

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Escola de Engenharia de São Carlos

**TRATAMENTO ANAERÓBIO DE ÁGUA RESIDUÁRIA SALINA,  
SEGUIDO DE NITRIFICAÇÃO/DESNITRIFICAÇÃO SIMULTÂNEAS E  
DESNITRIFICAÇÃO AUTOTRÓFICA COM SULFETO**

CRISTIANE ARRUDA DE OLIVEIRA

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic



CRISTIANE ARRUDA DE OLIVEIRA

Tratamento anaeróbio de água residuária salina, seguido de  
nitrificação/desnitrificação simultâneas e desnitrificação  
autotrófica com sulfeto

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Helena  
Rissato Zamariolli Damianovic

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos

2023

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

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

O48t Oliveira, Cristiane Arruda  
Tratamento anaeróbico de água residuária salina, seguido de nitrificação/desnitrificação simultâneas e desnitrificação autotrófica com sulfeto / Cristiane Arruda Oliveira; orientadora Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic. São Carlos, 2023.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2023.

1. Águas salinas. 2. Água produzida em plataformas de óleo e gás. 3. Metanogênese. 4. Nitrificação e desnitrificação simultâneas. 5. Desnitrificação heterotrófica. 6. Sulfetogênese. 7. Sistema de tratamento combinado anaeróbico/aeróbico/anóxico. I. Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907



## FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Engenheira **CRISTIANE ARRUDA DE OLIVEIRA.**

Título da tese: "Tratamento anaeróbio de água residuária salina, seguido de nitrificação/desnitrificação simultâneas e desnitrificação autotrófica com sulfeto".

Data da defesa: 23/06/2023.

### Comissão Julgadora

### Resultado

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

Aprovada

Dr. **Lucas Tadeu Fuess**  
(Autônomo)

Aprovada

Profa. Dra. **Ana Cláudia Barana**  
(Universidade Estadual de Ponta Grossa/UEPG)

Aprovada

Profa. Dra. **Carla Eloísa Diniz dos Santos**  
(Universidade Federal do Triângulo Mineiro/UFTM)

Aprovada

Prof. Dr. **Paulo Igor Milen Firmino**  
(Universidade Federal do Ceará/UFC)

Aprovada

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

Prof. Associado **Juliano Jose Corbi**



A vó Valdomira e a memória de meus avós Luiz, Nelly e Orlando  
por serem exemplos de força, coragem e dedicação.

Aos meus pais, Miguel e Célia por me proporcionarem a  
oportunidade constante de aprender.

Aos meus irmãos, Gustavo e Thais por todos os conselhos e apoio.



## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade da vida em toda sua plenitude.

Aos meus pais, Célia e Miguel, pela dedicação, amor e por fazerem sempre o melhor para a família.

Aos meus avós Nelly e Luiz, Valdomira e Orlando, por me proporcionarem a família que eu tenho e por sempre serem exemplos de dedicação, força e trabalho.

Aos meus irmãos pelo amor, apoio e conselhos.

Ao Rafael, por ser parceiro de vida e entrar de coração em todas as minhas ideias mais malucas. Mas acima de tudo por sempre estar presente, me ouvindo, me apoiando e me ajudando nessa caminhada de vida e na busca da evolução como ser humano.

Aos meus cunhados, Paula e Eduardo, por terem entrado na nossa família e agregar para que todos se tornem pessoas melhores. Aos meus tios, Keko, Cesinha, Vera e Lu. A Luna, Ted, Billy e Amora que restauram minha energia nos momentos mais difíceis e cansativos.

À minha orientadora, Márcia, que me acompanhou nessa jornada por 7 anos. Por ter acreditado em mim, pela compreensão, respeito, ensinamentos e pelos “puxões de orelha” que me ajudaram a crescer. E principalmente por ser um exemplo de mulher cheia de força, garra e coragem.

A todo pessoal do LPB, vocês se tornaram uma família para mim e guardo com muito carinho cada uma das memórias que vivi com vocês, seja nas discussões de resultados, nos choros e risadas. Obrigada por tanto.

Ao Lucas, você é um irmão para mim, e que orgulho que sinto em poder te chamar a partir de agora Professor, você merece muito, desfrute de cada momento.

À Carol Sabatini, Janja, Mariê, Luciana, Rafa, Rhayssa, Carol Tavares, Paulinha, Rodrigo Carneiro, Carla, Renata, Drica, Lais e Matheus por toda atenção, carinho e sugestões que me fizeram crescer profissionalmente, mas além disso, que me ajudaram a desenvolver olhar humano para tudo que faço. À Bel e Elô por toda ajuda ao longo desses anos.

Aos professores Eugênio Foresti, Marcelo Zaiat, Márcia Damianovic, Guilherme Oliveira, Rachel Biancalana, Theo Syrto, Eduardo Penteado, Lucas Fuess, Carla Diniz

por compartilharem ensinamentos e serem grandes exemplos para mim. Que privilégio que a vida me proporcionou.

Ao SHHG por todo apoio. Obrigada por me acompanharem nessa jornada e serem um apoio nos momentos difíceis e riso fácil nos momentos alegres.

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos 2017/22952-4 e 2015/06246-7, pelo fornecimento da bolsa e auxílio financeiro complementar na realização da pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro complementar na realização da pesquisa.

À Universidade de São Paulo (USP), mais especificamente a Escola de Engenharia de São Carlos por ter sido minha casa por mais de 11 anos durante a graduação, mestrado e doutorado, quem sabe um dia nos reencontramos.

Obrigada de coração a todos do LPB. Aos novos alunos e professores, cuidem bem desse laboratório, tenho um carinho enorme por tudo e todos.

Meus sinceros agradecimentos.

“Onde estiver seu medo, aí estará sua tarefa”

*Carl Jung*

## RESUMO

OLIVEIRA, C.A. **Tratamento anaeróbio de água residuária salina, seguido de nitrificação/desnitrificação simultâneas e desnitrificação autotrófica com sulfeto.** 2023. 164 p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2023

Na presente pesquisa investigou-se o efeito da salinidade no desempenho de reatores de leito estruturado anaeróbio, aeróbio e anóxico inoculados com lodos não halofílicos para tratamento de efluente sintético com salinidade, matéria orgânica, nitrogênio amoniacal ( $\text{N-NH}_4^+$ ) e sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) baseados em água produzida em plataformas de extração de petróleo e gás. Em ensaios em batelada foram avaliados a cinética para produção de metano e redução de  $\text{SO}_4^{2-}$  na presença de salinidade variando de 0 a 35 g-NaCl  $\text{L}^{-1}$ , sem a adaptação gradual à mesma. A produção de metano decaiu em elevadas salinidades, com valores variando de 139 a 29 NmL para 15,6 e 35 g-NaCl  $\text{L}^{-1}$ , respectivamente. A redução de  $\text{SO}_4^{2-}$  foi afetada a partir de 10,4 g-NaCl  $\text{L}^{-1}$ , em que a constante cinética aparente variou de 0,06 (0 g-NaCl  $\text{L}^{-1}$ ) a 0,014  $\text{h}^{-1}$  (10,4 g-NaCl  $\text{L}^{-1}$ ). Os resultados permitiram concluir que as bactérias redutoras de sulfato (BRS) foram as primeiras afetadas pela salinidade, desequilibrando o sistema, e levando ao acúmulo de ácidos. Em reator anaeróbio contínuo, com DQO/ $\text{SO}_4^{2-}$  de 1,6, a salinidade foi incrementada de 1,7 para 50,0 g-NaCl  $\text{L}^{-1}$ . Os resultados mostraram que até 35 g-NaCl  $\text{L}^{-1}$ , arqueias metanogênicas (AM) e BRS participaram igualmente na conversão de DQO. Na presença de 50 g-NaCl  $\text{L}^{-1}$ , a eficiência de remoção de DQO decaiu em 46% associada ao acúmulo de acetato, com participação da via sulfetogênica de 62%. A atividade sulfetogênica foi menos sensível a altos níveis de salinidade em comparação com a metanogênese, resultado contrário aos obtidos nos ensaios em batelada. Em seguida foi avaliado um reator de nitrificação e desnitrificação simultâneas (NDS) e apenas nitrificante com salinidade de 0 a 35 g-NaCl  $\text{L}^{-1}$ . A eficiência de oxidação do  $\text{N-NH}_4^+$  foi de 95%. Porém, para 35 g-NaCl  $\text{L}^{-1}$  houve acúmulo de nitrito, durante a operação do reator NDS. A variação do oxigênio dissolvido de 6 para 3 mg- $\text{O}_2$   $\text{L}^{-1}$  e o retorno para 6 mg- $\text{O}_2$   $\text{L}^{-1}$  permitiu inferir que a perda de eficiência da  $\text{N-NH}_4^+$  ocorreu devido a salinidade. O residual de nitrato, presente no efluente do reator aeróbio, indicou a possibilidade de processo de tratamento sequencial utilizando biogás rico em sulfeto, gerado no reator anaeróbio na relação N/S de 1,6. Ao reator desnitrificante autotrófico foi adicionada salinidade de 0 a 15,6 g-NaCl  $\text{L}^{-1}$ . A viabilidade desse processo foi observada para 10,4 g-NaCl  $\text{L}^{-1}$ , sendo observado em concentrações superiores o acúmulo de nitrito na ordem de 30 mg-N- $\text{NO}_2^-$   $\text{L}^{-1}$ .

**PALAVRAS-CHAVE:** Águas salinas. Água produzida em plataformas de óleo e gás. Metanogênese. Nitrificação e desnitrificação simultâneas. Desnitrificação autotrófica. Sulfetogênese. Sistema de tratamento combinado anaeróbio/aeróbio/anóxico.



## ABSTRACT

OLIVEIRA, C.A. **Anaerobic treatment of saline wastewater with simultaneous nitrification/denitrification and autotrophic denitrification with sulfide**. 2023. 164 p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2023

In the present research, the effect of salinity on the performance of anaerobic, aerobic and anoxic structured bed reactors inoculated with non-halophilic sludge was investigated for the treatment of synthetic effluent with salinity, organic matter, ammonia nitrogen ( $\text{N-NH}_4^+$ ) and sulfate ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) based on water produced in oil and gas extraction platforms. Batch tests evaluated the kinetics for methane production and  $\text{SO}_4^{2-}$  reduction in the presence of salinity ranging from 0 to 35 g-NaCl  $\text{L}^{-1}$ , without gradual adaptation to it. Methane production declined at high salinities, with values ranging from 139 to 29 NmL for 15.6 and 35 g-NaCl  $\text{L}^{-1}$ , respectively. The reduction of  $\text{SO}_4^{2-}$  was affected from 10.4 g-NaCl  $\text{L}^{-1}$ , where the apparent kinetic constant ranged from  $0.06 \text{ h}^{-1}$  - 0 g-NaCl  $\text{L}^{-1}$  to  $0.014 \text{ h}^{-1}$  - 10.4 g-NaCl  $\text{L}^{-1}$ . The results allow us to conclude that the sulfate-reducing bacteria (BRS) were the first affected by salinity, unbalancing the system and leading to acid accumulation. In a continuous anaerobic reactor, with COD/ $\text{SO}_4^{2-}$  of 1.6, the salinity was increased from 1.7 to 50.0 g-NaCl  $\text{L}^{-1}$ . The results showed that up to 35 g-NaCl  $\text{L}^{-1}$ , methanogenic archaea (MA) and BRS equally participated in the COD conversion. In the presence of 50 g-NaCl  $\text{L}^{-1}$ , COD removal efficiency ranged from 83 to 44% associated with acetate accumulation, with a 62% participation of the sulfidogenesis. Sulfetogenic activity was less sensitive to high salinity levels compared to methanogenesis, contrary to results obtained in batch tests. Next, a simultaneous nitrification and denitrification reactor (NDS) and only nitrifier with salinity from 0 to 35 g-NaCl  $\text{L}^{-1}$  were evaluated. The oxidation efficiency of  $\text{N-NH}_4^+$  was 95%. However, for 35 g-NaCl  $\text{L}^{-1}$  there was an accumulation of nitrite during the operation of the NDS reactor. The variation of dissolved oxygen from 6 to 3 mg- $\text{O}_2 \text{ L}^{-1}$  and the return to 6 mg- $\text{O}_2 \text{ L}^{-1}$  allowed us to infer that the loss of  $\text{N-NH}_4^+$  efficiency was due to salinity. The residual nitrate, present in the effluent from the aerobic reactor, indicated the possibility of a sequential treatment process using biogas rich in sulphide, generated in the anaerobic reactor at an N/S ratio of 1.6. To the autotrophic denitrifying reactor was added salinity from 0 to 15.6 g-NaCl  $\text{L}^{-1}$ . The viability of this process was observed for 10.4 g-NaCl  $\text{L}^{-1}$ , with nitrite accumulation in the order of 30 mg- $\text{N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$  being observed at higher concentrations.

**KEYWORDS:** Autotrophic denitrification Combined anaerobic/aerobic/anoxic treatment system. Methanogenesis. Saline waters. Simultaneous nitrification and denitrification. Sulfidogenesis. Water produced in oil and gas extraction platforms.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1.Ciclo do enxofre e as principais formas de oxidação (-2 a +6).....	38
Figura 2.2.Rotas metabólicas para degradação do etanol, hidrogênio e acetato: (a) sistema com dominância das metanogênicas; (b) sistema com dominância das bactérias redutoras de sulfato. ....	40
Figura 4.1. Imagem do reator anaeróbico e a biomassa aderida em espuma de poliuretano após os 580 dias de operação.....	51
Figura 4.2.Imagem do reator anóxico e a biomassa aderida em espuma de poliuretano após os 100 dias de operação.....	51
Figura 4.3. Imagem do reator aeróbico e a biomassa aderida em espuma de poliuretano após os 480 dias de operação.....	52
Figura 4.4. Desenho esquemático dos reatores contínuos e seus principais equipamentos .....	53
Figura 5.1. Eficiência total de remoção de matéria orgânica via metanogênese e sulfetogênese em diferentes salinidades .....	67
Figura 5.2. Eficiência de redução de sulfato e sulfeto em meio líquido de acordo com as diferentes concentrações de salinidade.....	69
Figura 5.3. Produção de metano (acumulado) para diferentes salinidades. (a) 0 g-NaCl L <sup>-1</sup> ; (b) 2,3 g-NaCl L <sup>-1</sup> ; (c) 4,6 g-NaCl L <sup>-1</sup> ;(d)10,4 g-NaCl L <sup>-1</sup> ; (e) 15,6 g-NaCl L <sup>-1</sup> ; (f) 23,0 g-NaCl L <sup>-1</sup> ; (g) 35,0 g-NaCl L <sup>-1</sup> .....	71
Figura 5.4. Valores da velocidade de produção de metano obtidos para diferentes salinidades devido ao NaCl. ....	72
Figura 5.5. Cinética de redução de sulfato para diferentes salinidades. (a) 0 g-NaCl L <sup>-1</sup> ; (b) 2,3 g-NaCl L <sup>-1</sup> ; (c) 4,6 g-NaCl L <sup>-1</sup> ;(d)10,4 g-NaCl L <sup>-1</sup> ; (e) 15,6 g-NaCl L <sup>-1</sup> ; (f) 23,0 g-NaCl L <sup>-1</sup> ; (g) 35,0 g-NaCl L <sup>-1</sup> .....	75
Figura 5.6. Comportamento das constantes cinéticas aparente obtidas na redução de sulfato para diferentes salinidades devido ao NaCl.....	76
Figura 5.7. Gêneros mais abundantes detectados em amostras de biomassa com base em sequências classificadas do gene 16s rRNA nos ensaios em bateladas utilizando inóculo não adaptador para salinidades variando de 0,00 a 35,00 g-NaCl L <sup>-1</sup> .....	78
Figura 6.1. (A) Perfil temporal para eficiência de remoção de DQO e sulfato (Δ) e (B) participação da metanogênese e sulfetogênese na remoção de matéria orgânica para diferentes concentrações de salinidade (---). ....	91

Figura 6.2. (A) Perfil temporal para alcalindade total (AT) e (B) discriminação de AT (%) de acordo com cada nível de salinidade..	92
Figura 6.3. Distribuição de compostos de enxofre em diferentes níveis de salinidade em efluentes líquidos e correntes de biogás..	94
Figura 6.4.(A) Composição do biogás e (B) Rendimento de metano..	99
Figura 6.5.Gêneros mais abundantes detectados em amostras de biomassa com base em sequências classificadas do gene 16s rRNA (Fase IX: 35 g-NaCl L-1; Fase X_A: 50 g-NaCl L-1 - biomassa em suspensão; Fase X_B: 50 g-NaCl L-1 - biomassa aderida)..	102
Figura 7.1. Perfil temporal para as fases com matéria orgânica (fase I a XI) afluyente (●) e efluente, eficiência de remoção de DQO, e concentrações de salinidade em cada fase (-)	114
Figura 7.2. Variação da fração de nitrogênio para os diferentes níveis de salinidade e oxigênio dissolvido.....	117
Figura 7.3. variação da amônia livre no sistema aeróbio de acordo com a variação da salinidade, oxigênio dissolvido. ....	119
Figura 7.4. Gêneros mais abundantes detectados em amostras de biomassa suspensa e aderida com base em sequências classificadas do gene 16s rRNA em diferentes fases do reator aeróbio para diferentes salinidades variando de 0,00 a 50,00 g-NaCl L <sup>-1</sup> .....	120
Figura 8.1. Variação da alcalinidade afluyente e efluente para as diferentes concentrações de salinidade. ....	132
Figura 8.2. Variação da concentração de Nitrito, nitrato e sulfato no efluente nas diferentes concentrações de salinidade devido ao NaCl.....	133
Figura 8.3. Variação da fração de nitrogênio para os diferentes níveis de salinidade e oxigênio dissolvido.....	134
Figura 8.4. Concentração de H <sub>2</sub> S em ppmv e eficiência de remoção de H <sub>2</sub> S consumido pela desnitrificação para diferentes concentrações de salinidade.....	134
Figura 9.1.Balanço global dos reatores contínuos anaeróbio, aeróbio e anóxico.....	139

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Caracterização da água produzida em plataformas de óleo e gás.....	35
Tabela 2.2. Principais reações de redução de sulfato e produção de metano a partir de diferentes doadores e elétrons e seus respectivos valores de energia livre de Gibbs. ....	39
Tabela 4.1. Principais equações utilizadas para verificação do desempenho do reator R1 .....	57
Tabela 4.2. Principais equações utilizadas para verificação do desempenho do reator R2 .....	58
Tabela 4.3. Principais equações utilizadas para verificação do desempenho do reator R3 .....	59
Tabela 5.1. Salinidades devido ao cloreto de sódio utilizados em ensaios em batelada e suas respectivas concentrações de íon sódio, pressão osmótica (atm e Wt%) .....	63
Tabela 5.2.Desempenho geral de testes em batelada para diferentes concentrações de NaCl.....	68
Tabela 5.3.Parâmetros cinéticos obtidos para a produção de metano em diferentes salinidades .....	73
Tabela 5.4.Parâmetros cinéticos obtidos para a redução de sulfato em diferentes salinidades .....	77
Tabela 6.1.Fases de operação aplicadas no AnSTBR de acordo com os diferentes níveis de salinidade e pressão osmótica .....	87
Tabela 7.1.Fases de operação de acordo com as diferentes salinidades devido ao cloreto de sódio, demanda química de oxigênio, oxigênio dissolvido e níveis de pressão osmótica. ....	111
Tabela 7.2. Resumo dos parâmetros analisados para cada fase e salinidade do AnSTBR - reator aeróbio.....	115
Tabela 8.1. Fases de operação de acordo com as diferentes salinidades devido ao cloreto de sódio, relação N/S e carga de sulfeto aplicado ao sistema desnitrificante.....	127
Tabela 8.2. Resumo dos parâmetros analisados para cada fase e salinidade do AnSTBR - reator anóxico .....	131



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A.R: Água residuária

AAGV: Alcalinidade a ácidos graxos voláteis

Abic: Alcalinidade ao íon bicarbonato

AD: Anaerobic digestion (Digestão anaeróbia)

AGV: Ácidos graxos voláteis

AI: alcalinidade intermediária

AM: arqueias metanogênicas

AnSTBR: anaerobic structured bed reactor (reator anaeróbio de leito fixo estruturado)

Ap; Alcalinidade parcial

ATP: Adenosina trifosfato

AVT: Ácidos voláteis totais

BOA: Bactérias oxidadoras de amônia

BON: Bactérias oxidadoras de nitrito

BOS: Bactérias oxidadoras de enxofre

BRS: Bactérias redutoras de sulfato

BTEX: Benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno

COT carbono orgânico total

CSTR: Continuous stirred tank reactor (Reator de agitação contínua)

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DQO: Demanda química de oxigênio

EESC: Escola de Engenharia de São Carlos

GB: Glicina betaína

LPB: Laboratório de Processos Biológicos

MO: Matéria orgânica

NCBI: National center for biotechnology information

NDS: Nitrificação e desnitrificação simultâneas

OD: Oxigênio dissolvido

PU: Poliuretano

Rpm: Rotação por minuto

SBRRIA: Reactor subjected to recirculation and intermittent aeration (Reator de leito estruturado com recirculação e aeração intermitente)

SSF: Sólidos suspensos fixos

SST: Sólidos suspenso totais

SSV: Sólidos suspensos voláteis

STD: Sulfeto total dissolvido

SV: Sólidos voláteis

TDH: Tempo de detenção hidráulico

UASB: Upflow Anaerobic Sludge Blanket (Reator anaeróbio de fluxo ascendente)

USP: Universidade de São Paulo

## LISTA DE SÍMBOLOS

%DQO metanogênese: Porcentagem de matéria orgânica removida via metanogênese

%DQO sulfetogênese: Porcentagem de matéria orgânica removida via sulfetogênese

%Ef SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>: Eficiência de conversão de sulfato

%EfDQO: Eficiência de remoção de matéria orgânica

°C: Temperatura em graus celsius

CO: Concentração inicial de sulfato

Ca<sup>2+</sup>: Íon de cálcio

CaCO<sub>3</sub>: Carbonato de cálcio

CH<sub>4</sub>: Metano

Cl<sup>-</sup>:Íon cloreto

CO<sub>2</sub>: Gás carbônico

Cres: Concentração residual de sulfato

DQOaf: Concentração de matéria orgânica afluenta medida em demanda química de oxigênio

DQOef: Concentração de matéria orgânica efluente medida em demanda química de oxigênio

F/B: Relação filo Firmicutes e Bacteroidota

F/M: Relação food/ microrganismo (alimento /microrganismo)

fCH<sub>4</sub>: Fração de metano no biogás no tempo “n”

h: Tempo em hora

H<sup>+</sup>: Íon de hidrogênio

H<sub>2</sub>: Hidrogênio

H<sub>2</sub>O: Água

H<sub>2</sub>S: Sulfeto de hidrogênio

HAc: Acetato

HCl: Ácido clorídrico

HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>: Íon carbonato

i: Fator de Van't Hoff

K: Temperatura em kelvin

$K^+$ : Íon de potássio  
 $K_{app}$ : Constante cinética aparente  
 $k-CH_4$ : Velocidade de produção de metano  
M: Molaridade  
MEPcum: Produção cumulativa de metano  
MM: Massa molar  
MY: Rendimento de metano  
N/S: Relação nitrogênio e enxofre  
 $N_2$ : Nitrogênio gasoso  
 $Na^+$ : Íon sódio  
NaCl: Cloreto de sódio  
NaOH: Hidróxido de sódio  
 $nCH_{4,n}$ : Número de mols de metano  
 $N-NH_3^+$ : Íon de amônia livre  
 $N-NH_4^+$ : Nitrogênio da forma amoniacal  
 $N-NO_2^-$ : Nitrogênio na forma de nitrito  
 $N-NO_3^-$ : Nitrogênio na forma de nitrato  
 $NO_2^-$ : Íon nitrito  
 $NO_3^-$ : Íon nitrato  
 $O_2$ : Oxigênio  
 $P_0$ : Pressão atmosférica local  
pH: Potencial hidrogeniônico  
Qafluente: Vazão afluente  
R: Constante universal dos gases perfeitos  
 $S_0$ : Enxofre elementar  
 $S^{2-}$ : Íon sulfeto  
 $S_2O_3^{2-}$ : Íon tiosulfato  
 $SO_4^{2-}$ : Íon sulfato  
 $SO_4^{2-}af$ : Concentração de íon sulfato afluente  
 $SO_4^{2-}ef$ : Concentração de íon sulfato efluente

T: Temperatura

UV: Ultravioleta

VCH<sub>4</sub>: Volume de metano no headspace

Vheadspace: Volume do headspace

Vreator: Volume do reator

Vutil: Volume útil

Wt%: Porcentagem em peso, do inglês weight percent

ZnCl<sub>2</sub>: Cloreto de zinco

ZnS: Sulfeto de zinco

$\pi$  total: Pressão osmótica em atmosférica

PCH<sub>4</sub>: Produção máxima de metano



## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>30</b>
<b>1.1 Delineamento da tese</b> .....	<b>32</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>34</b>
<b>2.1 ÁGUA PRODUZIDA EM PLATAFORMAS DE ÓLEO E GÁS</b> .....	<b>34</b>
<b>2.3 Digestão anaeróbia e a influência da concentração de compostos de enxofre na competição entre organismos metanogênicos e sulfetogênicos</b> .....	<b>37</b>
2.3.1 Toxicidade de compostos de enxofre na Digestão anaeróbia.....	40
<b>2.4 Processos de nitrificação e de desnitrificação</b> .....	<b>41</b>
<b>2.6 Desnitrificação autotrófica</b> .....	<b>43</b>
<b>2.7 Tratamento microbiológico de águas salinas</b> .....	<b>45</b>
<b>3. HIPÓTESES E OBJETIVOS</b> .....	<b>47</b>
<b>4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>49</b>
4.1.5 Material suporte .....	54
<b>4.1. Avaliação do desempenho dos reatores: Métodos analíticos e cálculos</b> ....	<b>54</b>
<b>CAPÍTULO 5</b> .....	<b>60</b>
<b>5. EFEITO DA SALINIDADE NA PRODUÇÃO DE METANO E NA REDUÇÃO DE SULFATO DE LODO DE REATOR ANAERÓBIO NÃO ADAPTADO À SALINIDADE: UMA AVALIAÇÃO CINÉTICA</b> .....	<b>60</b>
<b>5.1 RESUMO</b> .....	<b>60</b>
<b>5.2 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>61</b>
<b>5.3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>62</b>
5.3.1 Inóculo .....	62
5.3.2 Água residuária .....	62
5.3.3 Procedimento experimental.....	63
5.3.4 Métodos analíticos .....	63
5.3.5 Análise de dados e avaliação cinética .....	64
5.3.6 Análises microbiológicas.....	66
<b>5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>66</b>
5.4.1 Desempenho geral .....	66
5.4.2 Avaliação da produção de metano em lodo não adaptado em diferentes concentrações de salinidade.....	70
5.4.3 Avaliação da redução de sulfato em lodo não adaptado em diferentes concentrações de salinidade.....	73
5.4.4 Biologia molecular.....	77
<b>5.5 CONCLUSÃO</b> .....	<b>80</b>
<b>6. O AUMENTO DOS NÍVEIS DE SALINIDADE DETERMINA A PARTICIPAÇÃO A LONGO PRAZO DA METANOGENESE E</b>	

<b>SULFETOGENESE NA BIODIGESTÃO DE ÁGUAS RESIDUAIS RICAS EM SULFATO .....</b>	<b>82</b>
<b>6.1 RESUMO .....</b>	<b>82</b>
<b>6.2 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>83</b>
<b>6.3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>85</b>
6.3.1 Reator anaeróbio .....	85
6.3.2 inóculo .....	85
6.3.3 Água residuária e condições operacionais.....	86
6.3.4 Métodos analíticos .....	87
6.3.5 Análises microbiológicas: amostragem, extração e sequenciamento .....	89
<b>6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>89</b>
6.4.1. Aumento gradual de salinidade até 35 g-NaCl L <sup>-1</sup> .....	89
6.4.2 Resposta da mtanogênese e sulfetogênese para salinidade de 50 g-NaCl L <sup>-1</sup>	98
6.4.3 Decifrando a inibição do sistema .....	99
6.4.4 Análises microbiológicas .....	101
<b>6.5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>106</b>
<b>7. IMPACTO DO AUMENTO GRADUAL DA SALINIDADE DEVIDO À NaCl NO PROCESSO DE NITRIFICAÇÃO .....</b>	<b>107</b>
<b>7.1 RESUMO .....</b>	<b>107</b>
<b>7.2 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>107</b>
<b>7.3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>109</b>
7.3.1 Design do reator .....	109
7.3.2 Inóculo .....	109
7.3.3 Água residuária e condições operacionais.....	110
7.3.4 Métodos analíticos .....	111
7.3.5 Análises microbiológicas.....	112
<b>7.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>113</b>
7.4.1 Efeito do aumento gradual da salinidade (até 35 g-NaCl L <sup>-1</sup> ) no processo NDS .....	113
7.4.2 Efeito da redução de oxigênio dissolvido em elevada salinidade para as nitrificantes .....	117
7.4.3 Biologia molecular .....	120
<b>7.5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>123</b>
<b>8. EFEITO DE ELEVADAS SALINIDADES NO PROCESSO DE DESNITRIFICAÇÃO AUTOTRÓFICA DO NITRATO, UTILIZANDO SULFETO GASOSO COMO DOADOR DE ELÉTRONS.....</b>	<b>124</b>
<b>8.1. RESUMO .....</b>	<b>124</b>

<b>8.2 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>124</b>
<b>8.3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>126</b>
8.3.1 Design do reator .....	126
8.3.2 Inóculo .....	126
8.3.3 Água residuária e condições operacionais.....	127
8.3.4 Métodos analíticos .....	128
<b>8.3 RESULTADOS</b> .....	<b>129</b>
8.3.1 Efeito da salinidade no processo de desnitrificação autotrófica .....	129
<b>8.4 CONCLUSÃO</b> .....	<b>137</b>
<b>9. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>138</b>
9.1 CONCLUSÕES.....	138
9.2 RECOMENDAÇÕES PARA PESQUISAS FUTURAS.....	141
<b>10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>142</b>

## CAPÍTULO 1

---

### 1. INTRODUÇÃO GERAL

Águas residuárias são definidas como salinas quando apresentam até 1wt%, enquanto que hipersalinas apresentam mais de 3,5wt% (SHI et al., 2012). Estima-se que 5% dos efluentes industriais apresentam salinidade ou hipersalinidade (LEFEBVRE et al., 2007), alguns exemplos são as águas residuárias de indústria de pescado e a água de produção de petróleo e gás que podem conter elevadas concentrações de íons como cloro (Cl<sup>-</sup>), sódio (Na<sup>+</sup>), sulfato (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) e matéria orgânica.

As atividades de produção de petróleo e gás natural geram efluentes líquidos, entre os quais se destaca a água de formação, ou água produzida como também é conhecida. Essa água é produzida em grandes volumes que dependem da tecnologia de exploração, formação geológica, e principalmente da idade do poço, pois quanto mais antigo, mais água será gerada (CAMPOS et al., 2002a). Dessa maneira, esse tipo de indústria a cada ano gera mais água residuária para o mesmo montante de petróleo e/ou o gás explorado. Uma média de geração para o início da exploração é de 0,6 L de água residuária por litro de petróleo (SAUER JR., 1981) enquanto em poços mais antigos, esse volume pode exceder 10 vezes o de petróleo produzido (RIBEIRO, 1995).

A água produzida possui elevada salinidade, podendo chegar a quatro vezes a concentração da água do mar. Suas características apresentam potencial para que alguns compostos constituintes sejam convertidos por processos anaeróbios, aeróbios e anóxicos. O processo anaeróbio possibilita a degradação da matéria orgânica e a conversão de compostos de enxofre, no processo anaeróbio conhecido como sulfetogênese, produzindo alcalinidade, concomitantemente à geração de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S).

O nitrogênio amoniacal, importante constituinte das águas produzidas na exploração de óleo e gás, apresenta potencial de remoção, utilizando os próprios componentes da água residuária (A.R) como doadores de elétrons, após a etapa de nitrificação em processo aeróbio autotrófico e heterotrófico para a fração orgânica, dependendo da eficiência de remoção dessa fração no sistema anaeróbio. Tendo em vista a baixa concentração de matéria orgânica prontamente biodegradável na A.R em questão, os produtos da conversão anaeróbia como o H<sub>2</sub>S podem ser considerados doadores de elétrons na etapa de desnitrificação pela via autotrófica (LU et al., 2012).

A remoção de nitrogênio da A.R. por sistema de nitrificação e desnitrificação simultâneas (NDS) apresenta-se como uma alternativa mais sustentável. Nesse sistema, a oxidação do nitrogênio amoniacal e sua redução a nitrogênio gasoso ocorrem em uma única unidade, possibilitando a recuperação de alcalinidade no processo de desnitrificação, essencial no processo de nitrificação. A redução da geração de lodo em sistemas NDS, dado que os microrganismos são expostos a condições ambientais adversas às consideradas ótimas, merece destaque. Entretanto, no sistema de tratamento proposto, a estratégia de iniciar com processo anaeróbio resulta no consumo da principal parcela da matéria orgânica disponível na A.R, reduzindo seu uso como doador de elétrons para a desnitrificação heterotrófica na etapa de pós-tratamento para remoção de nitrogênio.

A inserção de unidade em série posterior ao sistema NDS traz como grande vantagem a utilização dos subprodutos de unidades anteriores, como o  $H_2S$  produzido na digestão anaeróbia que pode atuar como doador de elétrons na etapa de desnitrificação. MORAES; ORRÚ; FORESTI (2013) investigaram o processo NDS, com desnitrificação pela via autotrófica com sulfeto em reatores em batelada alimentada com aeração intermitente e verificaram o acúmulo de enxofre elementar, eficiências de 86% e 53% para a nitrificação e desnitrificação, respectivamente, em condições com excesso de sulfeto. Nesse sentido, outra vantagem da utilização do biogás contendo  $H_2S$  como doador de elétrons é a possibilidade de recuperação de enxofre elementar que é formado pela oxidação incompleta do sulfeto, e pode ser utilizado como matéria prima em indústrias de produção de ácido sulfúrico e fertilizantes (CELIS-GARCÍA; GONZÁLEZ-BLANCO; MERAZ, 2008). Exaurido o potencial dos doadores de elétrons disponíveis na água residuária, a adição de fontes externas de carbono, como metanol, etanol, ácido acético (FORESTI; ZAIAT; VALLERO, 2006) , dentre outros pode ser considerada.

A sequência de processos biológicos investigados nessa tese é amplamente aplicada e estudada. O diferencial encontra-se na avaliação da influência da salinidade devido a cloreto de sódio na metanogênese e sulfetogênese para remoção da matéria orgânica e compostos sulfurosos oxidados; na remoção de nitrogênio, em sistema de nitrificação e desnitrificação simultâneas, complementado pela desnitrificação autotrófica com a utilização do subproduto gasoso  $H_2S$  como doador de elétrons, gerado na unidade anaeróbia, baseando-se nas concentrações de salinidade, matéria orgânica nitrogênio e enxofre existentes na água produzida em plataformas de óleo e gás.

## 1.1 Delineamento da tese

Esta tese de doutorado trata da remoção de compostos orgânicos, sulfurosos e nitrogenados presentes em água residuárias com elevadas salinidades, utilizando processos anaeróbio, nitrificante e desnitrificante simultâneos e desnitrificação autotrófica para polimento final da fração líquida e gasosa. As aplicações derivadas dos tópicos abordados nesta tese podem ser desenhadas a partir de duas perspectivas, uma estritamente associada à tecnologia de tratamento e outra às populações microbianas, as quais participam da conversão do substrato. Dentro de um contexto tecnológico, nesta tese foram testadas a utilização de reatores de leito fixo estruturado, com inóculos não-halofílicos, submetidos a condições ambientais adversas, combinando tópicos de salinidade, presença de sulfato, nitrogênio, entre outros.

A partir do exposto, este documento compreende os seguintes capítulos:

**CAPÍTULO 2:** Consiste em revisão bibliográfica para contextualizar a base dos principais processos avaliados nesse estudo.

**CAPÍTULO 3:** Consiste nas hipóteses e respectivos fundamentos desta tese, motivados pela revisão da literatura abordada no Capítulo 2. Os objetivos gerais e específicos foram estabelecidos de acordo com as hipóteses delineadas.

**CAPÍTULO 4:** Consiste no resumo das principais metodologias utilizadas no delineamento experimental. As metodologias e equações químicas específicas utilizadas para avaliar os dados obtidos serão apresentadas nos capítulos pertinentes.

Os resultados da tese serão apresentados nos capítulos 5 a 8. Sendo o conteúdo do **CAPÍTULO 5** uma avaliação cinética de remoção de matéria orgânica e conversão de sulfato utilizando ensaios em batelada anaeróbio para inóculo não halofílico, sob condições halofílicas. No **CAPÍTULO 6** avaliou-se o efeito do aumento gradual da salinidade em reator anaeróbio com leito fixo estruturado(AnSTBR), com capacidade de remoção de matéria orgânica. O **CAPÍTULO 7** traz uma abordagem de remoção parcial de nitrogênio, via nitrificação e desnitrificação simultâneas, também utilizando inóculo não halofílico, submetido ao aumento gradual de salinidade, com posterior avaliação apenas da nitrificação. No **CAPÍTULO 8** apresenta-se o polimento quanto á remoção de compostos nitrogenados, simultaneamente à lavagem do biogás para remoção de sulfeto, considerando-se o incremento de salinidade via processo de desnitrificação autotrófica.

**CAPÍTULO 9:** Consiste na apresentação da conclusão geral, destaques e recomendações para estudos futuros.

## CAPÍTULO 2

---

### 2. REVISÃO DE LITERATURA

#### 2.1 Caracterização e tratamento da água produzida em plataformas de óleo e gás

As rochas de formações subterrâneas são permeadas por diferentes compostos, como petróleo, gás, e água de formação, a qual possui característica salina. Assim, em plataformas de extração de petróleo e/ou gás é gerado um resíduo de grande impacto ambiental, conhecida como água produzida. Essa água residuária apresenta em sua composição substâncias orgânicas e inorgânicas, como óleos e graxas, ácidos orgânicos, compostos recalcitrantes e hidrocarbonetos (benzeno, tolueno, etilbenzeno, tolueno – BTEX- e fenóis), metais, ânions e cátions, metais pesados e gases dissolvidos (CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>S) (AHMADUN et al., 2009).

A Tabela 2.1 resume as características das águas produzidas em plataformas de petróleo e gás nas regiões sudeste (21 plataformas), nordeste (1 plataforma), e sul (1 plataforma) do Brasil realizada por GABARDO (2007). Vale ressaltar que há grande variação nos parâmetros dessas águas, uma vez que elas variam de acordo com a geologia do local de extração, tempo de vida do reservatório e tipo de hidrocarboneto extraído (VEIL et al., 2004).

A produção mundial de petróleo em 2021 foi de 89,8 milhões barris por dia, sendo o Brasil responsável por 3,3% dessa produção, de acordo com 71º relatório fornecido por BP Statistical Review of World Energy (Londres 2022). Para cada barril de petróleo produzido, são gerados aproximadamente três barris de água produzida, sendo que a mesma pode ser injetada novamente nos poços (com a finalidade de manter a pressão); descartadas nos oceanos, afetando a biota aquática (CAMPOS; NOBREGA; ASANT'ANNA JR., 1999) ou reutilizada na própria manufatura do petróleo e gás, sendo que para isso é necessário um tratamento adequado (ARTHUR; LANGHUS; PATEL, 2005).

De acordo com a Resolução N° 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) de Março de 2005, que classifica os corpos de água e fornece padrões para lançamento de efluentes, a água do mar enquadra-se na Classe I das águas salinas, sendo assim, ao comparar com os valores obtidos na Tabela 2.1 nota-se que é necessária adequação da água de produção, uma vez que os metais, hidrocarbonetos, carbono

orgânico total (COT) e nitrogênio amoniacal estão acima do permitido por essa resolução considerando classe 1 de águas salinas - onde há recreação de contato primário, proteção de comunidades aquáticas, aquicultura e atividades de pesca (exemplo de limites: COT até 10 mg L<sup>-1</sup>; nitrogênio amoniacal 0,40 mg L<sup>-1</sup>; e benzeno 700 µg L<sup>-1</sup>).

Tabela 2.1 Caracterização da água produzida em plataformas de óleo e gás

<b>Parâmetro</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Mediana</b>
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	17	2243	481
Sulfeto (mg L <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	-	-	10
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	275	730	436
Nitrogênio amoniacal (mg L <sup>-1</sup> )	10 <sup>a</sup>	300 <sup>a</sup>	51,7
pH	6,06	8,20	6,98
Salinidade (mg L <sup>-1</sup> )	38.182	179.766	75.434
SST (mg L <sup>-1</sup> )	1,9	106,1	10,6
COT (mg L <sup>-1</sup> )	153	971	307
DQO (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	1,2 <sup>a</sup>	1000 <sup>a</sup>	790 <sup>b</sup>
Hidrocarbonetos totais (mg L <sup>-1</sup> )	4	66	10
Óleos e graxas (mg L <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	21	218	79
<b>BTEX</b>			
Benzeno (mg L <sup>-1</sup> )	0,625	13,462	1,579
Tolueno (mg L <sup>-1</sup> )	0,484	5,066	2,11
Etilbenzeno (mg L <sup>-1</sup> )	0,051	0,602	0,223
Xilenos (mg L <sup>-1</sup> )	0,237	3,904	0,971
Fenóis (mg L <sup>-1</sup> )	0,05	5,74	0,74
<b>Ácidos</b>			
Acético (mg L <sup>-1</sup> )	45	775	365
Propiônico (mg L <sup>-1</sup> )	21	200	47
<b>Metais</b>			
Alumínio (mg L <sup>-1</sup> )	0,003	0,32	0,1
Bário (mg L <sup>-1</sup> )	0,2	45	2,0
Boro (mg L <sup>-1</sup> )	18,4	80,1	36,4
Cobre (mg L <sup>-1</sup> )	0,01	0,29	0,12
Ferro (mg L <sup>-1</sup> )	0,1	17	1,1
Fósforo (mg L <sup>-1</sup> )	0,1	3,0	0,05
Manganês (mg L <sup>-1</sup> )	0,04	5,89	0,35

Fonte: adaptado GABARDO (2007); <sup>a</sup>AHMADUN et al. (2009); <sup>b</sup>VIEIRA et al. (2003).

A água de produção pode ser tratada por métodos físicos, químicos e biológicos, que dependem da disponibilidade de tecnologia no local em que ocorre a exploração. Tratamentos físicos e químicos são usualmente aplicados para exploração “off shore”, ou seja, aquela realizada em plataformas, uma vez que a área destinada para o tratamento é

reduzida. Já o tratamento biológico é mais aplicado para exploração “on shore”, a qual ocorre em terra, sendo que esse tipo de tratamento apresenta menor custo que os demais (AHMADUN et al., 2009).

VIEIRA; CAMMARTOTA; CAMPORESE (2003) avaliaram o tratamento biológico anaeróbio da água de produção, utilizando o isolamento de consórcio microbiano presente na própria água residuária. Os autores verificaram a predominância de bactérias redutoras de sulfato (BRS) na comunidade estabelecida no sistema em questão, sendo esses microrganismos capazes de utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono para seu metabolismo.

COSTA (2014) avaliou o processo de nitrificação em água residuária sintética da indústria de petróleo, e por meio de teste de respirometria verificou a influência de salinidade de 100 a 15000 mg-Cl<sup>-</sup> L<sup>-1</sup> nos microrganismos nitrificantes. O autor observou que até 1000 mg-Cl<sup>-</sup> L<sup>-1</sup> o íon cloreto não apresentou toxicidade aos microrganismos, entretanto acima de 2000 mg-Cl<sup>-</sup> L<sup>-1</sup> a atividade metabólica celular apresentou queda.

VAIOPOULOU; MELIDIS; AIVASIDIS (2005) avaliaram a desnitrificação autotrófica utilizando reator em escala piloto alimentado com efluente real de água produzida em plataformas de óleo de gás. A carga de nitrogênio na forma de nitrato foi de 0,127 g-N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> e enxofre de 0,165 g-S<sub>2</sub><sup>-</sup> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. As cargas impostas ao sistema apresentaram boa eficiência com S<sub>2</sub><sup>-</sup> no efluente abaixo de 0,1 mg L<sup>-1</sup>, indicando que não houve toxicidade devido a esse composto.

Os compostos de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX), também estão presentes na água produzida em plataformas de óleo e gás, em concentrações de 0,05 mg L<sup>-1</sup> de etilbenzeno até 13 mg L<sup>-1</sup> de benzeno. Esses compostos são constituídos de hidrocarbonetos aromáticos e relativamente estáveis devido ao anel aromático e a falta de grupos reativos em suas cadeias (VOGT; KLEINSTEUBER; RICHNOW, 2011). BTEX são considerados os principais contaminantes das águas continentais, por isso efluentes industriais com esses compostos devem ser tratados para seu posterior lançamento no meio ambiente.

A eficiência de remoção de cada composto do BTEX varia de acordo com sua cadeia, sendo o benzeno o mais difícil de ser biodegradado. Estudos revelam que o benzeno é recalcitrante durante a redução do nitrato (BARBARO et al., 1992; KAO; BORDEN, 1997). Nardi et al., (2005) e Firmino et al., (2015) concluíram que após o benzeno, os compostos mais difíceis de degradação são: tolueno, etilbenzeno, *o*-xileno, seguidos pelos *m*- e *p*-xilenos.

Para sistemas aerados ZHAO et al., (2006) avaliaram a eficiência de reatores biológicos do tipo filtro aerado para o tratamento de águas de formação antes da etapa de dessalinização. Nesse estudo foi atingido 78% de eficiência para a remoção de carbono orgânico total (COT), 94% para óleo, e 90% para compostos aromáticos de cadeia  $C_{13}H_{28}$  até  $C_{32}H_{66}$ , totalizando 16 hidrocarbonetos, em um TDH de 4 horas e carga volumétrica de  $1,07 \text{ kg DQO m}^{-3}\text{d}^{-1}$ . FIRMINO et al., (2015) estudaram a influência da relação  $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$  utilizando reator UASB com volume de 3,3 litros. Esses autores encontraram uma eficiência de remoção de BTEX de 67% (concentração inicial de  $21,1 \text{ mg L}^{-1}$ ) e 93% de sulfato, quando a relação  $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$  foi de 5,2, porém quando atingiu o valor de 1,3 a eficiência foi de 73% para BTEX (concentração inicial de  $20,6 \text{ mg L}^{-1}$ ), e a remoção de sulfato para essas mesmas relações foi de 53%.

Os estudos aqui citados demonstram a capacidade de sistemas anaeróbio e aeróbio de removerem compostos recalcitrantes como o BTEX.

### **2.3 Digestão anaeróbia e a influência da concentração de compostos de enxofre na competição entre organismos metanogênicos e sulfetogênicos**

O ciclo do enxofre se relaciona com os do nitrogênio, carbono e fósforo (HAO et al., 2014), sendo assim, a degradação de águas residuárias contendo enxofre pode ocorrer concomitante com outros compostos indesejáveis e poluentes.

O enxofre é um dos elementos mais abundantes, podendo ser encontrado em erupções vulcânicas, oceanos e nas mais variadas atividades antropogênicas. Pode ser liberado nas suas mais diversas formas através da queima de combustíveis fósseis, processamento de alimentos, indústria de alumínio, decomposição de matéria orgânica, entre diversas outras (LEE; BRIMBLECOMBE, 2016).

As formas inorgânicas de enxofre podem ser: sulfeto ( $\text{S}^{2-}$ ); enxofre elementar ( $\text{S}^0$ ), tiosulfato ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ) e sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), variando seu estado de oxidação de -2 a +6 (Figura 2.1). Logo, o processo de tratamento biológico desses compostos baseia-se em 3 principais conceitos: controle da formação de sulfeto; volatilização do sulfeto de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{S}$ ); precipitação de metais contendo sulfeto (ZHANG et al., 2008) e utilização do sulfeto como doador de elétrons para desnitrificação (GUERRERO; ZAIAT, 2018; PANTOJA FILHO et al., 2014).

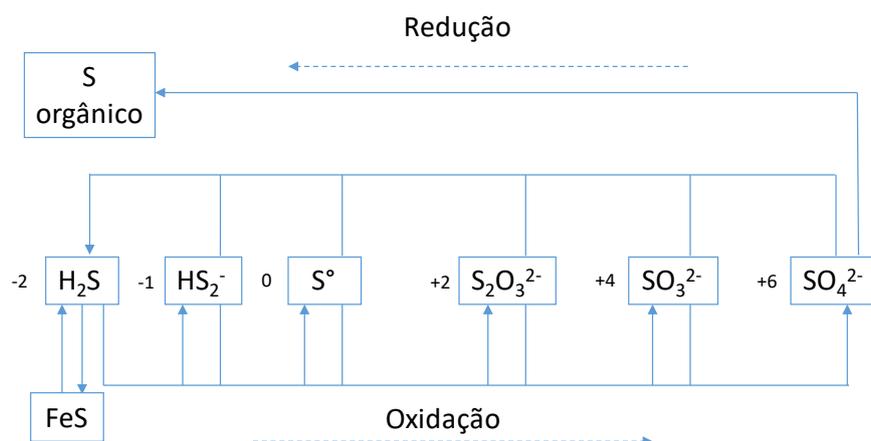


Figura 2.1. Ciclo do enxofre e as principais formas de oxidação (-2 a +6). Fonte: adaptado de Lloyd (2006)

Na digestão anaeróbia, a maior preocupação, associada aos compostos sulfurosos oxidados, está na competição entre arqueias metanogênicas (AM) e bactérias redutoras de sulfato (BRS). As arqueias metanogênicas convertem substratos como o acetato, metanol, hidrogênio e gás carbônico ( $\text{H}_2$  e  $\text{CO}_2$ ) a metano ( $\text{CH}_4$ ) (HEDDERICH; WHITMAN, 2006; MUYZER; STAMS, 2008). Há dois grupos principais de arqueias que participam da digestão anaeróbia, sendo as hidrogenotróficas responsáveis pela conversão de  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  em aproximadamente 30% do  $\text{CH}_4$  e as acetoclásticas (conversão do acetato), responsáveis por 70% (MOSEY, 1982).

As BRS utilizam ampla variedade de compostos orgânicos e  $\text{H}_2$  disponíveis no meio como doadores de elétrons e reduzem sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) a sulfeto ( $\text{S}^{2-}$ ) em condições anaeróbias (WU et al., 2018), tornando-as mais versáteis.

Na competição por  $\text{H}_2$ , as BRS são capazes de obter mais energia dessa molécula do que as arqueias metanogênicas hidrogenotróficas, por apresentarem maior afinidade pelo  $\text{H}_2$  e maior velocidade de crescimento (LENS et al., 1998a). No que tange a competição entre BRS e arqueias acetoclásticas, as primeiras também apresentam reação termodinamicamente mais favorável do que as arqueias (LENS et al., 1998a), bem como apresentam velocidades de crescimento maiores. Na Tabela 2.2 estão descritas as principais reações realizadas pelas BRS e arqueias metanogênicas.

Em elevadas razões  $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ , a metanogênese é a rota principal; enquanto que abaixo de 1,7 a pressão de seleção favorece a participação da BRS, como as *Desulfovibrio vulgaris* (LENS et al., 1998a)(LENS et al., 1998). Além da competição entre esses

microrganismos por doadores de elétrons, o sulfeto produzido pode ser tóxico a ambas. CALLADO; DAMIANOVIC; FORESTI (2015) relataram que o sulfeto afetou tanto as BRS quanto as arqueias, reduzindo a eficiência do processo anaeróbio em condições mesofílicas.

Tabela 2.2. Principais reações de redução de sulfato e produção de metano a partir de diferentes doadores e elétrons e seus respectivos valores de energia livre de Gibbs.

Processo	Reação	$\Delta G \text{ kJ}^{-1}$
<b>Sulfetogênese</b>	1) 2 etanol + $\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{HS}^- + 2\text{H}_2\text{O} + \text{H}^+ + 2 \text{Acetato}^-$	-132,7
	2) 2 etanol + $3\text{SO}_4^{2-} \rightarrow 3\text{HS}^- + 4\text{HCO}_3^- + 3\text{H}^+ + 2\text{H}_2\text{O}$	-227,3
	3) $\text{Acetato}^- + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow 3\text{HS}^- + 4\text{HCO}_3^-$	-47,3
	4) Glicose + $\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{HS}^- + 2\text{HCO}_3^- + 3\text{H}^+ + 2 \text{Acetato}^-$	-358,2
	5) Glicose + $3\text{SO}_4^{2-} \rightarrow 3\text{HS}^- + 6\text{HCO}_3^- + 3\text{H}^+$	-452,5
	6) $4\text{H}_2 + \text{SO}_4^{2-} + \text{H}^+ \rightarrow 3\text{HS}^- + 4\text{HCO}_3^-$	-152,2
	7) 4 Ác. Propiônico + $3\text{SO}_4^{2-} \rightarrow 3\text{HS}^- + 4\text{HCO}_3^- + 4\text{Acetato}^- + \text{H}^+$	-150,6
	8) 4 Ác. Propiônico + $7\text{SO}_4^{2-} \rightarrow 7\text{HS}^- + 12\text{HCO}_3^- + \text{H}^+$	-341
	9) 4 Ác. Butírico + $10\text{SO}_4^{2-} \rightarrow 10\text{HS}^- + 16\text{HCO}_3^- + 2\text{H}^+$	-492
	10) 2 Ác. Butírico + $\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{HS}^- + 4 \text{Acetato}^- + 2\text{H}^+$	-55,5
<b>Metanogênese</b>	11) $\text{Acetato}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{HCO}_3^-$	-31
	13) $4\text{H}_2 + \text{H}^+ + \text{HCO}_3^- \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$	-135,6

Fonte: Adaptado de SAADY (2013); ZHOU; XING (2015) .

WU et al. (2018) avaliaram a mudança gradual entre metanogênese e sulfetogênese durante a operação de um UASB com água residuária sintética contendo sulfato, etanol e acetato. A partir de testes de atividade microbiana, os autores observaram que durante a fase com dominância da metanogênese, o *Desulfovibrio* e outras BRS foram capazes de converter etanol a acetato por meio da redução de sulfato (Figura 2.2A). Na

fase em que a sulfetogênese estava estabelecida, *Desulfovibrio* oxidava etanol a acetato, além de utilizar o  $H_2$  na sulfetogênese (Figura 2.2B).

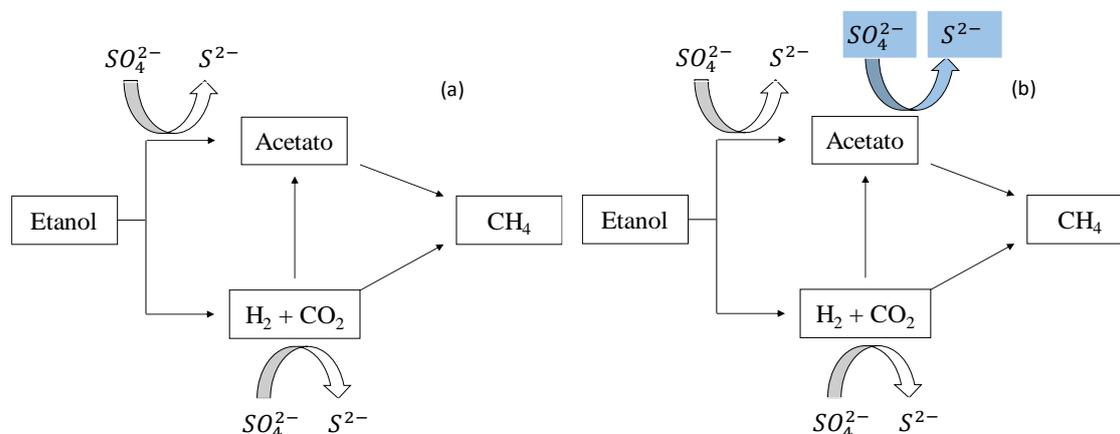


Figura 2.2. Rotas metabólicas para degradação do etanol, hidrogênio e acetato: (a) sistema com dominância das metanogênicas; (b) sistema com dominância das bactérias redutoras de sulfato. Fonte: Adaptado de Wu et al. (2018).

A razão entre a quantidade da matéria orgânica e sulfato em reatores metanogênicos/sulfetogênicos auxilia na seleção dos microrganismos, e é considerada o principal parâmetro da interação entre metanogênicos e sulfetogênicos (CALLADO; DAMIANOVIC; FORESTI, 2015). Estequiometricamente, a relação DQO/ $SO_4^{2-}$  de 0,67 é suficiente para a completa remoção de matéria orgânica via sulfetogênese. Para razões menores, a quantidade de matéria orgânica é insuficiente para a completa redução de sulfato; enquanto para relações acima de 0,67, a remoção da matéria orgânica só ocorrerá se concomitantemente houver metanogênese (LENS et al., 1998a). Porém, fatores como doadores de elétrons tornam a relação descrita acima apenas um parâmetro de controle, uma vez que a presença de acetato auxilia no metabolismo das arqueias acetoclásticas, e glicose favorece a oxidação incompleta das BRS, produzindo acetato (CALLADO; DAMIANOVIC; FORESTI, 2015).

### 2.3.1 Toxicidade de compostos de enxofre na digestão anaeróbia

A maior preocupação em sistemas de tratamentos de águas residuárias contendo composto sulfurosos oxidados é a produção de sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ). Esse composto, na sua forma dissolvida ou gasosa pode gerar corrosão, odor, aumentar a demanda química de oxigênio (DQO) no efluente e até mesmo causar toxicidade no sistema biológico de tratamento (LENS et al., 1998). O pH e a temperatura são fatores intervenientes para a especiação do sulfeto (Eq. I).



Em pH neutro (pKa = 6,9) e temperatura 30 °C, a dissociação entre H<sub>2</sub>S e HS<sup>-</sup> é de 50% de cada espécie. Em pH abaixo de 7, a maior parte do sulfeto é encontrada na forma de H<sub>2</sub>S. Acima de pH 8 inicia o aparecimento da forma S<sup>2-</sup> (LENS et al., 1998).

REIS et al., (1992a) observaram a completa inibição de cultura de BRS cultivada em lactato e sulfato a partir da presença de H<sub>2</sub>S em concentrações de 547 mg L<sup>-1</sup> com pH variando de 5,8 a 7,0 e temperatura de 22 °C. Para condições termofílicas (55 °C), VAN HOUTEN; YUN; LETTINGA, (1997a) observaram que a população de *Desulfotomaculum sp.* foi inibida a uma concentração de 250 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>S. Os níveis de toxicidade estão associados à especiação do sulfeto de hidrogênio, função do pH e de acordo com o inóculo utilizado, fonte de matéria orgânica e temperatura. Faixas de 100 a 800 mg L<sup>-1</sup> para HS<sup>-</sup> e H<sub>2</sub>S foram relatadas na inibição de microrganismos metanogênicos, enquanto que faixas de 50 a 200 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>S para outros microrganismos anaeróbios (PARKIN et al., 1990a).

Destaca-se que o sulfeto não é tóxico apenas para os organismos anaeróbios, mas também para as bactérias nitrificantes. Sendo assim, sistemas complexos de tratamento e compostos por unidades sequenciais anaeróbias e aeróbias devem se atentar para o sulfeto dissolvido. De acordo com SEARS et al., (2004) 0,5 mg L<sup>-1</sup> de sulfeto foi capaz de inibir a oxidação da amônia em sistemas de crescimento suspenso em reatores de fluxo contínuo. Ao contrário de outros tóxicos, como a salinidade, na qual os microrganismos se adaptam quando adicionados em concentrações crescentes, as bactérias nitrificantes dificilmente se adaptam à presença do sulfeto (MORAES; ORRÚ; FORESTI, 2013).

Portanto, o sulfeto possui considerável efeito negativo para as atividades das bactérias nitrificantes (ÆSØY; ØDEGAARD; BENTZEN, 1998; BECARI et al., 1980; ERGUDER et al., 2008). Dessa forma, o tratamento de águas residuárias ricas em compostos sulfurosos e nitrogenados requer estratégias específicas.

## 2.4 Processos de nitrificação e de desnitrificação

A nitrificação é um processo de conversão de compostos ricos em nitrogênio, geralmente na forma amoniacal (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) a nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), conhecido como nitritação, e de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> a nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) – nitratção, na presença de oxigênio como doador de elétrons. Ocorre sob condições ambientais específicas como: temperatura entre 25°C e 30°C; oxigênio dissolvido na relação O<sub>2</sub>/N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> de 3,55; pH entre 7,5 e 8,5 (ÆSØY;

ØDEGAARD; BENTZEN, 1998). Nessa etapa há consumo de alcalinidade para manutenção do pH, uma vez que essa reação libera íons  $H^+$  e fornece carbono aos organismos autotróficos. De acordo com HENZE et al. (1997), a nitritação é a etapa limitante do processo, uma vez que sua velocidade de reação é menor quando comparada a nitratação.

Em sistemas convencionais de tratamento, a nitrificação é seguida pela desnitrificação, em unidade subsequente sob condições anóxicas, e caracteriza-se pela redução do  $NO_3^-$  até  $N_2$ , utilizando doadores de elétrons orgânicos ou inorgânicos. Os doadores de elétrons externos mais comumente utilizados nos processos de desnitrificação heterotrófica são: metanol e etanol; enquanto que na via autotrófica o  $H_2S$  apresenta-se como potencial. Algumas condições ambientais que influenciam na desnitrificação são: temperatura entre 10 e 30°C, pH entre 6,5 e 8, e oxigênio dissolvido (OD) menor que 0,5 mg/L. Em contrapartida com o processo de nitrificação, a desnitrificação gera alcalinidade, sendo que sua recuperação dependente do doador de elétrons.

Na busca por sistemas mais compactos, vêm se estudando o processo de nitrificação e desnitrificação simultâneas (NDS), o qual é explicado com base em flocos de lodos ativados, onde os microrganismos aeróbios ocupam a parte mais externa, e organismos anóxicos ocupam a região central do floco. De acordo com ZENG et al. (2003), esse processo é possível devido à resistência à transferência de massa, uma vez que quando o oxigênio da fase líquida é transferido para o floco há um decaimento da sua concentração, até atingir valores baixíssimos, momento em que inicia a atividade do consórcio de microrganismos anóxicos. A estratificação observada no floco também pode ser observada em sistemas com biomassa imobilizada para ocorrência do processo NDS. Organismos nitrificantes ficam aderidos à parte mais externa do meio suporte, diretamente em contato com o oxigênio. Assim, ocorre a conversão de N-amoniaco em nitrito e nitrato, os quais serão transformados pelos organismos desnitrificantes autotróficos ou heterotróficos (localizados no interior do biofilme) em compostos mais reduzidos, como o nitrogênio gasoso.

POCHANA; KELLER (1999) avaliaram os fatores que poderiam influenciar a NDS em reatores de batelada sequenciais, e encontraram que o tamanho do floco interfere na eficiência de conversão, pois a diminuição de 80  $\mu m$  para 40  $\mu m$ , diminui a eficiência do processo global de 52% para 21%, além de verificar relação positiva entre OD e

eficiência da nitrificação e negativa com a desnitrificação, confirmando que o OD é um fator essencial na NDS.

MOURA et al. (2018) avaliaram a NDS, para tratamento de esgoto sanitário, variando os períodos de aeração e sem aeração entre 2h/1h e 3h/1h em duas condições de TDH, 8 e 12 horas. Os autores concluíram que aumentando o período de aeração de 2 para 3 horas a eficiência de nitrificação foi de 77,5% para 91%. Para o mesmo processo NDS e esgoto sanitário, SILVA et al. (2022) avaliaram o efeito das dimensões do leito de aderência dos microrganismos, com principal foco na influência da contradifusão para o processo. Os autores avaliaram espumas com espessuras de 10, 5 e 2 mm e efluentes sintéticos com relação DQO/N de 5 e 2,5, concluindo que em 2 mm não houve boa adesão dos microrganismos.

Tecnologias de tratamento para remoção de nutrientes de águas residuárias, como nitrogênio, fósforo, metais, entre outros vêm sendo desenvolvidas, e a busca contínua por processos eficientes, de baixo custo e compactos são destaques entre as pesquisas. O processo de nitrificação e desnitrificação simultâneas e a desnitrificação autotrófica ganham destaque em águas residuárias pré-tratadas.

O processo NDS foi estudado por muitos autores em diferentes condições e configurações de reatores. MORAES; ORRÚ; FORESTI (2013) avaliaram a remoção de nitrogênio a partir do efluente de um reator UASB contendo sulfeto, em reatores de batelada alimentada com ciclos de 8 horas e operado com aeração intermitente. Tais autores observaram que o prévio estabelecimento da nitrificação e baixas concentrações de sulfeto foram essenciais para a oxidação de N-amoniaco. A nitrificação é extremamente sensível à presença de sulfeto, sendo que concentrações de 0,5 mg/L de sulfeto resultou em perda da eficiência na nitrificação (ÆSØY; ØDEGAARD; BENTZEN, 1998). BECARI et al. (1980) observaram queda da eficiência de 28% para 76% da atividade das bactérias nitrificantes quando aumentaram a concentração de sulfeto de 1,5 para 10 mg S/L.

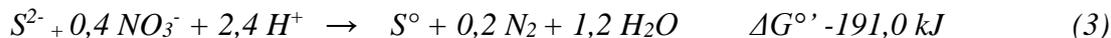
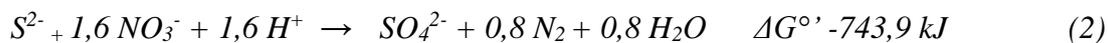
## **2.6 Desnitrificação autotrófica**

Após a nitrificação, doadores de elétrons precisam estar disponíveis para que ocorra a desnitrificação. Dada a escassez de doadores de elétrons, remanescente em unidades anteriores em que se estabelecem os processos de tratamento, como por exemplo em reatores anaeróbios e no processo NDS, faz-se necessário explorar outras possibilidades para remoção dos residuais de nitrogênio oxidado. Águas residuárias

complexas, contendo compostos sulfurosos, geram em ambiente anaeróbio gás sulfídrico, conforme abordado na seção 2.3. Esse composto gera mau odor nas estações de tratamento, corrói tubulações de metal e concreto e é tóxico para seres humanos, fauna e flora. Portanto, estratégias que permitam a remoção do gás sulfídrico, para mitigação dos efeitos deletérios para disposição ou para o aproveitamento do biogás, precisam ser analisadas. O acoplamento de processos envolvidos no sistema de tratamento, com a utilização do sulfeto de hidrogênio produzido no reator anaeróbio na desnitrificação em ambiente anóxico pode ser considerado.

Nessa etapa, compostos reduzidos de enxofre, como  $H_2S$  presente na corrente gasosa do reator anaeróbio, podem ser utilizados como doadores de elétrons para o processo de desnitrificação, interligando os ciclos do enxofre e nitrogênio e promovendo a lavagem do biogás.

A oxidação autotrófica do sulfeto via bactérias desnitrificantes pode levar à geração de sulfato ou enxofre elementar (BERISTAIN-CARDOSO et al., 2006) , conforme representado pelas equações 2 e 3.



A adição de solução contendo nitrato em campo de óleo com sulfeto se mostrou eficiente para a remoção biológica de sulfeto (JENNEMAN et al., 1999; REINSEL et al., 1996). Além disso, foram descritas para relações entre  $NO_3^-/S_2^-$  acima de 1,48 o produto final obtido era o sulfato ( $SO_4^{2-}$ ), enquanto que para relações abaixo desse valor, o produto final era o enxofre elementar ( $S^0$ ). Os autores observaram que a remoção de nitrato ou nitrito via sulfeto não só controla a liberação desse gás para a atmosfera, como também auxilia no processo simultâneo de desnitrificação via autotrófica (DOĞAN et al., 2012).

A utilização de reator anaeróbio tratando águas residuárias com sulfato, anteriormente ao processo de remoção de nitrogênio, requer a avaliação do conteúdo de sulfeto na fase líquida, visando proteger as bactérias nitrificantes em sistema NDS. O equilíbrio do sulfeto entre as fases gasosa e líquida está associado ao pH do meio. A introdução do sulfeto gasoso presente no biogás do reator anaeróbio pode contribuir para desnitrificação complementar pela via autotrófica, em unidade reacional complementar, após o sistema NDS.

O sulfeto possui considerável efeito negativo para as atividades das bactérias nitrificantes (ÆSØY; ØDEGAARD; BENTZEN, 1998; BECARI et al., 1980; ERGUDER et al., 2008). Dessa forma, o tratamento de águas residuárias ricas em compostos sulfurosos e nitrogenados requer estratégias específicas, como relação N/S estequiométrica, pH, temperatura e alcalinidade.

PANTOJA FILHO et al. (2014) operaram reator de leito fixo compartimentado (zona aeróbia e zona anóxica) com adição de sulfeto após a zona óxica, a partir do biogás para o pós-tratamento de efluente de reator UASB tratando esgoto doméstico. Os autores obtiveram 70% de remoção de nitrogênio em condições de excesso de  $H_2S$ , adicionado a partir de gás sintético. Para concentração de  $H_2S$  semelhante às concentrações obtidas em reator UASB ( $CH_4$  -380 g/m<sup>3</sup>,  $CO_2$  - 120 g/m<sup>3</sup>,  $H_2S$  - 50 g/m<sup>3</sup>), foi possível converter 50% do nitrato em nitrogênio gasoso.

## 2.7 Tratamento microbiológico de águas salinas

Águas residuárias são definidas como salinas quando apresentam até 1wt%, enquanto que hipersalinas apresentam mais de 3,5wt% (SHI et al., 2012). Logo, os microrganismos utilizados em sistemas de tratamento podem ser afetados, uma vez que as membranas celulares são permeáveis a água, e em meios hipertônicos, elas perdem água por osmose. Para que um organismo consiga sobreviver em ambientes com elevada salinidade, duas estratégias são fundamentais: as células reterem elevadas concentrações de sal intracelular; ou as células manterem baixas concentrações de sais no seu interior e a pressão osmótica do meio ser equilibrada por solutos orgânicos compatíveis (OREN, 1999).

Por exemplo, o  $Na^+$  é essencial para o crescimento dos microrganismos em pequenas concentrações, uma vez que participam da formação do ATP e oxidação do NADH (DIMROTH; THOMER, 1989) Porém, concentrações de 3,5 a 5,5 g- $Na^+$  L<sup>-1</sup> podem causar toxicidade moderada; enquanto que 8 g- $Na^+$  L<sup>-1</sup> afetam drasticamente a metanogênese (CHEN; CHENG; CREAMER, 2008; MCCARTY, 1964a). MUÑOZ et al. (2019) observaram em água residuária com concentração de 6 g- $Na^+$  L<sup>-1</sup> alta solubilização de substâncias semelhantes a proteínas e redução do tamanho médio dos grânulos do reator UASB em 38%. Bactérias como BRS e nitrificantes também são afetadas pela salinidade do meio. Um aumento de 7 a 35 g L<sup>-1</sup> na concentração de NaCl afetou as BRS, gerando redução de 40% na conversão de sulfato (VAN DEN BRAND et al., 2015).

Nos processos de nitrificação e desnitrificação, a salinidade também vem sendo avaliada como fator limitante. As bactérias oxidantes de amônia (BOA) e as oxidantes de nitrito (BON) devem atuar em simbiose para que a nitrificação ocorra completamente, ou seja a amônia seja totalmente convertida em nitrato. Entretanto, alguns parâmetros operacionais e características do substrato, como a salinidade podem afetar diretamente essa relação. WANG et al. (2017) avaliaram o processo de NDS em ambiente com elevada carga orgânica, nitrogênio e salinidade. Os autores relataram que a inibição da BON, bem como das desnitrificantes, ocorreu principalmente devido à salinidade. Contrariamente, MACÊDO et al. (2019b) observaram que aumento da pressão osmótica de 5 para 9 atm afetou o processo de nitrificação, entretanto os microrganismos desnitrificantes heterotróficos não sofreram alteração.

Estudo apresentado por BASSIN; DEZOTTI; SANT'ANNA (2011) relatou que na presença de  $33\text{g NaCl L}^{-1}$  ocorreu acúmulo de nitrito, demonstrando que as BON são mais sensíveis a salinidade do que as BOA. Entretanto, MOUSSA et al. (2006) concluíram que as BOA são mais sensíveis a curtos e longos períodos na presença de salinidade de aproximadamente  $17\text{g NaCl L}^{-1}$ , perdendo entre 36 e 39% da sua atividade, enquanto que as oxidadoras de nitrito apresentaram redução da sua atividade entre 5 e 13%. Essa divergência de resultados está, possivelmente, associada mais a uma limitação da transferência de oxigênio causada pelo sal, que pela inibição das bactérias oxidadoras de nitrito (MOUSSA et al., 2006). Os trabalhos citados indicam que é necessário cautela ao comparar ensaios de nitrificação na presença de sal, uma vez que os resultados se mostram contraditórios, devido às condições dos testes.

Assim, ao comparar resultados do efeito da salinidade na nitrificação é necessário atentar-se a: a) configuração do sistema e condições experimentais, como temperatura, pH e compostos inibitórios; b) Se o sal é introduzido em forma de pulso ou gradual; c) Inóculo utilizado (MOUSSA et al., 2006).

A partir do exposto, observa-se que em grande parte dos sistemas de tratamento, efluente salinos podem levar a baixas eficiências, uma vez que alteram a estrutura do biofilme (MACÊDO et al., 2019a) e geram aumento da produção de polímeros extracelulares (CHEN et al., 2019a) como forma de mitigar os efeitos do aumento da pressão osmótica. Sendo assim, a adaptação do inóculo não-halofílicos à salinidade e às mudanças de força iônicas causadas por excesso de cátions precisam ser consideradas.

## CAPÍTULO 3

---

### 3. HIPÓTESES E OBJETIVOS

A partir da revisão de literatura e dos avanços nas tecnologias de tratamento para águas residuárias, levantou-se a hipótese de avaliar sistemas mais eficientes para a remoção de nutrientes em condições de estresse para microrganismos, utilizando-se de uma água residuária com características salinas. Águas residuárias similar à água de produção de petróleo foi escolhida por conter diferentes nutrientes como nitrogênio, sulfato e matéria orgânica. Para tanto utilizaram-se reatores de leito estruturado, amplamente utilizados nas pesquisas dos processos envolvidos no grupo de pesquisa do Laboratório de processos biológicos (LPB -EESC/USP), e inóculos não halofílicos.

O presente trabalho teve como hipótese central: Águas residuárias salinas são passíveis de tratamento biológico gerando subprodutos que podem ser utilizado nas etapas sequencias, refinando o processo e aumento a eficiência do mesmo para os mais diferentes compostos, como sulfurosos, nitrogenados e matéria orgânica a partir de lodo não-halofílico. Assim, o objetivo foi avaliar a eficiência sistema de tratamento de águas com compostos orgânicos, sulfurosos e nitrogenados na presença de elevada salinidade á cloreto de sódio em inóculos não halofílicos, utilizando um sistema composto de reatores de leito estruturado anaeróbio, seguido de reator aeróbio/anóxico e para finalizar um reator anóxico para a desnitrificação autotrófica com  $H_2S$  como doador de elétrons.

De acordo com as etapas estudadas, a hipótese central foi subdividida em:

- Sub-hipótese 1: As BRS e arqueias metanogênicas oriundas de ambientes não halofílicos competem pelo substrato na digestão anaeróbia, sendo as BRS mais resistentes à salinidade sem adaptação aos sais.

Objetivo: Avaliar a sulfetogênese e metanogênese em diferentes salinidades de cloreto de sódio em reator anaeróbio de leito estruturado, utilizando lodo biológico anaeróbio não halofílico como inóculo.

- Sub-hipótese 2: O desempenho das BRS e AM não halofílicas é influenciada por fatores ambientais como a relação  $DQO/SO_4^{2-}$  e a salinidade, entretanto a resposta metabólica (para remoção de matéria orgânica e redução de sulfato)

desses microrganismos difere em ambientes com concentrações elevadas de salinidade.

Objetivo: Avaliar desempenho das BRS e AM por meio de parâmetros cinéticos de metanogênese e sulfetogênese conjuntamente em diferentes salinidades, utilizando lodo biológico não halofílico.

- Sub-hipótese 3: Águas residuárias ricas em nitrogênio são passíveis de tratamento com base na nitrificação e desnitrificação simultâneas, entretanto efluentes de pós tratamento de reatores anaeróbios possuem baixa concentração de matéria orgânica, limitando o processo de desnitrificação. Na presença de salinidade, que promove baixa difusão de O.D. e inóculo nitrificante não halofílico, a eficiência do sistema fica mais impactada negativamente.

Objetivo: Avaliar a nitrificação e desnitrificação heterotrófica simultânea em diferentes salinidades de cloreto de sódio em reator aeróbio/anóxico a partir de lodo não halofílico

- Sub-hipótese 4: Devido à baixa concentração de matéria orgânica em efluente de pós tratamento anaeróbio, a desnitrificação heterotrófica é limitada, assim utilizar o gás sulfídrico, que também é um sub-porduto da digestão anaeróbia da água residuária em questão, para a desnitrificação autotrófica apresenta-se como alternativa potencial. Entretanto, efluentes salinos podem interferir na transferência desse gás para o líquido, limitando a eficiência do processo, e até mesmo gerando toxicidade para os microrganismos.

Objetivo: Avaliar a desnitrificação autotrófica utilizando H<sub>2</sub>S em reator anóxico para diferentes salinidades, utilizando inóculo não halofílico

## CAPÍTULO 4

---

### 4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Nesse capítulo serão apresentados os processos avaliados em três reatores contínuos distintos, operados independentemente (Figura 4.4) e um ensaio em batelada. Os detalhes operacionais, como meio nutricional, salinidades e condições ambientais serão apresentadas nos capítulos específicos. Esse capítulo tem como objetivo apenas apresentar os principais destaques para o delineamento experimental desta tese.

Sendo assim, o primeiro reator anaeróbio de leito estruturado (AnSTBR- R1) foi operado em ambiente anaeróbio (Figura 4.1), em condições metanogênica e sulfetogênica, conforme descrito por GODOI; FORESTI; DAMIANOVIC, (2017). O principal objetivo da unidade foi a remoção de matéria orgânica e a redução do sulfato existente nas águas. O efluente do AnSTBR -R1 também teve como função fornecer alcalinidade, necessária para o processo de nitrificação em unidade subsequente e residual de matéria orgânica, para ser utilizado pelos microrganismos desnitrificantes heterotróficos no reator aeróbio de leito estruturado (AnSTBR - R2) – Figura 4.2. Como subproduto das reações em R1, durante a sulfetogênese é gerado gás  $H_2S$ . Dado o reduzido volume de biogás produzido e a dificuldade de coleta e armazenamento do mesmo, o gás do reator destinado ao processo de desnitrificação autotrófica (Figura 4.3) foi obtido a partir de cilindro com mistura sintética de gases contendo  $N_2$  e  $H_2S$ , sendo o  $H_2S$  o doador de elétrons para desnitrificação autotrófica no reator anóxico (R3) com objetivo de finalizar a remoção de nitrogênio remanescente do sistema NDS e simular a lavagem do biogás produzido no reator anaeróbio.

A imobilização da biomassa no reator anaeróbio (R1) foi realizada em material suporte na forma de hastes de poliuretano, configurando um leito estruturado. Esse reator foi confeccionado em acrílico com volume útil aproximado de 2,3 L e alimentado com fluxo ascendente por meio de bomba peristáltica.

O tempo de detenção hidráulica (TDH) de R1 foi de 12 horas, conforme observado por RIBEIRO et al. (2013) em reator anaeróbio horizontal de leito fixo para remoção de BTEX, e CAMILOTI et al. (2014) em reator de leito estruturado para redução simultânea de sulfato e matéria orgânica, componentes da água residuária sintética em questão. O meio sintético utilizado para alimentação manteve a relação  $DQO/SO_4^{2-}$  igual à obtida em literatura da água residuárias de plataformas de óleo e gás, ou seja, em 1,6 (GABARDO,

2007) . O pH foi ajustado para valores abaixo de 6,5, uma vez que essa faixa se mostrou eficiente para a liberação de biogás seguindo lei de Henry, favorecendo a forma não dissociada do  $H_2S$  (DE GODOI et al., 2017), permitindo o desenvolvimento dos processos metanogênico e sulfetogênico.

O reator aeróbio (R2) também teve como suporte para imobilização da biomassa o leito estruturado de espuma de poliuretano e foi construído com tubo de acrílico de diâmetro interno de 80 mm, altura de 400 mm, e volume útil aproximado de 2,2 L. A alimentação desse reator também foi em fluxo ascendente com efluente sintético simulando o efluente de R1, com ênfase no residual de matéria orgânica e alcalinidade. Destaca-se que nesse reator foram testadas diferentes concentrações de OD avaliadas na literatura, entre 3 até 6  $mg-O_2 L^{-1}$  por meio de compressor de ar com ajuste para aeração. O tempo de detenção hidráulica para R2 foi de 12 horas de acordo com (SANTOS et al., 2016), operando reator de leito estruturado com recirculação e aeração intermitente (SBRRIA).

O terceiro reator (R3), foi um sistema anóxico com suporte de espuma de poliuretano, no qual ocorreu a complementação da desnitrificação pela via autotrófica e lavagem do biogás produzido no em R1. O reator possuía diâmetro interno de 50 mm e altura de 680 mm e volume útil de 0,81 L. Destaca-se que a quantidade de matéria orgânica presente na água residuária era insuficiente para suprir a demanda por doadores de elétrons exigida para desnitrificação heterotrófica em R2. O TDH utilizado também foi de 12 horas e o afluente sintético baseado na composição do efluente de R2. O sulfeto gasoso foi dosado em concentração semelhante à produzida em R1.



Figura 4.1. Imagem do reator anaeróbio e a biomassa aderida em espuma de poliuretano após os 580 dias de operação



Figura 4.2. Imagem do reator anóxico e a biomassa aderida em espuma de poliuretano após os 100 dias de operação



Figura 4.3. Imagem do reator aeróbio e a biomassa aderida em espuma de poliuretano após os 480 dias de operação

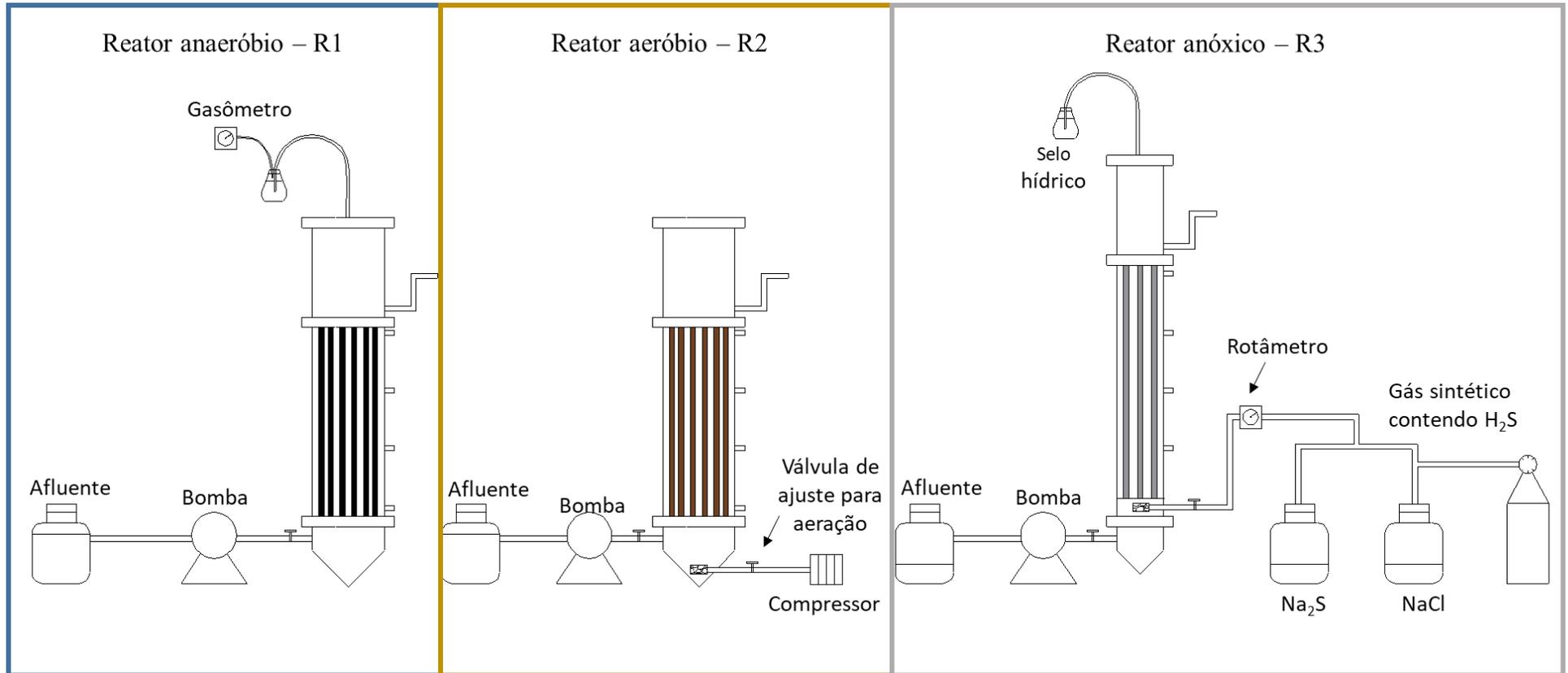


Figura 4.4. Desenho esquemático dos reatores contínuos e seus principais equipamentos

#### 4.1.5 Material suporte

Os três reatores contínuos foram de leito estruturado, utilizando como material suporte espuma de poliuretano, com densidade aparente de  $20 \text{ kg m}^{-3}$  e porosidade de 92% com arestas entre 0,8 e 1,0 cm . Foram utilizadas aproximadamente 12 hastes verticais para R1 e R2 e 8 hastes para R3. Nos ensaios em batelada não houve material suporte.

#### 4.1.6 Inóculo

R1 e bateladas anaeróbias foram inoculados a partir da maceração dos grânulos do lodo de reator UASB proveniente do tratamento de águas residuárias da Avícola Dacar (Tietê/SP).

R2 foi inoculado com lodo proveniente de sistema de lodos ativados com atividade nitrificante, da estação de tratamento de águas residuárias da Fábrica de Motores da Volkswagen (São Carlos/SP) (GUERRERO; ZAIAT, 2017).

R3 foi inoculado a partir da biomassa adaptada proveniente de reator desnitrificantes autotrófico operado nas dependências do Laboratório de Processos Biológicos (LPB/EESC –USP) (GUERRERO; ZAIAT, 2017).

Ressalta-se que nenhum dos três inóculos utilizados estavam adaptados à salinidade, ou seja, todos eram não-halofílicos.

### 4.1. Avaliação do desempenho dos reatores: Métodos analíticos e cálculos

O desempenho do reator anaeróbio (R1) foi avaliado por parâmetros como: pH Alcalinidade parcial (Ap), alcalinidade intermediária (AI), ácidos voláteis totais (AVT), alcalinidade a ácidos voláteis, demanda química de oxigênio (DQO) e concentração de sólidos suspensos totais (SST), voláteis (SSV) e fixos (SSF), sulfato, sulfeto líquido e gasoso.

O desempenho do reator aeróbio (R2) foi avaliado pelos mesmos parâmetros aplicados ao R1, com acréscimo da avaliação de nitrogênio amoniacal ( $\text{N-NH}_4^+$ ), nitrogênio na forma de nitrito ( $\text{N-NO}_2^-$ ) e nitrogênio na forma de nitrato ( $\text{N-NO}_3^-$ ).

E para o reator desnitrificante autotróficos (R3) a avaliação de desempenho ocorreu pelos mesmos parâmetros citados para os reatores R2 e R3 acrescido de análise de sulfeto no líquido e gás.

As equações gerais para os três sistemas estão descritas nas Tabela 4.1, Tabela 4.2 e Tabela 4.3.

- DQO, SST, SSV e SSF: Esses parâmetros foram determinados de acordo com protocolos descritos no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA/AWWA/WEF, 2012). Para a análise de sólidos foram utilizadas membranas de 1,2 µm para filtração das amostras, e para a análise de DQO do reator R1 foi utilizado ZnSO<sub>4</sub> para precipitação do sulfeto dissolvido, uma vez que o mesmo contribui para a DQO do sistema (1 g S<sup>2-</sup> (l) ~ 2 g O<sub>2</sub>), além da precipitação do cloreto existente na água residuária utilizando sulfato de mercúrio (HgSO<sub>4</sub>) seguindo metodologia de (VYRIDES; STUCKEY, 2009);

- Alcalinidade e ácidos voláteis totais: para determinação desses parâmetros foi utilizada metodologia descrita por KAPP, (1984) por meio de titulometria potenciométrica para R1, permitindo o cálculo da alcalinidade a sulfeto determinada DE GODOI et al. (2017). Para R2, foi realizada alcalinidade total e intermediária seguindo metodologia de RIPLEY; BOYLE; CONVERSE (1986).

- Sulfato e sulfeto no líquido: O sulfato e sulfeto estão sendo analisados por método descrito no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA/AWWA/WEF, 2012). Para análise do sulfeto utiliza-se o kit HACH® composto por dois reagentes. Uma vez que o sulfeto reagente com o oxigênio, as amostras foram coletadas diretamente do interior do reator utilizando seringa com septo para evitar a contaminação ou perda do gás. Foi utilizado NaOH para o sulfeto e HCl para o sulfato para preservação das amostras.

- Sulfeto gasoso: Esse método idealizado no laboratório de processos biológicos (LPB-EESC/USP) realiza a quantificação de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) em amostras gasosas utilizando o método de azul de metileno, o mesmo utilizado na determinação de sulfeto total em amostras líquidas (APHA/AWWA/WEF, 2012). Para análise de sulfeto gasoso a amostra é transferida para um tubo a vácuo contendo uma solução de acetato de zinco, na qual o gás sulfídrico é fixado sob a forma de sulfeto de zinco (ZnS). Hidróxido de sódio é utilizado para elevar o pH da solução e promover a precipitação de ZnS.

- Sulfeto total dissolvido (STD): Calculado de acordo com o pKa (6,89) para o primeiro estágio de ionização do sulfeto (H<sub>2</sub>S<sub>(aq)</sub> → HS<sup>-</sup>) sob a temperatura de operação (30 °C), de acordo com equações descritas nos respectivos capítulos desta tese.

- Série de nitrogênio: Nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) e nitrito (N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) foram avaliados por método espectrofotométrico (APHA/AWWA/WEF, 2012) e o nitrato

(N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) avaliado por método espectrofotométrico da absorção ultravioleta (UV) modificado de (APHA/AWWA/WEF, 2012) A análise de nitrato utiliza-se apenas do ácido clorídrico como reagente, e em seguida realiza-se a leitura em UV. As amostras do efluente são previamente filtradas em membrana 0,45 µm para realização da série nitrogenada.

- Oxigênio dissolvido, potencial de oxirredução e condutividade: O oxigênio dissolvido (OD) e o potencial de oxi-redução (pOR) estão sendo monitorados em R2 a partir de sensores Intellical ORP-Redox MTC 101 (Hach) e LDO HQ10 (Hach), ambos acoplados a medido HQ40d (Hach). E a condutividade por meio de condutímetro Digimed DM-31.

- Análise de Sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S), metano (CH<sub>4</sub>), nitrogênio (N<sub>2</sub>), e gás carbônico (CO<sub>2</sub>): esses compostos foram analisado por cromatografia gasosa (LEBRERO et al., 2016).

- Cálculo pressão osmótica (π): Como o substrato tem características salina, utiliza-se a pressão osmótica como forma de monitoramento (Equação 4). Onde: M é a molaridade da solução (mol/L), R é a constante universal dos gases perfeitos (0,082 atm L mol<sup>-1</sup>), T a temperatura (K) e i o fator de Van't Hoff. Para fins de transformação utilizou-se 1 wt% equivalente a 6,3 atm (PANSWAD; ANAN, 1999) .

$$\pi = M \cdot R \cdot T \cdot i \quad (4)$$

Tabela 4.1. Principais equações utilizadas para verificação do desempenho do reator R1

VARIÁVEL	UNIDADE	EQUAÇÃO	
Eficiência de remoção de matéria orgânica	%	$\%DQO = \frac{DQOaf - DQOef}{DQOaf} \cdot 100$	DQOaf: DQO afluyente (g L <sup>-1</sup> ) DQOef: DQ efluente (g L <sup>-1</sup> )
DQO removida via sulfetogênese	%	$\%DQO_{SO_4^{2-}} = 0,67 \cdot \frac{Sulfato\ af - Sulfato\ ef}{DQOaf - DQO\ ef} \cdot 100$	Sulfato af: sulfato afluyente (g L <sup>-1</sup> ) Sulfato ef: sulfato efluente (g L <sup>-1</sup> ) DQOaf: DQO afluyente (g L <sup>-1</sup> ) DQOef: DQ efluente (g L <sup>-1</sup> )
DQO removida via metanogênese	%	$\%DQO_{CH_4} = \%DQO - \%DQO_{SO_4^{2-}}$	%DQO: Eficiência de remoção de matéria orgânica %DQO <sub>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></sub> : DQO removida via sulfetogênese
Carga de sulfato	g SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	$C\ SO_4^{2-} = \frac{Sulfato}{TDH}$	TDH: Tempo de detenção hidráulico (dia)
Ânion bissulfeto	g L <sup>-1</sup>	$HS^- = \frac{STD}{1 + 10^{pKa - pH}}$	STD: Sulfeto total dissolvido (g L <sup>-1</sup> )
Sulfeto total dissolvido	g L <sup>-1</sup>	$STD = H_2S_{(aq)} + HS^-_{(aq)}$	H <sub>2</sub> S: Sulfeto de hidrogênio (g L <sup>-1</sup> ) HS <sup>-</sup> : ânion bissulfeto (g L <sup>-1</sup> )
Sulfeto estimado	g L <sup>-1</sup>	$S_{estim.} = (Sulfato\ af - Sulfato\ ef) \cdot 0,33$	Sulfato af: sulfato afluyente (g L <sup>-1</sup> ) Sulfato ef: sulfato efluente (g L <sup>-1</sup> )
Conteúdo de H <sub>2</sub> S(%), CH <sub>4</sub> (%) e CO <sub>2</sub> (%) no biogás	%	$\%H_2S = \frac{nH_2}{nt}$ $\%CH_4 = \frac{nH_2}{nt}$ $\%CO_2 = \frac{nH_2}{nt}$	nH <sub>2</sub> S: número de mols de H <sub>2</sub> S (mol) nCH <sub>4</sub> : número de mols de H <sub>2</sub> (mol) nCO <sub>2</sub> : número de mols de H <sub>2</sub> (mol) nt: nH <sub>2</sub> S + nCH <sub>4</sub> + nCO <sub>2</sub> (mol)
Rendimento de CH <sub>4</sub>	mLCH <sub>4</sub> g <sup>-1</sup> DQO	$MY = \frac{VBG \cdot \%CH_4}{(DQOaf - DQOef) \cdot Qaf}$	VBG: vazão de biogás (mL h <sup>-1</sup> ) DQOaf: DQO afluyente (g L <sup>-1</sup> ) DQOef: DQ efluente (g L <sup>-1</sup> ) Qaf: vazão afluyente ao reator (L h <sup>-1</sup> )

Tabela 4.2. Principais equações utilizadas para verificação do desempenho do reator R2

VARIÁVEL	UNIDADE	EQUAÇÃO	
Eficiência de remoção de matéria orgânica	%	$\%DQO = \frac{DQOaf - DQOef}{DQOaf} \cdot 100$	DQOaf: DQO afluente (g L <sup>-1</sup> ) DQOef: DQ efluente (g L <sup>-1</sup> )
Eficiência de oxidação de nitrogênio amoniacal	%	$\%Ox. N-NH_4^+ = \frac{N-NH_4^+ af - N-NH_4^+ ef}{N-NH_4^+ af} \cdot 100$	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> af: Nitrogênio amoniacal afluente (mg L <sup>-1</sup> ) N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ef: Nitrogênio amoniacal efluente (mg L <sup>-1</sup> )
Eficiência de remoção de nitrogênio total	%	$\%N = \frac{(N-NH_4^+ af) - (N-NH_4^+ ef + N-NO_2^- ef + N-NO_3^- ef)}{(N-NH_4^+ af)} \cdot 100$	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> af: Nitrogênio amoniacal afluente (mg L <sup>-1</sup> ) N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ef: Nitrogênio amoniacal efluente (mg L <sup>-1</sup> ) N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ef: Nitrogênio a nitrito efluente (mg L <sup>-1</sup> ) N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ef: Nitrogênio a nitrato efluente (mg L <sup>-1</sup> )
Carga aplicada a nitrogênio	mg-N m <sup>-3</sup> dia <sup>-1</sup>	$CN_{aplicada} = \frac{N-NH_4^+ af \cdot Qaf}{V_{útil}}$	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> af: Nitrogênio amoniacal afluente (mg L <sup>-1</sup> ) Q <sub>af</sub> : vazão afluente ao reator (L h <sup>-1</sup> ) V <sub>útil</sub> : Volume útil do reator (L)
Carga de nitrogênio oxidado	mg-N m <sup>-3</sup> dia <sup>-1</sup>	$CN_{oxidada} = \frac{(N-NH_4^+ af - N-NH_4^+ ef) \cdot Qaf}{V_{útil}}$	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> af: Nitrogênio amoniacal afluente (mg L <sup>-1</sup> ) N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ef: Nitrogênio amoniacal efluente (mg L <sup>-1</sup> ) Q <sub>af</sub> : vazão afluente ao reator (L h <sup>-1</sup> ) V <sub>útil</sub> : Volume útil do reator (L)

Tabela 4.3. Principais equações utilizadas para verificação do desempenho do reator R3

VARIÁVEL	UNIDADE	EQUAÇÃO	
Carga aplicada a nitrogênio	mg-N L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	$CN_{aplicada} = \frac{N-NO_3^- af \cdot Q_{af}}{V_{útil}}$	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> af: Nitrogênio amoniacal afluente (mg L <sup>-1</sup> ) Q <sub>af</sub> : vazão afluente ao reator (L h <sup>-1</sup> ) V <sub>útil</sub> : Volume útil do reator (L)
Eficiência de desnitrificação	%	$\%Des = \frac{(N-NO_3^- af) - (N-NO_3^- ef) - N-NO_2^- ef}{(N-NO_3^- af)} \cdot 100$	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> af: Nitrogênio a nitrato afluente (mg L <sup>-1</sup> ) N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ef: Nitrogênio a nitrato efluente (mg L <sup>-1</sup> ) N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ef: Nitrogênio a nitrito efluente (mg L <sup>-1</sup> )
Carga aplicada a enxofre	mg-S L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	$Carga\ de\ sulfeto = \frac{H_2S\ af \cdot Q_{N_2} \cdot P \cdot MM}{R \cdot T \cdot V_{reator}}$	H <sub>2</sub> S: concentração volumétrica de H <sub>2</sub> S afluente (ppmv) Q <sub>N<sub>2</sub>/S<sub>2</sub></sub> : Vazão de entrada de gás sintético (L h <sup>-1</sup> ) P: pressão atmosférica (1atm) MM: massa molar do enxofre (g mol <sup>-1</sup> ) R: constante universal dos gases ideais, equivalente - 0,082 atm L mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>
Eficiência de remoção de H <sub>2</sub> S	%	$Ef.\ Remoção\ H_2S = \frac{H_2S\ af - H_2S\ ef}{H_2S\ af}$	H <sub>2</sub> S af: concentração volumétrica de H <sub>2</sub> S afluente (ppmv) H <sub>2</sub> S ef: concentração volumétrica de H <sub>2</sub> S efluente (ppmv)

## CAPÍTULO 5

---

### 5. EFEITO DA SALINIDADE NA PRODUÇÃO DE METANO E NA REDUÇÃO DE SULFATO DE LODO DE REATOR ANAERÓBIO NÃO ADAPTADO À SALINIDADE: UMA AVALIAÇÃO CINÉTICA

#### 5.1 RESUMO

Águas residuárias ricas em matéria orgânica e sulfato são amplamente estudadas visando à digestão anaeróbia com microrganismos metanogênicos e bactérias redutoras de sulfato. Entretanto com a evolução rápida das indústrias, novas demandas surgem para águas residuárias ricas em compostos orgânicos e sulfato, mas sobretudo com elevadas salinidades. Os microrganismos halofílicos são os mais adequados para o tratamento dessas águas residuárias, entretanto não são facilmente disponíveis, por isso são necessários os estudos de comportamento de microrganismos metanogênicos e sulfetogênicos em elevadas salinidades utilizando inóculos não halofílicos. Assim, o presente estudo visa avaliar a cinética para produção de metano e redução de sulfato na presença de salinidade variando de 0,00 a 35,00 g-NaCl L<sup>-1</sup> em ensaios em batelada. A produção de metano (P-CH<sub>4</sub>) decaiu com o aumento da salinidade, com valores variando de 139 NmL (15,60 g-NaCl L<sup>-1</sup>) para 29 NmL (35,00 g-NaCl L<sup>-1</sup>), tendo sua velocidade máxima 81 mL-CH<sub>4</sub> d<sup>-1</sup> com 2,3 g-NaCl L<sup>-1</sup>. A redução de sulfato apresentou interferência com valores mais baixos de salinidade, 10,4 g-NaCl L<sup>-1</sup> com constante cinética aparente decrescendo de 0,06 h<sup>-1</sup> (0,00 g-NaCl L<sup>-1</sup>) para 0,014 h<sup>-1</sup> (10,40 g-NaCl L<sup>-1</sup>). Os resultados permitiram concluir que as BRS foram os primeiros microorganismos afetados pela salinidade, desequilibrando o sistema, e levando ao acúmulo de ácidos. As arqueias metanogênicas tiveram seu metabolismo afetado pela salinidade, apresentando baixa velocidade de produção de metano, não sendo capaz de consumir ácidos. A queda na abundância relativa das bactérias oxidadoras incompletas de sulfato em 23 g-NaCl L<sup>-1</sup>, *Sulfurovum*, seguido do aparecimento de bactérias fermentativas – *Clostridium* – explicam tais padrões. A existência de arqueias metanogênicas hidrogenotróficas (ex. *Methanoregula*) e acetoclásticas (ex. *Methanosaeta*) não foi suficiente para consumir acetato e hidrogênio do meio.

## 5.2 INTRODUÇÃO

Águas residuárias de indústria de pescado, água de produção de petróleo e gás podem conter elevadas concentrações de íons como cloro ( $\text{Cl}^-$ ), sódio ( $\text{Na}^+$ ), sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) e matéria orgânica. Matéria orgânica e sulfato podem ser removidos via metanogênese e sulfetogênese. O íon sódio ( $\text{Na}^+$ ) auxilia na síntese de adenosina trifosfato (ATP) e oxidação de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) (TURCIOS; WEICHHREBE; PAPENBROCK, 2016).

O  $\text{SO}_4^{2-}$  quando reduzido a sulfeto (ROBERTS et al., 2016) e  $\text{Na}^+$  (MENDEZ; LEMA; SOTO, 1995) podem causar toxicidade por inibição aos microrganismos envolvidos nos processos de conversão dependendo de suas concentrações. A toxicidade do sulfato ocorre após sua redução pelas BRS, na sua forma de sulfeto de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{S}$ ) no biogás, ou  $\text{HS}^-/\text{H}_2\text{S}$  na fase líquida, dependendo do pH. Todos esses compostos podem ser tóxicos às células, podendo ser permeável na parede celular, desnaturar proteínas e coenzimas importantes através de ligações com as cadeias polipeptídicas (LENS et al., 1998a).

A toxicidade do  $\text{Na}^+$  relaciona-se à elevada diferença de pressão osmótica entre citoplasma do organismo e meio líquido, gerando inibição de proteínas chaves e desordens metabólicas (GUAN et al., 2023). Entre as proteínas afetadas, a F420, coenzima presente nas arqueias metanogênicas, vem sendo avaliada como indicativo da atividade metanogênica, e estudos demonstram decaimento dessas proteínas com o aumento gradual de sal em ensaios anaeróbios, concomitante com o decaimento da produção de metano e tamanho de grânulos em lodos anaeróbios (ZHANG et al., 2022, 2020).

Além do decaimento de proteínas essenciais para o metabolismo celular, a salinidade elevada (>1%) pode gerar perda de água da célula, recessão do citoplasma e até desintegração das células (ABOU-ELELA; KAMEL; FAWZY, 2010). Para minimizar a toxicidade desses compostos, principalmente o sódio, uma opção é utilizar organismos halofílicos, porém, os mesmos são limitados como fonte de inóculo. A adaptação de organismos não halofílicos pode demorar até 719 dias em concentrações de sal acima de  $17 \text{ g L}^{-1}$  (MENDEZ; LEMA; SOTO, 1995). Ressalta-se aqui a diferença entre organismos halofílicos e halotolerantes. Organismos halofílicos são aqueles que

requerem elevadas concentrações de sal para crescer, enquanto o halotolerantes, podem crescer na ausência de salinidade, ou na presença de pequenas concentrações de sal.

Diante disso buscam-se alternativas para aplicação do tratamento anaeróbio em águas residuárias na presença de sal, viabilizando o uso de organismos não halofílicos como inóculo. Uma das estratégias metabólicas desses organismos é o acúmulo de íons em seu interior para balancear com a pressão osmótica externa (ROESSLER; MÜLLER, 2001). Devido ao tempo de resposta metabólica de adaptação, muito se tem pesquisado sobre as diferentes concentrações iniciais de salinidade capazes de afetar os organismos anaeróbios, podendo variar entre  $6 \text{ g-Na}^+ \text{ L}^{-1}$  (ZHANG et al., 2022) ou até  $23 \text{ g-Na}^+ \text{ L}^{-1}$  (LEFEBVRE et al., 2007).

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da salinidade ( $0$  a  $35 \text{ g-NaCl L}^{-1}$ ) na digestão anaeróbia usando água produzida em plataformas de petróleo e gás sintética por meio de (i) avaliação cinética do efeito da salinidade na metanogênese (produção de metano), (ii) avaliação cinética na sulfetogênese, por meio da remoção de sulfato, (iii) analisar o efeito da salinidade nas arqueias metanogênicas e bactérias. Esse estudo pode auxiliar em estratégias para utilizar lodo não halofílico como inóculo para diversas águas residuárias salinas de processos industriais.

## **5.3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.3.1 Inóculo**

O inóculo utilizado como consórcio microbiano foi proveniente de um reator do tipo UASB operando em condições mesófilas para o tratamento de efluentes de abatedouro de aves. Grupos microbianos participantes de todas as etapas da digestão anaeróbia (incluindo BRS) foram previamente identificados neste consórcio possuindo alto desempenho (GRANATTO et al., 2019).

### **5.3.2 Água residuária**

As características do efluente em estudo foram baseadas em água produzida de petróleo e gás (GABARDO, 2007), e utilizada em reator anaeróbio de leito estruturado, assim como o lodo. A matéria orgânica ( $780 \text{ mg L}^{-1}$ ) foi fornecida pelo etanol ( $0,48 \text{ mL L}^{-1}$ ), o sulfato, em concentração de  $480 \text{ mg-SO}_4^{2-} \text{ L}^{-1}$ , foi devido ao sulfato de sódio ( $710 \text{ mg L}^{-1}$ ), resultando em uma relação DQO /  $\text{SO}_4^{2-}$  foi de 1,6.

A salinidade foi devida ao cloreto de sódio (NaCl), e avaliada de 0 a 35 g-NaCl L<sup>-1</sup> (Tabela 5.1. Salinidades devido ao cloreto de sódio utilizados em ensaios em batelada e suas respectivas concentrações de íon sódio, pressão osmótica (atm e Wt%)). A suplementação de metais essenciais para o estabelecimento da metanogênese e sulfetogênese foi realizada através da adição de soluções de micro e macronutrientes adaptadas de (Torres, 1992).

Tabela 5.1. Salinidades devido ao cloreto de sódio utilizados em ensaios em batelada e suas respectivas concentrações de íon sódio, pressão osmótica (atm e Wt%)

<b>g-NaCl L<sup>-1</sup></b>	<b>g-Na<sup>+</sup> L<sup>-1</sup></b>	<b><math>\pi</math> total (atm)</b>	<b>Wt%</b>
<b>0</b>	0	0	0,0
<b>2,3</b>	1,00	1,9	0,3
<b>4,6</b>	2,00	3,9	0,6
<b>10,4</b>	4,00	8,8	1,4
<b>15,6</b>	6,00	13,2	2,1
<b>23,0</b>	9,00	19,5	3,1
<b>35,0</b>	14,00	30,0	4,7

### 5.3.3 Procedimento experimental

Testes de batelada foram realizados em frascos de Duran® com capacidade total de 1100 mL, volume útil de 360 mL e headspace de 740 mL. A relação alimento (F)/microorganismo (M) utilizada foi de 0,4 mg-DQO mg-SV<sup>-1</sup>.

Todos os testes foram realizados em triplicata. O lodo foi previamente centrifugado por 10 minutos a 900 rpm para retirada da fase líquida. Após a montagem dos reatores, o gás argônio foi fluxionado por 5 minutos na fase líquida e 2 minutos no headspace, garantindo o estabelecimento de um ambiente anaeróbio. Os frascos selados foram mantidos em agitador a 30°C e 150 rpm.

### 5.3.4 Métodos analíticos

O monitoramento de parâmetros como DQO, pH, sulfeto (S<sup>2-</sup>) seguiram metodologia descrita em APHA/AWWA/WEF (2012). Alcalindade total, intermediária e parcial foram avaliadas de acordo com Kapp (1984), no início e final do ensaio. A análise

de sulfato (APHA/AWWA/WEF, 2012) foi realizada ao longo do experimento. Para preservação das amostras, antes das análises de  $\text{SO}_4^{2-}$  e  $\text{S}^{2-}$ , amostras líquidas foram coletadas em frascos contendo quantidades adequadas de ácido clorídrico (1 M) e hidróxido de sódio (50% m/V), respectivamente. A análise de DQO foi modificada com a dosagem de excesso de sulfato de mercúrio (II) ( $\text{HgSO}_4$ ) conforme proposto por Vyrides & Stuckey (2009) visando eliminar interferências de altos níveis de cloro. As amostras também foram pré-tratadas com sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4$ ) para remover interferências de sulfeto dissolvido.

A composição do biogás - sulfeto de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{S}$ ), nitrogênio ( $\text{N}_2$ ), metano ( $\text{CH}_4$ ) e dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) foi analisada durante todo o teste em um cromatógrafo a gás GC 2014 (Shimadzu®), equipado com um detector de condutividade térmica, com um HP-PLOT/Q 30m x 0,54mm, sendo o gás de arraste hidrogênio, com tempo de corrida de aproximadamente 15 minutos (Lebrero et al., 2016).

### 5.3.5 Análise de dados e avaliação cinética

As equações (5) e (6) foram utilizadas para estimar a proporção de remoção de matéria orgânica via sulfetogênese (%DQOsulfetogênese; %) e metanogênese (%DQOmetanogênese; %) (VILELA; DAMIANOVIC; FORESTI, 2014). Vale ressaltar que o cálculo da remoção por sulfetogênese utilizou a concentração inicial e final de sulfato. Os termos  $\text{SO}_4^{2-}$ ini,  $\text{SO}_4^{2-}$ fin, DQOini, DQOfin e %EfDQO são, respectivamente, as concentrações de sulfato inicial e final ( $\text{mg L}^{-1}$ ), os níveis de DQO inicial e final ( $\text{mg L}^{-1}$ ) e a remoção global de DQO eficiência (%) na Eq. (5)–(6). A eficiência de remoção de sulfato (%Ef $\text{SO}_4^{2-}$ ) também foi usada para avaliar o desempenho da fase líquida.

$$\%DQO_{\text{sulfetogênese}} = \left[ 0.67 \left( \frac{\text{SO}_4^{2-} \text{ ini} - \text{SO}_4^{2-} \text{ fin}}{\text{DQO}_{\text{ini}} - \text{DQO}_{\text{fin}}} \right) \right] \cdot 100 \quad (5)$$

$$\%DQO_{\text{metanogênese}} = \%DQO - \%DQO_{\text{sulfetogênese}} \quad (6)$$

A composição do biogás via GC na pressão interna, mais especificamente o metano, foi determinada em medições periódicas da pressão interna nas garrafas de Duran®. A produção cumulativa de metano (MEPcum -atm), número de mols de metano ( $n_{\text{CH}_4, n}$  - mols) e volume de metano no headspace ( $V_{\text{CH}_4}$ ) foram avaliados através da Eq. (7), (8) e (9) (Santos et al., 2019). Os termos Ppre,n e Ppost,n-1 são as pressões antes e depois da coleta da amostra nos tempos “n” e “n-1” (atm), respectivamente. A fração

de metano no biogás no tempo “n” ( $f_{CH_4}$  -adimensional), o volume do headspace ( $V_{headspace} - L$ ), a constante universal do gás ( $R - 0,082 \text{ atm L mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ), a temperatura de incubação ( $T - 30 \text{ }^\circ\text{C}$ ), a temperatura em condições normais ( $T_0 - 273\text{K}$ ) e a pressão atmosférica local ( $P_0 - 1 \text{ atm}$ ).

$$MEP_{cum} = \sum_{t=0}^{t=n} [(P_{pre,n} - P_{pos,n-1}) \cdot f_{CH_4,n}] \quad (7)$$

$$n_{CH_4,n} = \frac{MEP_{cum} \cdot V_{headspace}}{R \cdot T} \quad (8)$$

$$V_{CH_4,n} = \frac{n_{CH_4,n} \cdot R \cdot T_0}{P_0} \quad (9)$$

Os resultados das análises do biogás foram ajustados de acordo com o modelo de Gompertz modificado por Zwietering et al. (1990), Eq. (10). Valores de produção máxima de metano ( $P_{CH_4}$ ) em mL, velocidade máxima de produção de metano ( $k$ ), em  $\text{mL d}^{-1}$ , e o período de tempo até o início da produção de metano ( $\lambda$ ), em dias, foram estimados. Sendo o número de Euler -  $e$  - de 2,71828 e  $t$  o tempo de incubação em dias. Os ajustes foram feitos pelo método Levenberg-Marquardt (Microsoft Origin 9.0).

$$P_{CH_4}(t) = P_{CH_4} \times \left\{ -\exp \left[ \frac{k \times e}{P_{CH_4}} \times (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (10)$$

Com relação à conversão de sulfato, foi utilizado o modelo de primeira ordem com decaimento exponencial e residual (CAMARGO et al., 2002) – Eq. (11). Para este modelo foi considerado um sistema de mistura completa, isotérmico (temperatura constante de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ), homogêneo e em estado estacionário. Sendo “ $C(t)$ ” a concentração de sulfato no líquido em um tempo “ $t$ ”, “ $C_0$ ” a concentração inicial de sulfato, “ $C_{res}$ ” o sulfato residual no reator ao final da incubação, todos em  $\text{mg L}^{-1}$ ,  $k_{app}$  a constante cinética aparente ( $\text{h}^{-1}$ ) e  $t$  o tempo de teste ( $\text{h}$ ).

$$C(t) = C_{res} + (C_0 - C_{res}) \cdot e^{(k_{app} \cdot t)} \quad (11)$$

Ao observar mais de um comportamento cinético para um mesmo conjunto de dados, para fins de ajuste, o tempo “n” em que ocorreu a mudança de comportamento foi considerado zero. Este procedimento foi aplicado tanto para a produção de metano quanto para a redução de sulfato.

### 5.3.6 Análises microbiológicas

Amostras finais de cada ensaio em batelada foram coletadas e armazenadas a 4 °C até processamento posterior. A extração total de DNA para sequenciamento de próxima geração (NGS) foi realizada usando o kit FASTDNA SPIN para solo (Qbiogene, Carlsbad, CA, EUA). A qualidade do DNA foi avaliada pela proporção de 260/280 nm N 1,8, medida por um espectrofotômetro ND-2000 (Nanodrop Inc., Wilmington, DE) e eletroforese em gel de agarose.

O sequenciamento paired-end de ciclos Illumina MiSeq 300 da região (~450 pb) de 16S rRNA foi realizada seguindo o protocolo do fabricante (Illumina Inc., EUA) pela NGS soluções genômicas (Piracicaba, Brasil), usando seu próprio pipeline considerando 1% de erro. As sequências resultantes (fastq) foram filtradas com qualidade em um Phred usando o software FastQC v.0.11.8 (ANDREWS, 2010). O recorte do primer foi realizado em Python v.3.6 com software inspirado no projeto BioPython (COCK et al., 2009) . As unidades taxonômicas operacionais (OTU) classificadas como quimeras foram removidas (SMYTH et al., 2010).

A identificação taxonômica foi realizada usando blastn v.2.6.0+(ALTSCHUL et al., 1990). As sequências identificadas pelo MiSeq Illumina foram depositadas no National Center for Biotechnology Information (NCBI - <https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/>).

## 5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.4.1 Desempenho geral

A participação da metanogênese e sulfetogênese na remoção da matéria orgânica, na forma de DQO, está indicada na Figura 5.1. Para a condição sem salinidade devido ao cloreto de sódio, a %EfdQO foi de  $93 \pm 3\%$ . A eficiência de remoção do sulfato para essa condição foi de  $63 \pm 3\%$ , e o pH efluente de  $7,40 \pm 0,10$ , resultando em concentração de sulfeto ( $S^{2-}$ ) no efluente de  $62,30 \pm 4,80 \text{ mg-S}^{2-} \text{ L}^{-1}$ . 32% da remoção da matéria orgânica ocorreu pela via sulfetogênica na ausência de salinidade.

O desempenho para as concentrações de 2,3 e 4,6 g-NaCl  $\text{L}^{-1}$  foram similares, com %EfdQO de  $83 \pm 1\%$  e  $78 \pm 1\%$ , respectivamente. A remoção pela via da sulfetogênese para ambas as condições foi de 40%, superior à condição sem salinidade. O sulfeto no

efluente foi de  $55,20 \pm 7,70 \text{ mg-S}^{2-} \text{ L}^{-1}$  para  $2,3 \text{ g-NaCl L}^{-1}$  e  $51,00 \pm 2,00 \text{ mg-S}^{2-} \text{ L}^{-1}$  para  $4,6 \text{ g-NaCl L}^{-1}$ . O pH para  $2,3 \text{ g-NaCl L}^{-1}$  foi de  $7,00 \pm 0,1$  para o afluente e  $7,20 \pm 0,0$  para o efluente.

De acordo com os dados da Tabela 5.2, o incremento da salinidade para  $2,3$  e  $4,6 \text{ g-NaCl L}^{-1}$  causou redução na eficiência de remoção de DQO com manutenção da participação da vida sulfetogênica e queda da via metogênica para a remoção de matéria orgânica.

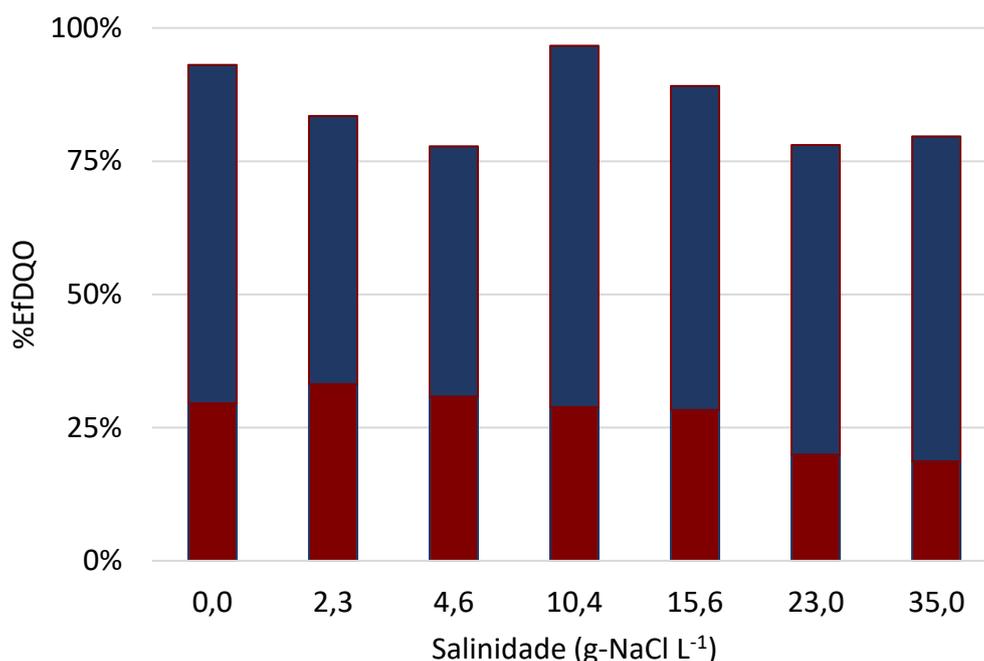


Figura 5.1. Eficiência total de remoção de matéria orgânica via metanogênese (-■-) e sulfetogênese (-■-) em diferentes salinidades

Na condição com o aumento da salinidade para  $10,4 \text{ g-NaCl L}^{-1}$  observou-se que a eficiência de remoção de DQO alcançou cerca de 97%, com participação de 30% da via sulfetogênica, indicando resistência da população metanogênica à salinidade.

A partir do aumento de salinidade para  $15,6 \text{ g-NaCl L}^{-1}$ , a eficiência de remoção de DQO decresceu paulatinamente até 80%, com remoção de matéria orgânica pela via sulfetogênica da ordem de 30%. Análises da proporção de biogás indicaram que até a salinidade de  $10,4 \text{ g-NaCl L}^{-1}$  a porcentagem era, em média, de 83% de metano ( $\text{CH}_4$ ) e 17% gás carbônico ( $\text{CO}_2$ ), e com  $15,6 \text{ g-NaCl L}^{-1}$  essa proporção foi de 77% de  $\text{CH}_4$  e 23% de  $\text{CO}_2$ . O  $\text{H}_2\text{S}$  não foi observado na proporção gasosa devido a limitação do método. Apesar da queda na proporção do gás metano com concentração de sal a partir de

15,6 g-NaCl L<sup>-1</sup>, a proporção da remoção de DQO pelas vias concorrentes metanogênese/sulfetogênese variou de 70:30 para 80:20 com o aumento da salinidade 4,6 para 10,4 gNaCl L<sup>-1</sup>.

A partir de 23 g-NaCl L<sup>-1</sup>, observou-se queda do pH para 5,5 em média e eficiência de remoção de sulfato de cerca de 40%, indicando maior sensibilidade das BRS em relação à salinidade do que das arqueias metanogênicas. Devido ao decréscimo no pH e à redução da eficiência da sulfetogênese, menor concentração de sulfeto foi observada na fase líquida.

Tabela 5.2. Desempenho geral de testes em batelada para diferentes concentrações de NaCl

<b>g-NaCl L<sup>-1</sup></b>	<b>0,00</b>	<b>2,30</b>	<b>4,60</b>	<b>10,40</b>	<b>15,60</b>	<b>23,00</b>	<b>35,00</b>
<b>%EfSO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	63% (3%)	70% (1%)	69% (1%)	63% (4%)	62% (5%)	44% (4%)	41% (2%)
<b>%EfDQO</b>	93% (1%)	83% (1%)	78% (1%)	97% (1%)	89% (1%)	78% (0%)	80% (0%)
<b>Sulfeto líquido (mg L<sup>-1</sup>)</b>	62,30 (4,80)	55,20 (7,70)	51,00 (2,00)	42,30 (4,25)	32,30 (4,23)	16,60 (2,00)	14,50 (1,75)
<b>HS<sup>-</sup> (mg L<sup>-1</sup>)</b>	48,20 (1,20)	37,00 (7,30)	34,50 (1,00)	27,70 (3,10)	18,70 (1,60)	0,70 (0,10)	0,30 (0,05)
<b>H<sub>2</sub>S (mg L<sup>-1</sup>)</b>	14,10 (3,80)	18,30 (1,70)	16,50 (1,50)	14,60 (1,20)	13,60 (2,60)	16,00 (2,00)	14,20 (1,70)
<b>pH afluente</b>	7,30 (0,20)	7,00 (0,00)	7,50 (0,00)	7,30 (0,06)	7,10 (0,06)	7,20 (0,09)	7,20 (0,07)
<b>pH efluente</b>	7,40 (0,10)	7,20 (0,10)	7,20 (0,04)	7,20 (0,02)	7,03 (0,05)	5,50 (0,04)	5,30 (0,02)
<b>%DQO sulfetogênese</b>	32% (9%)	40% (2%)	40% (2%)	30% (0%)	32% (3%)	26% (3%)	23% (2%)
<b>%DQO metanogênese</b>	68% (9%)	60% (2%)	60% (2%)	70% (0%)	68% (3%)	74% (3%)	77% (2%)
<b>Alcalinidade parcial (mg-CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>)</b>	365,70 (92,60)	301,50 (17,40)	299,20 (4,00)	378,60 (29,00)	212,70 (7,40)	-	-
<b>Alcalinidade intermediária (mg-CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>)</b>	144,60 (55,00)	103,60 (10,40)	112,80 (22,00)	218,70 (22,00)	105,00 (3,60)	255,40 (12,20)	217,0 (18,50)

Estudos utilizando lodo de tratamento de processamento de alimento e concentração de 30 g-NaCl L<sup>-1</sup> obtiveram apenas 30% de remoção de matéria orgânica em ensaios em batelada (GUAN et al., 2023). Em um reator do tipo CSTR, GAO et al. (2022) obtiveram remoção superior a 90% em concentrações até 10 g L<sup>-1</sup> de salinidade, e para concentrações entre 10 e 30 g L<sup>-1</sup> remoção de apenas 64% tratando esgoto.

Resultados da literatura demonstram que a metanogênese é fortemente afetada pela salinidade (GAO et al., 2022; GUAN et al., 2023; ZHANG et al., 2020a), influenciando na remoção de matéria orgânica e produção de metano. Porém, em comparação a este estudo, apesar da baixa produção de metano, a eficiência do sistema foi mantida com maior participação dada pela metanogênese, comparativamente à sulfetogênese.

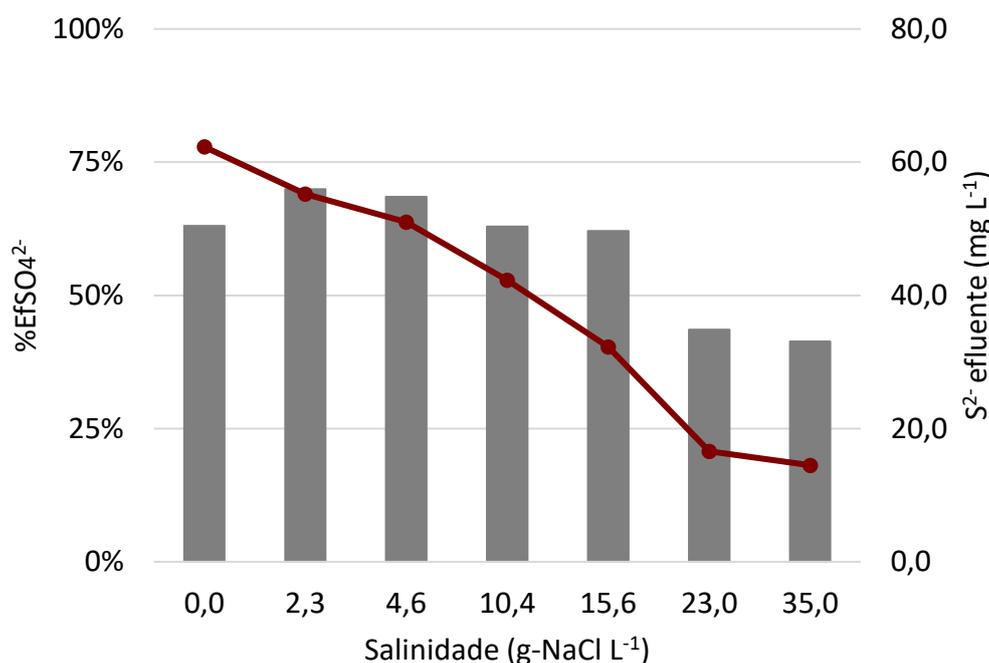


Figura 5.2. Eficiência de redução de sulfato (-■-) e sulfeto em meio líquido (-●-) de acordo com as diferentes concentrações de salinidade

A queda no pH para concentrações superiores a 15,6 g-NaCl L<sup>-1</sup> acarretou redução da alcalinidade, com a alcalinidade parcial passando de  $336 \pm 56$  mg-CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> para 0,0 mg-CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>. A alcalinidade intermediária, associada ao acúmulo de ácidos orgânicos, aumentou para concentrações maiores que 10,40 g-NaCl L<sup>-1</sup>, apesar do pH nessa condição não diferir das anteriores. Tal desempenho indica que em sistemas metanogênicos/sulfetogênicos a formação de alcalinidade a ácidos é o principal ponto a ser analisado, uma vez que a partir de 15,6 g-NaCl L<sup>-1</sup>, os resultados demonstram que a salinidade interferiu diretamente na digestão anaeróbia (metanogênese), similarmente ao observado por GUAN et al. (2023). Os autores citados observaram em concentração similar de salinidade acúmulo de ácido acético, propiônico e butírico.

Com a redução da alcalinidade, o pH conseqüentemente foi afetado para concentrações acima de 10,40 g-NaCl L<sup>-1</sup> acarretando em deslocamento químico das formas de sulfeto disponível no meio (Equação 12). Até 10,40 g-NaCl L<sup>-1</sup> de concentração de sal a proporção era de 67 ± 7 % HS<sup>-</sup> e 33 ± 7 % H<sub>2</sub>S, e acima de 23,00 g-NaCl L<sup>-1</sup> a proporção foi de 3 ± 1% HS<sup>-</sup> e 97± 1 % H<sub>2</sub>S. Nessa condição observou-se efeito deletério uma vez que a forma não ionizada (H<sub>2</sub>S livre) é a mais tóxica para os microrganismos, podendo gerar inibição 50% em concentrações entre 50 a 130 mg L<sup>-1</sup> em sistema de sólidos suspensos (LENS et al., 1998a). Apesar da concentração de H<sub>2</sub>S no meio líquido ter sido de apenas 15,30 ± 1,70 mg L<sup>-1</sup> as condições extremas do sistema, como salinidade contribuíram para que o mesmo não fosse capaz de se autoregular, acumulando ácidos e reduzindo a eficiência de remoção de matéria orgânica.



#### **5.4.2 Avaliação da produção de metano em lodo não adaptado em diferentes concentrações de salinidade**

A produção acumulada de metano foi avaliada para as sete condições de salinidade (0, 2,3, 4,6, 10,4 e 15,6, 23,0 e 35,0 g-NaCl L<sup>-1</sup>) – Figura 5.3, fazendo-se o ajuste dos dados experimentais para obtenção dos parâmetros cinéticos apresentados na Tabela 5.3.

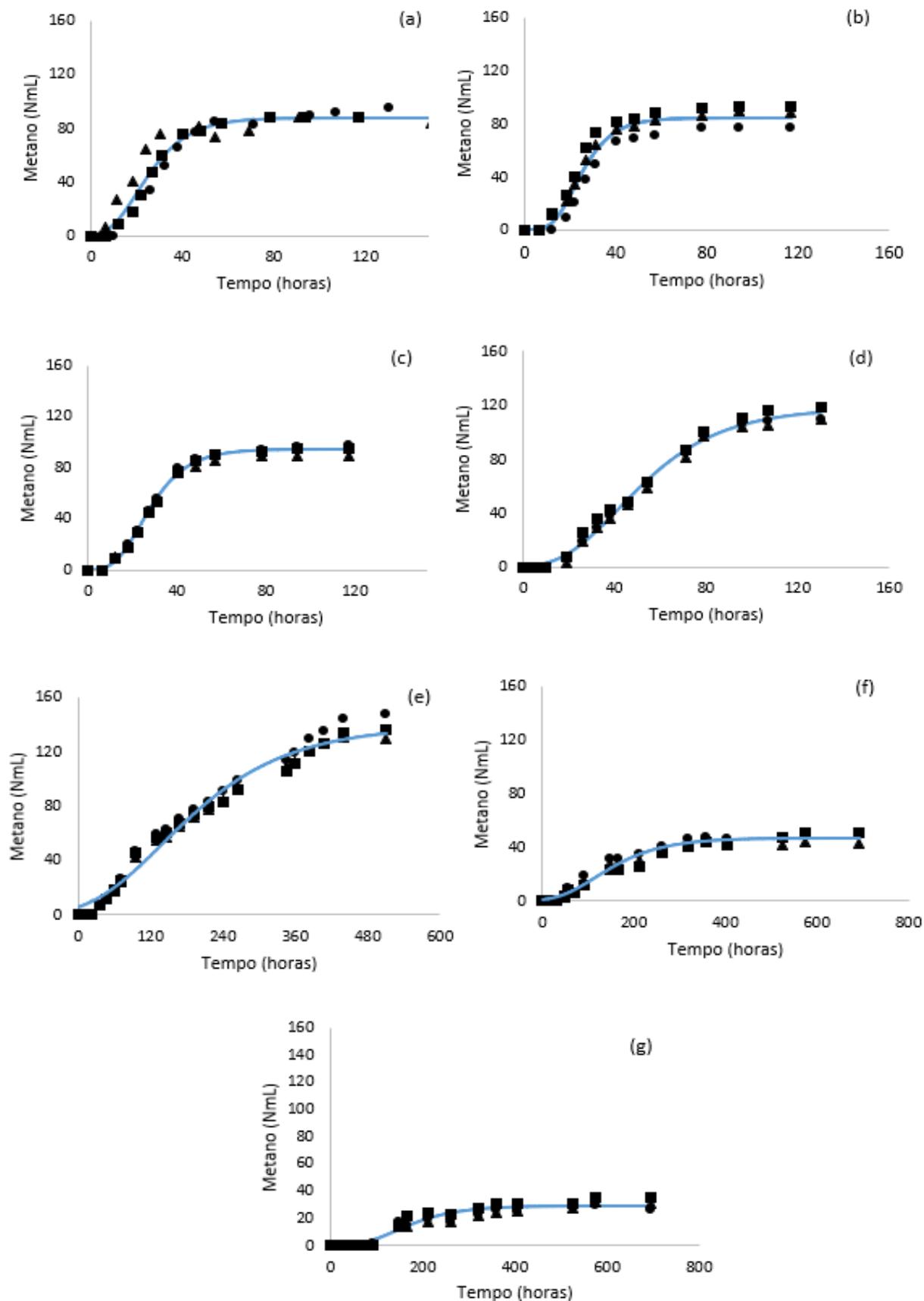


Figura 5.3. Produção de metano (acumulado) para diferentes salinidades. (a) 0 g-NaCl L<sup>-1</sup>; (b) 2,3 g-NaCl L<sup>-1</sup>; (c) 4,6 g-NaCl L<sup>-1</sup>; (d) 10,4 g-NaCl L<sup>-1</sup>; (e) 15,6 g-NaCl L<sup>-1</sup>; (f) 23,0 g-NaCl L<sup>-1</sup>; (g) 35,0 g-NaCl L<sup>-1</sup>. Legenda: Dados experimentais em triplicata (■●▲); Modelo ajustado (-)

As produções máximas de metano (PCH<sub>4</sub>) para a condição sem NaCl e 4,6 g-NaCl L<sup>-1</sup> foram próximas (Tabela 5.3), porém a velocidade de produção (k-CH<sub>4</sub>) para 2,3 g-NaCl L<sup>-1</sup> foi a maior obtida. Pequenas concentrações de Na<sup>+</sup> são essenciais para o crescimento dos microrganismos, uma vez que participam da formação do ATP e oxidação do NADH (DIMROTH; THOMER, 1989), porém concentrações de 3,5 a 5,5 g-Na<sup>+</sup> L<sup>-1</sup> podem causar toxicidade moderada, enquanto que 8 g-Na<sup>+</sup> L<sup>-1</sup> afetam drasticamente a metanogênese (CHEN; CHENG; CREAMER, 2008; MCCARTY, 1964b).

O aumento da salinidade para a concentração de 15,60 g-NaCl L<sup>-1</sup> relacionou-se com a maior produção de metano, 140,00 ± 3,00 mL, mas a velocidade de produção caiu consideravelmente para 11,00 ± 0,40 mL d<sup>-1</sup> em relação aos ensaios com menores salinidades. Observou-se que sob essa concentração, a fase lag aumentou para 0,90 ± 0,20 dias, indicando que os microrganismos tiveram maior impacto a essa salinidade quando comparado as fases anteriores, média de 0,50 dias para a fase lag.

Para concentrações maiores – 23,0 e 35,0 g-NaCl L<sup>-1</sup> – a resposta do sistema para a PCH<sub>4</sub> foi negativa assim como o aumento da fase lag (Figura 5.4) e a redução da velocidade da reação, apesar da manutenção da eficiência de remoção de %EfDQO. A fase lag também aumentou de 1,40 ± 0,20 dias, para 2,90 ± 0,40 dias, com destaque para k-CH<sub>4</sub> (Figura 5.4), menores valores obtidos.

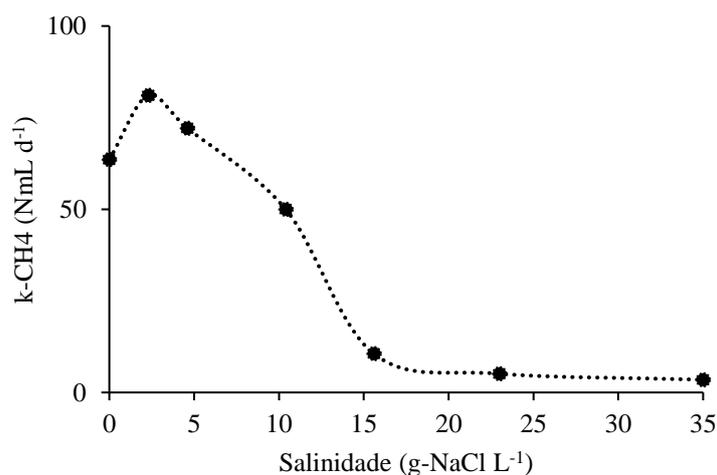


Figura 5.4. Valores da velocidade de produção de metano obtidos para diferentes salinidades devido ao NaCl.

Zhang et al. (2019) avaliaram a adaptação à salinidade em comunidades anaeróbicas a partir da digestão de efluentes de cozinha, verificando que um aumento de 0 a 4 gNaCl L<sup>-1</sup> gerou um aumento de produção de biogás de 179,4 para 243,06 mL g-SV<sup>-1</sup>, porém com uma concentração de 20 g-NaCl L<sup>-1</sup> a produção de metano caiu para 27,8 mL g-SV<sup>-1</sup>. Os autores observaram que a enzima desidrogenase e coenzima F420, relacionadas à produção de metano, foram afetadas.

ANWAR et al., (2016) observaram que, até 8 g-NaCl L<sup>-1</sup> houve um declínio na produção acumulada de metano de menos que 10%. Entretanto, a variação da salinidade acima de 10 g-NaCl L<sup>-1</sup> interferiu negativamente na produção acumulada de metano, sendo que para 16 g-NaCl L<sup>-1</sup> houve um declínio em 81%, quando comparada à ausência de salinidade.

OLLIVIER et al. (1994) ressaltam que a metanogênese não contribui para a mineralização de carboidratos em concentrações de NaCl acima de 15%, sendo que acima dessa concentração a redução de sulfato é a principal maneira de oxidar H<sub>2</sub> (embora a taxas muito baixas).

Para esse estudo, ao se comparar a concentração de 15,6 e 0,0 g-NaCl L<sup>-1</sup> observou-se um aumento na produção acumulada de metano de 60%, porém com uma velocidade 6 vezes menor.

Tabela 5.3. Parâmetros cinéticos obtidos para a produção de metano em diferentes salinidades

g-NaCl L <sup>-1</sup>	0,00	2,30	4,60	10,40	15,60	23,00	35,00
<b>P-CH<sub>4</sub></b>	87,60	84,80	93,90	117,80	139,30	46,60	29,00
<b>(NmL)</b>	(2,35)	(2,10)	(0,80)	(0,20)	(3,30)	(0,80)	(0,80)
<b>k-CH<sub>4</sub> (mL d<sup>-1</sup>)</b>	63,60	81,10	72,10	50,00	10,60	5,10	3,50
<b>d<sup>-1</sup>)</b>	(7,10)	(9,30)	(2,30)	(1,70)	(0,40)	(0,30)	(0,40)
<b>λ (dias)</b>	0,30	0,50	0,50	0,70	0,90	1,40	2,85
	(0,10)	(0,05)	(0,01)	(0,04)	(0,20)	(0,20)	(0,40)
<b>R<sup>2</sup></b>	0,94	0,95	0,99	0,99	0,98	0,97	0,95

#### 5.4.3 Avaliação da redução de sulfato em lodo não adaptado em diferentes concentrações de salinidade

A cinética para as diferentes salinidades em relação ao sulfato, apresentou decaimento contínuo com o aumento da concentração de NaCl (Figura 5.5), mantendo-se

estável para concentrações acima de 10,4 g-NaCl L<sup>-1</sup>. Assim, o aumento gradual da salinidade em lodo não adaptado gerou impacto sobre a sulfetogênese.

Ressalta-se que o tempo para que a remoção de sulfato se estabilizasse foi de aproximadamente 50 horas de ensaio para as concentrações de 0 a 4,6 g-NaCl L<sup>-1</sup> e 100 horas para 10,4 a 35,0 g-NaCl L<sup>-1</sup>, sendo os ensaios com total de até 700 horas.

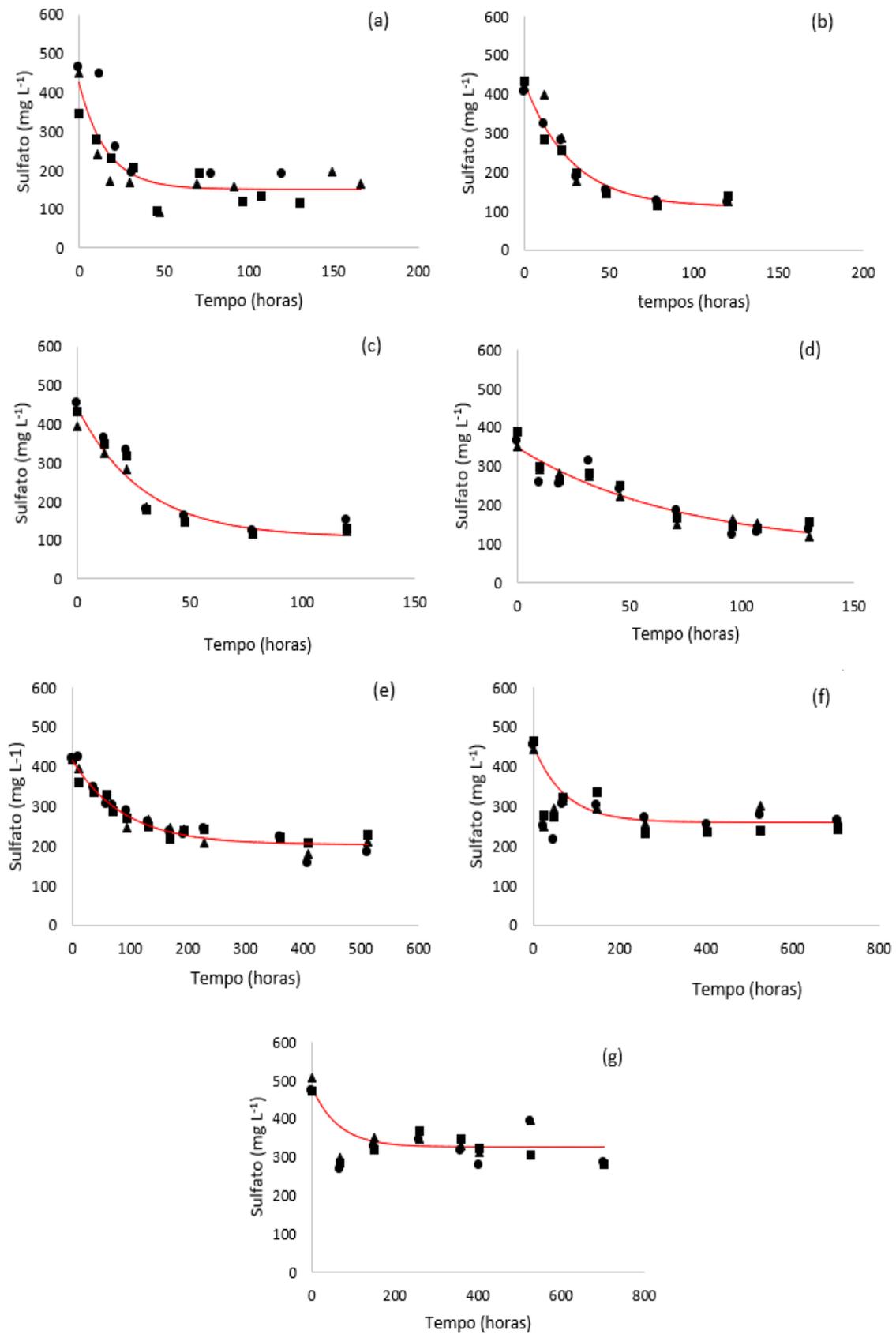


Figura 5.5. Cinética de redução de sulfato para diferentes salinidades. (a) 0 g-NaCl L<sup>-1</sup>; (b) 2,3 g-NaCl L<sup>-1</sup>; (c) 4,6 g-NaCl L<sup>-1</sup>; (d) 10,4 g-NaCl L<sup>-1</sup>; (e) 15,6 g-NaCl L<sup>-1</sup>; (f) 23,0 g-NaCl L<sup>-1</sup>; (g) 35,0 g-NaCl L<sup>-1</sup>. Legenda: Dados experimentais em triplicata (■●▲); Modelo ajustado (-)

Os valores da constante cinética aparente –  $k_{app}$  para o sulfato apresentaram decaimento gradual, sendo o maior valor obtido para o ensaio sem salinidade (Tabela 5.4). Ao contrário do obtido para a produção de metano, verifica-se pela Figura 5.6 que sob baixa concentração de  $\text{Na}^+$  ( $2,3 \text{ g-NaCl L}^{-1}$ ), ocorreu diminuição da velocidade de redução de sulfato em cerca de 50%, quando comparada à condição sem salinidade.

Ao aumentar a concentração de sal de 2,3 para  $10,4 \text{ g-NaCl L}^{-1}$  a  $k_{app}$  caiu de  $0,036 \pm 0,005 \text{ h}^{-1}$  para  $0,013 \pm 0,004 \text{ h}^{-1}$ , ou seja, uma velocidade 3 vezes menor, e uma queda da participação da remoção de matéria orgânica pela via sulfetogênica de 40 para 30%. VAN DEN BRAND et al. (2015) observaram que um aumento de 5 vezes na salinidade (0,7 a 3,5%) gerou uma queda de 40% na taxa de redução de sulfato, e mesmo após longo período de adaptação à salinidade, não houve aumento de rendimento para essa variável. Logo, pode-se inferir que as BRS foram afetadas pelo aumento de salinidade, não sendo capazes de se adaptar e retornar sua atividade.

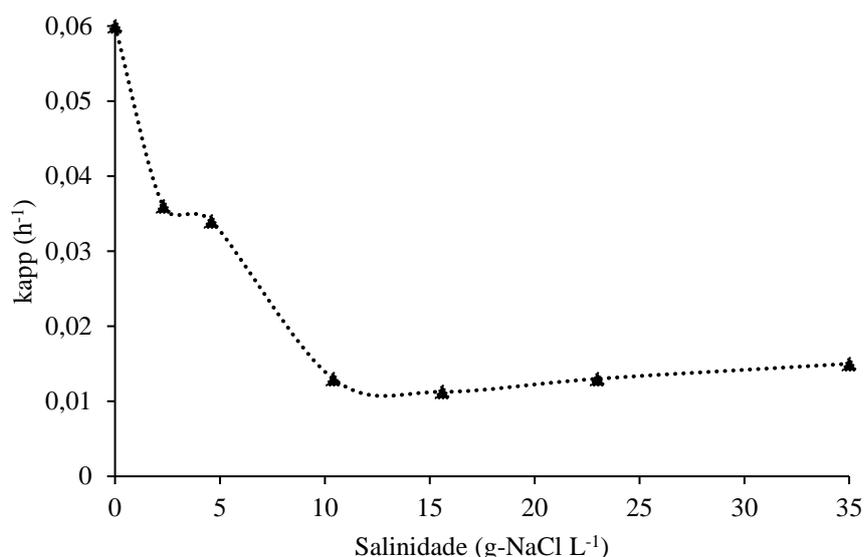


Figura 5.6. Comportamento das constantes cinéticas aparente obtidas na redução de sulfato para diferentes salinidades devido ao NaCl

Tabela 5.4. Parâmetros cinéticos obtidos para a redução de sulfato em diferentes salinidades

<b>g-NaCl L<sup>-1</sup></b>	<b>0,00</b>	<b>2,30</b>	<b>4,60</b>	<b>10,40</b>	<b>15,60</b>	<b>23,00</b>	<b>35,00</b>
<b>Cres (mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>)</b>	150,00 (17,60)	107,90 (15,00)	107,60 (18,30)	86,70 (40,00)	203,40 (6,00)	257,60 (7,00)	325,10 (9,80)
<b>C0 (mg L<sup>-1</sup>)</b>	426,60 (31,00)	430,50 (15,60)	441,30 (18,00)	347,80 (12,60)	417,20 (7,70)	450,00 (13,00)	482,80 (20,00)
<b>Kapp (h<sup>-1</sup>)</b>	0,060 (0,017)	0,036 (0,005)	0,034 (0,005)	0,013 (0,004)	0,011 (0,001)	0,013 (0,002)	0,015 (0,010)
<b>R<sup>2</sup></b>	0,73	0,94	0,92	0,89	0,94	0,89	0,71

#### 5.4.4 Biologia molecular

Análises filogenéticas dos domínios Bacteria e Archaea foram realizadas para caracterizar a comunidade microbiana do inóculo, biomassa para cada uma das bateladas com salinidade variando de 0,0 a 35,0 g-NaCl L<sup>-1</sup>. No nível de domínio, a maioria das leituras foi atribuída a Bacteria, com máximo de 77% para o ensaio com 23 g-NaCl L<sup>-1</sup> e mínimo de 42% para 4,60 g-NaCl L<sup>-1</sup>, enquanto Archaea predominou na fase 4,60 g-NaCl L<sup>-1</sup> com 58% e menor predominância para 23 g-NaCl L<sup>-1</sup> com 33%. Uma análise do gráfico de barras da abundância da comunidade no nível de gênero (valores relativos de abundância superiores a 1% em pelo menos uma amostra) é mostrada na Figura 5.7.

Os filos *Euryarchaeota*, *Halobacterota* que são pertencentes ao domínio Archaea, e os filos *Bacteroidota*, *Campilobacterota*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Spirochaetota*, *Synergistota* pertencentes ao domínio Bacteria foram os que mais apareceram nas amostras analisadas. A *Euryarchaeota* é um dos mais abundantes filos do domínio Arquéias e pode ser representada pelo gênero *Methanosaeta* e *Methanosarcina* (ZHANG et al., 2020a), a maior parte das espécies pertencentes a esse filo são estritamente anaeróbias, oxidando metano e metabolizadoras de enxofre (FAN et al., 2022a). As *Halobacterota* apresentam papel essencial no processo dissimilatório da redução de sulfato (MO et al., 2020), mas também são capazes de receber elétrons do acetato, hidrogênio e metanol (FAN et al., 2022a). O filo *Chloroflexi* são metabolicamente diversos, podendo ser encontrados em ambientes aquáticos e habitats extremos (NARSING RAO et al., 2022) e capazes de atuar em ambientes aeróbios e

anaeróbios, sendo que em ambientes anaeróbios são reportados como atuadores na redução de sulfato a sulfito (NARSING RAO et al., 2022). O filo *Proteobacteria* é o segundo maior filo de oxidantes de monóxido de carbono hidrogenogênicos (FUKUYAMA et al., 2020). O filo *Synergistota* são bactérias capazes de produzir ácidos graxos de cadeia curta a atuarem em sintrofismo com outros oxidantes de acetato, como as metanogênicas hidrogenotróficas (SHAO et al., 2023). Outro filo de organismos encontrados foram os *Firmicutes*, os quais exercem papel fundamentas na produção de ácidos graxos voláteis, contribuindo para a produção de acetato, butirato e hidrogênio (CHEN et al., 2023; ZHANG et al., 2022b).

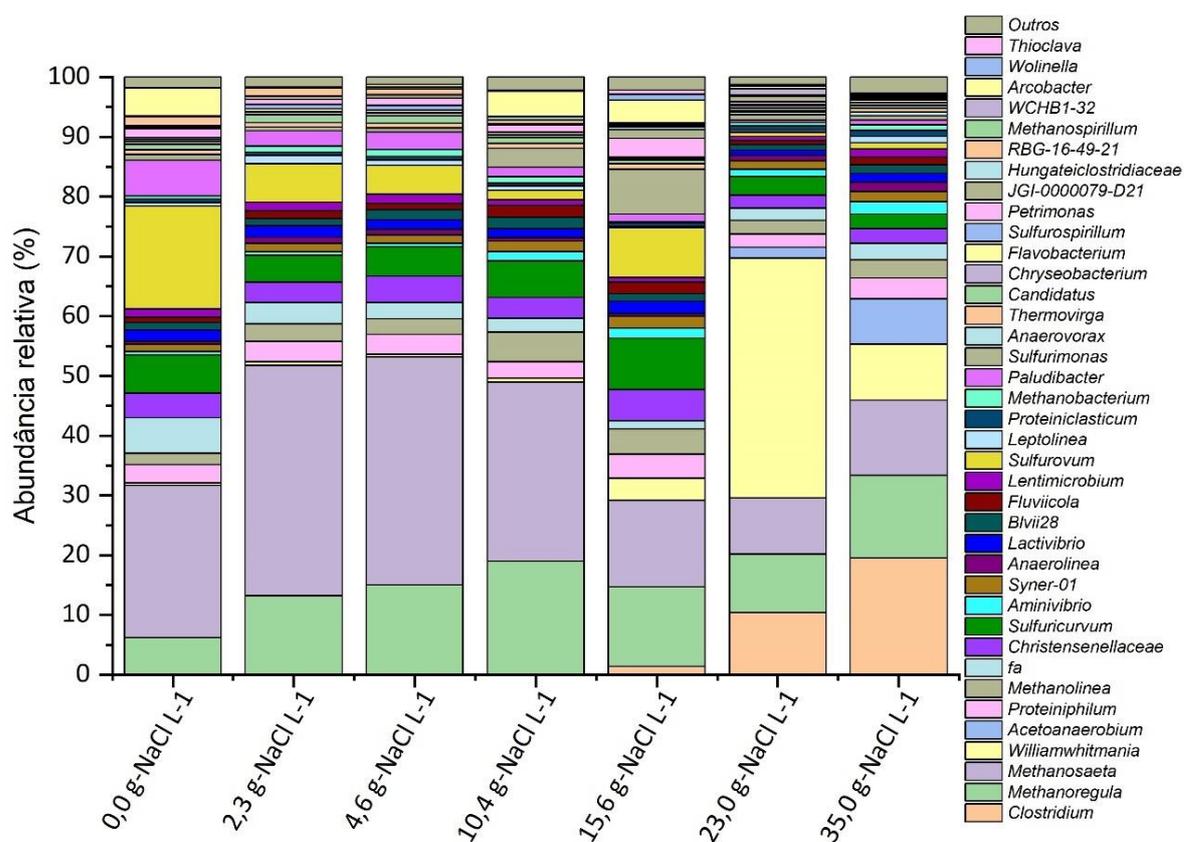


Figura 5.7. Gêneros mais abundantes detectados em amostras de biomassa com base em sequências classificadas do gene 16s rRNA nos ensaios em bateladas utilizando inóculo não adaptador para salinidades variando de 0,00 a 35,00 g-NaCl L<sup>-1</sup>

A proporção de *Firmicutes* e *Bacteroidota* (F/B) foi relatado como um parâmetro que reflete a flutuação do processo de digestão anaeróbia sendo que Bacteroidetes superou Firmicutes com maiores habilidades para utilizar substratos orgânicos fermentativos em altas concentrações, a menor relação F/B indicou uma estrutura de

comunidade mais estável (CHEN et al., 2016). Ao observar a relação F/B das amostras para diferentes concentrações de salinidade é possível notar estabilidade nessa proporção até 15,6 g-NaCl L<sup>-1</sup> (0,59 ± 0,07), sendo que para 35,0 g-NaCl L<sup>-1</sup> a relação foi de 1,75, corroborando com a baixa eficiência do sistema, e comunidades menos estáveis.

O filo *Campilobacterota* é representadas pelo gênero *Sulfurovum* os quais auxiliam na oxidação do sulfato (HUANG et al., 2021). E por fim, *Bacteroidota* que é comumente encontrada em sistemas de tratamentos anaeróbios de águas residuárias desempenhando rota importante na degradação da matéria orgânica (LV et al., 2023). A Figura 5.7 apresenta os principais gêneros dentro dos filios caracterizados previamente.

O gênero *Methanosaeta* foi um dos predominantes em todos os ensaios realizados. Esse microrganismo é amplamente encontrado em ambientes anaeróbios com foco na produção de metano, é conhecida como metanogênica acetoclástica, ou seja, produz metano utilizando o acetato como doador de elétrons e fonte de carbono (PAVLOSTATHIS, 2011). De 0,00 g-NaCl L<sup>-1</sup> até 10,4 g-NaCl L<sup>-1</sup> a predominância nas amostras foi de *Methanosaeta* (26 % e 30%, respectivamente), apresentando abundância maior para as concentrações de 2,3 g-NaCl L<sup>-1</sup> (39%) e 4,6 g-NaCl L<sup>-1</sup> (38%). Esses resultados corroboram com os valores cinéticos de velocidade encontrados. Sendo que na concentração de 2,3 g-NaCl L<sup>-1</sup> foi a maior velocidade de produção de metano (K-CH<sub>4</sub>) encontrada. A *Methanoregula* foi outro gênero encontrado em abundância relativa considerável, aumentando sua participação com o aumento da salinidade, atingindo sua maior abundância em 10,4 g-NaCl L<sup>-1</sup> (19%). Esse gênero é considerado metanogênica hidrogenotrófica, ou seja, seu metabolismo consegue consumir H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> para geração de CH<sub>4</sub> (CARNEIRO et al., 2022). Nos ensaios com 15,6, 23,0 e 35,0 g-NaCl L<sup>-1</sup> a abundância relativa desse microrganismo foi de 13%, 10% e 14% respectivamente. A *Methanoregula boonei* é extremamente sensível ao sal, produzindo metano a taxas exponenciais dentro de uma estreita faixa de sal de 0,4 mM NaCl a 25 mM NaCl, e são adaptadas a ambientes oligotróficos e de baixo pH. O crescimento é inibido por quantidades milimolares de sulfeto como agente redutor (BRÄUER et al., 2011), demonstrando a maior velocidade de produção de metano em 2,3 g-NaCl L<sup>-1</sup>.

A partir de 15,6 g-NaCl L<sup>-1</sup> observa-se o aumento de bactérias do gênero *Clostridium*, com abundância relativa de 1% aumentando para 10% (23,00 g-NaCl L<sup>-1</sup>) e 20% (35,0 g-NaCl L<sup>-1</sup>). Os microrganismos pertencentes ao gênero *Clostridium* são capazes de converter uma ampla gama de carboidratos e etanol em altas quantidades de

hidrogênio (WONG; WU; JUAN, 2014), além disso possuem relação de simbiose com a *Methanosaeta* (FAN et al., 2022a).

Em relação às BRS foram encontradas os gêneros *Sulfurovum* e *Sulfuricurvum*. A *Sulfurovum* é encontrada nas profundezas do mar, incluindo fontes hidrotermais e ambientes óxicos de sedimentos superficiais (LI et al., 2023). Esse gênero caracteriza-se por ser oxidadora completa de sulfato (CHOI et al., 2022) e pela necessidade de concentrações de sal entre 2,0 e 4,0% (w/v) para crescerem, podendo utilizar hidrogênio ou enxofre elementar como doador de elétrons (MINO et al., 2014). As bactérias do gênero *Sulfuricurvum*, são pertencentes ao ciclo do enxofre e podem crescer em ambientes anaeróbios e pela oxidação de espécies reduzidas de enxofre, como sulfeto, enxofre elementar e tiosulfato e hidrogênio, entretanto seu crescimento tem sido observado em concentrações abaixo de 1% (w/v) de NaCl (KODAMA; WATANABE, 2004). Devido às características desses dois gêneros a abundância relativa foi decaindo com o aumento da concentração de sal nos ensaios em batelada. A abundância relativa da *Sulfurovum* foi de 17% (0,0 g-NaCl L<sup>-1</sup>) para 1% (23,0 e 35,0 g-NaCl L<sup>-1</sup>). Enquanto que para a *Sulfuricurvum* foi de 6% (0,0 g-NaCl L<sup>-1</sup>), 9% (15,6 g-NaCl L<sup>-1</sup>), e 3% e 2% (23,0 e 35,0 g-NaCl L<sup>-1</sup>). Tal resultado corrobora com a queda de eficiência de remoção de sulfato, queda do pH devido ao acúmulo de ácidos no sistema, uma vez que houve aumento dos *Clostridium* (bactérias fermentativas), queda dos organismos consumidores de hidrogênio (*Sulfurovum*, *Sulfuricurvum* e *Methanoregula*).

Em concentrações a partir de 15,6 g-NaCl L<sup>-1</sup> observa-se o aumento do gênero *Williamwhitmania* (4%), atingindo 40% de abundância relativa em 23 g-NaCl L<sup>-1</sup>, e 9% em 35,0 g-NaCl L<sup>-1</sup>. Esses organismos são capazes de gerar acetato, etanol, H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, e não foi relatado pela literatura a inibição nem favorecimento de crescimentos devido a compostos de enxofre (PIKUTA et al., 2017).

## 5.5 CONCLUSÃO

Os ensaios em batelada permitiram avaliar que é possível ocorrer a produção de metano e redução de sulfato em sistemas utilizando inóculo não halofílico para concentrações de sal até 35,00 g-NaCl L<sup>-1</sup>, sem a necessidade de incremento gradual do mesmo.

Entretanto, a partir de 10,40 g-NaCl L<sup>-1</sup> houve uma redução na velocidade de conversão de sulfato, além do acúmulo de ácidos orgânicos, levaria à necessidade de intervenção com alcalinizante para evitar acidificação, pois a partir dessa concentração de sal as bactérias redutoras de sulfato tiveram sua cinética aparente reduzida de 0,06 para 0,01 h<sup>-1</sup>. O elevado tempo necessário para que os microrganismos consumissem os ácidos do sistema levou a um acúmulo dos mesmos, alterando alcalinidade e pH, o que auxiliou para que a forma mais tóxica de sulfeto, o sulfeto de hidrogênio, ficasse livre no meio líquido. A concentração livre de H<sub>2</sub>S não foi capaz de inibir as metanogênicas, mas ocasionou queda na velocidade de seu metabolismo em concentrações acima de 15,60 g-NaCl L<sup>-1</sup>.

Em sistemas combinados metanogênicos e sulfetogênicos esses microrganismos competem pelo substrato, no caso, da presente pesquisa, o etanol, que é facilmente transformado em acetato pelas duas vias (metanogênica e sulfetogênica). Entretanto, nessa competição, as BRS conseguem obter mais energia para o crescimento do que as metanogênicas, por isso em condições de ambientes extremos, como as salinidades impostas nesse estudo as BRS foram as primeiras a serem afetadas pela salinidade (ex. *Sulfurivum*) diminuindo a competição pela matéria orgânica, permitindo o *Clostridium* se estabelecer no meio, o qual rapidamente teve seu pH alterado, organismos como as *Methanosaeta* e *Methanoregula* não foram suficientes para suprir a necessidade do meio com o consumo de acetato e hidrogênio.

## CAPÍTULO 6

---

### 6. O AUMENTO DOS NÍVEIS DE SALINIDADE DETERMINA A PARTICIPAÇÃO A LONGO PRAZO DA METANOGÊNESE E SULFETOGÊNESE NA BIODIGESTÃO DE ÁGUAS RESIDUAIS RICAS EM SULFATO

#### 6.1 RESUMO

A competição entre bactérias redutoras de sulfato (BRS) e arqueias metanogênicas (AM) depende de vários fatores, como a relação DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, sensibilidade a inibidores e período de operação dos reatores. Dentre os inibidores, a salinidade, característica comum a diversos tipos de efluentes industriais, pode atuar como fator importante. Este trabalho teve como objetivo avaliar a participação a longo prazo da sulfetogênese e da metanogênese no processo de digestão anaeróbia de água residuária rica em sulfato (Sulfato = 480 mg/L; DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> = 1,6) em um reator anaeróbio de leito estruturado (AnSTBR) usando lodo não adaptado à salinidade. O AnSTBR foi operado por 580 dias sob temperatura mesófila (30 °C). Os níveis de salinidade foram gradualmente aumentados de 1,7 para 50,0 g-NaCl L<sup>-1</sup>. Os resultados mostraram que até 35 g-NaCl L<sup>-1</sup>, MA e BRS participaram igualmente na conversão de DQO, com leve predominância desta última (53 ± 11%). Uma diminuição da eficiência de remoção de DQO associada ao acúmulo de acetato foi observada ao aplicar 50 g-NaCl<sup>-1</sup> e nessa condição, a via sulfetogênica correspondeu a 62 ± 17%. A atividade sulfetogênica foi menos sensível (25% de inibição) a altos níveis de salinidade em comparação com a metanogênese (100% de inibição considerando o rendimento de metano). O amplo espectro de populações BRS em diferentes níveis de salinidade, ou seja, a prevalência de *Desulfovibrio sp.* até 35 g-NaCl<sup>-1</sup> e a participação adicional dos gêneros *Desulfobacca*, *Desulfatirhabdium* e *Desulfotomaculum* a 50 g-NaCl<sup>-1</sup> explicam tais padrões. Por outro lado, a persistência do gênero *Methanosaeta* não foi suficiente para sustentar a produção de metano. Assim, a exploração da sulfetogênese (BRS) foi imperativa para remediar anaerobiamente águas residuais salinas.

## 6.2 INTRODUÇÃO

Arquéias metanogênicas (MA) e bactérias redutoras de sulfato (BRS) podem coexistir em reatores anaeróbios, competindo por doadores de elétrons. A afinidade de ambos os grupos microbianos pelo acetato e a sensibilidade aos efeitos inibitórios do sulfeto de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{S}$ ) dependem principalmente do inóculo utilizado (VISSER, 1995). No entanto, fatores como pH, temperatura e a composição do substrato também afetam as vias metabólicas predominantes estabelecidas no sistema. Um resultado imediato para avaliar a via predominante é a proporção de metano e sulfeto de hidrogênio no biogás. Enquanto alta  $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-} > 10,0$  favorecem a metanogênese, a pressão seletiva resultante da alta disponibilidade de sulfato ( $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-} < 1,7$ ) inevitavelmente aumentará a participação das BRS, como *Desulfovibrio vulgaris* (CHOI; RIM, 1991; LENS et al., 1998a). Baixa  $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$  também pode favorecer a granulação de biomassa em reatores anaeróbios de manta de lodo com fluxo ascendente (UASB), liberando proteínas poliméricas extracelulares (EPS), facilitando o processo de granulação (LU et al., 2017).

Embora a relação  $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$  seja o principal parâmetro que determina a predominância de BRS ou metanogênicas, fatores adicionais, como a duração da operação, também afeta o caráter metabólico do reator. A duração do tempo de operação em sistemas metanogênicos/sulfetogênicos é crucial para as BRS. A literatura indica que períodos de tempo superiores a 300 d, precisamente 330 d (WU et al., 2018) e 400 d (OMIL et al., 1998), podem ser necessários para BRS para prevalecer sobre metanogênicas.

Constituintes específicos encontrados em águas residuárias podem causar toxicidade para alguns desses grupos microbianos e, portanto, o fator tempo pode auxiliar, uma vez que o estabelecimento de um determinado grupo pode ser favorecido em um período de tempo menor quando comparado à outros grupos microbianos. Por exemplo, MUÑOZ et al. (2019) observaram alta solubilização de substâncias semelhantes a proteínas na presença de  $6 \text{ g-Na}^+ \text{ L}^{-1}$ , relatando uma redução de 38% no tamanho médio dos grânulos de um reator UASB. Os efeitos tóxicos do  $\text{Na}^+$  podem ser aumentados na presença de outros compostos, como o  $\text{Ca}^{2+}$ , que apresentou toxicidade em concentrações superiores  $300 \text{ mg L}^{-1}$  junto com  $\text{Na}^+$  (GAGLIANO et al., 2017). Por outro lado, o efeito

tóxico do  $\text{Na}^+$  foi mitigado na presença de  $\text{K}^+$  porque ambos exercem função na bomba de sódio e potássio das células (GAGLIANO et al., 2020).

BRS são microrganismos encontrados naturalmente em ambientes salinos, como águas residuárias da indústria alimentícia, celulose e indústria de papel, refinarias de petróleo, azeite e petroquímica (LENS et al., 1998a; MUÑOZ et al., 2019), demonstrando a importância desses microrganismos na mineralização de efluentes mesmo em salinidade extrema, com  $270 \text{ g-NaCl L}^{-1}$  (KJELDSEN et al., 2007). No entanto, eles dependem de muitos parâmetros para atingir a capacidade de suportar altas concentrações de sal, conforme indicado anteriormente. Por exemplo, um aumento de  $7\text{-}35 \text{ g-NaCl L}^{-1}$  impactou negativamente a atividade das BRS, diminuindo a conversão de sulfato em 40% em testes de batelada com esgoto doméstico salino (VAN DEN BRAND et al., 2015). Apesar de extensos estudos sobre a toxicidade relacionada à salinidade, não há um padrão para definir com precisão valores de referência porque as concentrações inibitórias dependem do tipo de inóculo, substrato, temperatura e tipo de reator utilizado. Por exemplo, 70% de inibição da metanogênese foi observada em  $66 \text{ g-NaCl L}^{-1}$  (MUÑOZ et al., 2019), enquanto que em outro estudo apenas  $10 \text{ g-NaCl L}^{-1}$  foram suficientes para inibir 90% da atividade metanogênica (LIANG et al., 2019).

A maioria dos estudos sobre salinidade no contexto da digestão anaeróbia (AD) lida com reatores de manta de lodo de fluxo ascendente (UASB), avaliando impactos na granulação. No entanto, neste estudo, um reator anaeróbio de leito estruturado (AnSTBR) foi usado. Ao contrário dos reatores de leito de lodo, o crescimento microbiano em reatores de filme fixo tende a atenuar efeitos inibitórios na biomassa microbiana (CHAN et al., 2009; CUNHA et al., 2020), favorecendo o uso desse tipo de sistema ao processar águas residuais em condições ambientais adversas.

Este estudo teve como objetivo avaliar os impactos do aumento das concentrações de salinidade ( $0$  a  $50 \text{ g-NaCl L}^{-1}$ ) na competição entre grupos microbianos metanogênicos e sulfetogênicos que processam águas residuárias ricas em sulfato ( $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-} = 1,6$ ) a longo prazo usando imobilização celular por meio do (i) aumento gradual da salinidade até  $35 \text{ g-NaCl L}^{-1}$ , (ii) observação da resposta da metanogênese e sulfetogênese em diferentes salinidades, (iii) o efeito inibitório da salinidade para as comunidades metanogênicas e sulfetogênicas em salinidade superior a  $35 \text{ g-NaCl L}^{-1}$ , e (iv) comparação microbiológica para as diferentes salinidades avaliadas. Assim, foi possível estudar a viabilidade do tratamento de águas residuárias salinas a partir de lodos não adaptados,

comparando as duas principais rotas da digestão anaeróbia: metanogênese e sulfetogênese.

## **6.3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **6.3.1 Reator anaeróbio**

Um reator anaeróbio de leito estruturado – AnSTBR – em escala de bancada com volume útil de 2,30 L foi utilizado para esse estudo. O reator foi preenchido com 13 tiras de espuma de poliuretano (PU) ( $10 \times 10 \times 400$  mm cada) que foram fixadas em telas de aço inoxidável na região do leito, seguindo detalhes construtivos apresentados em AQUINO; FUESS; PIRES (2017) e OLIVEIRA et al., (2020).

O reator foi operado em uma câmara de temperatura controlada (modelo 410-DRE, Nova Ética, Vargem Grande Paulista, SP, Brasil) para manter as condições mesófilas (30 °C). A alimentação do reator foi realizada em modo de fluxo ascendente usando uma bomba peristáltica (modelo MiniPuls® 3, Gilson, Inc., Middleton, WI, EUA) para obter um tempo de detenção hidráulica fixo (TDH) de 12 h.

### **6.3.2 Inóculo**

O consórcio microbiano utilizado como inóculo é proveniente de um reator em escala real do tipo UASB para tratamento de efluentes de abatedouro de aves, operando com tratamento mesofílicas (30 °C). Grupos microbianos participantes de todas as etapas da digestão anaeróbia (incluindo BRS) foram previamente identificados neste consórcio (GRANATTO et al., 2019), o que motivou seu uso como inóculo.

O lodo granular rico em sólidos ( $28 \text{ g-ST L}^{-1}$  e  $24 \text{ g-SV L}^{-1}$ , em que ST = sólidos totais e SV = sólidos voláteis) foi diluído em água da torneira (1:1, v/v) para obter uma mistura menos viscosa, e posteriormente macerada com o objetivo de desagregar os grânulos.

O reator foi preenchido com a mistura para possibilitar o contato da biomassa com o material suporte por 2 h, após o que o excesso de lodo foi drenado e o reator foi alimentado continuamente.

### 6.3.3 Água residuária e condições operacionais

Água residuária sintética simulando as características das águas residuárias de uma instalação de produção de petróleo e gás no Brasil (GABARDO, 2007) foram usadas como substrato neste estudo.

A composição do afluente incluiu etanol ( $0,48 \text{ mL L}^{-1}$ ), sulfato de sódio ( $0,71 \text{ g L}^{-1}$ ) e cloreto de amônio ( $0,38 \text{ g L}^{-1}$ ) como fontes de matéria orgânica (doador de elétrons), sulfato e nitrogênio, com a finalidade de obter níveis de demanda química de oxigênio (DQO) e sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) de  $0,78 \text{ g L}^{-1}$  e  $0,48 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente. A suplementação de metais essenciais para o estabelecimento da metanogênese e sulfetogênese foi realizada através da adição de soluções de micro e macronutrientes adaptadas de TORRES (1992).

O AnSTBR foi operado continuamente por 580 dias com carga orgânica volumétrica (COV) e carga de sulfato de  $1,56 \text{ g-DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  e  $0,96 \text{ g- SO}_4^{2-} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  para obter uma relação DQO/ $\text{SO}_4^{2-}$  teórica de aproximadamente 1,6. A salinidade foi fornecida pela adição de cloreto de sódio (NaCl) em concentrações que variam entre  $1,7 \text{ g-NaCl L}^{-1}$  e  $50,0 \text{ g-NaCl L}^{-1}$ .

As fases operacionais com relação aos níveis de salinidade e pressão osmótica são apresentadas na Tabela 6.1. As mudanças nas concentrações de salinidade foram impostas após o estabelecimento de condições operacionais estáveis, definidas como a observação de valores de coeficiente de variação abaixo de 5% para DQO e sulfato em 5 consecutivos pontos de amostragem. As mudanças nas concentrações de NaCl seguiram aumentos graduais de 30 a 50% cada, em um esforço para estimular continuamente a adaptação da biomassa.

Tabela 6.1. Fases de operação aplicadas no AnSTBR de acordo com os diferentes níveis de salinidade e pressão osmótica

Fase operacional	Tempo (d)	Cloreto de sódio (g L <sup>-1</sup> )	Aumento de NaCl (%)	Pressão osmótica (wt%)
I	0–177	1,7		0,34
II	178–205	2,4	40,0	0,43
III	206–226	3,2	33,0	0,54
IV	227–339	4,6	44,0	0,74
V	340–360	6,9	51,0	1,06
VI	361–397	10,4	50,0	1,52
VII	398–443	15,6	50,0	2,21
VIII	444–466	23,4	50,0	3,26
IX	467–506	35,0	50,0	4,83
X	506–580	50,0	43,0	6,86

#### 6.3.4 Métodos analíticos

O monitoramento do desempenho da fase líquida baseou-se nos seguintes parâmetros: DQO, pH e as concentrações de  $\text{SO}_4^{2-}$ , sulfeto ( $\text{S}^{2-}$ ), sulfeto total dissolvido (STD), sólidos totais (ST), sólidos voláteis (SV) e sólidos fixos (SF) (APHA/AWWA/WEF, 2012). A alcalinidade total, intermediária e parcial, bem como as concentrações totais de ácidos graxos voláteis foram determinados de acordo com KAPP (1984). Para a preservação as amostras líquidas das análises  $\text{SO}_4^{2-}$  e  $\text{S}^{2-}$  foram coletadas em frascos preenchidos com quantidades adequadas de ácido clorídrico (1 M) e hidróxido de sódio (50% m/V), respectivamente. As amostras foram obtidas diretamente do reator usando seringas para evitar o contato com o oxigênio. Finalmente, com o objetivo de eliminar interferências de altos níveis de cloro a análise DQO foi modificada, para isso foi adicionado sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4$ ) nas amostras para remover interferências de sulfeto, e em seguida as mesmas foram centrifugadas (9000 rpm por 5 min). Após a etapa de centrifugação, foi adicionado sulfato de mercúrio (II) ( $\text{HgSO}_4$ ) no sobrenadante como proposto por VYRIDES; STUCKEY, (2009). Para cada 10 mL de amostra, uma proporção de 20:1 ( $\text{HgSO}_4$ : Cl). Assim, esta concentração é igual a 2,42 g- $\text{HgSO}_4$  para cada 20 g- $\text{NaCl L}^{-1}$ . Após a adição de sulfato de mercúrio, as amostras foram centrifugadas a 9.000 rpm por 5 min e, em seguida, filtrados através de um

Membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ . Ácidos graxos voláteis (AGV; C2–C6) e solventes (metanol, etanol e n-butanol) foram analisados em amostras filtradas por cromatografia gasosa (ADORNO; HIRASAWA; VARESCHE, 2014).

A alcalinidade por sulfeto ( $\text{AHS}^-$ ;  $\text{mg-CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ ) também foi monitorada usando a Eq. (12), em que o termo  $\text{HS}^-$  é a concentração de íon bissulfeto ( $\text{mol L}^{-1}$ ) (DE GODOI et al., 2017). Alcalinidade devido ao bicarbonato íon ( $\text{Abic}$ ;  $\text{mg-CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ ) e ácidos graxos voláteis ( $\text{AAGV}$ ;  $\text{mg-CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ ) também foram obtidos por esta metodologia. A especiação de sulfeto foi avaliada através das Eqs. (13) e (14) (GIL-GARCIA et al., 2018), enquanto as Eqs. (15) e (16) foram usadas para estimar a proporção de remoção de matéria orgânica via sulfetogênese (%  $\text{DQO}_{\text{sulfetogênese}}$ ; %) e metanogênese (%  $\text{DQO}_{\text{metanogênese}}$ ; %), respectivamente (VILELA; DAMIANOVIC; FORESTI, 2014). A temperatura (T) foi fixada em 30 °C (303,15 K), enquanto o bissulfeto ( $\text{HS}^-$ ) e as concentrações de sulfeto de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{S}$ ) foram obtidas em  $\text{mg L}^{-1}$  (Eqs. (12) a (14)). Os termos  $\text{SO}_4^{2-} \text{ afl}$ ,  $\text{SO}_4^{2-} \text{ efl}$ ,  $\text{DQO}_{\text{af}}$ ,  $\text{DQO}_{\text{ef}}$  e %DQO são, respectivamente, as concentrações de sulfato afluente e efluente ( $\text{mg L}^{-1}$ ), a DQO afluente e efluente ( $\text{mg L}^{-1}$ ) e a eficiência global de DQO removida (%) nas Eqs. (15) e (16). Eficiência de remoção de sulfato (%  $\text{SO}_4^{2-}$ ) e a carga de sulfato removida ( $\text{SRR}$ ;  $\text{g-SO}_4^{2-} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) também foram usados para avaliar o desempenho da fase líquida.

$$A_{\text{HS}^-} = [\text{HS}^-] \cdot 50000 \quad (12)$$

$$\text{pKa} = 7,257 \cdot \exp(-0,00172 \cdot T) \quad (13)$$

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{HS}^-_{\text{(aq)}}]}{[\text{H}_2\text{S}_{\text{(aq)}}]} \quad (14)$$

$$\% \text{DQO}_{\text{sulfetogênese}} = \left[ 0,67 \left( \frac{\text{SO}_4^{2-} \text{ af} - \text{SO}_4^{2-} \text{ efl}}{\text{DQO}_{\text{af}} - \text{DQO}_{\text{ef}}} \right) \right] \cdot 100 \quad (15)$$

$$\% \text{DQO}_{\text{metanogênese}} = \% \text{DQO} - \% \text{DQO}_{\text{sulfetogênese}} \quad (16)$$

O monitoramento da fase gasosa foi baseado em medições tanto da vazão e composição do biogás. A vazão de biogás foi continuamente monitorada acoplando um medidor de gás diretamente ao headspace do AnSTBR. O medidor de gás consistia em um contador de pulso eletromecânico conectado a uma coluna de vidro (tubo em U) preenchida com solução salina, conforme proposto em outro lugar (VEIGA et al., 1990). A composição do biogás ( $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{CH}_4$  e  $\text{CO}_2$ ) foi analisado em um conjunto de cromatografia gasosa (modelo GC, 2014; Shimadzu Scientific Instruments, Columbia,

MD, EUA) equipado com detector de condutividade térmica (TCD), coluna HP-PLOT/Q (30 m comprimento, 0,54 mm de diâmetro externo e 0,30  $\mu\text{m}$  de espessura), com hidrogênio como o gás carreador. As temperaturas do injetor e do detector foram ajustadas para 220 °C e 230 °C, respectivamente (LEBRERO et al., 2016).

### **6.3.5 Análises microbiológicas: amostragem, extração e sequenciamento**

Amostras do inóculo, biomassa suspensa da zona de alimentação a 35 g-NaCl L<sup>-1</sup> (Fase IX), biomassa suspensa e aderida a 50 g-NaCl L<sup>-1</sup> (Fase X\_A e Fase X\_B, respectivamente) foram coletadas do reator e armazenadas a 4 °C até processamento posterior. A extração total de DNA para sequenciamento de nova geração (NGS) foi realizada usando o kit FASTDNA SPIN para solo (Qbiogene, Carlsbad, CA, EUA). A qualidade do DNA foi avaliada pela proporção de 260/280 nm N 1,8, medida por um espectrofotômetro ND-2000 (Nanodrop Inc., Wilmington, DE) e eletroforese em gel de agarose.

O sequenciamento paired-end de ciclos Illumina MiSeq 300 da região (~450 pb) de 16S rRNA foi realizada seguindo o protocolo do fabricante (Illumina Inc., EUA) pela Neopropecta Microbiome Technologies (Florianópolis, Brasil), usando seu próprio pipeline considerando 1% de erro. As sequências resultantes (fastq) foram filtradas com qualidade em um Phred usando o software FastQC v.0.11.8 (ANDREWS, 2010) . O recorte do primer foi realizado em Python v.3.6 com software inspirado no projeto BioPython (COCK et al., 2009) . As unidades taxonômicas operacionais (OTU) classificadas como quimeras foram removidas (SMYTH et al., 2010).

A identificação taxonômica foi realizada usando blastn v.2.6.0+(ALTSCHUL et al., 1990). As sequências identificadas pelo MiSeq Illumina foram depositadas no National Center for Biotechnology Information (NCBI - <https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/>).

## **6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **6.4.1. Aumento gradual de salinidade até 35 g-NaCl L<sup>-1</sup>**

A conversão de matéria orgânica no AnSTBR ocorreu tanto pela via metanogênica quanto pela via sulfetogênica. Os detalhes da remoção de DQO são mostrados na Figura 6.0.1, enquanto um resumo dos dados de desempenho é apresentado na Tabela 6.2.

Numerosos fatores, como as características do inóculo, alta disponibilidade de sulfato, uso de etanol como doador de elétrons e alta salinidade proporcionaram um ambiente favorável para o estabelecimento imediato de populações de BRS no reator. A relação  $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$  foi mantida em  $1,41 \pm 0,23$ , com %DQO média de  $83 \pm 15\%$  até a Fase IX ( $35 \text{ g-NaCl L}^{-1}$ ) – Figura 6.1A. Uma prevalência marcante de metanogênese foi observada apenas nos primeiros três dias de operação (Figura 6.1 B), a partir da qual a sulfetogênese tornou-se a via predominante. No geral, a fase I ( $1,7 \text{ g-NaCl L}^{-1}$ ) foi caracterizada por um %DQO relativamente baixo, ou seja,  $67 \pm 7\%$ , com a sulfetogênese respondendo a  $57 \pm 14\%$  da conversão.

A remoção de DQO aumentou acentuadamente a partir da fase II, atingindo um valor médio de  $95 \pm 4\%$  até a fase IX, ainda com leve predominância de sulfetogênese (%DQO sulfetogênese =  $53 \pm 11\%$ ; figura 6.1 B). Em um reator anaeróbico de membrana, observou-se diminuição dos níveis de remoção de DQO de 91% para 78% quando a salinidade variou de 10 a  $40 \text{ g-NaCl L}^{-1}$  (CHEN et al., 2019a). CALLADO; DAMIANOVIC; FORESTI (2015) observaram que o aumento da salinidade ( $0,76$  a  $5,50 \text{ g-Na}^+ \text{ L}^{-1}$ ) levou a uma diminuição no tempo de retenção celular e, conseqüentemente, perdas tanto na atividade do lodo não halófilo quanto na eficiência de remoção de matéria orgânica em um reator UASB. Esses resultados são contrários aos obtidos neste estudo, pois a remoção de DQO não variou até a concentração de  $35 \text{ g-NaCl L}^{-1}$ . O uso de biomassa imobilizada, bem como a aplicação de períodos suficientemente longos de adaptação da biomassa para aumentar os níveis de salinidade, provavelmente minimizou os efeitos adversos sobre as comunidades microbianas no AnSTBR.

A carga de sulfato foi mantida em  $1,06 \pm 0,15 \text{ g-SO}_4^{2-} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , enquanto a carga removida de sulfato foi de  $0,90 \pm 0,23 \text{ g-SO}_4^{2-} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , correspondendo a % $\text{SO}_4^{2-}$  de  $87 \pm 12\%$  nas fases I–IX (Figura 6.2 A). Os resultados indicam que o sistema se mostrou estável quanto à remoção de sulfato, independentemente dos níveis de salinidade avaliados. Um reator de leito estruturado previamente aplicado na remoção simultânea de sulfato e matéria orgânica indicou níveis semelhantes de %DQO (82%) e % $\text{SO}_4^{2-}$  (89%) (CAMILOTI et al., 2014a), considerando uma relação  $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$  equivalente (1,7) mas baixa salinidade ( $0,25 \text{ g-NaCl L}^{-1}$ ). Neste caso, o lodo do tratamento de efluentes de abatedouro de aves também foi utilizado como inóculo. VALLERO et al. (2004) relataram uma carga de remoção de sulfato de  $3,7 \text{ g-SO}_4^{2-} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  a uma condutividade de

60-70  $\text{mS cm}^{-1}$  (maior que 40  $\text{g-NaCl L}^{-1}$  de salinidade) em um reator anaeróbio de membrana.

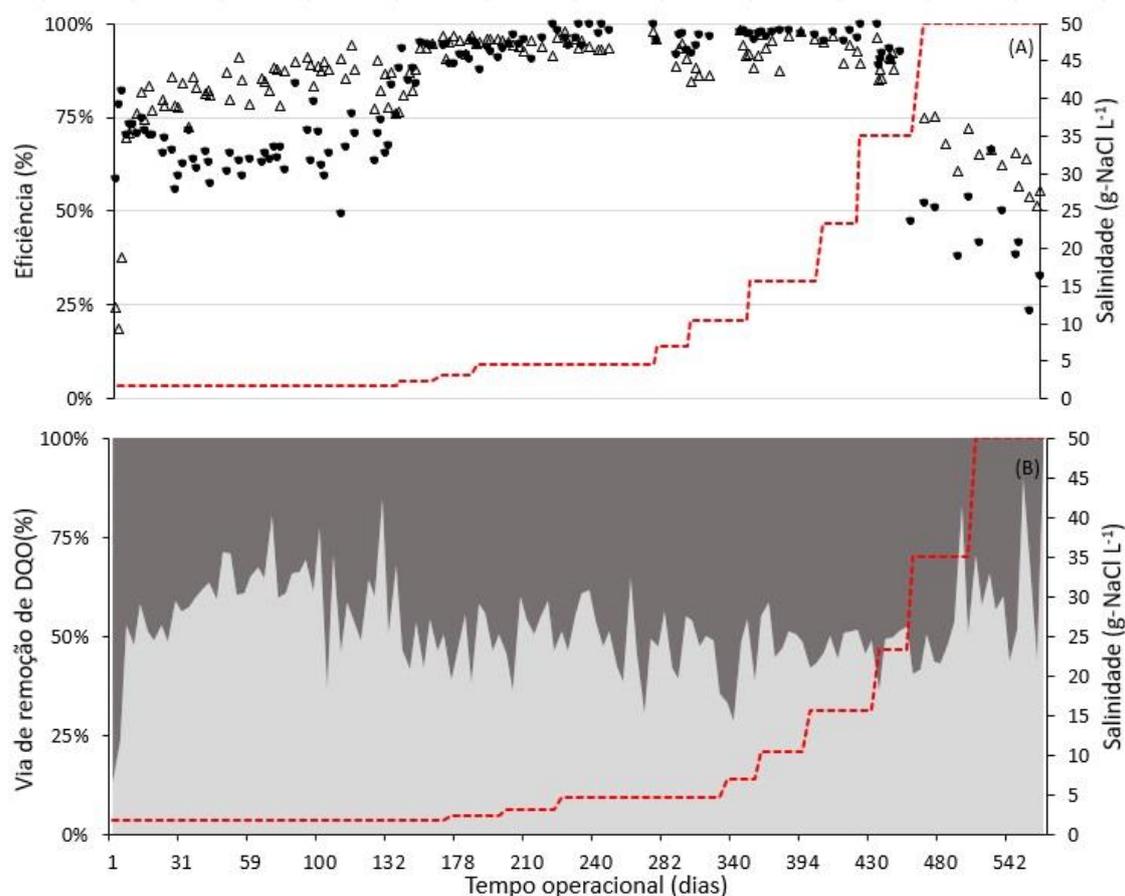


Figura 6.0.1. (A) Perfil temporal para eficiência de remoção de DQO (●) e sulfato (Δ) e (B) participação da metanogênese (■) e sulfetogênese (■) na remoção de matéria orgânica para diferentes concentrações de salinidade (---).

A produção de sulfeto (medidas em fase líquida) no AnSTBR foi de  $0,25 \pm 0,03 \text{ g-S}^{2-} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  até a fase IX, correspondendo a 83% da produção teórica ( $0,30 \pm 0,08 \text{ g-S}^{2-} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ). O pH afluente até a respectiva fase foi de  $6,8 \pm 0,15$ , enquanto um valor maior ( $8,3 \pm 0,5$ ) foi medido na corrente de efluente. Em pH neutro ( $\text{pK}_a = 6,9$ ) e temperatura de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , a dissociação do sulfeto resulta em proporções iguais de  $\text{H}_2\text{S}$  e  $\text{HS}^-$ , ou seja, 50% para cada espécie. O  $\text{H}_2\text{S}$  prevalece em condições mais ácidas ( $\text{pH} < 7,0$ ), enquanto a forma ionizada é a espécie dominante em  $\text{pH} > 8,0$  (OMIL et al., 1998). A análise de especiação de sulfeto indicou concentrações de  $\text{H}_2\text{S}$  de  $3,00 \pm 1,20 \text{ mg-H}_2\text{S L}^{-1}$  a partir do 100º dia, provavelmente não causando toxicidade às populações de archaea e BRS. REIS et al. (1992) observaram inibição completa de BRS cultivados em lactato e sulfato

quando expostos à concentração de  $\text{H}_2\text{S}$  de  $547 \text{ mg L}^{-1}$ , com pH na faixa de 5,8 a 7,0 e temperatura de  $22 \text{ }^\circ\text{C}$ . Para condições termofílicas ( $55 \text{ }^\circ\text{C}$ ), VAN HOUTEN; YUN; LETTINGA (1997) observaram a inibição de *Desulfotomaculum sp.* na concentração de sulfeto de  $250 \text{ mg-H}_2\text{S L}^{-1}$ . Em ambos os casos, a inibição relacionada ao  $\text{H}_2\text{S}$  foi observada apenas em concentrações muito mais altas do que as observadas neste estudo. Os níveis de toxicidade do  $\text{H}_2\text{S}$  variam de acordo com a fonte de inóculo e matéria orgânica (substrato), pH e temperatura. A configuração do reator também afeta a extensão da toxicidade do sulfeto porque as condições hidrodinâmicas e os mecanismos de retenção de biomassa podem naturalmente oferecer barreiras (resistência à transferência de massa) ao transporte de  $\text{H}_2\text{S}$  na fase líquida.

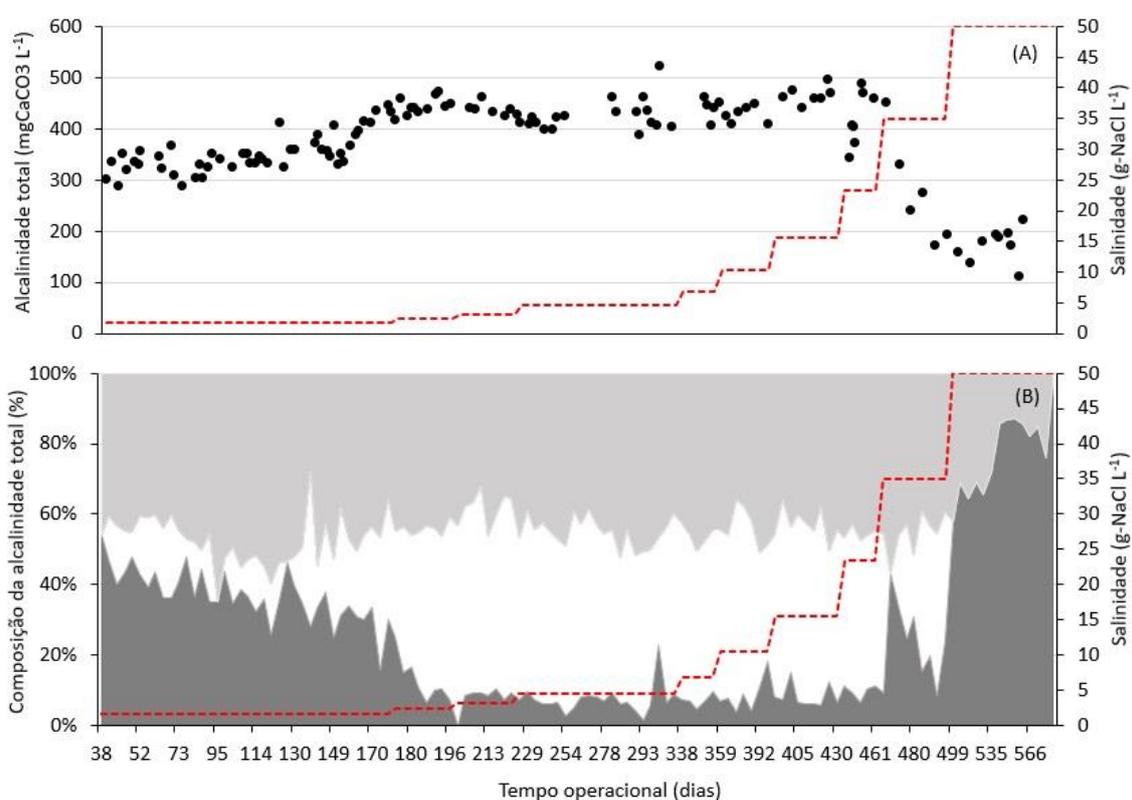


Figura 6.0.2. (A) Perfil temporal para alcalindidade total (AT) e (B) discriminação de AT (%) de acordo com cada nível de salinidade. Legenda: (■) Alcalinidade à ácidos voláteis –  $A_{AGVs}$ ; (■) Alcalinidade à sulfeto –  $A_{HS^-}$ ; (□) Alcalinidade a bicarbonato –  $A_{Bic}$ ; e (---) Concentração de salinidade.

Por exemplo, concentrações de  $\text{H}_2\text{S}$  semelhantes a maiores ( $81\text{--}150 \text{ mg L}^{-1}$ ) do que as observadas aqui não exerceram efeitos inibitórios em um AnSTBR avaliando a biotratabilidade da drenagem ácida sintética de mina (CUNHA et al., 2020). Em

particular, o referido AnSTBR também foi inoculado com lodo granular obtido do tratamento de efluentes de abatedouro de aves e foi mantido a 30 °C. Níveis muito mais altos de H<sub>2</sub>S (> 250 mg L<sup>-1</sup>) não foram associados à inibição de BRS em outros estudos (GIL-GARCIA et al., 2018), considerando também a operação de um sistema de leito fixo termofílico. Portanto, embora a literatura indique níveis inibitórios para H<sub>2</sub>S tão baixos quanto 50 mg L<sup>-1</sup> em reatores de crescimento suspenso (PARKIN et al., 1990b), o uso de imobilização celular diminui claramente a extensão da inibição relacionada ao H<sub>2</sub>S.

A avaliação da alcalinidade também indica eficientemente a contribuição das espécies de sulfeto para o sistema tampão do reator. De acordo com de GODOI; FORESTI; DAMIANOVIC (2017), a alcalinidade total (AT) em um sistema metanogênico/sulfetogênico resulta da soma de Abic, AAGV e AHS<sup>-</sup>. Este último se deve à ação do íon HS<sup>-</sup> como acceptor de H<sup>+</sup>, gerando H<sub>2</sub>S e consequentemente consumindo acidez (JOHNSON; HALLBERG, 2005). A Figura 6.2 A e B mostra os perfis temporais para os valores de AT e sua decomposição considerando a contribuição de bicarbonato, AGV e sulfeto. A composição de AT na fase I (1,7 g-NaCl L<sup>-1</sup>) indicou valores para AHS<sup>-</sup>, Abic e AAGV de 153,6 ± 27,0, 53,4 ± 38,8 e 124,3 ± 22,3 mg-CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>, respectivamente. Apesar da alta alcalinidade derivada dos AGV na fase I, observou-se uma diminuição da participação dos AAGV acompanhada pelo aumento dos níveis de Abic (Figura 6.0.2B). Esse comportamento indica fortemente que os microrganismos metanogênicos presentes no inóculo precisaram de aproximadamente 180 dias para se adaptar às condições gerais de operação aplicadas no reator. No entanto, supõe-se que o alto tempo de adaptação não esteja relacionado à salinidade, pois menores valores de AAGV (36,2 ± 15,9 mg-CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>) foram observados mesmo em maiores concentrações de sal (até 23 g-NaCl L<sup>-1</sup>). Ao mesmo tempo, Abic aumentou acentuadamente para 205,8 ± 46,7 mg-CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>, enquanto AHS<sup>-</sup> atingiu 191,0 ± 19,9 mg-CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>.

O aumento da salinidade pela dosagem de 35 g-NaCl L<sup>-1</sup> prontamente desencadeou um acúmulo de AGV (aumento em AAGV; Figura 6.2 B), com uma diminuição subsequente em Abic. No entanto, os microrganismos metanogênicos foram capazes de recuperar rapidamente sua atividade, conforme observado pelo consumo de ácido acético (HAc). O acúmulo de HAc foi observado apenas na fase I (1,7 g-NaCl L<sup>-1</sup>) em níveis de salinidade abaixo de 35 g-NaCl L<sup>-1</sup>, atingindo 200,0 ± 74,8 mg-HAc L<sup>-1</sup>. Apesar do acúmulo de HAc, altos níveis de %SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> foram mantidos, indicando que BRS

incompletas estava presente no AnSTBR, enquanto a atividade de BRS completas e especialmente as metanogênicas acetoclásticas foram prejudicadas. HAc foi o único metabólito determinado em todas as fases do sistema. Resultados semelhantes foram obtidos em outro trabalho (MCCARTNEY; OLESZKIEWICZ, 1993), em que o acetato foi o único metabólito da oxidação do lactato ao aplicar uma relação COD/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> de 1,6.

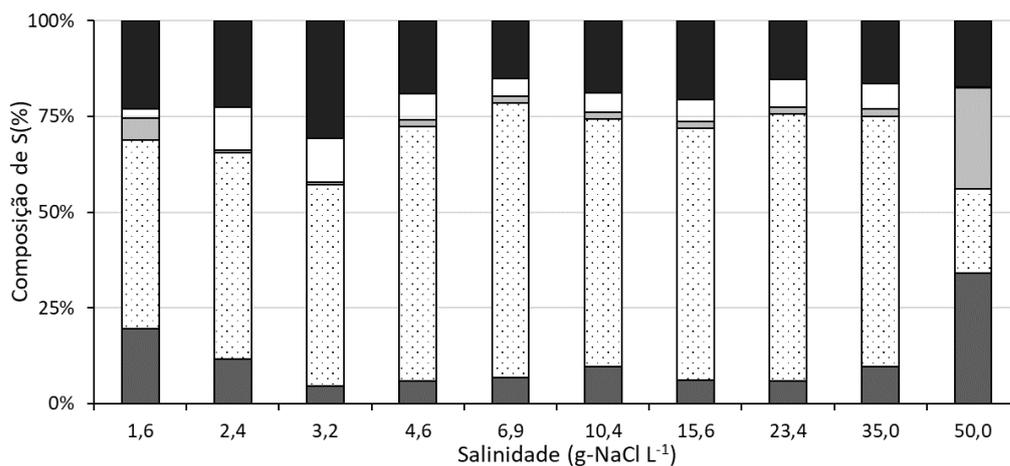


Figura 6.0.3. Distribuição de compostos de enxofre em diferentes níveis de salinidade em efluentes líquidos e correntes de biogás. Legenda: (■) Sulfato – S-SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>; (□) Sulfeto – S-S<sup>2-</sup>; (▨) Sulfeto de hidrogênio efluente – S-H<sub>2</sub>S; (□) Sulfeto de hidrogênio no biogás – S-H<sub>2</sub>S<sub>biogás</sub>; e (■) Enxofre não recuperado.

Embora a alcalinidade do sulfeto tenha sido estável até a fase IX (35 g-NaCl L<sup>-1</sup>; Figura 6.2 B), a eficiência redutora do sulfato na fase I (80 ± 14%) foi menor em comparação com as outras fases (92 ± 4%; fases II–IX). Conseqüentemente, o balanço de massa baseado em enxofre (Figura 6.0.3) indicou menores proporções de H<sub>2</sub>S (tanto na fase líquida quanto na fase gasosa) e HS<sup>-</sup> (fase líquida) na fase I, bem como maior participação de sulfato residual. As fases II e III indicaram a maior participação de H<sub>2</sub>S gasoso (13 ± 9%; Fig. 3), o que coincide com os menores valores de rendimento médio de metano (MY), ou seja, 100,8 ± 43,7 mL-CH<sub>4</sub> g-DQO<sup>-1</sup> (Figura 6.4). Da fase IV em diante (4,6–35,0 g-NaCl L<sup>-1</sup>), MY atingiu um platô mais alto e relativamente estável (150,8 ± 30,6 mL-CH<sub>4</sub> g-DQO<sup>-1</sup>; figura 6.4B) acompanhado por menores proporções de H<sub>2</sub>S no biogás (Fig. 4a), e conseqüentemente uma maior fração de sulfeto na fase líquida (geralmente > 70%; Figura 6.0.3). A composição do biogás variou acentuadamente apenas nas três primeiras fases (Figura 6.4B), das quais proporções relativamente

estáveis, ou seja,  $4 \pm 1\%$  ( $\text{CO}_2$ ),  $89 \pm 2\%$  ( $\text{CH}_4$ ) e  $7 \pm 2\%$  ( $\text{H}_2\text{S}$ ) foram observadas até fase IX (4,6–35,0 g-NaCl  $\text{L}^{-1}$ ; Fig. 6.4A).

Tabela 6.2. Resumo dos parâmetros analisados para cada fase e salinidade sistema contínuo anaeróbio

<b>Fase operacional</b>	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	
<b>NaCl (g L<sup>-1</sup>)</b>	1,7	2,4	3,2	4,6	6,9	10,4	15,6	23,4	35,0	50,0	
<b>Período de tempo de operação (d)</b>	177	21	21	114	23	39	48	28	42	81	
<b>TDH (h)</b>	12,2 (0,1)	12,2 (0,4)	12,2 (0,6)	12,0 (0,8)	12,3 (0,1)	12,1 (0,8)	11,8 (1,0)	12,3 (0,4)	12,2 (0,3)	12,9 (0,2)	
<b>pH</b>	Afluente	6,80 (0,10)	6,70 (0,10)	6,80 (0,10)	6,70 (0,20)	6,60 (0,10)	6,80 (0,10)	6,90 (0,10)	7,10 (0,15)	7,00 (0,15)	6,90 (0,15)
	Efluente	7,90 (0,60)	8,70 (0,20)	8,80 (0,10)	8,60 (0,20)	8,50 (0,10)	8,40 (0,10)	8,40 (0,10)	8,50 (0,10)	8,40 (0,10)	6,70 (0,60)
<b>DQO (mg L<sup>-1</sup>)</b>	Afluente	784,0 (49,0)	746,9 (33,0)	758,5 (35,0)	707,0 (37,5)	720,0 (49,0)	678,0 (48,0)	714,0 (49,2)	741,6 (63,9)	698,8 (103,6)	689,9 (53,8)
	Efluente	255,0 (58,5)	72,0 (33,0)	59,0 (17,0)	30,5 (23,0)	37,0 (20,0)	26,0 (14,0)	19,0 (6,0)	25,0 (10,0)	45,0 (28,0)	425,0 (107,5)
<b>Carga de sulfato aplicada (g-SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>)</b>	1,1 (0,1)	1,1 (0,1)	1,1 (0,1)	1,0 (0,1)	0,9 (0,2)	1,1 (0,1)	1,0 (0,1)	1,1 (0,1)	1,1 (0,1)	0,9 (0,1)	
<b>Carga removida de sulfato (g-SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>)</b>	0,9 (0,2)	1,0 (0,2)	1,1 (0,5)	1,0 (0,9)	0,8 (0,5)	1,0 (0,4)	1,0 (0,7)	1,0 (0,4)	1,0 (0,7)	0,6 (0,1)	
<b>HS<sup>-</sup> (mg L<sup>-1</sup>)</b>	96,0 (27,5)	117,0 (10,0)	112,0 (15,0)	130,0 (9,0)	131,5 (9,0)	127,0 (15,0)	125,0 (13,0)	140,0 (8,0)	128,0 (9,0)	21,0 (11,0)	
<b>H<sub>2</sub>S (mg L<sup>-1</sup>)</b>	12,0 (8,0)	1,4 (0,2)	1,4 (0,5)	3,0 (0,9)	3,4 (0,5)	3,5 (0,4)	3,7 (0,7)	3,7 (0,4)	3,9 (0,7)	47,2 (14,1)	
<b>Alcalinidade total (mg-CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>)</b>	322,0 (48,0)	389,0 (34,0)	437,0 (13,0)	437,0 (42,0)	432,0 (27,0)	438,0 (44,0)	419,0 (58,0)	467,0 (21,0)	430,0 (50,0)	199,0 (56,0)	

Tabela 6.2. Resumo dos parâmetros analisados para cada fase e salinidade sistema contínuo anaeróbio (continuação)

<b>Fase operacional</b>	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	
<b>NaCl (g L<sup>-1</sup>)</b>	1,7	2,4	3,2	4,6	6,9	10,4	15,6	23,4	35,0	50,0	
<b>Período de tempo de operação (d)</b>	177	21	21	114	23	39	48	28	42	81	
<b>Alcalinidade a sulfeto (mg-CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>)</b>	145,0 (42,0)	177,0 (39,0)	170,0 (23,0)	164,0 (14,0)	199,0 (14,0)	199,0 (27,0)	190,0 (20,0)	211,5 (12,5)	193,0 (13,0)	44,0 (35,0)	
<b>Alcalinidade a bicarbonato (mg-CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>)</b>	58,0 (37,0)	168,0 (39,0)	236,0 (24,0)	210,0 (49,5)	201,0 (17,0)	211,5 (58,0)	198,5 (59,0)	208,0 (8,0)	150,0 (60,5)	0,0 (0,0)	
<b>Alcalinidade a ácidos voláteis (mg-CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>)</b>	126,0 (22,0)	48,0 (19,5)	38,0 (4,0)	32,0 (17,0)	31,0 (9,0)	36,0 (19,0)	32,5 (15,0)	45,5 (10,0)	97,0 (40,0)	205,0 (41,0)	
<b>Composição do biogás (%)</b>	<b>CO<sub>2</sub></b>	9 (12)	33 (14)	20 (11)	10 (10)	3 (2)	4 (0)	4 (1)	4 (0)	4 (1)	12 (9)
	<b>CH<sub>4</sub></b>	84 (18)	41 (24)	63 (19)	80 (17)	92 (2)	89 (2)	89 (3)	88 (1)	86 (2)	37 (28)
	<b>H<sub>2</sub>S</b>	7 (8)	26 (10)	17 (8)	9 (7)	5 (0)	7 (2)	7 (3)	8 (1)	10 (2)	51 (28)
<b>MY (NmLCH<sub>4</sub> g-DQO<sup>-1</sup>)</b>	120,0 (39,0)	79,0 (50,0)	110,0 (39,0)	153,0 (38,0)	171,0 (19,0)	154,0 (39,0)	150,0 (16,0)	165,0 (8,0)	128,0 (19,0)	-	

#### 6.4.2 Resposta da metanogênese e sulfetogênese para salinidade de 50 g-NaCl L<sup>-1</sup>

As maiores mudanças no desempenho do sistema foram observadas apenas quando a salinidade foi aumentada para 50 g-NaCl L<sup>-1</sup>. A eficiência de remoção de DQO caiu acentuadamente para  $38 \pm 16\%$ , com sulfetogênese respondendo por  $62 \pm 17\%$  da conversão total de matéria orgânica. A queda na atividade metanogênica explica ambos os resultados. Enquanto o pH do afluente permaneceu aproximadamente inalterado ( $6,90 \pm 0,15$ ), o pH do efluente caiu para  $6,65 \pm 0,62$ , o que é um indicativo de acúmulo de AGV no AnSTBR. HAc foi o AGV predominante ( $302,2 \pm 60,8$  mg-HAc L<sup>-1</sup>), enquanto o etanol não convertido alcançou  $38,7 \pm 30,7$  mg-EtOH L<sup>-1</sup>. O perfil alcalinidade indicou participação nula do bicarbonato, com AAGV atingindo  $77 \pm 11\%$ . O acúmulo de HAc indicou um papel determinante de metanogênicos acetoclásticos na remoção de COD, enquanto populações de BRS completamente oxidantes não foram capazes de mediar seu consumo.

Impactos na atividade sulfetogênica também foram observados pela queda na alcalinidade, uma vez que AHS<sup>-</sup> caiu para  $23 \pm 11\%$ . De fato, 34% do enxofre aplicado permaneceram como sulfato não convertido no efluente, o que está de acordo com a diminuição observada tanto no %SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> ( $64 \pm 8\%$ ) quanto na concentração de STD ( $76,5 \pm 11,6$  mg-S<sup>2-</sup> L<sup>-1</sup>). O menor valor de pH do efluente (6,65) impactou diretamente na distribuição de sulfeto na fase líquida, indicando uma diminuição acentuada na proporção da forma ionizada ( $22 \pm 14\%$ ) associada a um aumento no S-H<sub>2</sub>S ( $27 \pm 14\%$ ). A condição mais ácida também favoreceu o deslocamento do sulfeto para a fase gasosa, com a proporção de H<sub>2</sub>S no biogás chegando a  $51 \pm 23\%$ . Além dos efeitos relacionados ao pH, a atividade metanogênica prejudicada (observada por um teor de metano de  $32 \pm 21\%$ ) também favoreceu a predominância de sulfeto na fase gasosa. Vale ressaltar que a evolução do

biogás cessou, pois a metanogênese foi prejudicada; portanto, a participação do H<sub>2</sub>S gasoso não foi incluída no balanço de massa baseado em S na fase X.

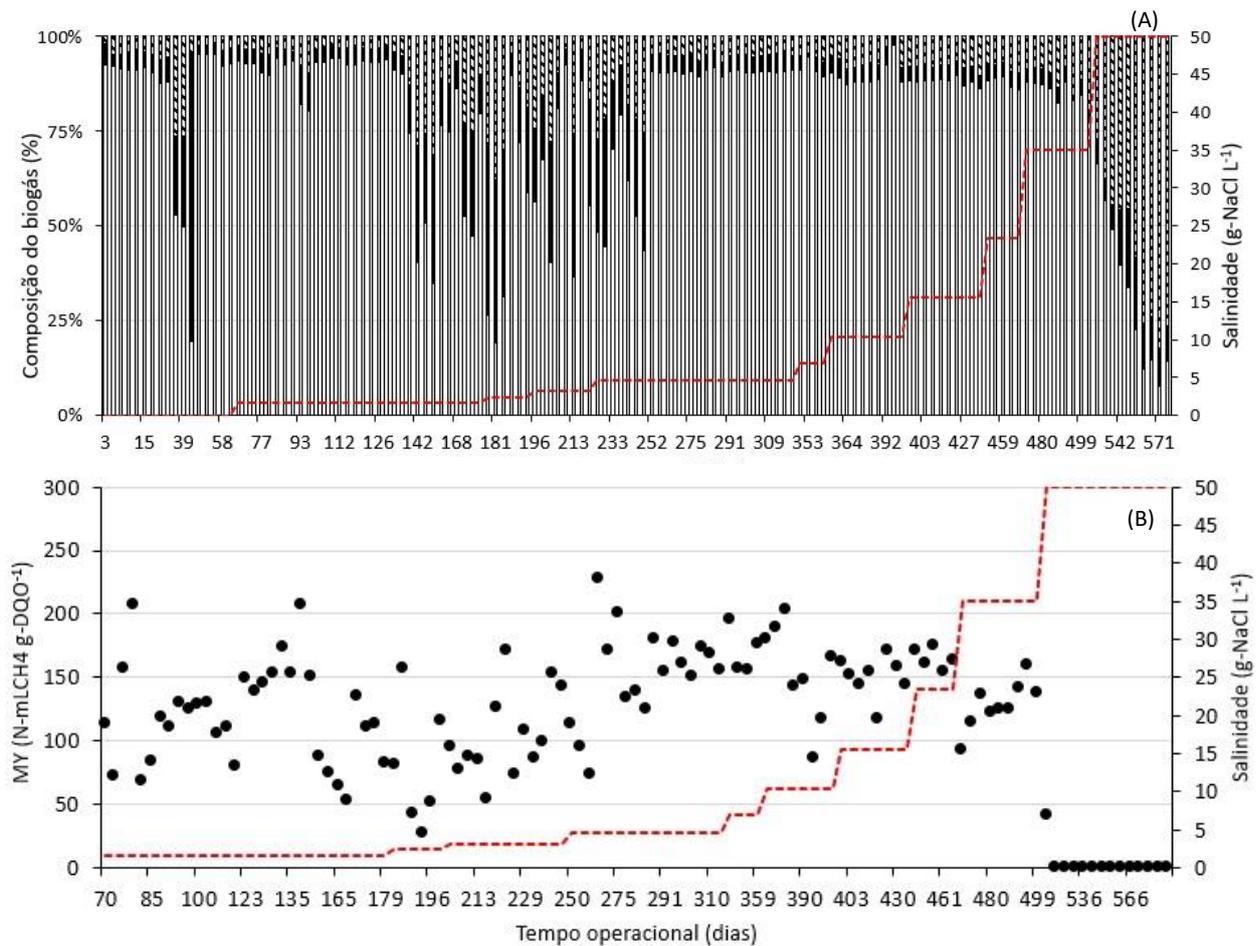


Figura 6.0.4.(A) Composição do biogás e (B) Rendimento de metano. Legenda: (□) %CH<sub>4</sub>, (○) %H<sub>2</sub>S, (■) %CO<sub>2</sub>, (●) rendimento de metano e (---) concentração de salinidade.

### 6.4.3 Decifrando a inibição do sistema

BRS e metanogênicas requerem valores de pH semelhantes para crescer, ou seja, 7,0–7,5 (GUTIERREZ et al., 2009; O’FLAHERTY et al., 1998); no entanto, vários fatores, como disponibilidade de sulfato, afinidade de substrato, sensibilidade a condições inibidoras (por exemplo, alta salinidade, acidez e níveis de sulfeto) determinam quem vence o “cabo de guerra” em um ambiente competitivo. Em ambientes livres de toxicidade, como os mencionados acima, o pH abaixo de 7,0 favorece as metanogênicas em relação as BRS (O’FLAHERTY et al., 1998). No entanto, a salinidade, bem como os baixos valores da razão  $DQO/SO_4^{2-}$  ( $< 1,7$ ) favorecem as BRS. Embora os resultados obtidos na fase X indiquem claramente a inibição de ambos os grupos no AnSTBR, as

populações BRS foram relativamente mais resistentes ao maior nível de salinidade avaliado. Enquanto a remoção de sulfato permaneceu ligeiramente superior a 60%, o MY atingiu valores nulos devido à interrupção da vazão do biogás. Assim, as BRS mantiveram parcialmente seu papel metabólico em um ambiente extremamente hostil.

A ocorrência de inibição de biomassa pode ser avaliada sob diferentes perspectivas no AnSTBR, considerando inicialmente os efeitos do sulfeto. Em segundo lugar, a salinidade e o aumento das concentrações de HAc compartilham um papel inibitório conjunto, respectivamente, impactando metanogênicos e BRS no final da operação (fase X). No caso do sulfeto, os resultados de longo prazo sugeriram que nenhum efeito inibitório foi associado a essa espécie química. As eficiências de remoção de DQO e sulfato em níveis de salinidade de até 35 g-NaCl L<sup>-1</sup> foram sempre superiores a 80% (após o período de adaptação). Por sua vez, embora as condições um pouco mais ácidas (pH = 6,65) observadas na dosagem de 50 g-NaCl L<sup>-1</sup> tenham favorecido a predominância de H<sub>2</sub>S (tanto na fase líquida quanto na fase gasosa), as concentrações no líquido (76,5 ± 11,6 mg-S<sup>2-</sup> L<sup>-1</sup>) estavam relativamente longe dos níveis inibitórios, como discutido anteriormente.

Apesar da adaptação gradual e bem-sucedida do AnSTBR ao aumento da salinidade, a aplicação de concentrações de NaCl superiores a 35 g L<sup>-1</sup> impactou negativamente os metanogênios acetoclásticos, inibindo totalmente o consumo de acetato e a posterior produção de metano. Embora as concentrações máximas de HAc observadas nesta condição operacional (302,2 ± 60,8 mg L<sup>-1</sup>) tenham sido muito inferiores às relatadas em estudos anteriores (>> 1 g L<sup>-1</sup>) (GIL-GARCIA et al., 2018; REIS et al., 1990, 1992b), BRS oxidantes completas não foram capazes de metabolizar o excesso de acetato, o que provavelmente desencadeou a inibição parcial da atividade sulfetogênica. Pesquisas anteriores relataram a diminuição da eficiência de redução de sulfato na presença de excesso de acetato (DAMIANOVIC; FORESTI, 2009), que é semelhante à diminuição de %SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (de 87 para 64%) observada neste estudo.

Finalmente, diferentes bases de referência podem ser usadas para medir a inibição da metanogênese no AnSTBR, seguida pela inibição do BRS, uma delas é a participação da remoção de DQO via metanogênese e sulfetogênese e a outra a produção de mtano. A remoção de matéria orgânica por essas duas principais (metogênese e sulfetogênese) indicou uma inibição de 19% da metnogênese, enquanto um nível de inibição 3 vezes maior (60%) foi calculado considerando a fração de metano no biogás. No entanto,

usando o MY, que caracteriza a resposta mais importante dos sistemas AD para aplicações energéticas, uma inibição de 100% foi observada devido aos valores nulos medidos na fase X. Isso indica a inibição completa da produção de metano “útil”, ou seja, a quantidade de metano potencialmente utilizável em aplicações energéticas. Por outro lado, um nível de inibição de 25% foi observado na sulfetogênese, considerando a diminuição nos níveis de  $\text{SO}_4^{2-}$ , causada pela inibição de BRS.

#### 6.4.4 Análises microbiológicas

No geral, depois de filtrar as sequências, foram obtidas 163674–588192 leituras variando de 205 pb a 305 pb e com média de 255 pb de comprimento. Segundo DELFORNO et al., (2020), aproximadamente 25% das leituras totais foram descartadas devido à baixa qualidade e comprimentos inadequados (<75 bp). Um platô foi observado para as curvas de rarefação, onde a diversidade taxonômica foi adequadamente representada. Análises filogenéticas dos domínios Bacteria e Archaea foram realizadas para caracterizar a comunidade microbiana do inóculo, biomassa suspensa na zona de alimentação do AnSTBR durante a fase IX (35 g-NaCl L<sup>-1</sup>), biomassa suspensa e aderida ao final da fase X (50 g-NaCl L<sup>-1</sup>). No nível de domínio, a maioria das leituras foi atribuída a Archaea (72,4%) no inóculo, enquanto Bacteria predominou na fase IX (81,1%; células suspensas), suspensa (60,3%) e aderida (61,6%) biomassa da fase X. Uma análise do gráfico de barras da abundância da comunidade no nível de gênero (valores relativos de abundância superiores a 1% em pelo menos uma amostra) é mostrada na Figura 6.0.5.

Índices de dominância, diversidade e riqueza respectivamente de 0,55, 1,06 e 18 foram observados na fase IX. Os gêneros dominantes foram relacionados ao gênero *Desulfovibrio* (72,9%) nesta amostra. Essas BRS pertencem a uma classe delta-Proteobacteria mesófila capaz de usar sulfato como acceptor final de elétrons (JENČÁROVÁ; LUPTÁKOVÁ; KUPKA, 2020). Outro grupo redutor de sulfato, o gênero *Desulfatirhabdium* (REZADEHBASHI; BALDWIN, 2018), foi identificado em menor proporção (1,29%) na biomassa suspensa durante a fase IX (35 g-NaCl L<sup>-1</sup>), reforçando o potencial papel dos microrganismos redutores de sulfato nesta amostra.

*Methanosaeta*, uma archaea típica encontrada em reatores produtores de metano (CHEN; HE, 2015), foi o segundo microrganismo predominante na fase IX (13,9%; Fig. 5). Este conhecido metanogênio k-estrategista (LINDEBOOM et al., 2016) é uma archaea

especialista que usa apenas acetato para produzir metano (SMITH; INGRAM-SMITH, 2007). O gênero *Methanofollis* (2,9%) é outro grupo metanogênico de archaea identificado sob tal condição operacional, caracterizado por metanogênios hidrogenotróficos halotolerantes capazes de usar uma ampla gama de substratos, como hidrogênio + dióxido de carbono, formiato, 2-propanol + dióxido de carbono, 2-butanol + dióxido de carbono ou ciclopentanol + dióxido de carbono. No entanto, esse grupo não pode usar acetato, metanol, etanol ou dimetilamina (OBATA et al., 2020), o que elimina sua participação na manutenção de baixas concentrações de acetato antes da dosagem de 50 g-NaCl L<sup>-1</sup>. Uma segunda metanogênica hidrogenotrófica afiliada ao gênero *Methanospirillum* (JAIN ET AL., 2020) também foi capaz de crescer sob 35 g-NaCl L<sup>-1</sup>, indicando um potencial resistência à salinidade.

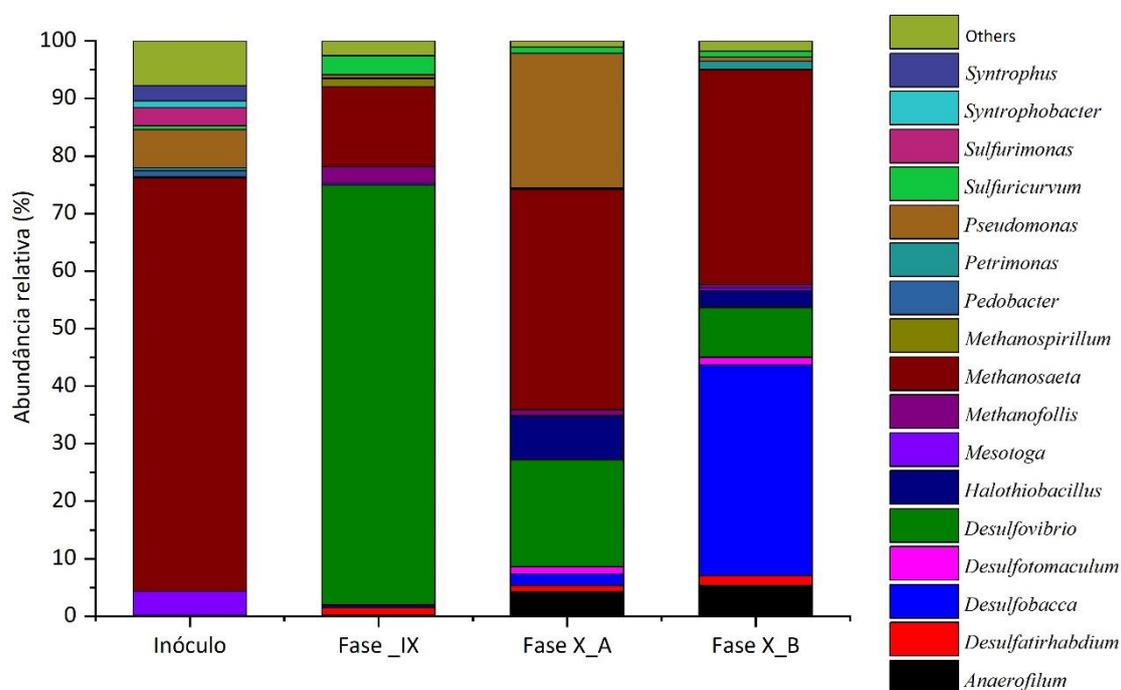


Figura 6.0.5. Gêneros mais abundantes detectados em amostras de biomassa com base em sequências classificadas do gene 16s rRNA (Fase IX: 35 g-NaCl L<sup>-1</sup>; Fase X\_A: 50 g-NaCl L<sup>-1</sup> - biomassa em suspensão; Fase X\_B: 50 g-NaCl L<sup>-1</sup> - biomassa aderida).

Curiosamente, *Methanosaeta* foi o gênero predominante nas amostras de biomassa suspensa (38,3%) e aderida (37,2%) na fase X (50 g-NaCl L<sup>-1</sup>), apesar da produção prejudicada de metano associada ao acúmulo de acetato. (GAGLIANO et al., 2017) relataram a eficiência da formação de biofilme e propriedades dos grânulos na digestão anaeróbia em alta salinidade. Segundo esses autores, o gênero *Methanosaeta*

pode dominar a comunidade microbiana em biofilmes e grânulos sob condição de estresse salino em concentrações de até 20 g-Na<sup>+</sup> L<sup>-1</sup>. Portanto, as propriedades agregantes deste gênero provavelmente foram positivamente relacionadas à persistência de populações de *Methanosaeta* em altas concentrações de NaCl, que permaneceram no sistema, mas com seu metabolismo inibido pela alta salinidade aplicada (50 g-NaCl L<sup>-1</sup>).

ZHANG et al. (2020) também relataram alta abundância relativa de *Methanosaeta* (22,08%) em alta salinidade (18 g-NaCl L<sup>-1</sup>) e nenhuma produção de metano após cinco dias de incubação nesta condição. Esses autores sugeriram que *Methanosaeta* pode ser resistente a condições salinas. No entanto, o aumento das concentrações de NaCl para 30 g L<sup>-1</sup> desencadeou uma diminuição de 60,6% nas concentrações da coenzima F420, que foi apontada como a principal razão por trás da inibição da metanogênese em alta salinidade (ZHANG et al., 2020a). JIN et al., (2020) também relataram que o aumento das concentrações de salinidade (de 0,0 para 18 g-NaCl L<sup>-1</sup>) reduziu a concentração de coenzima F420 em 1,47 vezes, sugerindo que a atividade de metanogênicos foi efetivamente inibida sob alta salinidade. Portanto, a persistência de *Methanosaeta* em altos níveis de salinidade não foi suficiente para garantir a produção eficiente de metano no AnSTBR porque o alto nível de salinidade (50 g-NaCl L<sup>-1</sup>) provavelmente suprimiu as principais enzimas das arqueias. Vale ressaltar que a concentração máxima de NaCl aplicada no AnSTBR foi muito superior às concentrações em que foi relatada a inibição da coenzima F420 (> 18 g L<sup>-1</sup>), o que corrobora a hipótese de inibição enzimática.

Em contraste, o metabolismo de redução de sulfato foi aparentemente menos afetado pela alta salinidade aplicada durante a fase X porque a conversão da matéria orgânica via sulfetogênese ainda foi observada, apesar das concentrações residuais de acetato resultantes tanto da inibição da metanogênese acetoclástica quanto da oxidação parcial de etanol a acetato por redutores de sulfato. BRS são microrganismos funcionais chave em sistemas anaeróbios de tratamento de efluentes ricos em sulfato, que são capazes de realizar a oxidação completa e incompleta de carbono orgânico (GIL-GARCIA et al., 2018; HUANG et al., 2020). O gênero *Desulfovibrio*, relacionado à oxidação incompleta, que é capaz de oxidar preliminarmente o etanol em acetato (Wu et al., 2018), foi identificado em abundâncias relativas de 18,6 % e 8,6%, respectivamente, nas amostras de biomassa suspensa e aderida na fase X, indicando que a produção de acetato via redução de sulfato estava ocorrendo no sistema.

HE et al. (2010) e ZHOU et al. (2017) relataram respostas interessantes do gênero *Desulfovibrio* à tolerância ao sal. De acordo com HE et al. (2010), este gênero é capaz de realizar reações iniciais a aumentos abruptos na concentração de sal (choque salino) e também sobreviver e crescer em ambientes altamente salinos (adaptação salina). ZHOU et al. (2017) compararam os genótipos representativos em 5.000 gerações e 1.200 gerações de *Desulfovibrio vulgaris*, demonstrando os mecanismos que impulsionam a adaptação do sal ao longo de uma longa escala de tempo evolutiva. Segundo esses autores, após a exposição a condições de estresse salino, foi observado um aumento na abundância de glutamato e glutamina, caracterizados como aminoácidos que desempenham um papel fundamental na adaptação ao sal. O aumento dos ácidos graxos derivados de fosfolipídeos (PLFAs) de membrana ramificada ou insaturados do *Desulfovibrio* sob alta salinidade foi um dos mecanismos utilizados para compensar a diminuição da fluidez da membrana, bem como a diminuição da motilidade celular, o que indica melhor gerenciamento de energia porque a motilidade celular exige altos gastos com energia (ZHOU et al., 2017).

BRS oxidantes completas, como os gêneros *Desulfobacca* (2,0% e 36,6%) e *Desulfatirhabdium* (1,1% e 1,7%) também foram identificados nas amostras de biomassa suspensa e aderida coletadas na fase X, respectivamente. Ambos os gêneros *Desulfobacca* (WU et al., 2018) e *Desulfatirhabdium* (BALK et al., 2008) podem usar acetato como único doador de elétrons e fonte de carbono ao mediar a redução de sulfato. No entanto, apesar da alta abundância relativa desses grupos, o acúmulo de acetato indica fortemente que esses microrganismos estavam sob estresse ambiental, como também observado pela diminuição da eficiência da redução de sulfato quando aplicada a maior concentração de NaCl. De acordo com BRANDT et al. (2001), o metabolismo do acetato pelo BRS é severamente inibido em salinidades extremas, o que conseqüentemente diminui as taxas de consumo deste substrato. Esses autores associaram a atividade de redução de sulfato prejudicada com excesso de concentração de acetato no contexto de inibição por produto, considerando experimentos realizados em uma estação usando sedimentos hipersalinos do Grande Lago Salgado.

Estudos anteriores também relataram inibição severa de BRS, bem como de outros anaeróbios, em ambientes altamente salinos, sempre levando ao acúmulo de acetato (OLLIVIER et al., 1994; ZHILINA; ZAVARZIN, 1990). Portanto, a 50 g-NaCl L<sup>-1</sup>, a inibição do produto pode ser uma possibilidade no AnSTBR com base nas respostas do reator: acúmulo de acetato associado a níveis decrescentes de eficiência de redução de

sulfato, mesmo quando grupos oxidantes completos do acetato, como o *Desulfobacca* e Os gêneros *Desulfatirhabdium* foram identificados em amostras de biomassa.

O gênero *Pseudomonas* também foi um grupo microbiano relevante identificado na fase X (Fig. 5). WANG et al. (2020) relataram que o gênero *Pseudomonas* foi favorecido sob baixas concentrações de NaCl (inferior a 20%). Em contraste, no presente estudo, este grupo foi o segundo gênero mais abundante (23,4%;Figura 6.0.5) na biomassa suspensa, exibindo alta tolerância à salinidade em 50 g-NaCl L<sup>-1</sup>. Segundo WARGO (2013), espécies de *Pseudomonas* possuem mecanismos para importar colina e glicina betaína (GB) para o citoplasma e utilizá-los para manter a homeostase do sal. Portanto, a alta abundância relativa observada no AnSTBR corrobora diretamente sua capacidade de aumentar sua sobrevivência sob condições de estresse.

Complementarmente, outros microrganismos foram identificados em abundância relativa superior a 1% a 50 g-NaCl L<sup>-1</sup>. O gênero *Anaerofilum* foi identificado nas amostras de biomassa suspensa (4,2%) e aderida (5,3%). Este gênero foi descrito em lodo de esgoto anaeróbio de estações de tratamento de águas residuais municipais e industriais (ZELLNER et al., 1996) e também é uma BRS predominante em sistemas acidogênicos (ZHOU et al., 2020). O gênero *Petrimonas*, identificado em abundância relativa de 1,4% na biomassa anexa, também é um fermentador (GRABOWSKI et al., 2005). A acidificação do sistema devido ao acúmulo de acetato na fase X pode ter favorecido o crescimento desses grupos. Por fim, os gêneros *Sulfuricurvum* (1,1% e 1,0%) e *Halothiobacillus* (7,7 e 2,9%) também foram identificados nas amostras de biomassa suspensa e aderida, respectivamente, correspondendo a grupos frequentemente identificados em efluentes de sistemas de tratamento (MARTÍNEZ-SANTOS et al., 2018; TURCIOS; WEICHHGREBE; PAPENBROCK, 2016) . Em particular, a identificação do gênero *Halothiobacillus* deve ser destacada por pertencer a um grupo de bactérias oxidantes de enxofre (BOS) tolerantes ao sal encontradas em ambientes salinos e sulfídicos. REZVANI BOROUJENI et al. (2020) relataram que o NaCl é essencial para a atividade de enzimas participantes do crescimento de espécies pertencentes ao gênero *Halothiobacillus*, que possui tanto cepas halotolerantes quanto halofílicas. A diminuição das concentrações de sulfetos e o aumento dos níveis residuais de sulfatos observados na fase X também podem ser decorrentes da atividade desse gênero no sistema, além dos eventos de inibição descritos anteriormente.

A alta diversidade, riqueza e abundância relativa de comunidades microbianas nas amostras de biomassa suspensa e aderida do AnSTBR indicam que, potencialmente, diferentes estratégias foram realizadas para sobreviver sob altas concentrações de sal (50 g-NaCl L<sup>-1</sup>). Embora os mecanismos utilizados pelas bactérias halofílicas tenham sido estudados, seria importante dissecar os mecanismos de tolerância ao sal nos níveis genômico, transcriptômico e proteômico, a fim de entender melhor as estratégias de sobrevivência utilizadas pelos microrganismos tolerantes ao sal.

## 6.5 CONCLUSÕES

Populações sulfetogênicas e metanogênicas foram resistentes a concentrações de até 35 g-NaCl L<sup>-1</sup>, mantendo remoções de sulfato e DQO superiores a 80%. A pressão seletiva do sulfato definiu inicialmente a participação de ambos os grupos na conversão de DQO, com prevalência de BRS (53%). Enquanto a comunidade microbiana foi resistente ao sulfeto, os metanogênicos (gênero *Methanosaeta*) foram fortemente inibidos em salinidade mais alta, caracterizada por evolução nula de biogás e acúmulo de acetato. A absorção de etanol pela oxidação incompleta de BRS (gêneros *Desulfovibrio* e *Desulfotomaculum*) e a conversão de acetato por oxidação completa de BRS (gêneros *Desulfobacca* e *Desulfatirhabdium*) configuraram o cenário metabólico principal a 50 g-NaCl L<sup>-1</sup>. A persistência de tais gêneros indica sua capacidade de sobreviver sob estresse salino. No entanto, o acúmulo de acetato a 50 g-NaCl L<sup>-1</sup> inibiu parcialmente a oxidação completa dos grupos, diminuindo a remoção de sulfato para 64%. No geral, esses resultados indicam que favorecer as populações de BRS pode ser o fator chave para remediar com sucesso águas residuais salinas em sistemas anaeróbios.

## CAPÍTULO 7

---

### 7. IMPACTO DO AUMENTO GRADUAL DA SALINIDADE DEVIDO À NaCl NO PROCESSO DE NITRIFICAÇÃO

#### 7.1 RESUMO

Águas residuárias ricas em nutrientes, como nitrogênio, têm alto impacto ambiental. Esses efluentes podem ser provenientes de processos industriais da indústria alimentícia de pescados, charque, ou água produzida na extração de óleo e gás, que além de uma variedade de nutrientes também apresentam salinidade, afetando a eficiência dos processos de nitrificação e desnitrificação. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do aumento gradual da salinidade de 0 a 35g-NaCl L<sup>-1</sup> em um reator de leito estruturado operado por 393 dias para nitrificação e desnitrificação simultâneas (NDS) na primeira etapa e 87 dias apenas nitrificação após atingir a salinidade desejada. A eficiência de oxidação do nitrogênio amoniacal foi de 95 ± 12%. No entanto, o nitrogênio na forma de nitrito foi acumulado para 35 g-NaCl L<sup>-1</sup> durante o processo de NDS. A variação do oxigênio dissolvido (OD) de 6 para 3 mg-O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> na avaliação apenas da nitrificação, e o retorno para 6 mg-O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> permitiu inferir que a perda de eficiência na oxidação do N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> não ocorreu devido à limitação de oxigênio, mas devido à salinidade. Constatou-se que houve efeito da salinidade nas bactérias oxidadoras de amônia (BOA), gerando menor conversão de amônia (<70%) e acúmulo de amônia livre (>4,00 mg-N-NH<sub>3</sub><sup>+</sup> L<sup>-1</sup>), causando toxicidade para as bactérias oxidadoras de nitrito (BON). O gênero *Paracoccus* e *Moheibacter*, associado à desnitrificação heterotrófica, foram predominantes nas amostras com salinidade 35 g-NaCl L<sup>-1</sup> e matéria orgânica. Entretanto maior estratificação, ou seja, seleção de novos microrganismos e menor abundância relativa ocorreu com a retirada da matéria orgânica (ex. *Mesohirzobium*, *Fontibacter* e *Truepera*). Concluiu-se que apesar da salinidade ter selecionado novos microrganismos, observou-se desequilíbrio entre o consórcio microbiano, levando à variação no pH, causando principalmente acúmulo de amônia livre.

#### 7.2 INTRODUÇÃO

Os processos de tratamento biológico de efluentes ricos em nitrogênio são realizados, convencionalmente, por meio de processos de nitrificação e desnitrificação, em unidades separadas, porém, na busca por sistemas mais compactos, destaca-se o

processo simultâneo de nitrificação e desnitrificação (NDS) em que ambas as reações ocorrerem em um único reator, a partir da estratificação dos microrganismos. Microrganismos aeróbios ocupam a parte externa, e organismos anóxicos a região central do floco ou biofilme formado no material de suporte (ZENG et al., 2003).

As bactérias oxidadoras de amônia (BOA) e as bactérias oxidantes de nitrito (BON) devem atuar em simbiose para que a nitrificação ocorra completamente, ou seja, a amônia seja totalmente oxidada a nitrato. Porém, alguns parâmetros operacionais e características do substrato, como a salinidade, podem afetar diretamente essa relação. WANG et al. (2017) avaliaram o processo NDS em um ambiente com alta carga orgânica e nitrogênio, na presença de salinidade. Os autores relataram que a inibição das BON, assim como na desnitrificação, ocorreu principalmente devido à salinidade. Diferentemente, MACÊDO et al. (2019b) observaram que um aumento na pressão osmótica de 5 para 9 atm afetou o processo de nitrificação, porém o desempenho dos microrganismos desnitrificantes heterotróficos não se alterou.

Em um estudo apresentado por BASSIN; DEZOTTI; SANT'ANNA (2011) relataram que na presença de 33g-NaCl L<sup>-1</sup> ocorreu acúmulo de nitrito, demonstrando que as BONs são mais sensíveis à salinidade do que os BOAs. No entanto, MOUSSA et al. (2006) concluíram que os BOAs são mais sensíveis a períodos curtos e longos na presença de salinidade de aproximadamente 17 g NaCl L<sup>-1</sup>, perdendo entre 36 e 39% de sua atividade, enquanto as oxidantes de nitrito apresentaram redução de sua atividade entre 5 e 13%. Essas divergências de resultados estão mais ligadas à limitação da transferência de oxigênio causada pelo sal do que à inibição de bactérias oxidantes de nitrito (MOUSSA et al., 2006). Os trabalhos citados indicam que é preciso cautela ao comparar ensaios de nitrificação na presença de sal, pois os resultados apresentam contradições. Assim, ao comparar os resultados do efeito da salinidade na nitrificação, é necessário atentar para: a) configuração do sistema e condições experimentais, como temperatura, pH e compostos inibidores; b) Se o sal for introduzido de forma pulsada ou gradual; c) Inóculo utilizado (MOUSSA et al., 2006).

Observa-se que na maioria dos sistemas de tratamento, os efluentes salinos podem levar a baixas eficiências, pois alteram a estrutura do biofilme (MACÊDO et al., 2019a) e aumentam a produção de polímeros extracelulares (CHEN et al., 2019b) como maneira de mitigar os efeitos do aumento da pressão osmótica. Portanto, a adaptação do inóculo

não halófilo à salinidade e às mudanças de força iônica causadas pelo excesso de cátions precisa ser considerada.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo (i) avaliar o efeito do aumento gradativo da salinidade no processo simultâneo de nitrificação e desnitrificação; (ii) avaliar o processo de nitrificação em alta salinidade devido ao NaCl na ausência do processo de desnitrificação; (iii) Avaliar o efeito da redução de oxigênio no processo de nitrificação utilizando um reator de leito estruturado com espumas de poliuretano alimentado com efluente de um reator anaeróbio; (iv) caracterizar a comunidade microbiada para as diferentes concentrações de salinidade.

## **7.3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **7.3.1 Design do reator**

Um AnSTBR em escala de bancada (volume de trabalho 2,20 L) preenchido com 13 tiras de espuma de poliuretano (PU) como material de suporte foi usado como unidade operacional neste estudo, seguindo detalhes construtivos apresentados do reator anaeróbio (capítulo 5). O reator foi colocado em uma câmara de temperatura controlada (modelo 410-DRE, Nova Ética, Vargem Grande Paulista, SP, Brasil) para manter as condições mesófilas (30°C). A alimentação do reator foi realizada em modo de fluxo ascendente usando uma bomba peristáltica (modelo MiniPuls® 3, Gilson, Inc., Middleton, WI, EUA) para obter um tempo de retenção hidráulica fixo (TDH) de 12 h. O oxigênio foi bombeado continuamente usando um compressor de ar e misturando completamente a massa por uma mangueira de irrigação porosa capaz de saturar o meio com OD.

### **7.3.2 Inóculo**

O consórcio microbiano utilizado como inóculo correspondeu ao lodo de um reator de lodos ativados com atividade nitrificante em condições mesófilas. Grupos microbianos participantes de todas as etapas dos processos de nitrificação e desnitrificação foram previamente identificados neste consórcio (ALMEIDA et al., 2018) o que motivou seu uso como inóculo no presente estudo. O lodo ativado rico em sólidos (12 g-ST L<sup>-1</sup> e 10 g-SV L<sup>-1</sup>, em que ST= sólidos totais e SV = sólidos voláteis) foi diluído em água corrente (1:1, v/v) para obter uma mistura menos viscosa. O reator foi preenchido

com a mistura para possibilitar o contato da biomassa com o material suporte por 2 h, após o que o excesso de lodo foi drenado e o reator foi alimentado continuamente.

### 7.3.3 Água residuária e condições operacionais

Foi utilizado como substrato água residuária sintética com composição baseada no efluente de um reator anaeróbio de leito estruturado (AnSTBR) tratando água residuária com características similares as águas produzidas em plataformas de óleo e gás, como abordado no capítulo 6. A composição do afluente à unidade em termos de carga orgânica foi etanol ( $0,13 \text{ mL L}^{-1}$ ) e ácido acético ( $0,14 \text{ mL L}^{-1}$ ) para obter uma demanda química total de oxigênio (DQO) de  $360 \text{ mg L}^{-1}$ . O nitrogênio foi provido por cloreto de amônio –  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $382 \text{ mg L}^{-1}$ ) para obtenção de  $100 \text{ mg-N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ . A suplementação de metais essenciais aos processos biológicos foi realizada por meio da adição de soluções de micro e macronutrientes adaptadas de TORRES (1992).

O reator foi operado continuamente por 480 dias, com carga de nitrogênio de  $0,20 \text{ g-N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , submetido ao aumento gradual da salinidade no processo de nitrificação e desnitrificação. O incremento de salinidade deveu-se ao cloreto de sódio no intervalo de concentração de 0 até  $35 \text{ g-NaCl L}^{-1}$  (fases I a XI). O efeito da alta salinidade no processo de nitrificação (fase XII) foi avaliado mediante a diminuição do oxigênio de  $5,30 \pm 0,90 \text{ mg-OD L}^{-1}$  para  $3,20 \pm 0,80 \text{ mg-OD L}^{-1}$  (fase XIII) e retorno para  $6,00 \pm 0,30 \text{ mg-OD L}^{-1}$  (fase XIV) sobre nitrificação. As fases de operação e as respectivas condições são apresentadas na Tabela 7.1

Tabela 7.1. Fases de operação de acordo com as diferentes salinidades devido ao cloreto de sódio, demanda química de oxigênio, oxigênio dissolvido e níveis de pressão osmótica.

	Fase operacional	Período (d)	Cloreto de sódio (g L <sup>-1</sup> )	Pressão osmótica (wt%)	Aumento de NaCl (%)
<b>6,0 mg-O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup></b>	I	0-50	0	0,18	-
	II	51-70	0,80	0,29	-
	III	71-102	1,70	0,41	100
	IV	103-128	2,50	0,52	47
	V	129-146	3,40	0,63	36
	VI	147-186	4,60	0,80	35
	VII	187-206	6,90	1,11	50
	VIII	207-242	10,40	1,58	50
	IX	243-287	15,60	2,28	50
	X	288-310	23,40	3,33	50
	XI	311-393			50
<b>3,0 mg-O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup></b>	XII	394-421			50
	XIII	421-448	35,0	4,90	-
	XIV	449-480			

#### 7.3.4 Métodos analíticos

O monitoramento do desempenho da fase líquida incluiu os seguintes parâmetros: Demanda química de oxigênio – DQO, pH, nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), nitrogênio nitrito (N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), nitrogênio nitrato (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (APHA/AWWA/WEF, 2012). As concentrações de alcalinidade total, intermediária e parcial foram determinadas de acordo com KAPP (1984). A análise de DQO foi modificada com a dosagem de excesso de sulfato de mercúrio (II) (HgSO<sub>4</sub>) conforme proposto por VYRIDES; STUCKEY (2009) visando eliminar interferências de altos níveis de cloro. As amostras também foram pré-tratadas com sulfato de zinco (ZnSO<sub>4</sub>) para remover interferências de sulfeto dissolvido. Oxigênio dissolvido (OD), potencial de oxi-redução (pOR), condutividade foram

monitorados usando uma sonda de OD (LDO HQ10, Hach), de sensores Intellical (ORP-Redox MTC 101, Hach) e medidor de condutividade (Digimed DM-31), respectivamente.

A amônia livre também foi monitorada utilizando a Eq. (17) em que o termo  $[N-NH_4^+]$  é a concentração de amônia na efluente medida, e ácido nítrico Eq. (18) (YAO et al., 2017), sendo a temperatura (T) fixada em 30 °C (303,15 K) e o pH efluente.

$$\text{Amônia Livre} = \frac{17}{14} \cdot \frac{10^{pH}}{e^{\frac{6334}{273+T}} + 10^{pH}} \cdot [N - NH_4^+] \quad (17)$$

$$\text{Ácido nítrico} = \frac{47}{14} \cdot \frac{1}{e^{\frac{2300}{273+T}} \cdot 10^{pH}} \cdot [N - NO_2^-] \quad (18)$$

### 7.3.5 Análises microbiológicas

Amostras do inóculo, biomassa suspensa sem salinidade (fase I), biomassa aderida e suspensa com 35 g-NaCl L<sup>-1</sup> e matéria orgânica (fase XII) e biomassa aderida e suspensa com 35 g-NaCl L<sup>-1</sup> e sem matéria orgânica (MO) (fase XIV) foram coletadas, lavadas com PBS e armazenados a 4 °C até processamento posterior. A extração total de DNA para sequenciamento de próxima geração (NGS) foi realizada usando o kit FASTDNA SPIN para solo (Qbiogene, Carlsbad, CA, EUA). A qualidade do DNA foi avaliada pela proporção de 260/280 nm N 1,8, medida por um espectrofotômetro ND-2000 (Nanodrop Inc., Wilmington, DE) e eletroforese em gel de agarose.

O sequenciamento paired-end de ciclos Illumina MiSeq 300 da região (~450 pb) de 16S rRNA foi realizada seguindo o protocolo do fabricante (Illumina Inc., EUA) pela NGS soluções genômicas (Piracicaba, Brasil), usando seu próprio pipeline considerando 1% de erro. As sequências resultantes (fastq) foram filtradas com qualidade em um Phred usando o software FastQC v.0.11.8 (ANDREWS, 2010). O recorte do primer foi realizado em Python v.3.6 com software inspirado no projeto BioPython (COCK et al., 2009). As unidades taxonômicas operacionais (OTU) classificadas como quimeras foram removidas (SMYTH et al., 2010).

A identificação taxonômica foi realizada usando blastn v.2.6.0+(ALTSCHUL et al., 1990). As sequências identificadas pelo MiSeq Illumina foram depositadas no National Center for Biotechnology Information (NCBI - <https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/>).

## 7.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 7.4.1 Efeito do aumento gradual da salinidade (até 35 g-NaCl L<sup>-1</sup>) no processo NDS

A salinidade no reator aeróbio foi gradativamente aumentada, no período de 420 dias, até 35 g-NaCl L<sup>-1</sup>, caracterizando um efluente hipersalino. O aumento da salinidade do lodo não adaptado ocorreu lentamente, uma vez que bactérias oxidadoras de amônia (BOA) e bactérias oxidantes de nitrito (BON) são sensíveis à limitação de OD, temperatura e salinidade (CHEN et al., 2019b; LI et al., 2018). Assim, se o sal for gradualmente aumentado, os microrganismos terão mais chances de se adaptar e seu impacto nas células reduzido, pois podem se ajustar ao aumento da pressão osmótica com a ajuda do vacúolo contrátil ou sintetizar soluto compatível. Quanto maior a salinidade, mais energia será necessária para os microrganismos manterem suas funções (HE et al., 2017).

O pH do afluente foi de  $7,50 \pm 0,40$  e do efluente de  $7,90 \pm 0,35$  para todas as fases avaliadas. A eficiência de remoção da matéria orgânica (Figura 7.1), via desnitrificação heterotrófica, foi de  $96 \pm 6\%$  para 23,4 g-NaCl L<sup>-1</sup>, com decaimento para  $86 \pm 9\%$  para 35 g-NaCl L<sup>-1</sup>. O afluente DQO foi de  $347,0 \pm 63,0$  mg-O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>, e o efluente médio foi de  $13,0 \pm 21,0$  mg-O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> e  $52,0 \pm 34,0$  mg-O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>, para 23,4 g-NaCl L<sup>-1</sup> e 35 g-NaCl L<sup>-1</sup>, respectivamente. A queda na eficiência de remoção de matéria orgânica foi creditada à interferência da salinidade no processo de desnitrificação. ZHANG et al. (2020b) obtiveram alta eficiência de remoção de DQO para salinidade inferior a 30 g L<sup>-1</sup>, seguida de perdas na capacidade de remoção em salinidades mais altas devido ao alto estresse osmótico imposto às células.

A média de remoção de nitrogênio amoniacal até a fase XI foi de  $95 \pm 14\%$ , correspondendo a uma carga de nitrogênio removida de  $0,20$  g-N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, ou seja, a oxidação da amônia não foi afetada pelo aumento gradativo de NaCl até 35 g-NaCl L<sup>-1</sup> na presença de matéria orgânica.

Entretanto, a concentração de nitrito para 23,4 g-NaCl L<sup>-1</sup> foi de  $4,0 \pm 8,0$  mg-N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> L<sup>-1</sup>, aumentando para  $32,0 \pm 17,0$  mg-N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> L<sup>-1</sup> em salinidade de 35 g-NaCl L<sup>-1</sup>. Já para o nitrato ocorreu o inverso, a concentração foi de  $68,0 \pm 19,0$  mg-N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> L<sup>-1</sup> a  $10,0 \pm 8,0$  mg-N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> L<sup>-1</sup>. É importante observar que o acúmulo de nitrito foi gradativo, a partir da concentração de 10 g-NaCl L<sup>-1</sup> (Figura 7.2)

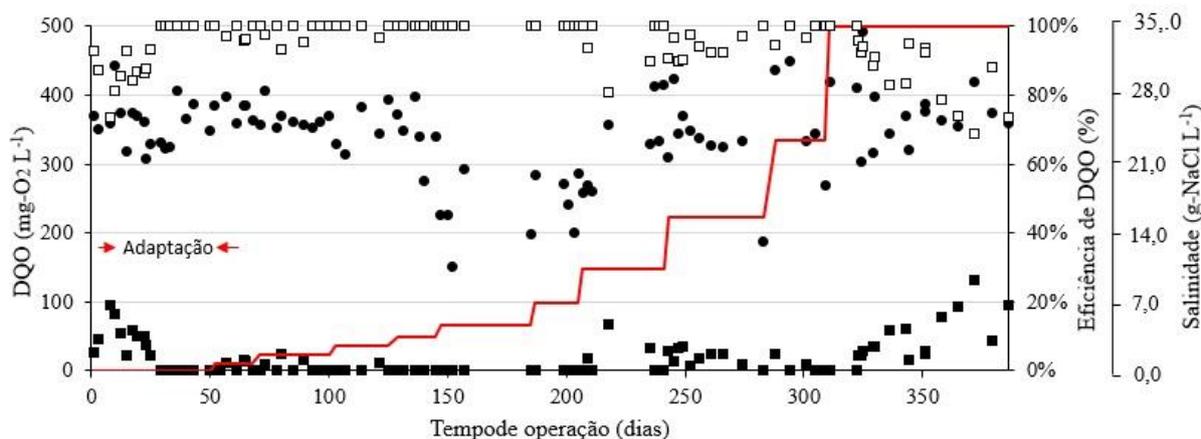


Figura 7.1. Perfil temporal para as fases com matéria orgânica (fase I a XI) afluente (●) e efluente (■), eficiência de remoção de DQO (□), e concentrações de salinidade em cada fase (-)

As bactérias oxidadoras de amônia (BOA) crescem mais rapidamente que as bactérias oxidantes de nitrito (BON) (FENG et al., 2007), associado o acúmulo inicial de nitrito no sistema na concentração de 10 g-NaCl L<sup>-1</sup>. MOUSSA et al. (2006) constataram que, para uma concentração de 25 g-NaCl L<sup>-1</sup>, as BON foram menos afetados pelo sal com queda na eficiência de 11%, enquanto que as BOA apresentaram queda da eficiência na proporção de 36%. Entretanto os autores avaliariam que em salinidades mais elevadas, tanto as BON quanto as BOA foram afetadas, com redução de até 95% na atividade de ambos os grupos para 66 g-NaCl L<sup>-1</sup>.

QUARTAROLI et al. (2019) observaram que a remoção de amônia não sofria interferência com altas salinidades, pois as BOA não perdiam eficiência; enquanto as BON foram afetados. No presente estudo houve acúmulo de nitrito obtido para 35 g-NaCl L<sup>-1</sup>. No entanto, como já apresentado, alguns estudos correlacionam a perda da atividade de BON devido a mudanças na transferência de oxigênio com o aumento da salinidade (CAMPOS et al., 2002b) e com a toxicidade a amônia livre. A inibição/toxicidade por limitação de oxigênio dissolvido, salinidade ou amônia livre serão discutidas no item 7.4.2.

Tabela 7.2. Resumo dos parâmetros analisados para cada fase e salinidade do AnSTBR - reator aeróbio

<b>Fase operacional</b>	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	
<b>NaCl (g L<sup>-1</sup>)</b>	0,00	0,80	1,70	2,50	3,40	4,60	6,90	10,40	15,60	23,40		35,00			
<b>OD (mg L<sup>-1</sup>)</b>							6,00						3,00	6,00	
<b>Período de tempo de operação (d)</b>	50	19	31	25	17	39	19	35	44	22	82	27	27	31	
<b>TDH (h)</b>	13,30 (1,30)	13,20 (1,10)	13,00 (0,70)	12,80 (1,30)	13,40 (1,10)	13,65 (1,20)	12,30 (0,35)	12,40 (0,30)	12,40 (0,45)	12,80 (0,80)	12,40 (0,60)	12,10 (0,75)	11,80 (0,40)	12,10 (0,45)	
<b>pH</b>	<b>Afluente</b>	7,20 (0,10)	7,20 (0,06)	7,50 (0,30)	7,30 (0,15)	7,20 (0,40)	7,50 (0,40)	7,20 (0,10)	7,35 (0,30)	7,35 (0,30)	7,70 (0,20)	7,70 (0,35)	8,00 (0,10)	8,00 (0,10)	8,00 (0,10)
	<b>Efluente</b>	7,90 (0,50)	7,90 (0,20)	7,65 (0,70)	7,90 (0,30)	7,90 (0,10)	7,80 (0,40)	7,90 (0,10)	7,80 (0,10)	7,80 (0,15)	7,60 (0,25)	7,90 (0,22)	8,00 (0,10)	7,90 (0,05)	8,00 (0,05)
<b>DQO (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Afluente</b>	358,0 (34,00)	379,00 (14,50)	365,45 (17,00)	353,00 (34,00)	346,00 (42,00)	219,00 (51,00)	257,00 (37,00)	330,00 (64,00)	330,000 (60,00)	366,00 (76,00)	387,50 (46,00)	-	-	-
	<b>Efluente</b>	0,00 (0,00)	6,00 (7,50)	6,00 (9,450)	2,20 (4,90)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	14,80 (24,60)	20,00 (12,00)	6,80 (10,50)	67,00 (36,00)	-	-	-
<b>Alcalinidade Parcial (mg-CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Afluente</b>	414,00 (91,00)	455,50 (28,00)	476,00 (72,50)	467,00 (82,00)	421,00 (4,00)	448,00 (26,00)	420,00 (4,00)	420,00 (19,00)	418,00 (14,00)	449,00 (27,00)	412,00 (32,00)	485,00 (53,00)	516,00 (43,50)	536,00 (56,00)
	<b>Efluente</b>	180,00 (75,00)	93,00 (60,00)	111,50 (85,50)	73,00 (57,00)	73,00 (11,00)	67,00 (12,00)	81,00 (30,50)	79,00 (35,00)	88,00 (26,00)	47,50 (22,00)	166,00 (107,00)	236,00 (50,00)	406,50 (44,00)	331,50 (50,00)

<b>Alcalinidade Intermediária</b> <b>(mg-CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Afluente</b>	230,30 (92,00)	221,00 (7,00)	223,00 (39,00)	234,00 (10,40)	236,00 (31,00)	236,00 (47,00)	241,00 (14,50)	250,00 (15,50)	246,50 (10,00)	244,00 (25,00)	243,00 (43,00)	179,00 (32,00)	194,00 (37,00)	181,00 (26,00)
	<b>Efluente</b>	58,00 (51,50)	30,00 (19,00)	39,00 (23,00)	58,00 (81,00)	27,50 (3,00)	35,00 (11,00)	32,00 (13,00)	32,00 (13,00)	40,50 (13,00)	24,00 (24,00)	78,00 (41,50)	137,00 (92,00)	167,00 (28,00)	145,00 (24,00)
<b>N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b> <b>(mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Afluente</b>	97,00 (17,00)	114,00 (12,00)	118,00 (16,00)	107,00 (18,00)	96,00 (10,00)	95,00 (7,00)	101,00 (10,00)	115,00 (8,00)	113,00 (9,00)	110,00 (6,00)	105,00 (9,00)	110,00 (13,00)	121,00 (11,00)	106,00 (9,00)
	<b>Efluente</b>	0,30 (0,10)	0,30 (0,20)	13,50 (24,00)	0,10 (0,10)	0,20 (0,15)	0,20 (0,10)	0,40 (0,30)	0,30 (0,10)	1,60 (1,20)	0,55 (0,10)	14,00 (18,00)	38,00 (13,00)	84,00 (10,50)	63,00 (10,50)
<b>%N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>		100% (0%)	100% (0%)	89% (18%)	100% (0%)	100% (0%)	100% (0%)	100% (0%)	100% (0%)	100% (0%)	99% (0%)	86% (19%)	66% (11%)	31% (8%)	40% (8%)
<b>N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b> <b>(mg L<sup>-1</sup>)</b>		0,60 (1,20)	0,30 (0,20)	0,30 (0,20)	0,10 (0,00)	0,30 (0,20)	0,20 (0,10)	0,50 (0,15)	2,10 (1,30)	21,00 (10,00)	6,00 (8,20)	31,00 (18,00)	50,00 (9,00)	21,50 (6,00)	33,00 (5,00)
<b>N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b> <b>(mg L<sup>-1</sup>)</b>		52,00 (16,00)	76,00 (19,00)	79,00 (14,00)	76,00 (24,00)	80,50 (5,00)	69,00 (4,00)	78,50 (15,00)	75,00 (8,00)	55,00 (17,00)	82,00 (11,00)	14,00 (18,00)	5,50 (1,00)	2,50 (0,50)	3,50 (1,50)
<b>N-NH<sub>3</sub><sup>+</sup></b> <b>(mg L<sup>-1</sup>)</b>		0,04 (0,02)	0,02 (0,01)	0,45 (1,10)	0,01 (0,01)	0,02 (0,01)	0,02 (0,01)	0,03 (0,02)	0,02 (0,00)	0,10 (0,10)	0,02 (0,01)	1,65 (3,00)	3,90 (2,00)	6,00 (0,70)	6,00 (2,00)

### 7.4.2 Efeito da redução de oxigênio dissolvido em elevada salinidade para as nitrificantes

Após 80 dias na concentração de 35g-NaCl L<sup>-1</sup> (fase XI) e 30 dias sem adição de matéria orgânica no sistema (fase XII), a eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal foi de 66 ± 11%, ou seja, diminuição de eficiência quando comparada às fases anteriores, por exemplo de 86% - fase XI (Figura 7.2). CORSINO et al. (2015) relataram uma baixa e lenta remoção de nitrogênio (apenas 26% do nitrogênio total foi oxidado) para 25 g-Cl L<sup>-1</sup>, aproximadamente 40 g-NaCl L<sup>-1</sup>.

A concentração de nitrito no meio reacional aumentou da fase XI para XII, atingindo 49,6 ± 8,8 mg-N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> L<sup>-1</sup>, enquanto a concentração de nitrato caiu de 14,30 ± 18,00 para 5,6 ± 1,0 mg-N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> L<sup>-1</sup>, corroborando com uma maior taxa de crescimento de bactérias oxidantes de amônia em detrimento das bactérias oxidantes de nitrito (FENG et al., 2007).

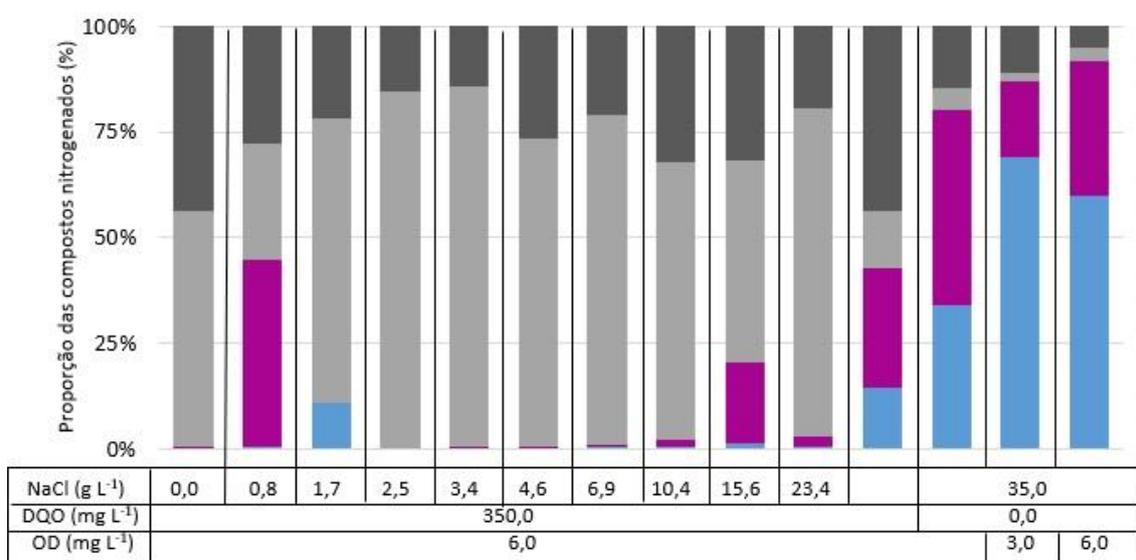


Figura 7.2. Variação da fração de nitrogênio para os diferentes níveis de salinidade e oxigênio dissolvido. Legenda: (■) N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>; (■) N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>; (■) N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; (■) Nitrogênio não determinado.

Com a redução do oxigênio dissolvido de 5,3 ± 0,30 mg-O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> para 3,2 ± 0,8 mg-O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> (fase XIII), a eficiência de remoção de amônia do sistema de 66 ± 11%, para 31 ± 8%, resultando em menor concentração de nitrito e nitrato, 21,5 ± 6,2 mg - N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> L<sup>-1</sup> e 2,6 ± 0,6 mg-N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> L<sup>-1</sup>, respectivamente. Com o retorno do OD para 6,00 ± 0,30 mg-O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> (fase XIV), a eficiência de conversão da amônia aumentou para 40 ± 8%,

aumentando assim a concentração de nitrito -  $33,2 \pm 5,4 \text{ mg-N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$  e de nitrato de  $3,40 \pm 1,50 \text{ mg-N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$ .

Estudos envolvendo salinidade e nitrificação diferem quanto à origem do acúmulo de nitrito, pois podem estar ligados à toxicidade da salinidade ou limitações de transferência de massa (DINÇER; KARGI, 1999; VREDENBREGT et al., 1997). Estudos têm demonstrado que as BON são mais sensíveis que os BOA em baixas concentrações de oxigênio, pois as BON apresentam maiores coeficientes de saturação de oxigênio portanto, em baixas concentrações de oxigênio ( $<2 \text{ g-O}_2 \text{ m}^{-3}$ ), BOA são muito mais ativos que os BON (CIUDAD et al., 2006).

Concentrações de oxigênio dissolvido inferiores a  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  (CHUNG et al., 2005) e amônia livre (PENG; CHEN; TIAN, 2003) são consideradas dois fatores para o acúmulo de nitrito. Além desses fatores, substâncias como hidrocarbonetos podem afetar diretamente as BOA, enquanto altas concentrações de sal inibem o BON (BASSIN; DEZOTTI; SANT'ANNA, 2011; CORSINO et al., 2015; HU et al., 2005). No presente estudo, a concentração de OD no sistema estava acima de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  relatado em literatura, por isso foi avaliado a concentração de amônia livre (Eq. 17) e ácido nítrico (Eq. 18).

Ácido nítrico não foi encontrado no sistema, associado à concentração de nitrito ( $\text{N-NO}_2^-$ ) e o pH do sistema. Entretanto, o mesmo não ocorreu para a amônia livre (Figura 7.3). Para a fase inicial (de adaptação do inóculo – fase I) e sem salinidade, houve acúmulo de amônia livre, entretanto ao atingir  $6,82 \text{ mg NH}_3^+ \text{ L}^{-1}$ , o sistema se recuperou sem nenhuma interferência e retornou a concentrações próximas as  $0 \text{ mg NH}_3^+ \text{ L}^{-1}$ . Ao atingir a concentração de  $35 \text{ g-NaCl L}^{-1}$ , a amônia livre voltou a ser detectada no sistema, atingindo a maior concentração em  $9,06 \text{ mg NH}_3^+ \text{ L}^{-1}$ , retornando para uma média de  $1,06 \pm 1,04 \text{ mg NH}_3^+ \text{ L}^{-1}$ .

Ao suprimir a matéria orgânica da água residuária afluenta ao reator, visando avaliar apenas a nitrificação, houve acúmulo amônia livre no sistema, com valor médio de  $3,89 \pm 1,94 \text{ mg NH}_3^+ \text{ L}^{-1}$ . Com a redução do oxigênio dissolvido de  $6,00$  para  $3,00 \text{ mg-O}_2 \text{ L}^{-1}$ , a concentração de amônia livre no reator dobrou (média de  $6,13 \pm 0,72 \text{ mg NH}_3^+ \text{ L}^{-1}$ ), e mesmo após o retorno do oxigênio dissolvido para  $6,00 \text{ mg-O}_2 \text{ L}^{-1}$ , a média continuou em  $6,02 \pm 1,60 \text{ mg NH}_3^+ \text{ L}^{-1}$ , porém, observa-se pela Figura 7.3, que a concentração de amônia livre teve seu aumento não devido a redução de oxigênio

dissolvido. Segundo LIU et al. (2019) as BOA são inibidas a uma faixa de amônia livre de 10 a 150 mg  $\text{NH}_3^+$   $\text{L}^{-1}$ .

O aumento da salinidade para 35 g- $\text{NaCl}$   $\text{L}^{-1}$  impactou as BON, gerando o início do acúmulo de nitrito no sistema, como discutido no item 7.4.1, associado à toxicidade pela amônia livre em contrações a partir de 0,1 mg  $\text{NH}_3^+$   $\text{L}^{-1}$  (TURK; MAVINIC, 1989).

PENG; CHEN; TIAN (2003) relataram que quando a relação OD/amônia livre for superior a 5, o sistema não é capaz de acumular nitrito, entretanto se essa relação for menor que 5 haverá acúmulo de nitrito. Além disso, se no sistema houver presença de organismos desnitrificantes, o mesmo poderá se recuperar ao acúmulo de nitrito. Assim, se as condições de salinidade de 35 g- $\text{NaCl}$   $\text{L}^{-1}$ , OD de 6 mg- $\text{O}_2$   $\text{L}^{-1}$  e presença de matéria orgânica fossem mantidas, esperava-se que o sistema pudesse ter se recuperado. Porém, a retirada da matéria orgânica prejudicou a ação das bactérias desnitrificantes heterotróficas, diminuindo a relação OD/amônia livre para 1,85, acumulando mais nitrito no sistema. No período com concentração de 3 mg- $\text{O}_2$   $\text{L}^{-1}$ , a relação OD/amônia livre decresceu para 0,9, acarretando baixa eficiência de 31% do sistema.

O comportamento das concentrações de amônia, nitrito, nitrato e amônia livre, concomitante com valores encontrados na literatura de toxicidade, permite inferir que a salinidade afetou as BOA, gerando menor conversão de amônia, levando ao acúmulo de amônia livre, a qual acarretou na toxicidade para as BON, levando ao acúmulo de nitrito, configurando baixo desempenho do sistema.

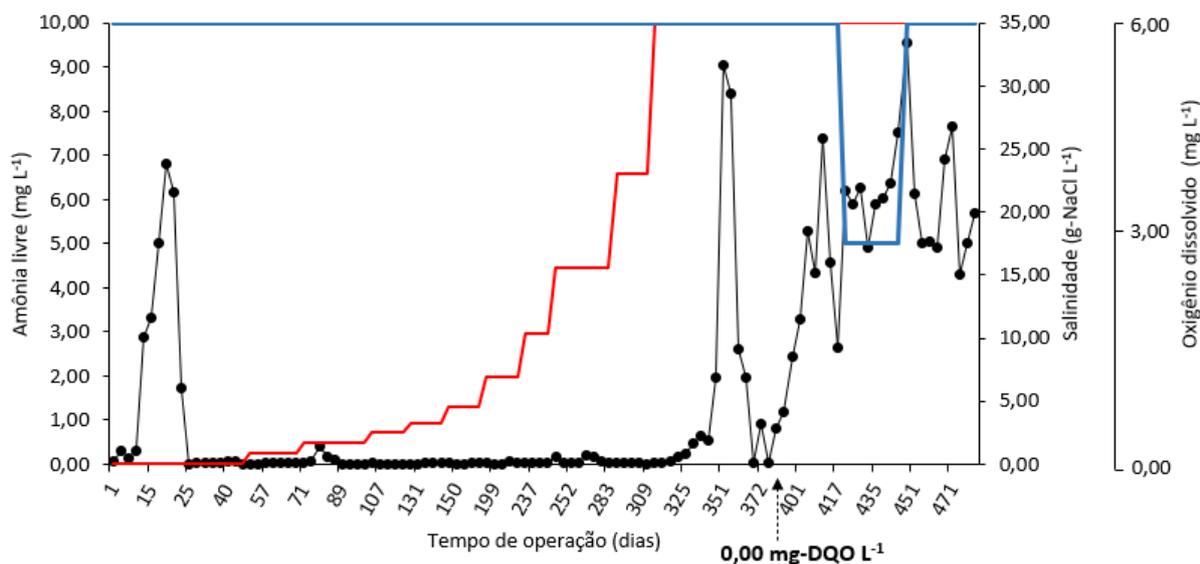


Figura 7.3. variação da amônia livre no sistema aeróbio (-●-) de acordo com a variação da salinidade (--), oxigênio dissolvido (--).

### 7.4.3 Biologia molecular

Análises filogenéticas dos domínios Bactéria e Archaea foram realizadas para caracterizar a comunidade microbiana do inóculo (amostra 1), biomassa suspensa na ausência de salinidade (amostra 2), biomassa aderida para salinidade de 35,0 g-NaCl L<sup>-1</sup> na presença de matéria orgânica (amostra 3), biomassa suspensa para 35,0 g-NaCl L<sup>-1</sup> com matéria orgânica (amostra 4), biomassa aderida (amostra 5) e suspensa (amostra 6) para 35,0 g-NaCl L<sup>-1</sup>, sem matéria orgânica (MO) e OD em 6 mg L<sup>-1</sup>. No nível de domínio, 100% das leituras foram atribuídas a Bactéria. Uma análise do gráfico de barras da abundância da comunidade no nível de gênero (valores relativos à abundância superior a 1% em pelo menos uma amostra) é apresentada na Figura 7.4.

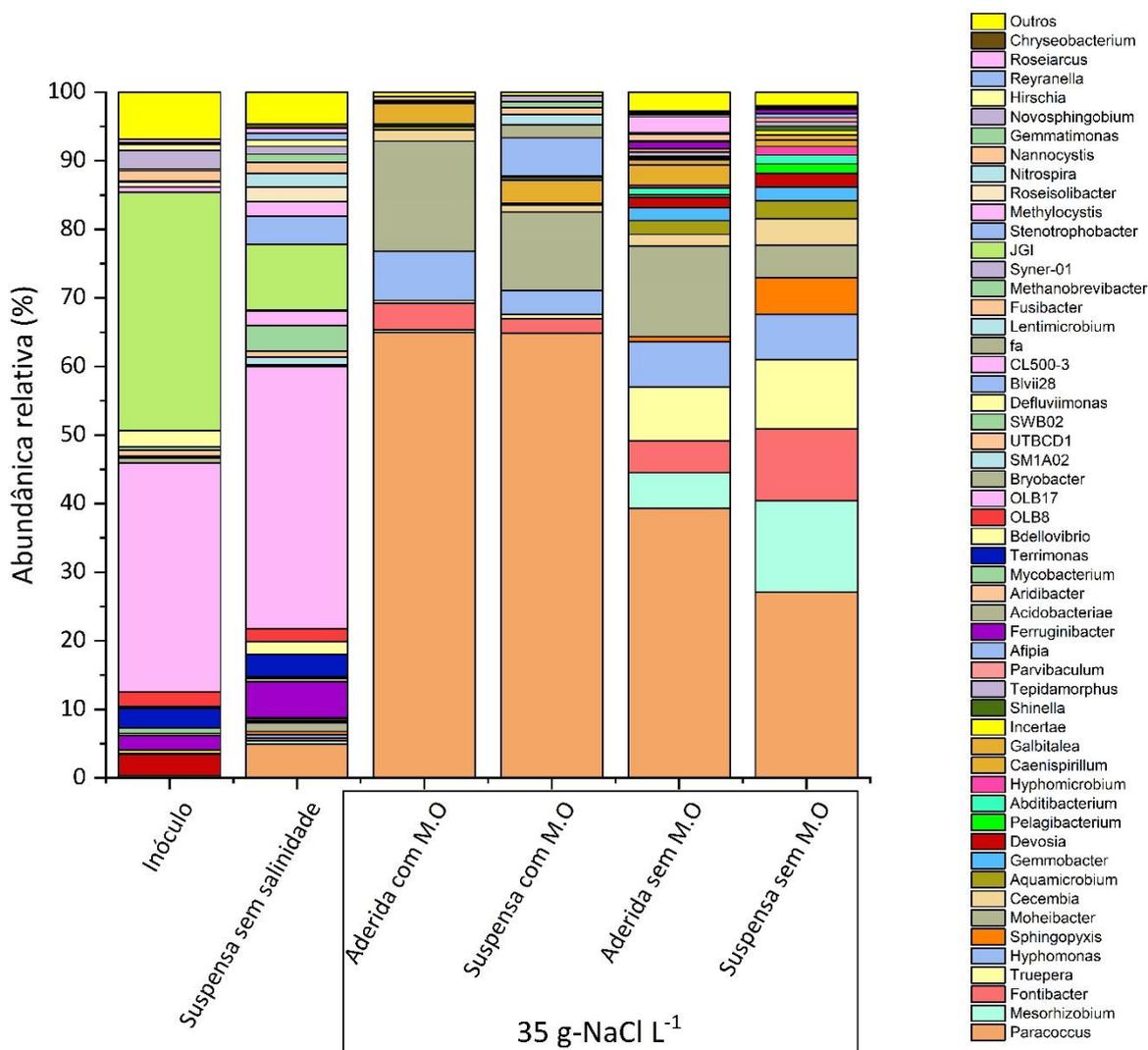


Figura 7.4. Gêneros mais abundantes detectados em amostras de biomassa suspensa e aderida com base em sequências classificadas do gene 16s rRNA em diferentes fases do reator aeróbio para diferentes salinidades variando de 0,00 a 35,00 g-NaCl L<sup>-1</sup>

Os filos *Acidobacteriota*, *Bacteroidota*, *Proteobacteria*, *Deinococcota* pertencentes ao domínio Bacteria foram os que mais apareceram nas amostras analisadas. O filo *Acidobacteriota* foi identificado principalmente nas amostras do inóculo (70%) e do fundo do reator aeróbio na condição “sem salinidade” (53%). Os genes de *Acidobacteriota* 16S rRNA são frequentemente detectados em ambientes marinhos, incluindo águas oceânicas, esponjas marinhas, fontes hidrotermais ou sedimentos (FLIEDER et al., 2021) e este filo está associado à capacidade de fixar nitrogênio (KAPILI et al., 2020). O filo *Bacteroidota* apresentaram abundância relativa nas amostras de inóculo e sem salinidade de 8 e 14% respectivamente, e para todas as amostras de 35,00 g-NaCl L<sup>-1</sup> com e sem matéria orgânica, manteve-se estável entre 20 e 22% em abundância relativa. Para o filo *Proteobacteria*, a abundância relativa para as amostras de 1 a 6 foi de: 15%, 18%, 77%, 73%, 64% e 67. Os filos *Bacteroidota* e *Proteobacteria* são essenciais para a transformação de nitrogênio, principalmente pelo potencial de mineralização do nitrogênio e desnitrificação, respectivamente (DUAN et al., 2022; LONG et al., 2023).

Para as amostras de biologia molecular do inóculo e da biomassa suspensa sem salinidade, o gênero OLB17 teve abundância relativa de 33 e 38%, respectivamente. Esse gênero pertence ao filo *Acidobacteriota* e é encontrada na literatura como não classificada (BONASSA et al., 2022), entretanto é relatada como filamentosa e com forte relação com reatores anammox (CHEN et al., 2021). Para as amostras com e sem matéria orgânica e biomassa tanto aderida quanto suspensa, esses microrganismos não foram detectados, sugerindo que esse gênero é inibido por salinidade devido ao cloreto de sódio.

Outro gênero encontrado no inóculo e biomassa suspensa sem salinidade foi o *JGI*, com abundância 35 e 10%, respectivamente. Organismos *JGI-0000079-D21* são relatados na literatura como hidrolíticas e acidogênicas com potencial de degradar compostos fenólicos de N-heterocíclicos (FAN et al., 2022b; ZHU et al., 2023), apesar desses compostos não existirem na água residuária estudada nessa tese.

Ao se adaptar ao meio nutricional, os microrganismos foram selecionados, apresentando na biomassa suspensa na condição de ausência de salinidade, o aparecimento de outros gêneros, como *Paracoccus*. O *Paracoccus* teve elevada abundância relativa nas amostras 2 a 6, sendo respectivamente: 5%, 65%, 65%, 39% e 27%. Ou seja, melhor abundância relativa foi observada para as amostras de 35 g-NaCl L<sup>-1</sup> com DQO. *Paracoccus halodenitrificans* também conhecido como

*Microoccus halodenitrificans* é um organismo desnitrificante, mas requer íons cloreto entre 4,4% e 8,8% para crescer e é extremamente sensível ao acúmulo de nitrito (DENARIAZ; PAYNE; LE GALL', 1989; ROBINSON; GIBBONS, 1952). Acima de 8,8% de salinidade, ele não sofreu inibição, apenas tem sua fase lag aumentada e taxa de crescimento diminuída (ROBINSON; GIBBONS, 1952). Outra espécie, o *Paracoccus denitrificans* também foi relatado como oxidante da amônia em nitrito (MOIR et al., 1996).

O gênero *Moheibacter* foi encontrado nas amostras suspensas e aderidas para todas amostras de 35g-NaCl L<sup>-1</sup>, com abundância relativa de 16% (amostra 3), 11% (amostra 4), 13% (amostra 5) e 5% (amostra 6), demonstrando que se adapta melhor quando aderida a uma superfície (amostra 3 e 5). Esse gênero tem crescimento entre 1 e 4% (w/v) de NaCl (SCHAUSS et al., 2016) e tem sido reportado como estritamente aeróbio (YU et al., 2022). Outro gênero que foi determinado nas amostras de salinidade foi a *Hyphomonas* (amostra 3 -7%, amostra 4 - 3% amostra 5 e 6 - 7%) e são caracterizadas por reduzirem nitrito e nitrato (MOORE; WEINER; GEBERS3, 1984).

O gênero *Fontibacter* foi determinado em amostras de 4 a 6 g-NaCl L<sup>-1</sup> com maior abundância relativa (11%) para a biomassa suspensa de sem matéria orgânica de 35,00 g-NaCl L<sup>-1</sup> (amostra 6). Tem sido reportado na literatura como removedor de nitrato em efluente de água residuária de coque (TANG et al., 2017). O gênero *Truepera* foi encontrado com abundância relativa de 8 e 10% para as amostras aderidas e suspensas com 35,00 g-NaCl L<sup>-1</sup> sem MO, respectivamente. Os organismos desse gênero podem usar uma variedade de fontes de matéria orgânica para crescimento e reprodução sob condições extremas, de alcalinidade, salinidade moderada e altas temperaturas (SHI et al., 2022). O gênero *Mesorhizobium* também foi detectado nas mesmas amostras que *Truepera sp.*, mas em abundância relativa de 5 e 13% e tem sido apontado como recuperadores de solos contaminados com crômio auxiliando na fixação do nitrogênio (NAZ et al., 2023). O gênero *Sphingopyxis* com abundância relativa de 1 e 5% (amostras aderida e suspensa com 35,00 g-NaCl L<sup>-1</sup> e sem MO) é encontrado na literatura como responsável pela nitrificação heterotrófica e desnitrificação aeróbia, podendo usar amônia, nitrato ou nitrito como fonte de nitrogênio, além de possuírem potencial para remoção de nitrogênio em água residuárias salinas (CHEN et al., 2022b).

De forma geral, observa-se que ao inserir a salinidade, a composição microbiológica do reator mudou significativamente, selecionando organismos resistentes

à salinidade, sendo que para amostras suspensas e aderidas com 35 g-NaCl L<sup>-1</sup>, a composição foi muito similar e em sua maioria composta apenas por dois gêneros, *Paracoccus* e *Moheibacter*. A retirada da matéria orgânica em elevada salinidade demonstrou uma maior estratificação dos gêneros de microrganismos, apresentando uma maior seleção, e conseqüentemente menor abundância relativa.

## 7.5 CONCLUSÃO

Para a NDS, observou-se que a concentração de matéria orgânica no sistema não foi suficiente para o processo de desnitrificação, resultando em elevada concentração remanescente de nitrato até 23,4 g-NaCl L<sup>-1</sup>. Ao adicionar salinidade na concentração de 35,00 g-NaCl L<sup>-1</sup>, as BON foram afetadas mais do que as BOA, provavelmente devido ao acúmulo de amônia livre no sistema. As bactérias desnitrificantes, para 35 g-NaCl L<sup>-1</sup>, não foram afetadas pelos níveis de salinidade sendo representadas pelo gênero *Paracoccus*, permanecendo com elevada abundância relativa mesmo com o acúmulo de nitrito.

Embora a eficiência de conversão da amônia tenha sido menor que a obtida até 35g-NaCl L<sup>-1</sup> com matéria orgânica (fase XI), a redução da concentração de OD ( fase XIII), seguida pelo retorno em concentrações próximas a 6 mg-O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> (fase XIV), permitiu inferir que houve acúmulo de amônia livre no sistema, apresentando efeito deletério para as BON, levando a elevadas concentrações no efluente. Em resumo, a elevada salinidade + ausência de matéria orgânica + redução de oxigênio dissolvido acarretaram em aumento das concentrações de nitrito e nitrato.

A análise de microbiologia permite inferir que a salinidade modificou o consórcio microbiano do inóculo, selecionando novos gêneros, com predominância do *Paracoccus* e *Moheibacter* na biomassa com matéria orgânica e 35 g-NaCl L<sup>-1</sup>; e *Truepera* e *Mesorhizobium* na condição de ausência de matéria orgânica. Apesar da salinidade ter selecionado novos microrganismos, observou-se desequilíbrio entre o consórcio microbiano, levando à variação no pH, causando acúmulo de amônia livre, com efeito deletério ao sistema.

## CAPÍTULO 8

**8. EFEITO DE ELEVADAS SALINIDADES NO PROCESSO DE DESNITRIFICAÇÃO AUTOTRÓFICA DO NITRATO, UTILIZANDO SULFETO GASOSO COMO DOADOR DE ELÉTRONS****8.1. RESUMO**

A digestão anaeróbia, apesar de sua elevada eficiência para remoção da matéria orgânica, não é capaz de converter compostos nitrogenados, requerendo, processos de tratamento complementares para águas residuárias ricas nesses compostos. Uma alternativa de tratamento para efluentes de processos anaeróbios é a união da nitrificação, e subsequente desnitrificação, podendo utilizar o residual de matéria orgânica, no processo heterotrófico, ou então o sulfeto de hidrogênio (produto final da digestão anaeróbia de águas com compostos de enxofre), no processo autotrófico. As águas ricas em sulfato quando submetidas à digestão anaeróbia produzem compostos reduzidos de enxofre, como o sulfeto de hidrogênio, presente em solução ou na fração gasosa, como potencial de utilização no processo de desnitrificação autotrófica. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a desnitrificação utilizando como doador de elétrons o  $\text{H}_2\text{S}$  gasoso durante 100 dias, avaliando o efeito de diferentes salinidades devido ao cloreto de sódio em concentrações variando de 0,00 a 15,6 g-NaCl  $\text{L}^{-1}$ . Para isso utilizou-se relação N/S de 1,6, sendo  $4,20 \pm 0,80 \text{ g-N m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  e  $6,00 \pm 1,00 \text{ g-S m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ . Os principais resultados demonstram a viabilidade desse processo em salinidade até 10,40 g-NaCl  $\text{L}^{-1}$ , sendo observado em concentrações mais elevadas o acúmulo de nitrito ( $30,00 \pm 5,00 \text{ mg-N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$ ), indicando efeitos deletérios da salinidade aos microrganismos responsáveis por essa conversão. No geral, a eficiência da desnitrificação foi de  $63 \pm 19\%$  utilizando concentrações de  $1000,2 \pm 175,00 \text{ ppmv}$ , representando média de  $10 \pm 2\%$  de  $\text{H}_2\text{S}$  no afluente. A relação estequiométrica N/S utilizada favoreceu a conversão de nitrato pela formação de sulfato ( $181,00 \pm 41,50 \text{ mg-SO}_4^{2-} \text{ L}^{-1}$ ).

**8.2 INTRODUÇÃO**

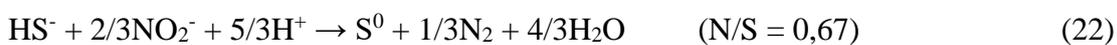
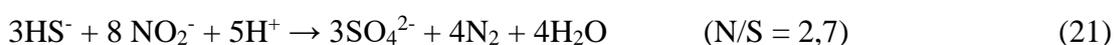
O processo de digestão anaeróbia é amplamente utilizado no tratamento de águas residuárias, permitindo a remoção da matéria orgânica via metanogênese e sulfetogênese, quando presentes compostos oxidados de enxofre, podendo assim, gerar metano, gás carbônico, hidrogênio e sulfeto de hidrogênio como produtos finais. Entretanto esse

processo não apresenta eficiência na remoção de compostos nitrogenados, o quais podem ser encontrados em águas residuárias dos mais diversos tipos de indústrias (ex. petróleo, têxtil, alimentícia e farmacêutica) (MACÊDO et al., 2019b), potencialmente removidos em unidades subsequentes por processos de nitrificação e desnitrificação.

A disponibilidade de doadores de elétrons para o processo de desnitrificação heterotrófica está associada à eficiência do processo de remoção de matéria orgânica na unidade anaeróbia, não sendo por vezes suficiente. O sulfeto de hidrogênio, que é gerado em uma proporção de (0,02 a 2,00%) em estações de tratamento de esgoto (LUISA et al., 2021) na digestão anaeróbia tem o potencial de incrementar a desnitrificação pela via autotrófica, além da possibilidade de gerar o enxofre elementar, subproduto com elevado valor agregado para a indústria química.

A união de diferentes processos auxilia para minimizar o impacto ambiental de águas residuárias no meio ambiente, além de gerarem potencialmente produtos atrativos para a biotecnologia. Um exemplo dessas águas pode ser a produzida em indústrias petroquímicas (ANDREIDES et al., 2021), ou mais conhecida como água produzida em plataformas de óleo e gás, que além elevada salinidade é rica em N e S.

A remoção de nitrogênio via desnitrificação autotrófica pode ocorrer a partir do H<sub>2</sub>S, presente na fração gasosa ou líquida, como doador de elétrons para a redução de nitrato, podendo o produto final variar de acordo com a relação molar de N/S (equações 19 a 22) (SOREANU et al., 2008).



A grande desvantagem em unir a desnitrificação autotrófica a efluente salinos é que ambos, sulfeto e salinidade, podem apresentar efeitos tóxicos aos microrganismos (CHEN et al., 2022a). Por exemplo, a salinidade pode ser tóxica aos microrganismos desnitrificantes em concentrações de 11,50 g-NaCl L<sup>-1</sup> (WANG et al., 2016), enquanto que concentrações de 76,5 mg- H<sub>2</sub>S L<sup>-1</sup> de sulfeto são relatadas como tóxicas (LIANG et al., 2020). Além disso, o nitrato em altas concentrações pode causar acúmulo de nitrito e álcalis que inibem a atividade microbiana do sistema (ALBINA et al., 2019).

SHEN et al. (2023) avaliaram o processo de desnitrificação autotrófica em água residuária sintética com salinidade até 5% (50 g L<sup>-1</sup>). Os autores observaram que até salinidade de 1,5% (15 g L<sup>-1</sup>) ocorreu efeito positivo na eficiência de acúmulo de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (85%). Quando a salinidade atingiu 5,0 %, a eficiência de acúmulo diminuiu para 80%. Os resultados indicaram que a salinidade não inibiu somente a conversão N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> → N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, mas também de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> → N<sub>2</sub>.

O objetivo desse trabalho foi avaliar o estabelecimento da desnitrificação autotrófica, bem como sua eficiência em diferentes concentrações de salinidade (0,00 a 15,6 g-NaCl L<sup>-1</sup>) utilizando reator anaeróbio de leito fixo vertical em uma razão de N/S 1,6, tendo como fonte de N o nitrato e de S o sulfeto de hidrogênio gasoso sintético.

### 8.3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 8.3.1 Design do reator

Um AnSTBR (5 cm de diâmetro x 50 cm de altura) em escala de bancada (volume de trabalho 0,81 L) preenchido com tiras de espuma de poliuretano (PU) como material de suporte foi usado como unidade operacional neste estudo. Um total de 8 tiras de PU foram dispostas verticalmente na região do leito. O reator foi colocado em uma câmara de temperatura controlada (modelo 410-DRE, Nova Ética, Vargem Grande Paulista, SP, Brasil) para manter as condições mesófilas (30°C). A alimentação do reator foi realizada em modo de fluxo ascendente usando uma bomba peristáltica (modelo MiniPuls® 3, Gilson, Inc., Middleton, WI, EUA) para obter um tempo de retenção hidráulica fixo (HRT) de 12 h.

#### 8.3.2 Inóculo

O inóculo utilizado como consórcio microbiano foi proveniente de um reator do tipo vertical de leito fixo operando por 505 dias em condições mesófilas (35 °C) para a desnitrificação autotrófica utilizando sulfeto, descrito por GUERRERO et al., (2020). O sistema encontrava-se com elevado desempenho (>89%) e adaptado à desnitrificação de sulfeto – N/S 0,55; Carga H<sub>2</sub>S: 29,1 g S-H<sub>2</sub>S m<sup>-3</sup>h<sup>-1</sup>.

### 8.3.3 Água residuária e condições operacionais

Foi utilizado como substrato efluente produzido em laboratório com os aspectos composicionais baseados principalmente no efluente do reator nitrificante de leito estruturado (AnSTBR) (capítulo 7) tratando um efluente de reator anaeróbio (capítulo 5) produzido em laboratório, a partir da composição de água produzida de óleo e gás sintética. A composição afluente foi: nitrato de sódio ( $425,00 \text{ mg L}^{-1}$ ), correspondendo a  $70 \text{ mg-N-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$ , bicarbonato de sódio ( $240 \text{ mg-NaHCO}_3 \text{ L}^{-1}$ ), suplementado com soluções de micro e macronutrientes adaptadas de TORRES (1992).

O reator foi operado continuamente por 100 dias com carga de nitrogênio de  $5,79 \text{ mg-N-NO}_3^- \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , com avaliação do efeito do aumento gradual da salinidade no processo dedesnitrificação – salinidade devido ao cloreto de sódio de 0 até  $15,6 \text{ g-NaCl L}^{-1}$  (fases I a V). A escolha da etapa final de salinidade em  $15,6 \text{ g-NaCl L}^{-1}$  decorreu dos melhores resultados apresentados nos sistemas de tratamento anteriores (sistema anaeróbio e nitrificante).

A razão N/S teórica adotada foi de 1,6, priorizando a formação de sulfato, como descrito na equação (1). As fases de operação e as respectivas condições são apresentadas na Tabela 8.1.

Tabela 8.1. Fases de operação de acordo com as diferentes salinidades devido ao cloreto de sódio, relação N/S e carga de sulfeto aplicado ao sistema desnitrificante.

Fase operacional	Período (d)	Cloreto de sódio ( $\text{g L}^{-1}$ )	Pressão osmótica (wt%)	Aumento de NaCl (%)	N/S	Carga de sulfeto ( $\text{g-S m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ )	Carga de nitrogênio ( $\text{g-N m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ )
I	0-48	0	0,10	-			
II	49-61	4,60	0,70	-			
III	62-74	6,90	1,00	50	1,6	8,30	5,79
IV	75-90	10,40	1,50	51			
V	91-100	15,90	2,15	53			

O gás sintético utilizado para a desnitrificação autotrófica foi o  $\text{H}_2\text{S}$  e obtido quimicamente pela reação entre NaCl (cloreto de sódio) e  $\text{Na}_2\text{S}$  (sulfato de sódio), (GUERRERO et al., 2020; RAMÍREZ et al., 2009). O gás de arraste utilizado foi o

nitrogênio com pureza superior a 90%, e vazão controlada por rotâmetro. A entrada de H<sub>2</sub>S teórica foi de 780 ppmv, resultando em uma vazão de N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>S de 0,06 L min<sup>-1</sup> e uma carga de sulfeto de 8,30 g-S m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup>.

### 8.3.4 Métodos analíticos

O monitoramento do desempenho da fase líquida foi baseado nos seguintes parâmetros: Concentrações de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, sulfeto (S<sup>2-</sup>), sulfeto total dissolvido (STD), nitrogênio nitrito (N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), nitrogênio nitrato (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (APHA/AWWA/WEF, 2012). Concentração de alcalinidade total, intermediária e parcial, bem como as concentrações totais de ácidos graxos voláteis foram determinados de acordo com Kapp (1984).

O sulfeto gasoso foi mensurado a partir de método colorimétrico indireto desenvolvido no LPB - EESC/USP (laboratório de processos biológicos), no qual a amostra gasosa do reator é transferida para um tubo à vácuo contendo solução de acetato de zinco, fixando o gás na forma de sulfeto de zinco (ZnS), e em seguida, adicionado solução de hidróxido de sódio com a finalidade de elevar o pH e promover a precipitação de ZnS. Em seguida realiza-se a análise de sulfeto descrita em APHA/AWWA/WEF (2012).

A especiação de sulfeto foi avaliada através das Eqs. (12), (13) e (14) (GIL-GARCIA et al., 2018). A temperatura (T) foi fixada em 30 °C (303,15 K), enquanto que a carga de sulfato foi calculada pelas equações (23 –26) e a de nitrogênio pelas equações (27), sendo V<sub>amostra</sub> o volume da amostra gasosa em µL; MM a massa molar do H<sub>2</sub>S (34,1 g mol<sup>-1</sup>); R a constante universal dos gases ideais, equivalente a 0,082 atm L mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>; P a pressão equivalente a 1 atm; e ppmv (partes por milhão em volume) equivalente a mL m<sup>-3</sup>; N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a concentração de nitrogênio na forma de nitrato (mg L<sup>-1</sup>); Q<sub>afluente</sub>, a vazão afluyente em L h<sup>-1</sup>; e V<sub>reator</sub>, o volume do reator em L. Q<sub>N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>S</sub> a vazão de arraste gás sulfídrico sintético (L h<sup>-1</sup>)

$$\text{H}_2\text{S} (\mu\text{mol L}^{-1}) = \frac{n (\text{mols})}{V_{\text{amostra}} \cdot 10^{-6}} \quad (23)$$

$$\text{H}_2\text{S} (\text{ppm}) = \text{H}_2\text{S} (\mu\text{mol L}^{-1}) \cdot \text{MM} \cdot 10^{-3} \quad (24)$$

$$\text{H}_2\text{S} (\text{ppmv}) = \frac{\text{H}_2\text{S} (\mu\text{mol L}^{-1}) \cdot R \cdot (273+T) \cdot 1000}{\text{MM}} \quad (25)$$

$$\text{Carga volumétrica de sulfeto} = \frac{\text{H}_2\text{S} (\text{ppmv}) \cdot Q_{\text{N}_2} \cdot P \cdot 32}{R \cdot T \cdot V_{\text{reator}}} \quad (26)$$

$$\text{Carga de nitrogênio} = \frac{[N-NO_3^-] \cdot Q_{\text{afluente}}}{V_{\text{reator}}} \quad (27)$$

### 8.3.5 Análises microbiológicas

Amostras do inóculo e de todas as fases com salinidade (0,00; 4,60; 6,90; 10,40; e 15,90 g-NaCl L<sup>-1</sup>) foram coletadas, lavadas com PBS e armazenados a 4 °C até processamento posterior. A extração total de DNA para sequenciamento de próxima geração (NGS) foi realizada usando o kit FASTDNA SPIN para solo (Qbiogene, Carlsbad, CA, EUA). A qualidade do DNA foi avaliada pela proporção de 260/280 nm N 1,8, medida por um espectrofotômetro ND-2000 (Nanodrop Inc., Wilmington, DE) e eletroforese em gel de agarose.

O sequenciamento paired-end de ciclos Illumina MiSeq 300 da região (~450 pb) de 16S rRNA foi realizada seguindo o protocolo do fabricante (Illumina Inc., EUA) pela NGS soluções genômicas (Piracicaba, Brasil), usando seu próprio pipeline considerando 1% de erro. As sequências resultantes (fastq) foram filtradas com qualidade em um Phred usando o software FastQC v.0.11.8 (ANDREWS, 2010). O recorte do primer foi realizado em Python v.3.6 com software inspirado no projeto BioPython (COCK et al., 2009) . As unidades taxonômicas operacionais (OTU) classificadas como quimeras foram removidas (SMYTH et al., 2010).

A identificação taxonômica foi realizada usando blastn v.2.6.0+(ALTSCHUL et al., 1990). As sequências identificadas pelo MiSeq Illumina foram depositadas no National Center for Biotechnology Information (NCBI - <https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/>).

## 8.3 RESULTADOS

### 8.3.1 Efeito da salinidade no processo de desnitrificação autotrófica

A salinidade no reator anóxico foi gradativamente aumentada de 0 até 15,6 g-NaCl L<sup>-1</sup>, caracterizando um efluente hipersalino. A relação N/S estabilizou-se depois dos primeiros 30 dias em afluente sem salinidade, com razão média de 1,65 ± 0,45, sendo 4,20 ± 0,80 g-N m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup> e 6,00 ± 1,00 g-S m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup>, o que favoreceu a desnitrificação autotrófica, observada pela formação de sulfato (reação 2).

A Tabela 8.2 apresenta um resumo das médias e desvio dos principais parâmetros nas diferentes fases avaliadas para esse sistema.

O pH afluente e efluente manteve-se estável durante os 100 dias de operação, sendo  $7,10 \pm 0,40$  e  $7,20 \pm 0,40$ , respectivamente. A alcalinidade total afluente foi de  $107,00 \pm 9,40$  mg-CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> sendo consumida pelo processo de desnitrificação em média de  $74,40 \pm 23,00$  mg-CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> (Figura 8.1).

A eficiência do processo de desnitrificação foi de  $63 \pm 12$  % de 0,00 a 6,90 g-NaCl L<sup>-1</sup> aumentando para  $86 \pm 16$  % na salinidade de 10,40 g-NaCl L<sup>-1</sup> e caindo para a menor eficiência de desnitrificação na salinidade de 15,60 g-NaCl L<sup>-1</sup> ( $40 \pm 7$  %). O responsável pela elevada variação da eficiência de desnitrificação nas etapas citadas acima foi o nitrito (N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), uma vez que as concentrações desse composto variaram de  $7,60 \pm 9,00$  mg- N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> L<sup>-1</sup> para 10,40 g-NaCl L<sup>-1</sup> a  $30,00 \pm 5,00$  mg- N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> L<sup>-1</sup> para 15,40 g-NaCl L<sup>-1</sup>. Para o nitrato (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) a variação foi de  $0,00 \pm 0,00$  mg- N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> L<sup>-1</sup> (10,40 g-NaCl L<sup>-1</sup>) para  $6,60 \pm 4,70$  mg- N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> L<sup>-1</sup> (15,40 g-NaCl L<sup>-1</sup>) – Figura 8.2.

O sulfato, subproduto do processo de desnitrificação autotrófica, acompanhou a variação do nitrato descrita anteriormente, logo, variou de  $186,70 \pm 33,00$  mg-SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (0,00 a 6,90 g-NaCl L<sup>-1</sup>), para  $208,00 \pm 49,50$  mg-SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (10,40 g-NaCl L<sup>-1</sup>) e  $136,00 \pm 28,00$  mg-SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (15,40 g-NaCl L<sup>-1</sup>).

Tabela 8.2. Resumo dos parâmetros analisados para cada fase e salinidade do AnSTBR  
- reator anóxico

Fase operacional		I	II	III	IV	V
NaCl (g L <sup>-1</sup> )		0,00	4,60	6,90	10,40	15,90
Período de tempo de operação (d)		48	12	15	15	10
TDH (h)		12	12	12	12	12
pH	Afluente	7,10 (0,50)	7,22 (0,15)	7,15 (0,15)	7,15 (0,10)	7,10 (0,20)
	Efluente	7,70 (0,60)	7,20 (0,30)	7,10 (0,30)	7,40 (0,10)	7,20 (0,15)
Carga de sulfeto (g-S m <sup>-3</sup> h <sup>-1</sup> )		2,50 (2,00)	6,70 (0,80)	6,60 (0,40)	6,20 (0,80)	5,00 (1,50)
Carga de nitrogênio (g-N m <sup>-3</sup> h <sup>-1</sup> )		4,50 (0,50)	5,10 (1,40)	4,00 (0,30)	4,00 (0,20)	4,50 (0,40)
N/S (razão molar)		8,10 (6,10)	1,70 (0,40)	1,40 (0,10)	1,30 (0,14)	2,20 (0,70)
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	Afluente	64,00 (6,70)	60,00 (1,50)	59,00 (2,50)	55,00 (1,60)	61,00 (1,50)
	Efluente	17,20 (20,00)	1,70 (1,20)	1,10 (1,40)	0,00 (0,00)	6,60 (4,70)
N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )		10,60 (10,90)	20,20 (4,50)	22,40 (6,30)	7,60 (9,00)	30,00 (5,00)
Eficiência de desnitrificação (%)		60,60 (32,00)	63,60 (8,00)	60,70 (11,40)	86,10 (16,40)	40,00 (7,00)
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )		205,30 (199,00)	196,00 (7,15)	203,30 (28,30)	208,00 (49,50)	136,00 (28,30)
HS <sup>-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )		86,40 (65,90)	115,50 (75,20)	114,00 (27,60)	171,70 (82,00)	47,50 (24,60)
H <sub>2</sub> S (mg L <sup>-1</sup> )		26,60 (34,00)	58,30 (35,60)	77,30 (40,40)	52,80 (28,20)	22,40 (15,80)
H <sub>2</sub> S (ppmv)	Afluente	406,00 (373,00)	1110,00 (129,00)	1031,00 (147,00)	1064,00 (138,00)	824,00 (253,00)
	Efluente	106,00 (108,00)	75,00 (4,00)	75,00 (17,00)	65,00 (45,00)	65,00 (7,00)
Consumo de H <sub>2</sub> S gasoso (%)		73,30 (19,00)	93,00 (0,60)	93,00 (2,00)	94,00 (0,60)	92,00 (2,00)

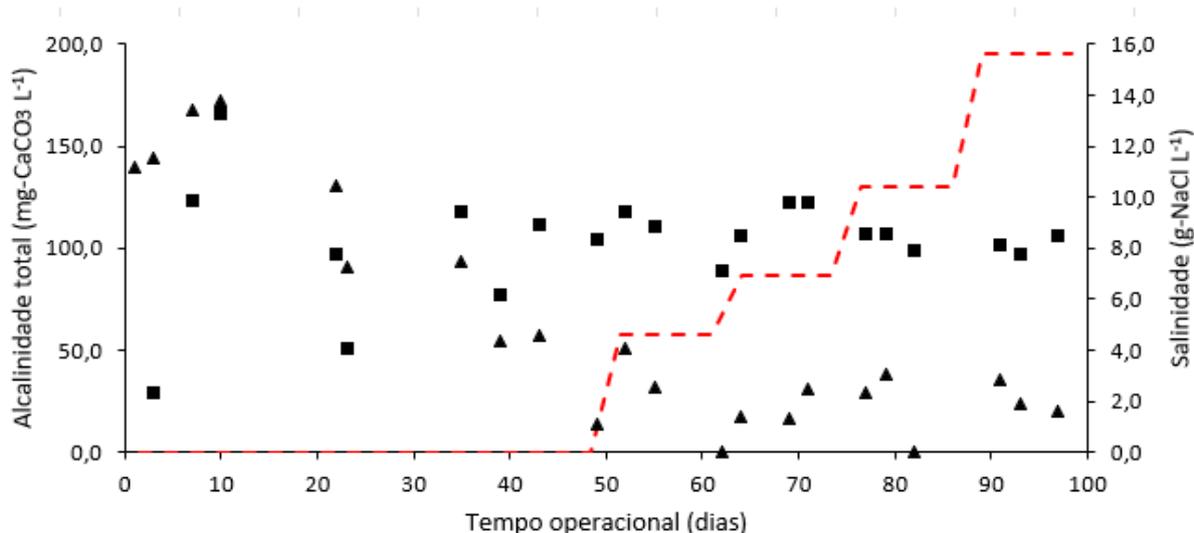


Figura 8.1. Variação da alcalinidade afluente (■) e efluente (▲) para as diferentes concentrações de salinidade ( - - ).

Em suma, o aumento da salinidade acima de 10,40 g-NaCl L<sup>-1</sup> teve impacto direto na conversão de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, se mostrando mais sensível a salinidade do que a conversão de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Os resultados de concentração de sulfato demonstram uma menor interferência da salinidade na conversão do nitrato, devido à pequena variação de sua concentração, uma vez que a estequiometria de conversão de nitrato a nitrogênio gasoso gera 5 mols de sulfato a partir de 8 mol de nitrato (reação 2). Resultado similar foi obtido por SHEN et al. (2023), sendo que em concentração de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> entre 100 e 135 mg L<sup>-1</sup> e salinidades acima de 2,5% (25 g-CaCl<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>) devido ao cloreto de cálcio observaram acúmulo de nitrito, indicando maior sensibilidade na conversão de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> a N<sub>2</sub>. Além disso, XU et al., (2020) observaram que aumento na salinidade em concentração acima de 5g L<sup>-1</sup> acarretou em queda na enzima nitrito redutase (EC 1.7.2.1) e óxido nitroso redutase (EC 1.7.2.4).

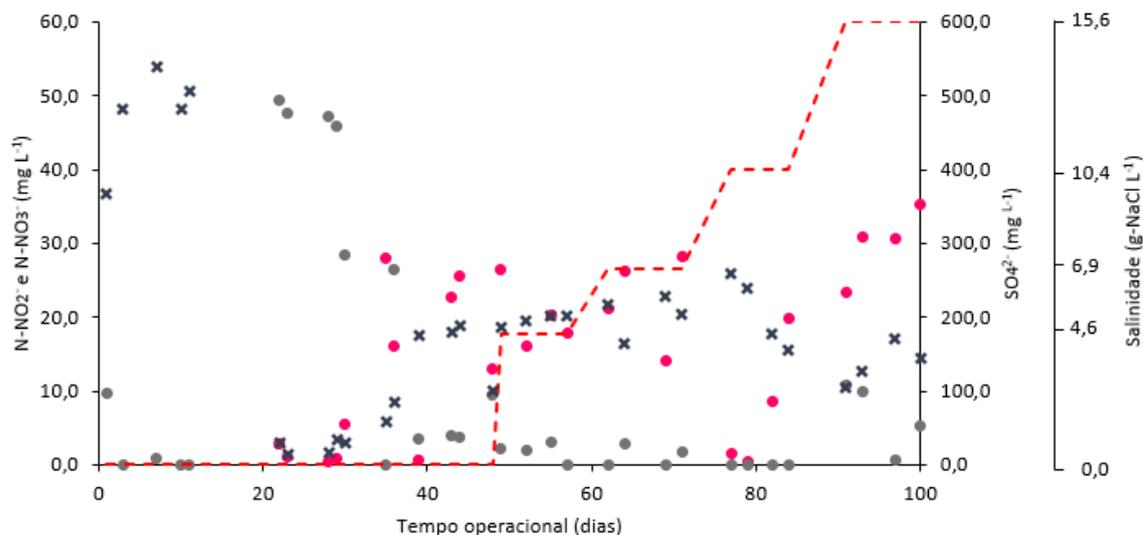


Figura 8.2. Variação da concentração de Nitrito, nitrato e sulfato no efluente nas diferentes concentrações de salinidade devido ao NaCl. Legenda: ( ● ) Nitrito efluente –  $\text{N-NO}_2^-$ , ( ● ) Nitrato efluente –  $\text{N-NO}_3^-$ , ( x ) Sulfato efluente, ( - - ) salinidade.

A concentração volumétrica de sulfeto de hidrogênio (Figura 8.4) ficou instável nos 30 primeiros dias devido a ajustes na vazão do mesmo. Porém, após esse período estabilizou-se com média de  $1000,2 \pm 175,00$  ppmv, representando média de  $10 \pm 2\%$  de  $\text{H}_2\text{S}$  no afluente, e no efluente de  $73,00 \pm 15,00$  ppmv, correspondendo a  $1 \pm 0\%$  de  $\text{H}_2\text{S}$ . Com isso, a eficiência de consumo de  $\text{H}_2\text{S}$  para a desnitrificação autotrófica foi de  $93 \pm 2\%$ . Eficiências de remoção de  $\text{H}_2\text{S}$  entre 98,3 e 99,7% foram obtidas em reatores do tipo biofiltro com  $\text{H}_2\text{S}$  no biogás variando de 100 a 2000ppmv (JUNTRANAPAPORN et al., 2019).

A Figura 8.3 apresenta o balanço de massa para os compostos nitrogenados de acordo com a salinidade. Nos primeiros 30 dias o sistema estava em fase de estabilização, entretanto, após esse período nota-se maior acúmulo de nitrito, com média de  $31 \pm 12\%$ , e maior composição de nitrogênio gasoso ( $\text{N}_2$ ) – obtido pelo balanço de massa – média de  $60 \pm 14\%$  até a salinidade de  $6,90 \text{ g-NaCl L}^{-1}$ . Para a salinidade de  $15,60 \text{ g-NaCl L}^{-1}$ , acompanhando a eficiência de desnitrificação, o  $\text{N}_2$  aumentou para  $86 \pm 16\%$ . E ao atingir a concentração de  $15,60 \text{ g-NaCl L}^{-1}$ , a proporção variou de  $49 \pm 8\%$  -  $\text{N-NO}_2^-$ ,  $11 \pm 8\%$  -  $\text{N-NO}_3^-$ , e  $40 \pm 7\%$  -  $\text{N}_2$ .

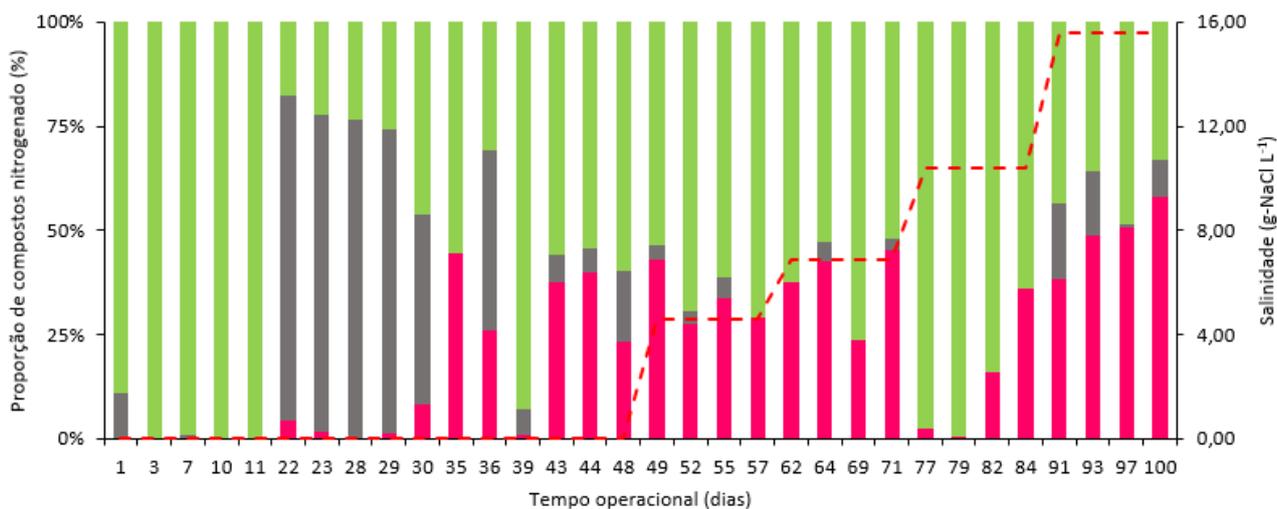


Figura 8.3. Variação da fração de nitrogênio para os diferentes níveis de salinidade e oxigênio dissolvido. Legenda: (■)  $\text{N-NO}_2^-$ ; (■)  $\text{N-NO}_3^-$ ; (■)  $\text{N}_2$ .

O elevado consumo do  $\text{H}_2\text{S}$  é mais um indicativo de que a salinidade afetou a conversão de  $\text{N-NO}_2^-$ , pois a utilização de  $\text{H}_2\text{S}$  manteve-se alta, e pela estequiometria, a conversão de nitrato consome mais sulfeto do que o nitrito, por isso mesmo com o acúmulo de  $\text{N-NO}_2^-$ , a eficiência de remoção de  $\text{H}_2\text{S}$  manteve-se elevada.

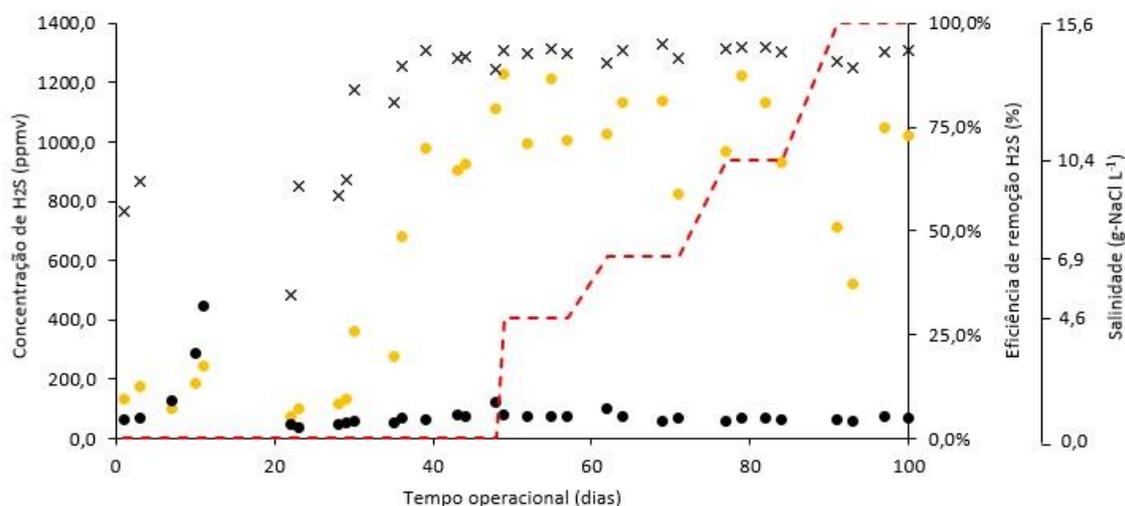


Figura 8.4. Concentração de  $\text{H}_2\text{S}$  em ppmv e eficiência de remoção de  $\text{H}_2\text{S}$  consumido pela desnitrificação para diferentes concentrações de salinidade. Legenda: (●)  $\text{H}_2\text{S}$  afluente; (●)  $\text{H}_2\text{S}$  efluente; (x) Eficiência de remoção de  $\text{H}_2\text{S}$  (%); e (- -) salinidade devido ao cloreto de sódio.

CHEN et al., (2022a) avaliaram em análise fatorial o efeito combinado da toxicidade da salinidade no processo de desnitrificação e de remoção de enxofre, obtendo que a toxicidade combinada da salinidade na remoção de nitrogênio e remoção de enxofre

do processo se manifestaram como efeito antagônicos. Ao comparar a eficiência da remoção de sulfeto e nitrato, a do nitrato foi mais sensível ao aumento da salinidade.

### 8.3.2 Biologia molecular

Análises filogenéticas dos domínios Bactéria e Archaea foram realizadas para caracterizar a comunidade microbiana do inóculo (amostra 1), biomassa aderida na ausência de salinidade (amostra 2), biomassa aderida para salinidade de 4,60 g-NaCl L<sup>-1</sup> (amostra 3), biomassa aderida para 6,90 g-NaCl L<sup>-1</sup> (amostra 4), biomassa aderida para 10,40 g-NaCl L<sup>-1</sup> (amostra 5) e biomassa aderida para 15,90 g-NaCl L<sup>-1</sup> (amostra 6). No nível de domínio, em média de 98% das leituras foram atribuídas a Bactéria, enquanto que os outros 2% foram atribuídos as Archaea. Uma análise do gráfico de barras da abundância da comunidade no nível de gênero (valores relativos à abundância superior a 1% em pelo menos uma amostra) é apresentada na Figura 8.5.

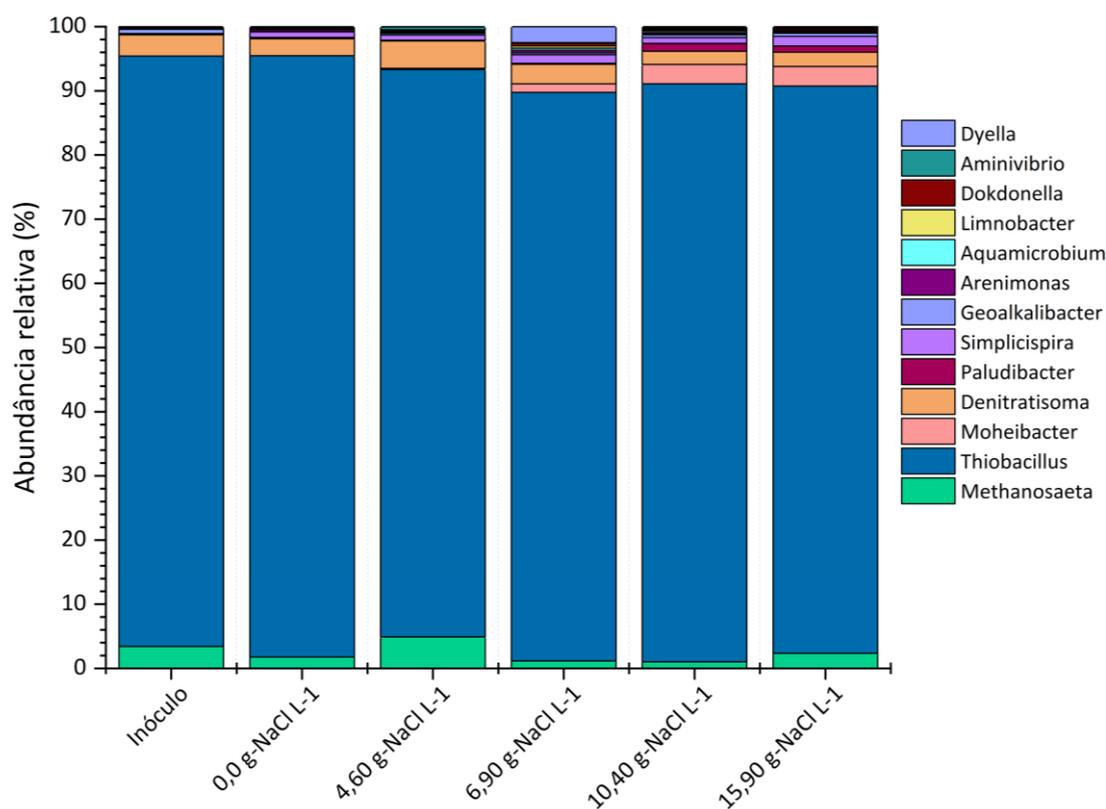


Figura 8.5 Gêneros mais abundantes detectados em amostras de biomassa aderida com base em sequências classificadas do gene 16s rRNA em diferentes fases do reator anóxico com salinidades variando de 0,00 a 15,90 g-NaCl L<sup>-1</sup>

O gênero predominante em todas as fases do reator anóxico, inclusive no inóculo, foi o *Thiobacillus* (média de  $86 \pm 2\%$ ). Esse gênero foi isolado de amostras em condições anaeróbias na presença de tiosulfato, utilizando essa forma de enxofre como fonte de energia e o nitrato como fonte de nitrogênio e acceptor de elétrons (CLAUS; KUTZNER, 1985). Esse microrganismo se desenvolve em condições de pH entre 7,5 e 8,00, porém sua atividade desnitrificante é inibida em sulfato superior a  $5 \text{ g L}^{-1}$  e nitrito acima de  $0,2 \text{ g L}^{-1}$  (CLAUS; KUTZNER, 1985). A ausência de concentrações de sulfato e nitrito inibitórias, atreladas as condições ideais de pH, fonte de energia (sulfeto de hidrogênio) e nitrato reportadas nessa tese auxiliaram na elevada abundância relativa durante toda operação do sistema. Além das condições ideais, outra vantagem do gênero *Thiobacillus* que proporcionou sua elevada abundância para as diversas salinidade estudadas é sua capacidade de se proteger de elevadas salinidades devido a um gene tolerante ao sal (WANG et al., 2018).

O gênero *Methanosaeta* foi observado nas seis amostras, porém em abundância relativa inferior a 5%, sendo sua maior abundância relativa de 4,6% na salinidade de  $4,60 \text{ g-NaCl}^{-1}$ . Apesar da abundância relativa desse gênero nas amostras, não foi encontrada na literatura ligação entre *Methanosaeta* e o processo de desnitrificação autotrófica, uma vez que esse microrganismo é estrito anaeróbio e utiliza ácido acético como fonte de energia, resultando na geração de metano e gás carbônico (PATEL; SPROTT, 1990).

Em relação a metabolismo oxidativo de nitrato, o gênero *Denitratisoma* apresentou abundância relativa média de  $2,8 \pm 1\%$  para todas as fases, inclusive no inóculo não adaptado a salinidade. Esse gênero é descrito pela literatura como desnitrificante endógeno responsável pela biotransformação do nitrito (WANG et al., 2019), estando envolvida em processos como nitrificação parcial pela via curta, desnitrificação e anammox (LIU et al., 2023).

O gênero *Moheibacter* apresentou maior abundância relativa em  $6,90 \text{ g-NaCl L}^{-1}$  (2,9%), mantendo-se em 2,0% e 2,2% para as concentrações de salinidade de 10,40 e  $15,90 \text{ g-NaCl L}^{-1}$ . O *Moheibacter sediminis* apresentou crescimento em faixas de salinidade de 0 a  $30 \text{ g-NaCl L}^{-1}$ , com crescimento ótimo entre 0 e  $5 \text{ g-NaCl L}^{-1}$  (ZHANG et al., 2014), enquanto o *Moheibacter lacus* apresentou crescimento na presença de  $10 \text{ g-NaCl L}^{-1}$  (LIU et al., 2021), corroborando com o aumento da abundância relativa em concentrações acima de  $6,90 \text{ g-NaCl L}^{-1}$  nesse estudo. Ressalta-se que esse gênero também foi encontrado nas amostras do sistema aeróbio – capítulo 7.

De forma geral, observa-se que ao inserir a salinidade, a composição microbiológica do reator não sofreu grandes alterações em relação a composição microbiológica e abundância relativa.

## 8.4 CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que a remoção de nitrato utilizando sulfeto como doador de elétrons é possível de ocorrer em salinidade variando de 0,00 a 15,6 g- NaCl L<sup>-1</sup>.

A desnitrificação teve eficiência média geral de 63%, entretanto o melhor desempenho (86%) foi observado na salinidade de 10,4 g-NaCl L<sup>-1</sup>. Em concentrações mais elevadas de salinidade, observou-se o acúmulo de nitrito no sistema, indicando possível efeito deletério associado à salinidade. Apesar do acúmulo de nitrito, a remoção de H<sub>2</sub>S manteve-se elevada (>90%), mostrando que a conversão de nitrato a nitrito não foi afetada pela salinidade, corroborando com a estabilidade da abundância relativa dos microrganismos no sistema, com predominância do gênero *Thiobacillus*.

## 9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

### 9.1 CONCLUSÕES

Baseando-se nos objetivos propostos e resultados obtidos, as principais conclusões desse trabalho são:

- Os ensaios em batelada para avaliar o efeito da salinidade em diferentes concentrações em lodo não adaptado permitiram observar que até salinidade de 10,4 g-NaCl L<sup>-1</sup> a remoção de matéria orgânica foi elevada (média de 88%), sendo predominante a via metanogênese (70%). Acima dessa concentração de salinidade, o impacto no inóculo não halofílico acarretou na instabilidade do sistema, gerando acúmulo de ácidos e queda no pH. Para a aplicação de concentrações superiores a 15,6 g-NaCl L<sup>-1</sup>, os resultados permitiram concluir que as BRS foram as primeiras afetadas pela salinidade, desequilibrando o sistema, e levando ao acúmulo de ácidos. As arqueias metanogênicas tiveram seu metabolismo afetado pela salinidade, apresentando baixa velocidade de produção de metano, não sendo capaz de suprir a demanda de consumo de ácidos.
- Para os ensaios em reator anaeróbio de alimentação contínua, a adaptação lenta e gradual por 580 dias conduziu a resposta diferente da obtida nos ensaios de batelada, em que a salinidade foi aplicada diretamente no inóculo não halofílico, sem adaptação. Os resultados permitiram avaliar que a salinidade até 23,4 g-NaCl L<sup>-1</sup> não afetou os microrganismos metanogênicos e sulfetogênicos, entretanto ao ser aplicada salinidade de 35 g-NaCl L<sup>-1</sup>, o acúmulo de ácidos ocorreu, mas de forma mais branda do que nos ensaios em batelada, além do mais, os primeiros organismos afetados foram as arqueias metanogênicas, sendo as BRS menos sensíveis. Uma possível explicação a isso é que enquanto para os ensaios de batelada os grupos de microrganismos predominantes foram as *Methanosaeta*, *Methanoregula* e *Sulfiricuvum*, no reator contínuo foram os *Desulfovibrio*, *Methanosaets* e *Pseudomonas*.
- No ensaio de nitrificação e desnitrificação simultâneas utilizando o residual de matéria orgânica resultante do reator contínuo anaeróbio foi possível verificar que sistemas adicionais para finalizar a remoção de nitrogênio se fazem necessário, uma vez que a matéria orgânica disponível não foi suficiente para conversão do

nitrito. Além do mais, concentrações de salinidade até 23,4 g-NaCl L<sup>-1</sup> não afetaram o sistema, mantendo equilíbrio entre bactérias oxidadoras de amônia e nitrito. Porém, em concentrações acima de 35 g-NaCl L<sup>-1</sup> foi possível observar o início do acúmulo de nitrito, o qual mostrou-se deletério aos microrganismos. A variação do oxigênio dissolvido permitiu inferir que a perda de eficiência na oxidação do N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> não ocorreu devido à limitação de oxigênio, mas devido à salinidade, a qual afetou as BOA, gerando menor conversão de amônia, levando ao acúmulo de amônia livre, o que conseqüentemente levou a efeitos deletérios para as BON.

- Fazendo-se uso das concentrações de nitrato acumulado na fase de avaliação do sistema NDS, e simulando o sulfeto de hidrogênio gerado no reator anaeróbio avaliou-se o sistema de desnitrificação autotrófica para diferentes salinidades e com inóculo não halofílico. Foi possível verificar a viabilidade desse processo em salinidade de até 15,60 g-NaCl L<sup>-1</sup>, sendo observado em concentrações maiores de 10,4 g-NaCl L<sup>-1</sup> o acúmulo de nitrito, assim como no sistema anterior, indicando possível toxicidade da salinidade aos microrganismos responsáveis por essa conversão.

Para todos os sistemas avaliados observou-se que a salinidade esteve associada a efeitos deletérios aos microrganismos em diferentes concentrações para cada um dos sistemas, sempre acarretando ao acúmulo de um outro subproduto tão tóxico quanto a salinidade, como por exemplo, sulfeto, nitrito e amônia livre.

De maneira geral, observando os sistemas como um todo, respeita-se a etapa mais limitante, que no caso dos reatores contínuo foi o processo de desnitrificação autotrófica, na salinidade de 15,60 g-NaCl L<sup>-1</sup>. Por isso, ao realizar tratamento de águas residuárias produzidas em plataformas de óleo e gás deve-se se ponderar as salinidades aplicadas quando utilizados inóculos não halofílicos para que os mesmos não se tornem limitantes para elevadas eficiências dos processos.

A partir do exposto e dos resultados obtidos são apresentadas as respostas às sub-hipóteses formuladas nas etapas iniciais desse projeto:

- **Sub-hipótese 1 - As BRS e arqueias metanogênicas oriundas de ambientes não halofílicos competem pelo substrato na digestão anaeróbia, sendo as BRS mais resistentes à salinidade em intervalo de salinidade sem adaptação aos**

**sais:** tendo em vista os resultados obtidos nos ensaios anaeróbios em batelada e contínuo observa-se que a adaptação lenta e gradual torna as BRS mais resistentes às elevadas salinidades impostas de maneira crescente, entretanto quando salinidades elevadas são adicionadas sem a adaptação correta dos microrganismos, os primeiros a serem sensibilizados pela salinidade são as BRS, sendo essa hipótese **parcialmente atendida**;

- **Sub-hipótese 2 - O desempenho das BRS e AM não halofílicas são influenciados por fatores ambientais como a relação DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> e a salinidade, entretanto a resposta metabólica desses microrganismos difere em ambientes com concentrações elevadas de salinidade:** de fato essa hipótese foi **atendida**, a resposta metabólica desses microrganismos difere em concentrações de elevada salinidade e além disso, a forma como é imposta a adaptação aos microrganismos também pode afetar a forma como cada grupo de microrganismos se sobressai nos sistemas metanogênicos e sulfetogênicos, visto que, em aumento gradual as BRS se sobressaem e sem adaptação à salinidade as arqueias metanogênicas foram mais resilientes;
- **Sub-hipótese 3 - Águas residuárias ricas em nitrogênio são passíveis de tratamento com base na nitrificação e desnitrificação simultâneas, entretanto efluentes de pós tratamento de reatores anaeróbios possuem baixa concentração de matéria orgânica, limitando o processo de desnitrificação. Na presença de salinidade, que promove baixa difusão de OD e inóculo nitrificante não halofílico, a eficiência do sistema fica mais impactada negativamente:** Neste caso, a avaliação do oxigênio dissolvido não demonstrou afetar a perda de eficiência na oxidação do N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, mas sim a salinidade causou toxicidade os organismos nitrificantes, por isso a hipótese **não foi atendida**.
- **Sub-hipótese 4 - Devido à baixa concentração de matéria orgânica em efluente de pós tratamento anaeróbio, a desnitrificação heterotrófica é limitada, assim utilizar o gás sulfídrico, que também é um sub-porduto da digestão anaeróbia da água residuária em questão, para a desnitrificação autotrófica apresenta potencial. Entretanto, efluentes salinos podem interferir na transferência desse gás para o líquido, limitando a eficiência do processo, e até mesmo gerando toxicidade para os microrganismos:** as elevadas eficiências de desnitrificação e remoção de sulfeto do meio demonstraram que a transferência de gás para o líquido nas concentrações de

salinidades avaliadas não é o problema, mas sim a efeitos deletérios da salinidade aos microrganismos desnitrificantes. Por isso essa hipótese foi **parcialmente atendida**.

## 9.2 RECOMENDAÇÕES PARA PESQUISAS FUTURAS

Algumas recomendações e sugestões são propostas para futuros trabalhos envolvendo sistemas combinados anaeróbios/aeróbios/anóxicos em elevadas salinidades:

- Avaliar a resposta das BRS e arqueias metanogênicas em ensaios de semi-contínuos anaeróbios, com o incremento gradual de salinidade;
- Investigar o efeito da salinidade devido à combinação de diferentes sais para os sistemas anaeróbios/aeróbios/anóxicos;
- Promover a desnitrificação autotrófica pelo sulfeto diretamente do sistema anaeróbio por meio de stripping do gás;
- Avaliar o efeito da salinidade e obter parâmetros cinéticos para sistemas aeróbios (NDS) e anóxicos (desnitrificação autotrófica) sem a adaptação gradual da salinidade;
- Investigar diferentes razões N/S no sistema desnitrificante para privilegiar a via de formação de enxofre elementar;
- Investigar o comportamento dos sistemas na combinação salinidade e compostos aromáticos, como BTEX, que também são encontrados nas águas produzidas em plataformas de óleo e gás.

## CAPÍTULO 10

**10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABOU-ELELA, S. I.; KAMEL, M. M.; FAWZY, M. E. Biological treatment of saline wastewater using a salt-tolerant microorganism. **Desalination**, v. 250, n. 1, p. 1–5, 1 jan. 2010.

ADORNO, M. A. T.; HIRASAWA, J. S.; VARESCHE, M. B. A. Development and Validation of Two Methods to Quantify Volatile Acids (C2-C6) by GC/FID: Headspace (Automatic and Manual) and Liquid-Liquid Extraction (LLE). **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 05, n. 07, p. 406–414, 6 maio 2014.

ÆSØY, A.; ØDEGAARD, H.; BENTZEN, G. The effect of sulphide and organic matter on the nitrification activity in a biofilm process. **Water Science and Technology**, v. 37, n. 1, p. 115–122, 1998.

AHMADUN, F. et al. Review of technologies for oil and gas produced water treatment. **Journal of Hazardous**, v. 170, p. 530–551, 2009.

ALBINA, P. et al. Influence of hydrogen electron donor, alkaline pH, and high nitrate concentrations on microbial denitrification: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 20, 2 out. 2019.

ALMEIDA, R. G. B. DE et al. Nitrogen removal by simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification (SNAD) in a structured-bed reactor treating animal feed processing wastewater: Inhibitory effects and bacterial community. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 133, n. June, p. 108–115, 2018.

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, 1990.

ANDREIDES, D. et al. Performance evaluation of sulfide-based autotrophic denitrification for petrochemical industry wastewater. **Journal of Water Process Engineering**, v. 40, 1 abr. 2021.

ANDREWS, S. **FastQC - A quality control tool for high throughput sequence data.** <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. [s.l: s.n.].

ANWAR, N. et al. Effect of sodium salt on anaerobic digestion of kitchen waste. **Water Science and Technology**, v. 73, n. 8, p. 1865–1871, 2016.

APHA/AWWA/WEF. **Standard Methods for Examination of Water and Wastewater**. 22. ed. Washington, DC, USA.: American Public Health Association/ American Water Works Association/ Water Environmental Federation, 2012.

AQUINO, S.; FUESS, L. T.; PIRES, E. C. Media arrangement impacts cell growth in anaerobic fixed-bed reactors treating sugarcane vinasse: Structured vs. randomic biomass immobilization. **Bioresource Technology**, v. 235, p. 219–228, 2017.

ARTHUR, J. D.; LANGHUS, B. G.; PATEL, C. **Technical Summary of Oil and Gas Produced Water Treatment Technologies**. Disponível em: <<http://www.all-llc.com/publicdownloads/ALLConsulting-WaterTreatmentOptionsReport.pdf>>.

BALK, M. et al. *Desulfatirhabdium butyrativorans* gen. nov., sp. nov., a butyrate-oxidizing, sulfate-reducing bacterium isolated from an anaerobic bioreactor. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 110–115, 2008.

BARBARO, J. R. et al. Biotransformation of BTEX under anaerobic denitrifying conditions: field and laboratory observations. **J. Contam. Hydrol.**, v. 11, p. 245–272, 1992.

BASSIN, J. P.; DEZOTTI, M.; SANT'ANNA, G. L. Nitrification of industrial and domestic saline wastewaters in moving bed biofilm reactor and sequencing batch reactor. **Journal of Hazardous Materials**, v. 185, n. 1, p. 242–248, 2011.

BECARI, M. et al. Inhibition effects on nitrification by typical compounds in coke plant wastewaters. **Environmental technology**, v. 1, p. 245–252, 1980.

BERISTAIN-CARDOSO, R. et al. Sulfide oxidation under chemolithoautotrophic denitrifying conditions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 95, n. 6, p. 1148–1157, 2006.

BRANDT, K. K. et al. Sulfate reduction dynamics and enumeration of sulfate-reducing bacteria in hypersaline sediments of the Great Salt Lake (Utah, USA). **Microbial Ecology**, v. 41, n. 1, p. 1–11, 2001.

BRÄUER, S. L. et al. Methanoregula boonei gen. nov., sp. nov., an acidiphilic methanogen isolated from an acidic peat bog. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 45–52, jan. 2011.

CALLADO, N.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; FORESTI, E. Resilience of methanogenesis in an anaerobic reactor subjected to increasing sulfate and sodium concentrations. **Journal of Water Process Engineering**, v. 7, p. 203–209, 2015.

CAMARGO, E. F. M. et al. Treatment of low-strength wastewater using immobilized biomass in a sequencing batch external loop reactor: Influence of the medium superficial velocity on the stability and performance. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, n. 3, p. 267–275, 2002.

CAMILOTI, P. R. et al. Innovative anaerobic bioreactor with fixed-structured bed ( ABFSB ) for simultaneous sulfate reduction and organic matter removal. **j chemical technology biotechnology**, v. 89, n. 2014, p. 1044–1050, 2014a.

CAMILOTI, P. R. et al. Innovative anaerobic bioreactor with fixed-structured bed (ABFSB) for simultaneous sulfate reduction and organic matter removal. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 89, n. 7, p. 1044–1050, 4 jul. 2014b.

CAMPOS, J. C. et al. Oilfield wastewater treatment by combined microfiltration and biological processes. v. 36, p. 95–104, 2002a.

CAMPOS, J. C.; NOBREGA, R.; ASANT'ANNA JR., G. L. TRATAMENTO DE ÁGUA DE PRODUÇÃO DE PETRÓLEO EM REATOR BIOLÓGICO DO TIPO " AIR-LIFT ". **21º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**, n. 1, p. 10, 1999.

CAMPOS, J. L. et al. Nitrification in saline wastewater with high ammonia concentration in an activated sludge unit. **Water research**, v. 36, n. 10, p. 2555–60, 2002b.

CARNEIRO, R. B. et al. Two-phase (acidogenic-methanogenic) anaerobic fixed bed biofilm reactor enhances the biological domestic sewage treatment: Perspectives for recovering bioenergy and value-added by-products. **Journal of Environmental Management**, v. 317, 1 set. 2022.

CELIS-GARCÍA, L. B.; GONZÁLEZ-BLANCO, G.; MERAZ, M. Removal of sulfur inorganic compounds by a biofilm of sulfate reducing and sulfide oxidizing bacteria in a

down-flow fluidized bed reactor. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 83, n. 3, p. 260–268, mar. 2008.

CHAN, Y. J. et al. A review on anaerobic-aerobic treatment of industrial and municipal wastewater. **Chemical Engineering Journal**, v. 155, n. 1–2, p. 1–18, 2009.

CHEN, B. et al. Response of simultaneous sulfide and nitrate removal process on acute toxicity of substrate concentration and salinity: Single toxicity and combined toxicity. **Science of the Total Environment**, v. 836, 25 ago. 2022a.

CHEN, H. et al. Swine wastewater treatment using combined up-flow anaerobic sludge blanket and anaerobic membrane bioreactor: Performance and microbial community diversity. **Bioresource Technology**, v. 373, 1 abr. 2023.

CHEN, L. et al. Effects of salinity on the biological performance of anaerobic membrane bioreactor. **Journal of Environmental Management**, v. 238, n. January, p. 263–273, 2019a.

CHEN, P. et al. Characterization of a novel salt-tolerant strain *Sphingopyxis* sp. CY-10 capable of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. **Bioresource Technology**, v. 358, 1 ago. 2022b.

CHEN, S. et al. Linkages of Firmicutes and Bacteroidetes populations to methanogenic process performance. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 6, p. 771–781, 1 jun. 2016.

CHEN, S.; HE, Q. Persistence of *Methanosaeta* populations in anaerobic digestion during process instability. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 8, p. 1129–1137, 2015.

CHEN, W. et al. Deciphering the mechanism of medium size anammox granular sludge driving better nitrogen removal performance. **Bioresource Technology**, v. 336, 1 set. 2021.

CHEN, X. et al. Salt inhibition on partial nitrification performance of ammonium-rich saline wastewater in the zeolite biological aerated filter. **Bioresource Technology**, v. 280, n. January, p. 287–294, 2019b.

CHEN, Y.; CHENG, J. J.; CREAMER, K. S. Inhibition of anaerobic digestion process : A review. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4044–4064, 2008.

CHOI, A. et al. Shifts in benthic bacterial communities associated with farming stages and a microbiological proxy for assessing sulfidic sediment conditions at fish farms. **Marine Pollution Bulletin**, v. 178, 1 maio 2022.

CHOI, E.; RIM, J. M. Competition and Inhibition of Sulfate Reducers and Methane Producers in Anaerobic Treatment. **Water Science and Technology**, v. 23, n. 7–9, p. 1259–1264, 1 abr. 1991.

CHUNG, J. et al. Comparison of Influence of Free Ammonia and Dissolved Oxygen on Nitrite Accumulation Between Suspended and Attached Cells. **Environmental Technology**, v. 26, n. 1, p. 21–33, 2005.

CIUDAD, G. et al. Differential kinetics of ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria: A simple kinetic study based on oxygen affinity and proton release during nitrification. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 8, p. 1764–1772, ago. 2006.

CLAUS, G.; KUTZNER, H. J. Physiology and kinetics of autotrophic denitrification by *Thiobacillus denitrificans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 283–288, ago. 1985.

COCK, P. J. A. et al. Biopython: Freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. **Bioinformatics**, 2009.

CORSINO, S. F. et al. Cultivation of granular sludge with hypersaline oily wastewater. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 105, p. 192–202, 2015.

COSTA, A. M. **Avaliação da influência da salinidade na nitrificação**. Rio de Janeiro: Universidade federal do Rio de Janeiro, ago. 2014.

CUNHA, M. P. et al. Sulfidogenesis establishment under increasing metal and nutrient concentrations: An effective approach for biotreating sulfate-rich wastewaters using an innovative structured-bed reactor (AnSTBR). **Bioresource Technology Reports**, v. 11, n. May, p. 100458, 2020.

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

DE BELLO SOLCIA GUERRERO, R. et al. Comparison between two different fixed-bed reactor configurations for nitrogen removal coupled to biogas biodesulfurization. **Biochemical Engineering Journal**, v. 162, 15 out. 2020.

DE GODOI, L. A. G. et al. Evaluating and Refining Alkalinity Calculations Due to Sulfide and Bicarbonate Accessed by Titration in Anaerobic Sulfate-Reducing Bioreactors. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 228, n. 9, p. 322, 2017.

DE NARDI, I. R. et al. Anaerobic packed-bed reactor for bioremediation of gasoline-contaminated aquifers. **Process Biochem**, v. 40, p. 587–592, 2005.

DELFORNO, T. P. et al. Anaerobic reactor applied to laundry wastewater treatment: Unveiling the microbial community by gene and genome-centric approaches. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 149, n. January, p. 104916, 2020.

DENARIAZ, G.; PAYNE, W. J.; LE GALL, J. A **Halophilic Denitrifier, *Bacillus halodenitricans* sp. nov.** INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. [s.l.: s.n.].

DIMROTH, P.; THOMER, A. A primary respiratory Na<sup>+</sup> pump of an anaerobic bacterium: the Na<sup>+</sup>-dependent NADH: quinone oxidoreductase of *Klebsiella pneumoniae*. **Archives of Microbiology**, v. 151, p. 439–444, 1989.

DINÇER, A. R.; KARGI, F. Salt inhibition of nitrification and denitrification in saline wastewater. **Environmental Technology**, v. 20, n. 11, p. 1147–1153, 1999.

DOĞAN, E. C. et al. Simultaneous sulfide and nitrite removal from industrial wastewaters under denitrifying conditions. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 17, n. 3, p. 661–668, 2012.

DUAN, Y. et al. Biochar regulates bacterial-fungal diversity and associated enzymatic activity during sheep manure composting. **Bioresource Technology**, v. 346, 1 fev. 2022.

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

FAN, Q. et al. Anaerobic digestion of wood vinegar wastewater using domesticated sludge: Focusing on the relationship between organic degradation and microbial

communities (archaea, bacteria, and fungi). **Bioresource Technology**, v. 347, 1 mar. 2022a.

FAN, Q. et al. Microbial community evolution, interaction, and functional genes prediction during anaerobic digestion in the presence of refractory organics. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 10, n. 3, 1 jun. 2022b.

FENG, W. et al. Community analysis of ammonia and nitrite oxidizers in start-up of aerobic granular sludge reactor. **Journal of Environmental Sciences**, v. 19, p. 996–1002, 2007.

FIRMINO, P. I. M. et al. Engineering and microbiological aspects of BTEX removal in bioreactors under sulfate-reducing conditions. **Chemical Engineering Journal**, v. 260, n. November 2014, p. 503–512, 2015.

FLIEDER, M. et al. Novel taxa of Acidobacteriota implicated in seafloor sulfur cycling. **ISME Journal**, v. 15, n. 11, p. 3159–3180, 1 nov. 2021.

FORESTI, E.; ZAIAT, M.; VALLERO, M. Anaerobic processes as the core technology for sustainable domestic wastewater treatment: consolidated applications, new trends, perspectives and challenges. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 5, p. 3–16, 2006.

FUKUYAMA, Y. et al. Anaerobic and hydrogenogenic carbon monoxide-oxidizing prokaryotes: Versatile microbial conversion of a toxic gas into an available energy. Em: **Advances in Applied Microbiology**. [s.l.] Academic Press Inc., 2020. v. 110p. 99–148.

GABARDO, I. T. **Caracterização química e toxicológica da água produzida descartada em plataformas de óleo e gás na costa brasileira e seu comportamento dispersivo no mar**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2007.

GAGLIANO, M. C. et al. Biofilm formation and granule properties in anaerobic digestion at high salinity. **Water Research**, v. 121, p. 61–71, 2017.

GAGLIANO, M. C. et al. Calcium effect on microbial activity and biomass aggregation during anaerobic digestion at high salinity. **New Biotechnology**, v. 56, n. January, p. 114–122, 2020.

GAO, M. et al. Deep insights into the anaerobic co-digestion of waste activated sludge with concentrated leachate under different salinity stresses. **Science of the Total Environment**, v. 838, 10 set. 2022.

GIL-GARCIA, C. et al. Performance improvement of a thermophilic sulfate-reducing bioreactor under acidogenic conditions: Effects of diversified operating strategies. **Journal of Environmental Management**, v. 207, p. 303–312, 2018.

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

GRABOWSKI, A. et al. *Petrimonas sulfuriphila* gen. nov., sp. nov., a mesophilic fermentative bacterium isolated from a biodegraded oil reservoir. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 1113–1121, 2005.

GRANATTO, C. F. et al. Scale-up evaluation of anaerobic degradation of linear alkylbenzene sulfonate from sanitary sewage in expanded granular sludge bed reactor. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 138, n. August 2018, p. 23–32, 2019.

GUAN, Q. et al. Enhancement of methane production in anaerobic digestion of high salinity organic wastewater: The synergistic effect of nano-magnetite and potassium ions. **Chemosphere**, v. 318, p. 137974, mar. 2023.

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

GUTIERREZ, O. et al. Effects of long-term pH elevation on the sulfate-reducing and methanogenic activities of anaerobic sewer biofilms. **Water Research**, v. 43, n. 9, p. 2549–2557, 2009.

HAO, T. et al. A review of biological sulfate conversions in wastewater treatment. **Water Research**, v. 65, p. 1–21, 2014.

HE, H. et al. Influence of salinity on microorganisms in activated sludge processes: A review. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 119, p. 520–527, 2017.

HE, Z. et al. Global transcriptional, physiological and metabolite analyses of the responses of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough to salt adaptation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 5, p. 1574–1586, 2010.

HEDDERICH, R.; WHITMAN, W. B. Physiology and Biochemistry of the Methane-Producing Archaea. Em: DWORKIN, M. et al. (Eds.). **The Prokaryotes: Volume 2: Ecophysiology and Biochemistry**. New York, NY: Springer New York, 2006. p. 1050–1079.

HENZE, M. ; et al. **Wastewater Treatment**. 2. ed. German: Springer, 1997.

HU, Z. et al. Biomass characteristics in three sequencing batch reactors treating a wastewater containing synthetic organic chemicals. **Water Research**, v. 39, n. 4, p. 710–720, 2005.

HUANG, H. et al. Sulfidogenic anaerobic digestion of sulfate-laden waste activated sludge: Evaluation on reactor performance and dynamics of microbial community. **Bioresource Technology**, v. 297, n. September 2019, 2020.

HUANG, L. et al. Campylobacterota dominate the microbial communities in a tropical karst subterranean estuary, with implications for cycling and export of nitrogen to coastal waters. **Environmental Microbiology**, v. 23, n. 11, p. 6749–6763, 1 nov. 2021.

JENČÁROVÁ, J.; LUPTÁKOVÁ, A.; KUPKA, D. Removal of contaminants from water by bacterial activity. **International Journal of Electrical and Computer Engineering Systems**, v. 2020, n. 2, p. 63–66, 2020.

JENNEMAN, G. et al. Sulfide removal in reservoir brine by indigenous bacteria. **Soc Petroleum Eng Prod Facilities**, v. 14, p. 219–225, 1999.

JIN, B. et al. Response of extracellular polymeric substances and enzymatic activity to salinity for the waste activated sludge anaerobic fermentation process. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, n. 4, p. 737–745, 2020.

JOHNSON, D. B.; HALLBERG, K. B. Acid mine drainage remediation options: A review. **Science of the Total Environment**, v. 338, n. 1- 2 SPEC. ISS., p. 3–14, 2005.

JUNTRANAPAPORN, J. et al. Hydrogen sulfide removal from biogas in biotrickling filter system inoculated with *Paracoccus pantotrophus*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 56, p. 29554–29560, 12 nov. 2019.

KAO, C. M.; BORDEN, R. C. Site-specific variability in BTEX biodegradation under denitrifying conditions. **Ground Water**, v. 35, p. 305–311, 1997.

KAPP, H. **Schlammfäulung mit hohem Feststoffgehalt. Stuttgarter Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft (Sludge with a High Solids Content, Stuttgart reports for Urban water Management)**. Band 86 ed. Munchen: Oldenbourg verlag, 1984.

KJELDSEN, K. U. et al. Diversity of sulfate-reducing bacteria from an extreme hypersaline sediment, Great Salt Lake (Utah). 2007.

KODAMA, Y.; WATANABE, K. *Sulfuricurvum kujiense* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic, chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium isolated from an underground crude-oil storage cavity. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 2297–2300, nov. 2004.

LEBRERO, R. et al. Biogas upgrading from vinasse digesters : a comparison between an anoxic biotrickling filter and an algal-bacterial photobioreactor. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 91, n. November, p. 2488–2495, 2016.

LEE, C.; BRIMBLECOMBE, P. Anthropogenic contributions to global carbonyl sulfide, carbon disulfide and organosulfide fluxes. **Earth-Science Reviews**, v. 160, p. 1–18, 2016.

LEFEBVRE, O. et al. Impact of increasing NaCl concentrations on the performance and community composition of two anaerobic reactors. **Environmental biotechnology**, v. 75, p. 61–69, 2007.

LENS, P. N. L. et al. **Biotechnological treatment of sulfate-rich wastewaters. Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, 1998a.

LENS, P. N. L. et al. Biotechnological Treatment of Sulfate-Rich Wastewaters. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 28, n. November 2014, p. 41–88, 1998b.

LI, C. et al. Bacterial anomalies associated with deep sea hydrocarbon seepage along the Scotian Slope. **Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers**, v. 193, 1 mar. 2023.

LI, J. et al. System performance and microbial community succession in a partial nitrification biofilm reactor in response to salinity stress. **Bioresource Technology**, v. 270, n. June, p. 512–518, 2018.

LIANG, J. et al. Degradation of guar in an up-flow anaerobic sludge blanket reactor: Impacts of salinity on performance robustness, granulation and microbial community. **Chemosphere**, v. 232, p. 327–336, 2019.

LIANG, Z. et al. Effects of sulfide on mixotrophic denitrification by: *Thauera* -dominated denitrifying sludge. **Environmental Science: Water Research and Technology**, v. 6, n. 4, p. 1186–1195, 1 abr. 2020.

LINDEBOOM, R. E. F. et al. Piezo-tolerant natural gas-producing microbes under accumulating pCO<sub>2</sub>. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1–19, 2016.

LIU, Y. et al. **The roles of free ammonia (FA) in biological wastewater treatment processes: A review.** **Environment International** Elsevier Ltd, , 1 fev. 2019.

LIU, Y. et al. *Moheibacter lacus* sp. nov., Isolated from Freshwater Lake Sediment. **Current Microbiology**, v. 78, n. 5, p. 2160–2164, 1 maio 2021.

LIU, Y. et al. The evolution of nitrogen transformation microorganism consortium under continued manganese domestication conditions. **Science of the Total Environment**, v. 899, 15 nov. 2023.

LONG, Y. et al. Denitrification efficiency, microbial communities and metabolic mechanisms of corn cob hydrolysate as denitrifying carbon source. **Environmental Research**, v. 221, 15 mar. 2023.

LU, H. et al. The Demonstration of a Novel Sulfur Cycle-Based Wastewater Treatment Process : Sulfate Reduction , Autotrophic Denitrification , and Nitrification Integrated ( SANI 1 ) Biological Nitrogen Removal Process. v. 109, n. 11, p. 2778–2789, 2012.

LUISA, B. G. et al. Modelling Biogas and H<sub>2</sub>S in Anaerobic Digestion. Em: **Computer Aided Chemical Engineering**. [s.l.] Elsevier B.V., 2021. v. 50p. 839–844.

LV, L. et al. Accelerated performance recovery of anaerobic granular sludge after temperature shock: Rapid construction of protective barriers (EPS) to optimize microbial community composition base on quorum sensing. **Journal of Cleaner Production**, v. 392, 15 mar. 2023.

MACÊDO, W. V. et al. Establishing simultaneous nitrification and denitrification under continuous aeration for the treatment of multi-electrolytes saline wastewater. **Bioresource Technology**, p. 121529, 2019a.

MACÊDO, W. V. et al. The effect of cations ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , and  $\text{Ca}^{2+}$ ) on the activity and structure of nitrifying and denitrifying bacterial communities. **Science of the Total Environment**, v. 679, p. 279–287, 2019b.

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

MCCARTNEY, D. M.; OLESZKIEWICZ, J. A. Competition between methanogens and sulfate reducers: effect of COD:sulfate ratio and acclimation. **Water Environment Research**, v. 65, n. 5, p. 655–664, 1993.

MCCARTY, P. L. Anaerobic Waste Treatment Fundamentals. **Chemistry and microbiology**, v. 95, n. 9, p. 107–112, 1964a.

MCCARTY, P. L. Anaerobic Waste Treatment Fundamentals. **Public works**, v. 9, p. 107–112, 1964b.

MENDEZ, R.; LEMA, J. M.; SOTO, M. **Treatment of Seafood-Processing Wastewaters in Mesophilic and Thermophilic Anaerobic Filters**Source: **Water Environment Research**. [s.l: s.n.].

MINO, S. et al. *Sulfurovum aggregans* sp. nov., A hydrogenoxidizing, Thiosulfate-reducing chemolithoautotroph within the Epsilonproteobacteria isolated from a deep-sea hydrothermal vent chimney, And an emended description of the genus *Sulfurovum*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 3195–3201, 1 set. 2014.

MO, S. et al. Impacts of Crenarchaeota and Halobacterota on sulfate reduction in the subtropical mangrove ecosystem as revealed by SMDB analysis. **bioRxiv**, 2020.

MOIR, J. W. B. et al. **The purification of ammonia monooxygenase from *Paracoccus denikjicans***FEBS 17074 FEBS Letters. [s.l.: s.n.].

MOORE, R. L.; WEINER, R. M.; GEBERS, D. R. **Genus *Hyphomonas* Pongratz 1957 norn. rev. emend. *Hyphomonas polymorpha* Pongratz 1957 norn. rev. emend. and *Hyphomonas neptunium* (Leifson 1964) comb. nov. emend. (*Hyphomicrobium neptunium*)**INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. [s.l.: s.n.].

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

MOSEY, F. E. **New Developments in the Anaerobic Treatment of Industrial Wastes.** [s.l.: s.n.]. v. 81

MOURA, R. B. et al. Carbon-nitrogen removal in a structured-bed reactor (SBRRIA) treating sewage: Operating conditions and metabolic perspectives. **Journal of Environmental Management**, v. 224, p. 19–28, 15 out. 2018.

MOUSSA, M. S. et al. Long term effects of salt on activity, population structure and floc characteristics in enriched bacterial cultures of nitrifiers. **Water Research**, v. 40, n. 7, p. 1377–1388, 2006.

MUÑOZ, J. D. et al. Comparative performance of upflow anaerobic sludge blanket reactor and anaerobic membrane bioreactor treating phenolic wastewater : Overcoming high salinity. **Chemical Engineering Journal**, v. 366, n. December 2018, p. 480–490, 2019.

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

NARSING RAO, M. P. et al. Metagenomic analysis further extends the role of Chloroflexi in fundamental biogeochemical cycles. **Environmental Research**, v. 209, 1 jun. 2022.

NAZ, H. et al. *Mesorhizobium* improves chickpea growth under chromium stress and alleviates chromium contamination of soil. **Journal of Environmental Management**, v. 338, p. 117779, jul. 2023.

OBATA, O. et al. Investigating the impact of inoculum source on anaerobic digestion of various species of marine macroalgae. **Algal Research**, v. 46, n. January, 2020.

O'FLAHERTY, V. et al. Effect of pH on growth kinetics and sulphide toxicity thresholds of a range of methanogenic, syntrophic and sulphate-reducing bacteria. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 5, p. 555–569, 1998.

OLIVEIRA, C. A. et al. Thermophilic biohydrogen production from sugarcane molasses under low pH: Metabolic and microbial aspects. **International Journal of Hydrogen Energy**, n. 7, p. 4182–4192, 2020.

OLIVEIRA, C. A. et al. Increasing salinity concentrations determine the long-term participation of methanogenesis and sulfidogenesis in the biodigestion of sulfate-rich wastewater. **Journal of Environmental Management**, v. 296, p. 113254, out. 2021.

OLLIVIER, B. et al. Anaerobic bacteria from hypersaline environments. **Microbiological Reviews**, v. 58, n. 1, p. 27–38, 1994.

OMIL, F. et al. Long-term competition between sulfate reducing and methanogenic bacteria in UASB reactors treating volatile fatty acids. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 57, n. 6, p. 676–685, 1998.

OREN, A. Bioenergetic Aspects of Halophilism. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63, n. 2, p. 334–348, 1999.

PANSWAD, T.; ANAN, C. Specific oxygen, ammonia, and nitrate uptake rates of a biological nutrient removal process treating elevated salinity wastewater. **Bioresource Technology**, v. 70, n. 3, p. 237–243, 1999.

PANTOJA FILHO, J. L. R. et al. Nitrogen and residual organic matter removal from anaerobic reactor effluent in a fixed-bed reactor with biogas for denitrification. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 2014.

PARKIN, G. F. et al. Interaction between sulfate reducers and methanogens fed acetate and propionate. **Water Environment Federation**, v. 62, n. 6, p. 780–788, 1990a.

PARKIN, G. F. et al. Interaction between sulfate reducers and methanogens fed acetate and propionate. **Water Environment Federation**, v. 62, n. 6, p. 780–788, 1990b.

PATEL, G. B.; SPOTT, G. D. *Methanosaeta concilii* gen. nov., sp. nov. (“*Methanothrix concilii*”) and *Methanosaeta thermoacetophila* nom. rev., comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 40, n. 1, p. 79–82, 1 jan. 1990.

PAVLOSTATHIS, S. G. **6.31 Kinetics and Modeling of Anaerobic Treatment and Biotransformation Processes**. [s.l: s.n.].

PENG, Y. Z.; CHEN, T.; TIAN, W. J. Nitrogen removal via nitrite at normal temperature in A/O process. **Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, v. 38, n. 6, p. 1007–1015, 2003.

PIKUTA, E. V. et al. *Williamwhitmania taraxaci* gen. nov., sp. nov., a proteolytic anaerobe with a novel type of cytology from lake Untersee in Antarctica, description of *Williamwhitmaniaceae* fam. nov., and emendation of the order *Bacteroidales* Krieg 2012. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4132–4145, 1 out. 2017.

POCHANA, K.; KELLER, J. Study of factors affecting simultaneous nitrification and denitrification (SND). **Water Science and Technology**, v. 39, p. 61–68, 1999.

QUARTAROLI, L. et al. Effect of the gradual increase of salt on stability and microbial diversity of granular sludge and ammonia removal. **Journal of Environmental Management**, v. 248, n. July, p. 109273, 2019.

RAMÍREZ, M. et al. Removal of hydrogen sulfide by immobilized *Thiobacillus thioparus* in a biotrickling filter packed with polyurethane foam. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 21, p. 4989–4995, nov. 2009.

REINSEL, M. et al. Control of microbial souring by nitrate, nitrite or glutaraldehyde injection in a sandstone column. **J Ind Microbiol**, v. 17, p. 128–136, 1996.

REIS, M. A. M. et al. Influence of produced acetic acid on growth of sulfate reducing bacteria. **Biotechnology Letters**, v. 12, n. 2, p. 145–148, 1990.

REIS, M. A. M. et al. Effect of Hydrogen Sulfide on Growth of Sulfate Reducing Bacteria. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 40, p. 593–600, 1992a.

REIS, M. A. M. et al. Effect of Hydrogen Sulfide on Growth of Sulfate Reducing Bacteria. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 40, p. 593–600, 1992b.

REZADEHBASHI, M.; BALDWIN, S. A. Core Sulphate-Reducing Microorganisms in Metal-Removing Semi-Passive Biochemical Reactors and the Co-Occurrence of Methanogens. **Microorganisms**, v. 6, n. 1, p. 16, 2018.

REZVANI BOROUJENI, S. et al. Evaluating the Potential of Halothiobacillus Bacteria for Sulfur Oxidation and Biomass Production under Saline Soil. **Geomicrobiology Journal**, v. 0, n. 0, p. 1–9, 2020.

RIBEIRO, C. M. S. **Ozonização de Efluentes da Indústria de Petróleo**. [s.l.] Tese de mestrado. PEQ/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil, 1995.

RIBEIRO, R. et al. BTEX removal in a horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor under denitrifying conditions. p. 269–278, 2013.

RIPLEY, A. L. E.; BOYLE, W. C.; CONVERSE, J. C. alkalimetric Improved for anaerobic digestion wastes monitoring of high-strength wastes. v. 58, n. 5, p. 406–411, 1986.

ROBERTS, K. P.; HEAVEN, S.; BANKS, C. J. Quantification of methane losses from the acclimatisation of anaerobic digestion to marine salt concentrations. **Renewable Energy**, v. 86, p. 497–506, 1 fev. 2016.

ROBINSON, J.; GIBBONS, N. E. THE EFFECT OF SALTS ON THE GROWTH OF MICROCOCCUS HALODENITRIFICANS N. SP. **Canadian Journal of Botany**, v. 30, n. 2, p. 147–154, 1 mar. 1952.

ROESSLER, M.; MÜLLER, V. **Osmoadaptation in bacteria and archaea: Common principles and differences**. **Environmental Microbiology**, 2001.

SAADY, N. M. C. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 30, p. 13172–13191, 2013.

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

SANTOS, P. S. et al. Does sugarcane vinasse composition variability affect the bioenergy yield in anaerobic systems? A dual kinetic-energetic assessment. **Journal of Cleaner Production**, v. 240, p. 118005, 2019.

SAUER JR., T. C. Volatile Liquid Hydrocarbon Characterization of Underwater Vents and Formation Waters from Offshore Production Operations. **Environmental Science and Technology**, v. 15, n. 8, p. 917–923, 1981.

SCHAUSS, T. et al. *Moheibacter stercoris* sp. Nov., isolated from an input sample of a biogas plant. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 7, p. 2585–2591, 1 jul. 2016.

SEARS, K. et al. Impacts of reduced sulfur components on active and resting ammonia oxidizers. **J Ind Microbiol biotechnol**, v. 31, p. 369–378, 2004.

SHAO, M. et al. Co-digestion of food waste and hydrothermal liquid digestate: Promotion effect of self-generated hydrochars. **Environmental Science and Ecotechnology**, v. 15, 1 jul. 2023.

SHEN, Z. et al. Effects of salinity on nitrite and elemental sulfur accumulation in a double short-cut sulfur autotrophic denitrification process. **Bioresource Technology**, v. 369, 1 fev. 2023.

SHI, K. et al. Performance of halophilic marine bacteria inocula on nutrient removal from hypersaline wastewater in an intermittently aerated biological filter. **Bioresource Technology**, v. 113, p. 280–287, 2012.

SHI, S. et al. Enhanced thermophilic denitrification performance and potential microbial mechanism in denitrifying granular sludge system. **Bioresource Technology**, v. 344, 1 jan. 2022.

SILVA, B. G. et al. Foam aerated biofilm reactor: a novel counter-diffusional process for COD and nitrogen removal from low COD/N effluents. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 43, n. 17, p. 2671–2683, 2022.

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

SMYTH, R. P. et al. Reducing chimera formation during PCR amplification to ensure accurate genotyping. **Gene**, 2010.

SOREANU, G. et al. Investigation on the use of nitrified wastewater for the steady-state operation of a biotrickling filter for the removal of hydrogen sulphide in biogas. **Journal of Environmental Engineering and Science**, v. 7, n. 5, p. 543–552, 2008.

TANG, R. et al. Biocathode denitrification of coke wastewater effluent from an industrial aeration tank: Effect of long-term adaptation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 125, p. 151–160, 2017.

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

TURCIOS, A. E.; WEICHHREBE, D.; PAPENBROCK, J. Potential use of the facultative halophyte *Chenopodium quinoa* Willd. as substrate for biogas production cultivated with different concentrations of sodium chloride under hydroponic conditions. **Bioresource Technology**, v. 203, p. 272–279, 1 mar. 2016.

VAIOPOULOU, E.; MELIDIS, P.; AIVASIDIS, A. Sulfide removal in wastewater from petrochemical industries by autotrophic denitrification. **Water Research**, v. 39, n. 17, p. 4101–4109, 2005.

VALLERO, M. V. G. et al. High-Rate Sulfate Reduction at High Salinity ( up to 90 mS . cm — 1 ) in Mesophilic UASB Reactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 2, p. 226–235, 2004.

VAN DEN BRAND, T. P. H. et al. Effects of Chemical Oxygen Demand, Nutrients and Salinity on Sulfate-Reducing Bacteria. **Environmental engineering science**, v. 32, n. August, 2015.

VAN HOUTEN, R. T.; YUN, S. Y.; LETTINGA, G. Thermophilic Sulphate and Sulphite Reduction in Lab-Scale Gas-Lift Reactors Using H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> as Energy and Carbon Source. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 55, n. 5, p. 807–814, 1997a.

VAN HOUTEN, R. T.; YUN, S. Y.; LETTINGA, G. Thermophilic Sulphate and Sulphite Reduction in Lab-Scale Gas-Lift Reactors Using H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> as Energy and Carbon Source. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 55, n. 5, p. 807–814, 1997b.

VEIGA, M. C. et al. A new device for measurement and control of gas production by bench scale anarobic digesters. **Water Research**, v. 24, n. 12, p. 1551–1554, 1990.

VEIL, J. et al. A White Paper Describing Produced Water from Production of Crude Oil, Natural Gas and Coal Bed Methane. [http://www.netl.doe.gov/publications/oil\\_pubs/prodwaterpaper.pdf](http://www.netl.doe.gov/publications/oil_pubs/prodwaterpaper.pdf), 2004., n. 1, 2004.

VIEIRA, D. S.; CAMMARTOTA, M. C.; CAMPORESE, E. F. S. Redução de contaminantes presentes na água de produção de petróleo. **2º congresso brasileiro de P&D em petróleo & gás**, p. 6, 2003.

VILELA, R. S.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; FORESTI, E. Removing organic matter from sulfate-rich wastewater via sulfidogenic and methanogenic pathways. **Water Science and Technology**, v. 69, n. 8, p. 1669–1675, 8 fev. 2014.

VISSER, A. **The anaerobic treatment of sulfate containing wastewater**. Ph.D thesis—[s.l.] Wageningen Agricultural University, Netherlands, 1995.

VOGT, C.; KLEINSTEUBER, S.; RICHNOW, H. H. Anaerobic benzene degradation by bacteria. **Microbial Biotechnology**, v. 4, n. 6, p. 710–724, 2011.

VREDENBREGT, L. H. J. et al. Fluid bed biological nitrification and denitrification in high salinity wastewater. **Water Science and Technology**, v. 36, n. 1, p. 93–100, 1997.

VYRIDES, I.; STUCKEY, D. C. A modified method for the determination of chemical oxygen demand (COD) for samples with high salinity and low organics. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 979–982, 2009.

WANG, D. et al. Roles and correlations of functional bacteria and genes in the start-up of simultaneous anammox and denitrification system for enhanced nitrogen removal. **Science of the Total Environment**, v. 655, p. 1355–1363, 10 mar. 2019.

WANG, H. et al. Salinity is a key factor driving the nitrogen cycling in the mangrove sediment. **Science of the Total Environment**, v. 631–632, p. 1342–1349, 1 ago. 2018.

WANG, J. et al. The potential multiple mechanisms and microbial communities in simultaneous nitrification and denitrification process treating high carbon and nitrogen concentration saline wastewater. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 708–715, 2017.

WANG, J. et al. Effect of salinity on mature wastewater treatment biofilm microbial community assembly and metabolite characteristics. **Science of the Total Environment**, v. 711, p. 134437, 2020.

WANG, R. et al. Effects of inorganic salts on denitrifying granular sludge: The acute toxicity and working mechanisms. **Bioresource Technology**, v. 204, p. 65–70, 1 mar. 2016.

WARGO, M. J. Homeostasis and catabolism of choline and glycine betaine: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 7, p. 2112–2120, 2013.

WONG, Y. M.; WU, T. Y.; JUAN, J. C. A review of sustainable hydrogen production using seed sludge via dark fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 34, p. 471–482, 2014.

WU, J. et al. A gradual change between methanogenesis and sulfidogenesis during a long-term UASB treatment of sulfate-rich chemical wastewater. **Science of the Total Environment**, v. 636, p. 168–176, 2018.

XU, X. et al. Sulphur-based autotrophic denitrification of wastewater obtained following graphite production: Long-term performance, microbial communities involved, and functional gene analysis. **Bioresource Technology**, v. 306, 1 jun. 2020.

YAO, Q. et al. Effect of free ammonium and free nitrous acid on the activity, aggregate morphology and extracellular polymeric substance distribution of ammonium oxidizing bacteria in partial nitrification. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 124, n. 3, p. 319–326, 1 set. 2017.

YU, C. et al. Hydrothermal pretreatment contributes to accelerate maturity during the composting of lignocellulosic solid wastes. **Bioresource Technology**, v. 346, 1 fev. 2022.

ZELLNER, G. et al. *Anaerofilum pentosovorans* gen. nov., sp. nov., and *Anaerofilum agile* sp. nov., two new, strictly anaerobic, mesophilic, acidogenic bacteria from anaerobic bioreactors. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, n. 4, p. 871–875, 1996.

ZENG, R. et al. Simultaneous Nitrification, Denitrification, and Phosphorus Removal in a Lab-Scale Sequencing Batch Reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, n. November 2015, 2003.

ZHANG, A. et al. Treatment of fracturing wastewater by anaerobic granular sludge: The short-term effect of salinity and its mechanism. **Bioresource Technology**, v. 345, 1 fev. 2022a.

ZHANG, J. et al. Adaptation to salinity: Response of biogas production and microbial communities in anaerobic digestion of kitchen waste to salinity stress. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. xxx, n. xxx, p. 0–5, 2019.

ZHANG, J. et al. Adaptation to salinity: Response of biogas production and microbial communities in anaerobic digestion of kitchen waste to salinity stress. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 130, n. 2, p. 173–178, 2020a.

ZHANG, L. et al. Chemical and biological technologies for hydrogen sulfide emission control in sewer systems : A review. **Water Research**, v. 42, p. 1–12, 2008.

ZHANG, R. G. et al. *Moheibacter sediminis* gen. nov., sp. nov., a member of the family flavobacteriaceae isolated from sediment, and emended descriptions of *empedobacter brevis*, *wautersiella falsenii* and *weeksella virosa*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. PART 5, p. 1481–1487, 2014.

ZHANG, W. et al. Medium-chain carboxylates production from co-fermentation of swine manure and corn stalk silage via lactic acid: Without external electron donors. **Chemical Engineering Journal**, v. 439, 1 jul. 2022b.

ZHANG, Z. et al. Elucidating salinity adaptation and shock loading on denitrification performance: Focusing on microbial community shift and carbon source evaluation. **Bioresource Technology**, v. 305, n. January, p. 123030, 2020b.

ZHAO, X. et al. Oil field wastewater treatment in Biological Aerated Filter by immobilized microorganisms. v. 41, p. 1475–1483, 2006.

ZHILINA, T. N.; ZAVARZIN, G. A. Extremely halophilic, methylotrophic, anaerobic bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 87, n. 3–4, p. 315–321, 1990.

ZHOU, A. et al. Key metabolites and mechanistic changes for salt tolerance in an experimentally evolved sulfate-reducing bacterium, *desulfovibrio vulgaris*. **mBio**, v. 8, n. 6, p. 1–20, 2017.

ZHOU, A. et al. Sulfate Reduction-Mediated Syntrophic Microbiomes Accelerated Waste-Activated Sludge Fermentation on the Basis of  $\text{SO}_4^{\bullet-}$ -Oxidation and Eliminated

Superfluous Sulfate. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 8, n. 25, p. 9325–9334, 2020.

ZHOU, J.; XING, J. Effect of electron donors on the performance of haloalkaliphilic sulfate-reducing bioreactors for flue gas treatment and microbial degradation patterns related to sulfate reduction of different electron donors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 96, p. 14–22, 2015.

ZHU, D. et al. Multi-cycle anaerobic digestion of hydrothermal liquefaction aqueous phase: Role of carbon and iron based conductive materials in inhibitory compounds degradation, microbial structure shaping, and interspecies electron transfer regulation. **Chemical Engineering Journal**, v. 454, 15 fev. 2023.

ZWIETERING, M. H. et al. Modeling of the Bacterial Growth Curve. **applied and environmental microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1875–1881, 1990.



***EESC • USP***