apresentados os procedimentos utilizados na quantificação desses organismos.

4.8.2.1 Organismos nitrificantes

A estimativa da quantidade dos organismos nitrificantes, oxidantes de amônia e oxidantes de nitrito, foi realizada segundo metodologia descrita por Schmidt e Belser (1984), adaptada para amostras líquidas, pois o método foi desenvolvido para amostras de solo.

A determinação do NMP foi realizada separadamente com meio de cultura específico para cada organismo.

O meio de cultura utilizado para a estimativa de bactérias oxidantes de amônia foi semelhante ao proposto por Schmidt e Belser (1984), salvo a concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH_4^+) que foi de 40 mg.L^{-1} , visto que essa foi a concentração afluyente no reator em estudo.

Foram classificadas como diluições positivas para o crescimento dos organismos oxidantes de N-NH_4^+ aquelas diluições que obtiveram resultado positivo para presença de nitrito (coloração rosa) depois de adicionado a solução teste (sulfanilamida + N-naftil-etilenodiamina hidrocloreto).

Para os organismos oxidantes de nitrito foram classificadas como diluições positivas para o seu crescimento aquelas que obtiveram resultado negativo para a presença de nitrito (solução incolor) depois de adicionado a solução teste (sulfanilamida + N-naftil-etilenodiamina hidrocloreto)

4.8.2.2 Organismos desnitrificantes

As análises de NMP para os organismos desnitrificantes foram realizadas de acordo com metodologia descrita por Tiedje (1982) e adaptada para esse trabalho.

O meio de cultura utilizado possuía composição semelhante à do substrato sintético utilizado nas etapas 5 e 6, anteriormente apresentada na Tabela 13, acrescido de $800 \mu\text{L.L}^{-1}$ de metanol como fonte de carbono (no meio já autoclavado e frio).

O metanol foi escolhido como fonte de carbono para os organismos desnitrificantes, por se tratar do possível intermediário formado durante a oxidação do metano.

Foram classificados como negativo para o crescimento de organismos desnitrificantes, redutores de nitrato, as diluições que obtiveram resultado positivo para presença de nitrato (coloração azul) depois de adicionado a solução teste (difenilamina).

Nos ensaios realizados com nitrito foram classificados como negativo para o crescimento de organismos desnitrificantes as diluições que obtiveram resultado positivo para presença de nitrito (coloração rosa) depois de adicionado a solução teste (sulfanilamida + N-naftil-etilenodiamina hidrocloreto).

4.8.2.3 Organismos metanotróficos

Com o objetivo de se estimar a população de organismos metanotróficos presentes no reator, foi desenvolvida metodologia de análise baseada na técnica de NMP utilizando o consumo de metano como resultado positivo para a presença desses organismos.

O procedimento encontra-se explicado a seguir;

- Reatores

Para realização do ensaio foram utilizados frascos de antibióticos com capacidade volumétrica aproximada de 30 mL.

Cada diluição seriada do inóculo foi testada em quintuplicada.

- Meio de cultura

O meio de cultura utilizado foi específico para organismos metanotróficos e sua composição se encontra apresentada na Tabela 17.

Tabela 17 - Características do meio de cultura específico para organismos metanotróficos.

Componente	Concentração
KNO ₃	1,00 g.L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,65 g.L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	0,87 g.L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0,68 g.L ⁻¹
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02 g.L ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g.L ⁻¹
FeSO ₄ .7H ₂ O	1,00 mg.L ⁻¹
CuSO ₄ .2H ₂ O	50,0 µg.L ⁻¹
H ₃ BO ₃	10,0 µg.L ⁻¹
MnSO ₄ .H ₂ O	10,0 µg.L ⁻¹
ZnSO ₄ .7H ₂ O	70,0 µg.L ⁻¹
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	12 µg.L ⁻¹

Fonte. Adaptado de Eisentraeger *et al.*(2001)

- Composição do headspace

Metano 99,5% de pureza (o mesmo utilizado no reator) e 15% de oxigênio.

Nas etapas 5 e 6, não foi adicionado oxigênio nos reatores.

- Reatores controles

Nos reatores controles, também montados em quintuplicadas, somente foram adicionados o meio de cultura, o metano e, quando necessário, o oxigênio, seguindo o mesmo procedimento para os demais reatores.

O objetivo do ensaio com esses reatores foi o de verificar a diminuição do metano em seus *headspaces*, devido à sua solubilização no meio líquido durante o período de incubação e à retirada de alíquotas para amostragem.

- *Procedimento*

- i. Os frascos, após receberem 9 mL de meio de cultura (os reatores controles receberam 10mL) e serem tampados com papel alumínio, foram autoclavados por 20 minutos à pressão de 1 atmosfera e temperatura de 120 °C
- ii. Após esfriarem, cada um recebeu 1 mL de inóculo conforme as diluições seriadas (menos os reatores controles) e, em seguida, foram fechados com tampa de butila e lacrados.
- iii. Os reatores tiveram a atmosfera trocada conforme apresentado nos itens iii e iv - Medida da atividade desnitrificante, descrita em 4.5 Controle operacional.
- iv. Após a troca de atmosfera, retiraram-se 0,5 mL de amostra gasosa do *headspace* de cada reator (inclusive dos controles) para análise no cromatógrafo gasoso, para analisar a concentração de metano. Essa primeira amostra analisada fornecia o valor inicial do teor de metano.
- v. Os frascos foram incubados em posição invertida em câmara rotativa (40 rpm) e temperatura de 30 °C. O objetivo da inversão foi o de evitar possíveis fugas de gás.
- vi. Novas medidas de metano foram feitas após 7 e 15 dias de incubação.
- vii. A variação na concentração de metano em cada reator foi comparada com a variação média deste gás nos controles. Aqueles que apresentaram maiores variações que os controles (incluindo o desvio padrão) foram classificados como positivos com relação ao crescimento das metanotróficas, enquanto que aqueles que tiveram variação menor ou igual à média dos controles foram considerados negativos.

4.8.3 Análise da diversidade microbiana

4.8.3.1 Amostragem

A frequência de amostragem de biomassa para o acompanhamento da diversidade microbiana foi específica para cada etapa do trabalho.

Durante a etapa 1, foram feitas cinco amostragens devido às dificuldades para a adaptação do sistema.

Nas etapas 2,3 e 5, a amostragem foi realizada na metade e final das etapas.

Na etapa 4, que teve pouco tempo de duração e 6, na qual a única alteração foi a fonte de nitrogênio inorgânico, a amostragem foi realizada somente no final dos períodos de operação.

Nas duas primeiras etapas, quando a biomassa se encontrava em suspensão, foram coletados cerca de 3 mL de lodo homogeneizado.

As amostras foram centrifugadas a 6000 rpm, a 4 °C por 10 minutos e o *pellet* obtido foi lavado com 5,0 mL de tampão PBS (NaCl 137,0 mM; KCl 2,6 mM; KH₂PO₄ 1,7 mM em pH 7,4).

Nas etapas em que se utilizou material suporte para adesão da biomassa, foram coletadas de 10 a 15 espumas e a biomassa removida com 5 mL de tampão PBS. Para auxiliar na remoção, foi utilizado um bastão de vidro.

Em seguida, os sólidos foram separados por centrifugação como nas etapas 1 e 2.

4.8.3.2 Extração de DNA

Foi realizada a extração do ácido nucléico de acordo com o protocolo de Griffiths *et al.* (2000), utilizando *glass beads*, fenol e clorofórmio.

4.8.3.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para as análises de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) os fragmentos do gene do RNAr 16S, extraídos das amostras, foram amplificados por PCR utilizando-se *primers* específicos sintetizados pela Invitrogen® para o Domínio *Bacteria* (Nielsen *et al.*, 1999). CG-clamp foi adicionado nos *primers forward* dos dois jogos de *primers*, cujas sequencias se encontram apresentadas na Tabela 18.

Para a reação de amplificação, foram adicionados 2 µL de DNA padrão e o procedimento foi realizado de acordo com o manual do fabricante (platinum Taq DNA polymerase - Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA).

Tabela 18 -: *Primers* filogenéticos utilizados para o Domínio *Bacteria*

Primers	Seqüência (5'→ 3')
968F	AACGCGAAGAACCTTAC
GC clamp	CGCCCGGGGCGCGCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG
1392R	ACGGGCGGTGTGTAC

Fonte: Nielsen *et al.* (1999).

Para as análises foi utilizado termociclador “Gene Amp. PCR System 2400” (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, Conn.). As condições de amplificação por PCR, descritas por Nielsen *et al.* (1999), encontram-se apresentadas na Tabela 19.

Tabela 19 -: Condições utilizadas na programação do aparelho para amplificação por PCR

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo
Desnaturação inicial	94	5 minutos
Desnaturação	94	45 segundos
Anelamento	38	1 minuto
Extensão	72	2 minutos
Final da extensão	72	10 minutos
Número de ciclos -35	-	-

4.8.3.4 Eletroforese em gel de agarose (DGGE)

A eletroforese em gel de agarose foi realizada segundo protocolo descrito por Muyzer *et al.*(1993). A técnica é aplicada com o intuito de avaliar o produto resultante da extração do ácido nucléico e da amplificação por PCR. Ela consiste em separar os fragmentos dos genes amplificados por PCR de acordo com o grau de desnaturação da dupla hélice de DNA, sob a ação de agentes desnaturantes como a uréia e a formamida.

Para facilitar a explicação dos resultados de DGGE realizados, considerou-se que uma banda particular observada no gel constitui, teoricamente, uma população de microrganismos.

O procedimento experimental para ambos os produtos foi o mesmo, diferindo apenas no marcador molecular.

As análises de DGGE foram realizadas usando Dcode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Os produtos do PCR foram aplicados diretamente em um gel de poliacrilamida 0,8 % (p/v) em TAE 0,5x com gradiente linear de desnaturação (uréia e formamida) variando de 30 a 60 %.

A eletroforese foi realizada sob voltagem constante de 75 V e à temperatura de 65 °C por 16 h. Os géis foram observados sob iluminação de luz UV e fotografados usando Eagle

Eye II Imager (Stratagene, La Jolla, CA, USA). As imagens foram manipuladas com o software Eaglesight Stratagene (v3.22).

A seguir, as bandas selecionadas foram recordadas do gel, armazenadas em frascos estéreis contendo 30 mL de água destilada esterelizada e armazenadas à temperatura de 4 °C para permitir a difusão passiva do DNA a partir do gel.

Dois microlitros da solução eluída foi re-amplificada utilizando os *primers* 968F e 1392R sem o CG-clamp. O produto foi purificado usando UltraClean PCR Clean Up Kit (Mobio) e o DNA purificado foi utilizado como padrão na reação de sequenciamento.

4.8.3.5 Sequenciamento

Foi realizado o sequenciamento parcial do gene RNAr 16S em um sequenciador capilar ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) utilizando kit BigDye (Applied Biosystems, CA, USA).

A identificação das seqüências foi realizada comparando-se a seqüência do gene RNAr 16S obtido com outras seqüências disponíveis no GenBank (banco de dados público) do National Center for Biotechnology Information (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando-se a ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn).

4.8.3.6 Análise filogenética

A árvore filogenética foi construída usando o método Neighbor-Joining a partir de análise de 500 reamostragens de *bootstraps* das seqüências das bandas recortadas do DGGE com *primers* para o Domínio *Bactéria*. Os valores presentes nos nós das árvores indicam porcentagens que o ramo se repetiu (500 reamostragens de *bootstraps*).

O alinhamento das sequências e a análise filogenética foram realizados usando o software Mega software (version 3).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises físico-químicas e biológicas

5.1.1 Etapa 1 (fases A e B)

Nesta etapa o reator foi operado com ciclos de 24 horas, sendo 6 horas de aeração, 16,5 h anóxico, 0,5 h destinado à respiração e 1,0 h para sedimentação. A biomassa se encontrava em suspensão.

No entanto, nos primeiros vinte e cinco dias de trabalho, depois da inoculação do sistema, os períodos, aeróbio e anóxico, foram divididos em dois de 11,5 horas, devido ao fato de não se saber qual seria a resposta dos organismos responsáveis pela nitrificação após serem submetidos a sucessivos períodos anóxicos.

Nesses vinte e cinco dias, durante o período aeróbio, as análises de nitrato e nitrito eram realizadas duas vezes por dia, a primeira depois de 6 horas de aeração e a segunda no final da etapa nitrificante.

Na Figura 6 são apresentados os resultados para as concentrações de nitrato e nitrito de amostras retiradas depois de seis horas de aeração durante os vinte cinco primeiros dias de operação.

Figura 6 - Valores de concentração de nitrato (N-NO_3^-) e nitrito (N-NO_2^-) após seis horas de aeração.

Como pode ser observado, os resultados obtidos permitiram verificar que o ciclo aeróbio podia ser diminuído para seis horas, sem prejuízo da nitrificação

Para a escolha do período anóxico, foram verificados os tempos citados na literatura para a remoção de nitrato associado ao processo metanotrófico (Houbroun *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2001; Waki *et al.*, 2002; Waki *et al.*, 2005).

Porém, esses tempos variam muito de acordo com cada pesquisa, alcançando valores desde 10 horas (LEE *et al.*, 2001) até 6 dias (WAKI *et al.*, 2002), sem que, no entanto, pudesse ser observado um comportamento padrão para a remoção de nitrato.

Sendo assim, levando-se em consideração o tempo mínimo de 10 horas encontrado na literatura (LEE *et al.*, 2001), optou-se em estabelecer o período anóxico em 16,5 horas, de maneira a obter um ciclo aeróbio/anóxico de 24 horas, incluindo os tempos necessários para a respiração, sedimentação e etc.

A escolha de tempos maiores não foi cogitada devido à possibilidade de a desnitrificação via material endógeno vir a prevalecer.

Na Figura 7, são apresentados os resultados de eficiência de remoção de nitrato obtidos durante os 100 primeiros dias de operação.

Figura 7 - Eficiência de remoção de N-NO₃⁻ no final do ciclo anóxico durante a etapa 1. Fase A – corresponde aos 50 primeiros dias de operação com solução de metais I; Fase B – corresponde aos demais dias de operação até o final da etapa 1, utilizando solução de metais II.

Nos primeiros dias de operação, logo após a inoculação do sistema, não foi verificada qualquer remoção significativa de N-NO₃⁻. No entanto, a partir do décimo dia, o sistema começou a melhorar gradativamente alcançando, inclusive, valores próximos a 40% de remoção. Porém, não foi possível manter sua estabilidade e, após quarenta e cinco dias de operação, a eficiência do processo de desnitrificação começou a diminuir.

Nesse mesmo período, também foi possível observar, visualmente, diminuição no volume de lodo presente no reator, indicando a perda de biomassa, que foi, posteriormente, confirmada por meio de medidas de concentração de sólidos (ver Tabela 20).

Tabela 20 - Resultados das análises de sólidos presentes no reator durante a etapa 1

Tempo (dia)	Observação	ST (g.L ⁻¹)	STV (g.L ⁻¹)	STF (g.L ⁻¹)
0	Início de operação	7,65	6,23	1,42
30	-	5,66	4,83	0,83
60	Nova inoculação	7,24	6,15	1,09
90	Final etapa 1	4,06	2,63	1,43

Adicionalmente aos resultados físico-químicos, os resultados obtidos nos ensaios de NMP, realizados no final da fase A, demonstraram a necessidade de adaptar as condições

ambientais ou nutricionais para o favorecimento dos organismos metanotróficos e desnitrificantes, já que os mesmos não puderam ser detectados no ensaio (Tabela 21).

Tabela 21 - Resultados de NMP realizados durante etapa 1 – final fase A para estimativa do número de organismos, nitrificantes, desnitrificantes e metanotróficos.

Organismos	NMP g ⁻¹ sólidos totais voláteis
Oxidantes de N-NH ₄ ⁺	3,0x10 ⁸
Oxidantes de N-NO ₂ ⁻	7,6x10 ⁸
Desnitrificantes	Não detectados
*Metanotróficos	Não detectados

*O desvio padrão obtido para os reatores controles nesse ensaio foi de $5,9 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CH}_4$

Como pode ser observado na Tabela 21, tanto os organismos oxidantes de N-NH₄⁺ como os de N-NO₂⁻ se adaptaram relativamente bem às condições impostas, visto que se apresentaram em números bem elevados.

Com relação ao fato de não ter sido possível detectar organismos desnitrificantes e metanotróficos e partindo-se da hipótese de que são os organismos metanotróficos que provêem a fonte de carbono para sustentar o processo de desnitrificação, optou-se por adaptar as condições de forma a favorecer o crescimento das bactérias metanotróficas.

Com relação à concentração de oxigênio dissolvido no meio, não se viu a necessidade de mudança, visto que este se manteve em torno de 2 mg.L⁻¹ no início do período anóxico e menor que 0,5 mg.L⁻¹ no final deste, valores estes que estão de acordo com a literatura.

A concentração de fósforo, aparentemente, não foi limitante, pois esta não sofreu alterações durante o ciclo, permanecendo em torno dos 18 mg.L⁻¹.

Além disso, Bussmann *et al.* (2004), ao estudarem o melhor meio de crescimento para os organismos metanotróficos provenientes de sedimentos lacustres, verificaram que variações de 0,015 mM a 1,5 mM (0,46 e 46,5 mg.L⁻¹, respectivamente) de fósforo não surtiram efeito no crescimento das metanotróficas.

Considerando a concentração de metano, esses mesmos autores também não verificaram mudanças na eficiência de crescimento destes organismos quando a concentração deste substrato variou de 97 para 532 μM no *headspace*.

Ao se observar a Figura 8, onde se encontram apresentados os resultados da variação temporal da concentração de metano no *headspace* do reator, obtidos no final da etapa 1, pode-se verificar que os valores se encontravam bem acima daqueles relatados anteriormente.

Figura 8 - Variação temporal da concentração de metano no *headspace* do reator.

Esses resultados levaram a crer que a disponibilidade de metano para os organismos metanotróficos não era o fator limitante no processo.

Desta forma, optou-se por modificar as condições nutricionais, alterando as características da solução de metais, caso o problema pudesse estar associado à disponibilidade de micronutrientes.

A solução utilizada até então tinha por objetivo aproximar as características do substrato sintético àquelas do efluente do reator UASB apresentadas por Passig e Campos (2004) para o tratamento de esgoto doméstico, solução esta anteriormente apresentada na Tabela 8.

A composição da nova solução de metais, mostrada, anteriormente, na Tabela 9, é específica para o crescimento de organismos metanotróficos.

Entre as principais alterações na composição da nova solução de metais pode-se destacar: a) retirada do cromo e b) inclusão do cobre.

De acordo com Mohanty *et al.* (2000), o cromo, com concentração de $20 \mu\text{g.g}^{-1}$ de solo, apresentou efeito inibitório na atividade de organismos metanotróficos presentes em amostras de solo provenientes de plantações de arroz.

Por outro lado, o cobre tem sido citado na literatura como importante componente para o crescimento desses organismos, participando diretamente na produção da enzima metanomonooxigenase particulada (MMOp) (HANSON; HANSON, 1996; MALASHENKO *et al.*, 2000).

No entanto, mesmo depois da substituição da solução de metais, o sistema não apresentou grandes melhoras; como verificado anteriormente na Figura 7.

Dessa forma, após dois meses de operação, considerou-se conveniente aumentar a concentração de biomassa no reator. Neste caso, optou-se pelo lodo anaeróbio, devido à sua maior concentração de sólidos voláteis e grande diversidade microbiana.

Após, aproximadamente, vinte dias da adição de lodo no reator, o processo de desnitrificação voltou a se restabelecer; porém, a diminuição dos sólidos totais voláteis, no final da etapa 1 (Tabela 20, apresentada anteriormente), permite supor que os resultados obtidos para a remoção de N-NO_3^- tenham sido devidos, principalmente, à utilização de material celular endógeno e não à utilização do metano.

No entanto, apesar de os resultados físico-químicos não terem sido satisfatórios, os resultados de NMP revelaram a presença de organismos metanotróficos, como pode ser observado na Tabela 22.

Tabela 22 - Resultados de NMP realizados durante a etapa 1 – final da fase B para estimativa do número de organismos, nitrificantes, desnitrificantes e metanotróficos.

Organismos	NMP. g⁻¹ sólidos totais voláteis
Oxidantes de N-NH ₄ ⁺	5,0x10 ⁵
Oxidantes de N-NO ₂ ⁻	7,0x10 ⁵
Desnitrificantes	Não detectados
*Metanotróficos	3,2x10 ³

* O desvio padrão obtido para os reatores controles nesse ensaio foi de 6,5x10⁻⁶ mol .L⁻¹ CH₄

Porém, como pode ser observado na Tabela 22, mesmo após o favorecimento do crescimento das metanotróficas no reator, ainda assim, não foi possível detectar os organismos desnitrificantes.

Uma das possíveis razões seria que a oxidação do metano não foi suficiente para sustentar o crescimento das bactérias desnitrificantes, seja pela baixa presença de organismos metanotróficos, ou talvez devido à formação de formaldeído (subproduto utilizado para o crescimento das metanotróficas) ou à sua oxidação completa a dióxido de carbono.

A queda no número de organismos nitrificantes, no final da fase B, pode ter sido devida à associação dos menores tempos de aeração com os elevados períodos anóxicos aos quais foram submetidos ou, inclusive, ao consumo de lodo no reator, anteriormente explicado.

As análises de microscopia realizadas no inóculo demonstraram a presença de morfologias bem distintas no reator.

Na Figura 9, são apresentadas algumas fotos de microscopia óptica comum, feitas a partir de amostras retirados do inóculo do reator no final da Fase B.

Figura 9 - Fotos de microscopia óptica comum feitas do inóculo do reator no final da fase B. a) bacilos; b) bacilos e filamentos

Devido ao fato de os resultados de eficiência de remoção de nitrato (ver Figura 7) assim como os obtidos para a variação de sólidos presentes no reator durante a etapa 1 (ver Tabela 20) refletirem a prevalência da desnitrificação endógena, foi realizado um perfil temporal para verificar a necessidade de se otimizar o tempo de ciclo.

A Figura 10 apresenta os resultados obtidos para as variações das concentrações de N-NH_4^+ e N-NO_3^- , no final da etapa 1.

Figura 10 - Variação temporal das concentrações de N-NH_4^+ e N-NO_3^- no final da etapa 1.

Observa-se que tanto a duração do período aeróbio, quanto a do período anóxico estavam elevadas.

A nitrificação ocorreu em aproximadamente cinco horas, sem ser observado o acúmulo de nitrito (N-NO_2^-), enquanto que a remoção do nitrato via desnitrificação, não sofreu alterações significativas, mesmo depois de 14 horas de período anóxico.

Além disso, acredita-se que os tempos destinados à sedimentação também possam ter favorecido ao consumo de material celular, devido à elevada presença de nitrato no efluente do reator associada à ausência de oxigênio e outras fontes de carbono orgânico, que não o próprio lodo.

Sendo assim, os tempos de aeração, sedimentação e do período anóxico foram diminuídos para tentar evitar o consumo de lodo.

5.1.2 Etapa 2

Nesta fase, o reator operou com ciclos de oito horas (três ciclos por dia) e os tempos de aeração e do período anóxico foram de 4 e 3 horas, respectivamente, e 0,5 h para respiração e sedimentação cada. A biomassa foi mantida em suspensão.

Além disso, foi adicionado, ao substrato, solução de ácidos orgânicos com concentração média de $35,3 \pm 5,2 \text{ mg.L}^{-1}$. A composição dessa solução foi apresentada anteriormente na Tabela 11.

O objetivo desta solução foi o de estimular o crescimento de organismos heterótrofos durante o período aeróbio que, posteriormente, poderiam vir a sustentar o processo de desnitrificação sob condições anóxicas.

No entanto, contrariamente ao esperado, a eficiência de remoção do nitrato (N-NO_3^-) no final dos períodos anóxicos não chegou a ultrapassar os 25 %, conforme resultados apresentados na Figura 11.

Figura 11 - Eficiência de remoção do N-NO₃⁻ durante etapa 2.

A utilização dos ácidos orgânicos como fonte de carbono no período anóxico foi descartada, pois, análises de ácidos realizadas no final do período aeróbio demonstraram que os mesmos foram totalmente consumidos.

Também não foi possível detectar metanol no meio líquido, durante o período anóxico. Desta forma, acredita-se, assim como na etapa anterior, que a concentração de sólidos possa ter influenciado no processo de desnitrificação.

Essa hipótese pode ser sustentada pela variação na concentração de sólidos presentes no reator no início e final da etapa 2, cujos resultados são apresentados na Tabela 23.

Tabela 23 - Variação na concentração de sólidos no reator no início e final da etapa 2

Etapa 2	ST (g.L⁻¹)	STV (g.L⁻¹)	STF (g.L⁻¹)	STV/STF
Início	6,15	4,57	1,58	2,89
Final	4,16	3,06	1,1	2,78

A diminuição no tempo de sedimentação, para evitar a desnitrificação sustentada por material biológico durante esse período, tampouco surtiu o efeito desejado, pois, nesta etapa, foi possível, inclusive, detectar concentrações de N-NO₂⁻ de até 3 mg.L⁻¹ (resultados não

mostrados) no afluente do reator logo depois de este ter sido alimentado com o substrato sintético..

A hipótese da formação de nitrito na solução estoque de N-NH_4^+ , utilizada para a preparação do substrato sintético, ou no reservatório do mesmo, foi descartada por não ter sido possível detectar sua presença em ambos.

Com relação aos estudos microbiológicos realizados no final dessa etapa, os resultados obtidos a partir do ensaio de NMP, quando comparados com aqueles obtidos no final da etapa 1, revelaram que a adição de ácidos orgânicos no substrato sintético surtiu os efeitos esperados para o crescimento dos organismos desnitrificantes.

No entanto, no mesmo período, foi detectada diminuição na população de organismos oxidantes de nitrito (N-NO_2^-) e os metanotróficos, conforme mostrado na Tabela 24.

Tabela 24 - Resultados de NMP realizados no final das etapas 1 e 2 para os organismos, nitrificantes, desnitrificantes e metanotróficos.

NMP. g^{-1} sólidos totais voláteis		
Organismos	Final etapa 1	Final etapa 2
Oxidantes de N-NH_4^+	$5,0 \times 10^5$	5×10^7
Oxidantes de N-NO_2^-	$7,0 \times 10^5$	$9,7 \times 10^4$
Desnitrificantes	Não detectados	$3,4 \times 10^5$
*Metanotróficos	$3,2 \times 10^3$	$1,7 \times 10^2$

* O desvio padrão obtido para os reatores controles nesse ensaio foi de $3,5 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CH}_4$

A diminuição no número de organismos oxidantes de nitrito (N-NO_2^-) e dos metanotróficos pode estar relacionada com a competição pelo oxigênio dissolvido no meio entre os organismos aeróbios heterótrofos e autótrofos.

Além da presença de bactérias desnitrificantes, também foi possível detectar no sistema, por meio de microscopia óptica comum, a presença excessiva de organismos com

morfologia semelhante às bactérias fototróficas anoxigênicas, conforme fotos apresentadas na Figura 12.

Figura 12. Fotos de microscopia óptica tiradas de amostra de lodo no final da etapa 2.

De acordo com Madigan (1998), algumas bactérias fototróficas púrpuras utilizam ferro e sulfeto, nesse caso sulfeto ferroso (FeS), como os redutores do CO_2 para crescerem autotroficamente.

No caso específico deste trabalho, o FeS pode ter sido formado a partir do ferro presente na solução de metais e do sulfeto de sódio adicionado ao substrato.

Além do mais, esses organismos são de pouco interesse para o processo e de difícil eliminação do sistema.

Sendo assim, devido aos resultados insatisfatórios das análises físico-químicas, assim como ao crescimento excessivo de organismos indesejáveis para o processo estudado, optou-se por dar por encerrada esta etapa e descartar o inóculo.

5.1.3 Etapa 3

5.1.3.1 Etapa de adaptação aeróbia

Durante essa etapa o reator foi operado com ciclos de seis horas, sendo adotados períodos aeróbios e anóxicos de 3 cada.

A biomassa se encontrou aderida em material suporte, que teve como objetivos: (a) auxiliar na retenção de organismos que, porventura, estivessem sendo “lavados do reator” durante as descargas, e (b) eliminar a etapa de sedimentação para o descarte.

Como os resultados das etapas anteriores mostraram a dificuldade em se obter a desnitrificação via nitrato, a operação do reator, durante o primeiro mês, foi, dentro do possível, direcionada à obtenção da nitrificação a nitrito.

A Tabela 25 apresenta as condições de operação adotadas.

Tabela 25 - Condições de operação adotadas durante a adaptação do inóculo

N-NH_4^+ (mg.L ⁻¹)	pH	¹ OD (mg.L ⁻¹)	T (°C)	Aeração (h)
$37 \pm 1,1$	$8,0 \pm 0,2$	$5,33 \pm 0,25$	$26,5 \pm 1,5$	4

¹ Concentração de OD, refere-se àquela apresentada no final do período aeróbio.

Entre os fatores apontados na literatura como responsáveis pelo acúmulo de nitrito, a manutenção do pH próximo a 8 foi escolhida como estratégia de operação, por ser a mais apropriada para este trabalho.

Como o processo de nitrificação tende a diminuir o pH, esperava-se que, no término da etapa aeróbia, este se encontrasse na faixa de valores apropriados para a desnitrificação associada aos organismos metanotróficos (próximo à neutralidade).

Não foram adotadas temperaturas acima de 30 °C devido à menor solubilidade do gás metano nessas temperaturas.

Os resultados do monitoramento realizado a partir de amostras coletadas do efluente do reator, durante essa etapa aeróbia, encontram-se apresentados na Figura 13.

Figura 13 - Resultado do monitoramento das formas nitrogenadas presentes no efluente do reator no período aeróbio. Tempo de ciclo = 6 horas

Observa-se que a manutenção do pH afluente próximo a 8 foi eficiente para o acúmulo de nitrito, sob as condições operacionais impostas. Os valores máximos obtidos para a estimativa das concentrações de amônia livre e ácido nitroso foram $1,35 \pm 0,8$ e $0,19 \pm 0,05$ mg.L⁻¹, respectivamente.

O valor estimado para a concentração de amônia livre encontra-se de acordo com resultados obtidos por alguns autores como sendo suficiente para inibir a nitratação (ABELING; SEYFRIED, 1992; BALMELLE *et al.*, 1992; YOO *et al.* 1998).

No entanto, de acordo com a literatura, o principal obstáculo para a manutenção do nitrito, como produto final da nitrificação, é a adaptação dos organismos oxidantes de nitrito aos níveis de amônia.

Da mesma forma, a máxima concentração de ácido nitroso obtida também pode estar associada à aparente inibição da oxidação do nitrito.

Segundo ⁹Anthonisen *et al.* (1976) *apud* Çeçen (1996) o ácido nitroso pode inibir a etapa de oxidação do nitrito mesmo quando presente em baixas concentrações (0,2 a 2,8 mg.L⁻¹).

Os resultados apresentados foram considerados satisfatórios para dar início aos ciclos anóxicos.

No entanto, foi realizado, previamente, um perfil temporal das diferentes formas de nitrogênio para se certificar do tempo necessário de aeração durante o período aeróbio.

A Figura 14 apresenta o resultado das variações temporais das concentrações de N-NO₃⁻, N-NO₂⁻ e N-NH₄⁺.

Figura 14 - Resultado das variações temporais das concentrações de N-NO₃⁻, N-NO₂⁻ e N-NH₄⁺ obtidos durante o ciclo aeróbio.

As estimativas para os máximos valores de amônia livre e ácido nitroso obtidos sofreram alterações, 0,9 e 0,03 mg.L⁻¹, respectivamente.

O valor obtido para a concentração de amônia livre encontra-se na média dos dados do monitoramento. No entanto, a concentração de ácido nitroso diminuiu acentuadamente, ficando muito abaixo do mínimo citado na literatura para a inibição da nitrificação a nitrato.

⁹ ANTHONISEN, A.C. *et al.* (1976) Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Journal WPCF*, v.48, n.5, p.835-852

Entretanto, baseando-se na relação $C_{OD}/C_{NH_3} < 10$ como fator de avaliação para explicar a inibição da oxidação do nitrito, proposta por Çeçen (1996), o mínimo valor obtido de 1,23 seguido por 10,1, poderiam explicar o acúmulo de nitrito, no início do ciclo.

No entanto, como a concentração de OD ao longo do período não foi mantida constante (ver Figura 15), essa relação tendeu a aumentar até o fim do período, sem que, no entanto, houvesse oxidação significativa do nitrito.

Figura 15 - Perfil da concentração de oxigênio dissolvido (OD)

Desta forma, acredita-se que a limitada concentração da fonte de carbono inorgânico adicionada ao substrato sintético, também pode ter contribuído para evitar a oxidação do nitrito no final do período, mesmo a elevadas concentrações de OD e baixas concentrações de amônia livre e ácido nitroso.

A Figura 16 apresenta a variação temporal da alcalinidade.

Figura 16 - Variação temporal da alcalinidade durante etapa aeróbia de adaptação

Observa-se que, após aproximadamente 120 minutos, praticamente toda a alcalinidade presente já havia sido consumida, coincidindo com a máxima concentração de nitrito (Figura 14).

Durante o monitoramento desta etapa, os valores de alcalinidade média afluente e efluente do reator foram de 243 ± 12 e 32 ± 15 mg.L⁻¹ CaCO₃.

Sendo assim, acredita-se que, no início dos ciclos aeróbios, o pH próximo a oito e baixas concentrações de OD propiciaram condições favoráveis para o acúmulo de nitrito (formação de amônia livre e relação $C_{OD}/C_{NH_3} < 10$), favorecendo os organismos oxidantes de N-NH₄⁺ que, durante seu metabolismo, consumiram grande parte do carbono inorgânico presente.

Desta forma, apesar de, no final do ciclo, as condições ambientais se apresentarem menos inóspitas para os organismos oxidantes de nitrito, seu crescimento pode ter sido suprimido devido à escassez de fonte de carbono.

O resultado dos valores médios de pH no término dos períodos aeróbios foi de $7,05 \pm 0,25$, portanto, satisfatório para o início do período anóxico.

Desta forma, partindo-se da hipótese que as condições obtidas durante esta etapa de adaptação já se encontravam bem estabelecidas, iniciou-se o período anóxico, posteriormente ao aeróbio.

Sendo assim, o novo ciclo de operação passou a ter 3 horas de aeração para nitrificação e 3 horas para desnitrificação.

5.1.3.2. Etapa aeróbia/anóxica

Nesta etapa, o metano passou a ser injetado no reator depois de terminado cada período aeróbio.

A concentração de OD no início dos períodos anóxicos, após a injeção de metano foi de $1,97 \pm 0,45 \text{ mg.L}^{-1}$ encontrando-se, portanto, dentro dos valores recomendados na literatura para a desnitrificação associada aos organismos metanotróficos.

Desta forma, foi possível retirar a etapa de respiração anteriormente empregada.

A Figura 17 apresenta os resultados do monitoramento das formas nitrogenadas no efluente aeróbio do reator antes e depois do início do ciclo anóxico

Figura 17- Resultados das análises das concentrações das formas nitrogenadas no efluente aeróbio do reator antes e depois do início dos períodos anóxicos. Tempo de ciclo = 6 h (A) – início dos períodos anóxicos; (B) diminuição na vazão de ar durante os períodos aeróbios; (C) aumento da vazão de ar durante os períodos aeróbios.

Pode ser observado que o início do período anóxico, identificado no gráfico como (A), causou a desestabilização do sistema.

O acúmulo de nitrito, antes observado, deu lugar à sua oxidação, produzindo nitrato como o produto preferencial no final do período aeróbio.

No entanto, baseando-se somente nos resultados das análises físico-químicas, não foi possível inferir se a nova condição afetou negativamente os organismos oxidantes de N-NH_4^+ , ou se houve a adaptação dos oxidantes de N-NO_2^- ou, o mais provável, ambos.

Na tentativa de reverter essa situação, optou-se por diminuir pela metade a vazão de ar durante a aeração, o que ocasionou diminuição na concentração de OD no final do ciclo aeróbio para $2,4 \pm 0,3 \text{ mg.L}^{-1}$.

Porém, pode-se observar na Figura 17, localização B, que esse procedimento ocasionou a diminuição na eficiência de oxidação do N-NH_4^+ , sem que o processo de oxidação de N-NO_2^- tivesse sido afetado de forma significativa.

Por isso, optou-se em retornar às condições iniciais de oxigenação (ver C na Figura 17), entretanto, já não foi possível observar acúmulo de N-NO_2^- .

Esse comportamento leva a crer que a mudança da condição ambiental levou à rápida adaptação dos organismos oxidantes de N-NO_2^- que, uma vez estabelecidos no reator, passaram a controlar o processo.

Com relação ao processo de desnitrificação, as maiores conversões de nitrogênio ocorreram no início da etapa quando foi possível detectar o acúmulo de N-NO_2^- no período aeróbio, mesmo nos casos em que as concentrações foram mais elevadas (aproximadamente 10 mg.L^{-1}). Porém, não foi possível observar remoções significativas de N-NO_3^- (Figuras 18 e 19).

As notações A, B e C são referentes aos intervalos sob as mesmas condições discutidas anteriormente.

Figura 18 - Resultados das análises das concentrações de nitrato (N-NO_3^-) obtidos a partir de amostras de efluente aeróbio e anóxico do reator durante a etapa 3. Tempo de ciclo = 6 h (A) – início dos períodos anóxicos; (B) diminuição na vazão de ar durante os períodos aeróbios; (C) aumento da vazão de ar durante os períodos aeróbios.

Os resultados de eficiência de remoção de nitrogênio no processo de desnitrificação durante o monitoramento do afluente e efluente (etapas aeróbia e anóxica) podem ser observados na Figura 19.

Figura 19 - Resultados da eficiência de remoção de nitrogênio no final de cada ciclo. Tempo de ciclo = 6 h

(A) – início dos períodos anóxicos; (B) diminuição na vazão de ar durante os períodos aeróbios; (C) aumento da vazão de ar durante os períodos aeróbios.

Observa-se que, quando o nitrito (N-NO_2^-) esteve presente no início da etapa anóxica (intervalo A), o processo de desnitrificação apresentou as maiores eficiências de remoção.

No entanto, esse processo se reverteu a partir do momento em que a nitrificação levou à formação de nitrato (N-NO_3^-), deixando de haver o acúmulo de N-NO_2^- (intervalo B).

Com relação ao intervalo C, não se observa um padrão de comportamento, provavelmente porque o sistema ainda se apresentava instável com relação à desnitrificação a partir do nitrato.

No final dessa etapa, para poder confirmar se o nitrito ainda estava sendo acumulado no sistema, pelo menos no início do período aeróbio, foi feita análise da variação temporal das formas nitrogenadas durante todo o ciclo (aeróbio e anóxico).

Os resultados obtidos para as concentrações de N-NO_3^- e N-NH_4^+ em ambos os períodos encontram-se apresentados na Figura 20.

Figura 20 - Variação temporal das concentrações de N-NO_3^- e N-NH_4^+ durante o ciclo de operação da etapa 3

Não foi possível detectar nitrito (N-NO_2^-) no perfil realizado; provavelmente, como citado na literatura, os organismos nitratantes se adaptaram às condições iniciais, de maneira que a forma mais oxidada do nitrogênio prevaleceu no final do ciclo aeróbio.

Com relação à desnitrificação na presença de metano, pode ser observado que, se ocorreu, foi somente na primeira hora e meia de período anóxico.

Também foi realizado um perfil temporal para medir as concentrações de metanol, mas não foi possível detectá-lo.

No entanto, ao se compararem as variações de nitrato (N-NO_3^-) durante o período anóxico obtidas neste ensaio, com àquelas apresentadas na Figura 10 referentes ao final da etapa 1, pode-se constatar que o valor de nitrato removido, durante a etapa 1, foi de, aproximadamente, $3,93 \text{ mg.L}^{-1}$ em 6 horas e, para a etapa 3, esse valor, foi de $3,98 \text{ mg.L}^{-1}$, em aproximadamente 1,5 hora.

Aparentemente, o material suporte presente no reator, além de favorecer a retenção dos organismos metanotróficos (Tabela 26 com resultados de NMP), pode ter auxiliado na retenção do metano no meio líquido por meio de aprisionamento de bolhas de gás em seus poros, permitindo assim, maior tempo de contato entre o líquido e o gás.

Desta forma, a solubilização do metano pode ter sido favorecida, aumentando, assim, a sua disponibilidade para os microrganismos.

Apesar de, na etapa 1, os resultados do monitoramento e análises de sólidos indicarem forte influência do lodo no processo de desnitrificação, neste caso, a quantidade de material aderido à espuma mostrou comportamento bem distinto.

A Tabela 26 apresenta os resultados obtidos para as análises de sólidos aderidos nas matrizes.

Tabela 26 - Variação na concentração de sólidos aderidos à espuma.

Fase	Espuma (g)	STA (g.g espuma ⁻¹)	SVA (g.g espuma ⁻¹)	SFA (g.g espuma ⁻¹)
(I)	0,1534	1,52	1,28	0,23
(II)	0,1512	0,24	0,16	0,08
(III)	0,1527	0,405	0,276	0,129

(I) Início da fase de adaptação aeróbia; (II) Final da fase de adaptação aeróbia e início da fase aeróbia/anóxica; (III) Final fase aeróbia/anóxica. STA – sólidos totais aderidos; SVA – sólidos voláteis aderidos e SFA – sólidos fixos aderidos.

Analisando-se os dados apresentados na Tabela 26, é possível verificar que, no final da etapa 3, a quantidade de sólidos aderidos voláteis teve um aumento significativo, com relação ao início da etapa, ao contrário das etapas anteriores, em que foram verificadas perdas consideráveis de sólidos.

A perda de sólidos no final da fase de adaptação aeróbia, quando comparada com o início, já era de se esperar, visto que o lodo utilizado para inocular o reator apresentava grandes quantidades de sólidos.

Apesar de a remoção de nitrato não ter sido satisfatória no período analisado, os resultados dos ensaios microbiológicos, mais especificamente o de NMP, revelaram a presença de organismos desnitrificantes e metanotróficos, como pode ser observado na Tabela 27.

Tabela 27 - Resultados de NMP para os organismos, nitrificantes, desnitrificantes e metanotróficos realizados durante a etapa 3 nos seguintes intervalos: (a) no final da fase aeróbia e (b) no final da fase aeróbia/anóxica.

Organismos	NMP. g ⁻¹ sólidos totais voláteis	
	Fase aeróbia	Fase aeróbia/anóxica
Oxidantes de N-NH ₄ ⁺	2,6x10 ¹⁰	1,5x10 ⁸
Oxidantes de N-NO ₂ ⁻	1,2x10 ⁷	1,2x10 ⁷
Desnitrificantes	-	1,2x10 ⁵
Metanotróficos	-	5,1x10 ³

* O desvio padrão obtido para os reatores controles nesse ensaio foi de 2,5x10⁻⁵ mol .L⁻¹ CH₄

Como pode ser observado na Tabela 27 no final do período de adaptação aeróbia, o número estimado de organismos oxidantes de N-NH_4^+ estava bem superior ao de oxidantes de N-NO_2^- , o que explicaria a presença deste composto no final dos ciclos.

No entanto, aparentemente, esses organismos foram mais sensíveis ao período anóxico, visto que seu número acabou diminuindo no final da etapa aeróbia/anóxica enquanto que não foi possível detectar mudanças no número de organismos oxidantes de nitrito nem dos desnitrificantes.

Com relação aos metanotróficos, de acordo com os resultados, eles também foram favorecidos, provavelmente pela adição de extrato de levedura, que proporcionou nitrogênio orgânico para o crescimento.

De acordo com Bitton (1994), as bactérias têm maior facilidade em assimilar essa forma de nitrogênio para o crescimento celular do que o nitrato.

Além do mais, nessa etapa, foi utilizado meio suporte, que pode ter auxiliado na retenção das metanotróficas no reator.

As análises de microscopia também mostraram que as morfologias semelhantes às bactérias fototróficas anoxigênicas já não predominavam no sistema, podendo, inclusive, ser detectadas morfologias semelhantes às das metanotróficas.

A Figura 21 apresenta as fotos de microscopia óptica comum feitas em amostra do inóculo aderido à espuma.

Figura 21- Fotos de microscopia óptica comum tiradas de amostra do inóculo aderido à espuma.

(a), (c) e (d) organismos com morfologia semelhante às metanotróficas (entre outras espécies as metanotróficas se caracterizam por acúmulo de polifosfatos (GREEN, P., 1992); (b) presença de morfologias semelhantes às fototróficas anoxigênicas;

5.1.4 Etapa 4

Como na etapa anterior, não foi possível manter o acúmulo de nitrito, e assim, nem a eficiência de remoção, optou-se em trabalhar com aeração intermitente em ciclos de 12 horas.

A aeração intermitente foi utilizada por Daniel (2005), que conseguiu bons resultados de acúmulo de nitrito e por longo período de tempo, mesmo a baixas concentrações de N-NH_4^+ (50 mg.L^{-1}).

O período aeróbio de 30 minutos foi estipulado de acordo com os resultados obtidos para as concentrações de N-NO_2^- durante o perfil temporal realizado na fase de adaptação

aeróbia (ver Figura 14). Para a escolha da duração do período anóxico, levou-se em consideração a necessidade de se evitar elevados períodos de tempos anóxicos que pudessem vir a favorecer a desnitrificação via material endógeno.

Também se optou pela utilização da biomassa imobilizada, devido às vantagens anteriormente citadas.

A concentração de N-NH_4^+ afluyente foi de $40,08 \pm 2,06 \text{ mg.L}^{-1}$.

Durante esta etapa, diferente das demais, foi possível detectar a presença de N-NH_4^+ no final do ciclo, conforme apresentado na Figura 22.

Figura 22 - Resultados das concentrações de amônia (N-NH_4^+) e nitrato (N-NO_3^-) presentes no efluente do reator durante o monitoramento realizado durante a etapa 4.
Tempo de ciclo = 12 horas

Com relação às concentrações de N-NO_2^- estas foram muito baixas ($< 1 \text{ mg.L}^{-1}$) no final de cada ciclo. No entanto, acredita-se que esta espécie tenha se acumulado no sistema pelo menos durante o início dos primeiros ciclos de operação e, portanto, favorecido a desnitrificação durante os períodos anóxicos. Isso explicaria as maiores eficiências de remoção de nitrogênio nos primeiros 15 dias de operação (até o 27º ciclo), conforme apresentado na Figura 23.

Figura 23 - Eficiência de remoção de nitrogênio total durante o monitoramento (etapa 4)
Tempo de ciclo = 12 h

A diminuição na eficiência de remoção depois do 27º ciclo de operação pode ter sido ocasionada por uma possível adaptação de organismos oxidantes de nitrito, que levariam a formação de nitrato como produto nitrogenado final nos períodos aeróbios. Que, de acordo com resultados obtidos nas etapas anteriores, demonstrou ser de difícil conversão na etapa desnitrificante.

Para verificar a ocorrência de nitrito ao longo dos ciclos, após o 41º ciclo, foi realizado um perfil temporal, em que foram coletadas amostras ao final de cada período aeróbio e anóxico.

Os resultados das concentrações de N-NH_4^+ nos finais dos períodos aeróbios (A) e anóxicos (AN) encontram-se apresentados na Figura 24.

Figura 24 - Variação temporal da concentração de N-NH_4^+ durante o ciclo de 12 h.
(A) – refere-se ao período aeróbio; (AN) refere-se ao período anóxico.

Como pode ser observado, o tempo estipulado para a nitrificação do nitrogênio amoniacal (N-NH_4^+) não foi suficiente, visto que sua oxidação no final do ciclo alcançou valores de aproximadamente 50 % do inicial.

Provavelmente, se fossem impostos períodos de aeração ou ciclos maiores que 12 horas, essa eficiência aumentaria.

No entanto, dificilmente a remoção do N-NO_3^- alcançaria valores consideráveis, visto que sua remoção do sistema durante os períodos anóxicos foi mínima, conforme apresentado na (Figura 25).

Figura 25 - Variação temporal da concentração de nitrato (N-NO₃⁻) durante o ciclo de 12 h.
(A) – refere-se ao período aeróbio; (AN) refere-se ao período anóxico.

O perfil de nitrito (resultados não apresentados) mostrou que seu acúmulo no período aeróbio foi mínimo, não alcançando 1 mg.L⁻¹, provavelmente devido à adaptação dos organismos nitratantes no meio.

Os resultados de NMP obtidos no final desta etapa encontram-se apresentados na Tabela 28.

Tabela 28 - Resultados de NMP realizados no final das etapas 3 e 4 para os organismos, nitrificantes, desnitrificantes e metanotróficos.

NMP. g ⁻¹ sólidos totais voláteis		
Organismos	Final etapa 3	Final etapa 4
Oxidantes de N-NH ₄ ⁺	1,5x10 ⁸	5,2x10 ⁷
Oxidantes de N-NO ₂ ⁻	1,2x10 ⁷	2,3x10 ⁵
Desnitrificantes	1,2x10 ⁵	>7,6x10 ⁹
Metanotróficos	5,1x10 ³	3,5x10 ⁷

* O desvio padrão obtido para os reatores controles nesse ensaio foi de 5,5x10⁻⁶ mol .L⁻¹ CH₄

Pode-se observar que esta condição foi a que mais favoreceu os organismos desnitrificantes e metanotróficos, provavelmente devido à adoção de períodos anóxicos mais curtos, que minimiza a necessidade de utilização de carbono endógeno.

No entanto, acredita-se que a aeração intermitente com intervalos curtos de aeração, tenha afetado negativamente tanto os organismos oxidantes de N-NO_2^- como os organismos responsáveis pela oxidação do N-NH_4^+ , motivo pelo qual, a conversão deste último não tenha sido completa durante essa etapa.

Esses resultados podem ter refletido na concentração de sólidos aderidos à espuma, conforme apresentados na Tabela 29.

Tabela 29 - Resultados de sólidos aderidos à espuma no início e final da etapa 4.

	Espuma (g)	STA (g.g espuma⁻¹)	SVA (g.g espuma⁻¹)	SFA (g.g espuma⁻¹)
Início	0,1527	0,405	0,276	0,129
Final	0,1283	0,316	0,165	0,151

Porém, assim como nas etapas anteriores, o aumento na concentração de nitrato devido, provavelmente, à adaptação dos organismos nitratantes, pode ter sido a causa da perda de eficiência nos ciclos seguintes.

5.1.5 Etapa 5

Como não foi possível manter o processo de desnitrificação associado aos organismos metanotróficos, tendo como primeira etapa o processo de nitrificação, optou-se por trabalhar diretamente com a desnitrificação, a partir de um substrato nitrificado, porém, na ausência de oxigênio molecular.

Esse procedimento foi adotado, a partir de resultados obtidos em ensaios de atividades desnitrificantes que revelaram a possibilidade da desnitrificação na presença de metano e ausência de oxigênio molecular (Figuras 28 e 29).

Além disso, a adoção de condições ambientais mais específicas induz a maior seleção microbiana no meio, diminuindo assim, possíveis competições por substrato, neste caso, a competição pelo metano no ciclo anóxico, por organismos metanotróficos e oxidantes de amônia.

Inicialmente, o acompanhamento da remoção de nitrato após 24 horas de ciclo não superava os 20%. Desta forma, optou-se por trabalhar com ciclos mais longos, como os adotados por WAKI *et al.*(2002).

A Figura 26 apresenta a variação temporal da concentração de N-NO_3^- na presença (A) e ausência (B) de metano tendo como ciclo períodos de 7 dias.

Figura 26 - Variação temporal da concentração de N-NO_3^- na presença e ausência de metano. _____ ajuste cinético para remoção de nitrato.

Como pode ser observado, quando o reator foi operado na ausência de metano a concentração de nitrato não apresentou variações significativas, motivo pelo qual não foi possível ajustar nenhum modelo matemático para o seu consumo.

Já na presença de metano, a porcentagem de conversão do nitrato (N-NO_3^-) foi de aproximadamente 75 % e o modelo cinético para remoção de nitrato que melhor se ajustou

aos resultados obtidos ($R^2 = 0,97$) foi o de primeira ordem. No entanto, apesar da elevada percentagem de conversão, a cinética do processo foi muito lenta, com constante cinética aparente k'_{NO_3} para essa condição de $0,007 \pm 0,0004 \text{ h}^{-1}$.

Não foram detectadas concentrações significativas de N-NH_4^+ e N-NO_2^- ao longo do tempo.

Sendo assim, pode-se inferir que o metano foi necessário para a sustentação do processo de desnitrificação.

Na Tabela 30 são apresentados os resultados obtidos para a determinação de sólidos aderidos à espuma.

Tabela 30 - Resultados das concentrações de sólidos aderidos à espuma no início e final da etapa 5.

	Espuma (g)	STA (g.g espuma ⁻¹)	SVA (g.g espuma ⁻¹)	SFA (g.g espuma ⁻¹)
Início	0,1283	0,316	0,165	0,151
Final	0,1453	0,321	0,191	0,13

Como pode ser observado, os resultados de sólidos aderidos apresentaram pequeno aumento com relação à etapa anterior. Estes resultados estão coerentes com os obtidos para a estimativa dos organismos presentes no reator por técnica de NMP, que tampouco apresentou variações significativas, conforme apresentado na Tabela 31.

Tabela 31 - Resultados de NMP realizados na etapa 4 e 5 para os organismos desnitrificantes e metanotróficos.

	NMP g ⁻¹ sólidos totais voláteis	
Organismos	Etapla 4	Etapla 5
Desnitrificantes	$>7,6 \times 10^9$	$2,2 \times 10^{10}$
Metanotróficos	$3,5 \times 10^7$	$4,9 \times 10^6$

* O desvio padrão obtido para os reatores controles nesse ensaio foi de $6,5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CH}_4$

No entanto, como o processo apresentou cinética muito lenta, a fonte receptora de elétrons foi substituída pelo nitrito que, conforme a literatura permite velocidades de desnitrificação mais altas.

5.1.6 Etapa 6

Nesta última etapa, a única modificação foi a substituição da fonte receptora de elétrons. Os resultados da variação temporal da concentração de nitrito na presença (A) e ausência (B) de metano se encontram apresentados na Figura 27.

Figura 27 - Variação temporal da concentração de N-NO_2^- (A) na presença de metano e (B) na ausência de metano; — Ajuste cinético para remoção de nitrito

Quando o reator operou na ausência de metano, pode-se observar que a desnitrificação endógena prevaleceu, no entanto, com velocidades de desnitrificação mais lentas.

A porcentagem de conversão do nitrito (N-NO_2^-) foi superior a 90 % porém, assim como na etapa anterior, as velocidades de conversão ainda foram relativamente baixas.

Na Tabela 32, encontram-se apresentados os resultados dos ajustes cinéticos obtidos para conversão de nitrito na presença e ausência de metano.

Tabela 32 - Resultados obtidos para ajuste cinético da remoção de N-NO_2^- no final da etapa 6 – (A) na presença de metano e (B) na ausência de metano.

Condição	Ajuste cinético	R^2	$k'_{\text{NO}_2} (\text{h}^{-1})$	Obs.
A	1ª ordem	0,99	$0,0278 \pm 0,0009$	-
B	1ª ordem com residual de N-NO_2^-	0,91	$0,013 \pm 0,005$	${}^2R_{\text{NO}_2} - 26,03 \pm 1,02 \text{ mg.L}^{-1}$

${}^2R_{\text{NO}_2}$ – concentração residual de nitrito (N-NO_2^-)

Comparando-se os valores das constantes cinéticas aparentes obtidas nos ensaios tendo nitrato como receptor de elétrons ($k'_{\text{NO}_3} = 0,007 \text{ h}^{-1}$) e a obtida quando o nitrito foi o receptor ($k'_{\text{NO}_2} = 0,0278 \text{ h}^{-1}$) pode-se verificar que esta última é aproximadamente 4 vezes maior, o que explica as maiores velocidades de remoção.

Estes resultados estão de acordo com a literatura que prevêem maiores velocidades de desnitrificação quando o nitrito é o receptor de elétrons.

Com relação à concentração de sólidos aderidos no início e final desta etapa, os resultados se encontram apresentados na Tabela 33.

Tabela 33 - Resultados de sólidos aderidos à espuma no início e final da etapa 6.

	Espuma (g)	STA (g.g espuma^{-1})	SVA (g.g espuma^{-1})	SFA (g.g espuma^{-1})
Início	0,1453	0,321	0,191	0,13
Final	0,1520	0,236	0,175	0,061

Nesta etapa houve ligeira queda na concentração de sólidos aderidos voláteis, que pode estar associado a possíveis efeitos inibitórios do nitrito na comunidade microbiana.

Os resultados de NMP encontram-se apresentados na Tabela 34.

Tabela 34 - Resultados de NMP obtidos no final das etapas 5 e 6 para os organismos desnitrificantes e metanotróficos.

Organismos	NMP g ⁻¹ sólidos totais voláteis	
	Etapla 5	Etapla 6
Desnitrificantes	2,2x10 ¹⁰	> 10 ¹¹
Metanotróficos	4,9x10 ⁶	4,7x10 ⁴

* O desvio padrão obtido para os reatores controles nesse ensaio foi de 1,6x10⁻⁵ mol .L⁻¹ CH₄

Observa-se que, quando a fonte de nitrogênio foi substituída pelo nitrito, os organismos metanotróficos parecem ter sido mais afetados que os desnitrificantes.

Isso pode ter ocorrido devido a uma maior sensibilidade destes organismos ao nitrito, aproximadamente 35 mg.L⁻¹ (N-NO₂⁻)

King e Schnell (1994) verificaram a inibição de organismos metanotróficos por N-NO₂⁻ nas concentrações de 0,7 a 14 mg.L⁻¹ na presença de 0,0001 atm de CH₄ e 0,21 atm de O₂.

Dunfield e Knowles (1995) também reportaram sobre o efeito inibitório do nitrito (concentrações que variaram entre 23 e 370 µmol de NO₂⁻, equivalente à 1 e 17 mg de NO₂⁻, respectivamente) em culturas de organismos metanotróficos presentes em amostras de solo.

5.2. Ensaio de atividade desnitrificante

Este ensaio teve como objetivo verificar se os organismos presentes no reator eram capazes de promover a redução do nitrogênio, tanto na forma de nitrito (N-NO₂⁻) quanto na de nitrato (N-NO₃⁻) na presença de metano e na presença de metano e oxigênio.

5.2.1 Final da etapa 4

As Figuras 28 e 29 apresentam os resultados dos valores da concentração de N_2O obtidos durante o ensaio para verificar a atividade desnitrificante da biomassa na presença de nitrito e nitrato, respectivamente.

Figura 28 - Resultados da concentração de N_2O nos reatores alimentados com $N-NO_2^-$.
RM – nitrito e metano; RMO – nitrito, metano e oxigênio RE – reator endógeno

Observa-se que, quando o nitrito foi o receptor de elétrons, as diferenças nos valores obtidos para as concentrações de N_2O na presença e ausência de oxigênio molecular foram muito pequenas, ficando difícil dizer se este composto teve ou não influência sobre o processo.

Adicionalmente, os elevados tempos da fase lag, juntamente com as menores concentrações de N_2O obtidos nos reatores endógenos, levantam à hipótese de que o metano foi necessário para se estabelecer o processo de desnitrificação via nitrito.

Na Figura 29, são apresentados os resultados para a formação de N_2O nas mesmas condições anteriores, porém, com o nitrato como o receptor de elétrons.

Figura 29 - Resultados da concentração de N_2O nos reatores alimentados com $N-NO_3^-$.
RM – nitrito e metano; RMO – nitrito, metano e oxigênio RE – reator endógeno

Como a diferença na concentração de N_2O entre os reatores alimentados com metano e os endógenos foi muito pequena no final do ensaio, qualquer conclusão a respeito da participação do metano no processo de desnitrificação é precipitada.

No entanto, nas primeiras 40 horas fica evidente a importância desta fonte de carbono no processo de desnitrificação, já que, nos reatores endógenos, não foi possível detectar o N_2O neste período de tempo.

Nas Figuras 30 e 31, são apresentados os resultados comparativos entre as concentrações de N_2O obtidos nos reatores alimentados com nitrito e nitrito na presença de oxigênio e na ausência deste substrato, respectivamente.

Figura 30 - Resultados da concentração de N_2O nos reatores alimentados com $N-NO_3^-$ e $N-NO_2^-$ na presença de metano e oxigênio molecular.

Figura 31 - Resultados da concentração de N_2O nos reatores alimentados com $N-NO_3^-$, $N-NO_2^-$ e metano na ausência de oxigênio molecular.

Pode-se observar que o nitrito foi o substrato que proporcionou maiores valores de concentrações de N_2O , independentemente da presença ou não do oxigênio molecular.

Esses resultados somente evidenciaram o que já havia sido constatado nas outras etapas experimentais, ou seja, que o processo é mais eficiente quando o receptor de elétrons é o nitrito.

Na Tabela 35 encontram-se apresentados os valores obtidos para a atividade desnitrificante sob as diferentes condições analisadas.

Tabela 35 - Resultados obtidos para o ensaio da atividade desnitrificante com biomassa adaptada durante a etapa 4.

Condição	Fase lag (h)	$N_2O_{Máximo}$ (mol.mL ⁻¹)	Consumo de CH_4 (mol.L ⁻¹)	¹ t _{N₂O} (h)
$NO_2 + CH_4$	9	$1,54 \times 10^{-6}$	0,0389	121
$NO_2 + CH_4 + O_2$	12	$2,0 \times 10^{-6}$	0,0319	149
NO_2 endógeno	71,5	$5,14 \times 10^{-7}$	-	121
$NO_3 + CH_4$	3	$6,54 \times 10^{-7}$	0,0334	121
$NO_3 + CH_4 + O_2$	3	$5,60 \times 10^{-7}$	0,0384	121
NO_3 endógeno	26,5	$4,07 \times 10^{-7}$	-	149

¹ Tempo no qual a concentração de N_2O foi a máxima

A maior fase lag presente nos reatores alimentados com nitrito pode ter ocorrido devido a um possível efeito inibitório inicial deste substrato nos organismos presentes.

Com relação à variação de metano nos reatores, não foi possível detectar diferenças significativas entre as condições testadas.

Esse fato pode ter ocorrido devido às elevadas concentrações de metano presentes nos *headspaces* dos reatores, impossibilitando a detecção de pequenas variações com os equipamentos utilizados.

Também, como a desnitrificação via nitrito necessita de menor concentração de doador de elétrons, pode-se esperar que mesmo com pequenas variações no consumo de metano, o processo de desnitrificação via nitrito forme mais N_2O que o processo via nitrato, o que explicaria os maiores valores para as concentrações deste intermediário.

De uma forma geral, como as concentrações de acetileno utilizadas para promover a inibição dos organismos metanotróficos aeróbios foram, aproximadamente, 40 vezes maiores do que as concentrações mínimas recomendadas por Bérard e Knowles, (1989) e 5 vezes àquelas utilizadas por Ren *et al* (2000), acredita-se que, nos ensaios com oxigênio, a presença de N_2O não ocorreu devido à desnitrificação suportada pela oxidação aeróbia do metano a metanol por bactérias metanotróficas e sim por outros organismos que, na presença de metano, utilizaram o nitrato ou nitrito como receptores de elétrons.

Ren *et al* (2000), ao estudarem a produção e o consumo de óxido nítrico (NO) por três diferentes espécies de bactérias metanotróficas, consideraram, entre outras possíveis causas, que a presença de N_2O , nos ensaios realizados com acetileno e meio nitrificado, possa ter ocorrido devido à capacidade de respiração do nitrato dos organismos presentes, não sendo, necessariamente, devido às bactérias desnitrificantes.

5.2.2 Etapas 5 e 6

Os resultados da atividade desnitrificante para essas duas últimas etapas foram semelhantes aos obtidos na etapa anterior.

Quando o nitrato foi a fonte de nitrogênio, a diferença entre as concentrações de N_2O formadas nos reatores alimentados com metano e os endógenos foi muito pequena no final do ensaio, porém, significativa no início.

Na fase 6, a participação do metano como fonte de carbono ficou mais evidenciada.

A Tabela 36 apresenta os resultados da atividade desnitrificante obtidos para essas duas etapas.

Tabela 36 - Resultados obtidos nos ensaios de atividade desnitrificante a partir de biomassa coletada no final das etapas 5 e 6.

Etapa	Condição	Fase lag (h)	$\text{N}_2\text{O}_{\text{Máximo}}$ (mol.L⁻¹)	Consumo de CH_4 (mol.L⁻¹)	¹t_{N₂O} (h)
5	$\text{NO}_2 + \text{CH}_4$	11	$1,56 \times 10^{-6}$	0,024	209
	NO_2 endógeno	37	$7,46 \times 10^{-7}$		209
6	$\text{NO}_3 + \text{CH}_4$	12	$7,8 \times 10^{-7}$	0,019	247
	NO_3 endógeno	31	$5,79 \times 10^{-7}$	-	247

¹Tempo onde a concentração de N_2O foi a máxima

Apesar de, nestas duas últimas etapas, a biomassa se encontrar mais adaptada às condições impostas no ensaio (desnitrificação com metano na ausência de oxigênio molecular), os resultados obtidos na etapa 4 foram melhores, principalmente com relação à fase lag e ao consumo de metano.

Isso pode ser explicado a partir da hipótese que, nas duas últimas etapas, as condições ambientais foram tão específicas que selecionaram a comunidade presente no reator, afetando o processo de desnitrificação.

Pelo exposto, e uma vez afastada a hipótese da desnitrificação com o uso de material endógeno, pode-se inferir que a presença do metano foi indispensável para a ocorrência do processo de desnitrificação em todas as condições e etapas testadas.

Porém, levando-se em consideração a inibição da enzima metanomonooxigenase (MMO) das metanotróficas pelo acetileno, tem-se: (a) o processo de desnitrificação foi realizado por organismos capazes de utilizarem anaerobiamente o metano como fonte de carbono e o nitrato como seu receptor de elétrons (Islas-lima *et al.*, 2003; Raghoebarsing *et al.*, 2006; Zehnder e Brock, 1980) ou (b) há outros organismos capazes de oxidarem o metano na presença de oxigênio, porém que não são inibidos pelo acetileno ou (c) ambas.

A hipótese de haver diferentes organismos capazes de oxidarem o metano em um mesmo nicho também foi levantada por Gullede *et al.* (1997) ao estudarem a o efeito de sais de amônia nas taxas de oxidação de metano em amostras de solo.

5.3 Influência do sulfato e cloreto na cinética de desnitrificação associada a organismos metanotróficos.

Este ensaio foi realizado para verificar se as culturas presentes no reator em estudo eram suscetíveis à concentração de cloreto no meio sintético, já que o substrato continha na sua composição cerca de 100 mg.L^{-1} de cloreto na forma de NH_4Cl .

É de se esperar que a inibição do processo metanotrófico reflita de forma negativa no processo de desnitrificação, visto que, teoricamente, os organismos oxidantes de metano são os responsáveis pela síntese de carbono orgânico utilizado pelas bactérias desnitrificantes.

Os ensaios com o sulfato também foram realizados para comparar os resultados com os da literatura.

O modelo cinético que melhor representou as variações da concentração de N-NO_3^- ao longo do tempo foi o de primeira ordem.

Nas Figuras 32 e 33 são apresentados os resultados dos ajustes cinéticos feitos para a remoção de N-NO_3^- na presença de sulfato e cloreto respectivamente.

Figura 32 - Ajuste cinético para a remoção do N-NO_3^- na presença de sulfato

Figura 33 - Ajuste cinético para a remoção do N-NO_3^- na presença de cloreto

Os reatores que receberam sulfato e cloreto não apresentaram diferenças significativas entre a variação temporal das concentrações de N-NO_3^- ao longo do tempo.

No entanto, quando se comparam tais resultados com os obtidos nos reatores que não receberam sulfato e cloreto (controles), apresentados na Figura 34, é possível verificar que as velocidades de remoção para o N-NO_3^- nestes últimos foram maiores.

Figura 34 - Ajuste cinético para a remoção do N-NO₃⁻ na ausência de cloreto e sulfato

Na Tabela 37, são apresentados os resultados obtidos para os ajustes cinéticos para a remoção de N-NO₃⁻, nas três diferentes condições.

Tabela 37 - Ajuste cinético para diferentes condições nutricionais.

RSO₄²⁻ - reatores que recebem sulfato; RCl⁻ - reatores que receberam cloreto; RC – reatores controles (ausência de cloreto e sulfato)

Reator	k _{ap} (d ⁻¹)	R ²
RSO ₄ ²⁻	0,074±0,003	0,98
RCl ⁻	0,066±0,002	0,99
RC	0,131±0,008	0,97

Ao comparar os valores das constantes cinéticas aparentes obtidas para a remoção de N-NO₃⁻ 0,074 d⁻¹, 0,066 d⁻¹ e 0,13 d⁻¹ na presença de sulfato, cloreto e na ausência desses ânions (reator controle), respectivamente, pode-se verificar que no reator controle houve melhor desempenho com relação à sua remoção.

No entanto, entre os reatores que receberam sulfato e cloreto a diferença foi menor.

Com relação às velocidades iniciais de remoção de nitrato, pode-se observar, na Figura 35, que os reatores que receberam cloreto foram os mais afetados.

Figura 35 - Velocidades de consumo de N-NO₃⁻.

Δ - reatores controle; □ - reatores alimentados com sulfato e ○ - reatores alimentados com cloreto

A Figura 36 apresenta a variação de metano (inicial menos final) nos *headspaces* dos reatores.

Figura 36 - Resultados da variação de metano nos *headspaces* dos reatores.

RC - ausência de sulfato e cloreto; RMS – ausência de inóculo – RCl⁻ – adição de cloreto, - RSO₄²⁻ – adição de sulfato. As barras de erro representam os desvios padrão.

Observa-se que os reatores que apresentaram as menores variações de metano no *headspace* foram aqueles que não receberam inóculo (RMS). Neste caso, a variação foi devida, principalmente, à retirada de alíquotas para análises, assim como pela própria

dissolução do gás no meio líquido. Desta forma, esses valores passaram a ser utilizados como referência para a mínima variação de metano em todos os reatores.

Descontando-se os valores das variações de metano obtidas nos reatores RMS, aproximadamente $0,0029 \text{ mol.L}^{-1}$, pode-se inferir que as variações médias de metano de $0,0204$, $0,017$ e $0,017 \text{ mol.L}^{-1}$ nos reatores RC, RSO_4^{2-} e RCl, respectivamente, foram devidas à sua utilização por organismos presentes no meio reacional.

A diminuição de aproximadamente 17% nos valores médios de consumo de metano nos reatores RSO_4^{2-} e RCl, com relação aos valores obtidos nos reatores controles (sem ânions), encontra-se bem abaixo do valor de 50% obtido por Visscher e Cleemput (2003) e de até 100% nos experimentos realizados por Whalen (2000).

No entanto, apesar de os experimentos relatados por esses autores terem apresentado efeitos inibitórios mais significativos que os obtidos neste ensaio, cabe ressaltar que tal efeito somente passou a ser expressivo após longos períodos de incubação na presença de cloreto (superiores a 30 dias).

Visscher e Cleemput (2003) atribuíram os resultados obtidos à mudança na predominância dos organismos metanotróficos do tipo I, no início do ensaio, para organismos metanotróficos do tipo II após 50 dias de operação.

Apesar de a literatura apresentar efeitos inibitórios mais significativos na oxidação do metano na presença de sais de cloreto do que na de sulfato (King; Schnell, 1998; Visscher; Cleemput, 2003), os resultados obtidos nesse estudo para ambos os ânions não apresentaram diferença significativa.

Porém, segundo Gullede *et al* (1997), que estudaram o efeito de sais de sulfato, cloreto e amônia em populações metanotróficas presentes em amostras de solos, além do efeito inibitório imediato destes sais sobre as diferentes populações metanotróficas, há também o efeito “retardado” devido ao stress celular.

Conforme os autores, com o passar do tempo, o stress celular leva à diminuição da população metanotrófica devido à utilização do substrato (metano) somente para o catabolismo, sem interferir na capacidade dos organismos em oxidarem metano.

Desta forma, as possíveis variações nas taxas de oxidação do metano serão mais facilmente detectadas a partir do momento em que houver significativa diminuição na população microbiana responsável por tal oxidação.

Além do mais, os autores ainda completam que a oxidação do metano observada em seus ensaios, provavelmente, ocorreu devido à presença de diferentes populações fisiologicamente diferentes, que respondem de formas distintas aos sais e às condições ambientais.

Baseando-se nos resultados obtidos para esse ensaio pode-se inferir que o fato de se utilizar os sais à base de cloreto na preparação do substrato sintético também pode ter influenciado nas baixas velocidades de conversão do nitrato.

5.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Na Figura 37 são apresentadas fotos tiradas de amostras de espuma retiradas do reator no final da parte experimental (Final da etapa 6).

Figura 37 - Imagens de MEV feitas em amostras de espuma retiradas do reator no final da parte experimental.

Como pode ser observado, as espumas se encontravam bem colonizadas. A utilização deste meio suporte se mostrou eficiente para a adesão dos microrganismos nas condições estudadas, fato este que se refletiu nos resultados de NMP obtidos após a utilização deste material no reator.

5.5 Análises de biologia molecular

5.5.1 Etapa 1 (fases A e B)

Na Figura 38 encontram-se apresentados os resultados do perfil de DGGE para o Domínio Bactéria a partir de amostras de biomassa retiradas durante a etapa 1(fases A e B) em diferentes períodos, no início e final de cada fase.

Figura 38 - Gel de DGGE (gradiente 30%-60%) com *primers* para o Domínio *Bacteria* (etapa 1, fases A e B)

Legenda: IN. Inóculo; IA – início fase A; FA – final fase A; IB – início fase B; FB – final fase B.

Ao se comparar o perfil de bandas das fases A e B, pode-se observar, conforme apresentado na Figura 38, modificação quanto à presença de algumas bandas depois do enriquecimento do substrato com uma solução de metais mais complexa (fase B) que pode ter favorecido o desenvolvimento de novos organismos.

O seqüenciamento não foi realizado por não ter sido possível extrair o DNA das amostras, a partir das bandas do DGGE.

5.5.2 Etapas 2 a 6

Na Figura 39 são apresentados os resultados do perfil de DGGE para o Domínio *Bactéria* a partir de amostras de biomassa retiradas nas etapas 2 a 6.

Figura 39 - Gel de DGGE (gradiente 30%-60%) com *primers* para o Domínio *Bactéria* (etapas 2 a 6)

Legenda: Os números na parte superior da Figura 39 (2 a 6) representam as diferentes etapas operacionais enquanto que as letras M e F são referentes às amostras retiradas na metade e no final de cada etapa, respectivamente. As setas enumeradas indicam as bandas que foram recortadas e o material genético seqüenciado para posterior identificação.

Na Figura 39 a comparação entre as amostras de uma mesma etapa, porém retiradas em períodos diferentes não apresentaram variações expressivas com relação ao perfil de bandas.

No entanto, situação diferente pode ser observada quando se comparam os perfis de DGGE para as diferentes etapas. As duas últimas (canaletas 5M, 5F e 6) foram as que

apresentaram menor número de bandas, o que indica a ocorrência de menor diversidade de microrganismos na biomassa.

Esse resultado já era esperado, pois, durante as etapas 5 e 6 as condições ambientais foram muito específicas o que, geralmente, leva a maior seletividade da comunidade. Porém, também pode se observar que, praticamente, não houve diferenças entre as etapas 5 e 6 demonstrando que a predominância da comunidade presente foi independente da presença de nitrato (canaletas 5M e F) ou nitrito (canaleta 6) no substrato

As bancas marcadas no perfil de DGGE foram recortadas e seqüenciadas.

Os resultados encontram-se apresentados na Tabela 38.

Tabela 38 Resultados do sequenciamento das bandas recortadas no DGGE com *primers* para o Domínio *Bacteria*

Banda	Microrganismo	nº acesso Genbank	Similaridade (%)	Referência
1	<i>Methylomonas</i> sp.	AF150794	98	Costello, <i>et al.</i> (1999)
2 e 3	<i>Methylomonas</i> sp.	AB015603	99	Hanada, <i>et al.</i> (1998)
4, 5 e 6	Bacteroidetes não cultivadas	EF999027	97	Laurent, <i>et al.</i> (2007)
7, 8 e 9	Bactéria não cultivada	DQ363612	92	Qin, <i>et al.</i> (2006)
10	<i>Methylomonas</i> sp.	AF150800	96	Costello, <i>et al.</i> (1999)
11	<i>Methylomonas</i> sp.	AF150798	97	Costello, <i>et al.</i> (1999)

Os resultados do seqüenciamento revelaram a presença de organismos do gênero *Methylomonas* (bandas 1, 2, 3, 10 e 11) inclusive quando o reator operou na ausência de oxigênio molecular (bandas 1, 2,3, e 10) .

Esses organismos, conforme apresentado anteriormente na Tabela 3 são classificados como organismos metanotróficos do Tipo I.

Apesar de esses organismos serem reportadas na literatura como organismos aeróbios (HANSON; HANSON, 1996). Schubert *et al.* (2006), ao estudarem a diversidade microbiana

envolvida na oxidação aeróbia e anaeróbia do metano em diferentes profundidades do Mar Negro, verificaram a presença de organismos metanotróficos do tipo I (*Methylococaceae*) à profundidade de 75 a 130 m, onde a concentração de oxigênio verificada foi menor que 1,5 μM .

Conforme os autores, a população metanotrófica representava de 0,3 a 4 % do total de células bacterianas presentes e ainda sugeriram que as mesmas eram as principais responsáveis pela oxidação do metano naquela zona.

Os seqüenciamentos realizados com amostras das bandas 1, 10 e 11, apresentaram similaridades com os organismos identificados por Costello *et al.* (1999) que estudou a população de organismos oxidantes de metano presentes em sedimentos lacustres (profundidade de, aproximadamente, 62 m), onde provavelmente as concentrações de oxigênio dissolvido são inferiores àquelas presentes na superfície.

Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem, assim como os obtidos por Islas-Lima *et al.* (2004) e Raghoebarsing *et al.* (2006), que a oxidação do metano na presença de nitrato ou nitrito é possível.

As bandas 7, 8 e 9 foram atribuídas a organismos oxidantes de amônia (QIN, *et al.*, 2006), cuja presença é compreensível, visto que amônia era oxidada a nitrito e nitrato, durante os ciclos aeróbios.

A Figura 40 mostra a árvore filogenética de consenso com *primers* para o Domínio *Bacteria* proveniente da informação de seqüências obtidas do biofilme dos reatores. Na construção da mencionada árvore filogenética, foram acrescentadas seqüências conhecidas de *Methylomonas sp.* (DQ119049), *Methylococcus capsulatus* (AJ563935) e de *Methylobacter sp.* (AJ868427).

Figura 40 - Árvore filogenética de consenso baseado nas seqüências das bandas recortadas do DGGE com *primers* para o Domínio *Bacteria*.

Os valores presentes nos nós das árvores indicam porcentagens que o ramo se repetiu (500 reamostragens de *bootstraps*). A árvore foi construída pelo método de Neighbor-Joining.

6 CONCLUSÕES

A utilização de metano como o doador de elétrons durante o processo de desnitrificação conduzido no reator aeróbio/anóxico sob as condições testadas demonstrou ser de difícil manutenção, embora tenha sido possível verificar sua ocorrência nos experimentos realizados em frascos menores e com elevados períodos reacionais.

Os resultados das análises cinéticas realizadas na presença e ausência de oxigênio revelaram que, em ambas as condições, o processo de desnitrificação se desenvolveu de forma muito lenta, apresentando constantes cinéticas aparentes de remoção de nitrogênio baixas, independentemente do receptor de elétrons (nitrato ou nitrito).

Os organismos metanotróficos se mostraram mais exigentes quanto às condições nutricionais do meio que os demais organismos aeróbios presentes. Além disso, esses organismos foram favorecidos com a utilização de meio suporte para sua imobilização e retenção no sistema.

A variação de oxigênio nas diferentes etapas afetou mais aos organismos oxidantes de nitrito que os de N-NH_4^+ ; no entanto, não foi suficiente para inibir a nitratação por longos períodos de tempo.

Esse fato também afetou o processo de desnitrificação, que resultou ser mais eficiente quando o receptor de elétrons foi o nitrito.

De acordo com os resultados de NMP, a operação do reator sob condição de aeração intermitente e meio suporte foi a que mais beneficiou os organismos metanotróficos. Por outro lado, concentrações de nitrito da ordem de $40 \text{ mg.L}^{-1}(\text{N-NO}_2^-)$, sob condições anoxigênicas, resultaram na diminuição do número estimado destes organismos.

A produção de N_2O , após a inibição da enzima metanomonooxigenase (MMO) por acetileno, leva à hipótese de que o inóculo continha organismos capazes de desnitrificar somente na presença de metano.

Os resultados das análises de biologia molecular revelaram a presença de organismos metanotróficos da espécie *Methylomonas* sp. tanto em amostras de biomassa retiradas do reator quando este operou sob condições desnitrificantes na presença de oxigênio como também naquelas retiradas quando o reator operou em condições anóxicas.

Os resultados de NMP de organismos metanotróficos obtidos com a metodologia desenvolvida neste trabalho foram coerentes com os resultados gerais de cada etapa avançada, sendo, portanto, uma técnica adequada para o acompanhamento destes organismos.

O sulfato e cloreto, nas concentrações de cerca de 100 mg.L^{-1} , afetaram a eficiência de remoção de nitrogênio, quando associado ao processo metanotrófico,

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Diante dos resultados obtidos e da dificuldade em se estabelecer o processo de desnitrificação tendo o metano como fonte de carbono sugere-se, como trabalhos futuros, o estudo dos fundamentos do processo, entre eles:

- Estudar as vias metabólicas aeróbias dos organismos metanotróficos, de maneira a verificar a liberação de subprodutos, como por exemplo, o metanol, no meio reacional.
- Realizar estudos mais aprofundados sobre a microbiologia e a bioquímica do processo de desnitrificação tendo metano como fonte de carbono e em ambiente anóxico.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELING, U.; SEYFRIED, C. F. (1992) Anaerobic-aerobic treatment of high-strength ammonium wastewater - nitrogen removal via nitrite. *Water Science and Technology*, v. 26, p. 1007-1015.

ADORNO, M. A. T.; MORAES, E. M. ; DUARTE, I. C. S. ; ZAIAT, M. ; FORESTI, E. ; VARESCHE, M. B. A. (2006). Desenvolvimento e validação de método para análise de ácidos orgânicos de cadeia curta por CG/FID. In. 10º. CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE CROMATOGRAFIA E TÉCNICAS AFINS - Campos do Jordão/SP - Livro de resumos, página 153.

ALEXANDER, M. (1982) Most probable number method for microbial populations, In: Page, A. Lee; Miller, R. H.; Keeney, D.R. *Methods of Soil Analysis, part 2 Chemical and Properties*, p. 815-830

AMARAL, J.A.; KNOWLES, R. (1995) Growth of methanotrophs in oxygen and methane counter gradients. *FEMS Microbiol.Lett.* v. 126, p. 215-220.

ARAÚJO, J. C. (1995) Acompanhamento da evolução do biofilme e caracterização química e biológica em reator de leito fluidificado tratando esgoto sanitário sintético São Carlos. Tese (Doutorado em Engenharia Civil). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

BAE, W.; BAEK, S.; CHUNG, J.; LEE,Y. (2002) Optimal operational factores for nitrite accumulation in batch reactors. *Biodegradation.* v. 12, p. 359-366.

BALMELLE, B.; NGUYEN, K.M.; CAPDEVILLE, B.; CORNER, J.C.; DEGUIN, A. (1992). Study of factors controlling nitrite build-up in biological processes for water nitrification. *Water Science and Technology*, v. 26, p. 1017-1025.

BENDER , M. e CONRD, R. (1995) Effect of CH₄ concentrations and soil conditions on the induction of CH₄ oxidation activity. *Soil Biology & Biochemistry.* v. 27, n. 12, p. 1517-1527.

BERNET, N.; DANGCONG, P.; DELGENES, J.; MOLETTA, R. (2001). Nitrification at low oxygen concentration in biofilm reactor. *Journal of Environmental Engineering.* v. 127, n. 3, p. 266-271

BITTON, G. (1994) Wastewater microbiology. Wiley-Liss Publ.,Gainesville, USA, 478 p.

BUSSMANN, I.; PESTER, M.; BRUNE, A.; SCHINK, B. (2004) Preferential cultivation of type II methanotrophic bacteria from littoral sediments (Lake Constance). *FEMS Microbiology Ecology*. v. 47, p. 179-189.

BYKOVA, S. *et al.* (2007) Response of CH₄ oxidation and methanotrophic diversity to NH₄⁺ and CH₄ mixing ratios. *Biol. Fertil. Soi.*, v. 43, n. 3, p. 341 – 348.

ÇEÇEN, F. (1996) Investigation of partial and full nitrification characteristics of fertilizer wastewaters in a submerged biofilm reactor. *Water Science and Technology*, v.34, n. 11, p.77-85.

CHOI, DONG-W *et al.* (2003) The Membrane-associated methane monooxygenase (pMMO) and pMMO-NADH: Quinone oxidoreductase complex from *Methylococcus capsulatus* Bath. *Journal of Bacteriology* v. 185, n. 19, p. 5755-5764

COSTA, C.; DIJKEMA, C.; FRIEDRICH, M.; GARDÍA-ENCINA, P.; FERNÁNDEZ-POLANCO, F.; STAMS, A.J.M. (2000). Denitrification with methane as electron donor in oxygen-limited bioreactors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 53, p. 754 – 762.

CUBA, R.M.F.(1995) *Avaliação do potencial de uso do metano como doador de elétrons para a desnitrificação em reator anóxico horizontal de leito fixo*. São Carlos 75 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

DANIEL, L.M.C.(2005) *Remoção de nitrogênio via nitrito em reator operado em bateladas sequenciais contendo biomassa imobilizada e aeração intermitente*. São Carlos. 106 p. Tese (Doutorado em Engenharia Civil). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

DiSPIRITO, A.A. *et al.*(1998) Copper –binding compounds from *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Journal of Bacteriology*. v. 180, n. 14, p. 3606-3613.

DUNFIELD, P; KNOWLES, R.; DUMONT, R.; MOORE, T.R. (1993) Methane production and consumption in temperate and subarctic peat soils – response to temperature and pH. *Soil Biology & Biochemistry*. v. 25, p. 321-326.

EISENTRAEGER, A.; KLAG, P.; VANSBOTTER, B.; HEYMANN, E.; DOTT, W. (2001) Denitrification of groundwater with methane as sole hydrogen donor. *Water Research*. v. 35, n. 9, p. 2261-2267.

GARRIDO, J.M.; BENTHUM, W.A.J.; LOOSDRECHT, M.C.M; HEIJNEN, J.J. (1997) Influence of dissolved oxygen concentration on nitrite accumulation in a biofilm airlift suspension reactor. *Biotechnology and Bioengineering*. v. 53, p. 168-178.

GEE, C.S.; KIM, J.S. (2004). Nitrite accumulation followed by denitrification using sequencing batch reactor. *Water Science and Technology*, v. 49, n. 5-6, p. 47-55.

GRAHAM, D.W.; CHANDHARY, J.A.; HANSON, R.S.; ARNOLD R.G. (1993) Factors affecting competition between type I and type II methanotrophs in continuous-flow reactors. *Microbiology Ecology*, v. 25, p. 1-17

GREEN, P. N. (1992). The genus *Methylobacterium*, p. 2342–2349. In BALOW, TRUPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K. H. (ed.), **The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications**. Springer-Verlag, New York, N.Y.

HANAKI, K.; POLPRASERT, C. (1989). Contribution of methanogenesis to denitrification with an upflow filter. *J. Water Pollut. Control Fed.* v. 61, p. 1604-1611.

HANSON, R. e HANSON, T. (1996) Methanotrophic bacteria. *Microbiological Reviews*. v. 60, n. 2, p. 439-471.

HELMER, C.; KUNST, S. (1998) Simultaneous nitrification/denitrification in an aerobic biofilm system. *Water Science and Technology*, v. 37, n. 4-5, p. 183-187.

HENZE, M; HARREMOES, P.; JANSEN, J.C.; ARVIN, E. (1997) *Wastewater Treatment . Biological and Chemical Processes* 2nd ed. Germany: Springer.

HOUBRON, E.; TORRIJOS, M.; CAPDEVILLE, B. (1999). An alternative use of biogas applied at the water denitrification. *Water Science and Technology*, v. 40, n. 8, p. 115 – 122.

ISLAS-LIMA, S.; THALASSO, F.; GOMEZ-HERNANDEZ, J. (2004) Evidence of anoxic methane oxidation coupled to denitrification *Water Research*. v. 38, n. 1, p.13 -16

KIM, H.; LEE, I.; BAE, J. (2004) Performance of a sulphur-utilizing fluidized bed reactor for post-denitrification . *Process Biochemistry* v. 39, p. 1591 – 1597

KING, G.M.; SCHNELL, S. (1994) Ammonium and nitrite inhibition of methane oxidation by *Methylobacter albus* BG8 e *Methylosinus trichosporium* OB3b at low methane concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 60, n. 10, p. 3508-3513.

KING, G.M. e SCHNELL, S. (1998) Effects of ammonium and non-ammonium salt additions on methane oxidation by *Methylosinus trichosporium* OB3b and maine forest soils. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 64, n.1, p. 253-257.

KLEEREBEZEM, R. e MENDEZ, R. (2002) Autotrophic denitrification for combined hydrogen sulfide removal from biogas and post-denitrification. *Water Science and Technology*, v. 45, n. 10, p. 349 – 356.

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

LEE, H.; BAE, J.; CHO, K.; (2001) Simultaneous nitrification and denitrification in a mixed methanotrophic culture. *Biotechnology Letters*, v. 23, p. 935-941.

LIDSTROM, M.E. (1992) The aerobic methylotrophic bacteria In BALOWS, A.; TRÜPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W. E SCHLEIFER, K.-H. **The prokaryotes**, 2nd ed. Springer-Verlag, New York, N.Y. p. 431-445

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. (1998) In: BROCK T. D. **Biology of microorganisms** 8nd ed . Prentice Hall International, Inc. New Jersey, 986 p.

MALASHENKO, Y.R.; SOKOLOV, I; ROMANOVSKAYA, V. (2000) Role of monooxygenase reaction during assimilation of non-growth substrates by methanotrophs. *Journal of Molecular Catalysis by Enzymatic*. v. 10, p. 305-312.

MAURET, M.; PAUL, E; PUECH-COSTES, E; MAURETTE, M.; BAPTISTE, P. (1996) Application of experimental research methodology to the study of nitrification in mixed culture. *Water Science and Technology*, v. 34, n. 1-2, p. 245-252.

MOHANTY, S.R. *et al.* (2000) Influence of heavy metals on methane oxidation in tropical rice soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 47, p. 277-284

MOSQUERA-CORRAL, A.; SÁNCHEZ, M; CAMPOS, J.L.; MÉNDEZ, R.; LEMA, J.M. (2001). Simultaneous methanogenesis and denitrification of pretreated effluents from a fish canning industry. *Water Research*. v. 35, n. 2, p. 411-418

MÜNCH, E.V.; LANT, P.; KELLER, J. (1996) Simultaneous nitrification and denitrification in bench-scale sequencing batch reactors. *Water Research*. v. 30, n. 2, p. 277-284-418

MUYZER, G.; WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, G. (1993). Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S RNAr. *App. Env. Micr.*, v.59, n.3, p.695-700.

NATION, J.L. (1983) A new method using hexamethyldilazane for preparation of soft tissues for scanning electron microscopy. *Stain Technol.* v. 58, p. 347 – 351

NEWBY, D.T. *et al.* (2004) diversity of methanotroph communities in a basalt aquifer *FEMS Microbiology Ecology*. v. 48, p. 333-344.

OMEL' CHENKO, L.; VASIL'EVA,V.; KHEMELENINAV.N.; TROTSSENKO Y.A. (1993) Pathways of primary and intermediate metabolism in a psychrophilic methanotrophic. *Microbiology*. v. 62, p. 509-512

PASSIG, F.H.; CAMPOS, J.R. (2004) Reator anaeróbio híbrido para tratamento de esgoto sanitário.In. SEMINÁRIO DO PROJETO TEMÁTICO DESENVOLVIMENTO, ANÁLISE, APRIMORAMENTO E OTIMIZAÇÃO DE REATORES ANAERÓBIOS PARA TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS, 3, 2004, São Caetano do Sul-SP.

PAWLOWSKA, M.; STEPNIEWSKI, W. (2006) An influence of methane concentration on the methanotrophic activity of a model landfill cover. *Ecology Engineering* v. 26, n. 4, p. 392-395

POCHANA, K.,;KELLER, J. (1999) Study of factors affecting simultaneous nitrification and denitrification (SND). *Water Science and Technology*, v. 39, n. 6, p. 61-68.

RAGHOEBARSING *et al.* (2006) A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature* v. 44, p. 918-921

RAJAPAKSE, J.P.; SCUTT, J.E. (1999) Denitrification with natural gas and various new growth media. *Water Research*, v. 33, n. 18, p. 3726 – 3734

REYES-AVILA, J.; RAZO-FLORES, E.; GOMEZ, J. (2004) Simultaneous biological removal of nitrogen, carbon and sulfur by denitrification. *Water Research*. v. 38, p. 3313 – 3321.

RUIZ, G.; JEISON, D.; CHAMY, R. (2002) Denitrification with high nitrite accumulation for the treatment of wastewater with high ammonia concentration. *Water Research*, v. 37, p. 1371 – 1377

SANTOS, S.G. (2003) *Utilização do metanol, etanol e metano como doadores de elétrons para a desnitrificação*. São Carlos, 129 p. Tese (Doutorado em Engenharia Civil). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

SCHMIDT, E.L.; BELSER, L.W. (1984) In: PAGE, A. LEE; MILLER, R. H.; KEENEY, D.R. *Methods of Soil Analysis. Winsconsin: American Society of Agronomy*, cap.48. p. 1027-1042

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

Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater (1995). 19th. ed. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington,DC,USA.

TÉLLEZ, C.M, *et al.* (1998) Isolation of copper biochelates from *Methylosinus trichosporium* OB3b and soluble methane monooxygenase mutants. *Applied Environmental Microbiology*. v. 64, n. 3, p. 1115-1122..

THALASSO, F.; VALLECILLO, A.; GARCÍA-ENCINA, P.; FDZ-POLANCO, F. (1997). The use of methane as a sole carbon source for wastewater denitrification. *Water Research*, v. 31, n. 1, p. 55 – 60.

TIEDJE, J.M. (1982) Denitrification. In: PAGE, A. LEE; MILLER, R. H.; KEENEY, D.R. *Methods of Soil Analysis. Winsconsin: American Society of Agronomy*, p. 1011-1041.

VAN LOOSDRECHT, A.A.; JETTEN, M.S.M (1998) Microbiological conversions in nitrogen removal. *Water science technology*, v. 38, n. 1, p- 1-7.

VISSCHER, A. e CLEEMPUT, O. (2003) Induction of enhanced CH₄ oxidation in soils: NH₄⁺ inhibition patterns. *Soil Biology & Biochemistry*. v. 35, p.907-913

WAKI, M.; TANAKA, Y.; OSADA, T.; SUZUKI, K. (2002) Effects of nitrite and ammonium on methane-dependent denitrification. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 59, p. 338-343..

WAKI, M.; TANAKA, Y.; OSADA, T.; SUZUKI, K. (2005) Methane-dependent denitrification by semi-partitioned reactor supplied separately with methane and oxygen. *Bioresource Technology*, v. 96, p. 921-927.

WERNER, M. ; KAYSER, R. (1991) Denitrification with biogas as external carbon source *Water Science and Technology*, v. 23, p. 701-708.

WHALEN, S.C. (2000) Influence of N and non-N salts on atmospheric methane oxidation by upland boreal forest and tundra soils. *Biol. Fertil. Soils*, v. 31, p. 279-287.

YOO, H.; AHN, K; LEE, H.; LEE, K.; KWAK, Y.; SONG, K. (1999). 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

ZAHN, J. A.; DiSPIRITO, A.A. (1996) Membrane-associated methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* Bath. *Journal of Bacteriology* v. 178, p. 1018-1029.

ZAIAT, M; CABRAL, A. K.A.; FORESTI, E. (1994) Horizontal-flow anaerobic immobilized sludge reactor for wastewater treatment conception and performance evaluation *Revista Brasileira de Engenharia – Caderno de Engenharia Química*, v. 11, p. 33-42