



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

MARINA CELANT DE PRÁ

**ESTABELECIMENTO E ESTUDO CINÉTICO DO PROCESSO
DE DESAMONIFICAÇÃO UTILIZANDO-SE UM REATOR
ÚNICO PARA REMOÇÃO DE NITROGÊNIO À
TEMPERATURA AMBIENTE**

Florianópolis
2013

Marina Celant De Prá

**ESTABELECIMENTO E ESTUDO CINÉTICO DO PROCESSO
DE DESAMONIFICAÇÃO UTILIZANDO-SE UM REATOR
ÚNICO PARA REMOÇÃO DE NITROGÊNIO À
TEMPERATURA AMBIENTE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina, para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Hugo M. Soares
Coorientador: Prof. Dr. Airton Kunz

Florianópolis
2013

Aos meus pais, Altair e Neiva, e minha irmã, Joana, pelo apoio, incentivo e amor.

AGRADECIMENTOS

Agradecer é admitir que houve um momento em que se precisou de alguém, é reconhecer a importância, em especial, dos que serão mencionados:

A Deus, pela proteção constante, por ser fonte de fé, força e direção em todos os momentos de minha vida.

Aos meus pais, Altair e Neiva, e minha irmã, Joana, pelo apoio, paciência e amor incondicional. Amo vocês!

Ao Marcelo Bortoli, pelas palavras de incentivo, gestos de compreensão e atitudes de amor, sempre.

Ao professor orientador Dr. Hugo Moreira Soares, pela orientação, ensinamentos e conversas fundamentais para minha formação.

Ao professor coorientador Dr. Airton Kunz, pelo aprendizado, amizade e confiança, por dar um sentido maior a esse trabalho e guiar minhas escolhas, nos melhores e piores momentos.

Ao Dr. Paulo Armando, pela disponibilidade e utilização do equipamento INNOVA sempre que necessário.

A todos os meus queridos colegas e amigos do Laboratório de Experimentação e Análises Ambientais da Embrapa Suínos e Aves, em especial ao Lucas, Aline, Cássia e Mariana pelo apoio na realização das análises e experimentos. Também ao Ricardo, Lidi e Lidinha pelos momentos de descontração e desabafos, e ao Anildo Cunha Jr., pelo início de tudo, paciência e disponibilidade sempre.

Aos amigos do Laboratório de Tratamento Biológico de Resíduos da UFSC, em especial a Camila, Jana, Cléo e Diane pela companhia, disposição e apoio durante a realização das disciplinas. Também a Lorena, pela dedicação e auxílio na realização das análises microbiológicas do trabalho.

Aos docentes do curso de Engenharia Química que contribuíram para minha formação profissional e pessoal nestes dois anos de mestrado.

A Embrapa Suínos e Aves, pela disposição dos recursos e espaço físico necessário para o desenvolvimento do trabalho, e a CAPES, pela bolsa de mestrado concedida.

A todos, MUITO OBRIGADA!

"A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre
aquilo que todo mundo vê".

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

A agropecuária desponta como um dos setores de maior expressão no país, e apesar de exercer extrema importância econômica e social, é apontada como uma das principais atividades do agronegócio brasileiro responsável pelo impacto ambiental das águas superficiais e subterrâneas. Considerando a remoção biológica de nitrogênio, o processo de desamonificação – que combina o processo de nitrificação parcial com o processo ANAMMOX em um único reator – surge como uma alternativa promissora para a eliminação de altas cargas de nitrogênio em efluentes agropecuários. Apesar de muito estudado nos últimos anos, ainda existem desafios em torno da implementação e comportamento operacional desse processo. Sabendo disso, o principal objetivo deste trabalho foi avaliar a partida e estabelecimento do processo de desamonificação, bem como o estudo cinético das bactérias envolvidas, em um sistema de reator único com biomassa suspensa em escala laboratorial para a remoção de nitrogênio à temperatura ambiente. O reator foi inoculado com uma concentração de aproximadamente 2400 mgSST L⁻¹ de biomassa nitrificante + ANAMMOX em uma respectiva proporção de 58:200 (v v⁻¹) e alimentado com afluente sintético composto por amônio, macro e microelementos. Os modelos matemáticos de Andrews, Edwards I e Monod, foram respectivamente os que melhor representaram o comportamento da biomassa nitrificante, ANAMMOX e do reator de desamonificação durante os ensaios cinéticos realizados. O processo de desamonificação foi estabelecido após o 52^o dia de operação do reator, utilizando a limitação de OD como grandeza operacional para o controle das velocidades de oxidação da amônia em uma concentração de 0,14 ± 0,03 mgO₂ L⁻¹, trabalhando com uma carga de nitrogênio aplicado de 0,5454 kgN m⁻³ d⁻¹, atingindo uma eficiência de remoção de amônia de 83,38 ± 0,04 % e remoção de nitrogênio total de 57,93 ± 0,05 %. Simultaneamente, o sistema mostrou ser uma ferramenta eficiente na redução de gases de efeito estufa, emitindo concentrações insignificantes de N₂O durante o experimento. A análise de FISH e qPCR demonstraram que a maior parte dos microrganismos presentes no reator são do grupo das BOA e ANAMMOX, o que torna a biomassa do reator bastante enriquecida sem a necessidade de seleção prévia de microrganismos.

Palavras-chave: Desamonificação. Remoção de nitrogênio. Estudo cinético.

ABSTRACT

The livestock production has emerged as one of the largest expression chains in the Brazil, despite exercising extreme economic and social importance, is considered one of the main activities of the Brazilian agribusiness with potential environmental impact of surface and groundwater. Considering the biological nitrogen removal, the deamonification process – which combines partial nitrification and ANAMMOX process in a single reactor – emerges as a promising alternative for nitrogen elimination at high loading rates in agricultural effluents. Although much studied in recent years, there are still challenges around the implementation and operational behavior of this process. The aim of this study was to evaluate the start-up and establishment of the deamonification process, as well as the kinetic study of its bacteria, in a single reactor system with suspended biomass at laboratory scale for nitrogen removal at room temperature. The deamonification reactor was inoculated with a nitrifying and ANAMMOX sludge at 2400 mgSST L⁻¹ in a respective ratio of 58:200 (v v⁻¹) and fed with synthetic medium composed of ammonium, macro and microelements. Mathematical models of Andrews, Edwards I and Monod were, respectively, the ones that best represented the biomass behavior of nitrifying, ANAMMOX and DMX reactor during the kinetic experiments performed. The deamonification process was established after 52th day of reactor operation, using DO limitation as the operating parameter to control the rate of ammonia oxidation in a concentration of $0,14 \pm 0,03$ mgO₂ L⁻¹, working a nitrogen loading rate of $0,5454$ kgN m⁻³ d⁻¹, reaching an ammonia removal efficiency of $83,38 \pm 0,04$ % and total nitrogen removal efficiency of $57,93 \pm 0,05$ %. Simultaneously, the system proved to be an effective tool in reducing greenhouse gases, emitting negligible N₂O concentrations during the experiment. The FISH and qPCR analysis showed that the reactor biomass proved quite enriched without the needing of selection of microorganisms.

Keywords: Deamonification. Nitrogen removal. Kinetic study.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática das reações envolvidas no ciclo do nitrogênio.	35
Figura 2 – Esquema representativo do caminho da nitrificação, desnitrificação via nitrito e desnitrificação via nitrato.	42
Figura 3 – Possível rota metabólica da oxidação anaeróbia do íon amônio.	43
Figura 4 – Ciclo biológico do nitrogênio, com processo de nitrificação, desnitrificação e ANAMMOX.	44
Figura 5 – Efeito da temperatura sobre a velocidade de crescimento das BOA e das BON.	48
Figura 6 – Esquema do processo de nitrificação parcial + ANAMMOX.	51
Figura 7 – Esquema do processo de desamonificação.	53
Figura 8 – Esquema representativo do processo de desamonificação em biofilmes.	54
Figura 9 – Esquema do perfil de concentração de oxigênio em um floco microbiano.	55
Figura 10 – Fluxograma do sistema de reator RBS utilizado para cultivo da biomassa nitritante.	60
Figura 11 – Esquema demonstrativo de um ciclo reacional completo de operação do reator RBS.	62
Figura 12 – Fluxograma do sistema de reator ANAMMOX utilizado para cultivo da biomassa.	63
Figura 13 – Fluxograma do sistema do reator DMX em escala de laboratório utilizado durante o experimento.	66
Figura 14 - Sistema experimental utilizado nos ensaios de respirometria, onde: 1, oxímetro; 2, controlador de pH; 3, agitador magnético; 4, biorreator; 5, bomba de aeração; 6, solução de NaOH (1 mol L ⁻¹).	70
Figura 15 – Sistema utilizado para coleta dos gases no reator DMX durante o experimento. Onde: 1, saída do gás do reator; 2, balão para coleta do gás.	78
Figura 16 – Valores da velocidade específica de respiração (QO ₂) em função da concentração do substrato (N-NH ₃) e ajuste do modelo de Andrews aos dados experimentais.	85
Figura 17 - Valores da velocidade específica de consumo de amônia (μN-NH ₃) em função da concentração do substrato (N-NH ₃) e ajuste do modelo de Edwards I aos dados experimentais.	89

Figura 18 - Valores da velocidade específica de consumo de nitrito ($\mu\text{N-NO}_2^-$) em função da concentração do substrato (N-NO_2^-) e ajuste do modelo de Edwards I aos dados experimentais.....	89
Figura 19 – Desempenho do reator RBS até o 103 ^o dia de operação. a: Acompanhamento das concentrações das formas nitrogenadas. b: acompanhamento das concentrações de alcalinidade. Fase I: ciclo óxico de 20 min h ⁻¹ . Fase II: ciclo óxico de 15 min h ⁻¹	93
Figura 20 – Acompanhamento das concentrações das formas nitrogenadas do reator ANAMMOX até o 141 ^o dia de operação. Fase I: concentração de substrato de 100 mgN L ⁻¹ . Fase II: concentração de substrato de 200 mgN L ⁻¹	95
Figura 21 – Acompanhamento das formas nitrogenadas durante os ensaios cinéticos nitritantes de consumo de substrato. Valores médios (n = 2).....	96
Figura 22 - Acompanhamento das formas nitrogenadas durante os ensaios cinéticos ANAMMOX de consumo de substrato. Valores médios (n = 2).....	97
Figura 23 – Desempenho do reator DMX até o 37 ^o dia de operação. a: Acompanhamento das concentrações das formas nitrogenadas. b: Acompanhamento das cargas de nitrogênio total na entrada e na saída do reator. Fase I: carga de nitrogênio aplicado de 0,6 kgN m ⁻³ d ⁻¹ . Fase II: carga de nitrogênio aplicado de 0,9 kgN m ⁻³ d ⁻¹	100
Figura 24 – Acompanhamento dos coeficientes estequiométricos até o 89 ^o dia de operação do reator DMX. Fase I: carga de 0,6 kgN m ⁻³ d ⁻¹ e concentração de 200 mgN-NH ₃ L ⁻¹ . Fase II: carga de 0,9 kgN m ⁻³ d ⁻¹ e concentração de 300 mgN-NH ₃ L ⁻¹ . Fase III: carga de 0,6 kgN m ⁻³ d ⁻¹ e concentração de 300 mgN-NH ₃ L ⁻¹	102
Figura 25 – A: Acompanhamento das concentrações das formas nitrogenadas. B: Acompanhamento da eficiência de remoção de nitrogênio no reator DMX durante o experimento.....	104
Figura 26 – Curva dos dados experimentais para o modelo de Monod em função de cada aumento na concentração de N-NH ₃	110
Figura 27 – Acompanhamento da temperatura no reator DMX durante o experimento.....	115
Figura 28 – Valores de OD nos ciclos óxico e anóxico de aeração intermitente no reator DMX durante o experimento. Área sombreada: período em que a vazão de ar foi ajustada de acordo com as concentrações de N-NH ₃ na saída do reator.....	116

Figura 29 – Acompanhamento das concentrações de alcalinidade e valores de pH no reator DMX durante o experimento.	118
Figura 30 – A: Comportamento das concentrações de AL durante o experimento. B: Comportamento das concentrações de ANL durante o experimento.....	120
Figura 31 – Acompanhamento da concentração de SSV em função do tempo no reator DMX.	122
Figura 32 – Velocidade de emissão de N-N ₂ O e N-NH ₃ no reator DMX durante o 70 ^o ao 81 ^o dias de operação.....	123
Figura 33 - Resultado da análise qualitativa de FISH para amostras do reator DMX. Em azul a coloração por DAPI da comunidade microbiana total. Em vermelho a coloração de bactérias específicas: Domínio <i>Bacteria</i> (A). Todas as BOA (B). Gênero <i>Nitrosomonas</i> (C). Gênero <i>Nitrobacter</i> (D). Todas as ANAMMOX (E).....	128

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produção média diária de dejetos gerados nas diferentes fases produtivas por tipo de animal.....	32
Tabela 2 – Composição média dos efluentes agropecuários de acordo com o tipo de animal.....	33
Tabela 3 – Comparação entre os processos biológicos para remoção de nitrogênio.....	58
Tabela 4 – Composição do afluente sintético e solução de microelementos utilizados para o cultivo da biomassa nitrificante.....	61
Tabela 5 – Composição do afluente sintético e solução de micronutrientes utilizados para o cultivo da biomassa ANAMMOX. ..	64
Tabela 6 – Pontos de amostragem, frequência de coleta e análises realizadas no reator DMX durante o experimento.....	67
Tabela 7 – Concentração do tampão de hibridização e solução de lavagem para cada tipo de sonda.....	80
Tabela 8 – Sequencia e especificidade das sondas utilizadas na análise de FISH para o reator DMX.....	80
Tabela 9 – Iniciadores utilizados e sua sequência.....	82
Tabela 10 – Velocidade de consumo de oxigênio e velocidade específica de consumo de oxigênio para cada concentração de substrato utilizada durante os ensaios realizados com a biomassa nitrificante.....	83
Tabela 11 – Análise do critério de informação de Akaike (CIA) em função dos modelos matemáticos para a variável QO_2 no processo de respirometria.....	84
Tabela 12 – Parâmetros cinéticos do modelo de Andrews estimados através da regressão não linear para a biomassa nitrificante.....	86
Tabela 13 – Velocidade de consumo de amônia e nitrito para cada concentração de substrato utilizada e suas respectivas velocidades específicas oriundas dos ensaios realizados com a biomassa ANAMMOX.....	87
Tabela 14 – Análise do critério de informação de Akaike (CIA) em função dos modelos matemáticos para as variáveis $N-NH_3$ e $N-NO_2^-$ no processo ANAMMOX.....	88
Tabela 15 – Parâmetros cinéticos do modelo de Edwards I estimados através da regressão não linear para a biomassa ANAMMOX.....	90

Tabela 16 - Velocidade específica de consumo de amônia para cada concentração de substrato utilizada e suas respectivas velocidades específicas oriundas dos ensaios realizados com o reator DMX.....	109
Tabela 17 - Análise do critério de informação de Akaike (CIA) em função dos modelos matemáticos para a variável N-NH ₃ no processo DMX.	110
Tabela 18 - Parâmetros cinéticos do modelo de Monod estimados através da regressão não linear para o reator DMX.	111
Tabela 19 – Comportamento do reator DMX em relação ao processo convencional de nitrificação/desnitrificação e ao processo combinado de nitrificação parcial + ANAMMOX utilizando dois reatores para remoção de nitrogênio.	125

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AL – Amônia Livre
ANAMMOX – *Anaerobic Ammonium Oxidation*
ANL – Ácido Nitroso Livre
BOA – Bactérias Oxidadoras de Amônia
BON – Bactérias Oxidadoras de Nitrito
CANON – Sistema de Reator Único para Completa Remoção de Nitrogênio via Nitrito
CIA – Critério de Informação de Akaike
CLP – Controlador Lógico Programável
CONAMA – Conselho Nacional de Meio Ambiente
DMX – Desamonificação
DP – Desvio Padrão
ETDS – Estação de Tratamento de Dejetos de Suínos
FIA – *Flow Injection Analysis*
FISH – *Fluorescent In Situ Hybridization*
GEE – Gases de Efeito Estufa
 K_I – Constante de inibição
 k_{la} – Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio
 K_S – Constante de saturação
LEAA – Laboratório de Experimentação e Análise Ambiental
NT – Nitrogênio Total
OD – Oxigênio Dissolvido
 QO_2 – Velocidade específica de consumo de oxigênio
 QO_2X – Velocidade de consumo de oxigênio
qPCR – PCR quantitativo
RBS – Reator em Batelada Sequencial
 $rN-NH_3$ – Velocidade de consumo de amônia
 $rN-NO_2^-$ - Velocidade de consumo de nitrito
 $rN-NO_3^-$ - Velocidade de produção de nitrato
 r_s – Velocidade de consumo de substrato
S – Concentração do substrato
SPACs – Sistemas de Produção de Animais Confinados
SSF – Sólidos Suspensos Fixos
SST – Sólidos Suspensos Totais
SSV – Sólidos Suspensos Voláteis
TRH – Tempo de retenção hidráulico

TRS – Tempo de retenção de sólidos

UASB – Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente com manta de lodo

X – Concentração celular

$\mu_{\text{máx}}$ – Velocidade específica máxima de crescimento

$\mu_{\text{N-NH}_3}$ – Velocidade específica de consumo de amônia

$\mu_{\text{N-NO}_2^-}$ - Velocidade específica de consumo de nitrito

$\mu_{\text{N-NO}_3^-}$ - Velocidade específica de produção de nitrato

μ_{P} – Velocidade específica de produção de produto

μ_{S} – Velocidade específica de consumo de substrato

μ_{x} – Velocidade específica de crescimento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
1.1 OBJETIVOS	29
1.1.1 Objetivo Geral	29
1.1.2 Objetivos Específicos.....	29
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	31
2.1 A AGROPECUÁRIA E O MEIO AMBIENTE.....	31
2.2 PROBLEMA AMBIENTAL DO NITROGÊNIO	34
2.3 PROCESSO CONVENCIONAL PARA REMOÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO	37
2.3.1 Nitrificação.....	37
2.3.2 Desnitrificação	38
2.4 PROCESSOS BIOLÓGICOS PARA REMOÇÃO DE NITROGÊNIO VIA NITRITO	40
2.4.1 Nitrificação e Desnitrificação via Nitrito.....	41
2.4.2 Oxidação Anaeróbia do Íon Amônio (ANAMMOX).....	42
2.4.3 Processo de Nitrificação Parcial.....	44
2.4.4 Processos de Desamonificação.....	50
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	59
3.1 REATORES PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA.....	59
3.1.1 Cultivo da Biomassa Nitritante	59
3.1.2 Cultivo da biomassa ANAMMOX	62
3.2 REATOR PARA DESAMONIFICAÇÃO (DMX).....	65
3.2.1 Sistema experimental	65
3.2.2 Inóculo utilizado	66
3.2.3 Afluente sintético	66
3.2.4 Operação e monitoramento analítico.....	67
3.2.5 Ensaio cinético de consumo de substrato	67
3.2.6 Ensaio de atividade nitrificante específica	69
3.2.7 Ensaio de atividade ANAMMOX específica	71
3.2.8 Ensaio de atividade DMX específica.....	72
3.2.9 Ajuste dos modelos matemáticos aos dados experimentais	73
3.3 METODOLOGIAS E TÉCNICAS LABORATORIAIS	74
3.3.1 Determinação de pH.....	74

3.3.2	Determinação de oxigênio dissolvido (OD)	74
3.3.3	Alcalinidade total	74
3.3.4	Nitrogênio amoniacal total (NAT)	75
3.3.5	Nitrito e Nitrato	75
3.3.6	Sólidos suspensos totais, fixos e voláteis	75
3.3.7	Cálculos de carga (c)	75
3.3.8	Balanco de massa e eficiência de remoção de nitrogênio	76
3.3.9	Cálculo das concentrações de amônia livre (AL) e ácido nitroso livre (ANL)	78
3.3.10	Amostragem e quantificação dos gases de efeito estufa (GEE)	78
3.3.11	Caracterização da biomassa	79
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
4.1	ENSAIOS DE ATIVIDADE ESPECÍFICA PARA OBTENÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS DOS INÓCULOS PRIMÁRIOS	83
4.1.1	Atividade específica nitrificante	83
4.1.2	Atividade específica ANAMMOX	86
4.2	ATIVAÇÃO E PRODUÇÃO DE BIOMASSA PARA INÓCULO DO REATOR DMX	91
4.2.1	Estabelecimento do processo de nitrificação parcial no reator RBS	91
4.2.2	Estabelecimento do processo de oxidação anaeróbia da amônia no reator ANAMMOX	94
4.3	DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES DOS INÓCULOS DO REATOR DMX	95
4.3.1	Atividade nitritante	95
4.3.2	Atividade ANAMMOX	97
4.3.3	Cálculo da razão de inóculo utilizado	98
4.4	PARTIDA DO REATOR DMX E INFLUÊNCIA DAS CARGAS DE NITROGÊNIO APLICADAS	99
4.5	ESTABELECIMENTO DO PROCESSO DE DESAMONIFICAÇÃO	101
4.6	EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE NITROGÊNIO	103
4.7	ENSAIOS DE ATIVIDADE DMX ESPECÍFICA	108
4.8	FATORES DE CONTROLE DO PROCESSO DMX	113

4.8.1 Temperatura	114
4.8.2 Oxigênio dissolvido	115
4.8.3 pH e alcalinidade	117
4.8.4 Amônia livre (AL) e ácido nitroso livre (ANL)	119
4.8.5 Crescimento da biomassa	121
4.8.6 Emissão de gases de efeito estufa	122
4.9 COMPARAÇÃO ENTRE OS PROCESSOS	123
4.10 AVALIAÇÃO MOLECULAR DA BIOMASSA PRESENTE NO REATOR DMX	127
5 CONCLUSÕES	131
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	133
REFERÊNCIAS	135
APÊNDICE A – Ensaio de respirometria da biomassa utilizada como inóculo.	151
APÊNDICE B – Ensaio cinéticos de consumo de substrato referentes à atividade específica da biomassa ANAMMOX utilizada como inóculo.	157
APÊNDICE C – Ensaio cinéticos de consumo de substrato referentes à atividade específica do reator DMX.	163

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, as cadeias produtivas das mais diversas áreas vêm sofrendo pressões quanto aos impactos ambientais que causam. Por sua vez, a agropecuária desponta como uma das atividades de maior expressão no país, e apesar de exercer extrema importância econômica e social, é apontada como uma das principais atividades do agronegócio brasileiro responsável pelo impacto ambiental das águas superficiais e subterrâneas.

Os problemas ambientais causados pelos impactos da agropecuária começaram a aparecer na medida em que foram adotados os Sistemas de Produção de Animais Confinados (SPACs). Esse modelo de produção concentra um grande número de animais em pequenas áreas, objetivando a diminuição dos custos produtivos e melhoria nos controles sanitários (KUNZ *et al.*, 2009). Em contrapartida, um grande volume de efluente é gerado na atividade produtiva e, associado à elevada concentração de nutrientes (principalmente o nitrogênio e fósforo) presentes nos dejetos dos animais, tornaram-se o principal desafio de manejo da atividade.

Uma das técnicas amplamente utilizadas com os efluentes agropecuários é a estocagem e disposição final no solo como biofertilizante. Contudo, a emissão de gases durante a estocagem em lagoas de armazenamento e a sobrecarga de nutrientes e metais no solo devido à disposição inadequada, são questões que tem limitado a utilização da técnica.

Com relação ao nitrogênio, o principal problema do mesmo como contaminante dos ecossistemas aquáticos e terrestres reside no potencial tóxico da amônia (NH_3) para os peixes e na eutrofização de ambientes lênticos e lóticos que o mesmo causa quando, em conjunto com o fósforo, é disponibilizado para as plantas. Além disso, os compostos de nitrogênio nos seus diferentes estados de oxidação, podem constituir graves riscos para a saúde humana, como indução a metahemoglobinemia (popular “síndrome do bebê azul”) e a formação de nitrosaminas de conhecido poder carcinogênico e mutagênico.

Nas águas residuárias da agropecuária, a maior parte do nitrogênio encontrado está sob forma de nitrogênio amoniacal (NH_3 e NH_4^+) e nitrogênio orgânico (uréia, aminoácidos e proteínas). Porém, dependendo das condições do meio, pode também ser encontrado em suas formas oxidadas: nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-).

Para minimizar os impactos causados pela falta de manejo e controle, os sistemas biológicos para remoção de compostos nitrogenados têm sido amplamente estudados (ZHU *et al.*, 2008; METCALF &

EDDY, 2003) e, preferencialmente, adotados no tratamento de águas residuárias. Isso porque podem atingir elevadas eficiências de remoção das espécies nitrogenadas com baixo preço relativo e pouca mão-de-obra, quando comparados a alguns processos de tratamento físico-químicos (EPA, 1993).

Geralmente, o tratamento biológico para remoção de nitrogênio envolve o processo convencional de nitrificação autotrófica e desnitrificação heterotrófica. No entanto, se utilizado, esse processo demanda grande quantidade de oxigênio e alcalinidade para completar o ciclo de remoção. Sabendo disso, as pesquisas recentes em remoção de nitrogênio estão voltadas para melhorar a eficiência e reduzir custos, otimizando as estratégias de tratamento disponíveis ou buscando o desenvolvimento de novos processos capazes de eliminar altas cargas de nitrogênio nas águas residuárias. Via de regra, estes novos processos buscam realizar a eliminação do nitrogênio utilizando nitrito como acceptor de elétrons e não o nitrato (ZHANG *et al.*, 2011; YANG e YANG, 2011; YAMAMOTO *et al.*, 2006).

Recentemente, com base nas metodologias de identificação de micro-organismos e no tipo de metabolismo desenvolvido por populações específicas, foi descoberta a possibilidade da ocorrência de uma mistura de processos em um mesmo reator, no qual as bactérias aeróbias oxidadoras de amônia (BOA) encontram-se em situação de simbiose com as anaeróbias (ANAMMOX), perfazendo um consórcio mais efetivo para eliminação do nitrogênio (SLIEKERS *et al.*, 2002).

Esse processo, denominado desamonificação (DMX), trata-se de um novo segmento do ciclo do nitrogênio que combina o processo de nitrificação parcial com o processo ANAMMOX, ambos operando em conjunto e em um mesmo reator. Em termos de reação, o processo DMX consiste na oxidação parcial da amônia a nitrito (pela atividade das BOA) sob condições de oxigênio limitado e, subsequentemente, na conversão do nitrito produzido junto com parte do amônio remanescente a nitrogênio gasoso (pela atividade de bactérias ANAMMOX), com uma pequena produção de nitrato.

A grande vantagem desse sistema reside na simplicidade de um único reator para a completa remoção de nitrogênio via nitrito e na utilização do carbono inorgânico como fonte para o crescimento celular, o que torna o processo completamente autotrófico. Ainda, devido à lenta velocidade de crescimento das bactérias envolvidas no processo, o mesmo produz pouco volume de lodo, além de preservar parte do oxigênio durante a nitrificação parcial, reduzindo os custos com tratamento quando comparado ao processo convencional de nitrifica-

ção/desnitrificação (JETTEN *et al.*, 2001; STROUS *et al.*, 1998; VAN DE GRAAF *et al.*, 1996).

Usualmente, as pesquisas relacionadas a esse processo têm sido conduzidas a elevadas temperaturas (30-35°C) (VEYS *et al.*, 2010), pois as mesmas favorecem a atividade de ambas as bactérias. No entanto, estudos recentes vêm tornando economicamente atrativa a possibilidade de operar o processo em temperaturas mais baixas (25°C), mesmo que a eficiência de remoção de nitrogênio seja reduzida (CHANG *et al.*, 2013; CUI, 2012).

Embora muito estudado nos últimos anos, devido ao resultado do envolvimento de reações bioquímicas complexas e diversos microorganismos no processo, ainda existem desafios em torno da implementação do sistema em grande escala. Isso porque a influência de fatores externos como a concentração de substrato, bem como o crescimento bacteriano e otimização operacional ainda não estão totalmente claros nos trabalhos conduzidos em escala de laboratório, podendo causar inibição ou desequilíbrio do sistema. Sabendo disso, o estudo da cinética e modelagem do processo de desamonificação podem ser ferramentas valiosas para melhor compreender e utilizar essa tecnologia no futuro de forma mais eficiente.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a partida e estabelecimento do processo de desamonificação, bem como o estudo cinético das bactérias envolvidas, em um sistema de reator único com biomassa suspensa em escala laboratorial para a remoção de nitrogênio à temperatura ambiente.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver e monitorar reatores para produção e enriquecimento de biomassa nitrificante e ANAMMOX para utilização como fonte de inóculo;
- Partir, operar e estabelecer o processo de desamonificação em um sistema de reator único com biomassa em suspensão à temperatura ambiente;

- Realizar ensaios de atividade específica nitrificante, ANAM-MOX e de desamonificação para modelagem matemática e obtenção de parâmetros cinéticos;
- Caracterizar a biomassa presente no reator DMX por análise de FISH (*Fluorescent In Situ Hybridisation*) e qPCR (reação em cadeia da polimerase em tempo real).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A AGROPECUÁRIA E O MEIO AMBIENTE

A globalização das cadeias produtivas fez com que fosse difundido um mesmo padrão de produção em todo o mundo. Essa homogeneização da atividade faz com que um país, para permanecer competitivo, minimize os custos de produção, otimize a produtividade e persiga padrões de qualidade da matéria-prima estabelecidos pelo mercado internacional (VON SPERLING, 2005).

Neste contexto, a agropecuária brasileira, a exemplo de outros setores produtivos do agronegócio, cresceu significativamente nos últimos anos, ocupando lugar de destaque na matriz produtiva do país e se destacando como uma atividade de extrema importância no âmbito econômico e social (PALHARES, 2011; GASQUES, 2004). Essa condição tornou o Brasil um dos maiores produtores do mundo (USDA, 2013), acoplando nessa atividade um de seus pilares de desenvolvimento.

Foi decisiva para alavancar esse cenário industrial a implantação do regime de integração em SPACs, no qual as agroindústrias participam com a assistência técnica e insumos e os criadores com as instalações e mão de obra (HHIBAR, 2010). Contudo, como consequência da intensificação da produção mediante o aumento de número de animais por unidade de área, novas pressões sobre o meio ambiente em relação ao impacto ambiental altamente negativo estão acontecendo (WILLIAMS, 2002; KUNZ *et al.*, 2009, HHIBAR, 2010). Isso porque apesar do atual modelo de criação em SPACs ser reconhecidamente de alta produtividade e regularidade de produção, o setor gera grandes quantidades de efluentes, que associados a alta concentração de matéria orgânica e nutrientes são responsáveis pelos principais impactos causados aos ecossistemas aquáticos e terrestres (SPELLMAN e WHITING, 2007).

A geração de grandes volumes de efluentes é fortemente vinculada ao grande desperdício de água nas instalações, o que propicia problemas de manejo, armazenamento, distribuição e poluição ambiental (HHIBAR, 2010).

Segundo Palhares (2011), o consumo de água nos sistemas de produção de suínos pode chegar a $810 \text{ L animal}^{-1} \text{ mês}^{-1}$. Já nos sistemas de produção de frango de corte estima-se $8,58 \text{ L animal}^{-1} \text{ mês}^{-1}$ (BELLAVER, 2003) e por fim, na criação de bovinos, são estimados 1.550 L de água consumidos mensalmente por cada animal confinado (MANSO e FERREIRA, 2007). Em síntese, na Tabela 1, são apresentados valores

médios para a produção diária de dejetos de acordo com a categoria e o tipo de animal.

Tabela 1 – Produção média diária de dejetos gerados nas diferentes fases produtivas por tipo de animal.

Animal	Categoria	Dejetos gerados (L d ⁻¹ animal ⁻¹)
Suínos	25-100 kg	7,00
	Porcas em gestação	16,00
	Porcas em lactação	27,00
	Machos	9,00
	Leitões desmamados	1,40
Bovinos	Terminação	29,61
	Em crescimento	22,93
Bovinos de leite	Vacas em lactação	67,96
	Vacas secas	36,81
	Novilha	22,09
Aves	Frangos de corte	0,10
	Peru Macho	0,28
	Peru Fêmea	0,16
	Pato	0,16

Fonte: (Adaptado de ASAE, 2005).

Para a redução desse volume, o controle de desperdícios de água e aplicação de conceitos baseados em produção mais limpa na pecuária brasileira tem muito no que melhorar para poder ser comparada à dos centros produtores mais adiantados, que se caracterizam pelo rigor no controle de eventos geradores de desperdícios (WILLIAMS, 2002). No Brasil, devido a falta de controle nesse aspecto, as águas residuárias devem ser tratadas como forma de mitigar os impactos ambientais que causam (KUNZ *et al.*, 2009).

O procedimento comumente utilizado é o da acumulação dos dejetos para posterior disposição nos solos como fertilizantes. Durante muito tempo essa técnica foi predominantemente utilizada como manejo em todo mundo, por ser um método de descarte econômico e por conter altos níveis de nutrientes que são vistos pelo homem como úteis para a fertilização da terra (GRADY *et al.*, 1999; DARTORA *et al.*, 1998).

As aplicações de dejetos brutos no solo, seja pelo uso de equipamentos transportadores, seja pelo uso de equipamentos de irrigação,

deve levar em consideração os tipos de solo e suas capacidades de uso específico (balanço de massa solo x planta), para se evitar os desequilíbrios químicos, físicos e biológicos no meio, além da contaminação dos recursos hídricos (CERVANTES, 2009; SAMPAIO *et al.*, 2010).

Quando lançadas sem um correto tratamento, os dejetos da pecuária favorecem o crescimento de micro-organismos, diminuem o oxigênio dissolvido da água (fruto da alta atividade microbiana), causam a eutrofização de águas de superfície (pelo aporte de N e P), beneficiam o impacto de antibióticos e desinfetantes em comunidades da microbiota da terra, possuem potencial de disseminação de patógenos, além da presença de maus odores e do aparecimento de vetores de contaminação como insetos e roedores, dentre outros problemas (HHIBAR, 2010, BURKHOLDER *et al.*, 2007).

Os elevados níveis de contaminação dos efluentes agropecuários estão diretamente relacionados à sua característica, que além da significativa concentração de matéria orgânica, possui uma elevada concentração de nutrientes e uma ampla variabilidade, dificultando uma generalização dos valores mais comuns conforme os dados da Tabela 2.

Tabela 2 – Composição média dos efluentes agropecuários de acordo com o tipo de animal.

Variáveis (kg dejetos/1000 kg de animal vivo)	Tipo de animal ¹			
	Gado de leite	Gado de corte	Frango de corte	Suíno
Dejeto total	86,0	58,0	85,0	84,0
Sólidos Totais	12,0	8,50	22,0	11,0
Sólidos Voláteis	10,0	7,20	12,0	8,50
DBO	1,60	1,60	*	3,1
DQO	11,0	7,80	16	8,40
pH	7,0	7,0	*	7,5
N-NTK	0,45	0,34	1,1	0,52
N-NH ₃	0,079	0,086	*	0,29
P-Total	0,094	0,092	0,3	0,18

¹Todos os valores em peso úmido

*Não analisado

Fonte: Adaptado de KUNZ *et al.*, 2008.

Sabendo disso, já não se pode mais omitir ou desconsiderar a escassez de terras e sobrecarga de dejetos por unidade de área nas proprie-

dades produtivas. Convém destacar que a poluição por águas residuárias agropecuárias vem se agravando nos principais centros produtores, pois armazenagem e distribuição não significam tratamento. Por isso, existe a necessidade de se buscar outras alternativas de reciclagem que não dependam do uso de dejetos como fertilizante em lavouras (SCHMIDELL, 2007).

Também já não se pode negar a crescente percepção de que a poluição ambiental causada pelas atividades produtivas deverá ser tratada dentro de uma visão mais abrangente que envolva os conceitos de sustentabilidade ambiental. A busca pelo tratamento dos efluentes deve ser fundamentada não somente para a redução do impacto causado ao meio ambiente, mas também para reutilização do efluente tratado, com o objetivo de diminuir o consumo de água tratada nos sistemas produtivos (SEGANFREDO, 2007).

Devido a isso, o grande desafio resulta em utilizar corretamente os dejetos e tratar o excesso de acordo com os padrões de emissão da Legislação Ambiental em vigor. Sabe-se que os parâmetros cobrados pela legislação estão se tornando cada vez mais restritivos, bem como na maioria dos casos não há disponibilidade de áreas cultiváveis que viabilizem a disposição dos efluentes no solo. Assim, se faz necessário o uso de estratégias de tratamento com capacidade de remover elevadas cargas de nutrientes, a fim de evitar possíveis contaminações no ambiente e cumprir com a legislação vigente (CONAMA, 2011).

Os principais objetos de preocupação, pelo menos neste momento, devem ser o nitrogênio e o fósforo, pelo seu alto impacto ambiental sobre o solo e a água. A remoção de fósforo já se encontra consolidada, e pode ser facilmente realizada por processos químicos (precipitação), evitando o acúmulo deste composto no solo e ainda favorecendo seu uso como biofertilizante (FERNÁNDEZ *et al.*, 2012). Quanto ao nitrogênio, este é o nutriente que exige maiores cuidados, pois além de limitar (quando em falta) o desenvolvimento da maioria das culturas agrícolas, é mais suscetível a transformações biológicas e perdas gasosas, seja na armazenagem ou no solo, o que torna sua remoção ainda mais complexa (BURKHOLDER, 2007).

2.2 PROBLEMA AMBIENTAL DO NITROGÊNIO

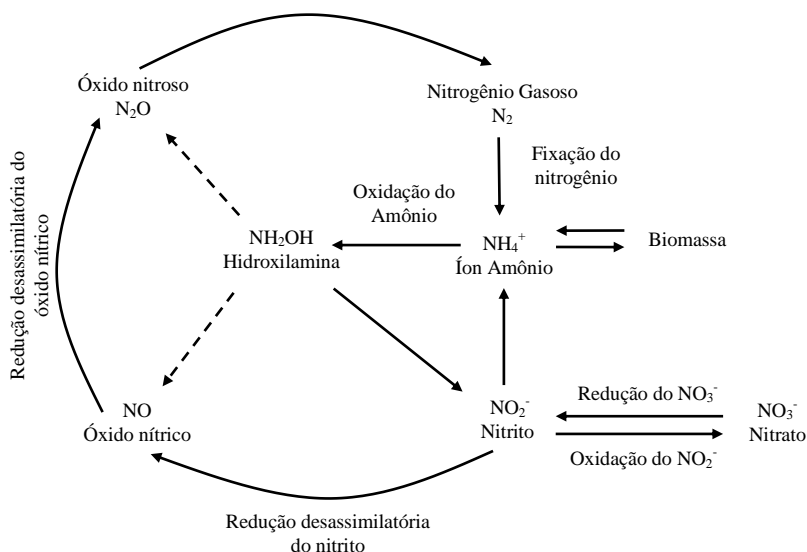
No sistema aquático, inúmeras, complexas e naturais ações ocorrem e deverão sempre ocorrer para se ter o que se chama de sistema em equilíbrio. No caso do ciclo de nitrogênio, essas ações são realizadas por uma complexa combinação de reações químicas e bioquímicas envol-

vendo vários micro-organismos (ZHU *et al.*, 2008; CERVANTES *et al.*, 2009).

O nitrogênio é um nutriente que está presente na natureza sob diversas formas e estados de oxidação, sendo as espécies químicas de maior relevância o nitrogênio orgânico dissolvido e particulado, o nitrogênio amoniacal ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$), nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) (BAILEY *et al.*, 2002; GERARDI, 2006).

De uma forma geral, as substâncias orgânicas nitrogenadas podem ser degradadas por sistemas microbianos gerando NH_3 , enquanto que o nitrogênio gasoso (N_2) pode ser convertido em outra forma, principalmente NH_3 , por bactérias fixadoras de nitrogênio. A amônia ainda pode ser assimilada pelas bactérias ou oxidada a nitrito, o que ocorre com certa frequência em efluentes na presença de oxigênio. Na Figura 1 estão representadas as transformações dos compostos nitrogenados no ciclo do nitrogênio, resultantes do metabolismo microbiano nos processos de fixação, nitrificação, desnitrificação, redução desassimilatória do nitrato e redução assimilatória do nitrito (YE e THOMAS, 2001; SIAS *et al.*, 1980).

Figura 1 – Representação esquemática das reações envolvidas no ciclo do nitrogênio.



Fonte: (Adaptado de YE e THOMAS, 2001).

Em solução aquosa, a relação entre a concentração das duas formas de nitrogênio amoniacal, NH_3 e NH_4^+ , é atribuída ao pH e à temperatura da solução. O equilíbrio ocorre a pH 9,25 onde se estabelece 50% de ambas as formas. Em pH abaixo do ponto de equilíbrio, há a predominância do íon NH_4^+ , já em valores de pH acima de 9,25 o equilíbrio é deslocado para formação de NH_3 (METCALF e EDDY, 2003).

Sabendo disso, pode-se conhecer a presença e estimar o grau de estabilização da matéria orgânica presente em efluentes pela verificação da forma como estão presentes os compostos de nitrogênio na água residual. O nitrogênio presente nos dejetos frescos de animais está quase todo combinado sob a forma de proteína e uréia, sofrendo oxidação primeiramente para amônia, depois para nitritos e por último para nitratos, sua forma mais estável e oxidada (METCALF e EDDY, 2003).

Quanto à problemática ambiental, elevadas concentrações de nitrogênio amoniacal podem ter graves implicações ecológicas, como por exemplo, influenciar fortemente a dinâmica do oxigênio dissolvido no meio, uma vez que para oxidar 1 mg de NH_3 são necessários 4,6 mg de O_2 (CERVANTES, 2009). Além disso, sob o ponto de vista de saúde pública, os compostos de nitrogênio nos seus diferentes estados de oxidação podem constituir graves riscos para a saúde humana. O nitrato pode causar metahemoglobinemia (popular “síndrome do bebê azul”), fruto da redução do NO_3^- a NO_2^- por bactérias do trato intestinal e consequente oxidação do Fe^{2+} a Fe^{3+} da hemoglobina, formando metahemoglobina que é incapaz de se ligar ao O_2 , impedindo assim as trocas gasosas no organismo humano. O nitrito ainda pode se combinar com aminas secundárias, provenientes da dieta alimentar, formando nitrosaminas que apresentam sabido poder carcinogênico e mutagênico (BITTON, 2005).

Além disso, as formas de nitrogênio (juntamente com o fósforo) podem ser disponibilizadas para as plantas aquáticas, contribuindo para eutrofização de ambientes lênticos e lóticos, bem como o acúmulo de nutrientes e metais no solo (SANT'ANNA Jr, 2010; BITTON, 2005).

Frente aos riscos ambientais, as águas residuárias das atividades agropecuárias necessitam atender a rigorosos padrões de concentração de nitrogênio para serem descartados ao final do tratamento. Em virtude disso, são crescentes as exigências quanto aos critérios de manejo de dejetos, tornando-se significativamente mais restritivos e acarretando a necessidade da evolução nos processos de tratamentos de efluentes que conduzam a uma redução satisfatória na concentração de nutrientes (GRADY *et al.*, 1999; CONAMA, 2011).

2.3 PROCESSO CONVENCIONAL PARA REMOÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

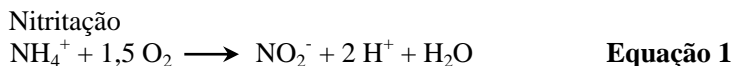
Dentre as alternativas para remoção de compostos nitrogenados nas águas residuárias, os processos biológicos se sobressaem econômica e tecnicamente pela elevada eficiência e menor custo operacional, além da facilidade em remover carbono, quando comparados a alguns processos físico-químicos (EPA, 2003).

A forma mais convencional de eliminação do nitrogênio de uma água residuária consiste na nitrificação autotrófica e desnitrificação heterotrófica. Na nitrificação, as bactérias oxidadoras de amônia (BOA) oxidam amônia a nitrito e em seguida, as bactérias oxidadoras de nitrito (BON) oxidam o nitrito a nitrato. Subsequentemente, ocorre a desnitrificação devido a conversão do nitrato a nitrogênio gasoso (N₂) (GRADY *et al.*, 1999).

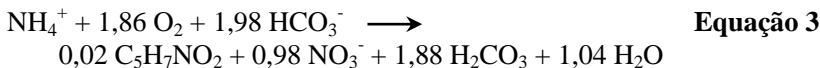
2.3.1 Nitrificação

A nitrificação é entendida frequentemente como a etapa limitante da remoção de nitrogênio, além de ser de vital importância para os novos processos de tratamento, motivo pelo qual é a etapa mais estudada dentre os processos (BITTON, 2005; CERVANTES, 2009; METCALF e EDDY, 2003).

O processo de nitrificação consiste na conversão do nitrogênio amoniacal a nitrato, ocorre em aerobiose (o oxigênio é usado como aceptor de elétrons) pela mediação de bactérias específicas e é realizado em dois passos sequenciais. No primeiro, denominado nitritação, ocorre a oxidação da amônia a nitrito, frequentemente pela ação de bactérias do gênero *Nitrosomonas* (pertencentes ao grupo das BOA) (Equação 1). No segundo, denominado nitratação, ocorre a conversão do nitrito a nitrato, frequentemente por bactérias do gênero *Nitrobacter* (pertencentes ao grupo das BON) (Equação 2) (SCHMIDELL e SPILLER, 2005).



Segundo Henze *et al.* (1997) a equação que determina a reação da oxidação da amônia a nitrato, como sendo uma única etapa, é apresentada na Equação 3.



Essas bactérias são autótrofas, ou seja, utilizam o dióxido de carbono (CO_2) como fonte de carbono e quimiolitotróficas, pois oxidam compostos inorgânicos para a obtenção de energia, caracterizando-se por serem bactérias de crescimento lento, o que obviamente traz consequências no que se refere às velocidades de conversão de substrato em células (GRADY *et al.*, 1999).

Outra observação importante é que, conforme ilustra a Equação 1, a primeira dessas etapas gera H^+ , ou seja, apresenta tendência a consumir alcalinidade, de forma a se ter queda do pH, o que pode limitar a velocidade do processo. Embora pareça bastante simples, este processo precisa ocorrer sob condições controladas, caso contrário os próprios produtos do metabolismo destas bactérias causarão aumento de toxicidade no meio, o que é muito nocivo para as mesmas (BITTON, 2005).

No mesmo contexto, alguns compostos podem provocar inibição do processo de nitrificação. Esta inibição pode ocorrer através da interferência com o metabolismo celular e logo com as reações envolvidas nos processos. O resultado é a diminuição da capacidade metabólica da biomassa e consequente redução de eficiência do processo. Por isso, é de extrema importância conhecer a cinética do processo e os efeitos que os interferentes causam na conversão do nitrogênio amoniacal, tendo principal atenção com os efeitos da temperatura, pH e oxigênio dissolvido (SCHIMIDELL *et al.*, 2007).

2.3.2 Desnitrificação

A desnitrificação é uma redução biológica do nitrato gerado na nitrificação para N_2 , a forma mais estável do nitrogênio, em condições de ausência de oxigênio. Este é um processo redutivo e desta maneira é uma forma de respiração anaeróbia, podendo ocorrer em diversos ambientes e utilizar diferentes fontes de carbono orgânico como doadores de elétrons para desnitrificação. A estequiometria do processo utilizando metanol como material orgânico durante a desnitrificação está descrita na Equação 4 (WEF, 2005). No entanto, outras fontes de carbono como ácido acético e etanol também podem ser usadas.



Segundo Wrage *et al.* (2001), os micro-organismos responsáveis pela desnitrificação são anaeróbios facultativos, ou seja, são capazes de utilizar tanto o oxigênio como o NO_3^- e NO_2^- como aceptores de elétrons. Devido a isso, o processo pode deixar de consumir o nitrogênio oxidado mesmo em baixas concentrações de oxigênio dissolvido, o que limitaria a eliminação do mesmo pelo processo de nitrificação/desnitrificação. Quanto aos intermediários do processo de desnitrificação, o óxido nítrico (NO) e óxido nitroso (N_2O), são produtos gasosos e se acumulam no meio quando suas enzimas são inibidas, principalmente em baixos valores de pH.

Além disso, a desnitrificação é importante especialmente para afluentes com baixa alcalinidade natural. Isso porque a perda de alcalinidade pela produção de ácido durante a nitrificação pode ser recuperada pela desnitrificação (Equação 4). Segundo Von Sperling (1997), para completa nitrificação são consumidos 7,1 mg de alcalinidade (como CaCO_3) para cada 1 mg de N-NH_4^+ oxidado a N-NO_3^- . Subsequentemente, 3,6 mg de alcalinidade (como CaCO_3) é recuperada para cada 1 mg de N-NO_3^- reduzido no processo de desnitrificação heterotrófica. Isso quer dizer que em sistemas onde ocorrem a nitrificação, o pH pode reduzir-se a valores inaceitavelmente baixos, mas, se no mesmo sistema, ocorrer a desnitrificação, cerca de metade da alcalinidade consumida pode ser recuperada.

Por outro lado, as bactérias heterotróficas que estão envolvidas neste processo requerem carbono orgânico como forma de obtenção de energia (BITTON, 2005). A presença de matéria orgânica é fundamental, pois a mesma age como doadora de elétrons. Vários são compostos orgânicos, que podem servir como substratos orgânicos ou doadores de elétrons, para desnitrificação. Qualquer composto oxidável pelo oxigênio pode servir como doador de elétrons ao nitrato, como por exemplo: açúcares (sacarose); álcoois (metanol e etanol); ácido acético; entre outras (EVANS e FURLONS, 2011).

Vários são os micro-organismos capazes de promover a desnitrificação, como por exemplo as do gênero *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, etc (BITTON, 2005).

2.4 PROCESSOS BIOLÓGICOS PARA REMOÇÃO DE NITROGÊNIO VIA NITRITO

Atualmente, muitas técnicas para remoção de carbono nos efluentes da pecuária já se encontram consolidadas, a grande maioria baseada na digestão anaeróbia, resultando em um efluente com baixa relação carbono/nitrogênio. A falta de carbono dificulta a remoção do nitrogênio solúvel pelo processo de nitrificação/desnitrificação. Isso porque efluentes que apresentam uma baixa relação carbono/nitrogênio (C/N) podem não ter carbono orgânico biodisponível suficiente para uma completa desnitrificação, fazendo-se necessária a adição de uma fonte externa de carbono orgânico. Além disso, a eficiência de remoção de nitrogênio nestes sistemas é limitada pela razão de reciclo (SANT'ANNA Jr, 2010).

Quando se têm efluentes muito concentrados, há dificuldades no dimensionamento e operação do sistema convencional, motivo pelo qual têm surgido novas propostas para realizar essa tarefa. As pesquisas recentes em remoção de nitrogênio estão voltadas para melhorar a eficiência e reduzir custos, otimizando as estratégias de tratamento disponíveis ou buscando implementar novos processos e, possivelmente, novos micro-organismos capazes de converter nitrogênio amoniacal em nitrogênio gasoso, sua forma inerte (CERVANTES, 2009).

Todos esses novos processos buscam realizar a eliminação do nitrogênio utilizando nitrito como aceptor de elétrons e não o nitrato, pois há economia clara de oxigênio para oxidação do amônio. Schmidell *et al.* (2007), calculando o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (kla) para distintos valores de tempo de retenção hidráulico, observaram que o valor do kla é consideravelmente menor para a oxidação a nitrito do que para nitrato, o que resulta em economia de energia para esse processo. Outra vantagem é a economia de composto orgânico para desnitrificação, isto quando ela é realizada por culturas heterótrofas (RUIZ *et al.*, 2006).

Para se ter nitrito disponível é necessário realizar a nitratação (ou nitrificação parcial), em que a subsequente oxidação do nitrito para nitrato seja impedida. Segundo Wiesmann *et al.* (2007), a reação de oxidação da amônia é de 3,0 a 3,8 vezes mais energética (240 a 350 KJ.mol⁻¹) do que a oxidação do nitrito (65 a 90 KJ.mol⁻¹). Assumindo que o crescimento celular das bactérias envolvidas nesse processo é proporcional à energia liberada na reação das mesmas, pode-se afirmar que o crescimento das BOA é mais favorecido do que o das BON, o que acaba sendo vantajoso quando o objetivo é acumular nitrito no reator.

Devido ao controle requerido, algumas dificuldades quanto ao estabelecimento desses processos são encontradas, principalmente em se tratando de longos períodos de operação. Também, a fase estacionária normalmente é difícil de ser atingida. Além disso, alguns cuidados devem ser tomados com a maioria desses processos quanto à possível eliminação de nitrito remanescente para o meio ambiente, isso por causa da considerável toxicidade do mesmo.

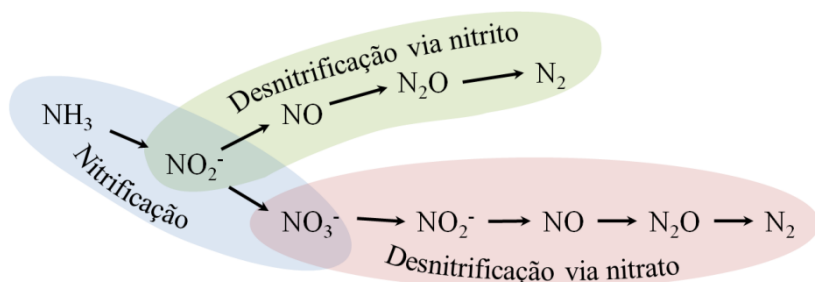
As novas propostas de processos para remoção de nitrogênio via nitrito presentes na literatura serão mencionados com maiores detalhes na sequência.

2.4.1 Nitrificação e Desnitrificação via Nitrito

Diferente do processo convencional de nitrificação/desnitrificação via nitrato, no processo de nitrificação/desnitrificação via nitrito, a nitrificação e a desnitrificação são mediadas pela presença de NO_2^- . Esse processo é baseado no fato de que o nitrito é o produto intermediário tanto do processo de nitrificação quanto do processo de desnitrificação, por isso, pode ser produzido durante a nitrificação e subsequentemente reduzido a N_2 na desnitrificação seguinte (CIUDAD *et al.*, 2005; RUIZ *et al.*, 2006).

Através da Figura 2 é possível visualizar os caminhos da nitrificação, desnitrificação via nitrato e desnitrificação via nitrito. Pode se observar que na desnitrificação via nitrito, tem-se uma redução no caminho de oxidação da amônia, não se fazendo necessária a oxidação do NO_2^- para NO_3^- . Como vantagem, tem-se 25% de redução no consumo de oxigênio na fase aeróbia, o que implica em 60% de economia de energia em todo o processo. Além disso, a demanda de doadores de elétrons para a desnitrificação é 40% menor e a velocidade de desnitrificação via nitrito é de 1,5 a 2 vezes maior do que a velocidade de desnitrificação via nitrato, o que é tecnicamente viável e economicamente favorável, especialmente quando se tratam de efluentes com alta concentração de amônia ou baixa relação C/N (YANG e YANG, 2011).

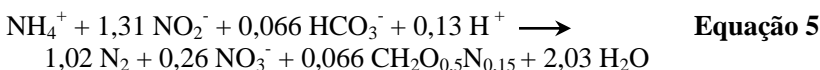
Figura 2 – Esquema representativo do caminho da nitrificação, desnitrificação via nitrito e desnitrificação via nitrato.



2.4.2 Oxidação Anaeróbica do Íon Amônio (ANAMMOX)

Com base nas metodologias de identificação de micro-organismos e no tipo de metabolismo desenvolvido por populações específicas, foi recentemente descoberto a existência de um novo segmento do ciclo do nitrogênio, conhecido como oxidação anaeróbica do íon amônio (ANAMMOX) (MULDER *et al.*, 1995). Durante a última década, o processo ANAMMOX evoluiu de uma parte bastante inexplorada do ciclo biológico do nitrogênio, tornando-se uma peça chave no ciclo global do mesmo.

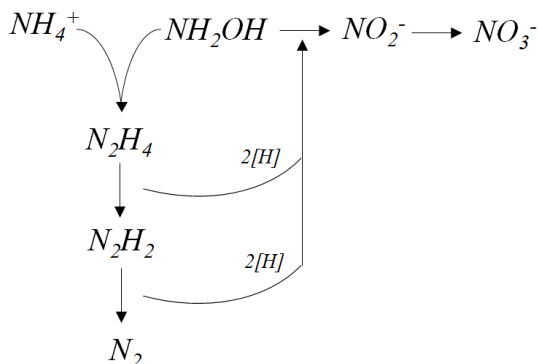
Este processo trata-se de uma rota alternativa que consiste na oxidação anaeróbica do íon amônio, via micro-organismos específicos, diretamente a N_2 , utilizando nitrito como acceptor de elétrons, com uma pequena produção de nitrato. A energia livre para esta reação está na mesma ordem de grandeza que a energia livre do processo de nitrificação aeróbica, demonstrando que o processo de oxidação anaeróbica do amônio é tão favorável quanto o processo de nitrificação aeróbica. A estequiometria da oxidação anaeróbica do íon amônio está demonstrada na Equação 5 (STROUS *et al.*, 1998).



Os detalhes bioquímicos do processo ainda estão sob investigação, porém, a rota metabólica apresentada na Figura 3 indica que em uma primeira etapa amônio é oxidado pela hidroxilamina para formar hidrazina, importante composto intermediário. Então, os equivalentes de

redução derivados de NH_4^+ reduzem o nitrito para regenerar a hidroxilamina e formar N_2 . Parte do NO_2^- é levado a NO_3^- , o que geraria equivalentes de redução para fixação do CO_2 e consequente crescimento da biomassa (VAN DE GRAAF *et al.*, 1997).

Figura 3 – Possível rota metabólica da oxidação anaeróbica do íon amônio.



Fonte: (VAN DE GRAAF *et al.*, 1997).

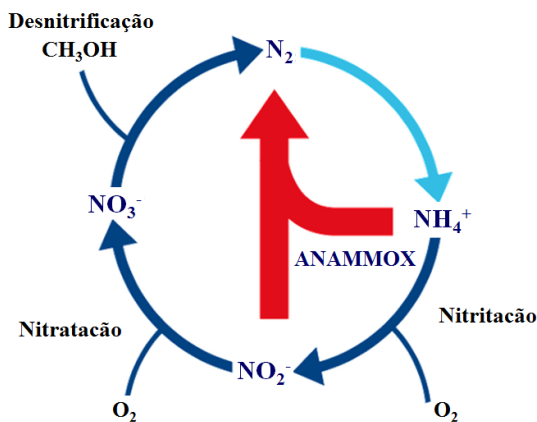
Devido à baixa velocidade de crescimento desse tipo de bactéria (9 a 11 dias para duplicação) o processo produz pouco volume de lodo, além de preservar aproximadamente 60% do oxigênio utilizado no processo, reduzindo os custos com tratamento, em comparação ao método convencional de nitrificação/desnitrificação (JETTEN *et al.*, 2001; STROUS *et al.*, 1998; VAN DE GRAAF *et al.*, 1996). A Figura 4 ilustra o ciclo biológico do nitrogênio com o processo de nitrificação/desnitrificação e o processo ANAMMOX. É visível a vantagem da redução no caminho de oxidação no processo ANAMMOX quando comparado ao processo de nitrificação/desnitrificação.

Os micro-organismos responsáveis por esta reação são quimiolitototróficos, anaeróbios, trabalham em temperaturas entre 20 e 43°C e sofrem inibição reversível na presença de oxigênio (STROUS *et al.*, 1998). Além do oxigênio, o processo pode ser afetado pelos efeitos do pH, temperatura, tensão de cisalhamento e concentração de substratos e produtos.

Desde a descoberta da oxidação anaeróbica de amônia, vários processos utilizando bactérias com atividade ANAMMOX têm sido imple-

mentados para otimizar a remoção autotrófica de nitrogênio em águas residuárias. Segundo Schierholt Neto (2007), que inoculou dois reatores e acompanhou seu enriquecimento, o dejetos de suíno mostrou-se como uma promissora fonte de inóculo para o enriquecimento de micro-organismos oxidadores anaeróbios de amônia. Esses micro-organismos foram posteriormente identificados e denominados *Brasilis concordiensis*, primeiro gênero de bactérias com atividade ANAMMOX encontrado no Brasil (VIANCELLI *et al.*, 2011).

Figura 4 – Ciclo biológico do nitrogênio, com processo de nitrificação, desnitrificação e ANAMMOX.



Fonte: (PAQUES, 2011, adaptado).

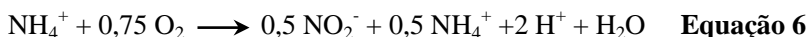
Tang et al. (2011) e Tsushima et al. (2007), atingiram elevadas cargas de remoção de nitrogênio trabalhando com reatores com atividade ANAMMOX, chegando a valores 100 vezes maiores quando comparado ao processo convencional de nitrificação/desnitrificação. Esses resultados demonstram a potencial eficiência que esses processos são capazes de atingir.

2.4.3 Processo de Nitritação Parcial

O processo de nitritação parcial trata-se de uma tecnologia baseada na seleção e favorecimento de bactérias oxidadoras de amônia que funciona como um pré-tratamento capaz de produzir um efluente com características ideais para alimentação de reatores com atividade ANAMMOX.

A estratégia para eficácia desse processo consiste em interromper a oxidação da amônia em nitrito – impedindo a oxidação a nitrato – e em paralelo, em controlar a taxa de amônia oxidada, de forma que se mantenha uma parcela de amônia residual. Em termos microbiológicos, isso significa evitar a atividade das BON, ou seja, as do gênero *Nitrobacter*, permitindo apenas a atividade das BOA, ou seja, as bactérias do gênero *Nitrosomonas* (ZHU *et al.*, 2008; YAMAMOTO *et al.*, 2006).

Em síntese, a nitrificação parcial deve, além de evitar a conversão de NO_2^- em NO_3^- pela inibição das BON, limitar a quantidade de amônia oxidada pela atividade das BOA. A fim de tornar a estequiometria de acordo com a reação ANAMMOX, é desejável que apenas 50% da amônia seja oxidada a nitrito, conforme descrito na Equação 6.



Neste contexto, não havendo a completa oxidação do NH_4^+ em NO_2^- , estimando uma conversão de apenas 50%, o efluente deste reator, contendo NH_4^+ e NO_2^- , estaria apto para alimentação de um posterior reator com atividade ANAMMOX, a fim de completar a degradação pretendida (ZHANG *et al.*, 2011).

No entanto, devido a seletividade, algumas dificuldades quanto ao estabelecimento desse processo são encontradas, principalmente em se tratando de longos períodos de operação. Devido a essa condição, as diferenças fisiológicas entre as BOA e BON se tornam extremamente importantes na estabilidade do processo. Isso porque, devido à maior sensibilidade das BON a determinadas condições do meio, algumas estratégias operacionais podem ser utilizados para influenciar a geração de nitrito pelo favorecimento das BOA (PRA, 2011).

Dentre as alternativas para favorecer o acúmulo de nitrito nos sistemas biológicos, as principais baseiam-se na regulação apropriada de parâmetros de controle como oxigênio dissolvido (OD), tempo de aeração, temperatura, tempo de retenção hidráulico (TRH), tempo de retenção de sólidos (TRS), pH, amônia livre (AL), ácido nitroso livre (ANL) e inibidores químicos. Contudo, é necessário avaliar além das vantagens e limitações, a viabilidade econômica do processo quando da utilização destas estratégias.

Neste sentido, na conversão de nitrogênio em águas residuárias agropecuárias não é possível generalizar uma única estratégia para a seletividade das BOA. Isso porque as características físico-químicas das águas residuárias variam de acordo com o processo produtivo e são dependentes de sua origem, por isso, dependendo do tipo de produção, o

desempenho dos parâmetros pode se apresentar mais ou menos eficiente (VON SPERLING, 2005).

2.4.3.1 Efeito da concentração de oxigênio dissolvido

Como se sabe, tanto as BOA como as BON são bactérias aeróbias, por isso utilizam o oxigênio como aceptor final de elétrons no processo de oxidação. No entanto, as BON exigem uma maior concentração de OD quando comparadas as BOA. Isso quer dizer que quando submetidas a baixas concentrações de OD, as BON demonstram maior sensibilidade, sofrendo clara inibição em sua atividade oxidante (JIANLONG e NING *et al.*, 2004).

Canziani *et al.* (2006), estudando a cinética de consumo de oxigênio, encontraram valores de afinidade da ordem de $0,3 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ para as BOA e de $1,1 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ para as BON. Além disso, Ciudad *et al.* (2005), relatam que a razão da concentração celular da população de bactérias oxidadoras de amônia em relação as bactérias oxidadoras de nitrito aumenta consideravelmente quando é restringido o OD do meio. Logo, baixas concentrações de oxigênio dissolvido são mais restritivas ao crescimento das BON, o que pode contribuir para o acúmulo de nitrito no sistema.

Do contrário, quando em condições de altas concentrações de OD ($> 2,5 \text{ mg L}^{-1}$), a nitrificação parcial pode ser convertida a completa nitrificação. Bae *et al.* (2002) estudaram a influência da concentração do oxigênio dissolvido sobre o acúmulo do nitrito, utilizando água residuária sintética com $50 \text{ mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$. O maior acúmulo de nitrito foi observado em concentrações de $1,5 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$. Já na concentração de $2,5 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$, houve disponibilidade de oxigênio para atividade das BON e, conseqüentemente, nitrato foi produzido e se acumulou no sistema.

Estes resultados indicam claramente a vantagem das BOA em relação as BON em ambientes com limitação de oxigênio, podendo este, ser um dos parâmetros utilizados como estratégia para inibição seletiva das BON, sem prejudicar a ação das oxidadoras de amônia (YOO *et al.*, 1999).

2.4.3.2 Efeito do tempo de aeração

Outra alternativa que vem sendo proposta para o controle da nitrificação parcial, além da concentração de OD, é o tempo de aeração (HIDAKA *et al.*, 2002; ZDRADEK, 2005). Isso porque a manutenção de concentrações de oxigênio estáveis em um sistema em escala real

pode ser uma tarefa difícil de alcançar, além do que, dependendo do fluxo e tempo de aeração, a nitrificação parcial pode ser convertida a uma completa nitrificação (ZHU *et al.*, 2008).

Neste contexto, a estratégia de intercalar períodos de aeração com períodos sem aeração, desde que bem planejados, pode resultar no acúmulo de nitrito sem a ocorrência da produção de quantidades significativas de nitrato. Inclusive, do ponto de vista prático, esta estratégia é mais simples do que imaginar o controle da concentração de OD em valores extremamente baixos, tendo em vista as dimensões dos sistemas para esta finalidade (YANG e YANG, 2011).

Peng *et al.* (2004) relataram que a nitrificação parcial foi atingida com êxito usando a estratégia de aeração intermitente, mesmo quando a temperatura diminuiu de 32 para 21°C. Pollice *et al.* (2002) realizaram testes com diferentes tempos de retenção de sólidos (TRS) sob condições de aeração contínua e intermitente, e relatam que a nitrificação parcial foi obtida sob condições de aeração intermitente, independente do TRS.

É importante salientar que a vazão de ar nos tanques de nitrificação interfere diretamente na quantidade de N₂O produzido que pode ser emitido para a atmosfera. Isso porque com baixas vazões de ar não se mantêm concentrações mínimas necessárias para nitrificação e com vazões elevadas pode ocorrer o *stripping* do N₂O (KAMPSCHREUR *et al.*, 2009). Por isso, o controle da aeração é um parâmetro que pode ser proposto como uma estratégia alternativa para alcançar o processo de nitrificação, no entanto, sua vazão deve ser controlada de modo que minimize a produção e emissão de N₂O.

2.4.3.3 Efeito da temperatura

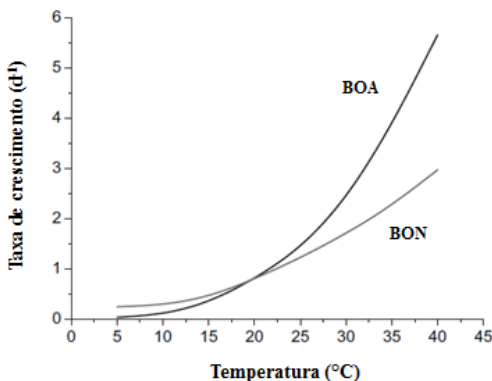
A temperatura é um parâmetro que influencia diretamente as taxas de crescimento das BOA e BON. Sabe-se que as BON apresentam atividade preponderante a temperaturas relativamente baixas (10 a 20°C), nas quais as BOA não são favorecidas. Por outro lado, em temperaturas mais elevadas (acima de 25°C) as BOA apresentam-se mais ativas, fato este que propicia a geração e acúmulo de nitrito (PRA *et al.*, 2012; VAN HULLE *et al.*, 2007).

Empregando a diferença da energia de ativação entre a oxidação da amônia e a oxidação do nitrito, tem-se 68 kJ mol⁻¹ e 44 kJ mol⁻¹ respectivamente. A elevada energia de ativação da oxidação da amônia faz com que este processo seja mais dependente da temperatura, por isso,

ocorrendo com maior facilidade em temperaturas mais elevadas (SCHMIDELL *et al.*, 2007).

A Figura 5 ilustra o efeito da temperatura sobre a velocidade de crescimento das BOA e das BON. Á 20°C, as BOA possuem velocidade específica máxima de crescimento maior (0,801 d⁻¹) do que as BON (0,788 d⁻¹) (HELLINGA *et al.*, 1998). Por outro lado, quando submetidas á 15°C, a velocidade de crescimento das BOA (0,523 d⁻¹) apresenta-se menor que das BON (0,642 d⁻¹). Portanto, as BON têm efeito dominante sobre as BOA em temperaturas abaixo de 15°C, enquanto que as BOA se sobressaem às BON a temperaturas acima de 20°C (VAN HULLE *et al.*, 2007). A temperatura mais alta não só promove o crescimento das BOA, mas também age expandindo as diferenças entre a velocidade de crescimento das BOA em relação as BON, o que permite visualizar uma maior possibilidade de acúmulo de nitrito do que nas temperaturas mais baixas (YOO *et al.*, 1999).

Figura 5 – Efeito da temperatura sobre a velocidade de crescimento das BOA e das BON.

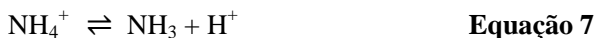


Fonte: (ZHU *et al.*, 2008, adaptado).

2.4.3.4 Efeitos do pH, Amônia Livre e Ácido Nitroso Livre

O pH tem significativa importância na nitrificação por reger o equilíbrio das formas de amônio/amônia ($\text{NH}_4/\text{NH}_3^+$) e nitrito/ácido nitroso ($\text{NO}_2^-/\text{HNO}_2$). Segundo Anthonisen *et al.* (1976), mantendo o pH do meio entre 5,5 e 7,8 não ocorrerá inibição da atividade nitritante em concentrações de N-NO_2^- e N-NH_3 abaixo de 100 mg L^{-1} . A formação

de NH_3 e HNO_2 obedece ao equilíbrio de dissociação das Equações 7 e 8 respectivamente, dependendo do pH e da temperatura.



Determinadas concentrações de amônia livre (AL) e ácido nitroso livre (ANL) exercem efeito inibitório sobre o metabolismo da biomassa nitrificante (ANTHONISEN *et al.*, 1976; KIM *et al.*, 2008; PARK e BAE, 2009) e, conseqüentemente, forte influência nas taxas de oxidação de amônia e nitrito. Suas concentrações dependem, além do equilíbrio do pH e temperatura, da concentração de amônio e nitrito, respectivamente. Por isso, mesmo em valores de pH próximos da neutralidade, dependendo da concentração de amônia total e nitrito do meio, pode existir inibição de BOA ou BON pela presença de AL ou ANL em excesso (ANTHONISEN *et al.*, 1976).

Estudos já realizados (KIM *et al.*, 2008; LIANG *et al.*, 2011; ANTHONISEN *et al.*, 1976; CHUNG *et al.*, 2005), demonstram que as BON são mais sensíveis a AL do que as BOA, podendo ser inibidas em uma concentração de 0,1 – 10,0 mg L⁻¹, enquanto que as BOA podem tolerar concentrações maiores de AL, 10 – 150 mg L⁻¹. Assim, quando a concentração de AL for maior que 150 mg L⁻¹, será suficiente para inibir tanto BOA como BON, e o nitrogênio amoniacal irá se acumular no sistema. Já em concentrações mais baixas de AL, 10 mg L⁻¹, somente as BON serão inibidas, e nitrito irá se acumular no sistema (PRA *et al.*, 2010). Essa inibição é considerada temporária, recuperando a atividade das BON quando as concentrações de AL forem reduzidas para menos de 10 mgN-NH₃ L⁻¹ (ZHU *et al.*, 2008).

A inibição das bactérias por AL parece consensual, porém, os limites de concentração que causam esse efeito diferem segundo os autores e, evidentemente, dependem de vários fatores, como prévia aclimação do sistema, estado fisiológico das células e nível de agregação (células livres, flocos, biofilmes). Esses fatores limitam a estratégia de controlar a geração de nitrito apenas pela presença de AL, no entanto, é um fator de importância a ser considerado.

Por outro lado, dependendo do equilíbrio do sistema, inibição por ANL também pode ocorrer. Anthonisen *et al.* (1976) relatam que a nitrificação pode ser inibida por ANL em uma concentração entre 0,22 e 2,8 mg L⁻¹. Da mesma forma, a medida que os valores de pH são reduzidos,

o equilíbrio é deslocado para acréscimo nas concentrações de ANL). Conforme já mencionado, esse composto apresenta-se tóxico para ambas as bactérias mesmo em baixas concentrações, o que justifica a importância de evitar sua formação.

2.4.3.5 Efeito do tempo de retenção de sólidos

Independentemente da existência ou não de recirculação de lodo, pode-se utilizar o conceito de tempo de retenção de sólidos (TRS) ou idade do lodo. A diferença é que em sistemas sem recirculação e mistura completa, o TRS, é igual ao TRH. Já em um sistema com recirculação, ou de biomassa aderida, devido a separação e adensamento dos sólidos, esses permanecem mais tempo no sistema do que o líquido. Isso explica a maior eficiência de sistemas com recirculação quando comparados com os sistemas sem recirculação para um mesmo volume de reator (VON SPERLING, 1997).

Neste contexto, Sant'Anna Jr. (2010) relata que estudos já realizados registram tempos mínimos de duplicação celular de 7-8 h para as BOA e de 10-13 h para as BON. Além disso, a velocidade de crescimento das BOA tende a ser maior do que a velocidade de crescimento das BON quando submetidas a temperaturas acima de 25°C (vide tópico 2.4.3.3). Assim, em sistemas com biomassa em suspensão, poderia haver favorecimento da população das BOA, que apresentaria maior velocidade de crescimento, por meio da escolha de um TRS adequado (HELLINGA *et al.*, 1998).

2.4.4 Processos de Desamonificação

Recentemente, Sliemers *et al.* (2002), e seu grupo de estudo observou a possibilidade da ocorrência de uma certa mistura de processos em um mesmo reator, no qual as bactérias aeróbias oxidadoras de amônia estariam em situação de simbiose com as anaeróbias, de forma a perfazerem um consórcio mais efetivo para eliminação do nitrogênio.

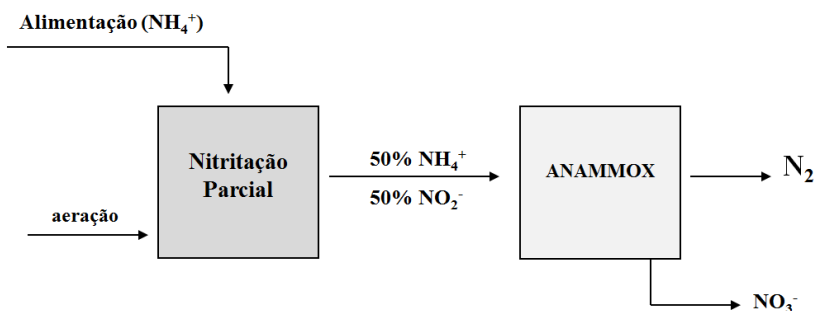
Esse processo, atualmente denominado desamonificação, trata-se da combinação do processo de nitrificação parcial com o processo ANAMMOX, ambos operando em conjunto e em um mesmo reator. No entanto, devido à diferença no controle operacional e para melhor entendimento, esses processos foram antes estudados em separado.

2.4.4.1 Processo Combinado de Nitritação Parcial + ANAMMOX

As discussões apresentadas nos itens anteriores permitem a reflexão a respeito da combinação dos processos de nitritação parcial + ANAMMOX, em termos da possível proposta de uma nova tecnologia.

Esse processo surge como uma alternativa promissora para a eliminação de altas cargas de nitrogênio em efluentes agropecuários. Um esquema do processo de nitritação parcial ligado ao processo ANAMMOX está reproduzido na Figura 6 (VAN DONGEN *et al.*, 2001).

Figura 6 – Esquema do processo de nitritação parcial + ANAMMOX.



Fonte: (VAN DONGEN *et al.*, 2001, adaptado).

De fato, pode-se imaginar um primeiro reator operando em condições de aerobiose, com apenas atividade das BOA, com a finalidade de gerar nitrito. No entanto, como resultado do envolvimento de reações bioquímicas complexas e diversos micro-organismos no processo, essa relação de oxidação da amônia no processo de nitritação pode ser difícil de manter (OKABE *et al.*, 2011).

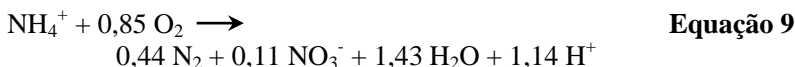
Estudos já realizados, Fux *et al.* (2002), relatam que a eficiência global de eliminação do nitrogênio foi limitada pelo processo de nitritação do primeiro reator. Isso demonstra a importância no controle operacional do processo, de modo a manter a estabilidade da atividade das bactérias oxidadoras de amônia para não diminuir a eficiência de remoção de nitrogênio no processo ANAMMOX.

2.4.4.2 Sistema de Reator Único para Remoção de Nitrogênio

2.4.4.2.1 Mecanismos e princípios

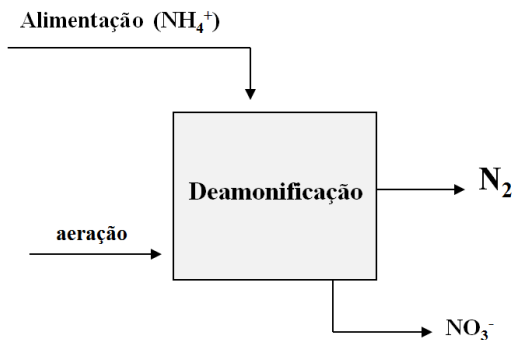
De forma conhecida, as bactérias responsáveis pelo processo de nitrificação parcial são aeróbias e, portanto, necessitam de oxigênio durante sua atividade metabólica. Por outro lado, as bactérias responsáveis pelo processo ANAMMOX são anaeróbias, tendo sua atividade estagnada quando submetidas a determinadas concentrações de oxigênio dissolvido. Devido a essa condição, esses dois processos costumam ser operados separadamente, objetivando maior controle operacional e eficiência na remoção de nitrogênio. No entanto, com a evolução e desenvolvimento de novas tecnologias, os últimos estudos têm proposto que ambas as bactérias possam coexistir em um único reator, desde que o sistema seja mantido em condições limitadas de oxigênio dissolvido (JETTEN *et al.*, 2003).

Esse processo, denominado desamonificação, consiste na oxidação parcial da amônia a nitrito (pela atividade das BOA – Equação 6) sob condição de oxigênio limitado e, subsequentemente, na conversão do nitrito produzido junto com parte do amônio remanescente a nitrogênio gasoso (pela atividade de bactérias ANAMMOX – Equação 5), formando uma pequena quantidade de nitrato. Ambos os processos ocorrem em um único reator, e a combinação reacional resulta na reação global de remoção de nitrogênio descrita na Equação 9 (SLIEKERS *et al.*, 2002).



Um esquema simplificado do processo de desamonificação está reproduzido na Figura 7.

Figura 7 – Esquema do processo de desamonificação.



Considerando que bactérias ANAMMOX são reversivelmente inibidas por baixas concentrações de oxigênio, para que esse processo possa ocorrer em um único reator, a oxidação aeróbia do amônio deve remover todo o oxigênio do líquido (SLIEKERS *et al.*, 2002). Para tanto, o fluxo de entrada de amônio no reator deve ser mantido acima do fluxo de entrada de oxigênio (JETTEN *et al.*, 2003; CHO *et al.*, 2011).

Além disso, as BOA são uma população conhecida de bactérias capazes de produzir NO e N₂O, principalmente em baixas concentrações de OD (GOREAU *et al.*, 1980; KESTER *et al.*, 1997). Sabendo que o N₂O é um potencial gás de efeito estufa, 210 vezes maior que o CO₂ (IPCC, 2006), e que o NO é um dos responsáveis pela degradação da camada de ozônio, evitar a produção e emissão desses gases é um dos grandes desafios do processo.

O processo CANON (do inglês, *Completely Autotrophic Nitrogen-removal Over Nitrite*) é um conhecido processo de desamonificação, e foi inicialmente proposto para operar reatores do tipo RBS a 35°C (SLIEKERS *et al.*, 2002). No entanto, nos últimos anos, novas configurações têm sido propostas para realizar a remoção de nitrogênio sob temperaturas menores de operação (VEYS *et al.*, 2010; CUI, 2012; CHANG *et al.*, 2013), todas objetivando a redução dos custos produtivos e simplicidade de operação para o aumento de escala do processo.

2.4.4.2.2 Configuração de reatores

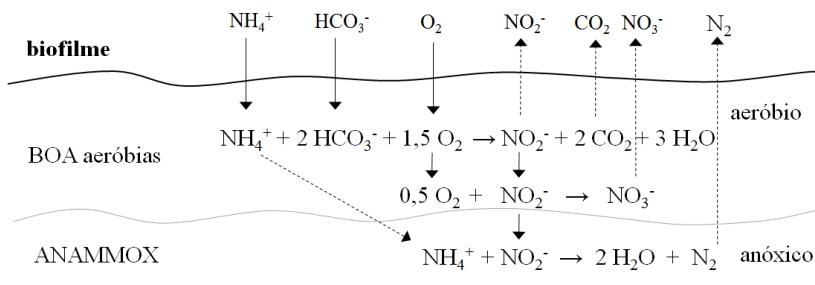
O processo de desamonificação foi originalmente proposto em reatores do tipo SBR, mas a proposta também é válida para sistemas

com biofilme (EGLI *et al.*, 2003) e reatores *airlift* (JETTEN *et al.*, 2003).

Nos sistemas com biofilme, os reatores eliminam o nitrogênio pela formação de uma película onde, na parte externa estão concentradas as BOA e no interior do biofilme as bactérias com atividade ANAMMOX. Assim, teoricamente, na parte superficial do biofilme irá ocorrer a conversão parcial do nitrogênio amoniacal para nitrito e subseqüentemente na zona anóxica do biofilme, o nitrito e o restante da amônia residual serão convertidos a N_2 pela atividade das ANAMMOX, conforme ilustra a Figura 8.

Egli *et al.* (2003), estudaram a composição microbiana de um sistema de biodiscos rotativos com biofilme utilizados no tratamento de efluentes da cidade de Kölliken, na Suíça, contendo concentrações de amônia acima de 500 mg L^{-1} . Os reatores eliminavam nitrogênio e os estudos revelaram a presença de BOA e bactérias ANAMMOX na parte externa e interna do biofilme, respectivamente.

Figura 8 – Esquema representativo do processo de desamonificação em biofilmes.

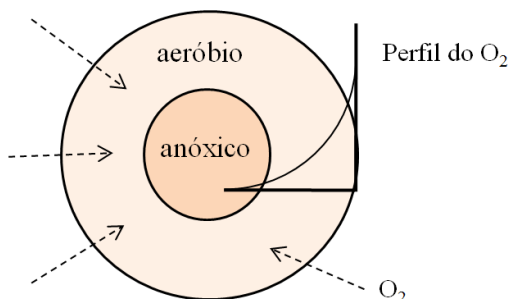


Fonte: (ZHU *et al.*, 2008, adaptado).

No mesmo contexto dos sistemas com biofilme, os reatores que trabalham com biomassa em suspensão também possuem um gradiente de concentração de substrato e OD, ou seja, enquanto a parte externa do grânulo permanece em condições aeróbias para realizar a nitrificação parcial, a parte interna mantém condição de anaerobiose para que ocorra atividade ANAMMOX (Figura 9). Essa configuração de reator, devido a maior área superficial para transferência de massa, vem tomando destaque e preferência de utilização pela capacidade em alcançar cargas maiores de remoção de N. Essa condição abre possibilidade para aplicação da desamonificação a baixas temperaturas, sem perder significativamen-

te a eficiência na remoção de nitrogênio quando comparado aos sistemas com biofilme a 30 - 35°C (CUI, 2012).

Figura 9 – Esquema do perfil de concentração de oxigênio em um floco microbiano.



Fonte: (ZHU *et al.*, 2008, adaptado).

É importante salientar que reatores que trabalham com biomassa em suspensão podem ser limitados pela resistência na transferência de massa. Como o nitrito produzido na camada externa do grânulo é consumido pelas bactérias que se encontram na parte interna, o oxigênio acaba sendo o principal fator para controle da taxa global, o que pode ser atribuído à difusão no grânulo ou a transferência de gás-líquido no meio.

2.4.4.2.3 Parâmetros de controle

O controle do processo de desamonificação obedece quase que totalmente aos parâmetros já mencionados e discutidos nos tópicos referentes ao processo de nitrificação parcial (vide tópico 2.4.3) e ao processo ANAMMOX (vide tópico 2.4.2). A diferença irá residir na escolha do parâmetro utilizado para inibição seletiva das BON e nos efeitos que este pode causar para as bactérias com atividade ANAMMOX.

Apesar disso, usualmente, a eficiência do processo de desamonificação está ligada diretamente a três fatores principais: a concentração de oxigênio dissolvido, a concentração de amônia e ao controle da população de BOA (CUI, 2012).

Conforme já mencionado, por ser o acceptor de elétrons no processo de nitrificação parcial, o oxigênio acaba sendo o principal fator para controle da taxa global, além de estar diretamente relacionado à transfe-

rência de massa e a taxa de conversão da amônia para nitrito. Elevadas concentrações podem causar a inibição do processo tanto por sua essência para as bactérias ANAMMOX (que são anaeróbias), como por suprimir as BOA com a produção excessiva de nitrito, que por sua vez, dependendo da concentração, também apresenta-se tóxico para a atividade ANAMMOX (SLIEKERS *et al.*, 2002).

A concentração de amônia está diretamente relacionada com a disponibilidade de oxigênio, mas pode ser crítica para o processo pois serve como substrato tanto para as BOA como para as ANAMMOX. Assim, caso haja acúmulo de amônia no reator, ou toda amônia seja oxidada a nitrito, o processo terá sua eficiência reduzida substancialmente devido ao desequilíbrio no sistema (NIELSEN *et al.*, 2005). Existe um grande número de estudos do processo de desamonificação em escala laboratorial onde, devido às condições operacionais, a carga volumétrica aplicada é mais baixa do que a aplicada ao ANAMMOX. Contudo, como somente um reator é requerido, há economia significativa que pode ser vantajosa dependendo do efluente a ser tratado (SCHMIDT *et al.*, 2003).

Quanto às populações microbianas, a interação entre as bactérias aeróbias e anaeróbias presentes no sistema desempenham papel fundamental para o desenvolvimento da desamonificação. Enquanto as BOA demandam amônia e oxigênio como fonte de substrato e elétrons, as ANAMMOX exigem amônia e nitrito. Sabendo que as BON exigem nitrito e oxigênio, caso estejam presentes no meio, podem interromper o processo de desamonificação devido à competição por oxigênio com as BOA e por nitrito com as ANAMMOX. Por isso, manter a seletividade e inter-relação das populações microbianas é um parâmetro fundamental no processo de desamonificação.

Neste momento, as pesquisas têm sido conduzidas principalmente a elevadas temperaturas (CHO *et al.*, 2011). Isso porque, conforme já mencionado, temperaturas superiores a 25°C favorecem a atividade ANAMMOX, bem como agem expandindo as diferenças entre a velocidade de crescimento das BOA em relação as BON. Segundo Veys *et al.* (2010), a temperatura ideal para operação do processo de desamonificação é 30 - 35°C, no entanto, devido a dificuldade e custos energéticos, estudos recentes vêm mostrando maiores vantagens em operar reatores com menores cargas aplicadas, mas à temperatura ambiente (20°C) (CEMA *et al.*, 2007).

Apesar de utilizados, ainda há carência de informações quanto à ação e real estratégia da utilização de estratégias para o controle da desamonificação, o que demonstra a importância da realização de maiores

investigações e trabalhos de pesquisa que possam contribuir para que esse processo ganhe ampla difusão e se consolide totalmente. Sendo assim, esse processo pode alcançar cargas satisfatórias de remoção de N, no entanto, mais estudos são necessários para caracterizar a comunidade microbiana, expandir sua aplicação, e aumentar sua resistência a aumentos de carga e choques operacionais.

2.4.4.3 Comparação entre os processos

A Tabela 3 faz um comparativo entre os processos biológicos de remoção de nitrogênio mencionados até aqui. Quando comparado ao processo convencional para remoção de nitrogênio, o processo de desamonificação possui algumas vantagens distintas: não requer fonte externa de carbono; demanda menor quantidade de oxigênio ($1,9 \text{ kgO}_2 \text{ kgN}^{-1}$ em vez de $4,2 \text{ kgO}_2 \text{ kgN}^{-1}$), o que poupa de 60 a 90% de energia para aeração; possui baixa produção de lodo ($0,08 \text{ kgSSV kgN}^{-1}$ em vez de aproximadamente 1 kgSSV kgN^{-1}) e pode atingir elevadas cargas de remoção de nitrogênio em menor espaço requerido (CUI, 2012; VAN LOOSDRECHT e JETTEN, 1998).

Em comparação com o processo combinado de nitrificação parcial + ANAMMOX, o processo de desamonificação se sobressai pelo menor número de reatores e menor custo de investimento, além de demandar menor controle operacional. No entanto, é necessário um controle global do processo para reduzir o risco da formação de elevadas concentrações de nitrito, uma vez que são potenciais inibidoras do processo ANAMMOX (CUI, 2012).

Tabela 3 – Comparação entre os processos biológicos para remoção de nitrogênio.

Parâmetros	Processos			Desamonificação
	Nitrificação-Desnitrificação	Nitrificação-Desnitrificação	Nitrificação parcial + ANAMMOX	
Número de reatores	2	2	2	1
Principais bactérias Envolvidas	BOA, BON / Desnitrificantes	BOA / Desnitrificantes	BOA / ANAM-MOX	BOA + ANAM-MOX
Demanda de oxigênio ^a (gO ₂ gN ⁻¹)	4,18 / 0	3,16 / 0	1,72–2,06 / 0	1,94
DQO necessária, com assimilação ^b (gDQO gN ⁻¹)	4,0	2,4	0	0
Produção de Iodo ^c (g peso seco gN ⁻¹)	1	n.e	0,1	0,1
Custo operacional ^d	2-4 euros/kg N removido	1 euro/kg N removido	1 euro/kg N removido	1 euro/kg N removido
Consumo de alcalinidade ^a (gCaCO ₃ gN ⁻¹)	7,07 / -3,57	7,07 / -3,57	3,68	3,68
Estado de aplicação ^e	Estabelecido	Plantas em escala real	Plantas em escala real	Laboratório

^a: Fonte: AHN, 2006;

^b: Fonte: VAN HULLE *et al.*, 2010;

^c: Fonte: MULDER, 2003;

^d: Fonte: VAN DONGEN *et al.*, 2001;

^e: Fonte: SCHMIDT *et al.*, 2003;

n.e: não encontrado.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Experimentação e Análises Ambientais (LEAA) da Embrapa Suínos e Aves, unidade descentralizada da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, Concórdia, SC.

3.1 REATORES PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA

Tendo em vista a futura utilização como fonte de inóculo do reator de desamonificação, foram previamente desenvolvidos dois reatores para aclimação e enriquecimento da biomassa nitritante e ANAMMOX.

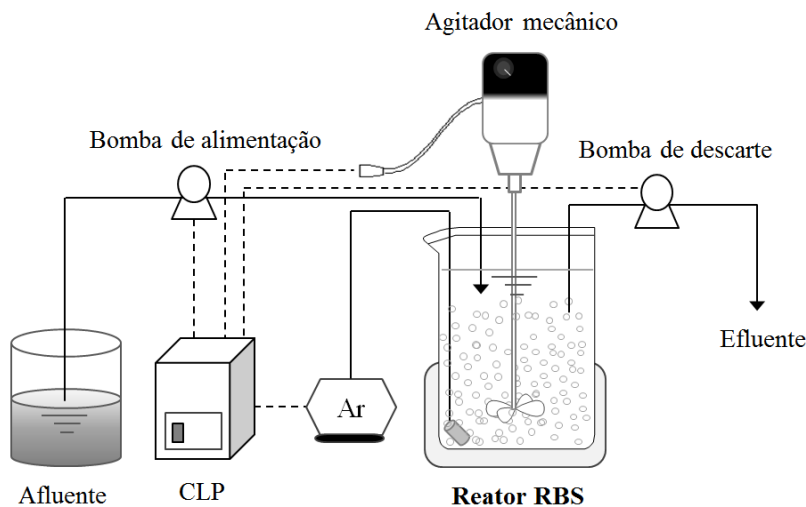
As configurações de ambos os reatores foram escolhidas para o cultivo devido à sua eficiência em retenção de biomassa, que é condição fundamental nessa etapa, uma vez que a velocidade de crescimento das BOA e principalmente das ANAMMOX têm tempo de duplicação consideravelmente baixo.

3.1.1 Cultivo da Biomassa Nitritante

3.1.1.1 Sistema experimental

Para produção da biomassa nitritante (BOA), foi montado um reator para operação automatizada em modo de batelada sequencial (RBS). O sistema experimental (Figura 10) foi composto por uma unidade reacional com volume útil de 3,5 L, mantido a temperatura ambiente e provido de sistema de aeração: compressor de ar de 2,5 W (A230, Big Air) com difusores de pedra porosa submersos. A agitação do reator foi realizada utilizando um agitador mecânico (IKA, RW 20) com velocidade de rotação de 70 rpm. Foram utilizadas bombas peristálticas (Milan, BP-200) para alimentação (enchimento) e descarte do efluente. O controle de todo o sistema foi automatizado através do uso de um controlador lógico programável (CLP) (Dexter, modelo μ DX série 100), regido pelo software de programação gráfica PG v6.8 da Dexter.

Figura 10 – Fluxograma do sistema de reator RBS utilizado para cultivo da biomassa nitritante.



3.1.1.2 Operação e monitoramento analítico

O reator RBS foi inoculado com uma concentração de 2,5 gSSV L^{-1} de biomassa proveniente de um reator aeróbio da estação de tratamento de dejetos de suínos da Embrapa Suínos e Aves em Concórdia, SC (KUNZ *et al.*, 2009).

Foi utilizado como meio de alimentação do reator RBS um afluente sintético composto majoritariamente por amônio, a uma concentração de 300 mgN-NH₃ L^{-1} , e microelementos. A Tabela 4 descreve a composição e concentração dos macro e microelementos utilizados no preparo do meio sintético.

O afluente foi preparado semanalmente e mantido em uma bombona de 50 L sob agitação intermitente (30 minutos agitando a cada 7 horas) com o objetivo de evitar a ocorrência de precipitação do material não dissolvido.

Tabela 4 – Composição do afluente sintético e solução de microelementos utilizados para o cultivo da biomassa nitritante.

Composto químico inorgânico	Concentração (mg L ⁻¹)
NH ₄ Cl	1145,7*
K ₂ HPO ₄	100
NaHCO ₃	2911
Na ₂ CO ₃	391,1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	60
FeSO ₄ ·7H ₂ O	8
CaCl ₂ ·2H ₂ O	8
Solução de microelementos	0,1 mL L ⁻¹
Solução de microelementos	Concentração (mg L ⁻¹)
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1247
MnSO ₄ ·H ₂ O	1119
CuSO ₄ ·5H ₂ O	44
Al ₂ (SO ₄) ₃ ·14H ₂ O	201,5
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	129
CoCl ₂ ·6H ₂ O	30
KCl	100
EDTA	975

*Variável conforme aumento da concentração.

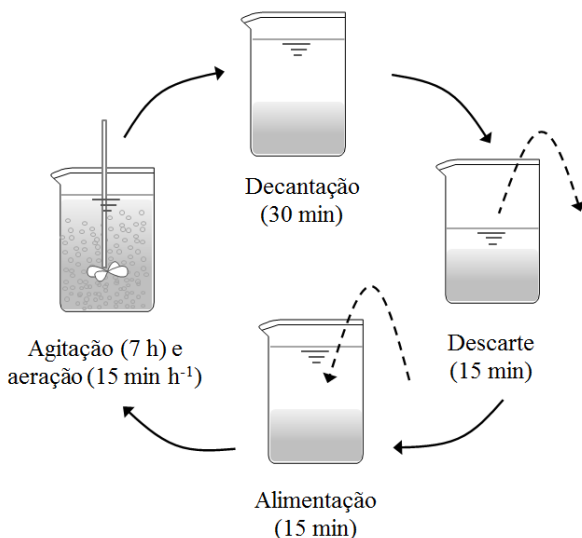
Fonte: Magrí *et al.*, 2012, adaptado.

A Figura 11 apresenta um esquema demonstrativo do processo operacional do reator RBS durante um ciclo completo de conversão do nitrogênio. Durante o período de enriquecimento, o reator operou com ciclo reacional de 8 horas, sendo destes 30 minutos destinados à decantação, 15 minutos destinados ao descarte e 15 minutos destinados à alimentação. Ao fim de cada ciclo, 825 mL de efluente eram descartados e o mesmo volume era adicionado com meio sintético, resultando em um TRH de 1,41 dias.

Como recurso para inibição das BON e manutenção da nitrificação parcial, utilizou-se a aeração intermitente, com 20 minutos de aeração para cada 40 minutos não aerados. Quando a oxidação da amônia foi completamente convertida a nitrato (Fase I), a aeração intermitente foi reduzida para 15 minutos de aeração e 45 minutos não aerados (Fase II), de modo que as BON se mantivessem inativas no reator.

O monitoramento do sistema foi realizado através da análise de alcalinidade total, N-NH_3 , N-NO_2^- e N-NO_3^- , duas vezes por semana na amostra coletada na entrada e ao final de um ciclo de cada dia.

Figura 11 – Esquema demonstrativo de um ciclo reacional completo de operação do reator RBS.



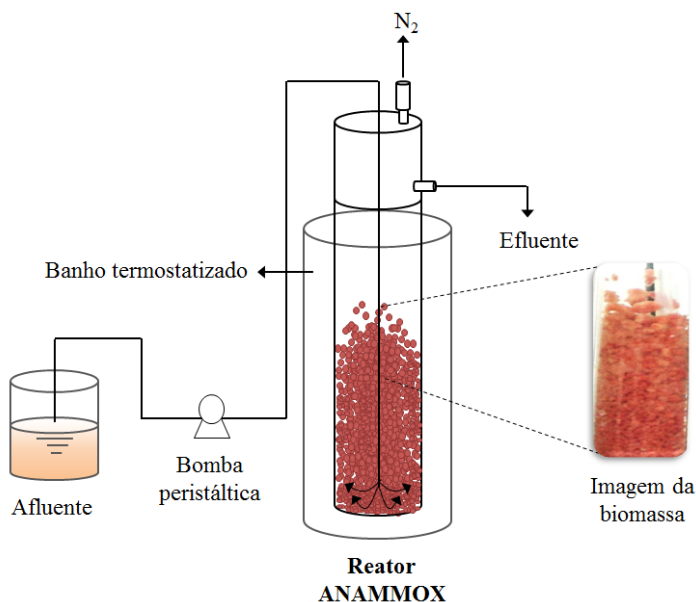
3.1.2 Cultivo da biomassa ANAMMOX

3.1.2.1 Sistema experimental

Para produção da biomassa com atividade ANAMMOX, foi montado um reator em coluna de fluxo ascendente com biomassa livre.

O sistema experimental (Figura 12) foi constituído por uma unidade reacional construída em vidro com 3,3 litros de volume útil. O reator operou com controle de temperatura pela utilização de banho termostático à 35°C. A alimentação foi efetuada de forma controlada utilizando-se bomba peristáltica (Milan, BP-600) operada a uma vazão de 26,4 L d⁻¹.

Figura 12 – Fluxograma do sistema de reator ANAMMOX utilizado para cultivo da biomassa.



3.1.2.2 Operação e monitoramento analítico

A alimentação do reator ANAMMOX constituiu-se de afluente sintético, tendo NH_4Cl e NaNO_2 como fonte de amônia e nitrito, respectivamente, e adição de micronutrientes, conforme ilustra a Tabela 5.

O meio sintético foi preparado semanalmente e para evitar contaminação por oxigênio, foi borbulhado N_2 até atingir concentração igual ou inferior a $0,2 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$.

Tabela 5 – Composição do afluente sintético e solução de micronutrientes utilizados para o cultivo da biomassa ANAMMOX.

Composto químico inorgânico	Concentração (mg L ⁻¹)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	143
NaHCO ₃	420
KH ₂ PO ₄	27
FeSO ₄ ·7H ₂ O	9
ETDA	5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	240
NH ₄ Cl	*
NaNO ₂	*
Solução de micronutrientes	0,3 mL L ⁻¹
Solução de micronutrientes	Concentração (mg L ⁻¹)
ZnSO ₄	1247
MnSO ₄	1149
CuSO ₄ ·5H ₂ O	44
Al ₂ (SO ₄) ₃ ·14H ₂ O	201
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	129
CoCl ₂ ·6H ₂ O	30
KCl	100
EDTA	975

*Variável conforme aumento da concentração

Fonte: Magrí *et al.*, 2012, adaptado.

O reator ANAMMOX foi inoculado com uma concentração de 500 g L⁻¹ de biomassa úmida proveniente de um reator de bancada com atividade ANAMMOX estável, localizado no LEAA da Embrapa Suínos e Aves em Concórdia, SC. Para a partida do sistema, o reator ANAMMOX foi alimentado com uma concentração inicial de 50 mg L⁻¹ de N-NH₃ e 50 mg L⁻¹ de N-NO₂⁻. Após estabilidade do processo, a concentração foi aumentada para 100 mg L⁻¹ de N-NH₃ e 100 mg L⁻¹ de N-NO₂⁻, totalizando 200 mg L⁻¹ de nitrogênio total (NT). O reator operou a 35°C, com TRH de 3 horas e pH controlado pela adição de sais no meio sintético.

Foram coletadas amostras da entrada e saída do reator, duas vezes por semana, e realizadas análises de N-NH₃, N-NO₂⁻ e N-NO₃⁻.

3.2 REATOR PARA DESAMONIFICAÇÃO (DMX)

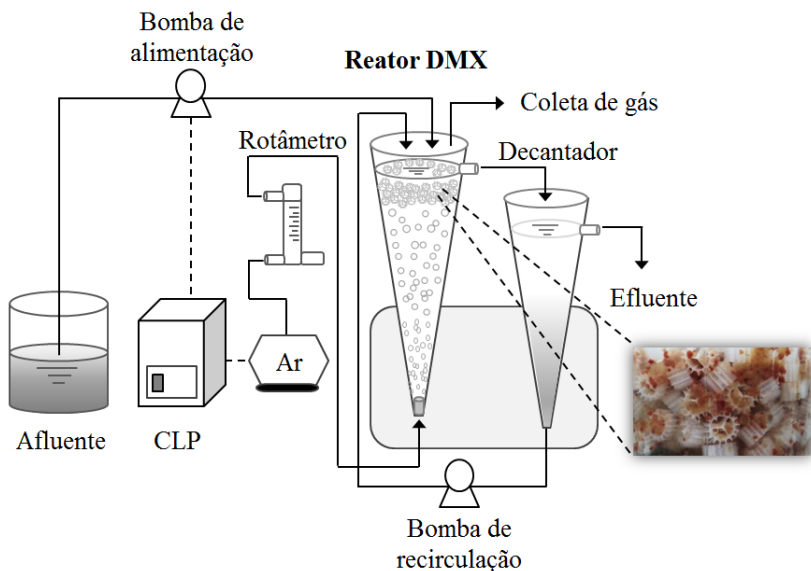
3.2.1 Sistema experimental

O processo de desamonificação foi implantado em um reator contínuo de fluxo ascendente com aeração intermitente denominado reator DMX. O sistema experimental (Figura 13) foi composto por uma unidade reacional construída a partir de um cone de Imhoff com volume de reação de 1,1 litros. O reator foi mantido a temperatura ambiente (25°C) e provido de sistema de aeração: compressor de ar de 2,5 W (A230, Big Air) acoplado a um rotâmetro (Gilmont, GF-9260) com difusores de pedra porosa submersos, que teve a vazão de ar alternada de 10 a 100 mL min⁻¹ em função do comportamento do reator. Os sais inorgânicos contidos no afluyente sintético (NaHCO₃ e Na₂CO₃) eram responsáveis pelo tamponamento do meio a pH de 7,5 a 8,0, que por sua vez era somente monitorado (e não controlado) no reator.

A alimentação e recirculação do efluente foram realizadas de forma controlada utilizando-se bombas peristálticas (Milan, BP-200) a uma vazão entre 2 – 3,3 L d⁻¹ e 5 – 8,2 L d⁻¹, respectivamente, em função da carga do sistema. O meio suporte utilizado constituiu-se de polietileno, tecnologia denominada “*kaldnes*” (AKTAN *et al.*, 2012) que serviu como barreira física para proteção da tensão de cisalhamento da biomassa causada pela fluidização da aeração e foi adicionado numa proporção de 30% do volume total do reator. Na saída do reator foi utilizado um cone de Imhoff com capacidade de 1 litro como decantador de lodo.

O controle de todo o sistema foi automatizado através do uso de um CLP (Dexter, modelo μ DX série 100), regido pelo software de programação gráfica PG v6.8 (Dexter).

Figura 13 – Fluxograma do sistema do reator DMX em escala de laboratório utilizado durante o experimento.



3.2.2 Inóculo utilizado

Devido à ocorrência de dois processos em um mesmo reator e a cultura mista (BOA + ANAMMOX) requerida para o sucesso da desamonificação, é necessário que a quantidade de bactérias ativas esteja em equilíbrio, de modo que coexistam sem competição dentro do reator DMX. Para tanto, foram previamente realizados ensaios cinéticos de consumo de substrato para a biomassa nitritante e para a biomassa ANAMMOX que serão discutidos mais adiante.

Dessa forma, após a realização dos ensaios, o reator foi inoculado com 58 mL de biomassa nitrificante proveniente do reator RBS e 200 mL de biomassa com atividade ANAMMOX proveniente do reator ANAMMOX, totalizando uma concentração celular de $2400 \text{ mgSSV L}^{-1}$.

3.2.3 Afluente sintético

Foi utilizado como meio de alimentação do reator DMX um afluente sintético inorgânico composto majoritariamente por amônio e mi-

croelementos, preparado de acordo com a composição previamente descrita para o cultivo da biomassa nitrificante (vide tópico 3.1.1.2, Tabela 4) a uma concentração inicial de $200 \text{ mgN-NH}_3 \text{ L}^{-1}$ e posteriormente $300 \text{ mgN-NH}_3 \text{ L}^{-1}$.

O meio sintético foi preparado duas vezes por semana e era mantido em uma bombona de 50 L sob agitação intermitente (30 minutos agitando a cada 7 horas) com o objetivo de evitar a ocorrência de precipitação do material não dissolvido.

3.2.4 Operação e monitoramento analítico

Para a partida do sistema, foram adicionados ao reator o meio suporte e o inóculo (BOA + ANAMMOX), tendo o volume completado com o afluente sintético diluído a 50% (v/v) (afluente/água).

O controle da aeração intermitente foi automatizado (CLP) e operou com ciclos de 30 minutos, sendo destes 22 minutos destinados ao ciclo óxico e 8 minutos destinados ao ciclo anóxico (MAGRÍ *et al.*, 2012).

O acompanhamento do sistema foi realizado por análises físico-químicas realizadas no LEAA. As coletas foram realizadas diariamente (Tabela 6), na entrada e saída do reator, durante 179 dias de operação.

Tabela 6 – Pontos de amostragem, frequência de coleta e análises realizadas no reator DMX durante o experimento.

Pontos de amostragem	Análises realizadas	Frequência das análises
Entrada	N-NH_3 ; N-NO_2^- ; N-NO_3^- ; Alcalinidade;	Diariamente
Meio do reator	pH; OD; Temperatura SST; SSV; SSF	Diariamente 1 vez a cada 60 dias
Saída	N-NH_3 ; N-NO_2^- ; N-NO_3^- ; Alcalinidade;	Diariamente

3.2.5 Ensaio cinético de consumo de substrato

Para verificar a atividade da biomassa e saber a razão ideal de inóculo utilizado para partida do reator DMX, foram previamente reali-

zados ensaios cinéticos de consumo de substrato para a biomassa nitrificante e para a biomassa ANAMMOX.

Os ensaios foram realizados separadamente, em duplicata, no próprio reator e antes deste ser inoculado.

3.2.5.1 Ensaio cinético nitritante

Para a realização do ensaio em batelada, foram inicialmente adicionados 80 mL de biomassa nitritante proveniente do reator RBS ao sistema reacional, tendo seu volume completado para 1 L utilizando afluente sintético a uma concentração de $100 \text{ mgN-NH}_3 \text{ L}^{-1}$. A temperatura foi controlada a 25°C e a vazão de ar ajustada para 500 mL min^{-1} , de modo que a concentração de oxigênio dissolvido não fosse limitante para o processo.

As amostras foram coletas com auxílio de um pipetador automático em intervalos de 15 minutos, até a concentração de amônio se apresentar abaixo de 10 mgN L^{-1} . Todas as amostras foram filtradas após a realização de cada coleta para evitar futuras transformações até a realização dos procedimentos analíticos.

O monitoramento do sistema foi realizado por análises de OD, pH, temperatura, N-NH_3 , N-NO_2^- , N-NO_3^- e alcalinidade, sendo incluída na última alíquota a análise de sólidos suspensos totais (SST), fixos (SSF) e voláteis (SSV).

3.2.5.2 Ensaio cinético ANAMMOX

Para realização dos ensaios cinéticos ANAMMOX, foi acoplada ao reator uma linha de recirculação interna com vazão igual a 3 mL min^{-1} . Foram utilizados 200 mL de biomassa proveniente do reator ANAMMOX, tendo também seu volume completado para 1 L com afluente sintético a uma concentração de $100 \text{ mgN-NH}_3 \text{ L}^{-1}$ e $100 \text{ mgN-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$. Os ensaios foram conduzidos com controle de temperatura a 25°C .

As amostras foram coletadas com auxílio de um pipetador automático em intervalos de 30 minutos por um período de 6 horas. Todas as amostras foram filtradas após a realização de cada coleta para evitar futuras transformações até a realização dos procedimentos analíticos.

O monitoramento dos ensaios foi realizado por análises de pH, temperatura, N-NH_3 , N-NO_2^- , N-NO_3^- , sendo incluída na última alíquota a análise de SST, SSF e SSV.

3.2.5.3 Determinação da velocidade específica de consumo do substrato

A velocidade de consumo de substrato (r_s) e a velocidade específica de consumo de substrato (μ_s) foram determinadas a partir da regressão linear das concentrações de substrato em função do tempo, resultantes dos ensaios cinéticos experimentais, conforme as Equações 10 e 11, respectivamente.

$$r_s = - \frac{dS}{dt} \quad \text{Equação 10}$$

Onde:

r_s = velocidade de consumo de substrato ($\text{mgN L}^{-1} \text{h}^{-1}$)

S = concentração do substrato (mgN L^{-1})

t = tempo (h)

$$\mu_s = \frac{1}{X} \left(- \frac{dS}{dt} \right) \quad \text{Equação 11}$$

Onde:

μ_s = velocidade específica de consumo de substrato ($\text{mgN gSSV}^{-1} \text{h}^{-1}$)

X = concentração celular ($\text{mgSSV}^{-1} \text{L}^{-1}$)

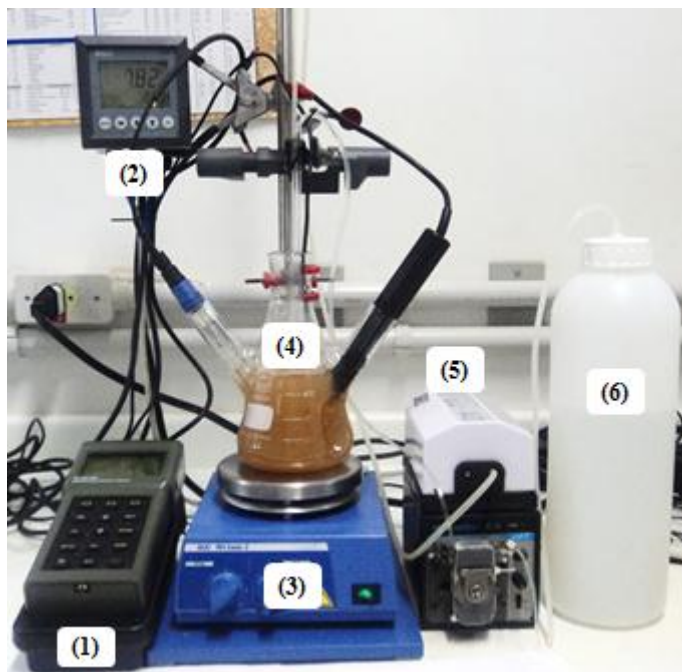
3.2.6 Ensaio de atividade nitrificante específica

Para caracterizar a biomassa nitrificante (oriunda do reator RBS) e extrair os parâmetros cinéticos em função de sua atividade, foram realizados ensaios de respirometria, que consistem na determinação da cinética de consumo de oxigênio decorrentes do consumo de substrato pela quantidade de micro-organismos. Para a execução da técnica, foi utilizado como reator um erlenmeyer de vidro (500 mL) adaptado com três bocas, para inserção de eletrodos de pH e oxigênio dissolvido, e três chicanas na base, com o objetivo de evitar a formação de vórtices durante a agitação (Figura 14). A concentração de biomassa utilizada para realização dos ensaios foi de $1,3 \text{ gSSV L}^{-1}$.

A Figura 14 ilustra o sistema experimental utilizado nos ensaios de respirometria. Os ensaios foram realizados a temperatura ambiente (25°C) e providos de aeração pela utilização de um compressor de ar de 2,5 W (Big Air, A230) com difusores de pedra porosa submersos. Um controlador de pH (Sincrontec, S2123-6606) foi utilizado para manter os valores de pH na faixa de 7,5 – 8,0 e compensar alcalinidade através da injeção de NaOH 1 mol L^{-1} . A homogeneização do sistema foi realizada

por agitador magnético (IKA, RH Basic 2) a uma rotação de 750 rpm e o oxigênio dissolvido monitorado por oxímetro (Hanna, HI 98186).

Figura 14 - Sistema experimental utilizado nos ensaios de respirometria, onde: 1, oxímetro; 2, controlador de pH; 3, agitador magnético; 4, biorreator; 5, bomba de aeração; 6, solução de NaOH (1 mol L⁻¹).



Uma solução nutriente baseada no meio sintético (no entanto sem adição de compostos nitrogenados) foi preparada para efetuar a lavagem da biomassa entre os ensaios. Para avaliar a influência da concentração de substrato na velocidade de consumo de oxigênio, foram preparadas em separado soluções de NH_4Cl com concentrações de 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 350, 475, 600, 850 e 1200 $\text{mgN-NH}_3 \text{L}^{-1}$, a fim de facilitar a distribuição dos volumes utilizados nos pulsos dados durante o experimento. Os ensaios foram realizados em duplicata e a média das velocidades encontradas foi utilizada como valor para posterior determinação dos parâmetros cinéticos μ_X , K_S e K_I .

Inicialmente e entre cada ensaio realizado, a biomassa passou por um procedimento de lavagem baseado na suspensão das células com a

solução nutriente sem amônia, posterior centrifugação e descarte do líquido sobrenadante. Esse procedimento foi realizado e repetido até que a concentração de substrato se anulasse e não viesse a interferir nos ensaios posteriores. Na sequência, a biomassa lavada foi suspensa no biorreator e submetida a aeração até atingir um valor de oxigênio dissolvido próximo a saturação. A seguir, a aeração foi interrompida e a queda da concentração de oxigênio dissolvido monitorada ao longo do tempo por medições em intervalos de 10 segundos até a concentração de oxigênio alcançar valores próximos a 15% da concentração de saturação do sistema. A velocidade de consumo de oxigênio encontrada representou a respiração endógena dos micro-organismos.

Este mesmo procedimento foi realizado na determinação da cinética de consumo de oxigênio para as diferentes concentrações de substrato através da realização de pulsos com as concentrações previamente preparadas com solução de cloreto de amônio. Para cada velocidade encontrada foi descontado o valor relativo à respiração endógena e então, dividido o valor resultante pela concentração celular previamente determinada, encontrando a velocidade específica de consumo de oxigênio QO_2 .

3.2.7 Ensaio de atividade ANAMMOX específica

Para caracterizar a biomassa ANAMMOX (oriunda do reator ANAMMOX) e extrair os parâmetros cinéticos em função de sua atividade, foram realizadas cinéticas de consumo de substrato. Neste caso, para a execução do experimento, foi utilizado como reator um kitasato de vidro (1000 mL) com volume útil de 600 mL, tendo a saída lateral acoplada com sistema para coleta de amostra. A concentração celular de biomassa ANAMMOX utilizada para realização dos ensaios foi de $1,7 \text{ gSSV L}^{-1}$.

Os experimentos foram conduzidos em uma Incubadora Shaker (Lucadema, Luca-222) com controle de temperatura à 25°C e velocidade de rotação de 60 rpm, o que possibilitou manter o sistema devidamente homogeneizado e à temperatura constante. Para avaliar a influência do substrato na velocidade de consumo das bactérias, foram realizados ensaios utilizando concentrações de aproximadamente 20, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 600 e 800 mg L^{-1} de NT, sendo destes 50% na forma de N-NH_3 e 50% na forma de N-NO_2^- , conforme exige a estequiometria do processo.

Inicialmente, e antes de iniciar cada ensaio, a biomassa passou por um procedimento de lavagem baseado na suspensão das células com

água destilada e posterior descarte do líquido sobrenadante até que as concentrações de substrato se anulassem na solução. Na sequência, 60 g L⁻¹ de biomassa úmida foram suspensas no reator e o volume completado com o afluente sintético previamente preparado para 600 mL. A atmosfera do restante do reator era preenchida com nitrogênio gasoso e a passagem superior fechada com *parafilm* para evitar a contaminação por oxigênio a longo prazo.

As amostras foram coletadas em intervalos de 30 minutos durante 8 horas de duração da cinética ou até que as concentrações de substrato se apresentassem abaixo de 10 mg L⁻¹. O monitoramento dos ensaios foi realizado por análises de pH, temperatura, amônia, nitrito e nitrato.

Assim, para encontrar a velocidade específica (μ) de consumo de substrato e formação de produto, o valor de cada velocidade (r) encontrada nos ensaios foi dividido pela concentração celular previamente determinada.

3.2.8 Ensaio de atividade DMX específica

Após a caracterização das biomassas utilizadas como inóculo e a partida do reator DMX, foram realizadas cinéticas de consumo de substrato no próprio reator com o objetivo de extrair os parâmetros cinéticos e otimizar a operação do mesmo. Para tanto, a linha de alimentação foi desligada e a saída do reator conectada diretamente na linha de reciclo, formando assim uma única linha de recirculação interna para manter o processo em batelada.

Para avaliar a influência do substrato na velocidade de consumo das bactérias, foram realizados ensaios utilizando-se concentrações de 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 550, 650, 800 e 1000 mgN-NH₃ L⁻¹. Inicialmente, após sedimentação das células, o conteúdo líquido do reator foi removido e o volume novamente completado com o afluente sintético previamente preparado de concentração conhecida. A operação do reator procedeu nas mesmas condições do reator DMX, no entanto, com vazão de ar fixa para 20 mL min⁻¹ durante as etapas de aeração.

As amostras foram coletadas com auxílio de um pipetador automático ao final de cada ciclo (30 minutos) por um período de 8 horas. Todas as amostras foram filtradas após a realização de cada coleta para evitar futuras transformações até a realização dos procedimentos analíticos. O monitoramento dos ensaios foi realizado por análises de pH, temperatura, oxigênio dissolvido, alcalinidade total, amônia, nitrito e nitrato, sendo incluída na última alíquota a análise de sólidos suspensos totais, fixos e voláteis.

Para o cálculo das velocidades específicas (μ) de consumo de substrato e formação de produto, foi dividido o valor das velocidades (r) pela concentração celular previamente determinada.

3.2.9 Ajuste dos modelos matemáticos aos dados experimentais

A partir das velocidades de consumo de substrato dos ensaios de atividade específica (nitritante, ANAMMOX e DMX) e das respectivas concentrações de substrato utilizadas, foi realizada uma análise dos dados através de uma regressão não linear pelo software SAS 9.2 (2008), onde foi testado o ajuste dos modelos matemáticos de Monod, Andrews, Teissier, Edwards II, Luong e Edwards I aos dados experimentais, conforme descrevem as Equações 12, 13, 14, 15, 16 e 17, respectivamente.

Assim, os parâmetros cinéticos para os micro-organismos testados foram obtidos através do melhor ajuste encontrado para os dados experimentais.

$$\mu_X = \mu_m \cdot \frac{S}{K_S + S} \quad \text{Equação 12}$$

$$\mu_X = \mu_m \cdot \frac{S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_I}} \quad \text{Equação 13}$$

$$\mu_X = \mu_m \cdot \left(1 - e^{-\frac{S}{K_S}} \right) \quad \text{Equação 14}$$

$$\mu_X = \frac{\mu_m \cdot S}{K_S + S} \exp\left(-\frac{S}{K_I}\right) \quad \text{Equação 15}$$

$$\mu_X = \frac{\mu_m \cdot S}{K_S + S} \left(1 - \left(\frac{S}{S_m} \right) \right)^n \quad \text{Equação 16}$$

$$\mu_X = \mu_m \left(\exp\left(-\frac{S}{K_I}\right) - \exp\left(-\frac{S}{K_S}\right) \right) \quad \text{Equação 17}$$

Onde:

μ_X = velocidade específica de crescimento (d^{-1})

μ_m = velocidade máxima específica de crescimento (d^{-1})

S = concentração de substrato ($mg L^{-1}$)

K_S = constante de saturação pelo substrato ($mg L^{-1}$)

K_I = constante de inibição pelo substrato ($mg L^{-1}$)

S_m = concentração de substrato onde o crescimento cessa ($mg L^{-1}$)

n = constante de Luong (adimensional)

3.3 METODOLOGIAS E TÉCNICAS LABORATORIAIS

3.3.1 Determinação de pH

As determinações de pH foram realizadas com potenciômetro da marca TECNAL, modelo Tec-3MP com eletrodo de pH e calibrado segundo os procedimentos descritos pelo Standard Methods (APHA, 2012), com soluções tampão de pH 7,0 e 4,0 da marca Merk.

3.3.2 Determinação de oxigênio dissolvido (OD)

As determinações de oxigênio dissolvido foram realizadas com medidor de oxigênio dissolvido, da marca YSI modelo 55.

3.3.3 Alcalinidade total

Para determinação de alcalinidade, utilizou-se do método titulométrico (APHA, 2012). Este método é aplicável à determinação da presença de carbonato e bicarbonatos em efluentes de sistemas de tratamentos de resíduos e água em geral.

Utilizou-se potenciômetro TECNAL Tec-3MP; um titulador semi-automático TITRONIC T-200. Para a análise, se faz necessário preparar as seguintes soluções: solução padrão de H_2SO_4 $0,005 mol L^{-1}$, onde o valor de alcalinidade foi obtido segundo a Equação 18.

$$mgCaCO_3 \cdot L^{-1} = \frac{M \cdot A \cdot 100000}{V} \quad \text{Equação 18}$$

Onde:

M = molaridade do ácido padronizado ($mol L^{-1}$)

A = volume de ácido padronizado gasto para reduzir o pH para 4,5 (mL)

V = volume de amostra (mL)

3.3.4 Nitrogênio amoniacal total (NAT)

A análise de nitrogênio amoniacal total foi realizada com eletrodo de íon seletivo da marca Thermo segundo procedimento descrito no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2012), pelo método potenciométrico, com alteração do volume de amostra. NAT compreende a soma de $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ e neste trabalho está expressado como N-NH_3 .

3.3.5 Nitrito e Nitrato

Na determinação de nitrito optou-se por utilizar o método colorimétrico em um sistema de análise por injeção em fluxo conforme APHA (2012), modificado segundo Schierholt Neto *et al.* (2006).

Para tanto, utilizou-se um Sistema Multicanal FIALab – 2500 com cabos de fibra ótica (SMA 200 mm) que ligam a célula de reação ao espectrofotômetro (Ocean-optics S2000 – escala ótica de 200 a 850 nm). Como carreador foi utilizado água destilada e como reagente de cor uma solução contendo sulfanilamida, ácido ortofosfórico e n-1-naftiletilenodiamina dihidracloreto, sendo todo reagente grau P.A.

Exclusivamente para análise de nitrato foi utilizado uma coluna com aproximadamente 5 g de cádmio para redução do nitrato a nitrito e uma solução de cloreto de amônio e EDTA sal dissódico como reagente tampão.

3.3.6 Sólidos suspensos totais, fixos e voláteis

Análise realizada segundo procedimento descrito no Standard Methods for the Examination of Water and wastewater (APHA, 2012). As amostras foram filtradas em filtro 0,45 μm sob cadinho de Gooch, secas em estufa a 105 °C por uma hora (SST) e calcinadas em mufla a 550°C por 30 minutos (SSF). Os SSV foram determinados pelo cálculo da diferença entre os SST e SSF.

3.3.7 Cálculos de carga (c)

Os cálculos das cargas aplicadas ao reator foram realizados segundo a Equação 19.

$$c = \frac{[C] \cdot Q}{V}$$

Equação 19

Onde:

c = carga aplicada ao reator ($\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$)

$[C]$ = Concentração na entrada (mg L^{-1})

Q = vazão de alimentação (L d^{-1})

V = volume do reator (L)

3.3.8 Balanço de massa e eficiência de remoção de nitrogênio

O reator DMX operou continuamente com recirculação de células conforme o sistema representado esquematicamente pela Figura 13. Assim, a eficiência teórica máxima pôde ser calculada a partir do balanço de massa para o substrato (nitrogênio total) realizado em função do sistema operacional.

Para a descrição matemática do balanço de massa do sistema, fez-se necessária a formulação das seguintes hipóteses:

1. Reator homogêneo;
2. Regime de alimentação contínuo, ou seja $Q/V = D$;
3. Não há transformação do nitrogênio no decantador, então $S_R = S$;
4. Estado estacionário, ou seja $dS/dt = 0$;
5. A velocidade de crescimento é desprezível, então $dX/dt = 0$;
6. O substrato incorporado na biomassa e o consumo de substrato para manutenção das células são desprezíveis;
7. O acúmulo de nitrogênio na forma de nitrito é desprezível.

Dessa forma, pode-se escrever o seguinte balanço de massa para o substrato, considerando o reator DMX como volume de controle:

$$Q_e \cdot S_e + Q_R \cdot S_R - (Q_R + Q_e) S - \mu_S \cdot X \cdot V + \mu_P \cdot X \cdot V = 0$$

Onde:

Q_e = Vazão de entrada (L d^{-1});

S_e = Concentração de NT na entrada (mgNT L^{-1});

Q_R = Vazão de recirculação (L d^{-1});

S_R = Concentração de NT na recirculação (mgNT L^{-1});

S = Concentração de substrato na saída (mgNT L^{-1});

μ_S = velocidade específica de consumo de amônia (d^{-1});

μ_P = velocidade específica de produção de nitrato (d^{-1});

X = Concentração celular (gSSV L^{-1});

V = Volume do reator (L)

Dividindo os membros da equação acima por V, temos:

$$\frac{Q_e \cdot S_e}{V} + \frac{Q_R \cdot S_R}{V} - \frac{(Q_R + Q_e) S}{V} - \frac{\mu_S \cdot X \cdot V}{V} + \frac{\mu_P \cdot X \cdot V}{V} = 0$$

Considerando a transformação do nitrogênio no decantador desprezível (hipótese 3), obtemos:

$$\frac{Q_e \cdot S_e}{V} - \frac{Q_e \cdot S}{V} + X (\mu_P - \mu_S) = 0$$

Considerando o regime de alimentação contínuo (hipótese 2), temos:

$$D (S_e - S) + X (\mu_P - \mu_S) = 0$$

Assim, isolando a variável S e rearranjando a equação, chegamos a Equação 20 para o cálculo da concentração na saída do reator DMX:

$$S = S_e + \frac{(\mu_P - \mu_S) \cdot X}{D} \quad \text{Equação 20}$$

No mesmo contexto, a eficiência de remoção de nitrogênio teórica pôde ser calculada pela Equação 21, utilizando o valor de S teórico obtido pela Equação 20. Ainda, a eficiência de remoção de nitrogênio obtida durante o experimento também foi calculada através da Equação 20, porém utilizando os valores de S experimentais.

$$E = \left(1 - \frac{S^*}{S_e}\right) \cdot 100 \quad \text{Equação 21}$$

Onde:

E = eficiência (%);

S* = concentração de nitrogênio total ($N-NH_3 + N-NO_2^- + N-NO_3^-$) ($mg L^{-1}$).

3.3.9 Cálculo das concentrações de amônia livre (AL) e ácido nitroso livre (ANL)

O equilíbrio químico do sistema para formação de amônia livre e ácido nitroso livre foi calculado através das Equações 22 e 23, propostas por Anthonisen *et al.*, 1976.

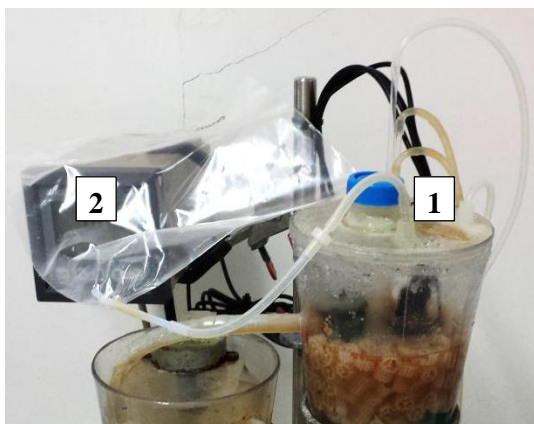
$$AL (NH_3, \text{mg/L}) = \frac{17}{14} \times \frac{[\text{total de amônia como N}] \times 10^{\text{pH}}}{e^{[6344/(273+T(^{\circ}\text{C}))]} + 10^{\text{pH}}} \quad \text{Equação 22}$$

$$ANL (HNO_2, \text{mg/L}) = \frac{46}{14} \times \frac{[N-NO_2^-]}{e^{[-2300/(273+T(^{\circ}\text{C}))]} \times 10^{\text{pH}}} \quad \text{Equação 23}$$

3.3.10 Amostragem e quantificação dos gases de efeito estufa (GEE)

As amostras dos gases foram coletadas através de um sistema acoplado ao reator (Figura 15) onde obrigatoriamente todo o gás emitido era transferido para um balão de plástico localizado na parte superior do mesmo durante o tempo de um ciclo completo (30 minutos). Foram coletadas amostras diariamente, durante 12 dias sem interrupção, quando o reator encontrava-se com estável atividade DMX.

Figura 15 – Sistema utilizado para coleta dos gases no reator DMX durante o experimento. Onde: 1, saída do gás do reator; 2, balão para coleta do gás.



Para medição, foi utilizado um analisador de gases infravermelho fotoacústico (INNOVA 1412, Lumasense Technologies, Denmark) e as massas de N-NH₃ e N-N₂O calculadas utilizando a Equação 24.

$$\beta = \frac{C \times M_N \times P \times (Q \cdot t)}{(R \times T) \cdot V^*} \quad \text{Equação 24}$$

Onde:

β = taxa de emissão ($\mu\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$) do gás de interesse (N-NH₃, N-N₂O);

C = concentração determinada pelo analisador de gases (ppmv);

M_N = massa de N no gás de interesse (N-NH₃ = 14 gN mol⁻¹ NH₃ e N-N₂O = 28 gN mol⁻¹ N₂O);

P = pressão do gás (P = 1 atm);

Q = vazão de ar (L d⁻¹);

t = tempo (d);

R = constante universal dos gases (0,082 atm.L mol⁻¹ K⁻¹);

T = temperatura do gás amostrado (K);

V* = volume do reator (L).

3.3.11 Caracterização da biomassa

Para identificar e quantificar o consórcio de micro-organismos presentes no reator DMX, foram realizadas análises baseadas em técnicas de biologia molecular: qPCR (PCR quantitativo) e FISH (do inglês, *Fluorescent In Situ Hybridization*).

3.3.11.1 Análise de Hibridização *in situ* com fluorescência (FISH)

A metodologia utilizada na análise seguiu as orientações de fixação e preparo de lâminas para análise microscópica, segundo Amann *et al.* (1990). As amostras foram fixadas utilizando as soluções de PBS e paraformaldeído 4%. Para hibridização, as amostras foram secas em estufa á 46 °C, desidratadas em etanol por imersão e secas a temperatura ambiente. Em seguida adicionou-se a solução de hibridização (na proporção apresentada na Tabela 7), a sonda específica (Tabela 8) para cada gênero de bactéria, e incubaram-se as lâminas em estufa 46 °C. Após, cobriu-se as amostras com DAPI (para coloração do DNA total) e novamente as lâminas foram incubadas a 46 °C. Em seguida, procedeu-se com a lavagem utilizando-se solução específica para cada sonda utilizada (Tabela 7) e por fim, mantiveram-se as lâminas protegidas da luz para secagem à temperatura ambiente. As lamínulas foram sobrepostas com auxílio de uma solução de Citifluor 30% em Glicerol 50%.

Tabela 7 – Concentração do tampão de hibridização e solução de lavagem para cada tipo de sonda.

Sonda	Tampão de hibridização (%)	Solução de lavagem (%)
EUB mix (EUB338 I + EUB338 II + EUB338 III)	20	20
Nso190	55	55
NEU	40	40
NIT3	40	40
AMX368	15	15

Tabela 8 – Sequencia e especificidade das sondas utilizadas na análise de FISH para o reator DMX.

Sondas	Sequencia 5' - 3'	Especificidade
EUB mix (EUB338 I + EUB338 II + EUB338 III) ^a	GCT GCC TCC CGT AGG AGT GCA GCC ACC CGT AGG TGT GCT GCC ACC CGT AGG TGT	Domínio <i>Bacteria</i>
Nso190 ^b	CGA TCC CCT GCT TTT CTC C	Todas as BOA
NEU ^a	CCC CTC TGC TGC ACT CTA TTC CAT CCC CCT CTG CCG*	Gênero <i>Nitrosomonas</i>
NIT3 ^c	CCT GTG CTC CAT GCT CCG CCT GTG CTC CAG GCT CCG*	Gênero <i>Nitrobacter</i>
AMX368 ^d	CCT TTC GGG CAT TGC GAA	Todas as ANAMMOX

^aPOLPRASERT e SAWAITTA-YOTHIN, 2006;

^bMOBARRY *et al.*, 1996;

^cWAGNER *et al.*, 1996;

^dSCHMID *et al.*, 2003;

*Sondas competidoras. As sondas competidoras não contém marcação com fluoróforo.

A ligação da sonda (marcadas com o fluorocromo do tipo Cy3) com a sequencia complementar no rRNA foi detectada por microscopia de epifluorescência (microscópio Olympus Modelo Bx41) e sistema de

captura de imagens do Laboratório Multiusuários de Estudos em Biologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

3.3.11.2 Quantificação de bactérias por reação em cadeia da polimerase (qPCR)

A quantificação da biomassa nitrificante (*amoA*) e biomassa ANAMMOX (*hzo*) foi realizada pelo método de PCR quantitativo (qPCR) utilizando o equipamento Rotor Gene 6000 (Corbett Research, NSW, Australia).

3.3.11.2.1 Curvas padrão para quantificação dos genes *16S*, *amoA* e *hzo*

O número de células foi estimado de acordo com as curvas padrão previamente preparada em concentrações decimais seriais de cópias de DNA. Para quantificação de bactérias totais no reator, a curva padrão foi gerada pela transformação de células de *Escherichia coli* DH5 α com o plasmídeo pCR.2.1-TOPO (Invitrogen), contendo uma sequência do gene 16S rDNA. Para quantificação dos genes catabólicos específicos para as reações de amônia monooxigenase (*amoA*) e hidrazina oxidase (*hzo*), uma curva padrão foi construída para cada amplicon purificado. Para clonagem, fragmentos alvo de DNA foram amplificados e inseridos no vetor pCR® 2.1-TOPO® (Invitrogen, USA) e transformados em células competentes de DH5 α *E. coli* (SAMBROOK e RUSSEL *et al.*, 2001). Os clones foram inoculados e incubados em caldo Luria-Bertani contendo ampicilina (100 mg mL⁻¹). O DNA plasmidial foi extraído utilizando o método de lise alcalina (SAMBROOK e RUSSEL, 2001). A presença de insertos no DNA plasmidial foi confirmada por meio de eletroforese em gel após PCR convencional.

3.3.11.2.2 Quantificação dos genes *amoA* e *hzo*

Amostras da biomassa do reator foram coletadas e submetidas a extração de DNA total utilizando o kit comercial UltraClean Microbial DNA Isolation (MOBIO). Após o processo de extração, o DNA obtido foi submetido a reação de qPCR para quantificação de bactérias nitrificantes e bactérias ANAMMOX, para a qual foi utilizado o kit comercial SYBR Green mix/ROX (Ludwig Biotec). Este kit contém a maioria dos reativos necessários para que a PCR ocorra (dNTPs, enzima Taq DNA

Polimerase, condições salinas adequadas), sendo adicionados os iniciadores (Tabela 9) e o material genético a ser avaliado.

Tabela 9 – Iniciadores utilizados e sua sequência

Iniciadores	Sequência (5' – 3')	Referência
<i>16Sf</i>	ATGGCTGTCGTCAGCT	Ferris <i>et al.</i> 1996
<i>16Sr</i>	ACGGGCGGTGTGTAC	
<i>amoAf</i>	GGGGTTTCTACTGGTGGT	Rotthauwe <i>et al.</i> , 1997
<i>amoAr</i>	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	
<i>hzof</i>	TGYAAGACYTG YCAYTGG	Schmid <i>et al.</i> , 2008
<i>hzor</i>	ACTCCAGATRTGCTGACC	

Os ensaios de qPCR foram realizados em duplicatas, sempre contendo controles negativos e positivos das reações. Todas as reações continham 12,5 µL de master mix SYBR Green, 0,5 µM de cada iniciador, 10µL de DNA total, e água ultrapura para completar um volume final de 25 µL. As reações foram acomodadas no equipamento Rotor Gene 6000 (BIORAD) e submetidas a termo ciclagem de: *16S*, 95°C por 5 min, 40 ciclos de 95°C por 15s, 53°C por 15s, 72°C por 40s; *amoA*, 94°C por 5 min, 40 ciclos de 94°C por 60s, 60°C por 90s, 72°C por 90s e *hzo*, 95°C por 5 min, 40 ciclos de 95°C por 15s, 53°C por 15s, 72°C por 60s. A especificidade de cada reação foi confirmada pela análise da curva de desnaturação. Todas as reações foram realizadas em duplicata.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ENSAIOS DE ATIVIDADE ESPECÍFICA PARA OBTENÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS DOS INÓCULOS PRIMÁRIOS

4.1.1 Atividade específica nitrificante

A concentração de oxigênio dissolvido durante o ensaio respirométrico referente à respiração endógena da biomassa nitrificante apresentou comportamento linear, obtendo uma velocidade de consumo de oxigênio (QO_2X) de $0,0575 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1} \text{ min}^{-1}$, e uma velocidade específica de consumo de oxigênio ($QO_2 \text{ end}$) de $0,0432 \text{ mgO}_2 \text{ gSSV}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Os resultados obtidos em cada ensaio realizado, expressos na forma gráfica, encontram-se disponíveis no Apêndice A.

A Tabela 10 apresenta em síntese os resultados dos ensaios de atividade nitrificante realizado com a biomassa utilizada como inóculo do reator DMX.

Tabela 10 – Velocidade de consumo de oxigênio e velocidade específica de consumo de oxigênio para cada concentração de substrato utilizada durante os ensaios realizados com a biomassa nitrificante.

Ensaio	S ($\text{mgN-NH}_3 \text{ L}^{-1}$)	QO_2X ($\text{mgO}_2 \text{ L}^{-1} \text{ min}^{-1}$)	QO_2 ($\text{mgO}_2 \text{ gSSV}^{-1} \text{ min}^{-1}$)
1	13,33	3,288	2,425
2	25,71	4,965	3,685
3	46,79	5,386	4,001
4	99,85	5,711	4,245
5	154,78	6,029	4,484
6	211,19	5,942	4,419
7	258,78	6,166	4,587
8	354,52	6,099	4,537
9	476,50	5,767	4,287
10	605,60	5,597	4,160
11	849,05	5,663	4,209
12	1244,50	5,078	3,770

De forma conhecida, foram utilizadas doze diferentes concentrações iniciais de N-NH_3 (Tabela 10) onde através dos dados obtidos para

cada pulso fornecido durante um ensaio respirométrico eram calculadas as velocidades específicas de respiração, as quais posteriormente foram ajustadas a um modelo para obtenção dos parâmetros cinéticos.

Através dos dados de QO_2 da Tabela 10, é possível perceber a tendência de inibição do processo de nitrificação devido ao aumento da concentração de substrato S. Durante os ensaios iniciais (1 a 5, Tabela 10), em baixas concentrações de $N-NH_3$, o QO_2 teve comportamento crescente, atingindo maior velocidade específica de consumo de oxigênio no ensaio 7 ($QO_2 = 4,587 \text{ mgO}_2 \text{ gSSV}^{-1} \text{ min}^{-1}$), sob concentração de $N-NH_3$ de $258,78 \text{ mg L}^{-1}$. Após o aumento da concentração S nos pulsos posteriores, o comportamento do QO_2 passou a ser decrescente, reduzindo a velocidade específica de consumo de oxigênio e consequentemente indicando inibição pelo substrato.

Para melhor especificidade, os dados experimentais foram submetidos a análise de regressão não linear objetivando encontrar o modelo que melhor representasse o comportamento da biomassa nitrificante. A Tabela 11 apresenta os resultados da análise do Critério de Informação de Akaike (CIA) (AKAIKE, 1974) em função dos modelos para a variável QO_2 no processo de respirometria, onde o menor valor encontrado representa o melhor ajuste do modelo.

Tabela 11 – Análise do critério de informação de Akaike (CIA) em função dos modelos matemáticos para a variável QO_2 no processo de respirometria.

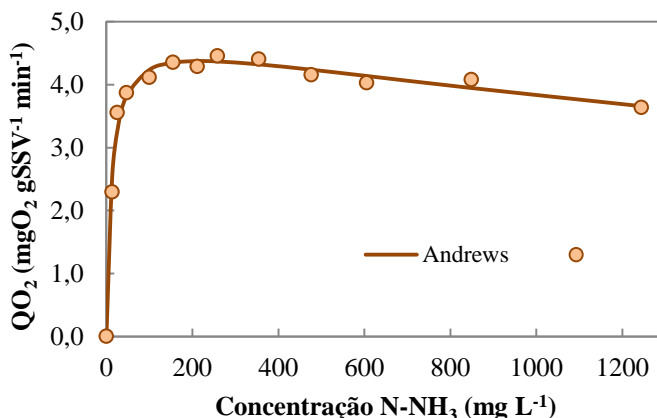
Modelo	Nº de parâmetros	CIA
Andrews	3	-6,6966
Edwards II	3	-6,5092
Luong	4	-6,5092
Edwards I	3	-5,2619
Teissier	2	3,0912
Monod	2	10,0450

O modelo matemático de Andrews foi o que melhor se ajustou aos dados experimentais. Isso porque o mesmo leva em consideração além da constante de saturação K_s e da velocidade máxima específica $\mu_{\text{máx}}$, a constante de inibição K_i , que neste estudo representa o efeito

inibitório da concentração de substrato para a biomassa nitrificante quando exposta a altas concentrações.

Dessa forma, através da afinidade no ajuste do modelo aos dados experimentais, o modelo de Andrews (ANDREWS, 1968) foi o que melhor representou o comportamento da biomassa nitrificante durante os ensaios realizados, obtendo, além do menor valor de CIA, um coeficiente de correlação de $R^2 = 0,989$. A Figura 16 apresenta a curva da velocidade específica de consumo de oxigênio em função da concentração de substrato e o ajuste do modelo de Andrews aos dados experimentais.

Figura 16 – Valores da velocidade específica de respiração (QO_2) em função da concentração do substrato ($N-NH_3$) e ajuste do modelo de Andrews aos dados experimentais.



O cruzamento dos dados após regressão não linear permitiu estimar os valores dos parâmetros cinéticos característicos da biomassa nitrificante, determinados pelo ajuste da Equação 13 (Andrews), conforme descrito na Tabela 12. No entanto, a definição do parâmetro μ_m do modelo de Andrews está relacionado ao valor máximo de velocidade de consumo de substrato na ausência de inibição. Isso faz com que quanto maior o nível de inibição do processo, mais superestimado se torne o seu valor. Por isso, Andrews (1968), propõe que esse valor seja corrigido (μ_m^*) pela Equação 25, que é o resultado da derivada da Equação 13, igualada a zero.

$$\mu_m^* = \frac{\mu_m}{1 + 2 \cdot \sqrt{\frac{K_S}{K_I}}} \quad \text{Equação 25}$$

Onde:

μ_m^* = velocidade máxima específica de consumo de substrato corrigida (mg gSSV⁻¹ h⁻¹)

Tabela 12 – Parâmetros cinéticos do modelo de Andrews estimados através da regressão não linear para a biomassa nitrificante.

Modelo	μ_m^a	μ_m^{*a}	K_S^b	K_I^b	R ²
Andrews	4,885	4,388	12,4	3867,1	0,989

^amgO₂ gSSV⁻¹ min⁻¹;

^bmg N-NH₃ L⁻¹

Ferretti (2005) estudando a velocidade de respiração em ensaios de atividade específica utilizando biomassa nitrificante também alimentada com efluente sintético, encontrou um valor de μ_m^* de 3,37 mgO₂ gSST⁻¹ min⁻¹. Jubany *et al.* (2005) estudando a inibição de bactérias nitrificantes pelo substrato, obteve um valor de velocidade máxima específica de 3,21 mgO₂ gSSV⁻¹ min⁻¹. A velocidade máxima específica μ_m^* do presente estudo foi de 4,38 mgO₂ gSSV⁻¹ min⁻¹ para uma concentração de 300 mgN-NH₃ L⁻¹, o que demonstra a alta seletividade e capacidade dos micro-organismos em ser utilizados como inóculo nitrificante, além da atividade preponderante em relação aos valores encontrados pela literatura.

Quanto aos valores de K_S e K_I , foram encontrados 12,38 mg N-NH₃ L⁻¹ e 3867,12 mgN-NH₃ L⁻¹, respectivamente. O valor relativamente alto de K_I permite dizer que, apesar da evidente queda na velocidade específica, a biomassa nitrificante estudada apresenta resistência considerável de inibição quando submetida a elevadas concentrações de S, característica que fortalece sua aptidão para o tratamento de efluentes também concentrados.

4.1.2 Atividade específica ANAMMOX

A Tabela 13 apresenta os valores das velocidades de consumo de substrato de amônia (rN-NH₃) e nitrito (rN-NO₂⁻) e das respectivas velocidades específicas (μ_N -NH₃ e μ_N -NO₂⁻) para cada concentração de

substrato utilizada nos ensaios cinéticos com a biomassa ANAMMOX. Todos os resultados das quedas de consumo de substrato e das velocidades específicas obtidos em cada ensaio realizado estão apresentados no Apêndice B, sob forma gráfica para melhor compreensão.

Tabela 13 – Velocidade de consumo de amônia e nitrito para cada concentração de substrato utilizada e suas respectivas velocidades específicas oriundas dos ensaios realizados com a biomassa ANAMMOX.

Ensaio	S (mg L ⁻¹)		r (mg L ⁻¹ h ⁻¹)		μ (mg gSSV ⁻¹ h ⁻¹)	
	N-NH ₃	N-NO ₂ ⁻	N-NH ₃	N-NO ₂ ⁻	N-NH ₃	N-NO ₂ ⁻
1	15,83	9,94	-2,52	-3,58	1,46	2,08
2	27,74	25,06	-2,95	-4,33	1,72	2,52
3	52,99	51,62	-4,89	-6,55	2,85	3,81
4	75,61	70,38	-8,40	-10,70	4,89	6,22
5	97,31	97,40	-8,54	-12,26	4,97	7,13
6	124,80	124,80	-9,36	-11,12	5,45	6,47
7	160,23	146,63	-9,71	-11,10	5,65	6,46
8	191,94	204,40	-9,61	-9,73	5,59	5,66
9	309,76	292,75	-9,96	-9,31	5,80	5,41
10	395,00	387,20	-8,48	-8,22	4,93	4,78

A maior velocidade específica de consumo de amônia encontrada foi de 5,80 mgN-NH₃ gSSV⁻¹ h⁻¹ (Ensaio 9) a uma concentração S de 309,76 mgN-NH₃ L⁻¹. Já a maior velocidade específica de consumo de nitrito foi de 7,13 mgN-NO₂⁻ gSSV⁻¹ L⁻¹ (Ensaio 5) a uma concentração S de 97,31 mgN-NO₂⁻ L⁻¹. Apesar de μN-NO₂⁻ possuir um valor de velocidade maior do que μN-NH₃, o efeito inibitório das concentrações de substrato se mostraram mais evidentes e rápidos para o primeiro do que para o segundo, ou seja, enquanto μN-NO₂⁻ começou a diminuir a velocidade a partir do Ensaio 5, μN-NH₃ apresentou uma pequena redução na velocidade somente no último ensaio. Além disso, a queda de μN-NH₃ no Ensaio 10 pode ter sido fruto do acúmulo de N-NO₂⁻ no reator (oriundo da queda acentuada de μN-NO₂⁻), o que pode ter gerado um desequilíbrio na razão estequiométrica causando a redução da atividade das bactérias.

Devido às bactérias ANAMMOX consumirem amônia e nitrito como substrato simultaneamente durante o processo de conversão, a análise não linear das velocidades específicas em função da concentração do substrato foram realizadas separadamente, possibilitando assim, a obtenção dos parâmetros cinéticos e modelagem matemática específica para cada substrato consumido.

Dessa forma, foram ajustados cinco modelos matemáticos aos dados experimentais com o objetivo de encontrar o modelo que melhor representasse o comportamento da biomassa ANAMMOX tanto para o consumo de $N-NH_3$ como para $N-NO_2^-$. A Tabela 14 apresenta os resultados da análise de CIA (AKAIKE, 1974) em função dos modelos matemáticos para as variáveis $N-NH_3$ e $N-NO_2^-$ no processo ANAMMOX, onde o menor valor encontrado representa o melhor ajuste do modelo.

Tabela 14 – Análise do critério de informação de Akaike (CIA) em função dos modelos matemáticos para as variáveis $N-NH_3$ e $N-NO_2^-$ no processo ANAMMOX.

Modelo	Nº de parâmetros	CIA_{N-NH_3}	$CIA_{N-NO_2^-}$
Edwards I	3	13,6232	25,3135
Edwards II	3	13,7606	25,9533
Luong	4	15,7606	27,9533
Andrews	3	16,1763	26,7580
Teissier	2	18,2090	30,9695
Monod	2	24,2222	34,4729

Os valores apresentados na Tabela 14 revelam que o modelo matemático de Edwards I (EDWARDS, 1970) foi o que melhor se ajustou aos dados experimentais tanto para $N-NH_3$ como para $N-NO_2^-$, obtendo, além do menor valor de CIA, um coeficiente de correlação de $R^2 = 0,962$ e $R^2 = 0,919$, respectivamente. Esse modelo, assim como de Andrews, também foi proposto levando em consideração a cinética de inibição pelo substrato.

As Figuras 17 e 18 apresentam as curvas da velocidade específica de consumo de amônia e nitrito, respectivamente, em função da concentração S de substrato e o ajuste do modelo de Edwards I aos dados experimentais.

Figura 17 - Valores da velocidade específica de consumo de amônia ($\mu\text{N-NH}_3$) em função da concentração do substrato (N-NH_3) e ajuste do modelo de Edwards I aos dados experimentais.

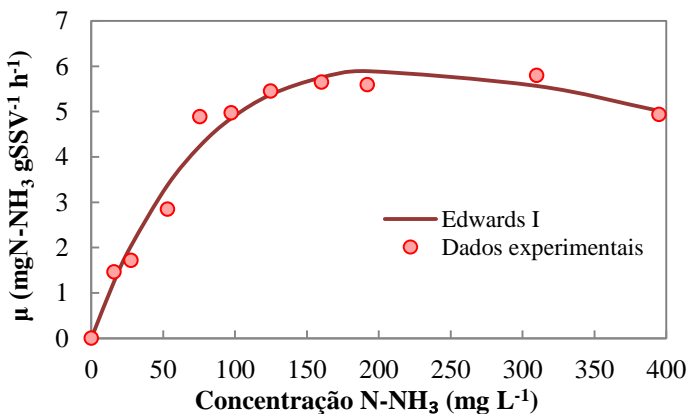
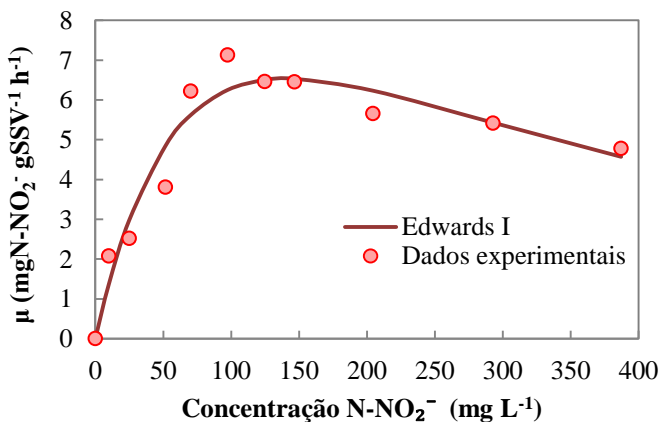


Figura 18 - Valores da velocidade específica de consumo de nitrito ($\mu\text{N-NO}_2^-$) em função da concentração do substrato (N-NO_2^-) e ajuste do modelo de Edwards I aos dados experimentais.



O cruzamento dos dados após regressão não linear permitiu estimar os valores dos parâmetros cinéticos característicos da biomassa

ANAMMOX, determinados pelo ajuste da Equação 17 (Edwards I), conforme descrito na Tabela 15.

Tabela 15 – Parâmetros cinéticos do modelo de Edwards I estimados através da regressão não linear para a biomassa ANAMMOX.

Modelo	Variável	μ_m^a	K_S^b	K_I^b	R^2
Edwards I	N-NH ₃	9,971	96,435	603,53	0,962
	N-NO ₂ ⁻	9,573	56,402	525,34	0,919

^amgN gSSV⁻¹ h⁻¹;

^bmgN L⁻¹

Os valores dos parâmetros cinéticos apresentados na Tabela 15, associados com as Figuras 17 e 18, revelam que o aumento da concentração S se mostrou mais limitante para a velocidade de consumo de nitrito do que para a amônia no processo ANAMMOX, indicando a maior capacidade do N-NO₂⁻ de inibir a atividade das bactérias.

Dapena Mora *et al.* (2007), estudou os efeitos de inibição da concentração de amônia, nitrito e nitrato sob a atividade das bactérias ANAMMOX e concluiu que entre as formas de nitrogênio estudadas, o nitrito foi a que exerceu o maior efeito inibitório sobre a atividade específica das bactérias com atividade ANAMMOX. Bettazzi *et al.* (2010), realizando testes de inibição por nitrito em reatores com atividade ANAMMOX concluíram que concentrações de 75 mgN-NO₂⁻ L⁻¹ reduzem cerca de 28% a atividade das bactérias. No presente estudo, conforme os dados apresentados na Tabela 15, concentrações superiores a 100 mgN-NO₂⁻ L⁻¹ tendem a reduzir a atividade das bactérias ANAMMOX e limitar a velocidade de consumo de substrato do processo.

A velocidade máxima específica de consumo de N-NH₃ encontrada foi de 9,971 mgN-NH₃ gSSV⁻¹ h⁻¹ para amônia e 9,573 mgN-NO₂⁻ gSSV⁻¹ h⁻¹ para nitrito. Já a constante de inibição pelo substrato K_I foi de 603,53 mgN-NH₃ L⁻¹ para amônia e 525,34 mgN-NO₂⁻ L⁻¹ para nitrito, reforçando novamente a maior influência das concentrações de nitrito na inibição do processo ANAMMOX. Os valores de K_S foram de 96,435 mg L⁻¹ para amônia e 56,402 mg L⁻¹ para nitrito. Strous *et al.* (1998) relataram que as constantes de afinidade das bactérias ANAMMOX para amônia e nitrito foram iguais ou menores que 0,1 mgN L⁻¹ para diâmetros de agregados (80%) menores que 50 µm. No entanto, o diâmetro

dos agregados do presente estudo se encontram na faixa de milímetros, o que fez a resistência à transferência de massa ser muito mais forte.

Embora as pesquisas relacionadas à microbiologia e bioquímica do processo ANAMMOX tenham se mostrado significativas, as informações referentes à cinética de crescimento dessas bactérias ainda são muito variáveis na literatura. Para o caso específico das ANAMMOX, a velocidade de crescimento torna-se particularmente importante, dado o número significativo de dificuldades relatadas na partida dos sistemas tanto laboratoriais como em grande escala. Sendo assim, a estimativa do valor de μ_m para essas bactérias torna-se uma ferramenta importante para ajudar a determinar se o tempo de partida está relacionado à baixa atividade das mesmas ou às condições operacionais impostas ao sistema, oferecendo por consequência suporte para a tomada de decisão.

No presente estudo, a velocidade específica máxima de crescimento encontrada e obtida pela modelagem dos dados experimentais para as bactérias ANAMMOX foi de $0,0096 \text{ h}^{-1}$. Van de Graaf *et al.* (1996) encontrou um valor de $0,001 \text{ h}^{-1}$ para o mesmo propósito, já Strous *et al.* (1998) encontrou $0,0027 \text{ h}^{-1}$ e Isaka *et al.* (2006) $0,016 \text{ h}^{-1}$, todos trabalhando com culturas mistas enriquecidas e acima de 30°C . Malovanyy *et al.* (2012) estudando os fatores que influenciam a velocidade específica de crescimento das bactérias ANAMMOX, relatam que a mesma aumenta de 8,7 a 12,5% em média por cada 1°C aumentado na temperatura do meio. Sabendo disso, de forma positiva as bactérias do reator ANAMMOX apresentaram um valor de μ_m bastante elevado para esse tipo de processo mantido a 25°C . A diferença entre esses valores pode variar em função, além das condições operacionais e fatores externos, da espécie de bactéria utilizada em cada experimento e da possibilidade de inativação de uma parte da população bacteriana devido à transferência de massa limitada nos grânulos ANAMMOX.

4.2 ATIVAÇÃO E PRODUÇÃO DE BIOMASSA PARA INÓCULO DO REATOR DMX

4.2.1 Estabelecimento do processo de nitrificação parcial no reator RBS

O reator RBS foi monitorado durante 103 dias sem interrupção. O desempenho do reator durante a partida e sua relação com as concentrações de alcalinidade estão apresentados na Figura 19. Todos os valores de resultados dados no presente estudo são apresentados como a média e o respectivo desvio padrão (DP).

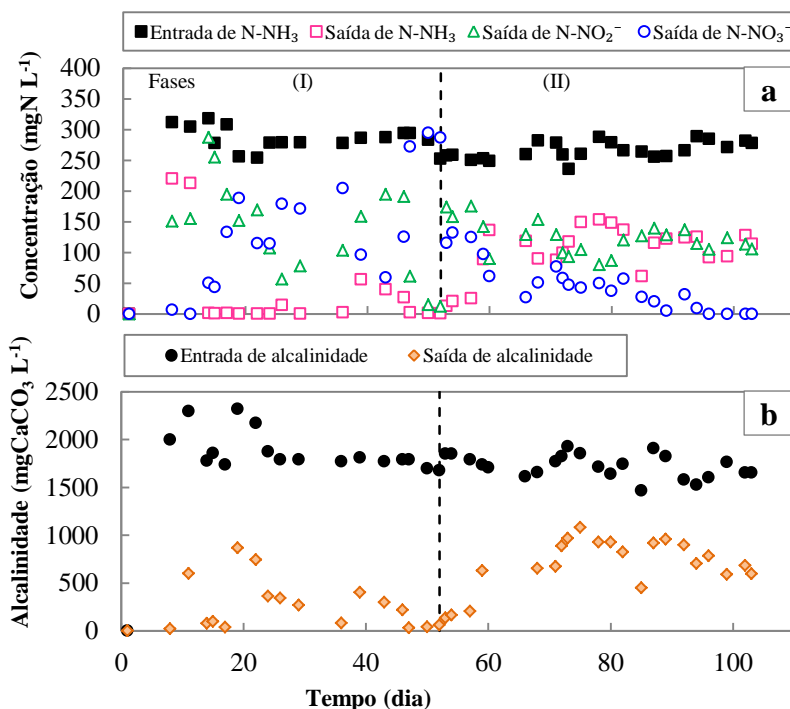
Inicialmente (Fase I, Figura 19a), o reator previamente inoculado foi submetido a 20 minutos de aeração (ciclo óxico) para cada 40 minutos não aerados (ciclo anóxico). Como consequência, após um período de adaptação da biomassa operando a uma concentração de $297 \text{ mgN-NH}_3 \text{ L}^{-1}$ (DP = 5,22), no 52º dia o processo de nitrificação encontrava-se estável no reator, tendo toda concentração de N-NH₃ convertida a N-NO₃⁻ na saída do mesmo.

Conforme já mencionado, a aeração intermitente foi utilizada como recurso para inibição das BON e consequente manutenção da nitrificação parcial. Por isso, quando a amônia passou a ser completamente oxidada a nitrato, a aeração intermitente foi reduzida para 15 minutos de ciclo óxico e 45 minutos de ciclo anóxico, dando início a Fase II, conforme ilustra a Figura 19. Após a limitação de oxigênio no meio, a concentração de N-NO₃⁻ foi gradativamente diminuindo até chegar a zero na saída do sistema (Figura 19a, Fase II). Paralelamente, as concentrações de N-NO₂⁻ e N-NH₃ tenderam a estabilidade do processo de nitrificação parcial após o 85º dia de operação, oxidando aproximadamente 50% da amônia a nitrito e, ainda, evitando a produção de nitrato. Durante esse período, a concentração de N-NH₃ manteve uma média de $114,33 \text{ mg L}^{-1}$ (DP = 14,08) e a concentração de N-NO₂⁻ igual a $120,81 \text{ mg L}^{-1}$ (DP = 13,31), possibilitando a utilização da biomassa como fonte de inóculo do reator DMX.

Além disso, os 103º dias de operação do reator sob condições favoráveis de crescimento permitiu a reprodução das células de modo satisfatório, o que possibilitou a retirada da biomassa sem que esta afetasse a eficiência de conversão das formas nitrogenadas no sistema.

A Figura 19b ilustra o acompanhamento das concentrações de alcalinidade durante o monitoramento do reator RBS. É perceptível a redução no consumo de alcalinidade entre as Fases I e II. Isso porque a oxidação da amônia a nitrito está diretamente relacionada à geração de íons H⁺ (Equação 1) que por sua vez, apresentam tendência a consumir alcalinidade. Portanto, quando a parcela de amônia oxidada aumentar ou diminuir, teoricamente o consumo de alcalinidade aumentará na mesma proporção. Durante o período inicial (Fase I), o consumo de alcalinidade foi de $1609,73 \text{ mgCaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ (DP = 153,01). Após a estabilidade do processo de nitrificação parcial, esse valor foi reduzido para $891,79 \text{ mgCaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ (DP = 144,16), o que representa aproximadamente 55% menos no consumo de alcalinidade durante a oxidação parcial da amônia quando comparada a completa nitrificação.

Figura 19 – Desempenho do reator RBS até o 103^o dia de operação. a: Acompanhamento das concentrações das formas nitrogenadas. b: acompanhamento das concentrações de alcalinidade. Fase I: ciclo óxico de 20 min h⁻¹. Fase II: ciclo óxico de 15 min h⁻¹.



Dentro desse contexto, aplicando as condições operacionais do reator RBS à Equação de Andrews – melhor ajustada aos dados experimentais para as bactérias nitritantes (vide tópico 4.1.1) – pôde-se calcular a velocidade de consumo de substrato das bactérias durante a operação do reator, que resultou em 6,27 d⁻¹. Esse valor representativo, associado à configuração em batelada sequencial, favoreceram a produção e acúmulo de células no reator RBS para posterior utilização como inóculo do reator DMX

4.2.2 Estabelecimento do processo de oxidação anaeróbia da amônia no reator ANAMMOX

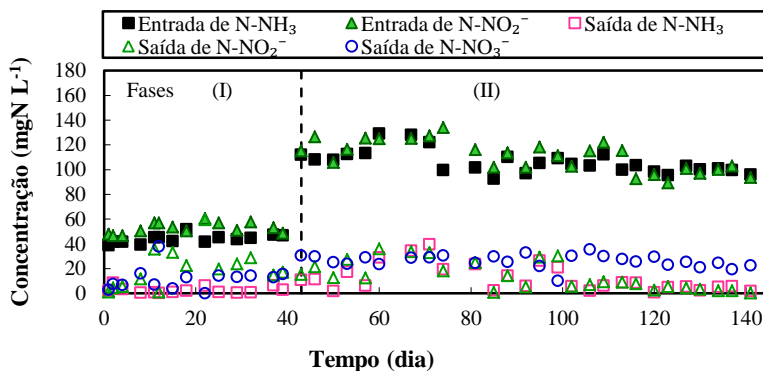
O reator ANAMMOX foi monitorado durante 141 dias sem interrupção. Como resultado da velocidade de crescimento lenta das bactérias com atividade ANAMMOX, bem como sua elevada sensibilidade as mudanças nas condições do meio, o reator apresentou um período de aproximadamente 20 dias para adaptação da biomassa.

A Figura 20 ilustra o desempenho do reator quanto ao acompanhamento das concentrações das formas nitrogenadas. Prá *et al.* (2013), estudando a influência da concentração de nitrogênio durante a partida de reatores com atividade ANAMMOX, concluíram que este é um fator determinante sobre a atividade metabólica das bactérias, interferindo na eficiência e apresentando maior agilidade quando operado com baixas concentrações. Por isso, durante o período inicial (Fase I, Figura 20), o reator foi alimentado com uma concentração de 50 mg L^{-1} de N-NH_3 e 50 mg L^{-1} de N-NO_2^- , totalizando uma carga de nitrogênio aplicado de $0,237 \text{ kgN m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ (DP = 0,02). Após 37º dias de operação, as concentrações de N-NH_3 , N-NO_2^- e N-NO_3^- apresentavam-se estáveis e de acordo com a estequiometria do processo ANAMMOX, atingindo eficiência de 65,51% (DP = 7,36) e removendo uma carga de $0,154 \text{ kgN m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ (DP = 0,02).

Percebendo a estabilidade do processo, no 43º dia de operação do reator promoveu-se aumento na concentração de substrato para 100 mg L^{-1} de N-NH_3 e 100 mg L^{-1} de N-NO_2^- , dando início a Fase II, conforme ilustra a Figura 20. Satisfatoriamente, o reator perdeu pouca eficiência, voltando rapidamente a operar com estabilidade. Após o 99º dia de operação, as baixas concentrações de N-NH_3 e N-NO_2^- , 4,78 (DP = 2,55) e 4,89 (DP = 2,96) respectivamente, associadas a estequiométrica produção de N-NO_3^- , 0,23 (DP = 0,07), demonstraram a adaptação das bactérias e estabelecimento do processo ANAMMOX no reator.

Durante esse período, o reator atingiu uma elevada eficiência de remoção de nitrogênio, 83,01% (DP = 3,23), operando com uma carga aplicada de $0,535 \text{ kgN m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ (DP = 0,04) e removida de $0,415 \text{ kgN m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ (DP = 0,02).

Figura 20 – Acompanhamento das concentrações das formas nitrogenadas do reator ANAMMOX até o 141^o dia de operação. Fase I: concentração de substrato de 100 mgN L⁻¹. Fase II: concentração de substrato de 200 mgN L⁻¹.



Aplicando a Equação 17 de Edwards I, melhor ajustada aos dados experimentais para as bactérias ANAMMOX (vide tópico 4.1.2) e utilizando como base o substrato limitante do processo (N-NO₂⁻) em uma concentração de 100 mg L⁻¹ (concentração utilizada na operação do reator), encontrou-se o valor de 0,0063 h⁻¹ para a velocidade de consumo de substrato das bactérias durante o período de operação do reator ANAMMOX. Quando comparada com a velocidade de consumo das BOA – encontrada no reator RBS (0,26 h⁻¹) – esse valor se mostra aproximadamente 42 vezes menor. Isso demonstra a importância das condições operacionais para controlar as populações bacterianas, de modo que ambas permaneçam em equilíbrio quando dispostas em um único reator.

Contudo, apesar da lenta velocidade de crescimento dessas bactérias, o reator ANAMMOX se mostrou estável e eficiente para produção celular, estimulando sua utilização como fonte de inóculo na partida do reator DMX.

4.3 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES DOS INÓCULOS DO REATOR DMX

4.3.1 Atividade nitritante

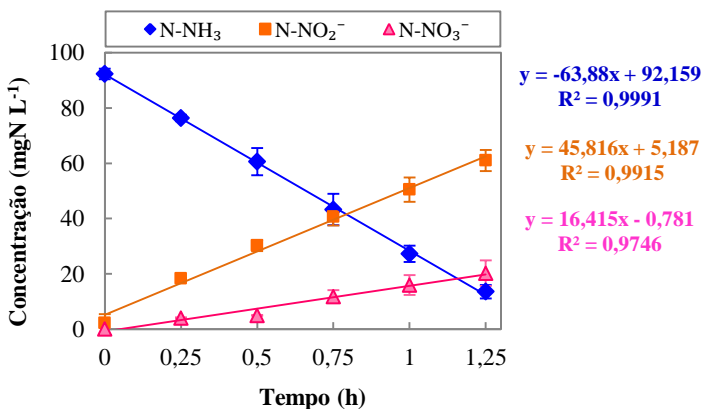
No presente estudo, ensaios cinéticos de consumo de substrato foram realizados para verificar, além do grau de atividade da biomassa, a

razão ideal de inóculo utilizado para a partida do reator DMX. A Figura 21 ilustra o acompanhamento das formas nitrogenadas durante a realização dos ensaios cinéticos utilizando biomassa nitrificante, tendo os resultados expressos pela média e seu respectivo desvio padrão.

Todas as formas nitrogenadas apresentaram comportamento linear, expresso pelos valores do R^2 de 0,9991; 0,9915 e 0,9746 para amônia, nitrito e nitrato, respectivamente. Os ensaios tiveram duração de 1,25 h e todos os valores foram obtidos pela regressão linear dos dados experimentais em função do tempo, onde o coeficiente angular representou a velocidade (r) da reação estudada.

A velocidade de consumo de amônio foi de $r_{N-NH_3} = 63,88 \text{ mgN-NH}_3 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, enquanto a velocidade de produção de nitrito de $r_{N-NO_2^-} = 45,82 \text{ mgN-NO}_2^- \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e de nitrato $r_{N-NO_3^-} = 16,41 \text{ mgN-NO}_3^- \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Figura 21).

Figura 21 – Acompanhamento das formas nitrogenadas durante os ensaios cinéticos nitritantes de consumo de substrato. Valores médios ($n = 2$).



Devido ao lento crescimento das bactérias, para o cálculo das velocidades específicas a concentração celular foi considerada constante a um valor medido analiticamente de $1,35 \text{ gSSV L}^{-1}$. A velocidade máxima específica de consumo de amônio foi de $\mu_{N-NH_3} = 47,38 \text{ mgN-NH}_3 \text{ gSSV}^{-1} \text{ h}^{-1}$, enquanto a velocidade específica de produção de nitrito de $\mu_{N-NO_2^-} = 33,98 \text{ mgN-NO}_2^- \text{ gSSV}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e de nitrato $\mu_{N-NO_3^-} = 12,17 \text{ mgN-NO}_3^- \text{ gSSV}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

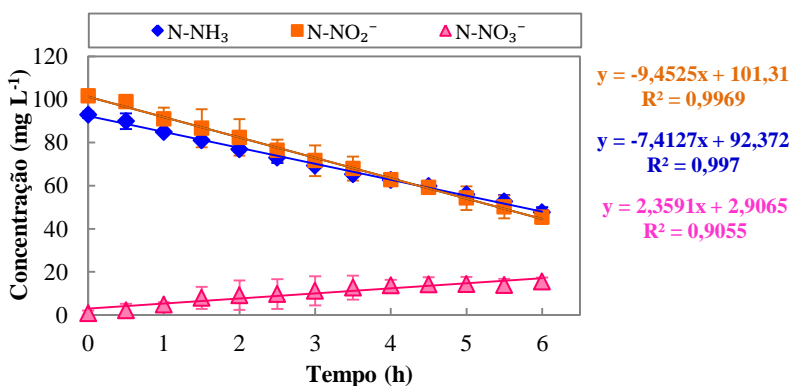
4.3.2 Atividade ANAMMOX

Para manter a estabilidade do processo e não diminuir a eficiência de remoção de nitrogênio no reator DMX, foram também realizados ensaios cinéticos de consumo de substrato para as bactérias ANAMMOX. A Figura 22 ilustra o acompanhamento das formas nitrogenadas durante a realização dos ensaios cinéticos, tendo os resultados expressos pela média e seu respectivo desvio padrão.

A cinética de consumo de substrato, tanto para N-NH_3 como para N-NO_2^- , apresentou comportamento linear, expresso pelos valores do R^2 de 0,997 e 0,9969 respectivamente, enquanto a cinética de formação de produto (N-NO_3^-) teve uma variação maior entre as repetições, tendendo a estabilidade após 4 h de duração dos ensaios (Figura 22) o que refletiu em um valor de R^2 de 0,9055. Os ensaios tiveram duração de 6 h e todos os valores foram obtidos pela regressão linear dos dados experimentais em função do tempo, onde o coeficiente angular representou a velocidade (r) da reação estudada.

A velocidade de produção de nitrato foi de $r_{\text{N-NO}_3^-} = 2,3591 \text{ mgN-NO}_3^- \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Já a velocidade de consumo de amônio foi de $r_{\text{N-NH}_3} = 7,4127 \text{ mgN-NH}_3 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, enquanto a de nitrito de $r_{\text{N-NO}_2^-} = 9,4525 \text{ mgN-NO}_2^- \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, totalizando um consumo de nitrogênio de $16,8652 \text{ mgN L}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

Figura 22 - Acompanhamento das formas nitrogenadas durante os ensaios cinéticos ANAMMOX de consumo de substrato. Valores médios ($n = 2$).



Da mesma forma que para as bactérias nitrificantes, para o cálculo das velocidades específicas (μ), a concentração celular foi considerada constante a um valor medido analiticamente de $4,2 \text{ gSSV L}^{-1}$. Assim sendo, a velocidade específica de formação de nitrato foi de $\mu_{\text{N-NO}_3^-} = 0,56 \text{ mgN-NO}_3^- \text{ gSSV}^{-1} \text{ h}^{-1}$, enquanto a velocidade específica de consumo de amônio foi de $\mu_{\text{N-NH}_3} = 1,76 \text{ mgN-NH}_3 \text{ gSSV}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e a de nitrito de $\mu_{\text{N-NO}_2^-} = 2,25 \text{ mgN-NO}_2^- \text{ gSSV}^{-1} \text{ h}^{-1}$, totalizando um consumo de nitrogênio de $\mu_{\text{N}} = 4,01 \text{ mgN gSSV}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Considerando que a diferença entre o nitrogênio (N-NH_3 mais N-NO_2^-) consumido e o nitrato produzido é nitrogênio gasoso, temos que a velocidade de produção de N_2 foi igual a $14,38 \text{ mgN}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e a velocidade específica de produção de N_2 foi igual a $82,05 \text{ mgN}_2 \text{ gSSV}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

4.3.3 Cálculo da razão de inóculo utilizado

Para eficiência do processo de desamonificação, é necessário que a atividade de ambas as bactérias envolvidas (nitrificantes e ANAMMOX) estejam em equilíbrio dentro do reator, de modo que as velocidades de conversão do nitrogênio não afetem a eficiência global de remoção do sistema.

Com base nas velocidades de consumo de nitrogênio dos ensaios previamente realizados para a biomassa nitrificante e ANAMMOX, e estimando uma carga inicial de $0,5 \text{ kgN m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, foi calculada a concentração celular teórica necessária para inoculação do reator DMX.

Conforme os dados experimentais, a velocidade de consumo de nitrogênio da biomassa nitrificante foi de $1,53 \text{ kgN m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ para 80 mL de lodo utilizado (vide tópico 4.3.1), enquanto da biomassa ANAMMOX foi de $0,40 \text{ kgN m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ para 200 mL de lodo utilizado (vide tópico 4.3.2).

De forma conhecida, as bactérias nitritantes tem sua atividade significativamente reduzida à medida que a vazão de ar do sistema é diminuída. Magrí *et al.*, (2012) relatam uma redução de mais de 60% na produção de nitrito quando a vazão de ar foi diminuída de 450 para 150 mL min^{-1} . Neste sentido, com objetivo de garantir a atividade nitritante no sistema mesmo em condições limitadas de oxigênio, o volume de lodo nitrificante foi corrigido e utilizado em excesso, de modo que a limitação de oxigênio dissolvido não prejudique a nitrificação parcial e garanta substrato suficiente para realização do processo ANAMMOX (de acordo com as atividades determinadas pela biomassa). Sendo assim, a razão de inóculo utilizada foi de 0,29 (biomassa nitrifican-

te/biomassa ANAMMOX), ou seja, o reator DMX foi inoculado com 58 mL de biomassa nitrificante oriunda do reator SBR e mais 200 mL de biomassa ANAMMOX.

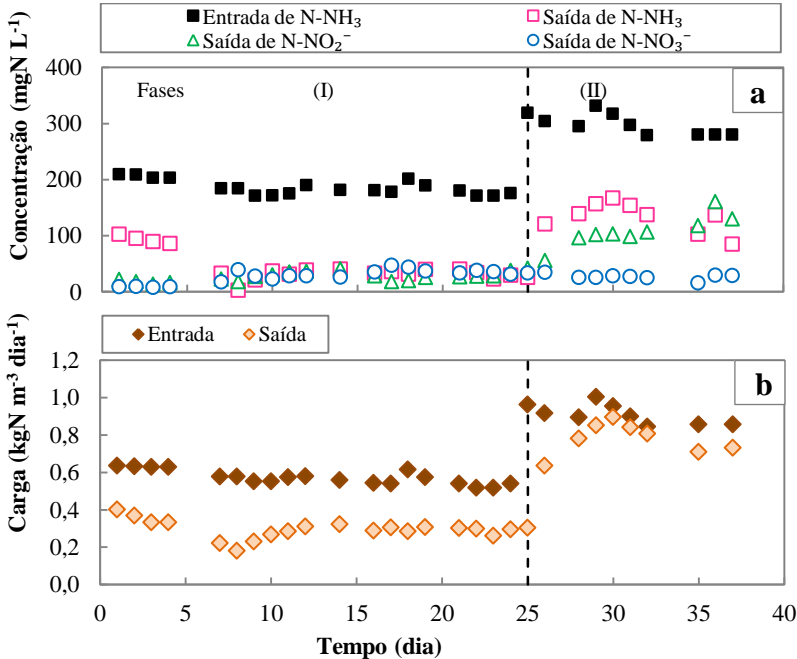
4.4 PARTIDA DO REATOR DMX E INFLUÊNCIA DAS CARGAS DE NITROGÊNIO APLICADAS

O reator DMX foi operado por 179 dias sem interrupção e inicialmente dividido em duas etapas, de acordo com a carga de nitrogênio aplicada no sistema. O desempenho do reator em termos de conversão de nitrogênio durante a partida e sua relação com as cargas aplicadas e removidas são mostrados na Figura 23.

Durante a Fase I (1-24 dias), o reator foi operado com uma concentração de $200 \text{ mgN-NH}_3 \text{ L}^{-1}$, TRH de 8 h e temperatura ambiente de $24,4^\circ\text{C}$ (DP = 0,6). Após um período de adaptação da biomassa de aproximadamente 7 dias, as concentrações de N-NH_3 , N-NO_2^- e N-NO_3^- foram reduzidas significativamente na saída do reator (Figura 23a), demonstrando a gradual interação e aumento na atividade das bactérias responsáveis pelo processo de desamonificação. Assim, trabalhando com uma carga de nitrogênio aplicada de $0,59 \text{ kgN m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ (DP = 0,09) e removido de $0,32 \text{ kgN m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ (DP = 0,09) (Figura 23b), foi atingida uma remoção de N-NH_3 de 82,54% (DP = 0,05) e nitrogênio total de 50,34% (DP = 0,07), dando margem para o aumento na concentração de alimentação do sistema de 200 para $300 \text{ mgN-NH}_3 \text{ L}^{-1}$.

Como consequência e dando início a Fase II (25-37 dias), no 25º dia de operação do reator o processo de oxidação anaeróbia da amônia parou de acontecer, aumentando as concentrações de N-NH_3 e N-NO_2^- na saída do sistema, conforme pode ser visto no acompanhamento das formas nitrogenadas da Figura 23a. Essa situação desfavorável pode ser justificada visualizando o aumento considerável das cargas aplicadas na entrada do reator durante esse período (Fase II, Figura 23b).

Figura 23 – Desempenho do reator DMX até o 37º dia de operação. a: Acompanhamento das concentrações das formas nitrogenadas. b: Acompanhamento das cargas de nitrogênio total na entrada e na saída do reator. Fase I: carga de nitrogênio aplicado de $0,6 \text{ kgN m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Fase II: carga de nitrogênio aplicado de $0,9 \text{ kgN m}^{-3} \text{ d}^{-1}$.



De forma conhecida, o processo ANAMMOX é fortemente influenciado pelas concentrações de substrato, o que justifica o controle das mesmas para que não ocorra inibição na atividade das bactérias. Assim, com o aumento da concentração de N-NH₃ no 25º dia de operação, a carga do sistema passou de $0,573 \text{ kgN m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ (DP = 0,03) para $0,917 \text{ kgN m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ (DP = 0,05), ocasionando um aumento de aproximadamente 60% na carga aplicada ao reator e causando um desequilíbrio no processo de desamonificação.

Conforme já mencionado, as bactérias com atividade ANAMMOX apresentam maior sensibilidade a determinadas mudanças operacionais quando comparadas as BOA. Além disso, a velocidade máxima de crescimento das primeiras é muito menor do que a velocidade máxima de crescimento das segundas. Strous *et al.* (1998) relatam $0,065 \text{ d}^{-1}$

para a velocidade de crescimento das bactérias ANAMMOX, enquanto Schmidell *et al.* (2007) relatam $0,77 \text{ d}^{-1}$ para a velocidade de crescimento das BOA.

Devido a essa condição, quando ambas as bactérias são submetidas a uma situação de desequilíbrio em um mesmo reator, é natural que o tempo de readaptação entre as mesmas varie de acordo com o metabolismo específico de cada espécie mencionada. No reator DMX, quando realizada progressão na carga de nitrogênio, fez com que a atividade das bactérias ANAMMOX fosse reduzida, enquanto a atividade das BOA permaneceu estável no sistema, resultando no visível acúmulo de N-NO_2^- e N-NH_3 durante a Fase II, conforme ilustra a Figura 23a.

Para rapidamente contornar essa situação desfavorável, a carga do reator foi reajustada no 37º dia de operação, mantendo a concentração de N-NH_3 em 300 mg L^{-1} e ajustando as vazões de alimentação e recirculação de 3,3 para $2,02 \text{ L d}^{-1}$ e 8,25 para $5,04 \text{ L d}^{-1}$, respectivamente.

4.5 ESTABELECIMENTO DO PROCESSO DE DESAMONIFICAÇÃO

Após um período de readaptação de aproximadamente 7 dias, o reator voltou a apresentar baixas concentrações de N-NH_3 e N-NO_2^- , indicando a recuperação na atividade das bactérias ANAMMOX e gradualmente tornando estável o processo de desamonificação.

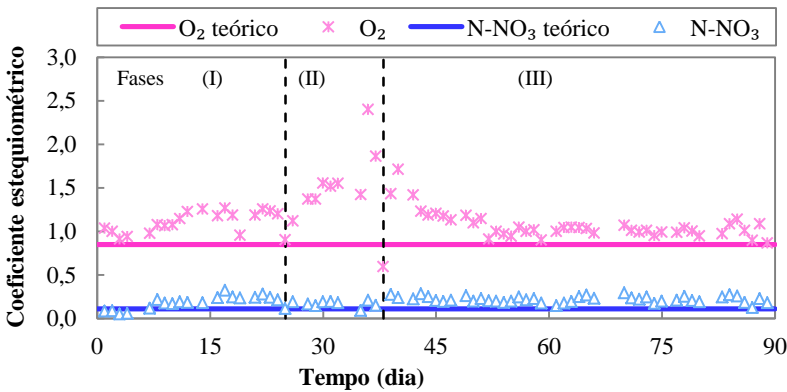
A Figura 24 apresenta o acompanhamento dos coeficientes estequiométricos no reator DMX até o 89º dia de operação. É claramente perceptível o afastamento do coeficiente estequiométrico do oxigênio durante o período de instabilidade (Fase II, Figura 24) do reator DMX, haja vista que elevadas cargas de nitrogênio exigem uma demanda maior de oxigênio para realizar sua oxidação.

Analisando os dados experimentais durante a Fase II (Figura 23a), é possível perceber que, mesmo com a progressão de carga no sistema, o processo de nitrificação parcial manteve a conversão da amônia a nitrito em aproximadamente 50%, gerando um efluente com concentrações proporcionais de N-NH_3 ($139,38 \text{ mg L}^{-1}$, DP = 20,61) e N-NO_2^- ($114,57 \text{ mg L}^{-1}$, DP = 21,87). Ainda, conforme apresenta a Figura 24, os coeficientes estequiométricos de N-NO_3^- não apresentaram mudança significativa durante todo o experimento, indicando que as BON permaneceram inibidas no reator mesmo quando este apresentou condições favoráveis para o seu crescimento.

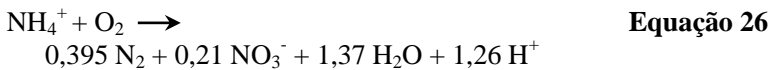
Neste contexto, após a readaptação do sistema às condições operacionais, os coeficientes estequiométricos voltaram a se aproximar aos

valores encontrados pela literatura (SLIEKERS *et al.*, 2002; THIRD *et al.*, 2001), comprovando o reestabelecimento do processo de desamonificação no reator DMX após o 52º dia de operação do mesmo.

Figura 24 – Acompanhamento dos coeficientes estequiométricos até o 89º dia de operação do reator DMX. Fase I: carga de $0,6 \text{ kgN m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ e concentração de $200 \text{ mgN-NH}_3 \text{ L}^{-1}$. Fase II: carga de $0,9 \text{ kgN m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ e concentração de $300 \text{ mgN-NH}_3 \text{ L}^{-1}$. Fase III: carga de $0,6 \text{ kgN m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ e concentração de $300 \text{ mgN-NH}_3 \text{ L}^{-1}$.



Dessa forma, através do acompanhamento dos coeficientes estequiométricos referentes ao processo de desamonificação estabelecido no reator, foi formulada a estequiometria apresentada pela Equação 26, com base nas médias dos valores encontrados durante o período de estabilidade:



Os resultados indicam que, apesar de diferentes, os valores obtidos no reator DMX foram consistentes com a teoria do processo de desamonificação descrito pela Equação 9, combinando os processos de nitrificação parcial e ANAMMOX em um único reator.

Sabendo que a estequiometria refere-se às relações quantitativas entre os elementos constitutivos das substâncias envolvidas na reação do processo de desamonificação, com o aumento do valor de NO_3^- de 0,11 para 0,21 no reator DMX, houve também um respectivo aumento dos

valores de O_2 e H^+ – de 0,85 para 1 e 1,14 para 1,26, respectivamente – para suprir as fontes de elétrons e alcalinidade durante a oxidação da amônia.

O balanço da equação teve como consequência do aumento da parcela de NO_3^- , a redução na parcela de N_2 (de 0,44 para 0,395), ou seja, aderindo ao princípio da conservação da massa e relacionando com os valores descritos pela literatura, a parte excedente convertida a NO_3^- no processo de desamonificação, coincidiu com a parcela “faltante” de N_2 nos valores estequiométricos encontrados durante a operação do reator DMX.

Em síntese, através dos valores da Equação 26, pode-se concluir que houve uma disponibilidade maior de oxigênio no reator do que a demanda exigida pelo processo de desamonificação. Assim, o oxigênio excedente pôde ser utilizado pelas BON para oxidação de parte do NO_2^- a NO_3^- , antes que esse fosse consumido pelas bactérias ANAMMOX. Em paralelo, uma maior quantidade de alcalinidade também foi necessária para neutralizar os íons H^+ excedentes gerados pela decorrente oxidação da amônia a nitrito. Apesar disso, quando comparado com o processo convencional de nitrificação/desnitrificação (que requer cerca de 2 mols de O_2 para cada mol de NH_4^+ oxidado), o processo DMX (Equação 26) reduziu em aproximadamente 50% a quantidade de oxigênio necessária para remoção biológica do nitrogênio.

Ademais, devido à complexa interação entre os micro-organismos e reações químicas no processo de desamonificação, é natural que variações ocorram nos valores estequiométricos em função das diferentes espécies operantes no reator. Essas variações estão diretamente relacionadas com a adaptação e atividade das bactérias presentes no meio reacional, que podem aumentar ou reduzir a eficiência de remoção de nitrogênio, bem como às condições operacionais impostas ao sistema que podem estimular ou desfavorecer a atividade dessas bactérias.

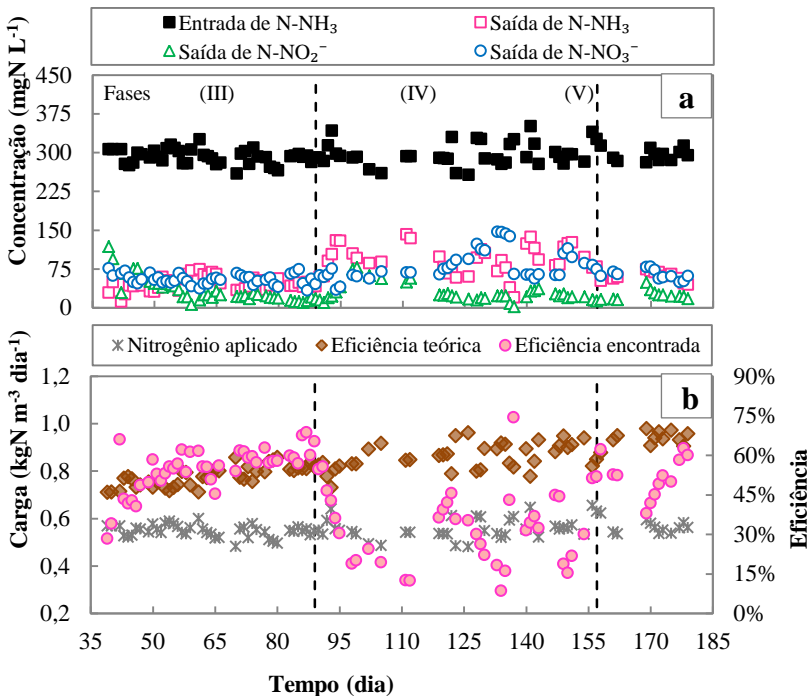
4.6 EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE NITROGÊNIO

Uma vez que o oxigênio dissolvido é o acceptor final de elétrons na reação de nitrificação, a sua concentração pode ser determinante nas velocidades de conversão de amônia e produção de nitrito. Sabendo disso, o controle e a limitação do mesmo foram as principais variáveis operacionais utilizadas para o controle da desamonificação no reator DMX. Assim, após o estabelecimento do processo e durante toda a Fase III, a vazão de ar foi mantida em 20 mL min^{-1} , o que resultou em uma

concentração de OD na fase aerada de $0,14 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ (DP = 0,03) e concentrações não detectadas na fase sem aeração.

Devido à complexa relação entre vários gêneros de bactérias em um único reator, dependendo das características das águas residuárias e da operação do mesmo, conversões adicionais do nitrogênio podem ocorrer, incluindo o acúmulo e oxidação do nitrito no reator. Satisfatoriamente, durante o período do experimento, as concentrações de N-NO_2^- mantiveram-se abaixo de 15 mg L^{-1} , com exceção de alguns picos pontuais de desequilíbrio do sistema (Figura 25a). Esse baixo valor encontrado representa o estabelecimento de uma cooperação estável entre as BOA e as bactérias ANAMMOX, não fornecendo substrato para favorecer a atividade das BON, tão pouco causando inibição do processo DMX pelo acúmulo de suas concentrações no reator.

Figura 25 – A: Acompanhamento das concentrações das formas nitrogenadas. B: Acompanhamento da eficiência de remoção de nitrogênio no reator DMX durante o experimento.



A Fase III (37-89 dias, Figura 25) caracterizou o período de maior estabilidade do reator. Durante esse intervalo, a temperatura manteve uma média de 24,5 °C (DP = 0,7) e o reator foi operado com uma concentração de 300 mgN-NH₃ L⁻¹ e TRH de 0,55 d, totalizando uma carga de nitrogênio aplicado de 0,55 kgN m⁻³ d⁻¹ e removido de 0,24 kgN m⁻³ d⁻¹ (DP = 0,02). Sob essas condições, o reator atingiu uma eficiência média de remoção de amônia de 83,38% (DP = 0,04) e remoção de nitrogênio total de 68,54%, com valor médio de 57,93% (DP = 0,05). Third *et al.* (2005), trabalhando o processo de desamonificação em um reator de batelada sequencial atingiram uma carga de 0,08 kgN m⁻³ d⁻¹, enquanto Sliemers *et al.* (2002) alcançaram 0,16 kgN m⁻³ d⁻¹ para o mesmo sistema, o que faz o presente trabalho ter removido de 1,5 a 3 vezes mais nitrogênio em relação aos valores encontrados pela literatura mesmo operando com valores menores de temperatura.

A Figura 25b apresenta os valores de eficiência teóricos calculados a partir da Equação 20 (balanço de massa), cruzados com os valores de eficiência encontrados durante a operação do reator DMX. A velocidade específica de consumo de substrato (μN-NH₃) e de formação de produto (μN-NO₃⁻) para o cálculo da concentração teórica (S) de substrato na saída do reator foram obtidas através de uma cinética a 300 mgN-NH₃ L⁻¹, com vazão de ar de 20 mL min⁻¹ e à 25°C, objetivando representar da melhor forma possível a operação do reator durante o experimento. Os resultados encontrados pelo ensaio estão apresentados no Apêndice C e foram da ordem de 4,999 mgN-NH₃ gSSV⁻¹ h⁻¹ e 1,040 mgN-NO₃⁻ gSSV⁻¹ h⁻¹ para substrato e produto, respectivamente. O valor do termo dX/dt foi de 0,7848 gSSV d⁻¹ e obtido em função do acompanhamento do crescimento da biomassa no reator (vide tópico 4.8.5).

Por não fazer parte da estequiometria do processo de desamonificação, as concentrações de nitrito não foram contabilizadas no cálculo de S e eficiência teóricos da Equação 20. No entanto, foram adicionadas aos cálculos experimentais, pois, mesmo que pouco significativas, estavam presentes como forma de N-NO₂⁻ na saída do reator DMX.

Assim, a eficiência teórica média do reator DMX durante a Fase III foi de 53,01% (DP = 0,03). Cruzando com o valor médio experimental mencionado anteriormente (57,82%) e conforme ilustra a Figura 25b, a eficiência teórica do reator esteve na maior parte do tempo da Fase III acima da eficiência calculada pelo balanço de massa. Essa diferença entre os valores durante o período de estabilidade pode ter sido fruto do enriquecimento da biomassa e aumento da atividade das bactérias no reator durante a operação contínua em relação aos ensaios em batelada.

Assim, para estimar os valores da atividade específica de consumo de substrato da operação contínua do reator, foram primeiramente calculados os coeficientes estequiométricos de NO_3^- obtidos durante a Fase III, que resultaram em uma média de 0,1755 (DP = 0,03). Sabendo que o coeficiente estequiométrico de NO_3^- corresponde à razão entre a velocidade de formação de produto μ_p e a velocidade de consumo de substrato μ_s , obtemos a Equação 27:

$$\mu_p = 0,1755 \mu_s \quad \text{Equação 27}$$

Substituindo a Equação 27 na Equação 20 do balanço de massa do sistema e rearranjando seus termos, chegamos a Equação 28 para o cálculo de μ_s durante a operação contínua do reator DMX.

$$\mu_s = \frac{(S - S_e) \cdot Q_e}{\left(\frac{dX}{dt} \cdot t + X_0\right) \cdot (-0,8245 \cdot V)} \quad \text{Equação 28}$$

A média dos valores obtidos com a aplicação da Equação 28 aos dados experimentais foi de $\mu_s = 6,26 \text{ mgN-NH}_3 \text{ gSSV}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (DP = 0,70), valor 1,25 vezes maior do que o encontrado nos ensaios cinéticos em batelada. Esse resultado demonstra, além do aumento da atividade do reator durante a estabilidade do processo, o aumento da interação entre os processos de nitrificação parcial e ANAMMOX, possibilitando a operação do sistema com cargas maiores de nitrogênio sem perder a estabilidade de operação.

No presente estudo, a resposta da capacidade do sistema em suportar cargas maiores de operação foi avaliada através de ensaios em batelada conforme os dados apresentados no tópico 4.6, por isso não foram realizadas progressões na concentração durante a operação contínua do mesmo. Dentro desse contexto, a transição entre a Fase III e a Fase IV (Figura 25) foi marcada pela realização do último de tais ensaios cinéticos de consumo de substrato, onde se trabalhou com uma concentração de $1000 \text{ mgN-NH}_3 \text{ L}^{-1}$ por um período de 8 horas. Esse tempo de exposição, mesmo a curto prazo, gerou um efeito negativo na eficiência do reator, reduzindo a atividade das bactérias e acumulando N-NH_3 e N-NO_2^- na saída do sistema. Através da Figura 25b pode-se acompanhar a queda da eficiência de remoção de nitrogênio a partir do início da Fase IV, atingindo no 111º dia de operação a marca de 12,48%. Como alternativa para contornar essa situação desfavorável, no 112º dia de operação foi interrompido o fluxo contínuo do reator, deixando o

mesmo operando em batelada com efluente sintético a uma concentração de 100 mg L^{-1} durante 24 horas, objetivando recuperar a atividade das bactérias que possivelmente foram inibidas pela exposição a concentrações altas de substrato.

Conforme ilustra a Figura 25b, a operação em batelada surtiu um efeito positivo, aumentando a eficiência para 42,01% no 121^o dia. No entanto, cruzando os dados com a Figura 25a, percebe-se que, na medida em que as concentrações de N-NH_3 e N-NO_2^- foram reduzidas no sistema, as concentrações de N-NO_3^- aumentaram demasiadamente, atingindo $146,27 \text{ mgN-NO}_3 \text{ L}^{-1}$ no 133^o dia de operação, o que indica que o processo de nitrificação estava se sobrepondo ao processo de nitrificação parcial, além de proporcionar a competição entre as BON e as ANAMMOX pelo consumo do mesmo substrato (N-NO_2^-).

Conforme já discutido anteriormente, devido às BOA se sobressaírem às BON sob condições de limitação de OD, esse parâmetro foi a estratégia utilizada no reator DMX para controle da nitrificação parcial. Portanto, no 134^o dia de operação, a vazão de ar do sistema foi reduzida de 20 para 10 mL min^{-1} , objetivando limitar a disponibilidade de O_2 e aceptor de elétrons na reação química, e conseqüentemente inibir as bactérias responsáveis pela oxidação do N-NO_2^- a N-NO_3^- . Satisfatoriamente, após aproximadamente 20 dias de adaptação operando sob limitação de oxigênio, o reator DMX voltou a encontrar equilíbrio, estabilizando suas concentrações e gradativamente aumentando sua eficiência de remoção de nitrogênio, conforme ilustra a Fase V da Figura 25b. Após a recuperação, durante a Fase V, o reator operou com carga de nitrogênio aplicado de $0,568 \text{ kgN m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ ($\text{DP} = 0,02$) alcançando em seu período final eficiência de remoção de amônia de 83,71% ($\text{DP} = 0,02$) e de nitrogênio total de 60,17% ($\text{DP} = 0,02$).

O aumento em maior escala das concentrações de N-NH_3 na saída do reator demonstrou que, tanto as BOA reduziram a sua capacidade de oxidação, como as bactérias ANAMMOX deixaram de consumir parte da amônia residual com o nitrito produzido. Após a exposição a elevadas concentrações de substrato, o reator precisou de 68 dias para voltar a estabilidade e atingir as antigas eficiências de remoção de nitrogênio. Portanto, conforme já mencionado, o controle dessas concentrações são de extrema importância para eficácia do processo de desamonificação, haja vista que dependendo dos valores aplicados podem causar inibição irreversível das bactérias responsáveis pela remoção do nitrogênio.

4.7 ENSAIOS DE ATIVIDADE DMX ESPECÍFICA

O controle e a estabilidade das concentrações de nitrogênio aplicado ao sistema devem ser monitorados cuidadosamente, pois são muito importantes para a estabilidade do processo de desamonificação, haja vista que suas concentrações podem tanto favorecer como inibir a atividade das bactérias responsáveis pela oxidação da amônia. Assim, para avaliar o comportamento do reator DMX e encontrar um modelo que melhor representasse as características da biomassa em questão, foram realizados ensaios de atividade específica utilizando diferentes concentrações de substrato sob as mesmas condições reacionais de operação.

Os ensaios foram realizados em paralelo a operação contínua do reator em um intervalo de tempo entre o 52^o ao 89^o dias de operação, período de estabilidade do processo DMX. A concentração celular de biomassa foi medida antes e após a realização dos ensaios, e devido a diferença entre os valores ser menor que 5%, foi utilizado valor fixo de 2537 mgSSV L⁻¹.

A Tabela 16 apresenta os valores das velocidades de consumo de substrato de amônia (rN-NH₃) e das respectivas velocidades específicas (μN-NH₃) para cada concentração de substrato utilizada nos ensaios cinéticos com o reator DMX. De forma conhecida, foram utilizadas onze diferentes concentrações iniciais de substrato S (Tabela 16), onde através dos dados obtidos em cada ensaio eram calculadas as velocidades específicas de consumo, as quais posteriormente foram ajustadas a um modelo para obtenção dos parâmetros cinéticos. Todos os resultados das quedas de consumo de substrato e das velocidades específicas obtidos em cada ensaio realizado estão apresentados no Apêndice C, sob forma gráfica para melhor compreensão.

Tabela 16 - Velocidade específica de consumo de amônia para cada concentração de substrato utilizada e suas respectivas velocidades específicas oriundas dos ensaios realizados com o reator DMX.

Ensaio	S (mgN-NH ₃ L ⁻¹)	r (mgN-NH ₃ L ⁻¹ h ⁻¹)	μ (mgN-NH ₃ gSSV ⁻¹ h ⁻¹)
1	80,63	-6,403	2,524
2	104,36	-6,911	2,724
3	150,51	-8,953	3,529
4	170,07	-9,402	3,706
5	257,89	-9,559	3,768
6	314,29	-12,682	4,999
7	397,20	-13,911	5,483
8	545,19	-14,713	5,799
9	632,71	-15,842	6,244
10	814,00	-15,544	6,127
11	1060,68	-15,571	6,138

A maior velocidade específica de consumo de amônia encontrada foi de 6,244 mgN-NH₃ gSSV⁻¹ h⁻¹ (Ensaio 9) a uma concentração S de 632,71 mgN-NH₃ L⁻¹. Apesar de não ser o último ensaio realizado, os dados da Tabela 16 sugerem que a inibição provocada pelo substrato não foi significativa para as concentrações de amônia utilizadas.

Para melhor especificidade, os dados experimentais foram submetidos a análise de regressão não linear objetivando encontrar o modelo que melhor representasse o comportamento da biomassa nitrificante. Assim, a partir das velocidades específicas de consumo de N-NH₃ em cada concentração de substrato utilizada, foi testado o ajuste dos modelos matemáticos aos dados experimentais. A Tabela 17 apresenta os resultados da análise de CIA (AKAIKE, 1974) em função dos modelos matemáticos para a variável N-NH₃ no reator DMX, onde o menor valor encontrado representa o melhor ajuste do modelo.

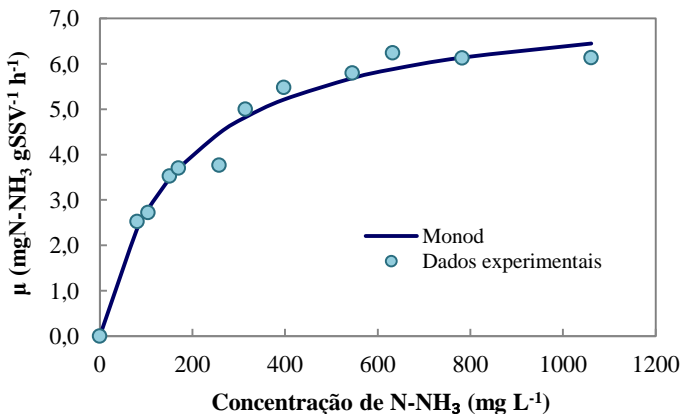
Tabela 17 - Análise do critério de informação de Akaike (CIA) em função dos modelos matemáticos para a variável N-NH₃ no processo DMX.

Modelo	Nº de parâmetros	CIA _{N-NH₃}
Monod	2	9.4087
Edwards II	3	10,1523
Luong	4	10.1523
Andrews	3	10.2301
Teissier	2	10.2548
Edwards I	3	20.3585

Obviamente a escolha do modelo se dá pelo que venha a traduzir melhor os objetivos de estudo da cinética em questão. Assim, os valores apresentados na Tabela 17 revelam que o modelo matemático de Monod foi o que melhor se ajustou aos dados experimentais para N-NH₃, obtendo, além do menor valor de CIA, um coeficiente de correlação de $R^2 = 0,978$.

A Figura 26 apresenta a curva da velocidade específica de consumo de amônia em função da concentração S de substrato e o ajuste do modelo de Monod aos dados experimentais.

Figura 26 – Curva dos dados experimentais para o modelo de Monod em função de cada aumento na concentração de N-NH₃.



O cruzamento dos dados após regressão não linear permitiu estimar os valores dos parâmetros cinéticos característicos da biomassa do reator, determinados pelo ajuste da Equação 12 (Monod), conforme descrito na Tabela 18.

Tabela 18 - Parâmetros cinéticos do modelo de Monod estimados através da regressão não linear para o reator DMX.

Modelo	μ_m (mgN gSSV ⁻¹ h ⁻¹)	K_s (mgN L ⁻¹)	R ²
Monod	7,513	175,48	0,978

Os valores dos parâmetros cinéticos apresentados na Tabela 18, associados com a Figura 26, revelam que o aumento da concentração S não se mostrou limitante para a velocidade de consumo de amônia, indicando a grande capacidade do sistema em suportar altas cargas de remoção sem inibir a atividade das bactérias.

Não há dúvida que o μ_m é o parâmetro mais crítico na modelagem e projetos de sistema de remoção de nitrogênio, uma vez que desempenha um papel dominante na determinação da idade do lodo. A velocidade máxima específica de consumo de N-NH₃ μ_m encontrada foi de 7,513 mgN-NH₃ gSSV⁻¹ h⁻¹ e a constante de saturação pelo substrato K_s foi de 175,48 mgN-NH₃ L⁻¹, valores bastante significativos para operação do reator a 25°C e bastante satisfatórios para o aumento de escala do processo devido à baixa produção de lodo – o que significa economia com disposição e tratamento do mesmo.

Cruzando com os dados obtidos pela modelagem realizada previamente à inoculação do reator DMX com as bactérias em separado (Tabelas 12 e 15 para nitritantes e ANAMMOX, respectivamente), percebe-se que na medida em que a velocidade específica máxima μ_m é maior para as bactérias nitrificantes em relação às ANAMMOX, a constante de inibição K_I também aumenta. Conforme já mencionado, os valores de K_I encontrados foram de 525,34 mgN-NO₂⁻ L⁻¹ para o substrato limitante das bactérias ANAMMOX e de 3867,12 mgN-NH₃ L⁻¹ para as bactérias nitrificantes, o que representa uma resistência de aproximadamente 7 vezes mais para as BOA em relação às ANAMMOX quando submetidas à elevadas concentrações de substrato.

A interpretação desses resultados permite confirmar que apesar de muito eficiente, o processo ANAMMOX é muito mais sensível à inibição pelo substrato, quando comparado ao processo de nitrificação.

Apesar de reduzirem sua atividade, as bactérias nitrificantes se mostraram tolerantes às concentrações de substrato em torno de $1000 \text{ mgN-NH}_3 \text{ L}^{-1}$ (Figura 16), no entanto, as bactérias ANAMMOX tiveram acentuada queda na atividade quando submetidas a concentrações em torno de $400 \text{ mgN-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$ (Figura 18).

Segundo Zhu *et al.* (2008), reatores que trabalham com biomassa em suspensão no processo de desamonificação apresentam tendência a eliminar o nitrogênio pela formação de agregados onde, na parte externa encontram-se as BOA e no interior do grânulo as bactérias com atividade ANAMMOX. Assim, teoricamente, as concentrações de substrato irão atingir primeiramente a parte superficial do agregado onde as BOA realizarão a nitrificação parcial e posteriormente, com um gradiente de concentração de substrato, o nitrito e o restante da amônia residual serão convertidos a N_2 pela atividade das bactérias ANAMMOX.

Sabendo disso, quando o reator DMX foi submetido a concentrações em torno de $1000 \text{ mgN-NH}_3 \text{ L}^{-1}$, em um primeiro momento as BOA permaneceram realizando a nitrificação parcial, bem como as bactérias ANAMMOX realizando a conversão a N_2 , o que justifica o aumento na velocidade específica de consumo de substrato e os elevados valores de K_S da Tabela 18. No entanto, apesar de o modelo matemático encontrado indicar ausência de inibição das bactérias pelo aumento nas concentrações de substrato no reator DMX, o comportamento do mesmo em sua forma contínua teve um efeito negativo a partir da realização da cinética contendo $1000 \text{ mgN-NH}_3 \text{ L}^{-1}$ (Figura 26).

Musabyimana (2008), avaliando o impacto da concentração de nitrito sob as bactérias ANAMMOX durante o processo de desamonificação, concluiu que as bactérias ANAMMOX presentes dentro de um reator DMX são mais tolerantes às concentrações de N-NO_2^- do que as encontradas sozinhas em culturas mistas enriquecidas. Ainda, relata que a inibição causada pelo nitrito é reversível em curto prazo de exposição (1 - 3 h), mas faz a atividade das bactérias cair em 66% quando mantida por um longo período de tempo (8 h). Isso explica a maior resistência do processo DMX em suportar elevadas concentrações de substrato quando comparado com a análise realizada utilizando as culturas mistas enriquecidas (vide tópicos 4.1.1 e 4.1.2). Além disso, também comprova que o tempo de exposição pode ter sido o fator determinante para a perda de eficiência no sistema contínuo do reator DMX após a realização do último ensaio cinético no sistema.

Neste contexto, a baixa velocidade máxima específica de crescimento das bactérias ANAMMOX, bem como a inibição por N-NO_2^- , são historicamente relatados como os principais desafios da operação do

processo, no entanto, a influência de cada um sob a eficiência do sistema difere amplamente na literatura. Os resultados obtidos pela modelagem dos dados experimentais sugerem que as bactérias ANAMMOX podem tolerar concentrações tão elevadas quanto $400 \text{ mgN-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$ a curto prazo. No entanto, concentrações mantidas acima de $100 \text{ mgN-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$ causam uma queda gradual na atividade a longo prazo. Apesar da concentração de N-NO_2^- mostrar ser um fator limitante para a velocidade de crescimento das bactérias ANAMMOX, o reator DMX não apresentou acúmulo desse substrato, tão pouco queda na velocidade de consumo das bactérias, o que indica que as concentrações S não foram limitantes para o processo durante os ensaios cinéticos realizados a curto prazo. Em síntese, a queda na atividade das bactérias ANAMMOX observada durante a operação do reator DMX foi, na maioria dos casos, a principal razão para a perda de eficiência do processo em função da sensibilidade ao aumento das concentrações de N-NO_2^- .

Finalmente, do ponto de vista operacional, com base nos resultados fornecidos pelos ensaios cinéticos no reator, o processo DMX pode ser melhorado e atingir eficiências maiores de remoção de nitrogênio. A redução na vazão de ar e conseqüente concentrações de OD podem reduzir a taxa de produção de nitrato e levar ao aumento da produção de N_2 , o que favoreceria a remoção de nitrogênio. No mesmo contexto, a otimização dos tempos de aeração intermitente podem ser ajustados para encontrar o melhor equilíbrio entre os períodos aeróbios e anóxicos e assim, evitar o acúmulo de concentrações residuais de nitrogênio que poderiam ser consumidas com um tempo maior de reação.

4.8 FATORES DE CONTROLE DO PROCESSO DMX

As transformações que ocorrem no ciclo do nitrogênio (amonificação, nitrificação, desnitrificação) são intensamente acopladas umas às outras e influenciadas pela interação de diversos parâmetros sobre o metabolismo da microbiota. Na desamonificação, parâmetros como concentração de OD, temperatura, alcalinidade, pH e alguns compostos inibidores têm grandes efeitos sobre o desempenho do sistema, devido à diversidade de espécies microbianas e a sua complexa inter-relação dentro do processo.

Devido a isso, algumas variáveis que podem influenciar a taxa de desamonificação e refletir na atividade das bactérias foram monitorados objetivando melhorar a eficiência do processo.

4.8.1 Temperatura

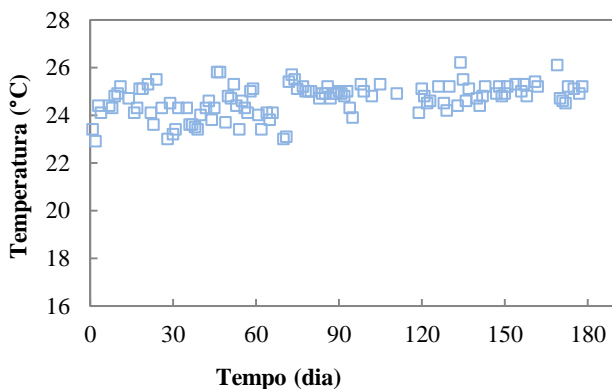
De forma conhecida, o desempenho do processo DMX depende da atividade metabólica tanto das BOA como das ANAMMOX. No entanto, esses micro-organismos possuem diferentes comportamentos frente à variação da temperatura. A temperatura ótima recomendada para expandir as diferenças entre a velocidade de crescimento das BOA em relação as BON é acima de 25°C, enquanto que a ótima temperatura para o crescimento de bactérias ANAMMOX gira em torno de 30 á 40°C (STROUS *et al.*, 1998). Por estas razões, as pesquisas relacionadas a esse processo têm sido conduzidas á elevadas temperaturas (30-35°C) (VEYS *et al.*, 2010), pois as mesmas favorecem a atividade de ambas as bactérias.

Apesar disso, a temperatura também pode inibir o processo de desamonificação quando muito alta, pois está diretamente relacionada ao aumento da concentração de amônia livre (KIM *et al.*, 2008), que por sua vez possui efeito no crescimento e na atividade dos micro-organismos e está intimamente ligado a outros três fatores: concentração de OD, substrato e pH do meio.

Devido a isso, estudos recentes vêm tornando economicamente atrativa a possibilidade de operar o processo em temperaturas mais baixas (25°C), mesmo que a eficiência de remoção de nitrogênio seja reduzida. Vázquez-Padin *et al.* (2011) atingiram uma carga média de remoção de nitrogênio de 0,2 kgN m⁻³ d⁻¹ operando um reator RBS com o processo DMX à 15°C. Neste estudo, o reator DMX foi operado à temperatura ambiente, obtendo um valor médio de 24,59°C (DP = 0,78), não comprometendo a atividade das bactérias no reator e apresentando baixa oscilação durante todo o experimento.

Na Figura 27 visualiza-se o acompanhamento da temperatura durante o experimento. Esses valores de temperatura, apesar de reduzirem a atividade das bactérias, se mostram promissores economicamente para aplicação e aumento de escala do processo DMX.

Figura 27 – Acompanhamento da temperatura no reator DMX durante o experimento.



4.8.2 Oxigênio dissolvido

Tendo em vista que os processos degradativos são essencialmente constituídos por reações de oxidação, uma variável muito importante no processo de desamonificação é o oxigênio dissolvido (OD).

Uma vez que o oxigênio gasoso é o aceptor final de elétrons na estequiometria da reação de nitrificação, a sua concentração pode ser determinante nas velocidades de conversão de amônia e produção de nitrito e nitrato. Além disso, no processo de desamonificação, a concentração de OD deve ser disponível o suficiente para as BOA e limitante o suficiente para as ANAMMOX, de modo que não ocorra o acúmulo de nitrito pela falta de atividade das bactérias na camada interna do biofilme.

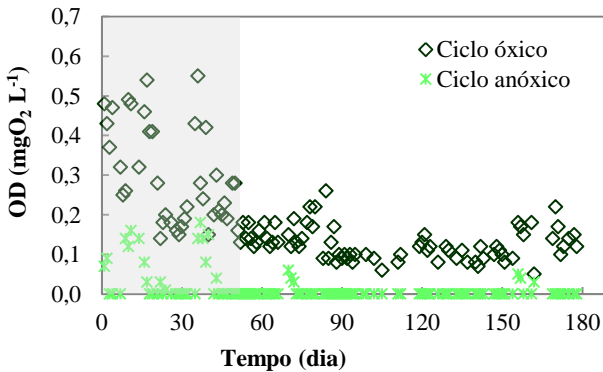
Apesar de parâmetros como temperatura e pH possuírem um valor ótimo para operação do processo DMX, as conclusões a respeito da concentração ideal de OD e o tempo de aeração variam muito em função das condições experimentais e configuração imposta aos sistemas operacionais.

No reator DMX, a concentração de OD foi controlada pelo ajuste da vazão na aeração do sistema, e os valores encontrados durante os ciclos de aeração intermitente (óxico e anóxico) são mostrados na Figura 28. No período inicial, a vazão de ar foi ajustada de acordo com as concentrações de $N-NH_3$ na saída no reator, alternando de 60 à 100 mL_{ar} min⁻¹, o que resultou em uma concentração média de OD de 0,30 mgO₂

L^{-1} (DP = 0,12) durante o ciclo óxico e $0,04 \text{ mgO}_2 L^{-1}$ (DP = 0,05) no ciclo anóxico (Área sombreada, Figura 28).

Durante o período de estabilidade, o reator operou com vazão de ar fixa de $20 \text{ mL}_{\text{ar}} \text{ min}^{-1}$, e obteve uma concentração média de OD de $0,15 \text{ mgO}_2 L^{-1}$ (DP = 0,04) durante o ciclo óxico e concentrações nulas na ciclo anóxico, o que indica a elevada atividade dos micro-organismos em consumir rapidamente o oxigênio residual do meio nos momentos em que a aeração era desligada no sistema. Além disso, a baixa demanda na concentração de OD no reator se mostrou vantajosa na medida em que inibiu a atividade das BON, permitindo a oxidação da amônia somente até nitrito, que, por sua vez, reagindo com a amônia residual, contribuiu para o aumento da eficiência na remoção de nitrogênio durante o experimento.

Figura 28 – Valores de OD nos ciclos óxico e anóxico de aeração intermitente no reator DMX durante o experimento. Área sombreada: período em que a vazão de ar foi ajustada de acordo com as concentrações de $N\text{-NH}_3$ na saída do reator.



Zhang *et al.* (2012), operando um sistema de reator único para completa conversão do íon amônio via nitrito trabalhou com concentrações abaixo de $0,1 \text{ mgO}_2 L^{-1}$ durante o período de estabilidade do processo DMX. Os autores relatam que essas concentrações foram vantajosas para inibir a atividade das BON e evitar a formação de $N\text{-NO}_3^-$ no sistema, além de favorecer a remoção de nitrogênio pela produção de $N\text{-NO}_2^-$, que reagindo com o $N\text{-NH}_3$ residual, beneficiaram a atividade ANAMMOX.

Ademais, a influência da concentração de OD na eficácia do processo DMX está intimamente ligada à transferência de massa gás-líquido, à concentração de amônia que será oxidada e à espessura do biofilme nos grânulos. Por isso, é essencial uma melhor compreensão das condições operacionais e limitação de oxigênio do sistema para se alcançar elevadas cargas de remoção de nitrogênio no mesmo.

4.8.3 pH e alcalinidade

O pH tem significativa importância na desamonificação por reger o equilíbrio das formas nitrogenadas do sistema. Faixas de pH fortemente ácidas ou fortemente básicas podem causar inibição completa do processo por promover hidrólise da membrana celular e cessar processos metabólicos vitais para as bactérias. Outro fator, estritamente ligado ao pH no processo DMX é a alcalinidade do meio, que age neutralizando intermediários ácidos tóxicos durante o processo reacional. O reator teve seus valores de pH monitorados e alcalinidade compensada pela adição de sais (NaHCO_3 e Na_2CO_3) ao afluente sintético.

Sabe-se que a etapa de nitrificação gera H^+ (Equação 1), ou seja, apresenta tendência a consumir alcalinidade, de forma a se ter queda do pH, o que pode limitar a velocidade do processo. Segundo Schmidell e Spiller (2005), na oxidação de 1 mol de nitrogênio há uma produção de 1,88 moles de H^+ , equivalente ao consumo de 1,98 moles de alcalinidade. Embora pareça simples, este processo é crucial para a estabilidade e eficiência da desamonificação, pois os próprios produtos do metabolismo das BOA podem ser tóxicos para elas mesmas. Assim, a disponibilidade de alcalinidade, bem como a otimização da carga de alimentação são de importância imprescindível para a eficácia do processo de desamonificação.

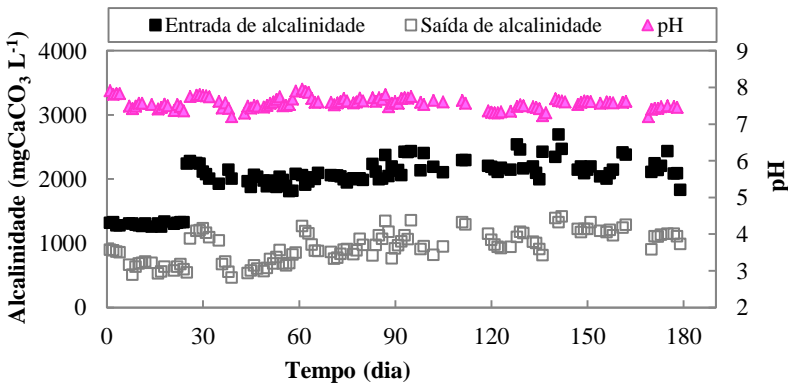
A Figura 29 apresenta o acompanhamento das concentrações de alcalinidade e valores de pH no reator durante o experimento. Veys *et al.* (2010), estudando a otimização do processo de desamonificação, relata que o valor ótimo de pH para o processo se encontra entre 7,5-8,0. O reator DMX operou com pH médio de 7,57 (DP = 0,15), indicando que as BOA mantiveram sua atividade durante todo o período do experimento e ainda, que a alcalinidade do afluente foi suficiente para manter os valores de pH dentro de uma faixa não inibitória.

No mesmo contexto, o comportamento da alcalinidade no reator DMX variou entre períodos de estabilidade com períodos de oscilação, resultando em uma média de 2019,34 $\text{mgCaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ (DP = 112,26) na entrada e 917,22 $\text{mgCaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ (179,28) na saída do sistema durante o

período de estabilidade do mesmo. Este resultado significativo na saída do sistema demonstra, além do baixo consumo pelo processo DMX, a neutralidade do efluente para descarte em corpos d'água sem a necessidade de compensação para equilíbrio do pH, uma vez que na saída do sistema ainda se encontra alcalinidade residual.

Confrontando os dados da Figura 29 com a Figura 25a, percebe-se que quanto maior a fração de amônia oxidada, maior é o consumo de alcalinidade. Por isso, a tendência na oscilação dos valores de alcalinidade na saída do reator está diretamente relacionada com a concentração de amônia oxidada e geração de íons H^+ , que por sua vez, também agem reduzindo o pH do meio. Apesar disso, a variação da alcalinidade em função do tempo não é um parâmetro que pode ser utilizado quantitativamente para tomada de decisões, pois uma vez que a concentração de amônia na entrada do sistema aumente, a concentração de alcalinidade também aumentará na mesma proporção (Figura 29, dias 25-27).

Figura 29 – Acompanhamento das concentrações de alcalinidade e valores de pH no reator DMX durante o experimento.



Ademais, estudos já realizados (YANG *et al.*, 2010), documentaram que concentrações suficientes de carbono inorgânico na alimentação de reatores ANAMMOX podem desempenhar papel positivo no enriquecimento e na atividade dos micro-organismos. Por estas razões, e como as concentrações de alcalinidade são proporcionais à quantidade de carbono inorgânico no meio, manteve-se sempre um valor de alcalinidade residual, objetivando não interferir na atividade e no crescimento das bactérias ANAMMOX e ainda, favorecendo o processo de desammonificação.

4.8.4 Amônia livre (AL) e ácido nitroso livre (ANL)

Segundo os modelos propostos por Anthonisen *et al.* (1976) foram estimadas as concentrações de AL e ANL no reator DMX durante todo o experimento.

De forma conhecida, determinadas concentrações de AL e ANL exercem efeito inibitório sobre o metabolismo da biomassa nitrificante (KIM *et al.*, 2008; PRA *et al.*, 2010) e, conseqüentemente, forte influência nas taxas de oxidação de amônia e nitrito. Da mesma forma, são potenciais inibidoras do processo ANAMMOX (JIN *et al.*, 2012), podendo assim, interferir na eficiência global de remoção de nitrogênio do processo DMX.

As concentrações de AL e ANL dependem, além do equilíbrio do pH e temperatura, da concentração de amônio e nitrito, respectivamente. Por isso, mesmo em pHs próximos da neutralidade, dependendo da concentração de amônia total e nitrito do meio, pode existir inibição de BOA, BON ou ANAMMOX pela presença de AL ou ANL em excesso.

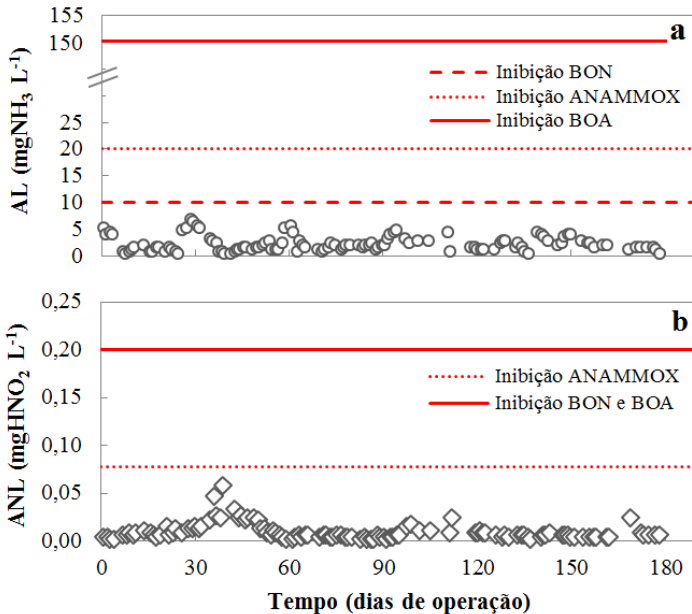
Anthonisen *et al.* (1976), demonstraram que as BON são mais sensíveis à AL do que as BOA, podendo ser inibidas numa concentração de 0,1 – 10,0 mg L⁻¹, e ambas severamente inibidas a uma concentração maior que 150 mg L⁻¹. Assim, quando a concentração de AL for muito alta, será suficiente para inibir tanto BOA como BON, e amônia irá se acumular no sistema. Em concentrações mais baixas de AL, somente BON serão inibidas, e nitrito irá se acumular no sistema. Ainda, Fernández *et al.* (2012), estudaram os efeitos a curto e a longo prazo das concentrações de AL sobre o processo ANAMMOX. Em testes de curto prazo (ensaios em batelada), houve um decréscimo de 50% na atividade específica das bactérias em concentrações de 38 mg L⁻¹, e nos testes de longa duração (em reatores RBS), mostraram instabilidade quando as concentrações ultrapassaram 20-25 mg L⁻¹, inibindo completamente a atividade em concentrações de AL superiores a 35-40 mg L⁻¹.

No mesmo contexto, dependendo do equilíbrio do sistema, inibição por ANL também pode ocorrer. Anthonisen *et al.* (1976) relatam que a nitrificação pode ser inibida por ANL em uma concentração entre 0,22 e 2,8 mg L⁻¹, enquanto o processo ANAMMOX em uma concentração de 0,07 mg L⁻¹ (JIN *et al.*, 2012).

A Figura 30 ilustra o comportamento das formas AL e ANL no reator DMX durante o experimento. Positivamente, tanto as concentrações de AL como de ANL mantiveram-se abaixo das concentrações inibitórias durante todo o período analisado.

Conforme já mencionado anteriormente, o pH exerce significativa importância no processo de desamonificação por reger o equilíbrio das formas de amônio/amônia (NH_4/NH_3) e nitrito/ácido nitroso ($\text{NO}_2^-/\text{HNO}_2$). Cruzando os dados da Figura 30 com a Figura 25a, é possível perceber que nos períodos onde houve maior acúmulo na concentração de N-NO_2^- , foram os mesmos onde, com a queda do pH, o equilíbrio do sistema foi deslocado para formação de ANL (Figura 30b, dia 39). De forma positiva, essas concentrações não foram suficientes para influenciar no processo de desamonificação, tão pouco inibir a atividade das bactérias.

Figura 30 – A: Comportamento das concentrações de AL durante o experimento. B: Comportamento das concentrações de ANL durante o experimento.



Fonte: ANTHONISEN *et al.*, 1976; JIN *et al.*, 2012

Observando as concentrações de AL (Figura 30a), é possível perceber que dentre as faixas de inibição dos três gêneros de bactérias atuantes no processo de desamonificação, as BON são as que apresentam maior sensibilidade às concentrações de AL. Sabendo disso, excedendo o limite de inibição somente das BON e não ultrapassando o limite de

inibição das ANAMMOX, é possível favorecer o processo de desamonificação deslocando o equilíbrio das formas para formação e acréscimo das concentrações de AL, utilizando como estratégia valores entre 10 e 20 mg L⁻¹. No entanto, devido a proximidade dos valores inibitórios e exigência rígida no controle dessas concentrações, no presente estudo não foram ultrapassados os limites de inibição de nenhum dos micro-organismos atuantes no reator DMX.

Dessa forma, os dados da literatura resumidos acima, associados aos dados experimentais, mostram claramente que AL e ANL têm efeito inibitório significativo sobre o metabolismo dos micro-organismos, e é devido a isso que se justifica o acompanhamento das concentrações dessas formas no sistema. Ainda, é importante salientar que a resistência dessas bactérias a esses compostos inibidores irão variar de acordo com as características fisiológicas e espécies de micro-organismos envolvidos em cada processo.

4.8.5 Crescimento da biomassa

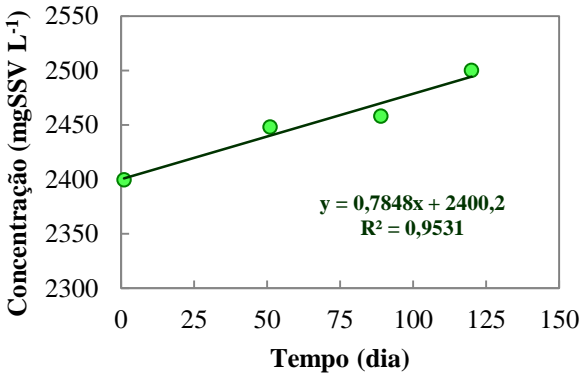
O monitoramento das concentrações celulares do reator DMX foi realizado através de análises de sólidos suspensos voláteis em função do tempo durante o experimento. A Figura 31 apresenta a evolução da concentração de SSV no reator durante o experimento.

A concentração inicial de SSV foi de 2,4 g L⁻¹ e após 125 dias teve um acréscimo de 4,18%, atingindo um valor de 2,5 gSSV L⁻¹. A velocidade de crescimento da biomassa foi da ordem de 0,7848 mgSSV L⁻¹ d⁻¹ e teve um comportamento linear, comprovado pela correlação de R² = 0,9531 entre os dados e o modelo obtido.

Esse baixo valor encontrado, apesar de aumentar o tempo de partida do sistema, representa também uma das vantagens do processo DMX, quando comparado ao processo convencional de nitrificação/desnitrificação. Isso porque a lenta velocidade de crescimento das bactérias faz o processo produzir pouco volume de lodo, reduzindo assim os custos com tratamento e disposição.

Bortoli (2010), encontrou valores de velocidade de crescimento da ordem de 44 mgSSV L⁻¹ d⁻¹ para o reator desnitrificante e 39 mgSSV L⁻¹ d⁻¹ para o reator nitrificante. A média desses valores representa uma produção de lodo de aproximadamente 50 vezes mais em relação ao processo DMX do presente estudo, o que torna atrativa a aplicação desse tipo de processo em escalas maiores de operação.

Figura 31 – Acompanhamento da concentração de SSV em função do tempo no reator DMX.



4.8.6 Emissão de gases de efeito estufa

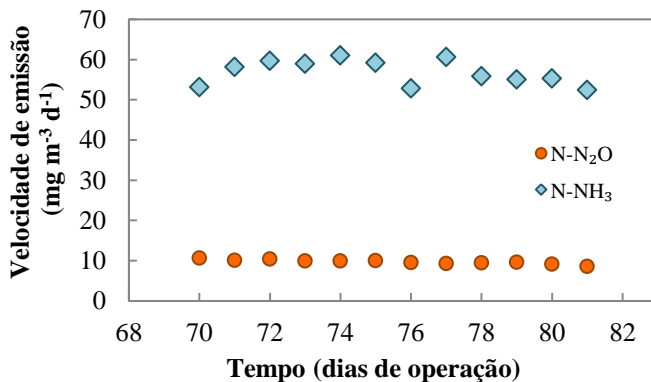
De forma conhecida, a eficácia do processo de desamonificação está condicionada a limitação das concentrações de OD durante sua operação. Essa prerrogativa, associada à atividade das BOA e BON, pode conduzir a produção e emissão de N_2O durante a operação do processo DMX. Isso porque vários autores citam que baixas concentrações de oxigênio dissolvido na nitrificação convencional ocasionam elevadas velocidades de emissão de N_2O , variando entre $1,74 \text{ gN m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ e $7,87 \text{ gN m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ (TSUNEDA *et al.*, 2005, TALLEC *et al.*, 2006).

A Figura 32 mostra a taxa de emissão de $N-NH_3$ e $N-N_2O$ do reator DMX durante o período de estabilidade do mesmo. De forma positiva, a taxa média para emissão de N_2O foi de $9,75 \text{ mg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ (DP = 0,56), o que é aproximadamente 800 vezes menor quando comparada com o encontrado na literatura para o processo de nitrificação convencional operado com baixas concentrações de OD.

No mesmo contexto, a emissão relativa de N_2O em relação ao nitrogênio observada foi de 0,005% do nitrogênio removido quando a carga de alimentação foi de $0,531 \text{ kgN m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ (DP = 0,03). Durante esse período o reator operou com eficiência de remoção de amônia de 84,53% (DP = 0,03) e eficiência de remoção de nitrogênio total de 58,84% (DP = 0,02). Estes resultados são aproximadamente 10 vezes menores dos que encontrados por Slikers *et al.* (2002), que observaram

emissão de N_2O de 0,05% do nitrogênio removido no mesmo processo e consideraram a mesma como insignificante.

Figura 32 – Velocidade de emissão de $N-N_2O$ e $N-NH_3$ no reator DMX durante o 70^o ao 81^o dias de operação.



Da mesma forma, a taxa de emissão de $N-NH_3$ encontrada foi de $56,87 \text{ mg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ (DP = 3,11), demonstrando que o reator DMX não teve perda desse composto por volatilização e tão pouco emitiu valores que possam ser considerados relevantes.

Por fim, pode-se concluir que o sistema mostrou ser uma ferramenta eficiente na redução de gases de efeito estufa, emitindo concentrações insignificantes de N_2O e concentrações irrelevantes de NH_3 durante o período de estabilidade do experimento.

4.9 COMPARAÇÃO ENTRE OS PROCESSOS

Na Tabela 19 foram compilados os principais parâmetros operacionais e o comportamento do reator DMX em relação ao processo convencional de nitrificação/desnitrificação e ao processo combinado de nitrificação parcial + ANAMMOX utilizando dois reatores durante a remoção de nitrogênio. Em um contexto geral, o sistema operando com um único reator, apesar de requerer uma quantidade de inóculo maior para partida do processo, apresenta vantagens com relação à simplicidade de operação e menor espaço requerido, o que reduz os custos com construção de reatores e quantidade de equipamentos para controle operacional quando comparado aos demais processos analisados.

Com relação ao processo convencional de nitrificação/desnitrificação, o reator DMX possui vantagens distintas na maioria dos parâmetros avaliados. Além de este ser totalmente autotrófico e não demandar fonte externa de carbono para completar o ciclo de remoção, permite operar reatores com um TRH até 7 vezes menor e uma carga duas vezes maior de N, o que significa tratar uma quantidade maior de efluente contendo quantidades maiores de nitrogênio (Tabela 19). Ainda, a baixa velocidade de crescimento das bactérias faz o processo produzir 40 vezes menos volume de lodo, poupando custos com disposição e tratamento do mesmo.

Com relação a comparação entre os processos de nitrificação parcial e ANAMMOX utilizando um ou dois reatores, estes vêm sendo estudados e seus relatos na literatura vem apresentando vantagens e desvantagens operacionais. Jaroszynski e Oleszkiewicz (2011) relatam que o sistema de dois reatores se apresenta mais robusto, possuindo um elevado potencial de recuperação após possíveis desequilíbrios no processo e suportando cargas maiores de aplicação de nitrogênio. Por outro lado, esse mesmo sistema apresenta uma sensibilidade maior à toxicidade dos compostos AL e ANL, potenciais inibidores do processo, e se mostra inviável do ponto de vista comercial pelas configurações de reatores exigidas.

No presente estudo, ainda que a carga de nitrogênio se mostre menor durante a operação contínua do reator DMX em relação ao sistema de dois reatores, o processo foi operado à 25°C, diferindo em 10°C do sistema com dois reatores (35°C), o que por consequência pode reduzir em até 50% a atividade específica das bactérias ANAMMOX (MALOVANNY *et al.*, 2012) e influenciar significativamente na remoção de nitrogênio do reator. Além disso, através dos resultados obtidos com os ensaios cinéticos realizados, fica claro que o reator DMX é capaz de suportar cargas maiores de remoção, seja pelo aumento de concentração ou redução do TRH, o que permitiria trabalhar com um único reator à temperatura ambiente, com carga superior de nitrogênio e por fim, poupando energia com aquecimento em relação ao processo com dois reatores.

Tabela 19 – Comportamento do reator DMX em relação ao processo convencional de nitrificação/desnitrificação e ao processo combinado de nitrificação parcial + ANAMMOX utilizando dois reatores para remoção de nitrogênio.

Parâmetros	Processos		
	Nitrificação-Desnitrificação	Nitrificação parcial + ANAMMOX	Reator DMX (desamonificação)
Número de reatores	2	2	1
Demanda de oxigênio (gO ₂ gN ⁻¹)	4,57 / 0 ^a	1,72 ^a / 0	0,15
TRH (d)	4 ^c	1 ^b / 0,08 – 0,25 ^d	0,55
DQO necessária, com assimilação (gDQO gN ⁻¹)	4,0 ^a	0	0
Crescimento da biomassa (mgSSV L ⁻¹ d ⁻¹)	39 / 44 ^c	0,1 ^e	0,78
Carga de nitrogênio aplicado (kgN m ⁻³ d ⁻¹)	0,26 ^f	0,9 ^d	0,55
Temperatura do processo (°C)	23 / 26 ^c	35 ^d	25
Emissão de N ₂ O (mg m ⁻³ d ⁻¹)	0,4-1740 ^g / 1-7870 ^g	152 / 11,6 ^d	9,75

^aVAN HULLE *et al.*, 2010; ^bPRA *et al.*, 2012; ^cBORTOLI, 2010; ^dOKABE *et al.*, 2011; ^eMULDER, 2003; ^fVANOTTI *et al.*, 2009; ^gBORTOLI *et al.*, 2012.

Conforme já discutido, o controle da concentração de oxigênio é essencial para todos os processos biológicos que trabalham com remoção de nitrogênio. No entanto, para ambos os processos operando com um ou dois reatores, a limitação desse parâmetro está diretamente relacionada com a eficiência de remoção do sistema. Quando comparado ao processo convencional de nitrificação/desnitrificação, o reator DMX demandou aproximadamente 30 vezes menos oxigênio no meio reacional e quando comparado ao sistema com dois reatores a diferença foi de aproximadamente 11 vezes menor para o reator DMX (Tabela 19). Esses valores representam a diferença de economia com aeração e energia necessária para manter valores altos de oxigênio dissolvido no meio, o que acaba viabilizando limitar a sua concentração.

Por fim, um parâmetro de extrema importância na operação desses processos é a emissão de N_2O , gás conhecidamente potencial de efeito estufa que vêm gerando grandes preocupações nos sistemas de tratamento. Quando comparado ao processo convencional, dependendo de suas condições de vazão de ar, tempo de aeração e oxigênio dissolvido (BORTOLI *et al.*, 2012), o reator DMX pode emitir até 800 vezes menos N_2O (Tabela 19), demonstrando ser uma ferramenta eficiente na redução desse gás e contribuindo para a diminuição do impacto ambiental causado pelo mesmo. Em relação ao processo com dois reatores, o reator DMX pode emitir até 15 vezes menos N_2O do que o processo de nitrificação parcial do primeiro reator, isso muito provavelmente devido ao acúmulo de nitrito no mesmo que tende a favorecer a produção e emissão desse gás (TALLEC *et al.*, 2006).

Em síntese, é necessário avaliar além das vantagens e limitações dos processos, a viabilidade econômica para sua real aplicação. Neste sentido, não é possível generalizar uma única alternativa para remoção de nitrogênio. Isso porque as características físico-químicas das águas residuárias variam de acordo com o processo produtivo e são dependentes de sua origem. Por isso, dependendo do tipo de produção, o desempenho dos processos pode se apresentar mais ou menos eficiente.

Por fim, os estudos realizados com o reator DMX demonstraram, além das vantagens observadas, o potencial tecnológico que esse processo tem para real aplicação e aumento de escala do sistema quando comparado aos demais processos para remoção de nitrogênio já consolidados.

4.10 AVALIAÇÃO MOLECULAR DA BIOMASSA PRESENTE NO REATOR DMX

Além dos já citados parâmetros operacionais, um bom equilíbrio entre as BOA e as bactérias ANAMMOX também é importante para o controle do processo DMX. Mudanças nos fatores externos podem perturbar o microambiente, levando a redução da atividade e a possível morte celular das bactérias em estudo. Por isso, conhecer a estabilidade quali e quantitativa da biomassa responsável pelas conversões do nitrogênio no reator são fundamentais para futura aplicação prática do sistema analisado.

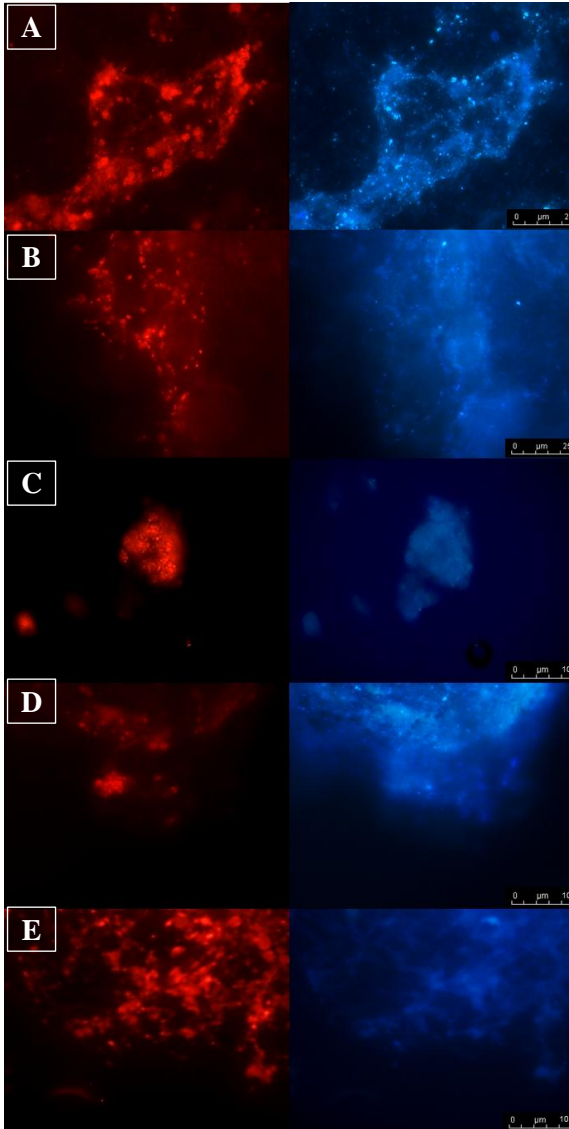
A Figura 33 apresenta os resultados da análise de FISH para a amostra do reator DMX. Observando seus resultados, percebe-se que a amostra apresentou resultado positivo para todas as bactérias específicas avaliadas.

Dentre os gêneros encontrados, as Figuras 33B e 33E se destacam pela forte coloração e aglomerados mais definidos em maiores quantidades. A primeira se trata de bactérias oxidadoras de amônia, nas quais observando a Figura 33C percebe-se que em sua maior parte são compostas pelo gênero *Nitrosomonas*. A segunda trata-se de bactérias com atividade ANAMMOX, principais responsáveis pela eliminação do nitrogênio durante o processo de desamonificação. Satisfatoriamente ambas as bactérias formaram a maior parte das bactérias totais (Figura 33A) analisadas durante o experimento, o que indica uma cultura bastante enriquecida e explica a eficiência e sucesso do processo de desamonificação pelo favorecimento dessas bactérias no reator DMX.

Além disso, conforme ilustra a Figura 33D, o reator apresentou resultado positivo, mesmo em pequena quantidade, para a presença de bactérias oxidadoras de nitrito do gênero *Nitrobacter*. Isso justifica a parcela excedente de nitrato no reator DMX durante o experimento (fruto da atividade dessas bactérias), o que por consequência contribuiu para a redução da eficiência de remoção de nitrogênio no sistema. Entretanto, apesar de presentes, essas bactérias tiveram sua atividade controlada através dos parâmetros operacionais impostos ao sistema, mostrando que a concentração de oxigênio dissolvido foi uma estratégia eficiente para o controle dessas populações durante o experimento.

Assim, a diversidade de micro-organismos encontrados no reator DMX demonstra que mesmo não tendo sua atividade favorecida, há um rico consórcio presente com potencial para o desenvolvimento de outros processos biológicos no reator.

Figura 33 - Resultado da análise qualitativa de FISH para amostras do reator DMX. Em azul a coloração por DAPI da comunidade microbiana total. Em vermelho a coloração de bactérias específicas: Domínio *Bacteria* (A). Todas as BOA (B). Gênero *Nitrosomonas* (C). Gênero *Nitrobacter* (D). Todas as ANAMMOX (E).



No mesmo contexto, os resultados do qPCR corroboram os resultados do FISH, uma vez que mostram uma população de 10^{11} bactérias g^{-1} de micro-organismos nitrificantes (*amoA*) e 10^8 $cg\ g^{-1}$ de bactérias ANAMMOX (*hzo*). Da mesma forma que o FISH, a análise de qPCR indicou que a biodiversidade do reator DMX era composta majoritariamente por bactérias oxidadoras de amônia e ANAMMOX como bactérias funcionais dominantes.

Liu *et al.*, (2012), estudaram a população de BOA e ANAMMOX em um reator com processo DMX estabelecido, e verificaram que a população de BOA foi de 10^8 a 10^{10} bactérias por mg de biomassa. Além disso, no mesmo trabalho, o aumento e redução do número de células de BOA estava diretamente relacionado ao aumento ou redução da concentração de N-NH₃ na entrada do sistema. Outros trabalhos também mostram uma correlação positiva entre a concentração de amônia e a população de BOA (PARK *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2010).

Quanto às bactérias ANAMMOX, a população permaneceu em torno de 10^7 , e não apresentou variação durante as diferentes fases do estudo do reator com variações na concentração de amônia (LIU *et al.*, 2012). No entanto, isso pode estar relacionado ao longo tempo de duplicação das bactérias ANAMMOX (9 a 11 dias) (STROUS *et al.*, 1998) e não necessariamente a indiferença quanto a concentração de amônia.

Correlacionando com os resultados obtidos pela atividade específica do reator DMX, onde as BOA mostraram-se mais resistentes à inibição pelo substrato, pode-se dizer que elevadas concentrações de N-NH₃ tendem a favorecer a atividade das BOA pela afinidade com o substrato, enquanto as bactérias ANAMMOX apresentam maior estabilidade de crescimento devido ao seu menor tempo de duplicação. Dessa forma, conclui-se que populações de BOA serão comumente encontradas em maior quantidade do que populações de ANAMMOX quando submetidas ao mesmo reator durante o processo de desamonificação. No entanto, através do controle dos parâmetros operacionais do processo, é possível manter o equilíbrio dessas populações, fazendo com que a eficiência global de remoção de nitrogênio não seja afetada pela diferença entre esses resultados.

5 CONCLUSÕES

Os reatores operados para produção de biomassa se mostraram boa fonte de inóculo de micro-organismos nitrificantes e ANAMMOX, operando com uma velocidade de crescimento de $0,2612 \text{ h}^{-1}$ e $0,0063 \text{ h}^{-1}$, respectivamente para os reatores SBR e ANAMMOX.

O modelo de Andrews foi o que melhor representou o comportamento da biomassa nitrificante durante os ensaios cinéticos realizados, obtendo uma velocidade máxima específica μ_m de $4,38 \text{ mgO}_2 \text{ gSSV}^{-1} \text{ min}^{-1}$, uma constante de saturação K_S de $12,38 \text{ mgN-NH}_3 \text{ L}^{-1}$ e uma constante de inibição K_I de $3867,12 \text{ mgN-NH}_3 \text{ L}^{-1}$.

O modelo de Edwards I foi o que melhor representou o comportamento da biomassa ANAMMOX tanto para N-NH_3 como para N-NO_2^- durante os ensaios cinéticos realizados, obtendo uma velocidade máxima específica μ_m de $9,97 \text{ mgN-NH}_3 \text{ gSSV}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para amônia e $9,573 \text{ mgN-NO}_2^- \text{ gSSV}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para nitrito. Já a constante de saturação K_S foi de $96,435 \text{ mgN-NH}_3 \text{ L}^{-1}$ para amônia e $56,402 \text{ mgN-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$ para nitrito e a constante de inibição K_I de $603,53 \text{ mgN-NH}_3 \text{ L}^{-1}$ e $525,34 \text{ mgN-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$ para amônia e nitrito, respectivamente.

O aumento da concentração de substrato se mostrou potencialmente limitante (aproximadamente 7 vezes mais) para a atividade das bactérias ANAMMOX quando comparado à atividade nitrificante.

O processo de desamonificação foi estabelecido após o 52º dia de operação do reator DMX, trabalhando com o afluente a uma concentração de $300 \text{ mgN-NH}_3 \text{ L}^{-1}$, com TRH de 0,55 d, OD de $0,14 \pm 0,03 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$, vazão de ar em 20 mL min^{-1} , temperatura de $24,49 \pm 0,7 \text{ }^\circ\text{C}$ e carga de nitrogênio aplicado de $0,5454 \text{ kgN m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. As concentrações estequiométricas de N-NH_3 e N-NO_3^- no efluente do reator, juntamente com a eficiência de remoção de amônia de $83,38 \pm 0,04 \%$ e remoção de nitrogênio total de $57,93 \pm 0,05 \%$ comprovam a evidência do processo DMX por mais de 35 dias consecutivos de operação.

Em paralelo, o modelo matemático de Monod foi o que melhor se ajustou aos dados experimentais do reator DMX, obtendo uma velocidade máxima específica de consumo de N-NH_3 de $7,513 \text{ mgN-NH}_3 \text{ gSSV}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e uma constante de saturação pelo substrato K_S de $175,48 \text{ mgN-NH}_3 \text{ L}^{-1}$. Esses resultados ajustados pelo modelo de Monod sugerem que o aumento da concentração de substrato não foi um fator limitante para a velocidade de consumo de amônia a curto prazo, indicando a possibilidade do sistema de suportar cargas maiores de remoção de nitrogênio sem inibir a atividade das bactérias.

Simultaneamente, o sistema se mostrou eficiente na redução de gases de efeito estufa, emitindo concentrações insignificantes de N_2O durante a estabilidade do experimento.

Ademais, a análise de FISH e qPCR demonstraram que grande parte dos micro-organismos presentes no reator são bactérias oxidadoras de amônia (10^{11} bactérias g^{-1}) e bactérias ANAMMOX (10^8 bactérias g^{-1}), o que torna a cultura do reator bastante enriquecida sem a necessidade de seleção de micro-organismos.

Por fim, os experimentos conduzidos à temperatura ambiente potencializam a aplicação do processo de desamonificação como tecnologia para remoção de altas cargas de nitrogênio, além de criar a possibilidade de utilização com efluentes reais da agropecuária.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a capacidade do sistema em suportar cargas maiores de alimentação sob o aumento da concentração de substrato e sob a redução do TRH durante a operação contínua;
- Avaliar a influência da adição de carbono orgânico no afluente de alimentação e sua interferência na atividade específica dos micro-organismos (competição entre ANAMMOX e bactérias desnitrificantes);
- Utilizar efluentes reais da agropecuária como fonte de alimentação e estudar seus impactos na configuração proposta pelo presente trabalho;
- Otimizar o tempo de aeração, tempo do ciclo e tempo de retenção hidráulico no sistema objetivando aumentar a eficiência de remoção de nitrogênio;
- Estudar o processo DMX em diferentes configurações de reatores objetivando a progressão de escala;
- Realizar a caracterização microbiológica em futuros reatores, de modo a qualificar e quantificar o consórcio de micro-organismos presentes no reator desde a inoculação até o estabelecimento do processo.

REFERÊNCIAS

- AHN, Y.H. **Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review.** *Process Biochemistry*, v. 41, p. 1709–1721, 2006.
- AKAIKE, H. **A new look at the statistical model identification.** *IEEE Transactions on Automatic Control.*, Boston, v.19, n.6, p.716-723, 1974.
- AKTAN, C. K., YAPSAKLI, K., MERTOGLU, B. **Inhibitory effects of free ammonia on ANAMMOX bacteria.** *Biodegradation*, v.23, p. 751-762, 2012.
- AMANN, R. I. *et al.* **Combination of 16S rRNA targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 56, p. 1919-1925, 1990.
- ANDREWS, J.F. **A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates.** *Biotechnology and Bioengineering*, v. 10, p. 707-723, 1968.
- ANTHONISEN, A. C. *et al.* **Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid.** *Journal Water Pollution Control Federation*, v. 48, p. 835-852, 1976.
- APHA – American Public Health Association. **Standard methods for the examination of water and wastewater.** 22 ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2012.
- ASAE - American Society of Agricultural Engineers. **Manure Production and Characteristics.** ASAE D384.2, 2005. Disponível em: <http://evo31.ae.iastate.edu/ifafs/doc/pdf/ASAE_D384.2.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2013.
- BAE, W. *et al.* **Optimal operational factors for nitrite accumulation in batch reactors.** *Biodegradation*, v.12, p. 359-366, 2002.
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**, 2º Ed. McGraw Hill. Singapura. 1986.

BAILEY, R.; CLARK, H.; FERRIS, J.; KRAUSE, S.; STRONG, R.; **Chemistry of the Environment**, 2. ed., San Diego-California, Ed. Elsevier, 835p, 2002. ISBN 978-0-12-073461-0.

BELLAVER, C. **Sistemas de Produção de Frangos de Corte**. Embrapa Suínos e Aves, ISSN 1678.8850, 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Ave/ProducaodeFrangodeCorte/agua.html>>. Acesso em: 10 jul. 2013.

BETTAZZI, E. *et al.* **Nitrite inhibition and intermediates effects on ANAMMOX bacteria: A batchscale experimental study**. *Process Biochemistry*, v. 45, p. 573–580, 2010.

BITTON, G. **Wastewater microbiology**. 3 ed. New Jersey: Ed. John Wiley & Sons, p. 765, 2005.

BLEY Jr, C. **A Suinocultura e o Meio Ambiente**. Encontro técnico ABRAVES, 2000. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/abrades-sc/memorias.html>. Acesso em: 11 mai. 2011.

BORTOLI, M. *et al.* **Emissão de óxido nitroso nos processos de remoção biológica de nitrogênio de efluentes**. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v.17 p. 1-6, 2012.

BORTOLI, M. **Partida, operação e otimização de um sistema de nitrificação/desnitrificação visando à remoção de nitrogênio de efluente da suinocultura pelo processo Ludzack-Ettinger modificado**. 2010. f. 155. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), UFSC, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

BURKHOLDER, J. *et al.* **Impacts of Waste from Concentrated Animal Feeding Operations on Water Quality**. *Environmental Health Perspect*, v. 115, p. 308-312, 2007.

CANZIANI, R. *et al.* **Effect of oxygen concentration on biological nitrification and microbial kinetics in a cross-flow membrane bioreactor (MBR) and moving-bed biofilm reactor (MBBR) treating old landfill leachate**. *Journal of Membrane Science*, n. 286, p. 202-212, Set. 2006.

CARRERA, J. *et al.* **Kinetic models for nitrification inhibition by ammonium and nitrite in a suspended and an immobilised biomass systems.** *Process Biochemistry*, v. 39, p. 1159-1165, 2004.

CEMA, G. *et al.* **Biological nitrogen removal from landfill leachate by deammonification assisted by hetero-trophic denitrification in a rotating biological contactor (RBC).** *Water Science and Technology*, v. 55, p. 35-41, 2007.

CERVANTES, F.J. **Environmental Technologies to Treat Nitrogen Pollution.** London, NY: IWA Publishing, p.420, 2009.

CHANG, X. *et al.* **Performance of a completely autotrophic nitrogen removal over nitrite (CANON) process for treating wastewater with different substrates at ambient temperature.** *Environmental Sciences*, v. 25, p. 688-697, 2013.

CHO, S. *et al.* **Development of a simultaneous partial nitrification and anaerobic ammonia oxidation process in a single reactor.** *Biore-source Technology*, v.102, p.652-659, 2011.

CHUNG, J.; SHIM, H.; LEE, Y. W.; BAE, W. **Comparison of influence of free ammonia and dissolved oxygen on nitrite accumulation between suspended and attached cells.** *Environmental Technology*, v. 26, p. 21-33, 2005.

CIUDAD, G. *et al.* **Partial nitrification of high ammonia concentration wastewater as a part of a shortcut biological nitrogen removal process.** *Process Biochemistry*, v. 40, p. 1715-1719, 2005.

CONAMA - Conselho Nacional de Meio Ambiente, **Resolução N° 430** de 13 de Maio de 2011.

CUI, F. **Cold CANON: ANAMMOX at low temperatures.** 2012, f. 118, Master of Science in Civil Engineering, Delft University of Technology, Delf.

DAPENA-MORA, A. *et al.* **Evaluation of activity and inhibition effects on ANAMMOX process by batch tests based on the nitrogen gas production.** *Enzyme and Microbial Technology*, v.40, p.859-865, 2007.

DARTORA, V.; PERDOMO, C. C.; TUMELERO, I. L. **Manejo de dejetos suínos**. Boletim Informativo de Pesquisa – Embrapa Suínos e Aves e Extensão, EMATER, RS: BIPERS, 1998.

EDWARDS, V. H. **The influence of high substrate concentration on microbial kinetics**. Biotechnology and Bioengineering, v. 12, p. 679–712, 1970.

EGLI, K. *et al.* **Microbial composition and structure of a rotating biological contactor biofilm treating ammonium-rich wastewater without organic carbon**. Microbial Ecology, n. 45, p. 419-432, 2003.

EPA. **Nitrogen control**. Washington, DC: US EPA/625/R-93/010, p.46, 1993.

EVANS, G.M., FURLONS, J.C.; Environmental Biotechnology: Theory and Application. 2nd Edition, West Sussex, UK, John Wiley & Sons Ltd. 293 pages. ISBN: 978-0-470-97538-1, 2011.

FERNANDES, G. W. *et al.* **Chemical phosphorus removal: a clean strategy for piggery wastewater management in Brazil**. Environmental Technology, v. 33, p. 1677-1683, 2012.

FERNÁNDEZ, I. *et al.* **Short- and long-term effects of ammonium and nitrite on the ANAMMOX process**. Environmental Management, v. 95, p. 170–174, 2012.

FERRETTI, E. C. **Estudo da Influência da Relação S_0/X_0 na Determinação da Atividade Específica de Bactérias Nitrificantes**. 2005. f. 111. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), UFSC, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

FERRIS, M. J., MUYZER, G., WARD, D. M. **Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community**. Applied and Environmental Microbiology, v. 62, p. 340-346, 1996.

FUX, C. *et al.* **Biological treatment of ammonium-rich wastewater by partial nitrification and subsequent anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) in a pilot plant**. Journal Biotechnology, v. 99, p. 295-306, 2002.

GASQUES, J. G. *et al.* **Desempenho e crescimento do Agronegócio no Brasil**. Brasília: Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada, 2004. ISSN 1415-4765. Disponível em: <http://www.en.ipea.gov.br/agencia/images/stories/PDFs/TDs/td_1009.pdf>. Acesso em: 27 jun. 2013.

GERARDI, M. H. **Wastewater Bacteria**. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2006.

GOREAU, T. J. *et al.* **Production of NO₂- and N₂O by nitrifying bacteria at reduced concentrations of oxygen**. Applied and Environmental Microbiology, v. 40, p. 526–32, 1980.

GRADY, C. P. L. Jr.; DAIGGER, G. T.; LIM, C. H. **Biological Wastewater Treatment**. 2 ed. New York: Ed. Marcel Dekker, p. 1039, 1999.

HAN, K., LEVENSPIEL, O. **Extended Monod kinetics for substrate, product, and cell inhibition**. Biotechnology and Bioengineering, v. 32, p. 430–437, 1988.

HELLINGA, C. *et al.* **The SHARON process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich wastewater**. Water Science and Technology, v.37, p.135-142, 1998.

HENZE, M.; HARREMOES, P.; JANSEN, J. C.; ARVIN, E. **Wastewater treatment – Biological and chemical process**. Springer Verlag, 2a Edição, Alemanha, 1997.

HHIBAR, C. **Understanding Concentrated Animal Feeding Operations and Their Impact on Communities**. Environmental Health, 2010. Disponível em: <http://www.cdc.gov/nceh/ehs/docs/understanding_cafos_nalboh.pdf>. Acesso em: 8 jul. 2013.

HIDAKA, T. *et al.* **Effect of dissolved oxygen conditions on nitrogen removal in continuously fed intermittent-aeration process with two tanks**. Water Science and Technology, v.45, p. 181-188, 2002. IPCC - INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. **Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories**. Japan, IGES, p. 6.24-6.26, 2006.

ISAKA, K. *et al.* **Growth Characteristics of anaerobic ammonia-oxidizing bacteria in an anaerobic biological filtrated reactor.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 70, p. 46-62, 2006.

JAROSZYNSKI, L. W. e OLESZKIEWICZ, J. A. **Autotrophic ammonium removal from reject water: partial nitrification and anammox in one-reactor versus two-reactor systems.** Environmental Technology, v. 32, p. 289-294, 2011.

JETTEN M. S. M. **Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation ('ANAMMOX') process.** Environmental biotechnology, v. 12, p. 283-288, 2001.

JETTEN, M. S. M. *et al.* **CANON and ANAMMOX in a gas-lift reactor.** FEMS Microbiology Letters, v. 218, p. 339-344, 2003.

JIANLONG, W.; NING, Y. **Partial nitrification under limited dissolved oxygen conditions.** Process Biochemistry, v. 39, p. 1223-1229, 2004.

JIN, R. C. *et al.* **The inhibition of the ANAMMOX process: A review.** Chemical Engineering Journal, v. 197, p. 67-79, 2012.

JUBANY, I. *et al.* **Respirometric calibration and validation of a biological nitrite oxidation model including biomass growth and substrate inhibition.** Water Research, v. 39, p. 4574-4584, 2005.

KAMPSCHREUR, M.J. *et al.* **Nitrous oxide emission during wastewater treatment.** Water Research. v. 43, p. 4093-4103, 2009.

KESTER, R. A.; DE BOER, W.; LAANBROEK H. J. **Production of NO and N₂O by pure cultures of nitrifying and denitrifying bacteria during changes in aeration.** Applied and Environmental Microbiology, v. 63, p. 3872-3877, 1997.

KIM, J. H.; GUO, X.; PARK. H. S. **Comparison study of the effects of temperature and free ammonia concentration on nitrification and nitrite accumulation.** Process Biochemistry, v. 43, p. 154-160, 2008.

KUNZ, A., BORTOLI, M. HIGARASHI, M. M. **Avaliação do manejo de diferentes substratos para compostagem de dejetos líquidos de suínos.** Acta Ambiental Catarinense, v. 5, p. 7-19, 2008.

KUNZ, A.; MIELE, M.; STEINMETZ, R. **Advanced swine manure treatment and utilization in Brazil.** Bioresource Technology, v. 100, p. 5485-5489, 2009.

LIANG, Z. e LIU, J.-x. **Control factors of partial nitrification for land-fill leachate treatment.** Journal of Environmental Sciences, v.19 p.523-529, 2007.

LIU, T. *et al.* **Biodiversity and quantification of functional bacteria in completely autotrophic nitrogen-removal over nitrite (CANON) process.** Bioresource Technology, v. 118, p. 399-406, 2012.

LIANG, Z. *et al.* **A control strategy of partial nitrification in a fixed bed biofilm reactor.** Bioresource Technology, v. 102, p. 710-715, 2011.

MAGRÍ, A., VANOTTI, M. B., SZÖGI, A. A., CANTRELL, K. B. **Partial Nitrification of Swine Wastewater in View of its Coupling with the ANAMMOX Process.** Journal of Environmental Quality, v. 41, p. 1989-2000, 2012.

MALOVANY, A. PLAZA, E. TRELA, J. **Evaluation of the factors influencing the specific ANAMMOX activity (SAA) using surffasse modelling.** 2012. Disponível em: <<http://www2.lwr.kth.se/forskningsprojekt/Polishproject/rep16/MalovanyPlaza.pdf>>. Acesso em: 12 jul. 2013.

MANSO, K. R. J., FERREIRA, O. M. F. **Confinamento de Bovinos: Estudo do Gerenciamento dos Resíduos.** Goiânia, 2007. Disponível em: <<http://www.cigeneticabovina.com.br/pe/dcd768bbf6991ca78688c72e4c51ba09.pdf>>. Acesso em: 10 jul. 2013.

MERIÇ, S., TÜNAY, O., ALI SAN, H. **A new approach modelling substrate inhibition.** Environmental Technology, v. 23, p. 163-77, 2002.

METCALF & EDDY. **Wastewater Engineering: Treatment and reuse.** 4 ed. New York, USA: McGraw Hill, p. 1819, 2003.

MOBARRY, B. K. **Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria.** Applied and Environmental Microbiology, v. 62, p. 2156-2162, 1996.

MULDER, A. *et al.* **Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized reactor.** FEMS Microbiology and Ecology, v. 16, p. 177-184, 1995.

MULDER, A. **The quest for sustainable nitrogen removal technologies.** Water Science and Technology, v. 48, p. 67-75, 2003.

MUNZ, G. LUBELLO, C. OLESZKIEWICZ, J. A. **Factors affecting the growth rates of ammonium and nitrite oxidizing bacteria.** Chemosphere, v. 83, p. 720-725, 2011.

MUSABYIMANA, M. **Deammonification process kinetics and inhibition evaluation.** Dissertação de Mestrado. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, 2008.

NAKAKI, T., NAKAYAMA, M., KATO, R. **Inhibition by nitric oxide and nitric-oxide producing vasodilators of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells.** European Journal of Pharmacology, v. 189, p. 347-353, 1990.

NIELSEN, M. *et al.* **Kinetics, diffusional limitation and microscale distribution of chemistry and organisms in a CANON reactor.** FEMS Microbiology Ecology, v. 51, p. 247-256, 2005.

OKABE, S. *et al.* **Development of long-term stable partial nitrification and subsequent ANAMMOX process.** Bioresource Technology, v.102, p.6801-6807, 2011.

PALHARES J.C.P. **Pegada hídrica dos suínos abatidos nos Estados da Região Centro-Sul do Brasil.** Acta Scientiarum Animal Sciences, v. 33, p. 309-314, 2011.

PAQUES, ANAMMOX. Disponível em:
<<http://www.paques.nl/?pid=46>> . Acesso em: 19 abr. 2011.

PARK, H. *et al.* **Impact of inocula and growth mode on the molecular microbial ecology of anaerobic ammonia oxidation (ANAM-**

MOX) bioreactor communities. *Water Research*, v. 44, p. 5005–5013, 2010.

PARK, S.; BAE, W. **Modeling kinetics of ammonium oxidation and nitrite oxidation under simultaneous inhibition by free ammonia and free nitrous acid.** *Process Biochemistry*, v. 44, p. 631-640, 2009.

PENG, Y.Z. *et al.* **Nitrite accumulation by aeration controlled in sequencing batch reactors treating domestic wastewater.** *Water Science and Technology*, v. 50, p. 35-43, 2004.

POLLICE A. *et al.* **Influence of aeration and sludge retention time on ammonium oxidation to nitrite and nitrate.** *Water Research*, v.36, p. 2541-2546, 2002.

POLPRASERT, C. e SAWAITTAYOTHIN, V. **Nitrogen mass balance and microbial analysis of constructed wetlands treating municipal landfill leachate.** *Water Science & Technology*, v. 54, p. 147–154, 2006.

PRA, M. C. de *et al.* **Acompanhamento da Amônia Livre e Ácido Nitroso Livre em um Reator Biológico Aerado no Tratamento de Dejeito de Suíno.** In: I Congresso Sul Brasileiro de Produção Animal Sustentável – ANISUS, 2010, Chapecó, Anais, 2010.

PRA, M. C. de *et al.* **Influência da concentração de nitrogênio em reatores com atividade ANAMMOX durante o start-up do sistema.** In: III Simpósio Internacional sobre Gerenciamento dos Resíduos Agropecuários e Agroindustriais – SIGERA, 2013, São Pedro, SP, Anais, 2013.

PRA, M. C. de. *et al.* **Simultaneous removal of TOC and TSS in swine wastewater using partial nitrification process.** *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 87, p. 1641-1647, 2012.

PRA, M. C. de. **Partida, Operação e Estabelecimento do Processo de Nitrificação Parcial em um Reator *Airlift* com Remoção Simultânea de Carbono e SST em Efluente da Suinocultura.** 2011. f. 75. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Ambiental), UnC, Universidade do Contestado, Concórdia.

ROTHAUWE, J. H.; WITZEL, K. P.; LIESACK, W. **The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations.** Applied and Environmental Microbiology, v. 63, p. 4704-4712, 1997.

RUIZ, G. *et al.* **Nitrification-denitrification via nitrite accumulation for nitrogen removal from wastewaters.** Bioresource Technology, vol. 97, p. 330-335, 2006.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: A laboratory Manual.** Third ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, p. 1.31-1.34, 2001.

SAMPAIO, S. C. *et al.* **Comportamento das formas de nitrogênio em solo cultivado com milho irrigado com água residuária da suinocultura.** Engenharia Agrícola, Jaboticabal, v. 30, p. 138-149, jan./fev., 2010.

SANT'ANNA JR, G. L. **Tratamento Biológico de Efluentes: Fundamentos e Aplicações.** Rio de Janeiro: Interciência, p.418, 2010.

SAS INSTITUTE INC. **System for Microsoft Windows.** Versão 9.2, Cary, NC, USA, 2002-2008.

SCHIERHOLT NETO, G. F. **Desenvolvimento de uma flora de micro-organismos oxidadores anaeróbios de amônia utilizando inóculos provenientes de dejetos de suíno.** 2007. f. 101. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), UFSC, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SCHIERHOLT NETO, G. F. *et al.* Análise por injeção em fluxo para determinação de nitrato e nitrito em amostras de águas e dejetos de animais. In: **XI Encontro Nacional sobre Metodologias de Laboratório da Embrapa.** Anais. Concórdia: EMBRAPA, p. 35-35, 2006.

SCHMID, M. C. *et al.* **Environmental detection of octahem cytochrome c hydroxylamine/hydrazine oxidoreductase genes of aerobic and anaerobic ammonium-oxidizing bacteria.** Environmental Microbiology, v. 10, p. 3140, 2008.

SCHMID, M. *et al.* **Candidatus "Scalindua brodae", sp. nov., Candidatus "Scalindua wagneri", sp. nov., two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria.** Systematic and Applied Microbiology, v. 26, p. 529–538, 2003.

SCHMIDELL, W. e SPILLER, A. R. Remoção de Nitrogênio. **In: V Curso de Tratamento Biológico de Resíduos.** Florianópolis, p. 40, 2005.

SCHMIDELL, W. *et al.* **Biotecnologia Industrial.** São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda., 2001.

SCHMIDELL, W. *et al.* **Tratamento biológico de águas residuárias.** Florianópolis: Gráfica PaperPrint, 2007.

SCHMIDT, I. *et al.* **New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater.** FEMS Microbiology reviews, n. 27, p.481-492, 2003.

SEGANFREDO, M. A. **Gestão Ambiental na Suinocultura.** Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2007.

SIAS, S. R. *et al.* **The Assimilatory and Dissimilatory Nitrate Reductases of *Pseudomonas aeruginosa* are Encoded by Different Genes.** Journal of General Microbiology, v. 118, p. 229-234, 1980.

SLIEKERS, A. O. *et al.* **Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite in one single reactor.** Water Res., v. 36, p. 2475-2482, 2002.

SPELLMAN, F. R., WHITING, N. E. **Environmental Management of Concentrated Animal Feeding Operations (CAFOs).** CRC Press: 1 ed., p. 496, 2007.

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

TALLEC, G.; GARNIER, J.; BILLEN, G.; GOUSAILLES, M. **Nitrous oxide emissions from secondary activated sludge in nitrifying condi-**

tions of urban wastewater treatment plants: effect of oxygenation level. Water Research, v. 40, p. 2972-2980, 2006.

TANG, C-J. *et al.* **Performance of high-loaded ANAMMOX UASB reactors containing granular sludge.** Water Research, v. 45, p. 135-144, 2011.

TANYOLAÇ, D., SALIH, B., TANYOLAÇ, A. **Inhibition kinetics of a commercial mixed culture by ammonium sulfate.** Biochemical Engineering, v. 7, p 177-82, 2001.

THIRD K. A. *et al.* **Treatment of nitrogen-rich wastewater using partial nitrification and ANAMMOX in the CANON process,** Water Science and Technology, v. 52, p. 47-54, 2005.

THIRD, K. A. *et al.* **The CANON System (Completely Autotrophic Nitrogen-removal Over Nitrite) under Ammonium Limitation: Interaction and Competition between Three Groups of Bacteria.** Systematic and Applied Microbiology, v. 24, p. 588-596, 2001.

TSUNEDA, S.; MIKAMI, M.; KIMOCHI, Y.; HIRATA, A. **Effect of salinity on nitrous oxide emission in the biological nitrogen removal process for industrial wastewater.** Journal of Hazardous Materials, v. 119, p. 93-98, 2005.

TSUSHIMA, I. *et al.* **Development of high-rate anaerobic ammonium-oxidizing (ANAMMOX) biofilm reactors.** Water Research, v.41, p. 1623-1634, 2007.

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Livestock and poultry:** World Markets and Trade, 2013. Disponível em:
<http://www.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf>. Acesso em: 7 jul. 2013.

VAN DE GRAAF, A. A. *et al.* **Autotrophic Growth of Anaerobic Ammonium oxidizing micro-organisms in a Fluidized Bed Reactor.** Microbiology, v.142, p.2187-2196, 1996.

VAN DE GRAAF, A. A. *et al.* **Metabolic Pathway of Anaerobic Ammonium Oxidation on the Basis of ^{15}N Studies in a Fluidized Bed Reactor.** *Microbiology*, v.143, p.2415-2421, 1997.

VAN DONGEN, U.; JETTEN, M.S.M.; van LOOSDRECHT, M.C.M. **The SHARON-ANAMMOX process for treatment of ammonium rich wastewater.** *Water Science and Technology*, n. 44, p.153-160, 2001.

VAN HULLE, S. W. H. *et al.* **Engineering aspects and practical application of autotrophic nitrogen removal from nitrogen rich streams.** *Chemical Engineering Journal*, v. 162, p. 1-20, 2010.

VAN HULLE, S.W.H. *et al.* **Influence of temperature and pH on the kinetics of the Sharon nitrification process.** *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.82, p.471-480, 2007.

VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; JETTEN, M. S. M. **Microbiological conversions in nitrogen removal.** *Water Science Technology*, v. 38, p. 1-7, 1998.

VANOTTI, M.B. *et al.* **Development of a second-generation environmentally superior technology for treatment of swine manure in the USA.** *Bioresource Technology*, v. 100, p. 5406–5416, 2009.

VÁZQUEZ-PADIN, J. R *et al.* **Autotrophic nitrogen removal at low temperature.** *Water Science and Technology*, v. 63, p. 1282–1288, 2011.

VERSTRAETE, W. e PHILIPS, S. **Nitrification-denitrification processes and technologies in new contexts.** *Environmental Pollution*, v.102, p.717-726, 1998.

VEYS, P. *et al.* **Performance analysis and optimization of autotrophic nitrogen removal in different reactor configurations: a modelling study.** *Environmental Technology*, vol. 31, p. 1311-1324, 2010.

VIANCELLI, A. *et al.* **Bacterial Biodiversity from an Anaerobic up Flow Bioreactor with ANAMMOX activity Inoculated with Swine**

Sludge. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 54, p. 1035-1041, 2011.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos.** Belo Horizonte, MG: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais, 3ª edição, p.452, 2005.

VON SPERLING, M. **Lodos Ativados.** Belo Horizonte, MG: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais, p.416, 1997.

WAGNER M. *et al.* **In situ analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants.** Water Science and Technology, v. 34, p. 237-244, 1996.

WEF - Water Environment Federation. **Biological Nutrient Removal (BNR) Operation In Wastewater Treatment Plants.** Manual of Practice No. 29, ASCE/EWRI Manuals and Reports on Engineering Practice No 109: McGraw-Hill Professional, p.597, 2005. ISBN: 0-07-146415-8

WIESMANN, U.; CHOI, I. S.; DOMBROWSKI, E. M. **Fundamentals of Biological Wastewater Treatment.** Berlin: Ed. WILEY-VCH, p. 393, 2007.

WILLIAMS, C. M. **CAFOs: Issues and Development of New Waste Treatment Technology.** Penn State Environmental Law Review, 217-247, 2002.

WRAGE, N.; VELTHOF, G. L.; van BEUSICHEM, M. L.; OENEMA, O.; **Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide.** Soil Biology & Biochemistry, n° 33, p.1723-1732, 2001.

YAMAMOTO, T. *et al.* **Novel Partial Nitritation Treatment for Anaerobic Digestion Liquor of Swine Wastewater Using Swim-Bed Technology.** Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 102, p. 497-503, 2006.

YANG, J. *et al.* **High rate partial nitrification treatment of reject wastewater.** Journal of Bioscience and Bioengineering v. 110, p. 436-440, 2010.

YANG, S. e YANG, F. **Nitrogen removal via short-cut simultaneous nitrification and denitrification in an intermittently aerated moving bed membrane bioreactor.** *Journal of Hazardous Materials*, v.195, p.318-323, 2011.

YE R. W.; THOMAS S.; M. **Microbial nitrogen cycles: physiology, genomics and applications.** 4ed. *Current Opinion in Microbiology*, p. 307–312, 2001.

YOO, H. *et al.* **Nitrogen removal from synthetic wastewater by simultaneous nitrification and denitrification (SND) via nitrite in an intermittently-aerated reactor.** *Water Res.*, v. 33, p. 145-154, 1999.

ZDRADEK, C. P. **Seleção de linhagens oxidadoras de amônio e remoção de nitrogênio via nitrito em reator descontínuo alimentado (SBR), sob condições de limitação de oxigênio.** 2005. f. 157. Tese (Doutorado em Engenharia Química), UFSC, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ZHANG, B. *et al.* **Quantification and comparison of ammonia-oxidizing bacterial communities in MBRs treating various types of wastewater.** *Bioresource Technology*, v. 101, p. 3054–3059, 2010.

ZHANG L. *et al.* **High rate nitrogen removal by the CANON process at ambient temperature.** *Water Science and Technology*, v. 65, p. 1826-1833, 2012.

ZHANG, L. *et al.* **High-rate partial nitrification treatment of reject water as a pretreatment for anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX).** *Bioresource Technology*, v. 102, p. 3761-3767, 2011.

ZHU, G. *et al.* **Biological Removal of Nitrogen from Wastewater.** *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 192, p. 159-195, 2008.

APÊNDICE A – Ensaios de respirometria da biomassa utilizada como inóculo.

Valores de QO_2X expressos em $mgO_2 L^{-1} min^{-1}$;

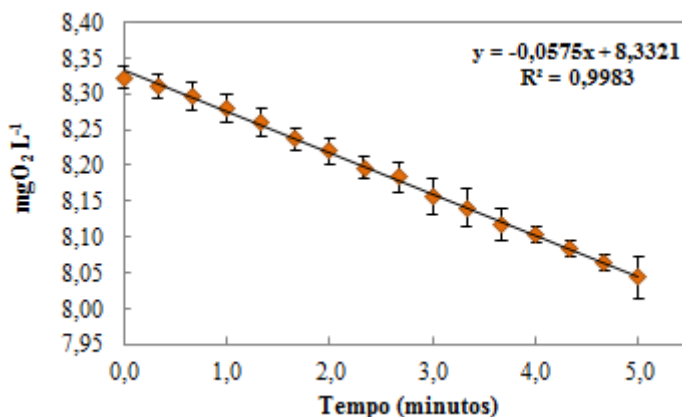
Valores de X expressos em $gSSV L^{-1}$;

Valores de $QO_2 end$ expressos em $mgO_2 gSSV^{-1} min^{-1}$;

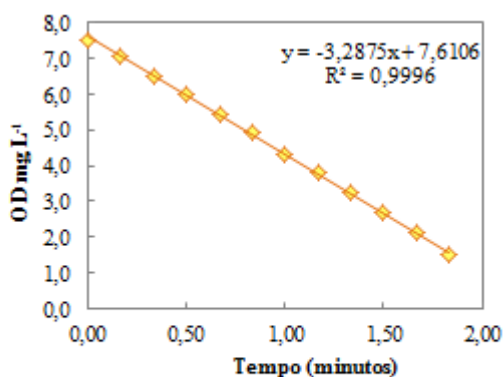
Valores de QO_2 expressos em $mgO_2 gSSV^{-1} min^{-1}$.

Respiração endógena					
Tempo (min)	Tempo (s)	R1	R2	R3	Média
0,00	0	8,34	8,31	8,32	8,32
0,33	20	8,33	8,30	8,30	8,31
0,67	40	8,32	8,29	8,28	8,30
1,00	60	8,30	8,28	8,26	8,28
1,33	80	8,28	8,26	8,24	8,26
1,67	100	8,25	8,24	8,22	8,24
2,00	120	8,23	8,23	8,20	8,22
2,33	140	8,21	8,20	8,18	8,20
2,67	160	8,20	8,19	8,16	8,18
3,00	180	8,18	8,16	8,13	8,16
3,33	200	8,16	8,15	8,11	8,14
3,67	220	8,13	8,13	8,09	8,12
4,00	240	8,11	8,11	8,09	8,10
4,33	260	8,09	8,09	8,07	8,08
4,67	280	8,07	8,07	8,05	8,06
5,00	300	8,06	8,06	8,01	8,04

QO_2X	X	$QO_2 end$
0,057	1,332	0,043

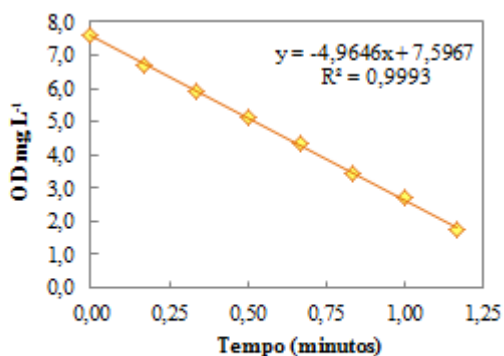


Concentração N-NH ₃ : 13,33 mg L ⁻¹		
Tempo (min)	Tempo (s)	OD (mg L ⁻¹)
0,00	0	7,52
0,17	10	7,10
0,33	20	6,53
0,50	30	5,98
0,67	40	5,43
0,83	50	4,92
1,00	60	4,33
1,17	70	3,79
1,33	80	3,23
1,50	90	2,71
1,67	100	2,12
1,83	110	1,53



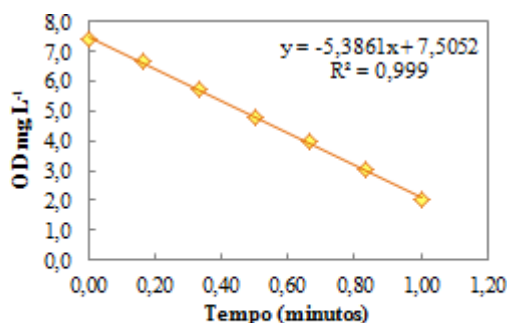
QO ₂ X	X	QO ₂ end	QO ₂
3,288	1,332	0,043	2,425

Concentração N-NH ₃ : 25,71 mg L ⁻¹		
Tempo (min)	Tempo (s)	OD (mg L ⁻¹)
0,00	0	7,61
0,17	10	6,73
0,33	20	5,92
0,50	30	5,13
0,67	40	4,38
0,83	50	3,43
1,00	60	2,69
1,17	70	1,74



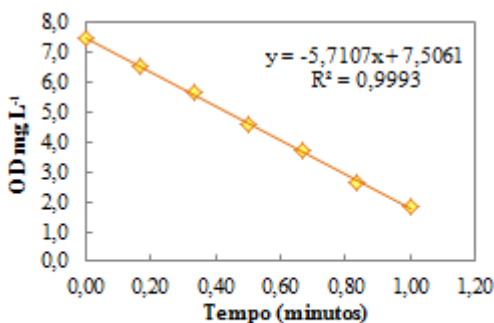
QO ₂ X	X	QO ₂ end	QO ₂
4,965	1,332	0,043	3,685

Concentração N-NH ₃ : 46,79 mg L ⁻¹		
Tempo (min)	Tempo (s)	OD (mg L ⁻¹)
0,00	0	7,42
0,17	10	6,69
0,33	20	5,71
0,50	30	4,82
0,67	40	3,98
0,83	50	3,02
1,00	60	2,06



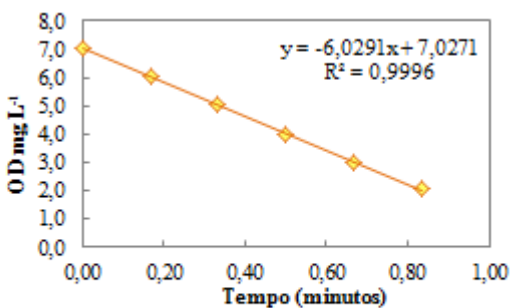
QO ₂ X	X	QO ₂ end	QO ₂
5,386	1,332	0,043	4,001

Concentração N-NH ₃ : 99,85 mg L ⁻¹		
Tempo (min)	Tempo (s)	OD (mg L ⁻¹)
0,00	0	7,49
0,17	10	6,58
0,33	20	5,65
0,50	30	4,59
0,67	40	3,74
0,83	50	2,67
1,00	60	1,85



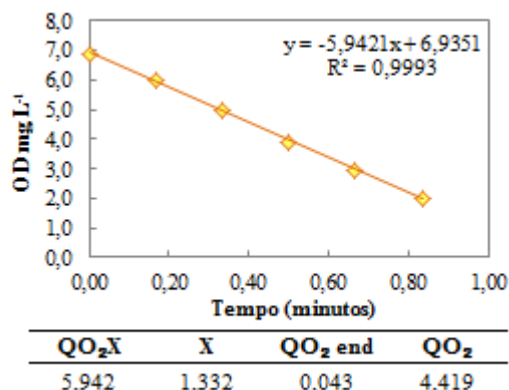
QO ₂ X	X	QO ₂ end	QO ₂
5,711	1,332	0,043	4,245

Concentração N-NH ₃ : 154,78 mg L ⁻¹		
Tempo (min)	Tempo (s)	OD (mg L ⁻¹)
0,00	0	7,05
0,17	10	6,02
0,33	20	5,03
0,50	30	3,96
0,67	40	2,98
0,83	50	2,06

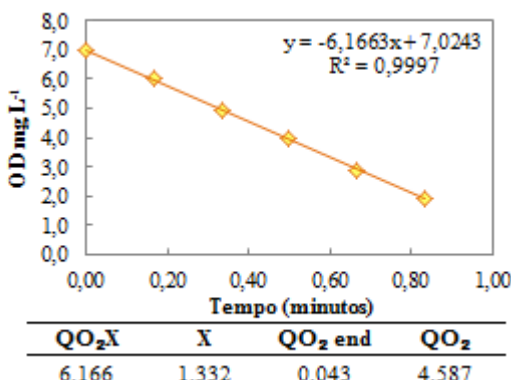


QO ₂ X	X	QO ₂ end	QO ₂
6,029	1,332	0,043	4,484

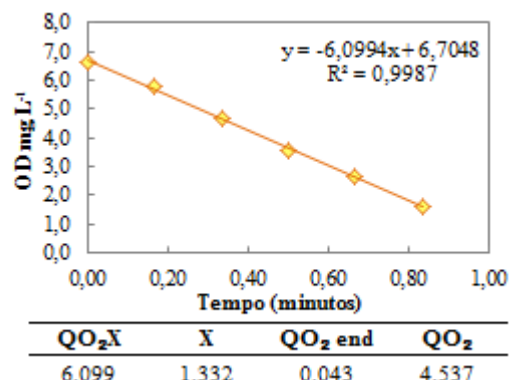
Concentração N-NH ₃ : 211,19 mg L ⁻¹		
Tempo (min)	Tempo (s)	OD (mg L ⁻¹)
0,00	0	6,89
0,17	10	6,02
0,33	20	4,99
0,50	30	3,90
0,67	40	2,97
0,83	50	2,00



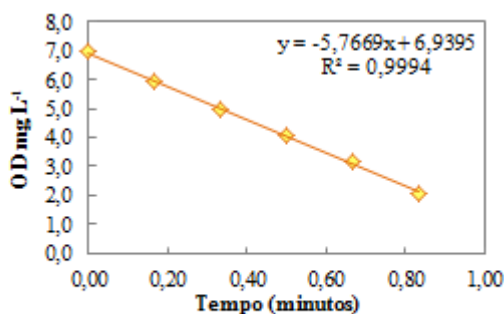
Concentração N-NH ₃ : 258,78 mg L ⁻¹		
Tempo (min)	Tempo (s)	OD (mg L ⁻¹)
0,00	0	6,99
0,17	10	6,05
0,33	20	4,96
0,50	30	3,96
0,67	40	2,89
0,83	50	1,90



Concentração N-NH ₃ : 354,52 mg L ⁻¹		
Tempo (min)	Tempo (s)	OD (mg L ⁻¹)
0,00	0	6,66
0,17	10	5,79
0,33	20	4,65
0,50	30	3,57
0,67	40	2,69
0,83	50	1,62

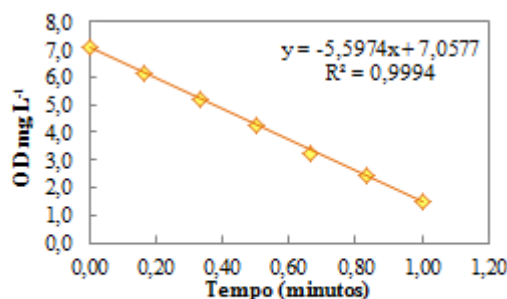


Concentração N-NH ₃ : 476,50 mg L ⁻¹		
Tempo (min)	Tempo (s)	OD (mg L ⁻¹)
0,00	0	6,97
0,17	10	5,93
0,33	20	5,00
0,50	30	4,07
0,67	40	3,16
0,83	50	2,09



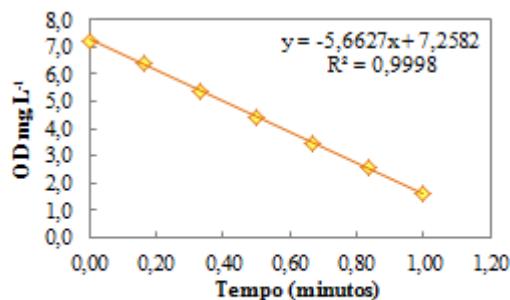
QO ₂ X	X	QO ₂ end	QO ₂
5,767	1,332	0,043	4,287

Concentração N-NH ₃ : 605,60 mg L ⁻¹		
Tempo (min)	Tempo (s)	OD (mg L ⁻¹)
0,00	0	7,06
0,17	10	6,18
0,33	20	5,18
0,50	30	4,25
0,67	40	3,24
0,83	50	2,45
1,00	60	1,48



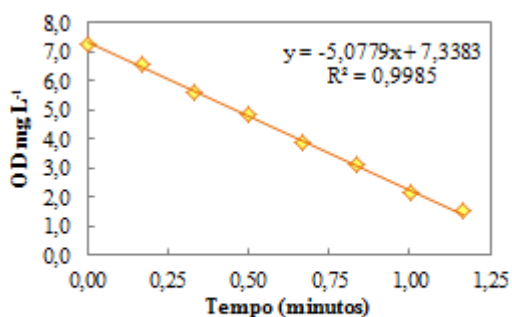
QO ₂ X	X	QO ₂ end	QO ₂
5,597	1,332	0,043	4,160

Concentração N-NH ₃ : 849,05 mg L ⁻¹		
Tempo (min)	Tempo (s)	OD (mg L ⁻¹)
0,00	0	7,25
0,17	10	6,37
0,33	20	5,34
0,50	30	4,41
0,67	40	3,46
0,83	50	2,55
1,00	60	1,62



QO ₂ X	X	QO ₂ end	QO ₂
5,663	1,332	0,043	4,209

Concentração N-NH ₃ : 1244,50 mg L ⁻¹		
Tempo (min)	Tempo (s)	OD (mg L ⁻¹)
0,00	0	7,29
0,17	10	6,59
0,33	20	5,63
0,50	30	4,86
0,67	40	3,85
0,83	50	3,10
1,00	60	2,17
1,17	70	1,52

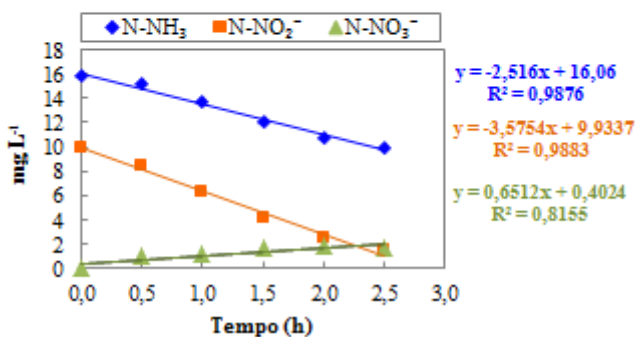


QO ₂ X	X	QO ₂ end	QO ₂
5,078	1,332	0,043	3,770

APÊNDICE B – Ensaios cinéticos de consumo de substrato referentes à atividade específica da biomassa ANAMMOX utilizada como inóculo.

Valores de $rN-NH_3$ expressos em $mgN-NH_3 L^{-1} h^{-1}$;
 Valores de $rN-NO_2^-$ expressos em $mgN-NO_2^- L^{-1} h^{-1}$;
 Valores de $rN-NO_3^-$ expressos em $mgN-NO_3^- L^{-1} h^{-1}$;
 Valores de X expressos em $mgSSV L^{-1}$;
 Valores de $\mu N-NH_3$ expressos em $mgN-NH_3 gSSV^{-1} h^{-1}$;
 Valores de $\mu N-NO_2^-$ expressos em $mg N-NO_2^- gSSV^{-1} h^{-1}$;
 Valores de $\mu N-NO_3^-$ expressos em $mgN-NO_3^- gSSV^{-1} h^{-1}$.

Tempo (h)	N-NH ₃ (mg L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	rN-NH ₃	X	μN-NH ₃			
0.0	15,83	9,94	0,00	2,52	1,72	1,46			
0.5	15,16	8,52	0,95	rN-NO ₂ ⁻	X	μN-NO ₂ ⁻			
1.0	13,69	6,25	1,23				3,58	1,72	2,08
1.5	12,03	4,12	1,63						
2.0	10,82	2,49	1,78	rN-NO ₃ ⁻	X	μN-NO ₃ ⁻			
2.5	9,96	1,47	1,71				0,65	1,72	0,38

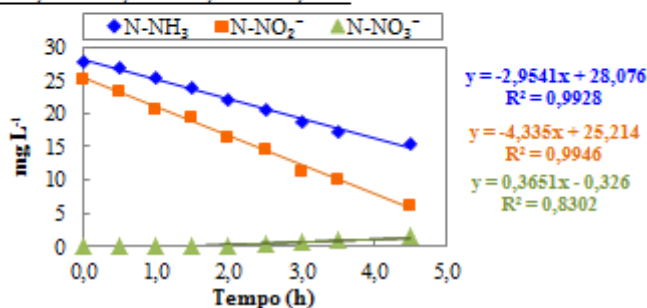


Tempo (h)	N-NH ₃ (mg L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)
0,0	27,74	25,06	0,00
0,5	26,88	23,25	0,00
1,0	25,44	20,62	0,00
1,5	23,90	19,46	0,00
2,0	22,18	16,36	0,00
2,5	20,42	14,57	0,56
3,0	18,88	11,29	0,64
3,5	17,25	10,03	0,97
4,5	15,34	6,09	1,65

rN-NH ₃	X	μN-NH ₃
2,95	1,72	1,72

rN-NO ₂ ⁻	X	μN-NO ₂ ⁻
4,33	1,72	2,52

rN-NO ₃ ⁻	X	μN-NO ₃ ⁻
0,37	1,72	0,21

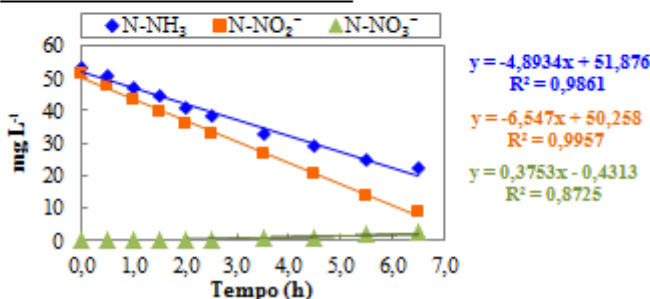


Tempo (h)	N-NH ₃ (mg L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)
0,0	52,99	51,62	0,00
0,5	50,75	48,00	0,00
1,0	47,29	43,50	0,02
1,5	44,59	39,95	0,00
2,0	41,06	36,10	0,00
2,5	38,26	32,93	0,02
3,5	32,96	26,52	0,83
4,5	28,96	20,80	0,95
5,5	25,15	14	1,78
6,5	22,18	9,1167	2,41

rN-NH ₃	X	μN-NH ₃
4,89	1,72	2,85

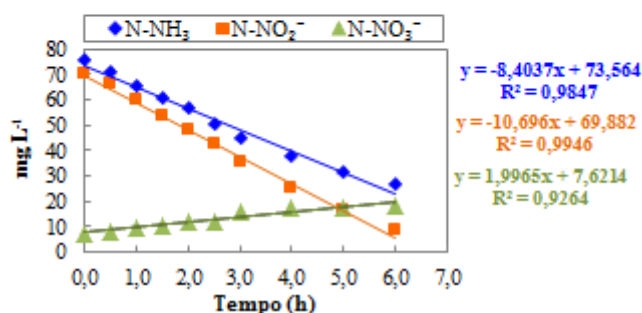
rN-NO ₂ ⁻	X	μN-NO ₂ ⁻
6,55	1,72	3,81

rN-NO ₃ ⁻	X	μN-NO ₃ ⁻
0,38	1,72	0,22



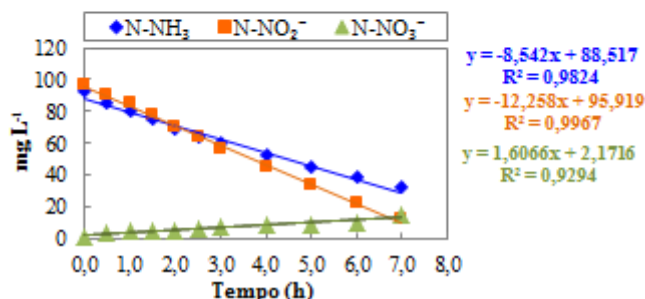
Tempo (h)	N-NH ₃ (mg L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)
0,0	75,61	70,38	7,03
0,5	70,77	65,99	7,61
1,0	65,72	60,13	9,87
1,5	60,56	53,75	10,62
2,0	56,67	48,17	12,07
2,5	50,42	42,40	11,87
3,0	45,39	35,28	15,63
4,0	37,65	25,20	17,18
5,0	31,84	16,27	17,03
6,0	26,72	8,50	18,22

rN-NH ₃	X	μN-NH ₃
8,40	1,72	4,89
rN-NO ₂ ⁻	X	μN-NO ₂ ⁻
10,70	1,72	6,22
rN-NO ₃ ⁻	X	μN-NO ₃ ⁻
2,00	1,72	1,16



Tempo (h)	N-NH ₃ (mg L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)
0,0	93,31	97,40	0,73
0,5	85,27	90,87	3,03
1,0	81,04	85,00	5,33
1,5	75,23	77,47	5,17
2,0	69,28	71,00	5,20
2,5	63,81	64,13	5,97
3,0	59,93	56,47	7,47
4,0	52,26	44,73	8,83
5,0	45,17	34,10	9,13
6,0	38,50	22,73	10,40
7,0	32,27	12,83	14,83

rN-NH ₃	X	μN-NH ₃
8,54	1,72	4,97
rN-NO ₂ ⁻	X	μN-NO ₂ ⁻
12,26	1,72	7,13
rN-NO ₃ ⁻	X	μN-NO ₃ ⁻
1,61	1,72	0,93

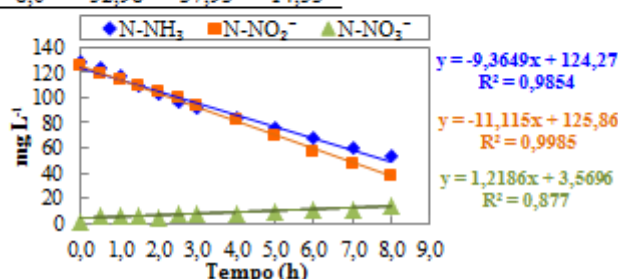


Tempo (h)	N-NH ₃ (mg L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)
0,0	127,85	124,80	1,69
0,5	123,38	119,27	5,20
1,0	117,21	114,67	6,60
1,5	109,59	109,60	6,10
2,0	103,70	104,87	4,93
2,5	96,20	99,47	7,07
3,0	92,11	93,20	7,97
4,0	84,11	82,20	6,80
5,0	76,50	69,13	8,70
6,0	67,95	57,03	11,13
7,0	60,35	47,93	11,47
8,0	52,98	37,93	14,53

rN-NH ₃	X	μN-NH ₃
9,36	1,72	5,45

rN-NO ₂ ⁻	X	μN-NO ₂ ⁻
11,12	1,72	6,47

rN-NO ₃ ⁻	X	μN-NO ₃ ⁻
1,22	1,72	0,71

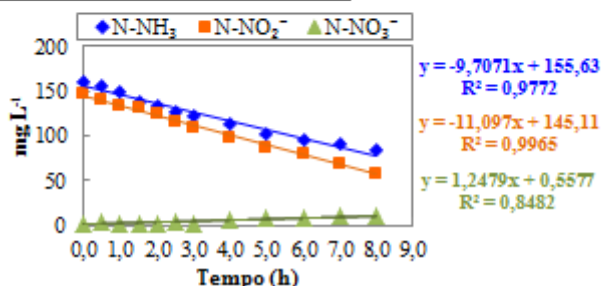


Tempo (h)	N-NH ₃ (mg L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)
0,0	160,23	146,63	1,93
0,5	155,28	139,67	3,53
1,0	149,32	134,27	0,93
1,5	139,15	130,37	0,37
2,0	133,81	123,90	2,43
2,5	127,66	116,40	4,33
3,0	122,76	108,67	1,87
4,0	112,62	98,50	5,33
5,0	103,32	87,30	7,17
6,0	95,91	79,60	9,17
7,0	90,43	68,97	9,97
8,0	83,95	57,57	10,20

rN-NH ₃	X	μN-NH ₃
9,71	1,72	5,65

rN-NO ₂ ⁻	X	μN-NO ₂ ⁻
11,10	1,72	6,46

rN-NO ₃ ⁻	X	μN-NO ₃ ⁻
1,25	1,72	0,73

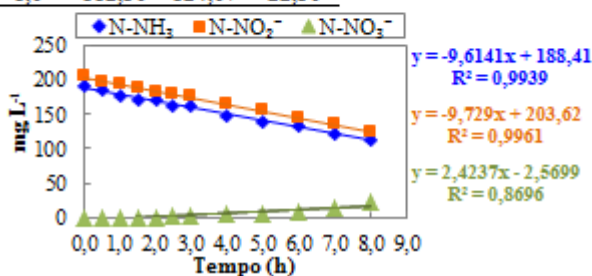


Tempo (h)	N-NH ₃ (mg L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)
0,0	191,94	204,40	0,00
0,5	184,28	195,80	0,33
1,0	177,76	194,47	0,60
1,5	171,60	187,07	1,07
2,0	169,74	183,67	1,11
2,5	161,87	180,33	3,05
3,0	161,73	177,13	3,44
4,0	147,35	166,33	5,47
5,0	138,86	155,47	5,73
6,0	132,16	145,66	9,45
7,0	121,90	135,00	14,77
8,0	112,30	124,07	22,30

rN-NH ₃	X	μN-NH ₃
9,61	1,72	5,59

rN-NO ₂ ⁻	X	μN-NO ₂ ⁻
9,73	1,72	5,66

rN-NO ₃ ⁻	X	μN-NO ₃ ⁻
2,42	1,72	1,41

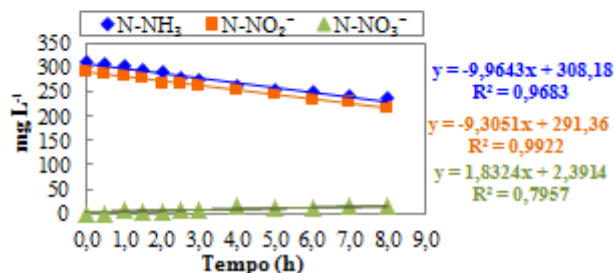


Tempo (h)	N-NH ₃ (mg L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)
0,0	309,76	292,75	1,17
0,5	305,91	288,08	0,58
1,0	303,32	283,50	8,33
1,5	296,10	280,08	4,42
2,0	290,23	267,83	5,00
2,5	276,90	264,92	6,00
3,0	274,37	262,67	7,50
4,0	260,26	254,75	14,92
5,0	253,43	244,92	13,08
6,0	248,79	234,58	10,75
7,0	239,82	227,50	14,91
8,0	235,66	217,92	16,25

rN-NH ₃	X	μN-NH ₃
9,96	1,72	5,80

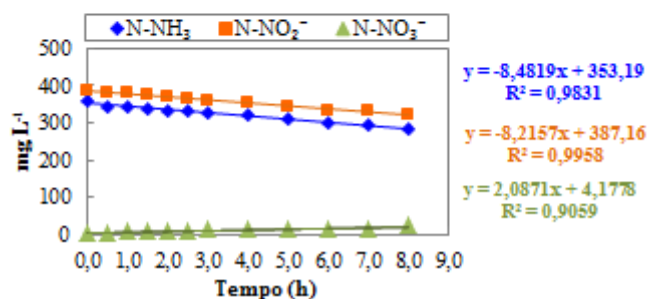
rN-NO ₂ ⁻	X	μN-NO ₂ ⁻
9,31	1,72	5,41

rN-NO ₃ ⁻	X	μN-NO ₃ ⁻
1,83	1,72	1,07



Tempo (h)	N-NH ₃ (mg L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)
0,0	359,94	387,20	2,67
0,5	345,92	382,40	3,73
1,0	346,00	379,33	7,79
1,5	337,89	375,07	8,08
2,0	332,59	371,73	10,12
2,5	332,59	367,20	10,40
3,0	324,80	361,87	11,60
4,0	319,71	354,00	11,87
5,0	313,46	345,47	12,27
6,0	302,51	334,93	15,33
7,0	293,10	332,81	16,80
8,0	286,23	321,15	24,00

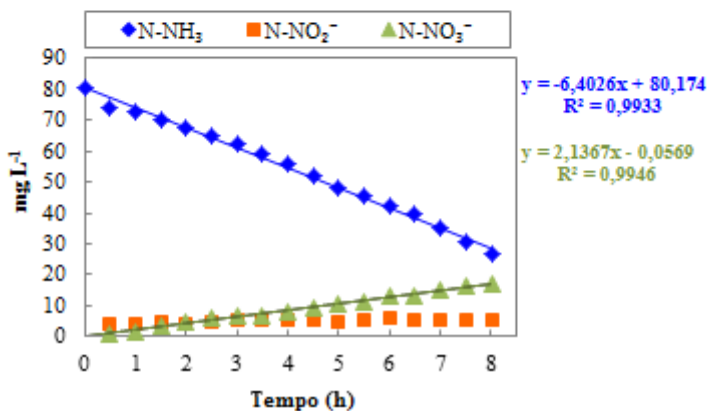
rN-NH ₃	X	μN-NH ₃
8,48	1,72	4,93
rN-NO ₂ ⁻	X	μN-NO ₂ ⁻
8,22	1,72	4,78
rN-NO ₃ ⁻	X	μN-NO ₃ ⁻
2,09	1,72	1,21



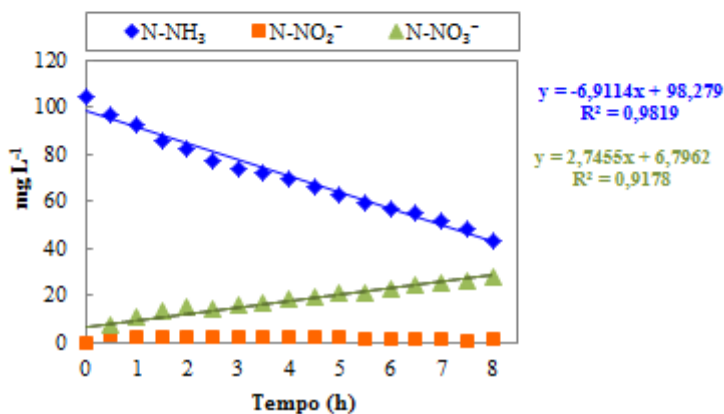
APÊNDICE C – Ensaios cinéticos de consumo de substrato referentes à atividade específica do reator DMX.

Valores de $rN-NH_3$ expressos em $mgN-NH_3 L^{-1} h^{-1}$;
 Valores de $rN-NO_3^-$ expressos em $mgN-NO_3^- L^{-1} h^{-1}$;
 Valores de rNT expressos em $mgNT L^{-1} h^{-1}$;
 Valores de X expressos em $mgSSV L^{-1}$;
 Valores de $\mu N-NH_3$ expressos em $mgN-NH_3 gSSV^{-1} h^{-1}$;
 Valores de $\mu N-NO_3^-$ expressos em $mgN-NO_3^- gSSV^{-1} h^{-1}$;
 Valores de μNT expressos em $mgNT gSSV^{-1} h^{-1}$.

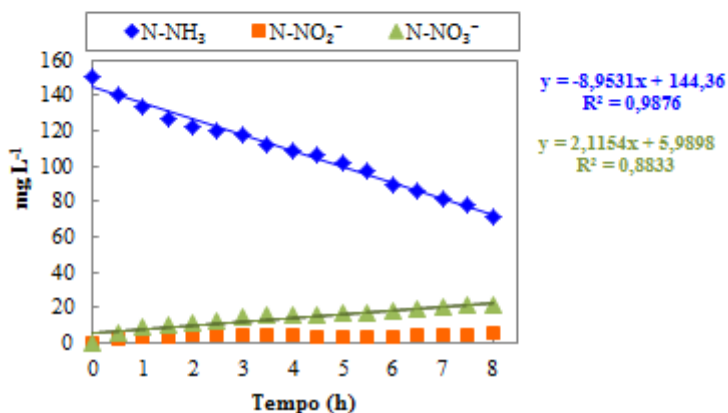
Tempo (h)	N-NH ₃ (mg L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	NT (mg L ⁻¹)	rN-NH ₃	X	μN-NH ₃
0,0	80,63	0,00	0,00	80,62	6,403	2,537	2,524
0,5	74,15	3,95	0,67	78,77	rN-NO ₃ ⁻ 2,137	X 2,537	μN-NO ₃ ⁻ 0,842
1,0	72,40	4,16	1,80	78,36			
1,5	69,85	4,47	3,47	77,79			
2,0	67,65	4,21	4,59	76,45			
2,5	64,75	4,69	6,00	75,44	rNT 3,885	X 2,537	μNT 1,531
3,0	62,47	5,56	6,65	74,68			
3,5	59,32	5,15	7,03	71,50	Relação Alc/N-NH ₃ 5,742		
4,0	56,09	5,28	7,99	69,35			
4,5	52,00	5,37	9,25	66,62			
5,0	48,40	5,07	10,63	64,09			
5,5	45,79	5,49	11,10	62,38			
6,0	42,05	5,90	13,22	61,17			
6,5	39,58	5,73	13,39	58,69			
7,0	35,23	5,62	15,06	55,91			
7,5	30,62	5,58	16,44	52,63			
8,0	26,60	5,37	17,04	49,00			



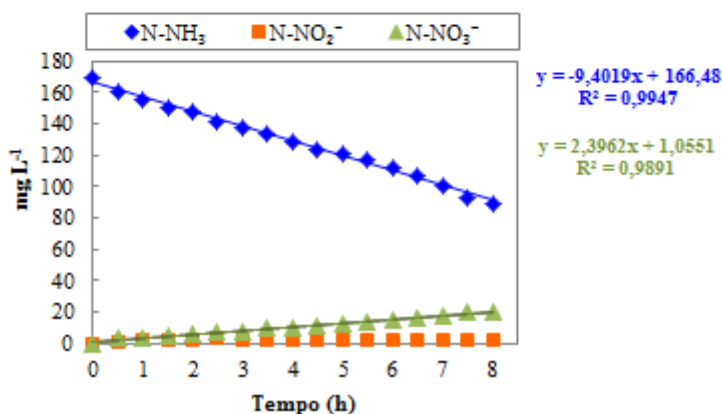
Tempo (h)	N-NH ₃ (mg L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	NT (mg L ⁻¹)	rN-NH ₃	X	μN-NH ₃
0,0	104,36	0,00	0,00	104,36	6,911	2,537	2,724
0,5	97,11	3,11	7,58	107,80			
1,0	92,29	2,80	11,13	106,22	rN-NO ₂ ⁻	X	μN-NO ₂ ⁻
1,5	86,03	2,97	13,47	102,47	2,746	2,537	1,082
2,0	82,10	2,35	14,94	99,40			
2,5	77,74	2,84	14,73	95,30	rNT	X	μNT
3,0	74,19	2,38	15,93	92,49	4,281	2,537	1,687
3,5	72,47	2,41	17,29	92,17			
4,0	69,43	2,50	18,30	90,23	Relação Alc/N-NH₃		
4,5	66,48	2,30	19,23	88,01	5,217		
5,0	63,23	2,24	21,11	86,58			
5,5	59,87	1,87	21,57	83,31			
6,0	57,03	1,84	22,60	81,47			
6,5	55,16	1,53	24,50	81,19			
7,0	51,43	1,35	25,78	78,56			
7,5	48,69	1,13	26,10	75,92			
8,0	43,15	1,45	27,98	72,59			



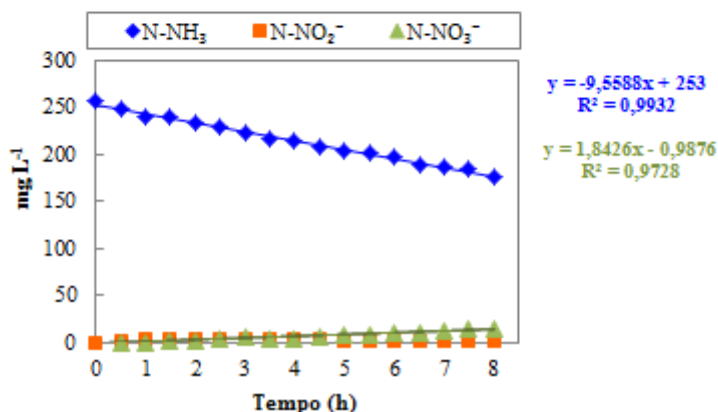
Tempo (h)	N-NH ₃ (mg L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	NT (mg L ⁻¹)	rN-NH ₃	X	μN-NH ₃
0,0	150,51	0,00	0,00	150,52	8,953	2,537	3,529
0,5	140,52	2,62	5,68	148,81	rN-NO ₃ ⁻	X	μN-NO ₃ ⁻
1,0	133,67	3,49	9,45	146,61			
1,5	127,27	3,58	10,68	141,53			
2,0	121,90	4,26	11,77	137,92			
2,5	120,43	4,49	13,03	137,95			
3,0	118,21	5,07	14,20	137,48	rNT	X	μNT
3,5	112,02	4,65	15,54	132,21	6,544	2,537	2,579
4,0	108,63	4,17	15,62	128,42	Relação Alc/N-NH₃		
4,5	106,16	3,11	15,82	125,08	4,726		
5,0	101,77	3,12	16,80	121,69			
5,5	97,93	3,16	16,78	117,87			
6,0	89,65	3,82	18,06	111,52			
6,5	85,64	4,20	19,12	108,96			
7,0	81,44	4,72	20,11	106,27			
7,5	78,67	4,96	21,04	104,67			
8,0	70,92	5,54	21,99	98,45			



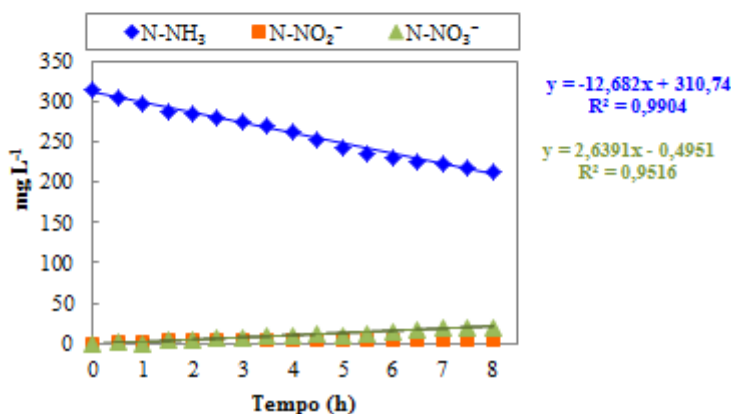
Tempo (h)	N-NH ₃ (mg L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	NT (mg L ⁻¹)	rN-NH ₃	X	μN-NH ₃
0,0	170,07	0,00	0,00	170,08	9,402	2,537	3,706
0,5	161,04	1,71	3,55	166,30	rN-NO ₃ ⁻	X	μN-NO ₃ ⁻
1,0	155,45	2,33	3,42	161,20			
1,5	150,04	2,47	5,53	158,04			
2,0	147,87	3,05	5,83	156,75			
2,5	141,45	3,38	7,25	152,08			
3,0	137,61	3,07	7,91	148,59	rNT	X	μNT
3,5	133,88	2,27	9,69	145,83	6,943	2,537	2,737
4,0	128,72	2,16	10,07	140,95	Relação Alc/N-NH₃		
4,5	123,27	2,00	11,28	136,55	4,025		
5,0	121,31	2,44	12,24	135,99			
5,5	116,67	2,52	14,30	133,49			
6,0	112,62	2,47	14,98	130,06			
6,5	106,59	2,26	16,46	125,31			
7,0	100,69	2,47	17,72	120,88			
7,5	93,62	2,18	20,04	115,84			
8,0	89,86	2,03	20,62	112,51			



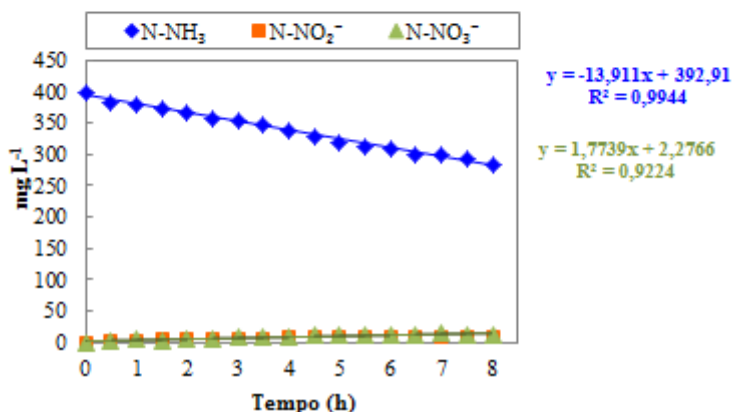
Tempo (h)	N-NH ₃ (mg L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	NT (mg L ⁻¹)	rN-NH ₃	X	μN-NH ₃
0,0	257,89	0,00	0,00	257,89	9,559	2,537	3,768
0,5	248,66	2,23	0,78	251,67	rN-NO ₃ ⁻	X	μN-NO ₃ ⁻
1,0	240,64	3,23	0,50	244,37	1,843	2,537	0,726
1,5	239,22	3,61	1,60	244,43	rNT	X	μNT
2,0	233,26	4,04	2,10	239,40	7,711	2,537	3,039
2,5	228,97	4,39	3,58	236,95	Relação Alc/N-NH₃		
3,0	223,80	4,21	5,72	233,73	3,454		
3,5	216,11	3,73	5,09	224,92			
4,0	214,72	3,57	4,93	223,22			
4,5	208,50	3,20	6,44	218,14			
5,0	203,17	3,16	7,90	214,23			
5,5	201,88	3,07	8,05	212,99			
6,0	197,45	2,90	9,95	210,31			
6,5	190,08	2,89	11,39	204,35			
7,0	186,60	2,59	12,63	201,82			
7,5	183,89	2,49	13,83	200,21			
8,0	176,23	2,23	14,04	192,49			



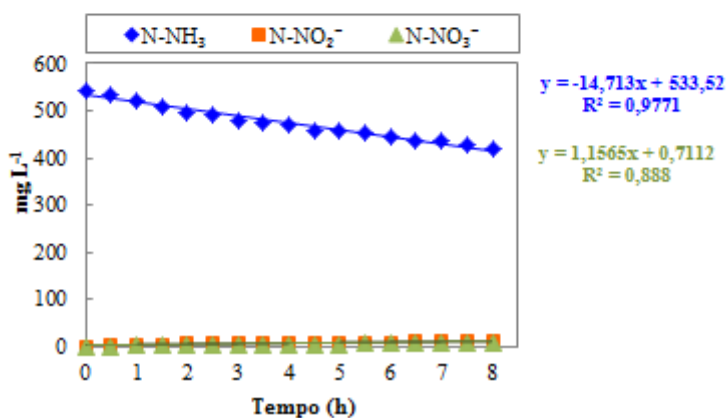
Tempo (h)	N-NH ₃ (mg L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	NT (mg L ⁻¹)	rN-NH ₃	X	μN-NH ₃
0,0	314,29	0,00	0,01	314,30	12,682	2,537	4,999
0,5	305,47	1,95	2,40	309,82	rN-NO ₃ ⁻	X	μN-NO ₃ ⁻
1,0	296,90	3,14	0,40	300,44	2,639	2,537	1,040
1,5	287,40	4,09	3,93	295,41	rNT	X	μNT
2,0	283,91	4,64	4,08	292,62	9,637	2,537	3,799
2,5	280,47	4,72	7,79	292,98	Relação Alc/N-NH ₃		
3,0	274,82	4,94	6,38	286,14	3,283		
3,5	270,39	5,01	9,43	284,84			
4,0	261,74	5,41	9,26	276,41			
4,5	253,36	5,65	11,50	270,51			
5,0	242,28	5,80	9,24	257,33			
5,5	235,48	5,34	13,23	254,05			
6,0	231,68	5,02	15,38	252,08			
6,5	226,09	5,18	18,49	249,76			
7,0	224,26	5,17	20,18	249,61			
7,5	218,86	4,85	20,37	244,07			
8,0	212,72	4,90	18,98	236,60			



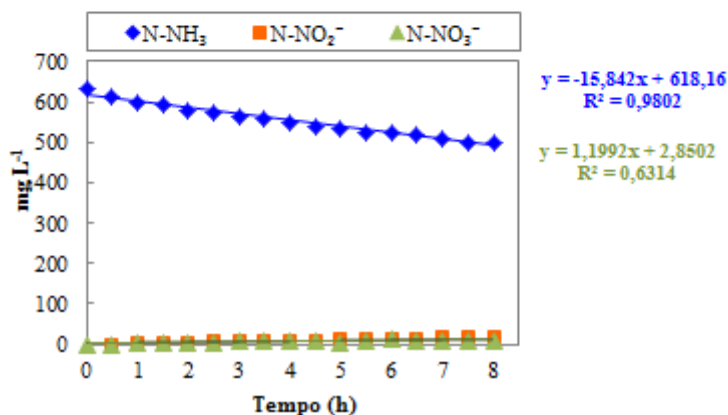
Tempo (h)	N-NH ₃ (mg L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	NT (mg L ⁻¹)	rN-NH ₃	X	μN-NH ₃
0,0	397,20	0,00	0,00	397,20	13,911	2,537	5,483
0,5	383,88	2,46	2,53	388,87	rN-NO ₂ ⁻	X	μN-NO ₂ ⁻
1,0	378,36	4,36	5,68	388,40	1,774	2,537	0,699
1,5	371,87	5,11	3,32	380,30	rNT	X	μNT
2,0	366,38	5,91	5,53	377,81	11,017	2,537	4,343
2,5	355,97	6,72	7,12	369,81	Relação Alc/N-NH₃		
3,0	352,56	7,59	8,25	368,40	2,818		
3,5	347,35	7,71	10,19	365,24			
4,0	336,72	8,38	9,75	354,85			
4,5	329,01	8,76	11,73	349,50			
5,0	320,12	9,31	12,11	341,55			
5,5	311,42	10,12	11,88	333,42			
6,0	307,90	10,61	13,85	332,36			
6,5	300,67	10,84	13,47	324,98			
7,0	298,44	10,21	15,68	324,32			
7,5	292,50	9,53	13,96	315,99			
8,0	283,21	10,22	14,29	307,72			



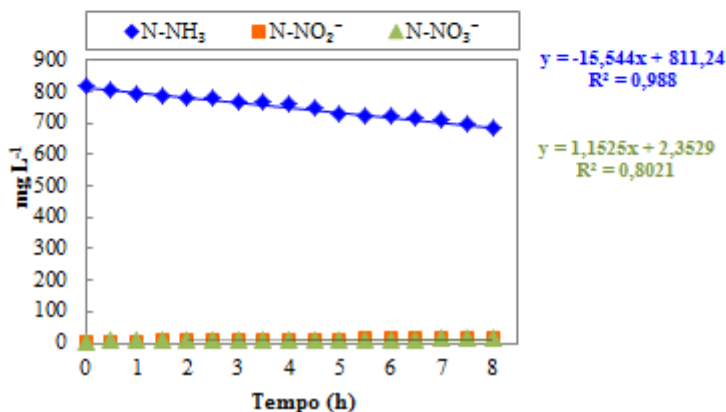
Tempo (h)	N-NH ₃ (mg L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	NT (mg L ⁻¹)	rN-NH ₃	X	μN-NH ₃
0,0	545,19	0,00	0,00	545,19	14,713	2,537	5,799
0,5	534,30	2,85	1,10	538,25	rN-NO ₃ ⁻	X	μN-NO ₃ ⁻
1,0	521,69	4,07	4,22	529,97	1,156	2,537	0,456
1,5	508,86	5,86	2,35	517,07	rNT	X	μNT
2,0	498,42	6,78	3,43	508,63	12,174	2,537	4,799
2,5	492,14	7,04	4,38	503,56	Relação Alc/N-NH ₃		
3,0	480,16	7,49	4,20	491,84	2,366		
3,5	476,16	7,58	3,71	487,44			
4,0	472,24	7,14	4,99	484,37			
4,5	460,63	7,48	4,30	472,41			
5,0	458,72	8,52	4,33	471,57			
5,5	454,18	9,52	7,23	470,93			
6,0	444,18	10,41	7,90	462,49			
6,5	438,63	11,08	8,64	458,35			
7,0	436,72	12,49	9,57	458,77			
7,5	427,31	12,84	10,40	450,54			
8,0	419,91	13,94	10,00	443,84			



Tempo (h)	N-NH ₃ (mg L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	NT (mg L ⁻¹)	rN-NH ₃	X	μN-NH ₃
0,0	632,71	0,00	0,00	632,71	15,842	2,537	6,244
0,5	615,88	2,19	0,22	618,28	rN-NO ₃ ⁻	X	μN-NO ₃ ⁻
1,0	602,30	4,00	3,42	609,72	1,199	2,537	0,473
1,5	592,74	5,60	4,76	603,10	rNT	X	μNT
2,0	581,68	6,54	5,58	593,80	12,182	2,537	4,802
2,5	574,07	7,56	6,77	588,40	Relação Alc/N-NH ₃		
3,0	564,45	8,70	8,89	582,04	3,245		
3,5	559,77	9,60	11,17	580,55			
4,0	549,80	11,03	11,66	572,48			
4,5	541,63	11,92	8,60	562,15			
5,0	533,98	12,94	6,57	553,48			
5,5	527,81	14,08	9,45	551,34			
6,0	523,81	15,68	12,42	551,91			
6,5	518,43	16,61	11,52	546,56			
7,0	510,29	18,48	8,78	537,55			
7,5	503,09	19,82	9,40	532,31			
8,0	499,06	21,21	10,77	531,04			



Tempo (h)	N-NH ₃ (mg L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	NT (mg L ⁻¹)	rN-NH ₃	X	μN-NH ₃
0,0	814,00	0,00	0,01	814,01	15,544	2,537	6,127
0,5	804,25	1,67	5,56	811,48	rN-NO ₃ ⁻	X	μN-NO ₃ ⁻
1,0	790,57	2,58	3,95	797,10	1,152	2,537	0,454
1,5	785,57	4,16	4,30	794,02	rNT	X	μNT
2,0	774,56	4,91	5,13	784,60	12,528	2,537	4,938
2,5	774,56	6,15	5,26	785,97	Relação Alc/N-NH ₃		
3,0	763,88	7,01	6,47	777,36	2,878		
3,5	762,97	8,07	5,29	776,33			
4,0	756,33	8,53	7,03	771,89			
4,5	744,15	9,34	8,25	761,74			
5,0	727,60	9,57	6,65	743,83			
5,5	720,60	10,84	8,02	739,46			
6,0	719,90	12,14	9,00	741,04			
6,5	713,87	13,06	8,55	735,48			
7,0	705,87	14,33	9,96	730,16			
7,5	694,35	14,68	9,84	718,87			
8,0	681,12	15,58	15,10	711,80			



Tempo (h)	N-NH ₃ (mg L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	NT (mg L ⁻¹)	rN-NH ₃	X	μN-NH ₃
0,0	1060,68	0,00	0,00	1060,68	15,571	2,537	6,138
0,5	1055,26	2,00	2,93	1060,19	rN-NO ₃ ⁻	X	μN-NO ₃ ⁻
1,0	1045,16	3,21	3,84	1052,21	1,265	2,537	0,499
1,5	1024,51	4,36	3,31	1032,18	rNT	X	μNT
2,0	1019,51	4,41	4,96	1028,88	12,820	2,537	5,053
2,5	999,93	5,33	5,42	1010,68	Relação Alc/N-NH₃		
3,0	998,22	5,93	6,53	1010,68	3,623		
3,5	984,99	6,58	6,36	997,93			
4,0	985,23	7,38	8,98	1001,59			
4,5	984,20	8,24	7,69	1000,13			
5,0	968,11	9,30	8,66	986,07			
5,5	971,11	9,41	9,75	990,27			
6,0	963,35	10,37	9,25	982,97			
6,5	960,28	10,65	10,43	981,36			
7,0	949,58	12,19	9,87	971,64			
7,5	935,96	12,07	11,58	959,61			
8,0	926,34	12,87	11,25	950,46			

