



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO TECNOLÓGICO

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E  
ENGENHARIA DE ALIMENTOS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA  
QUÍMICA

**Eliminação Autotrófica de Nitrogênio via  
Integração dos Ciclos do Nitrogênio e Enxofre em  
Reator SBR**

**Fabício Butierres Santana**

**Florianópolis (SC), março de 2006**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

# **Eliminação Autotrófica de Nitrogênio via Integração dos Ciclos do Nitrogênio e Enxofre em Reator SBR**

**Fabício Butierres Santana**

Texto submetido ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal de Santa Catarina, para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia Química.

**ORIENTADOR: Prof. Hugo Moreira Soares, Ph.D.**

**CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Willibaldo Schmidell Netto**

**Florianópolis (SC), março de 2006**

## RESUMO

O tratamento de águas residuárias contendo compostos nitrogenados e sulforosos é, particularmente, difícil de ser realizado. Muitas vezes, os limites imposto pela legislação ambiental não são atingidos e resíduos, com qualidade inferior aos padrões necessários, são dispostos no meio ambiente. Para reverter este cenário, é necessário o desenvolvimento de tecnologias que busquem aproveitar as interações entre os ciclos do nitrogênio e do enxofre, minimizando os custos do tratamento. Neste sentido, este trabalho foi concebido de forma a promover a eliminação biológica do nitrogênio via a integração dos ciclos do nitrogênio e do enxofre, pela ação das bactérias oxidadoras de amônio e das desnitrificantes autotróficas, como *Thiobacillus denitrificans*, sob aeração intermitente. Para isto, foram realizados experimentos com uma cultura pura de *T. denitrificans* e com uma cultura mista de bactérias oxidadoras de amônio e de enxofre. Os experimentos com a cultura pura foram realizados para verificar a influência de suplementos alimentares (Extrato de Levedura e Glicose) na cinética de desnitrificação autotrófica e, após, a influência da relação tiosulfato / nitrato sobre o balanço de enxofre. Observou-se que, neste conjunto de resultados, a presença do extrato de levedura possibilitou um aumento de 9 vezes na cinética de desnitrificação, sem alterar o metabolismo de oxidação de tiosulfato, doador de elétrons. Já, a presença de glicose inibiu a oxidação do tiosulfato, além de não se obter valores tão significativos de velocidade de crescimento. Nos experimentos realizados em diferentes relações  $S_2O_3 / NO_3$  observou-se que, quando o sistema está sob limitação de acceptor de elétrons, ocorre a oxidação parcial do tiosulfato com concomitante acúmulo de intermediários. Nos experimentos com cultura mista, realizados em um reator tipo SBR e alimentado com tiosulfato e amônio, observou-se a eliminação de nitrogênio pelo processo de desnitrificação autotrófica, ocorrendo concomitantemente com o processo de nitrificação parcial, formação do nitrito, se atingido eficiências de remoção acima de 70%. A flexibilidade de *T. denitrificans* em mudar o seu acceptor final de elétrons (nitrito para o oxigênio) possibilitou a formação do sulfato em todas as condições ensaiadas. A presença deste microrganismo, na biomassa do reator, foi confirmada pelo uso da técnica de biologia molecular FISH. Com estes resultados, a aplicação da fisiologia de *T. denitrificans* foi ampliada, obteve-se a eliminação biológica do nitrogênio, concomitantemente com a integração dos ciclos do nitrogênio e enxofre, em um único reator.

## ABSTRACT

The treatment of wastewater containing nitrogen and sulfur compounds is particularly difficult to be performed. Often, environmental standard limits are not reached and low quality wastes are disposed in the environment. To reverse this scenario, it is necessary to develop new technologies aiming at the interaction between the nitrogen and sulfur cycles, minimizing treatment costs. In this way, this work was idealized to promote biological nitrogen elimination via nitrogen and sulfur cycles integration, by ammonium oxidizer bacteria and autotrophic denitrifying bacteria, such as *T. denitrificans*, submitted to intermittent aeration. To reach this goal, experiments were performed with *T. denitrificans* pure culture and a mixed culture of ammonium and sulfur oxidizing bacteria. The pure culture experiments were performed to verify the influence of feeding supplementation (yeast extract and glucose) on the autotrophic denitrification kinetics and the influence of thiosulfate / nitrate rate on the sulfur mass balance. The presence of yeast extract led to an improvement of 9 times on the denitrification kinetics, without changing the thiosulfate oxidation metabolism (electron donor). In the other hand, the presence of glucose inhibited thiosulfate metabolism and did not allow reaching significant growth velocities. The experiments varying different  $S_2O_3 / NO_3$  rates have shown that when the system is limited on electron acceptor the thiosulfate partial oxidation occurs with intermediate compounds accumulation. In the experiments with mixed culture using in the SBR reactor fed with thiosulfate and ammonium, it was observed nitrogen elimination by the autotrophic denitrification and partial nitrification processes occurring at the same time, reaching nitrogen removal efficiencies above 70%. The flexibility of *T. denitrificans* in changing its final electron acceptor (from nitrite to oxygen) allowed sulfate formation in all tested conditions. The presence of this microorganism inside the reactor was confirmed by FISH technique. With these results, the application of *T. denitrificans* physiology was extended, obtaining biological nitrogen elimination coupled with the integration of nitrogen and sulfur cycles in the same reactor.

## SUMÁRIO

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
II. 1 CICLO DO NITROGÊNIO.....	5
II.1.1. <i>Bioquímica e microbiologia</i> .....	6
II.2. CICLO DO ENXOFRE.....	14
II.2.1. <i>Microbiologia e Bioquímica</i> .....	16
II.2.2.1. Processos de Tratamento.....	22
CAPÍTULO III – OBJETIVOS.....	25
CAPÍTULO IV – MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
IV.1. ESTRATÉGIA DE AÇÃO.....	26
IV.2. ENSAIOS COM A CULTURA PURA DE T. DENITRIFICANS.....	27
IV.2.1. <i>Microorganismo e Meio de cultura</i> .....	27
IV.2.2. <i>Planejamento Experimental</i> .....	29
IV.3. ENSAIOS COM A CULTURA MISTA – OPERAÇÃO DO REATOR SBR.....	33
IV.3.1. <i>Microorganismos e Meio de cultura</i> .....	33
IV.3.2. <i>Sistema Experimental</i> .....	34
IV.3.3. <i>Planejamento Experimental</i> .....	37
IV.3.4. <i>Determinações analíticas</i> .....	38
IV.3.4.1. Determinação de amônia.....	38
IV.3.4.2. Determinação de nitrito.....	38
IV.3.4.3. Determinação de nitrato.....	38
IV.3.4.4. Determinação de sulfato.....	39
IV.3.4.6. Determinação de tiosulfato.....	39
IV.3.4.7. Determinação de Sólidos Suspensos Totais - SST.....	39
IV.3.5. <i>Respirometria</i> .....	39
IV.3.6. <i>Atividade desnitrificante</i> .....	45
IV.3.7. <i>Acompanhamento do ciclo de alimentação durante 24 horas</i> .....	45
IV.3.8. <i>Hibridização in-situ por fluorescência - FISH</i> .....	46
CAPÍTULO V - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49

V. 1. INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES AMBIENTAIS NO CRESCIMENTO DO <i>T. DENITRIFICANS</i> .....	49
V.1.1. <i>Influência de compostos orgânicos</i> .....	49
V.1.2. <i>Balço de enxofre durante a desnitrificação autotrófica</i> .....	55
V.2. ESTABELECIMENTO DO PROCESSO DE DESNITRIFICAÇÃO AUTOTRÓFICA VIA A INTEGRAÇÃO DOS CICLOS DO NITROGÊNIO E DO ENXOFRE.....	61
V.2.1. <i>Performance do reator SBR</i> .....	61
V. 2.2. <i>Acompanhamento do ciclo de alimentação em 24 horas</i> .....	82
V. 2.3. <i>Atividade desnitrificante autotrófica</i> .....	93
V.2.4. <i>Atividade Nitrificante</i> .....	96
V.2.5. <i>Hibridização in-situ por fluorescência - FISH</i> .....	100
VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	106
VII – CONCLUSÕES.....	112
VIII. SUGESTÕES.....	114
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
X. ANEXOS.....	125

Excluído: 114

Excluído: 124

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA II. 1: REPRESENTAÇÃO DA INTEGRAÇÃO DOS CICLOS DE CARBONO, NITROGÊNIO E ENXOFRE. ....	4
FIGURA II. 2: CICLO DO NITROGÊNIO. (BROCK E MADIGAN, 1991).....	5
FIGURA II. 3: REPRESENTAÇÃO DO METABOLISMO AERÓBIO E ANÓXICO DAS BACTÉRIAS OXIDADORAS DE AMÔNIO (FIGURA ADAPTADA DE SCHMIDT ET. AL., 2004). ....	8
FIGURA II. 4: PROCESSO DE OXIDAÇÃO ANAERÓBIA DO AMÔNIO (JETTEN ET. AL., 1997).....	11
FIGURA II. 5: ESQUEMA SIMPLIFICADO DE NITRIFICAÇÃO E DESNITRIFICAÇÃO (SCHMIDELL E REGINATTO, 2005).....	12
FIGURA II. 6: CICLO BIOQUÍMICO DO ENXOFRE (ETCHEBEHERE, 2005). ....	16
FIGURA II. 7: FORMAÇÃO DO ENXOFRE ELEMENTAR NA MEMBRANA CELULAR (FIGURA ADAPTADA DE BRÜSE ET. AL., 2000).....	20
FIGURA II. 8: ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE NITRATO REDUTASE E NITRITO REDUTASE EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE OXIGÊNIO. (DADOS EXPERIMENTAIS DE: JUSTIN E KELLY, 1978). ....	21
FIGURA IV. 1: SISTEMA EXPERIMENTAL UTILIZADO PARA O ESTABELECIMENTO DO PROCESSO DE NITRIFICAÇÃO AUTOTRÓFICA E NITRIFICAÇÃO PARCIAL.....	35
FIGURA IV. 2: VARIAÇÃO DO VALOR DO $K_LA$ EM RELAÇÃO AO VOLUME DO REATOR SBR. ....	37
FIGURA IV. 3: CURVA TÍPICA OBTIDA NO EXPERIMENTO DE RESPIROMETRIA – TÉCNICA 1. ....	41
FIGURA V. 1: INFLUÊNCIA DA FONTE DE CARBONO NO CRESCIMENTO DO <i>T. DENITRIFICANS</i> . ....	50
FIGURA V. 2: CINÉTICA DO CONSUMO DE NITRATO E PRODUÇÃO DE SULFATO: A) COM MEIO AUTOTRÓFICO (CP 01); B) COM MEIO CONTENDO EXTRATO DE LEVEDURA (CP 02); C) COM MEIO CONTENDO GLICOSE (CP 03). ....	51
FIGURA V. 3: QUANTIDADES DE NITRATO CONSUMIDO E DE SULFATO PRODUZIDO DURANTE OS EXPERIMENTOS (CP 01, CP 02, CP 03) QUE CONTINHAM DIFERENTES FONTES DE CARBONO NA MESMA CONCENTRAÇÃO DE DQO. ....	51
FIGURA V. 4: INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE DQO NA VELOCIDADE MÉDIA DE CRESCIMENTO DO <i>T. DENITRIFICANS</i> (MÉDIA NAS PRIMEIRAS 24 HORAS).....	52
FIGURA V. 5: PERCENTUAL DE REDUÇÃO DO NITRATO PELO METABOLISMO QUIMIOAUTOTRÓFICO (OXIDAÇÃO DO TIOSSULFATO) E HETEROTRÓFICO, QUANDO DA ADIÇÃO DE GLICOSE, PELO <i>T. DENITRIFICANS</i> .....	55
FIGURA V. 6: INFLUÊNCIA DA RELAÇÃO DOADOR/ACCEPTOR FINAL DE ELÉTRONS SOBRE A PRODUÇÃO DE ENXOFRE ELEMENTAR.....	58
FIGURA V. 7: INFLUÊNCIA DOS NÍVEIS DA CONCENTRAÇÃO DE TIOSSULFATO E EXTRATO DE LEVEDURA NA FISIOLOGIA DO <i>T. DENITRIFICANS</i> . ....	59

Excluído: 36

FIGURA V. 8: EFEITO DO AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE TIOSSULFATO E EXTRATO DE LEVEDURA NA QUANTIDADE DE TIOSSULFATO OXIDADO .....	60
FIGURA V. 9: CONCENTRAÇÕES DE NITROGÊNIO AMONÍACAL ( $N-NH_4$ ) E CONCENTRAÇÃO DE AMÔNIO NO MEIO DE ALIMENTAÇÃO; $N-NH_4$ S = CONCENTRAÇÃO DE AMÔNIO NO EFLUENTE) DURANTE A OPERAÇÃO DO REATOR SBR .....	62
FIGURA V. 10: CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO NA FORMA DE NITRITO E NITRATO DURANTE A OPERAÇÃO DO REATOR SBR .....	63
FIGURA V. 11: REMOÇÃO DE NITROGÊNIO DURANTE A OPERAÇÃO DO REATOR SBR .....	64
FIGURA V. 12: CONCENTRAÇÃO DE SULFATO DURANTE A OPERAÇÃO DO REATOR SBR NAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS I, II, III-1, III-2, IV. ....	65
FIGURA V. 13: CONCENTRAÇÃO DE SÓLIDOS SUSPENSOS TOTAIS DURANTE A OPERAÇÃO DO REATOR SBR. ....	66
FIGURA V. 14: RELAÇÃO ENTRE NITROGÊNIO REMOVIDO E SULFATO PRODUZIDO NAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS II, III-1, III-2, IV. ....	73
FIGURA V. 15: RELAÇÃO ENTRE SULFATO PRODUZIDO PELO PROCESSO ANÓXICO E A QUANTIDADE DE NITROGÊNIO REMOVIDO EM DIFERENTES VALORES DO METABOLISMO AERÓBIO ( $F$ ) .....	77
FIGURA V. 16: CONSUMO DE OXIGÊNIO PELAS BACTÉRIAS OXIDADORAS DE ENXOFRE DURANTE AS DIFERENTES CONDIÇÕES AMBIENTAIS. A) CONDIÇÃO I; B) CONDIÇÃO II; C) CONDIÇÃO III-2; D) CONDIÇÃO IV. ....	78
FIGURA V. 17: INFLUÊNCIA DO TEMPO DE AERAÇÃO NA ATIVIDADE DAS BACTÉRIAS OXIDADORAS DE ENXOFRE, NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DE SUBSTRATO (TIOSSULFATO) .....	81
FIGURA V. 18: VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS FORMAS NITROGENADAS E DO SULFATO DURANTE AS CONDIÇÕES OPERACIONAS: A) CONDIÇÃO I (DIA 60 <sup>0</sup> ); B) CONDIÇÃO II (DIA 180 <sup>0</sup> ); C) CONDIÇÃO III-2 (DIA 340 <sup>0</sup> ); D) CONDIÇÃO IV (DIA 370 <sup>0</sup> ) .....	83
FIGURA V. 19: VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE OXIGÊNIO DURANTE UM CICLO DE 24 HORAS DE OPERAÇÃO NAS DIFERENTES CONDIÇÕES APLICADAS AO REATOR SBR. A) CONDIÇÃO II (DIA 180 <sup>0</sup> ); B) CONDIÇÃO III-1 (DIA 290 <sup>0</sup> ); C) CONDIÇÃO III-2 (DIA 340 <sup>0</sup> ); D) CONDIÇÃO IV (DIA 370 <sup>0</sup> ) .....	84
FIGURA V. 20: MEDIDA DA VELOCIDADE DE RESPIRAÇÃO DURANTE UM CICLO DE 24 HORAS DE OPERAÇÃO NAS DIFERENTES CONDIÇÕES APLICADAS AO REATOR SBR. A) CONDIÇÃO I; B) CONDIÇÃO II; C) CONDIÇÃO III; D) CONDIÇÃO IV; E) CONDIÇÃO V .....	85
FIGURA V. 21: TRANSFORMAÇÕES DO NITROGÊNIO AMONÍACAL POSSÍVEIS DE TEREM OCORRIDO NO REATOR SBR. ....	86
FIGURA V. 22: INFLUÊNCIA DA RELAÇÃO $NH_4/O_2$ NAS FORMAS DE NITRIGÊNIO PRODUZIDAS NO REATOR SBR: A) $N-NH_4$ ; B) $N-NO_2$ ; C) $N-NO_3$ ; D) $N-N_2$ (?); E. $S-S_2O_3$ ( ) .....	92



FIGURA V. 23: CONCENTRAÇÕES DE NITRATO E SULFATO DURANTE O ENSAIO DE ATIVIDADE DESNITRIFICANTE AUTOTRÓFICA NAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO DO REATOR. A) CONDIÇÃO I; B) CONDIÇÃO II; C) CONDIÇÃO III-2; D) CONDIÇÃO IV .....	94
FIGURA V. 24: CONCENTRAÇÕES DE NITRITO E SULFATO DURANTE O ENSAIO DE ATIVIDADE DESNITRIFICANTE AUTOTRÓFICA NAS CONDIÇÕES DIFERENTES CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO DO REATOR. A) CONDIÇÃO I; B) CONDIÇÃO II; C) CONDIÇÃO III-2; D) CONDIÇÃO IV.....	95
FIGURA V. 25: VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE OXIGÊNIO AO LONGO DO TEMPO DURANTE O ENSAIO DE RESPIROMETRIA PARA A BIOMASSA NITRIFICANTE: A) PARA A CONCENTRAÇÃO DE $N\_NH_4$ DE 5MG/L; B) PARA A CONCENTRAÇÃO DE $N\_NH_4$ DE 20MG/L.....	97
FIGURA V. 26: VARIAÇÃO DA VELOCIDADE DE RESPIRAÇÃO DAS BACTÉRIAS NITRIFICANTES EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NITROGÊNIO AMONIACAL – CONDIÇÃO I.....	98
FIGURA V. 27: VARIAÇÃO DA VELOCIDADE DE RESPIRAÇÃO DAS BOA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NITROGÊNIO AMONIACAL – CONDIÇÃO IV.....	99
FIGURA V. 28: FOTO ILUSTRATIVA DO LODO DA CONDIÇÃO III-2, HIBRIDIZADO COM: A) DAPI; B) SONDA EUBMIX. AUMENTO DE 1000X. ....	101
FIGURA V. 29: PORCENTAGEM DE BIOMASSA ATIVA E DO TOTAL DE BACTÉRIAS OXIDADORAS DE AMÔNIO (BOA), DE NITRITO (BON) E DE <i>T. DENITRIFICANS</i> , DURANTE AS VARIAS CONDIÇÕES OPERACIONAIS. .....	102
FIGURA V. 30: FOTO ILUSTRATIVA DO LODO DA CONDIÇÃO III-2, HIBRIDIZADO COM: A) DAPI; B) SONDA NEU. AUMENTO DE 1000X.....	103
FIGURA V. 31: PORCENTAGEM DE BACTÉRIAS ATIVAS HIBRIDIZADAS COM AS SONDAS PARA BETA- PROTEOBACTÉRIAS OXIDADORAS DE AMÔNIO, PARA <i>NITROSOMONAS</i> E <i>NITROSOCOCCUS MOBILISE</i> PARA <i>NITROSOCOCCUS MOBILIS</i> . ....	103
FIGURA V. 32: FOTO ILUSTRATIVA DO LODO DA CONDIÇÃO III-2, HIBRIDIZADO COM: A) DAPI; B) SONDA THIO51. AUMENTO DE 1000X.....	104

## LISTA DE TABELAS

TABELA II. 1: CARGA VOLUMÉTRICA E REMOÇÃO DE NITROGÊNIO ATINGIDA PELOS NOVOS PROCESSOS BIOLÓGICOS DE REMOÇÃO DE NITROGÊNIO HETEROTRÓFICOS E AUTOTRÓFICOS.....	13
TABELA II. 2: ESTADOS DE OXIDAÇÃO DOS COMPOSTOS DE ENXOFRE (PAUL E CLARK, 1989).....	15
TABELA II. 3: ESTEQUIOMETRIA E A ENERGIA LIVRE DE GIBBS DA DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DO PROPIONATO, ACETATO, METANOL E HIDROGÊNIO MOLECULAR PELAS BRS (FONTE: VALLERO, 2003) ( $DG^0$ A 37°C EM KJ/REACTION).....	17
TABELA II. 4: REAÇÕES CATABÓLICAS ENVOLVIDAS NA INTEGRAÇÃO DOS CICLOS DO NITROGÊNIO E DO ENXOFRE.....	22
TABELA II. 5: PROCESSOS ENVOLVENDO O <i>T. DENITRIFICANS</i> APLICADO AO TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS. FONTE: ADAPTADO DE LENS E HULSHOFF, 2000.....	23
TABELA IV. 1: MEIO DE CULTURA INDICADO PELA ATCC.....	28
TABELA IV. 2: COMPOSIÇÃO DOS MEIOS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS.....	29
TABELA IV. 3: NÍVEIS DAS CONCENTRAÇÕES DE TIOSSULFATO E EXTRATO DE LEVEDURA.....	31
TABELA IV. 4: CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DOS ENSAIOS DO PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO.....	32
TABELA IV. 5: COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO UTILIZADO NA OPERAÇÃO DO REATOR SBR.....	33
TABELA IV. 6: SOLUÇÃO DE MICRONUTRIENTES PROPOSTA POR CAMPOS ET. AL (1999).....	34
TABELA IV. 7: CONDIÇÕES OPERACIONAIS APLICADAS NO REATOR SBR.....	37
TABELA IV. 8: SONDAS E SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NA ANÁLISE DE FISH.....	47
TABELA V. 1: VALORES DO CONSUMO DE NITRATO E PRODUÇÃO DE SULFATO PARA OS EXPERIMENTOS REALIZADOS COM AS DIFERENTES FONTES DE CARBONO.....	53
TABELA V. 2: CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E RESULTADOS ATINGIDOS COM O PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO.....	56
TABELA V. 3: CONDIÇÕES OPERACIONAIS APLICADAS AO REATOR SBR DURANTE ESTE ESTUDO.....	61
TABELA V. 4: VALORES DAS VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CONSUMO DE AMÔNIO.....	68
TABELA V. 5: VALORES DAS VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE PRODUÇÃO DE NITRATO.....	69
TABELA V. 6: VALORES DAS VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE REMOÇÃO DE NITROGÊNIO.....	71
TABELA V. 7: VALORES DAS VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE PRODUÇÃO DE SULFATO.....	72
TABELA V. 8: PARÂMETROS CINÉTICOS APARENTES DA EQUAÇÃO IV.5.....	79
TABELA V. 9: VELOCIDADES DE RESPIRAÇÃO DAS BACTÉRIAS OXIDADORAS DE AMÔNIO NOS DIFERENTES PERÍODOS DE AERAÇÃO (FIG. V.17).....	82

Excluído: 70

TABELA V. 10: VALORES TEÓRICOS E EXPERIMENTAIS DE CONSUMO DE OXIGÊNIO DURANTE AS CONDIÇÕES OPERACIONAIS APLICADAS AO REATOR SBR. ....	90
TABELA V. 11: VALORES DOS RESIDUAIS DE $N-NH_4^+$ , $N-NO_2^-$ , $N-NO_3^-$ E $N-N_2$ , ASSIM COMO A QUANTIDADE DE $N-NH_4$ ALIMENTADA E $O_2$ CONSUMIDO, E AS RESPECTIVAS RELAÇÕES $N-NH_4^+/O_2$ APLICADAS EM CADA CONDIÇÃO EXPERIMENTAL. ....	91
TABELA V. 12: VALORES DAS VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CONSUMO DE NITRATO, DE PRODUÇÃO DE SULFATO. ....	94
TABELA V. 13: VALORES DAS VELOCIDADES DE CONSUMO DE NITRITO, DE PRODUÇÃO DE SULFATO E DA RELAÇÃO ESTEQUIOMÉTRICA ENTRE NITRITO E SULFATO. ....	96
TABELA V. 14: VELOCIDADE DE RESPIRAÇÃO DAS BACTÉRIAS OXIDADORAS DE AMÔNIO DURANTE A OPERAÇÃO DO REATOR SBR. ....	100
TABELA VI. 1: CONDIÇÕES OPERACIONAIS ESTIMADAS PARA QUE O PROCESSO DE REMOÇÃO COMBINADA DE ENXOFRE E DE NITROGÊNIO POSSA SER ATINGIDO. ....	111

## SIMBOLOGIA

abs – Absorbância;

ANAMMOX – Anaerobic Ammonium Oxidation

ATCC – American Type Culture Collection

ATP – Adenosina Trifosfato;

BOA – Bactérias Oxidadoras de Amônio;

BON – Bactérias Oxidadoras de Nitrito;

BOS – Bactérias Oxidadoras de Enxofre;

BRS – Bactérias Redutoras de Sulfato;

C/N - relação entre carbono e nitrogênio;

CANON - Completely Autotrophic Nitrogen-removal Over Nitrite;

CASAN – Companhia Catarinense de Águas e Saneamento;

CM – Cultura Mista

CONAMA – Conselho Nacional de Meio Ambiente

CP – Cultura Pura;

D<sub>A</sub> – Desnitrificação autotrófica;

D<sub>H</sub> – Desnitrificação Heterotrófica;

DQO – Demanda química de oxigênio;

*f* – Fração do tiosulfato oxidado pelo metabolismo aeróbio;

FISH – Hibridização *in-situ* por fluorescência;

HAO - Hidroxilamina Oxidoreductase;

- $Hv$  – acceptor de elétrons (Equação II.17);
- $K_{LA}$  – Coeficiente de transferência volumétrico de oxigênio;
- $K_N$  – Constante de saturação do nitrogênio;
- $K_o$  – Constante de saturação do oxigênio;
- $N$  – Normalidade;
- $n$  – Número de variáveis;
- $N_{\text{autotrófico}}$  – Nitrogênio removido pelo processo autotrófico;
- $N_e$  - Somatório das concentrações de nitrogênio da alimentação do reator;
- $N\text{-NH}_4^+$  – Concentração de Nitrogênio na forma de Amônia;
- $N\text{-NH}_4^+/\text{O}_2$  – Relação entre amônia alimentada e oxigênio consumido;
- $N\text{-NO}_2^-$  - Concentração de Nitrogênio na forma de Nitrito;
- $N\text{-NO}_3^-$  - Concentração de Nitrogênio na forma de Nitrato;
- $N_s$  - Somatório das concentrações de nitrogênio na vazão de saída do reator;
- $\text{O}_2$  – Concentração de oxigênio;
- $\text{O}_{20}$  – Concentração de oxigênio no início do experimento ( $t = 0$ );
- $\text{O}_{2t}$  – Concentração de oxigênio no tempo  $t$ ;
- $\text{O}_2^{\text{SAT}}$  – Concentração de oxigênio na saturação, cujo o valor de 7,5mg/L;
- OLAND – Oxygen Limited Autotrophic Nitrification Denitrification;
- PHB - Poli-hidroxi-butilato;
- $Q_{\text{Água Residuária}}$  – Vazão da água residuária;
- $Q_{\text{Reciclo}}$  – Vazão do reciclo do reator nitrificante;

$q_{NO_2}$  - Velocidade específica inicial de redução do nitrito;

$q_{NO_3}$  - Velocidade específicas iniciais de redução de nitrato;

$q_{O_2}$  – Velocidade específica de consumo de oxigênio;

$q_{O_2\text{ end.}}$  - Velocidade específica de consumo de oxigênio pelo metabolismo endógeno;

$q_{O_2\text{ MAX}}$  - Velocidade específica máxima de consumo de oxigênio;

$q_{O_2X}$  – Velocidade de consumo de oxigênio;

$q_{O_2X_{BOS}}$  - Velocidade de consumo de oxigênio pelas bactérias oxidadoras de enxofre;

$q_{O_2X^t}$  – Velocidade de consumo de oxigênio no instante t;

$q_{S_2O_3}$  - Velocidade específica de consumo de tiosulfato;

$q_{S_2O_3}^{DA}$  – Velocidade específica de consumo de tiosulfato pelo metabolismo anóxico;

$q_{SO_4}$  – Velocidade específica de produção de sulfato;

R – Razão de reciclo;

rpm – Rotações por Minuto;

S (%) – Porcentagem de Enxofre não detectado analiticamente;

SBR – Sequecial Bacht Reactor – Reator operado em batelada alimentada seqüencial;

SHARON – Single Reactor High Activity Ammonia Removal Over Nitrite;

$S-S_2O_3^-$  – Concentração de tiosulfato no final do experimento;

$S-S_2O_3^-_i$  – Concentração de tiosulfato no início do experimento;

$S-SO_4$  – Concentração de enxofre na forma de sulfato;

$SO_4^{DA}$  – Concentração de enxofre na forma de sulfato produzida pelo metabolismo anóxico;

SST – Sólidos Suspensos Totais;

STR – “Stirred type reactor”;

t – Tempo de experimento;

$T_{O_2\text{total}}$  – Total de oxigênio consumido em todos os processos de oxidação do amônio até nitrito e nitrato ( $T_{O_2}^1 + T_{O_2}^2$ );

$T_{O_2}^1$  – Total de oxigênio consumido durante a transformação do amônio até nitrito;

$T_{O_2}^2$  – Total de oxigênio consumido durante a transformação do nitrito até nitrato;

$T_{O_2}^{\text{EXP}}_{\text{Anóx}}$  – Total de oxigênio consumido durante o período anoxico;

$T_{O_2}^{\text{EXP}}_{\text{Aer}}$  – Total de oxigênio consumido durante o período aerado;

$T_{O_2}^{\text{EXP}}_{\text{total}}$  – Total de oxigênio consumido, determinado experimentalmente;

$T_{O_2}^t$  – Quantidade de oxigênio consumido no volume de reação em um dado instante t;

TRH – Tempo de Retenção Hidráulico;

$V_0$  – Volume inicial do reator e igual a 1L;

$V_r$  – Volume do Reator;

$V_r^t$  – Volume do reator no instante t;

X – Concentração Celular;

$Y_{NO_2/SO_4}$  - Fator de conversão de sulfato produzido em nitrogênio removido via nitrito;

$Y_{N/S}$  – Fator de conversão de sulfato produzido em nitrogênio removido;

$Y_{N_2/SO_4}$  – Relação entre a produção de nitrogênio gasoso e a produção total de sulfato;

$Y_{N_2/SO_4}^{\text{ANOXICO}}$  - Relação entre o nitrogênio removido e o sulfato produzido somente pelo metabolismo anóxico;

$Y_{O_2/NO_2}$  – Fator de conversão de oxigênio consumido por nitrito produzido;

$Y_{O_2/NO_3}$  - Fator de conversão de oxigênio consumido por nitrato produzido a partir do nitrito;

$Y_{O_2/S}$  - Fator de conversão de tiosulfato consumido em oxigênio consumido;

$Y_{X/S}$  - Fator de conversão substrato a células;



## CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

A aplicação de sistemas biológicos para o tratamento de águas residuárias tem se tornado cada vez mais freqüente. Os atuais avanços tecnológicos neste setor têm possibilitado que rejeitos de difícil biodegradação e com elevado índice de toxicidade possam ser eliminados eficientemente, atendendo os requisitos legais, através de processos economicamente viáveis (Field, 2002).

Nas últimas décadas, os ecossistemas têm sido constantemente afetados pela poluição urbana e industrial. Dentre todos os compostos presentes nestas águas residuárias, o nitrogênio tem tido uma atenção especial dos pesquisadores, quanto ao desenvolvimento e otimização de processos e a determinação do seu impacto sobre o meio ambiente (Wiesman, 1994).

Principalmente, as formas mais reduzidas de nitrogênio (amônio) geram uma grande demanda de oxigênio nos ambientes aquáticos. Porém, os piores problemas para a saúde pública estão relacionados com as formas mais oxidadas ( $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}_3^-$ ), que podem causar câncer e doenças como “bebê azul”. No meio ambiente, a presença de excesso de nitrogênio acelera o fenômeno de eutrofização em rios e lagos (Albertson, 1983).

Em muitas águas residuárias encontram-se elevadas concentrações deste elemento, superando normalmente o limite imposto pela legislação ambiental nacional CONAMA, Resolução 357/2005 (20 mg N-NH<sub>4</sub>/L) atualmente em exercício no país. Exemplos de atividades industriais que possuem águas com estas características são: processamento de alimentos, petroquímica, curtumes, processamento pesqueiro, etc (Santana, 2002; Chazal e Lens, 2000; Sezerino, 2002).

A eliminação do nitrogênio, oriundo da sua forma mais reduzida (amônio), é realizada, inicialmente, por uma etapa aeróbia que leva à formação dos compostos oxidados de nitrogênio (nitrito e nitrato). Após, há necessidade de reduzir estes compostos a nitrogênio molecular ( $\text{N}_2$ ), que será liberado para atmosfera sem prejudicar o meio ambiente. Nesta última etapa, é necessária a adição de um doador de elétrons, mais comumente compostos orgânicos, como o metanol, o que conseqüentemente aumenta os custos do processo.

Neste sentido, diferentes fontes de doadores de elétrons têm sido pesquisadas, com o objetivo de obter-se a maior eficiência de remoção de nitrogênio, com o menor custo de tratamento possível. Atualmente, destacam-se o uso de três fontes alternativas de elétrons: o metano, as formas reduzidas de enxofre e o próprio amônio. A maior potencialidade de eliminação de nitrogênio é atribuída ao uso do amônio como doador de elétrons, já que o nitrogênio molecular formado será uma consequência da oxidação de uma fonte de nitrogênio, o amônio, e da redução de outra fonte de nitrogênio, o nitrito.

Contudo, a aplicação deste processo ainda encontra-se limitada pela baixa velocidade de crescimento dos microrganismos envolvidos, assim como o processo que utiliza o metano, como doador de elétrons. Nos processos nos quais os compostos reduzidos de enxofre são utilizados como fonte de elétrons, a velocidade de crescimento dos microrganismos envolvidos é maior do que nos processos anteriores, o que aumenta a possibilidade de aplicação, deste processo, ao tratamento de resíduos. Além do que, a disponibilidade dos compostos reduzidos de enxofre é muito freqüente, pois estes são sub-produtos dos processos anaeróbios de degradação da matéria orgânica, quando o sulfato está presente nas águas residuárias.

Com a utilização dos compostos reduzidos de enxofre, em especial o sulfeto de hidrogênio, para a redução do nitrato ou nitrito, inicia-se a integração dos ciclos do enxofre e do nitrogênio, o que possibilita a redução dos custos envolvidos no tratamento, além de permitir a redução do impacto ambiental associado ao sulfeto de hidrogênio, que é extremamente tóxico ao meio ambiente, além de apresentar forte odor e ser corrosivo.

Neste trabalho, pretende-se estudar a possibilidade de utilização dos compostos reduzidos de enxofre para a redução do nitrato ou do nitrito, em um sistema simultâneo de nitrificação e desnitrificação autotrófica, realizado em um único reator, operado no regime de batelada alimentada seqüencial. Esta tese está associada a um projeto maior e a uma nova linha de pesquisa do Grupo de Tratamento Biológico de Resíduos do Laboratório de Engenharia Bioquímica, que tem como objetivo obter um novo processo, no qual ocorra a remoção combinada do nitrogênio e do enxofre, com a formação do enxofre elementar.

## CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Naturalmente a existência de uma espécie de microrganismo em um ambiente está associada aos ciclos biogeoquímicos. Esta espécie, normalmente catalisa uma das etapas das transformações que ocorrem com os compostos destes ciclos, possibilitando o equilíbrio entre os diferentes elementos químicos e biológicos no meio ambiente (Middelburg, 2000).

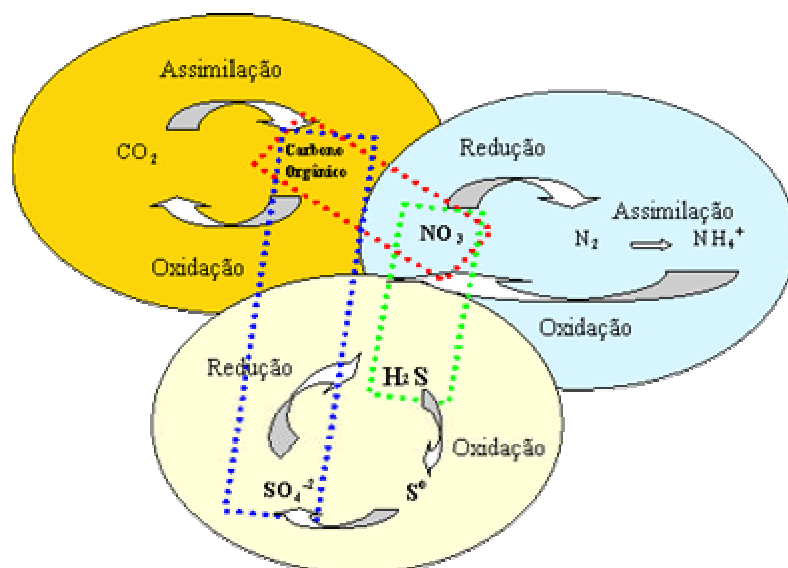
O metabolismo de um microrganismo é dependente das condições ambientais às quais está exposto, que muitas vezes é consequência da atividade de outros microrganismos. O resultado destas interações constitui uma simbiose entre as diferentes espécies envolvidas nos ciclos naturais. Quando estão envolvidos os elementos essenciais para a vida (Carbono, Hidrogênio, Nitrogênio, Oxigênio, Fósforo e Enxofre) os processos de simbiose são mais diversificados e um maior número de espécies de microrganismos estará envolvido (Etchebehere, 2005).

O desenvolvimento de tecnologias para o tratamento biológico de resíduos é baseado no conhecimento dos conceitos fundamentais dos microrganismos envolvidos e das interações com os ciclos naturais dos elementos químicos (McCarty, 1975; Metcalf e Eddy, 1991). Os maiores avanços tecnológicos têm ocorrido com a aplicação do ciclo do carbono e do nitrogênio (Gray, 1990; Speece, 1995; Lema, 1997; Strous et. al., 1999), restando ao fósforo e ao enxofre um papel secundário, situação esta que nas últimas décadas vem sendo alterada com o desenvolvimento de novas tecnologias (Lettinga e Rizema, 1985; Vallero, 2003; Zeng et. al., 2004).

Para o projeto de sistemas de tratamento, deve ser considerada a interação entre estes ciclos, conforme a composição química do rejeito, de modo que seja determinada a influência de um ciclo sobre o outro (Lin et. al., 2001; Sterling et. al., 2001). Na Figura II.1 estão representados os ciclos do carbono, nitrogênio e enxofre, bem como os processos que representam a interação entre os ciclos.

A interação entre o ciclo do carbono e do nitrogênio é representada pelo processo de desnitrificação heterotrófica (Fig. II.1., caixa vermelha), realizado por bactérias que oxidam o carbono orgânico em ambientes anóxicos, onde compostos oxidados de nitrogênio, como nitrato e outros, são utilizados como aceptores de

elétrons. Em ambientes anaeróbios, onde esteja presente o sulfato, a oxidação do carbono será realizada principalmente por bactérias redutoras de sulfato. Desta forma, ocorre a integração do ciclo do carbono com o do enxofre (Fig. II.1, caixa azul) (Brock e Madigan, 1991).



**Figura II. 1:** Representação da integração dos ciclos de carbono, nitrogênio e enxofre.

Recentemente, o processo de desnitrificação autotrófica via enxofre tem despertado o interesse da comunidade científica envolvida com o desenvolvimento de tecnologias ambientais (Fig. II.1, caixa verde). Este processo é realizado principalmente por *Thiobacillus denitrificans*, que é capaz de utilizar o nitrato como acceptor final de elétrons na oxidação dos compostos reduzidos de enxofre ( $S^0$ ,  $H_2S$ ,  $S_2O_3^-$ ) (Brock e Madigan, 1991). Este processo integra os ciclos de nitrogênio e de enxofre, o que possibilita o desenvolvimento de tecnologias para remoção combinada do  $H_2S$ , extremamente tóxico ao meio ambiente, e do nitrato.

No desenvolvimento deste capítulo uma atenção especial será dada à interação dos ciclos do nitrogênio e do enxofre, de modo que se tenha um aprofundamento dos conhecimentos a respeito das reações bioquímicas envolvidas nestes ciclos. Além disso, será apresentada a proposta deste trabalho, descrevendo as condições necessárias para que a completa integração dos ciclos de nitrogênio e enxofre ocorra.

## II. 1 Ciclo do Nitrogênio

O nitrogênio é um elemento químico essencial à vida, encontrando-se a descrição das transformações envolvendo compostos desse elemento na natureza relativamente bem descritas (Brock e Madigan, 1991; Atlas e Bartha, 2002). Contudo, com a aplicação de reatores biológicos para o tratamento deste composto, as interações entre os diferentes microrganismos envolvidos nas transformações do nitrogênio foram potencializadas. Condições ambientais que raramente são encontradas nos ecossistemas naturais foram atingidas. Conseqüentemente, novas reações bioquímicas foram descritas e novas espécies de microrganismos foram identificadas e observadas (Robertson et. al., 1988; Strous et. al., 1997; Egli et. al., 2003). Além deste fato, a fisiologia de espécies tradicionais do ciclo do nitrogênio tem sido questionada e novas rotas metabólicas estão sendo propostas para estas espécies (Schmidt et. al., 2002).

A Figura II.2 apresenta as reações envolvidas no ciclo do nitrogênio, bem como aquelas que constituem os processos biológicos mais conhecidos e aplicados no tratamento de águas residuárias. Basicamente, são três as reações que são aplicadas no projeto de sistemas biológicos para a remoção de nitrogênio (formação do nitrogênio molecular –  $N_2$ ): a nitrificação (caixas amarela e laranja); a desnitrificação heterotrófica (caixa azul marinho); e a oxidação anaeróbica da amônia (azul claro).

Um processo de remoção de nitrogênio (formação do  $N_2$ ) no mínimo utiliza duas destas reações. A possibilidade da aplicação destas reações, sob diferentes condições ambientais (temperatura, concentração de oxigênio, valores de pH), permite que inúmeras variações de processos sejam criadas.

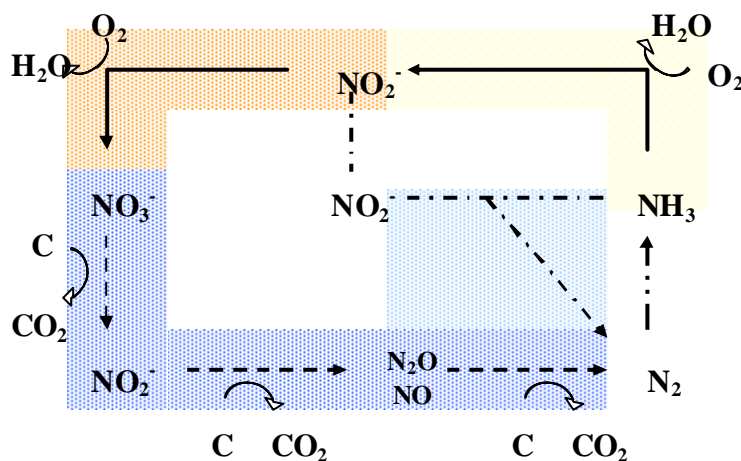


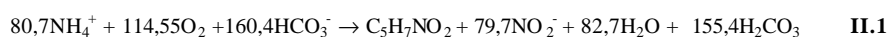
Figura II. 2: Ciclo do nitrogênio. (Brock e Madigan, 1991)

### II.1.1. Bioquímica e microbiologia

Como pôde ser observado no ciclo do nitrogênio (Fig. II.2), qualquer processo em que a formação do nitrogênio molecular seja desejada, a primeira etapa envolvida é a formação dos compostos oxidados ( $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}_3^-$ ), quando o nitrogênio na forma de amônia estiver presente na água residuária. Esta etapa de formação do nitrito e do nitrato é realizada sob condições aeróbias, sendo denominada de nitrificação (caixas amarela e laranja), como já apresentado.

O processo de nitrificação é realizado por várias espécies de bactérias, sendo os dois gêneros mais importantes, *Nitrosomonas*, responsável pela passagem do amônio a nitrito, e *Nitrobacter*, responsável pela passagem de nitrito a nitrato. Essas bactérias são autotróficas, utilizam o  $\text{CO}_2$  como fonte de carbono ou, ainda, quimiolitotróficas, pois oxidam compostos inorgânicos para obtenção de energia (Brock e Madigan, 1991).

As reações estequiométricas da oxidação aeróbia da amônia (formação do nitrito) e a posterior oxidação do nitrito a nitrato, estão descritas a seguir pelas equações II.1 e II.2 (Henze *et al.*, 1997):



Por muito tempo o objetivo dos sistemas biológicos era de transformar completamente o amônio em nitrato, evitando-se ao máximo a presença do nitrito. Esta prática vem sendo alterada e tem-se proposto que a nitrificação seja interrompida após a formação do nitrito (Hellings *et al.*, 1998). Este procedimento resulta numa diminuição dos custos relacionados com a aeração do sistema e com a posterior adição de carbono, para a redução deste composto para nitrogênio molecular ( $\text{N}_2$ ).

A formação preferencial do nitrito tem sido alcançada sob diferentes procedimentos, sendo estes baseados nos conhecimentos das cinéticas dos microrganismos envolvidos nestas etapas (Wiesmann, 1994; Yoo, *et al.*, 1999; Wyffels *et al.*, 2003). Os primeiros estudos referem-se ao cultivo destes microrganismos em temperatura próximas a  $35^\circ\text{C}$ , onde as bactérias oxidadoras de amônio (BOA) apresentam uma velocidade de crescimento superior às das bactérias oxidadoras de nitrito (BON). Nestas condições, quando um processo contínuo, sem reciclo de células, é executado, tem-se a lavagem das bactérias oxidadoras de nitrito e conseqüentemente o nitrito será o principal produto da oxidação aeróbia do amônio (Hellings *et al.*, 1998).

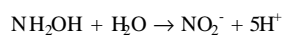
Outro procedimento se refere ao cultivo destas células sob condições de limitação de oxigênio. Novamente as bactérias oxidadoras de amônio terão velocidades de crescimento superiores às das bactérias oxidadoras de nitrito e o processo de nitrificação será interrompido na formação do nitrito (Yoo, et al., 1999).

Com a aplicação destes processos, o cultivo destes microrganismos em condições atípicas tem sido uma realidade nos trabalhos apresentados na literatura, revelando fisiologias desconhecidas até há pouco tempo atrás (Zart e Bock, 1998; Beaumont et. al., 2002). Os principais avanços neste sentido têm ocorrido com estudos envolvendo as bactérias oxidadoras de amônio.

As bactérias oxidadoras de amônio do gênero *Nitrosomonas*, conhecidas inicialmente pela sua atividade aeróbia (Brock e Madigan, 1991), tem sido encontradas constantemente em diferentes tipos de lodos de biorreatores, mesmo em alguns destes operados sob condições anóxicas (Verstraete e Philips, 1998; Uemoto e Saiki, 2000; Fux et. al., 2002). Este fato revela a flexibilidade deste grupo de microrganismos, que mesmo sob condições desfavoráveis ao seu crescimento, consegue manter-se ativo, obtendo energia para a sua manutenção através de metabolismos secundários (Bodelier et. al., 1996). Atualmente é conhecido que as bactérias oxidadoras de amônio possuem a capacidade de realizar duas rotas metabólicas distintas para obtenção de energia do amônio (doador de elétrons) (Zart e Bock, 1998; Schmidt e Bock, 1998), além de serem capazes de oxidar compostos orgânicos, como metano, metanol, fenol, benzeno e compostos que provocam distúrbios endócrinos (nonilfenol, “estrone-E2”, 17 $\beta$ -Estradiol, e outros) (Hyman et. al., 1988; Rashe et. al, 1991; Vader et. al., 2000; Shi et. al, 2004).

Estes microrganismos podem oxidar o amônio até nitrito, substituindo o oxigênio (agente oxidante) pelo dióxido de nitrogênio (NO<sub>2</sub>), ou ainda pelo tetraóxido de nitrogênio (N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>), forma dímera do NO<sub>2</sub>. Este fato indica uma relação complexa dos óxidos de nitrogênio (NO e NO<sub>2</sub>) no metabolismo aeróbio destes microrganismos (Schmidt et. al., 2001; Beaumont et. al., 2002). Esta relação entre os óxidos de nitrogênio (NO, NO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) com a atividade aeróbia da amônia, pode ser traduzida pelas Equações II.3, II.4 e II.5.



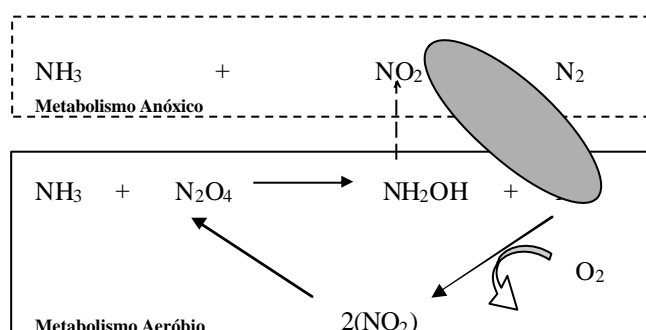


II.5

Nestas reações o NO é apresentado como um produto adicional da oxidação do amônio pelo  $\text{N}_2\text{O}_4$ . O óxido nitroso formado nesta reação (Eq. II.3) é um intermediário que, em condições aeróbias, será oxidado para  $\text{NO}_2$  (dióxido de nitrogênio) que será transformado na sua forma dímica  $\text{N}_2\text{O}_4$  (Eq. II.4). Observa-se ainda que ocorre a formação de hidroxilamina ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) (Eq. II.3), que após ser hidrolisada forma o nitrito (Eq. II.5). De qualquer forma, a equação II.1 representa a estequiometria global do processo de oxidação aeróbia do amônio.

O mecanismo de formação do NO, durante a oxidação do amônio, ainda não está claro, sendo que alguns estudos revelam que o NO e o  $\text{N}_2\text{O}$  são produtos diretos da reação de hidrólise da hidroxilamina, catalisada pela hidroxilamina oxidoreductase (HAO) (Kester et. al., 1997; Poughon et. al., 2001). Atribui-se a presença do intermediário NO, como sendo a chave para execução dos metabolismos secundários nas espécies de *Nitrosomonas sp.*. Exemplo disso é o metabolismo de redução do nitrito tendo como doador de elétrons o amônio (Zart e Bock, 1998; Beaumont et. al., 2004; Schmidt et. al., 2004). Estes autores acreditam que o NO seja o indutor das enzimas nitrito redutase, como acontece em outros microrganismos desnitrificantes.

A Figura II.3 ilustra os metabolismos aeróbio e anóxico das bactérias oxidadoras de amônio.



**Figura II. 3:** Representação do metabolismo aeróbio e anóxico das bactérias oxidadoras de amônio (Figura adaptada de Schmidt et. al., 2004).

Durante o cultivo aeróbio de *Nitrosomonas eutropha*, principalmente na presença de dióxido de nitrogênio ( $\text{NO}_2$ ) exógeno, foi observado um acúmulo de NO no interior das células e, conseqüentemente, parte do nitrogênio foi eliminado, através do processo de desnitrificação. Esta desnitrificação ocorre concomitantemente com o



processo de oxidação aeróbia da amônia na formação do nitrito (Zart e Bock, 1998). Resultados similares a estes já foram observados em cultivos aeróbios de bactérias oxidadoras de amônio, sem a adição de  $\text{NO}_2$  exógeno (Leitão et. al., 2006), revelando assim uma nova possibilidade metabólica. Estes conceitos todos apresentados tem possibilitado o melhor entendimento do papel destes microrganismos no ciclo do nitrogênio e o aperfeiçoamento dos processos de remoção dos compostos nitrogenados das águas residuárias.

Após a formação do nitrito ou do nitrato, o nitrogênio molecular ( $\text{N}_2$ ) pode ser produzido por dois metabolismos distintos. O primeiro, e mais tradicional, seria a desnitrificação heterotrófica. O segundo é o metabolismo autotrófico, em que o amônio é utilizado como doador de elétrons para a redução de nitrito.

O metabolismo de desnitrificação heterotrófica consiste da oxidação de compostos orgânicos, com a redução do nitrito ou do nitrato até nitrogênio molecular. Uma variedade muito grande de microrganismos possui esta capacidade, na maioria são do grupo das  $\beta$  ou  $\delta$ -Proteobactéria, destacando-se as espécies de *Pseudomonas sp* (Zumft, 1997). Estes microrganismos possuem a capacidade de metabolizar diferentes tipos de substratos orgânicos, variando dos mais simples como metanol e acetato, até compostos complexos e tóxicos como o fenol (Brock e Madigan, 1991).

Esforços neste tema têm sido feitos no sentido da otimização do metabolismo de oxidação e assimilação dos compostos orgânicos por estes microrganismos durante a respiração anóxica. Constantemente tem sido observada a formação de polímeros extra e intracelulares durante este metabolismo, como poli-hidroxi-butirato (PHB). A presença destes compostos na matriz do floco ou grânulo prejudica a sedimentação da biomassa, o que diretamente influencia a eficiência do processo de remoção de nitrogênio (Murnleitner et. al., 1997).

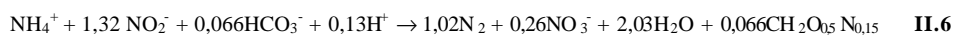
Outro tema que também tem tido atenção especial dos pesquisadores é a desnitrificação via nitrito, principalmente pela oportunidade de redução dos custos do tratamento. A redução do nitrito ou do nitrato é bastante influenciada pela quantidade de doador de elétrons (fonte de carbono). Quando o cultivo destes microrganismos é realizado sob baixas relações C/N, a redução do nitrito ou do nitrato ocorre parcialmente, com a formação dos óxidos de nitrogênio. Ao contrário, quando o cultivo

acontece em altos valores de C/N, o nitrato e o nitrito podem ser reduzidos até amônio e não a nitrogênio gasoso como desejado (Guynot et. al, 1998).

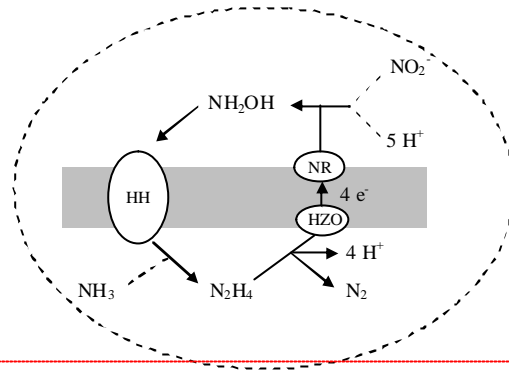
Como apresentado anteriormente, a formação do nitrogênio gasoso pode ocorrer por um metabolismo autotrófico, em que a adição de compostos orgânicos não se faz necessária. O uso do nitrogênio amoniacal como doador de elétrons representa grande rota potencial de remoção de nitrogênio, pelo produto desejado ( $N_2$ ) ser oriundo de duas fontes de nitrogênio, o composto doador de elétrons ( $NH_3$ ) e o acceptor de elétrons ( $NO_2^-$ ) (Jetten et. al, 1999). Por este motivo, este processo é ainda aplicado somente para águas residuárias com elevada concentração de nitrogênio.

A descoberta deste metabolismo é bastante recente e as espécies de microrganismos que possuem esta capacidade ainda são pouco conhecidas. Destacam-se espécies como *Kuenenia stuttgartiensis* e *Brocadia anammoxidans*, além de alguns microrganismos do gênero *Nitrosomonas*, como *Nitrossomonas eutropha* e *N. europea*. Contudo, este metabolismo ainda não foi atribuído exclusivamente a nenhuma espécie citada anteriormente, já que muitos dos microrganismos encontrados nestes sistemas não foram isolados pelos métodos clássicos e não foram cultivados sob condições assépticas (Strous et. al, 1997; Jetten et. al. 1997; Strous et. al., 1999, Schmidt et. al., 2004).

A estequiometria deste metabolismo, de oxidação anaeróbia da amônia, denominado como ANAMMOX, foi recentemente proposta na literatura (Eq. II.6) (Van Dongen et. al, 2001). Observa-se, nesta equação, que a quantidade de células formada por grama de substrato oxidado ( $NH_4^+$ ) é baixa, cerca de 0,11gSSV/gN- $NH_4^+$ . Este fato limita a aplicação do processo ANAMMOX, pois períodos muito longos de “start-up” podem ser necessários para a aplicação deste processo.



A Figura II.4 ilustra o metabolismo de oxidação anaeróbia do amônio, observa-se que o nitrito é reduzido a hidroxilamina, que após reage com o amônio, formando o intermediário hidrazina ( $N_2H_4$ ), que dará origem ao nitrogênio molecular.



**Figura II. 4:** Processo de oxidação anaeróbica do amônio (Jetten et. al, 1997).

### II.1.2. Processos de Remoção de Nitrogênio

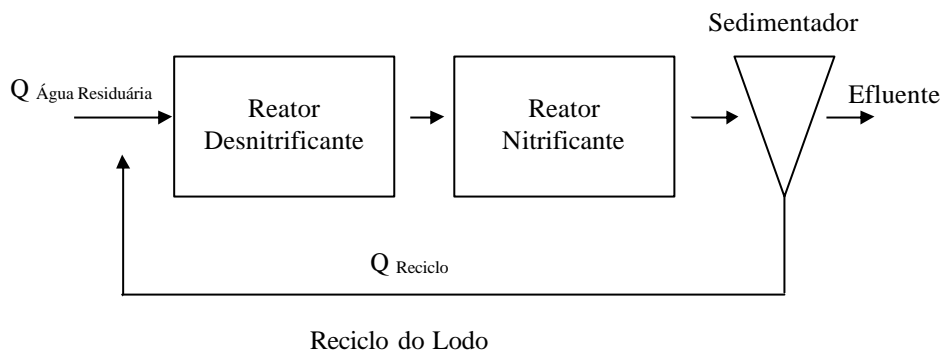
Conforme mencionado anteriormente, o processo clássico utilizado para a remoção de nitrogênio é a nitrificação seguida da desnitrificação. No entanto, tendo em vista os fundamentos anteriormente descritos, alguns processos novos estão em desenvolvimento.

No processo clássico, a disposição dos reatores é ainda sujeita a discussão, tendo em vista as questões de eficiência e economia de processo (Albertson, 1983). Quando é desejado o aproveitamento do residual de matéria orgânica para a redução do nitrato, procura-se utilizar o reator desnitrificante antes do reator nitrificante, como apresentado na Figura II.5.

Apesar da redução dos custos referentes à adição do doador de elétrons, que ocorre quando primeiro é aplicado o processo de desnitrificação, a eficiência de remoção de nitrogênio obtida com esta configuração (fluxograma apresentado na Figura II.5) é diretamente influenciada pela razão de reciclo (R), ou seja, pela relação entre a vazão do reciclo do reator nitrificante ( $Q_{\text{Reciclo}}$ ) pela vazão da água residuária ( $Q_{\text{Água Residuária}}$ ).

Com a intenção de evitar a limitação da remoção de nitrogênio pela razão de reciclo, é proposto utilizar um reator desnitrificante após o reator nitrificante. Esta prática possibilita que todo o nitrato formado seja reduzido a nitrogênio gasoso. Para isto, normalmente é adicionada uma fonte extra de carbono, como doador de elétrons, para promover a desnitrificação.

Neste sentido, tem-se proposto a substituição do nitrato pelo nitrito, reduzindo os custos referentes à adição de uma fonte externa de carbono. Com base nas reações estequiométricas para a redução do nitrato (Eq. II.7) e do nitrito (Eq. II.8), pode-se imaginar que, para uma mesma quantidade de carbono (metanol), a quantidade de nitrogênio removido é 1,64 vezes maior quando o processo é realizado via nitrito do que via nitrato.



**Figura II. 5:** Esquema simplificado de nitrificação e desnitrificação (Schmidell e Reginatto, 2005)

Desta forma, é no controle do oxigênio dissolvido no reator nitrificante, ou agora nitritante (formador de nitrito), que reside o maior desafio tecnológico. Algumas estratégias de controle e operação deste reator têm sido propostas na literatura. Wyffels et. al (2003) relatam que, independente do tipo de controle, há a necessidade de manter-se a concentração de oxigênio dissolvido próxima a  $0,1\text{mgO}_2/\text{L}$ , pois, nesta condição as bactérias oxidadoras de amônio teriam atividade maior do que a das bactérias oxidadoras de nitrito. Contudo, a manutenção de um sistema nesta faixa de concentração de oxigênio dissolvido é difícil de ser realizada e exige elevados investimentos (Ruiz et. al., 2006).

Uma estratégia mais simples e eficaz para a manutenção do nível baixo de oxigênio dissolvido é a realização de ciclos de aeração, ou seja, períodos aeróbios e períodos anóxicos (sem aeração) (Yoo et. al., 1999; Zdradek, 2005). Inicialmente, este tipo de processo foi aplicado para obter-se a remoção de nitrogênio em um único reator,

onde são realizados os processos de nitrificação e desnitrificação simultaneamente. Quando estes são realizados via nitrito, tem-se denominado este processo como “SHARON – Single Reactor High Activity Ammonia Removal Over Nitrite”. Desta maneira, observou-se que dependendo do tempo do período aerado e do período anóxico, as bactérias oxidadoras de nitrito tem a sua atividade inibida e o processo de eliminação do nitrogênio acontece via nitrito (Zdradek, 2005).

Da mesma forma que no processo de nitrificação / desnitrificação simultâneas, tem sido proposto que o processo de formação do nitrito e a sua posterior redução, utilizando o amônio como doador de elétrons, sejam realizados em um único reator. Neste sentido, dois processos têm sido descritos na literatura, o processo “Oxygen Limited Autotrophic Nitrification Denitrification – OLAND”, que está baseado na flexibilidade metabólica das bactérias oxidadoras de amônio (Kuai e Verstraete, 1998). Outro processo é o designado “Completely Autotrophic Nitrogen-removal Over Nitrite - CANON”, que seria realizado por bactérias oxidadoras de amônio (BOA) e as bactérias ANAMMOX, como *Kuenenia stuttgartiensis* e *Brocadia anammoxidans*. O crescimento conjunto destes microrganismos permite que as BOA garantam um ambiente livre de oxigênio e conseqüentemente as bactérias ANAMOX teriam a sua atividade não inibida (Schmidt et. al., 2002). Na Tabela II.1 é apresentado uma revisão das principais condições operacionais utilizadas nestes processos, bem como as eficiências atingidas quanto á remoção de nitrogênio.

**Tabela II. 1:** Carga volumétrica e remoção de nitrogênio atingida pelos novos processos biológicos de remoção de nitrogênio heterotróficos e autotróficos.

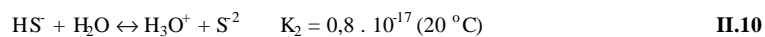
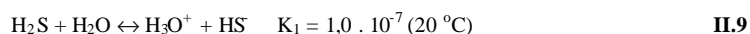
Processo	Carga de nitrogênio (gN/L.d)	Eficiência (%)	Referência
SHARON	0,63-1	76-90	Jetten et. al., 1999
ANAMMOX	0,46-2,63	88-99	Jetten et. al., 1999
OLAND	0,25	15-40	Kuai e Verstraete, 1998
CANON	3,708	40	Sliekers et. al., 2002

## II.2. Ciclo do enxofre

Em adição aos problemas causados no ambiente, devido ao desequilíbrio do ciclo do enxofre, como chuvas ácidas, concentrações elevadas de compostos de enxofre podem também prejudicar a performance dos reatores biológicos no tratamento de resíduos. Como para outros poluentes, as primeiras tecnologias foram desenvolvidas para a eliminação ou remoção dos compostos de enxofre que impactam diretamente o ambiente. Nos últimos 20 anos, no entanto, as conversões do ciclo do enxofre foram utilizadas de forma mais racional, viabilizando processos para abater a poluição causada por compostos de enxofre, metais pesados, xenobióticos e até por compostos do nitrogênio, com oportunidades de recuperação destes compostos (Janssen *et al.*, 1995,1997; Lagas, 2000; Vallero, 2003).

Para melhor entendimento dos processos envolvidos no tratamento de resíduos é necessário aprofundar os conceitos envolvidos no ciclo natural do enxofre. As transformações do enxofre na natureza são complexas, principalmente devido ao grande número de estados de oxidação que este elemento apresenta, conforme pode ser observado na Tabela II.2 (Vallero, 2003). Ao todo, são nove estados de oxidação do enxofre na natureza, variando a valência deste composto de  $-2$  até  $+6$ . Contudo, muitas destas espécies químicas apresentam-se na natureza em pequenas quantidades, já que algumas destas são intermediárias de reações bioquímicas, ou sua concentração está diretamente relacionada com as condições ambientais encontradas, como pH, potencial redox e temperatura.

Um composto cuja forma química é fortemente influenciada pelas condições ambientais é o sulfeto de hidrogênio. Em sistemas aquáticos, a composição do sulfeto de hidrogênio é influenciada principalmente pelo pH, conforme as equações II.9 e II.10. Em sistemas com baixo valor do pH ( $< 3$ ), a forma predominante é a forma não ionizada  $H_2S$ , enquanto que em valores superiores a 8, quase todo o sulfeto dissolvido esta presente na sua forma ionizada  $S^{-2}$ .



Os processos de tratamento usam os mesmos sólidos insolúveis do enxofre, que acumulam na natureza ( $CaSO_4$ , minerais-sulfeto,  $S^0$ ), para o abatimento de poluição causada pelo enxofre, já que a fase sólida pode ser separada da fase líquida com

facilidade. Torna-se importante destacar que todas as formas gasosas do enxofre (ex.  $\text{H}_2\text{S}$  e compostos orgânicos sulfurosos voláteis, como as mercaptanas) são tóxicas, corrosivas e apresentam forte odor. Portanto, a remoção do enxofre de um efluente líquido pela produção de um produto final gasoso não é uma opção facilmente justificável, ao contrário dos ciclos do nitrogênio e do carbono, nos quais a produção de  $\text{CO}_2/\text{CH}_4$  e  $\text{N}_2$ , respectivamente, são os métodos mais comumente aplicados para as remoções.

**Tabela II. 2:** Estados de oxidação dos compostos de enxofre (Vallero, 2003).

Composto	Estado de Oxidação
Enxofre Orgânico (R-S)	-2
Sulfeto ( $\text{H}_2\text{S}$ , $\text{HS}^-$ , $\text{S}^{2-}$ )	-2
Disulfanos ( $\text{H}_2\text{S}_2$ ), Polissulfetos ( $-\text{S}(\text{S}_n)\text{S}-$ )	-1
Enxofre Elementar ( $\text{S}^0$ )	0
Diclorodissulfano (Cl-S-S-Cl)	1
Dicloro Enxofre ( $\text{SCl}_2$ )	2
Tiosulfato ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ )	2
Ditionato ( $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ )	3
Dióxido de Enxofre ( $\text{SO}_2$ ), Sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ )	4
Dithionatos ( $\text{S}_2\text{O}_6^{2-}$ ), Sulfonatos ( $\text{R-SO}_3^{2-}$ )	5
Trióxido de Enxofre ( $\text{SO}_3$ ), Sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ )	6

Para compreender as transformações necessárias para o tratamento de resíduos sulfurosos, é apresentado na Figura II.6 o ciclo bioquímico do enxofre. Destacam-se também, nesta figura, as transformações que estão envolvidas nos processos utilizados no abatimento deste poluente. Observa-se que, quando o sulfato estiver presente na água residuária a ser tratada, a primeira transformação que ocorre é a redução dissimilatória do sulfato (caixa azul). Após, com a formação do sulfeto, a formação do enxofre elementar poderá ocorrer via oxigênio (caixa laranja, Fig. II.6) ou via nitrato (caixa

amarela, Fig. II.6). Estes processos serão melhores descritos nos itens apresentados a seguir.

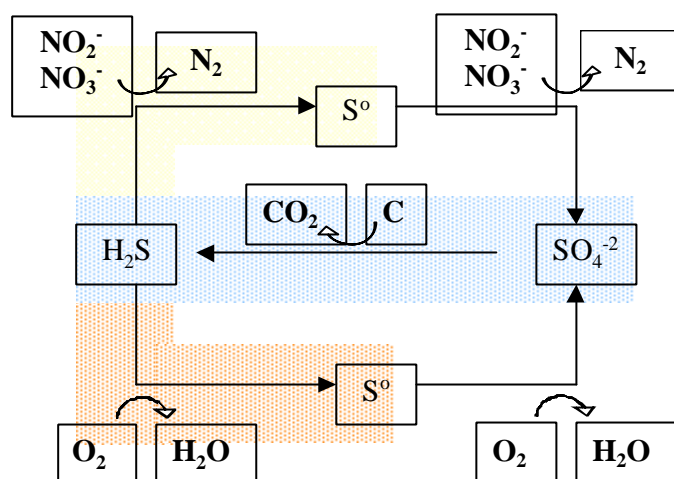


Figura II. 6: Ciclo bioquímico do Enxofre (Etchebehere, 2005).

### II.2.1. Microbiologia e Bioquímica

O sulfato presente nas águas residuárias pode ser utilizado como aceptor final de elétrons na oxidação de compostos orgânicos. Esta etapa é denominada de redução dissimilatória do sulfato, representada na Figura II.6 pela caixa azul, sendo realizada pelas bactérias redutoras de sulfato (BRS). As BRS são pertencentes a divisão  $\alpha$ -Proteobacteria, são microrganismos gran-negativos (com algumas exceções) e anaeróbios. Estas bactérias são consideradas muito versáteis e podem utilizar grande variedade de substratos como, por exemplo: toda a cadeia de ácidos graxos voláteis, diversos ácidos aromáticos, hidrogênio, diversos álcoois, açúcares, aminoácidos e outros compostos fenólicos (Madigan *et al.*, 1997).

Estas bactérias podem ser divididas em dois grupos: (1) as que oxidam suas fontes de elétrons até acetato, excretando esse composto como produto final de seu metabolismo, e (2) as que oxidam suas fontes de elétrons completamente até  $\text{CO}_2$  (Madigan *et al.*, 1997). Em adição, existem também BRS autótrofas, que são capazes de utilizar o hidrogênio como doador de elétrons. Apesar da grande variedade de doadores de elétrons oxidáveis pelas BRS, o produto final do seu metabolismo é sempre o  $\text{H}_2\text{S}$ . A redução incompleta até  $\text{S}^0$  não foi reportada até o momento. As BRS ainda podem utilizar o nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) como aceptor de elétrons, reduzindo este até  $\text{NH}_3$  (Widdel, 1988).

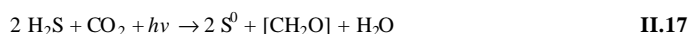


Finalmente, na ausência de sulfato as BRS também podem atuar como bactérias fermentativas, permitindo com esta flexibilidade metabólica sua sobrevivência em reatores anaeróbios sob condições de ausência de sulfato (O’Flaherty and Colleran, 1999). Estas diferentes reações que as bactérias redutoras de sulfato podem realizar estão em parte apresentadas na Tabela II.3.

**Tabela II. 3:** Estequiometria e a energia livre de Gibbs da degradação anaeróbia do propionato, acetato, metanol e hidrogênio molecular pelas BRS (Fonte: Vallero, 2003) ( $DG^0$  a 37°C em kJ/gmol).

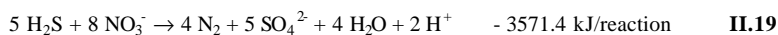
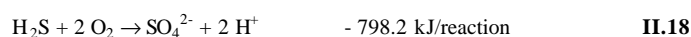
Reações	$DG^0$	Equação
Propionato		
$CH_3CH_2COOH + 0.75 SO_4^{2-} \rightarrow CH_3COO^- + HCO_3^- + 0.75 HS + 0.25 H^+$	-37,7	II.11
$CH_3CH_2COOH + 1.75 SO_4^{2-} \rightarrow 3 HCO_3^- + 1.75 HS + 0.5 H^+ + 0.25 OH^-$	-88,9	II.12
Acetato		
$CH_3COO^- + H_2O \rightarrow CH_4 + HCO_3^-$	-31,0	II.13
$CH_3COO^- + SO_4^{2-} \rightarrow HS + 2 HCO_3^-$	-47,6	II.14
Metanol		
$4 CH_3OH + 3 SO_4^{2-} \rightarrow 4 HCO_3^- + 3 HS + 4 H_2O + H^+$	-362,0	II.15
Hidrogênio		
$4 H_2 + SO_4^{2-} + H^+ \rightarrow HS + 4 H_2O$	-151,9	II.16

Após a completa redução do sulfato pelas BRS, é necessário re-oxidar o  $H_2S$  formado até enxofre elementar, o que permitirá a eliminação da poluição oriunda dos compostos de enxofre. Uma grande variedade de bactérias é capaz de oxidar o sulfeto até o enxofre elementar ou até o sulfato. Bactérias fotosintéticas oxidadoras do enxofre usam compostos reduzidos do enxofre como doadores de elétrons para a fixação redutiva do dióxido de carbono ( $CO_2$ ) durante o crescimento fotolitotrófico, enquanto que as bactérias do enxofre não fotossintéticas (chamadas de “colorless”) oxidam os compostos do enxofre no crescimento quimiolitotrófico (Madigan *et al.*, 1997), conforme a equação II.17.

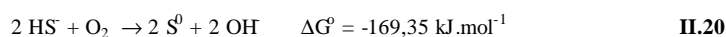


Onde:  $h\nu$  representa o acceptor final de elétrons.

A maioria dos estudos sobre a oxidação do sulfeto concentra-se na atividade das bactérias oxidadoras de enxofre “colorless”. Este grupo de bactérias usa o oxigênio molecular como o acceptor final de elétrons (Eq. II.18). Várias espécies deste grupo, também são capazes de desnitrificar, utilizando o nitrato ou nitrito como acceptor final de elétrons (equação II.19) (Lens & Kuenen, 2001). Esta oxidação é realizada, por exemplo, pelo gênero *Thiobacillus*, espécies como *T. denitrificans*.



O produto final da oxidação é na maioria dos casos o sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ). No entanto, a oxidação do  $\text{H}_2\text{S}$  ocorre em estágios, sendo que na primeira etapa de oxidação ocorre a formação do enxofre elementar ( $\text{S}^0$ ), conforme apresentado na Equação II.20. Para a remoção de enxofre das águas residuárias é importante que a oxidação do sulfeto de hidrogênio seja interrompida após a formação do enxofre elementar, porque este composto é um sólido coloidal passível de separação.



Para que ocorra a produção seletiva de enxofre elementar em biorreatores concebidos para tal fim, é necessário que o acceptor de elétrons (oxigênio ou, em alguns casos, o nitrato) seja o limitante do processo biológico. Caso o acceptor de elétrons esteja presente em excesso, o sulfato será preferencialmente o produto final (II.18 e 19), já que a energia livre obtida por esta reação é superior à da oxidação parcial.

### II.2.2. Desnitrificação Autotrófica

Como mencionado durante a introdução deste capítulo, após a apresentação dos ciclos do nitrogênio e do enxofre, será apresentada a interação entre estes dois ciclos que é realizada pelo processo de desnitrificação autotrófica via compostos reduzidos de enxofre, realizada por microrganismos como *T. denitrificans*.

Outras espécies de microrganismos presentes em diferentes ambientes naturais têm a habilidade de oxidar compostos de enxofre com a redução do nitrato. Dentre estas espécies destacam-se mais duas espécies de *Thiobacillus* (*T. versutus* e *T. thyasiris*), o *Thiomicrospira denitrificans*, *Beggiatoa* sp. e *Thiomargarita namibiensis*. Adiciona-se a esta lista *Thiosphaera panthotropha*, que, além desta atividade, é capaz de utilizar o

hidrogênio como doador de elétrons e pode desnitrificar em elevadas concentrações de oxigênio (3,8 mgO<sub>2</sub>/L) heterotroficamente (Kuenen et. al. , 1992<sup>1</sup> apud Chazal e Lens, 2000).

Os trabalhos apresentados na literatura, que reportam o uso de *T. denitrificans* para o tratamento de resíduos, seguiram dois caminhos distintos. O primeiro apresentou a aplicação da ação metabólica deste microrganismo para o tratamento de gases contendo H<sub>2</sub>S, sendo este composto transformado em sulfato sob condições aeróbias e anaeróbias (Sublete e Sylvester, 1987a). O segundo caminho apresenta a aplicação de *T. denitrificans* para o tratamento de água para consumo humano, pelo processo de desnitrificação autotrófica (Zang e Lampe, 1999).

Contudo, com o desenvolvimento dos conhecimentos sobre a fisiologia e a bioquímica de *T. denitrificans*, a sua aplicação em processos foi estendida a outros fins, como o tratamento de águas residuárias. As maiores alterações no metabolismo de *T. denitrificans* ocorrem devido às mudanças nas quantidades de acceptor de elétrons, que podem inibir alguns estágios do processo de oxidação.

Segundo Brüse et. al. (2000), a rota metabólica para a oxidação do tiosulfato pode ser representada pela Figura II.7, que apresenta a formação do enxofre elementar no espaço periplásmico, entre as membranas celulares. Nota-se que, além do enxofre elementar e do sulfato (principais produtos), existe uma grande variedade de compostos intermediários. Na limitação de acceptor de elétrons, as reações 1 e 2 (indicadas na Fig. II.7) são inibidas e a célula acumula o enxofre elementar.

Quando são observados os estados de oxidação do enxofre (Tabela II.2), nas suas diferentes espécies químicas, nota-se que o enxofre na forma de tiosulfato (estado de oxidação +2) é mais oxidado que o enxofre elementar (estado de oxidação, 0). Assim, para a formação do enxofre elementar no interior da célula, a partir do tiosulfato, é necessário uma etapa redutiva, apresentada na Fig.II.7.

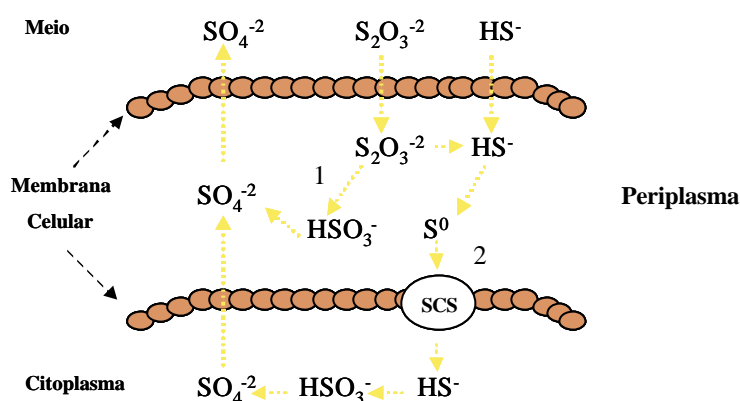
A enzima tiosulfato redutase é reportada como uma das responsáveis para o passo de clivagem do tiosulfato. Acredita-se que esta enzima converta o tiosulfato para sulfeto, o qual, como o sulfeto exógeno, é posteriormente oxidado a enxofre elementar no próprio periplasma. Assim, este enxofre elementar é estocado dentro do

---

<sup>1</sup> Kuenen J. G., Robertson L. A. e Tuovinen O. H. (1992). The genera *Thiobacillus*, *Thiomicrospira* e *Thiosphaera*; In Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W & Shlefer (Eds) *The Prokaryotes*, Vol. III, 2638-2657. Springer-Verlag, New York.

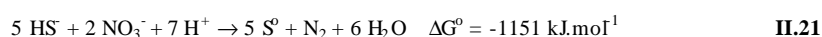
periplasma, mantendo a concentração de sulfeto próxima a zero (Schedel e Trüper, 1980).

Em experimentos utilizando processos descontínuos, realizados com *T. denitrificans* em uma relação 2,8 g S-S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/g N-NO<sub>3</sub> (doador / aceptor de elétrons), foi observado um depósito transiente de enxofre elementar no interior da célula sob uma forma reativa, até que todo o tiosulfato (doador de elétrons) tivesse sido consumido. Neste momento, a velocidade de oxidação do enxofre elementar a sulfato aumentou, atingido o seu valor máximo (Schedel e Trüper, 1980). Durante o acúmulo de S<sup>0</sup>, foi detectada a excreção deste composto da célula, formando o polissulfeto S<sub>8</sub>, que é insolúvel no meio aquoso e normalmente é depositado sobre a superfície da célula. A presença desta molécula é caracterizada pela coloração amarela alaranjado.



**Figura II. 7:** Formação do enxofre elementar na membrana celular (Figura adaptada de Brüse et. al., 2000)

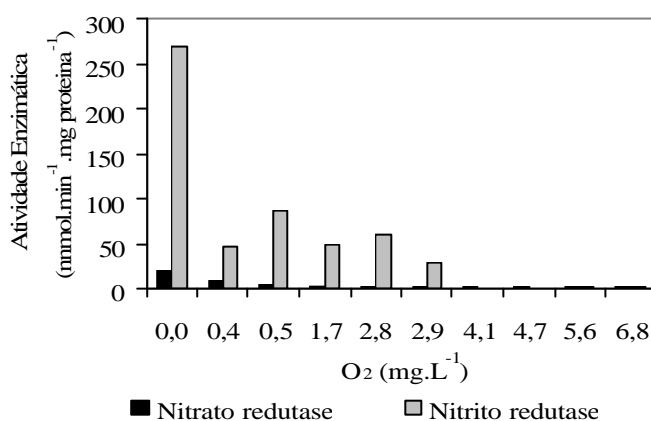
Recentemente foi apresentada a estequiometria da formação de enxofre elementar sob condições anóxicas, utilizando o nitrato como aceptor final de elétrons, que está apresentada na equação II.21 a seguir (Wang et. al., 2004).



Além da influência da relação doador / aceptor de elétrons sobre a oxidação do enxofre, alguns autores têm demonstrado que a redução do nitrato ou nitrito é também influenciada por esta relação. Em baixos valores da relação doador / aceptor de elétrons a redução do nitrato ou nitrito ocorre parcialmente, com a formação e acúmulo de intermediários como NO e N<sub>2</sub>O. Em valores altos, a redução do nitrato e nitrito ocorre até a formação do amônio, e não somente até N<sub>2</sub>. Os principais resultados atingidos com

a redução do nitrato a amônio, durante a desnitrificação autotrófica, foram obtidos com a utilização do  $H_2S$  como substrato (Brunet et. al., 1996).

Muitos dos microrganismos envolvidos na desnitrificação autotrófica são facultativos, pois, além do nitrato, podem utilizar o oxigênio como aceptor de elétrons, como já mencionado. Justin e Kelly (1978), em estudos fundamentais, realizaram o crescimento de *T. denitrificans* em biorreator laboratorial, sob condições contínuas de cultivo, submetido a diferentes concentrações de oxigênio dissolvido. Os autores observaram que a atividade desnitrificante via nitrato só foi observada nas culturas que cresceram em condições anaeróbias, enquanto que a atividade via nitrito foi observada após uma etapa de adaptação (fase lag) em média de 0,5 a 1 hora. Este fato foi relacionado com a presença das enzimas nitrito e nitrato redutase, que foram sintetizadas em concentrações de oxigênio inferiores a  $2,9 mgO_2/L$  e a  $0,4 mgO_2/L$ , respectivamente. Estes resultados podem ser observados na Figura II.8.



**Figura II. 8:** Atividade enzimática de nitrato redutase e nitrito redutase em função da concentração de oxigênio. (Dados experimentais de: Justin e Kelly,1978).

Com estes resultados, parece que o crescimento deste microrganismo em ambientes microaerados pode ser uma alternativa tecnológica interessante. Deve-se observar que, nestas mesmas condições, a oxidação parcial do amônio pode ser realizada, como anteriormente apresentado. Com estas informações da literatura, pode ser imaginada a completa integração dos ciclos do nitrogênio e do enxofre.

Esta integração poderá ser feita em ambientes microaerados e anóxicos. Numa primeira etapa microaerada ocorre a formação do nitrito, pela oxidação parcial do nitrogênio amoniacal e também a oxidação do sulfeto. Numa etapa posterior anaeróbia,

o sulfeto residual, ou uma fonte externa de sulfeto, será oxidado via nitrito, formado na etapa anterior, permitindo a desnitrificação deste nitrogênio. As reações que compõem esta integração dos ciclos do nitrogênio e do enxofre estão apresentadas na Tabela II.4. Destaca-se ainda que, se a quantidade de acceptor final de elétrons for limitante, as reações de oxidação do enxofre podem ocorrer somente até o enxofre elementar e não a sulfato.

**Tabela II. 4:** Reações catabólicas envolvidas na integração dos ciclos do nitrogênio e do enxofre.

Etapa do processo	Reação	Equação
	$H_2S + 2 O_2 \rightarrow SO_4^{2-} + 2 H^+$	<b>II.18</b>
Microaerada	$55 NH_4^+ + 76 O_2 + 109 HCO_3^- \rightarrow C_5H_7NO_2 +$ $54 NO_2^- + 57 H_2O + 104 H_2CO_3$	<b>II.1</b>
Anaeróbia	$3H_2S + 8NO_2^- + 2H^+ \rightarrow 3SO_4^{2-} + 4N_2 + 4H_2O$	<b>II.22</b>

### II.2.2.1. Processos de Tratamento

A aplicação do metabolismo de *T. denitrificans* ao tratamento de resíduos iniciou-se na década de 80, pelo processo de dessulfurização. Após, a sua potencialidade bioquímica de desnitrificação foi observada e aplicada ao tratamento de água potável.

Os problemas relativos à baixa velocidade de crescimento têm sido contornados pela utilização de processos com retenção celular, pelo crescimento aderido ou com a utilização de sistemas sofisticados de separação de sólidos (Koengi e Liu, 2001; Kimura et. al., 2002).

O desenvolvimento de sistemas de tratamento, aplicados ao processo de desnitrificação autotrófica, tem sido em reatores de leito fixo usando o enxofre elementar ( $S^0$ ) como meio suporte. Este processo tem sido aplicado normalmente ao tratamento de águas contendo um residual de nitrato na sua composição (Zang e Lampe, 1999). Outros tipos de reatores e aplicações do processo de desnitrificação podem ser observados na Tabela II.5.

**Tabela II. 5:** Processos envolvendo *T. denitrificans* aplicado ao tratamento de águas residuárias. Fonte: Adaptado de Lens e Hulshoff, 2000.

Natureza da Água Residuária	Características da operação do reator	Observações	Referencia
Efluente de tanque séptico com água de torneira e enriquecido com 40 mg N-NO <sub>3</sub> /L	Crescimento fixo em Enxofre elementar; inóculo foi <i>T. denitrificans</i> ATCC 23642; Reator operado como fluxo contínuo à 23 °C.	Desnitrificação completa com 3 horas de TRH e produção de 90 mg S SO <sub>4</sub> /L. Os autores assumem que a completa desnitrificação poderia ocorrer a 5°C, entre TRH de 1,5 a 2 dias.	Sikora e Keeney (1976)
Água residuária sintética com 25 – 50 mg N-NO <sub>3</sub> /L	Reator de fluxo contínuo alimentado com sulfeto/ Óxido de Cálcio e com crescimento fixo em enxofre elementar; Inoculado com cultura enriquecida de <i>T. denitrificans</i> a partir de tiosulfato; Reator operado à 20 °C.	A completa desnitrificação foi atingida na presença tanto de sulfeto e enxofre elementar. Os tamanhos das partículas de enxofre elementar influenciaram o THR mínimo que poderia ser aplicado.	Driscoll e Bisogni (1978)
Água residuária sintética	Reator de leito fluidificado usando tiosulfato ou enxofre elementar com substrato, sendo operado à 20 °C. Foi inoculado com esgoto doméstico e a partida do reator foi feita com tiosulfato	A desnitrificação com tiosulfato foi estável ao contrário da desnitrificação via enxofre elementar,	Matsui e Yamamoto (1986)
Água residuária de coluna de troca iônica	Reator de leito fixo com enxofre elementar, operado à 20 °C; Inoculado com <i>T. denitrificans</i> enriquecido com tiosulfato.	Demonstrou o potencial de aplicação para efluentes salinos (30 g/L de NaCl), operando com uma carga nitrogenada de 1 Kg N-NO <sub>3</sub> /m <sup>3</sup> .d, atingindo 90% de desnitrificação	Sant'Anna et. al. (1996)

Contudo, principalmente nos processos com crescimento aderido, a potencialidade de utilização plena da variedade metabólica de *T. denitrificans* fica limitada ao processo de desnitrificação ou à oxidação total dos compostos reduzidos de

enxofre (formação do sulfato). Nestes tipos de processos elimina-se a possibilidade da aplicação da oxidação parcial de compostos reduzidos de enxofre ( $\text{H}_2\text{S}$  e  $\text{S}_2\text{O}_3^-$ ) a enxofre elementar, o que caracterizaria a remoção biológica do enxofre. Desta forma, o enxofre elementar formado no interior das células não será removido do reator, pois a biomassa estará fixa no leito do sistema.

Poucos processos têm sido desenvolvidos no sentido da formação do enxofre elementar durante o processo de desnitrificação autotrófica. Assim, acredita-se que a potencialidade de aplicação de microrganismos como *T. denitrificans* seja maior do que esta apresentado pela literatura até o presente momento.



---

---

### CAPÍTULO III – OBJETIVOS

#### Objetivo Geral:

- O principal objetivo deste trabalho é promover a eliminação biológica do nitrogênio via a integração dos ciclos do nitrogênio e enxofre, pela ação das bactérias oxidadoras de amônio e das desnitrificantes autotróficas, como *T. denitrificans*, sob aeração intermitente.

#### Objetivos Específicos:

- Determinar as condições ambientais favoráveis para o crescimento de uma cultura pura de *Thiobacillus denitrificans*, nas quais se tenha velocidade de crescimento expressiva concomitantemente atividade de desnitrificação autotrófica;
- Verificar a influência da relação doador de elétrons (tiosulfato) e aceptor (nitrito) na oxidação do tiosulfato, durante a desnitrificação autotrófica;
- Estabelecer em reator SBR (Sequencing Batch Reactor), contendo a cultura mista de células selecionadas (Nitrificantes / Oxidadoras de tiosulfato), a eliminação autotrófica de nitrogênio, identificando o comportamento fisiológico dos microrganismos e a potencialidade de remoção, em um ciclo de aeração intermitente e diferentes relações de nitrogênio amoniacal e tiosulfato.
- Avaliar a comunidade de microrganismos presentes no reator SBR, identificando as principais espécies e ou grupos envolvidas no processo proposto, pela técnica de Hibridização *in-situ* por fluorescência - FISH

## CAPÍTULO IV – MATERIAIS E MÉTODOS

### IV.1. Estratégia de ação

A metodologia utilizada para atingir os objetivos traçados está composta de estudos das características de crescimento, usando uma cultura pura de *Thiobacillus denitrificans* e, paralelamente, o estabelecimento do processo proposto neste trabalho, com a operação do reator SBR inoculado com a cultura mista de microrganismos nitrificantes e oxidadores de enxofre.

O desenvolvimento do trabalho referente à cultura pura (CP) tem como objetivo aprofundar o conhecimento sobre *T. denitrificans*, que se imagina ser o microrganismo responsável pela integração dos ciclos de enxofre e nitrogênio, sendo de fundamental importância para este novo processo. Assim, os primeiros experimentos foram feitos para avaliar a influência da composição do meio de cultura (indicado pelo ATCC) no seu crescimento, mais especificamente a adição de extrato de levedura, como suplemento alimentar, e a adição de glicose.

Com as condições de crescimento determinadas, a etapa seguinte foi desenvolvida com o intuito de observar o efeito da adição de tiosulfato no balanço de enxofre durante o crescimento de *T. denitrificans*. Para isto, foram realizados ensaios com a cultura pura de *Thiobacillus denitrificans* (ATCC 23642), em diferentes concentrações de tiosulfato de sódio (doador de elétrons) e de extrato de levedura.

O estudo da cultura mista (CM) no reator SBR foi iniciado com o desenvolvimento das células oxidadoras de amônia e das oxidadoras de enxofre. Esta etapa foi realizada por meio da adição de concentrações de nitrogênio amoniacal e tiosulfato como únicos substrato ao inóculo utilizado, sob aeração contínua (100% aeróbio). Este ensaio foi realizado simultaneamente aos experimentos com a cultura pura (CP).

O estabelecimento do processo proposto neste trabalho iniciou-se com a caracterização do processo sob aeração contínua e, após, foi aplicado um ciclo de aeração de 15 minutos e 45 sem aeração, a fim de estabelecer a oxidação parcial da amônia e a desnitrificação autotrófica. Após o estabelecimento do processo, foi alterada

a relação entre nitrogênio amoniacal e tiosulfato, com o objetivo de otimizar-se a eficiência de remoção de nitrogênio e, se possível, realizar a oxidação parcial do enxofre. Com a intenção de obter a melhor performance do sistema experimental, durante a operação do reator SBR, foi necessário substituir o ciclo de aeração utilizado (15 minutos com aeração e 45 sem aeração) por um ciclo com períodos sem aeração mais longos, já que nesta nova condição, períodos aerados com vazões de ar maiores foram utilizadas. Este novo ciclo de aeração era composto de períodos de 15 min, de aeração e 60min, sem aeração.

## **IV.2. Ensaios com a cultura pura de *T. denitrificans***

### **IV.2.1. Microrganismo e Meio de cultura**

Neste trabalho uma cultura pura de *Thiobacillus denitrificans*, ATCC 23642, foi utilizada nos experimentos que avaliaram a influência das condições ambientais na atividade deste microrganismo. Um estoque desta cultura de células foi mantida em placas de Petri, contendo o meio indicado pela ATCC, adicionado de agar, conforme a Tabela IV.1. Estas placas foram mantidas sob condições assépticas em um ambiente refrigerado, na temperatura de 5°C, por no máximo 3 meses. Após este período, novas placas eram confeccionadas e uma parte da cultura anterior era transferida para estas novas placas de petri.

A partir destas placas de Petri, contendo *T. denitrificans*, foi possível padronizar a condição fisiológica do microrganismo, para posterior utilização destes nos experimentos realizados. Assim, antes do começo de cada experimento, era realizada uma raspagem das células de uma dessas placas de Petri e parte dos microrganismos nela presentes, era transferida para um tubo de ensaio, contendo 5mL do meio líquido ATCC, sem o agar (Tabela IV.1). Este tubo de ensaio era então mantido a 30°C, numa incubadora, para crescimento e adaptação de *T. denitrificans* ao meio líquido.

Decorrido este tempo de uma semana, 2,5 mL do meio de cultura do tubo de ensaio, contendo *T. denitrificans*, eram utilizados como pré-inóculo. Este volume foi transferido para um erlenmeyer, contendo 22,5 mL do meio ATCC (Tabela IV.1), adicionado de extrato de levedura, de modo que a concentração deste composto fornecesse DQO de 250 mg/L. Estes erlenmeyres eram mantidos a 30°C, por um período de 12 horas, tempo suficiente para que o microrganismo atingisse a fase exponencial de crescimento.

**Tabela IV. 1:** Meio de cultura indicado pela ATCC.

Composto	Concentração (g/L)
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	15,6
$\text{NaNO}_3$	5
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	1,2
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,8
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,1
$\text{CaCl}_2$	0,03
$\text{FeCl}_3$	0,02
$\text{MnSO}_4$	0,02
$\text{NaHCO}_3$	0,5
Agar	100

O exato controle deste tempo foi realizado pelo acompanhamento do valor da absorbância medido no comprimento de onda de 460nm, conforme indicado por Justin e Kelly (1978). Quando o valor da absorbância fosse de 0,25, a cultura de células presentes no erlenmayer estava no meio da fase exponencial de crescimento e pronta para ser utilizada como inóculo nos experimentos. Com este controle, a quantidade de microrganismos utilizados como inóculo foi padronizada, já que o valor da absorbância é função do valor da concentração celular.

A quantidade de inóculo utilizada nos experimentos realizados neste trabalho foi de 10% do volume total do experimento.

### IV.2.2. Planejamento Experimental

O primeiro estudo envolvendo a cultura pura (CP) foi realizado no intuito de estabelecer as melhores condições de crescimento para *T. denitrificans*, que compreende os experimentos CP 01, CP 02, e CP 03, nos quais duas diferentes fontes de carbono (suplementos alimentares - glicose e extrato de levedura) foram ensaiadas, mantendo-se um mesmo teor inicial de DQO (Demanda Química de Oxigênio). Após, alterou-se a concentração da fonte de carbono que influenciou o crescimento, compreendendo os experimentos CP 04 até CP 09. As condições experimentais de cada ensaio estão apresentadas na Tabela IV.2. Durante estes ensaios, a mesma concentração de tiosulfato (doador de elétrons) e nitrato (aceptor de elétrons) foram mantidas, nos valores de 300 mgS-S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/L e 300 mgN-NO<sub>3</sub>/L, respectivamente. As concentrações de macro e micronutrientes foram mantidas iguais às do meio de cultura (Tabela IV.1), indicado pela ATCC, descrito anteriormente.

**Tabela IV. 2:** Composição dos meios utilizados nos experimentos.

Experimento	[Extrato de Levedura] <sup>1</sup>	[Glicose] <sup>1</sup>
CP 01	0	0
CP 02	500	0
CP 03	0	500
CP 04	0	250
CP 05	0	100
CP 06	0	50
CP 07	1000	0
CP 08	250	0
CP 09	100	0

<sup>1</sup> – concentração como DQO, em mg O<sub>2</sub>/L.

Para a formulação dos diferentes meios utilizados nestes experimentos (CP 01 até CP 09) tinha-se uma solução estoque de tiosulfato de sódio (0,1N), de nitrato de sódio (3gN-NaNO<sub>3</sub>/L), de extrato de levedura (3gDQO/L) e de glicose (3gDQO/L). Para cada experimento, era calculado o volume necessário destas soluções estoque, para

que as condições experimentais (Tabela IV.2) fossem atingidas. Estes volumes eram adicionados ao meio de cultivo, apresentado na Tabela IV.1 (sem agar, tiossulfato de sódio e nitrato de sódio).

Somente o tiossulfato de sódio foi adicionado separadamente dos demais compostos e somente após o meio anterior, contendo  $\text{NaNO}_3$ , extrato de levedura ou glicose, e macro e micronutrientes (Tab. IV.1), terem sido esterilizados em auto-clave a  $121^\circ\text{C}$ , por 15 minutos. A adição do tiossulfato de sódio estéril foi realizada com o uso de membranas de filtração de  $0,2\mu\text{m}$  de porosidade, procedimento este realizado em câmara de fluxo laminar, previamente esterilizada.

Estes experimentos foram realizados em tubos de ensaio, de 28 mL de volume total, com tampa de rosca. Nestes tubos eram colocados 22,5 mL do meio de cultivo descrito anteriormente, nas concentrações apresentadas na Tabela IV.2, e 2,5mL do inoculo descrito no item IV.2.1. A temperatura dos experimentos foi de  $30^\circ\text{C}$  e o pH final do experimento era de 7,5, o mesmo do meio de cultivo. Um Shaker, da marca TECNAL, modelo TE 420, foi utilizado nestes experimentos, operado em uma rotação de 150rpm.

A cada 4 horas, três dos tubos de ensaio, inoculados com *T. denitrificans* era retirado do Shaker. Primeiramente, o meio de cultivo era filtrado em membrana  $0,2\mu\text{m}$  e, após, procedia-se a análise de sólidos suspensos totais (SST), nitrato e sulfato.

O segundo estudo envolvendo a cultura pura (CP) foi realizado com o intuito de verificar a influência da concentração de tiossulfato na fisiologia de *T. denitrificans*, tendo-se como resposta as alterações ocorridas no balanço de enxofre após o período de 5 dias de experimento. Simultaneamente, a influência da concentração de extrato de levedura foi estudada, pela adição deste composto aos experimentos, juntamente com o tiossulfato. Assim, teve-se a resposta de como estas duas variáveis influenciam na fisiologia de *T. denitrificans*. A concentração de nitrato inicial foi de  $300\text{mgN-NO}_3/\text{L}$ , para todos os experimentos.

Para isto, foi construído um planejamento experimental estatístico, tipo “estrela”, com duas variáveis (fatores), onde o nível inferior destas variáveis foi -1,41 e o superior foi +1,41, sendo que estes valores representam a distância destes níveis ao ponto central (0). A distância entre um nível e outro é definida pelo número de fatores

(variáveis) em estudo, pela relação:  $(2^n)^{1/4}$ . Neste planejamento, o experimento realizado na condição central, onde o nível das variáveis era de 0, foi feito em triplicada.

Para definição do valor da concentração de tiosulfato ou extrato de levedura que representa cada nível (+ ou - 1,41) é necessário conhecer qual é o maior e o menor valor desta concentração que deseja-se estudar. No caso do tiosulfato de sódio, desejava-se iniciar o estudo numa concentração de 300mg/L de S-S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e finalizar em uma concentração em que houvesse limitação do acceptor de elétrons, imaginando-se a estequiometria da desnitrificação autotrófica apresentada na equação II.21. Assim, definiu-se que o intervalo entre o nível -1,41 até o ponto central (nível 0) representa um aumento no valor da concentração de tiosulfato de 469mgS-S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/L. Desta forma, pode-se determinar as concentrações para os demais níveis exigidos pelo planejamento experimental. Os níveis das concentrações de tiosulfato e extrato de levedura utilizado nos experimentos estão apresentados na Tabela IV.3 e as condições experimentais dos ensaios realizados, na Tabela IV.4.

**Tabela IV. 3:** Níveis das concentrações de tiosulfato e extrato de levedura.

Nível	Concentração	
	S-S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (mg/L)	Extrato de Levedura (mg/L)
-1,41	300	0
-1,00	436	101
0,00	769	249
1,00	1102	351
1,41	1239	499

Estes experimentos foram realizados conforme descrito anteriormente, para o primeiro estudo realizado com a cultura pura. A única diferença é que não houve a retirada de tubos de ensaio em diferentes tempos de experimento, já que não se desejava realizar um estudo cinético.

Para a avaliação destes experimentos, foram determinadas as variações das concentrações de tiosulfato de sódio e sulfato, podendo-se, assim, determinar o efeito destas variáveis sobre o balanço de massa. A Equação IV.1 apresenta o balanço de

enxofre, que indica a quantidade de enxofre não detectado analiticamente (S %), determinada pela diferença entre o tiosulfato oxidado ( $S-S_2O_{3i} - S-S_2O_{3f}$ ) e o sulfato produzido.

$$S (\%) = \frac{((S - S_2O_{3i}) - (S - S_2O_{3f})) - (S - SO_{4f})}{((S - S_2O_{3i}) - (S - S_2O_{3f}))} * 100 \quad \text{IV.1}$$

onde:  $S-S_2O_{3i}$  = concentração de tiosulfato no início do experimento (mg $S-S_2O_3/L$ );

$S-S_2O_{3f}$  = concentração de tiosulfato no final do experimento (mg $S-S_2O_3/L$ );

$S-SO_{4f}$  = concentração de sulfato no final do experimento (mg $S-SO_4^{-2}/L$ ).

Tabela IV. 4: Condições experimentais dos ensaios do planejamento estatístico.

Experimento	Tempo (dias)	S2O3	DQO
CP 10	5	-1,00	-1,00
CP 11	5	-1,00	1,00
CP 12	5	1,00	-1,00
CP 13	5	1,00	1,00
CP 14	5	-1,41	0,00
CP 15	5	1,41	0,00
CP 16	5	0,00	-1,41
CP 17	5	0,00	1,41
CP 18	5	0,00	0,00
CP 19	5	0,00	0,00
CP 20	5	0,00	0,00



### IV.3. Ensaios com a cultura mista – Operação do Reator SBR

#### IV.3.1. Microrganismos e Meio de cultura

Como inóculo para o reator SBR utilizou-se uma cultura mista de microrganismos oxidadores de amônia e de tiosulfato, selecionados a partir de um lodo de um sistema de tratamento de esgoto sanitário, da estação de tratamento da cidade de Florianópolis, da companhia de saneamento local (CASAN – Companhia Catarinense de Águas e Saneamento).

A etapa de seleção dos microrganismos foi constituída da operação de um reator SBR, de 20 L de volume útil, operado com um tempo de residência hidráulico (TRH) de 10 dias, em que os principais substratos foram a amônia e o tiosulfato. Desta forma, imaginava-se que somente os microrganismos que são aptos a oxidar estes compostos tiveram a oportunidade de crescer no reator. O pH foi controlado no valor de 7,5, pela adição de NaOH (10% p/v), e a temperatura do sistema foi mantida próxima a 30°C, pelo uso de uma resistência termostatzada, da marca ATMAN, modelo AT50w. O oxigênio foi suprido ao reator através da rede local de ar comprimido e dispersado no meio líquido por uma pedra porosa. Estas condições permitem, também, a agitação do sistema.

O meio de cultivo utilizado está descrito na Tabela IV.5, sendo que a concentração de  $\text{NH}_4^+$  e de  $\text{S}_2\text{O}_3^-$ , durante o procedimento de obtenção do inóculo, foram crescentes. Partiu-se de uma concentração de 50 mgN-NH<sub>4</sub>/L e 50 mgS-S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/L e estes valores foram aumentados até que a concentração de ambos atingisse 200 mg/L de N-NH<sub>4</sub> ou de S-S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

**Tabela IV. 5:** Composição do meio de cultivo utilizado na operação do reator SBR.

Composto	Concentração (g/L)
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,8
NH <sub>4</sub> Cl	0,8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,125
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,046
NaHCO <sub>3</sub>	3
NaCl	0,5
Micronutrientes	0,4ml/L

Este meio de cultivo (Tab. IV.5), utilizado para a obtenção do inóculo e para a operação do reator SBR, é basicamente o indicado por Campos et. al. (1999), adicionado-se o tiosulfato de sódio e alterando-se a quantidade de bicarbonato, a fim de tamponar o valor do pH do reator em 7,5. A concentração do tiosulfato de sódio, apresentada na Tabela IV.5, refere-se à concentração da primeira condição experimental aplicada no reator SBR (vide Tabela IV.7). Somente esta concentração foi alterada nas condições experimentais seguintes.

A solução de micronutrientes utilizada na formulação da água residuária sintética está apresentada na Tabela IV.6.

**Tabela IV. 6:** Solução de micronutrientes proposta por Campos et. al (1999)

Composto	Concentração (g/L)
EDTA	50
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	1,036
$\text{MnCl}_2$	3,220
$\text{ZnSO}_4$	12,354
$\text{CaCl}_2$	5,540
$\text{CoCl}_2$	0,880
$\text{CuSO}_4$	1,004
$\text{FeSO}_4$	2,728

### IV.3.2. Sistema Experimental

O reator utilizado no desenvolvimento do processo de desnitrificação autotrófica, via a integração dos ciclos do nitrogênio e do enxofre, foi construído de 2 tubos de acrílico concêntricos, com diâmetro de 15 e 18 cm, fixados em uma placa de vidro, de modo a formar uma camisa de aquecimento no espaço entre os cilindros de maior e o de menor diâmetro. A altura dos cilindros era de 18cm cada um. Na camisa de aquecimento, água era recirculada para manter a temperatura do sistema próxima a 30°C. Esta água era aquecida por um banho termostatizado.

No tubo interno de acrílico, foram fixadas quatro haletas na borda interna deste tubo, para garantir melhores condições de agitação no reator. Um agitador magnético, da marca Fisaton, foi utilizado durante toda a operação do reator SBR. A rotação foi mantida constante em 300 rpm. Na Figura IV.1 pode ser observado uma foto do sistema experimental utilizado neste trabalho.



**Figura IV.1:** Sistema experimental utilizado para o estabelecimento do processo de nitrificação autotrófica e nitrificação parcial.

A alimentação do reator foi feita durante um ciclo de 23,5 horas, sendo distribuída uniformemente durante este período. O período de sedimentação correspondeu a 0,5 hora, completando um ciclo de 24 horas de operação deste sistema. A cada ciclo eram alimentados 1L da água residuária sintética. Ao final de cada ciclo, este volume de alimentação era retirado do reator e o volume reacional retornava ao valor inicial de 1L. Assim, o tempo de retenção hidráulica (TRH) do sistema foi de 48 horas.

A adição de oxigênio no sistema foi realizada intermitentemente durante as condições II a IV, utilizando-se um temporizador (“timer”) como o controle do tempo aerado. Porém, mesmo durante o período em que o reator não era submetido à aeração, o conjunto das características geométricas do reator, da agitação fornecida e do tipo de alimentação praticado, possibilitou uma transferência de oxigênio pela superfície do líquido presente no tubo interno do reator. Esta transferência de oxigênio foi quantificada em diferentes volumes do reator, variando de 1 a 2 litros, pela adição de diferentes volumes da água residuária sintética. Desta forma, teve-se a variação do

coeficiente de transferência volumétrico de oxigênio ( $K_{LA}$ ) com o volume do reator, que está apresentada na Figura IV.2.

Em cada batelada adicionada ao reator, a concentração de oxigênio do meio era reduzida até um valor próximo a zero, pelo borbulhamento de um gás inerte (Argônio, 98% de pureza). A concentração de oxigênio foi medida pelo oxímetro, marca WTW, modelo OXI 340 / SET. Após este procedimento, eram mantidas as condições de agitação em que o reator foi operado e, então, iniciava-se o registro dos valores da concentração de oxigênio dissolvido do líquido.

A partir destes valores, o coeficiente de transferência volumétrico de oxigênio foi determinado, conforme o procedimento proposto por Schmidell e Zdradek (2005). Quando não existe o consumo de oxigênio, estes autores propõem utilizar a equação IV.2 para esta determinação, que correlaciona os valores da concentração de oxigênio dissolvido, com os valores do  $K_{LA}$  e o tempo do experimento.

$$\ln\left(\frac{(O_2^{SAT} - O_{2t})}{(O_2^{SAT} - O_{20})}\right) = K_{LA} * t \quad \text{IV.2}$$

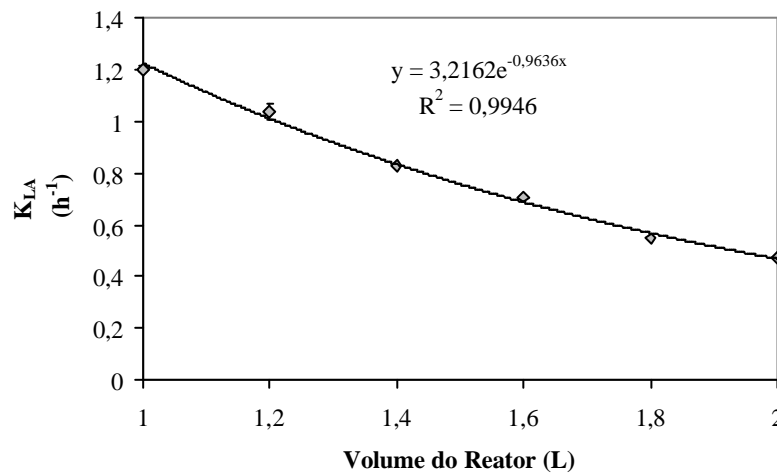
Onde:  $O_{20}$  = concentração de oxigênio no início do experimento ( $t = 0$ ) (mg/L);

$O_2^{SAT}$  = concentração de oxigênio na saturação, cujo valor de 7,5mg/L foi estimado (APHA, 1995);

$O_{2t}$  = concentração de oxigênio no tempo  $t$ ; e  $t$  é o tempo de experimento (mg/L);

$K_{LA}$  = coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $h^{-1}$ );

$t$  = tempo (h).



**Figura IV. 2:** Variação do valor do  $K_{LA}$  em relação ao volume do reator SBR.

Com estes resultados, foi construída a Figura IV.2 e determinada a relação entre o valor do  $K_{LA}$  e o volume do reator, pela equação exponencial apresentada nesta figura. Com esta relação foi possível considerar a transferência de oxigênio na quantificação das velocidades de respiração (descritas no item IV.3.6), bem como na quantificação do oxigênio consumido nos diferentes “pseudos” estados estacionários atingidos com a operação do reator SBR.

### IV.3.3. Planejamento Experimental

Inicialmente, o desempenho do reator foi avaliado sem limitação de oxigênio (Condição I) e com a limitação de oxigênio, através da aplicação de um ciclo intermitente com 15 minutos de aeração e 45 sem aeração (Condição II). Com estes resultados, foi possível estabelecer parte do processo e, na seqüência destes experimentos, foram pesquisadas em diferentes relações de tiosulfato e amônia. Os valores da concentração de tiosulfato e de nitrogênio amoniacal para as condições ensaiadas estão apresentados na Tabela IV.7.

Com os resultados atingidos com a condição II e III-1, observou-se a necessidade da prática de vazões maiores de ar. Assim, a vazão de ar foi aumentada de 0,3 L/min para 1,5L/min de ar. Neste momento, o ciclo de aeração foi alterado para 60 min. sem aeração e 15 min. aerado, durante as condições III-2 e IV.

**Tabela IV. 7:** Condições operacionais aplicadas no reator SBR

Condição	[N-NH <sub>4</sub> ] (mg/L)	[S-S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ] (mg/L)	Tempo de operação (d)
I (Sem Limitação de O <sub>2</sub> )	190	200	80
II (45min. sem e 15min. com aeração)	230	200	80
III-1 (45min. sem e 15min. com aeração)	236	350	40
III-2 (60min. sem e 15min. com aeração)	236	350	40
IV (60min. sem e 15min. com aeração)	247	500	60

Em cada condição, foi avaliado o desempenho do reator através das análises do consumo dos substratos e produção dos produtos, pelos balanços de massa, além das medidas cinéticas de consumo de oxigênio (respirometria) e da medida da atividade desnitrificante via nitrato e nitrito.

#### **IV.3.4. Determinações analíticas**

##### **IV.3.4.1. Determinação de amônia**

A determinação da concentração de nitrogênio amoniacal foi realizada pelo método de Nessler, apresentado por Vogel (1981). A metodologia consiste da adição de 0,1mL do reativo de Nessler a 5mL da amostra. Após 10min, é formado o produto da reação do amônio com o reativo, que possui uma cor amarelo-alaranjado. Neste momento, deve-se proceder à medida do valor da absorbância em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 525nm. A faixa de leitura deste método é de 0 a 20mg/L de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. O espectrofotômetro utilizado foi da marca Hach, modelo DR-2010.

##### **IV.3.4.2. Determinação de nitrito**

Esta determinação foi feita pelo uso de kits analíticos, da marca Hach, método 8153 apresentado no manual de análises e procedimentos desta companhia. O kit utilizado era denominado de NitraVer 2. A metodologia consistia da adição de um envelope do kit em 10ml de amostra, estando o método baseado na formação de um produto colorido, que é resultado da redução do nitrito para óxido nitroso e da reação deste composto com o cádmio.

Após o tempo de 10min, necessário para que a reação seja completa, a leitura da absorbância era realizada no espectrofotômetro, no comprimento de onda de 585nm. A faixa de leitura do método é de 0 até 45mgN-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L.

##### **IV.3.4.3. Determinação de nitrato**

Esta medida está baseada no procedimento descrito por Cataldo *et. al.* (1975). Consiste da adição de 0,8 mL do reagente proposto por este autor, uma solução de 5% de ácido salicílico em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, em 0,2ml de amostra. Esperava-se 20min e se adicionava 19ml de uma solução de NaOH 2N, então fazia-se a leitura no espectrofotômetro, no comprimento de onda de 410nm. A faixa de medida é de 0 até 70mg/L de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

#### **IV.3.4.4. Determinação de sulfato**

Esta determinação foi feita pelo uso de kits analíticos da marca Hach, método 8051 apresentado no manual de análises e procedimentos desta companhia. O kit utilizado era denominado de SulfaVer 4. A metodologia consistia da adição de um envelope do kit em 25ml de amostra, estando o método baseado na formação de um produto colorido, que é o resultado da reação do sulfato com o cloreto de bário.

Após o tempo de 10 min, necessário para que a reação seja completa, a leitura da absorbância era realizada no espectrofotômetro, no comprimento de onda de 450nm. A faixa de leitura do método é de 0 até 30mgS-SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>/L.

#### **IV.3.4.6. Determinação de tiosulfato**

A determinação da concentração de tiosulfato foi realizada pelo método apresentado por Vogel (1981). A metodologia consiste da titulação de 20ml de uma solução estabilizada de iodo na presença de 6ml de HCl 6N, acrescida de um volume conhecido de amostra, por uma solução padrão de tiosulfato de sódio. O ponto final da titulação era determinado quando a cor laranja da solução de iodo desaparecesse.

#### **IV.3.4.7. Determinação de Sólidos Suspensos Totais - SST**

A determinação da concentração celular foi realizada através da determinação dos sólidos suspensos totais, por meio da filtração da amostra em membrana de acetato de celulose 0,45µm, previamente seca e pesada. Esta membrana foi seca em forno microondas, ajustando-se a potencia de 180 Watts, durante 15min. (Olsson e Nielsen, 1997). Após, pesou-se novamente esta membrana, que agora continha os sólidos retidos. Conhecendo-se estas massas, foi possível determinar a concentração celular (SST).

#### **IV.3.5. Respirometria**

A técnica de respirometria consiste da medida da velocidade específica de consumo de oxigênio ( $q_{O_2}$ ), grandeza esta que apresenta uma relação linear com a velocidade específica de crescimento e de consumo de substrato. A medida do  $q_{O_2}$  foi realizada com o lodo do reator SBR, nos diferentes “pseudos” estados estacionários atingidos, nas condições apresentadas na Tabela IV.7. Para isto utilizou-se um medidor de oxigênio dissolvido marca WTW, modelo OXI 340 / SET.

As determinações destas velocidades foram realizadas separadamente para as bactérias oxidadoras de amônio e para as bactérias oxidadoras de enxofre, pela adição

separada dos seus respectivos substratos e, quando, a concentração de um dos substratos era próxima a zero. Para a determinação destas velocidades durante este trabalho foram utilizados três procedimentos experimentais diferentes, todos baseados na equação do balanço de oxigênio (Eq. IV.3), seguindo as recomendações relatadas por Schmidell e Zdradek (2005).

$$\frac{dO_2}{dt} = K_L A * (O_2^{SAT} - O_2) - q_{O_2} * X \quad \text{IV.3}$$

Onde:  $O_2$  = concentração de oxigênio do experimento (mg/L);

$O_2^{SAT}$  = concentração de oxigênio na saturação (7,5mg/L - APHA, 1995);

$K_L A$  = coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $h^{-1}$ );

$q_{O_2}$  = velocidade específica de consumo de oxigênio (mgO<sub>2</sub>/gSST.h);

$X$  = concentração celular (gSST/L).

#### ***Técnica 1 – Medida direta do $q_{O_2}$***

Esta determinação foi utilizada no acompanhamento das velocidades de consumo de oxigênio, das bactérias oxidadoras de amônia e de enxofre, durante a operação do reator. Este procedimento foi realizado no próprio reator, ao final de cada ciclo, quando o volume do sistema era de 2L. A temperatura e o pH do reator foram controlados em 30°C e 7,5, respectivamente.

Inicialmente, a aeração e a bomba de alimentação do reator foram desligadas. Neste momento, foi medida a queda no valor da concentração de oxigênio dissolvido ao longo do tempo, determinando-se assim o valor da velocidade específica de consumo de oxigênio endógena ( $q_{O_2 \text{ end.}}$ ), que refere-se à atividade devida aos residuais mínimos de substrato e ao consumo de oxigênio necessário para a manutenção da fisiologia dos microrganismos.

Após este procedimento, a aeração foi re-ligada e a concentração de oxigênio dissolvido retornou ao nível próximo a saturação (7,5mgO<sub>2</sub>/L). Então, nesta condição, novamente a aeração era interrompida e a medida da queda da concentração de oxigênio foi determinada, após a adição de um dos substratos específicos para as bactérias oxidadoras de amônia (BOA) ou para as bactérias oxidadoras de enxofre (BOS), por um pulso de uma solução de amônia ou de tiosulfato, conforme o caso. Este procedimento



era realizado garantindo que, no início de cada medida, a quantidade de um dos substratos estava em excesso, numa concentração no meio líquido de 20mg/L para estes compostos, enquanto a do outro substrato era próxima a zero. Um exemplo de valores obtidos com esta determinação pode ser observado na Figura IV.3.

Nestas condições apresentadas, deve-se ainda considerar a transferência de oxigênio pela superfície do líquido, conforme apresentado na Figura IV.2. Desta forma, para a determinação do valor do  $q_{O_2}$  foi utilizado a equação IV.4.

$$q_{O_2} = \left( K_{LA} * (O_2^{SAT} - O_2) - \frac{dO_2}{dt} - q_{O_2\text{end}} * X \right) * \frac{1}{X} \quad \text{IV.4}$$

Onde:  $O_2$  = concentração de oxigênio do experimento (mg/L);

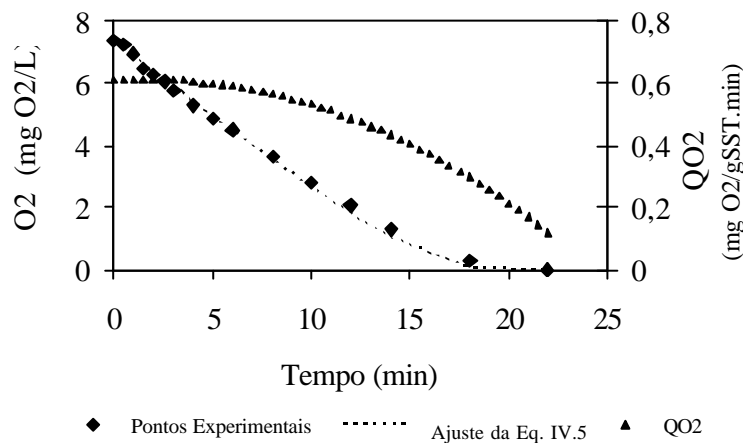
$O_2^{SAT}$  = concentração de oxigênio na saturação (7,5mg/L - APHA, 1995);

$K_{LA}$  = coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $h^{-1}$ );

$q_{O_2}$  = velocidade específica de consumo de oxigênio ( $mgO_2/gSST.h$ );

$q_{O_2\text{end}}$  = velocidade endógena de consumo de oxigênio ( $mgO_2/gSST.h$ );

$X$  = concentração celular (gSST/L).



**Figura IV. 3:** Curva típica obtida no experimento de respirometria – Técnica 1.

De posse dos valores de velocidade específica de consumo de oxigênio, nos diferentes valores de “ $\frac{dO_2}{dt}$ ” e nas respectivas concentrações de oxigênio dissolvido, foram estimados os parâmetros da Eq.IV.5. Para isto, o programa Statistic foi utilizado

como ferramenta nesta estimação e o método matemático de regressão não linear foi usado.

$$q_{O_2} = q_{O_2MAX} * \frac{O_2}{O_2 + K_o} \quad \text{IV.5}$$

Onde:  $q_{O_2}$  = velocidade específica de consumo de oxigênio (mgO<sub>2</sub>/gSST.h);

$q_{O_2MAX}$  = velocidade específica máxima de consumo de oxigênio (mgO<sub>2</sub>/gSST.h);

$O_2$  = concentração de oxigênio (mg/L);

$K_o$  = constante de saturação (mgO<sub>2</sub>/L).

### ***Técnica 2 – Medida Indireta do $q_{O_2X}$***

Este procedimento foi utilizado exclusivamente na determinação da influência do tempo de aeração na fisiologia das bactérias oxidadoras de enxofre, realizado durante a condição IV, da operação do reator SBR. Esta medida foi realizada no próprio reator SBR, novamente quando o reator tinha o volume igual a 2L. Nas mesmas condições descritas para o procedimento anterior.

Para a determinação do  $q_{O_2X}$  nestas condições foi necessário primeiro determinar o valor do  $K_{LA}$ . Para isto, seguiu-se as recomendações de Schmidell e Zdradek (2005), para o método de determinação conjunta de  $K_{LA}$  e  $q_{O_2}$  durante processos fermentativos. Assim, em um determinado momento, a aeração foi interrompida e determinado o valor do  $q_{O_2}$ , conforme feito no método anterior. Conhecendo-se este valor, a aeração foi re-ligada e anotou-se o aumento da concentração de oxigênio.

Com estes valores e de posse do valor máximo de concentração de oxigênio atingido ( $O_2^{MAX}$ ), determinado quando esta concentração foi constante, e com os respectivos valores da concentração de oxigênio no tempo, o valor do  $K_{LA}$  foi determinado pela equação IV.6.

$$\ln \left( \frac{O_2^{max} - O_{2t}}{O_2^{max} - O_{20}} \right) = K_{LA} * t \quad \text{IV.6}$$

Onde:  $O_2^{MAX}$  = maior valor da concentração de oxigênio atingido, quando o sistemas está totalmente aerado (mg/L);

$O_{2t}$  = concentração de oxigênio em um dado tempo t (mg/L); ]

$O_{20}$  = concentração de oxigênio no início do experimento (mg/L);

$K_1A$  = coeficiente de transferência volumétrico de oxigênio ( $h^{-1}$ );

t = tempo (h).

Com o valor de  $K_1A$ , pode-se então determinar o valor de  $q_{O_2X}$  durante todo o período de aeração (15min.), repetindo-se as mesmas condições experimentais de aeração. Quando se opera sem aeração, a concentração de oxigênio dissolvido é mantida muito próxima a zero. Quando inicia-se a aeração, ocorre um aumento da concentração de oxigênio, até que ocorra constância desta concentração (estado estacionário). Então, o procedimento para determinar o  $q_{O_2X}$ , no período inicial, quando ocorre o aumento da concentração de oxigênio, e no período de constância (estado estacionário), foi sempre iniciado com a concentração de oxigênio próxima a zero e com a aeração ligada durante 15min.

Para determinar se as bactérias oxidadoras de enxofre são capazes de oxidar o tiosulfato, desde o início da aeração, o procedimento descrito anteriormente foi realizado primeiramente na ausência de substrato, assim teve-se o comportamento da concentração de oxigênio dissolvido ao longo do tempo de aeração, quando a única atividade de respiração era a endógena ( $q_{O_2\text{end}}$ ). Após, para saber a atividade das BOS nos diferentes períodos de aeração, um pulso de tiosulfato foi realizado antes do começo do período aerado. Assim, durante todo este período, a concentração de substrato para as BOS não foi limitante.

Com este procedimento, obtêm-se três valores de  $q_{O_2X}$ , determinados para a condição de subida da concentração de oxigênio (fase inicial -  $q_{O_2X\text{BOS } 2}$ ), quando a concentração de oxigênio foi constante (estado estacionário  $q_{O_2X\text{BOS } 3}$ ) e para a queda da concentração de oxigênio (aeração desligada -  $q_{O_2X\text{BOS } 4}$ ). As equações IV.7, 8 e 9 permitem a determinação dos valores de  $q_{O_2X}$  para as três condições. O valor  $q_{O_2X}$  determinado antes do pulso de tiosulfato foi considerado como sendo o valor da respiração endógena ( $q_{O_2X\text{end}}$ ).

$$q_{O_2 X_{BOS\ 2}} = kla * (O_2^{SAT} - O_2) - \frac{dO_2}{dt} - q_{O_2 X_{end}} \quad \text{IV.7}$$

$$q_{O_2 X_{BOS\ 3}} = kla * (O_2^{SAT} - O_2) - q_{O_2 X_{end}} \quad \text{IV.8}$$

$$q_{O_2 X_{BOS\ 4}} = -\frac{dO_2}{dt} - q_{O_2 X_{end}} \quad \text{IV.9}$$

### ***Técnica 3 – Medida direta do $q_{O_2}$ em diferentes concentrações de substrato***

Este procedimento foi utilizado exclusivamente para a determinação da influência da concentração de amônia sobre a atividade das bactérias oxidadoras de amônio, realizado com o inóculo do reator SBR e com a biomassa obtida na condição IV. Este procedimento foi realizado com a biomassa fora do reator SBR, em um erlemmayer apropriado. A metodologia utilizada nesta determinação seguiu indicações de Ferreti (2005).

Antes do início do ensaio, o lodo foi lavado com água destilada. O líquido sobrenadante foi descartado e este procedimento repetido até que a concentração de substrato (nitrogênio amoniacal) se anulasse. A seguir, o lodo lavado foi suspenso em um volume de meio apropriado para se ter uma concentração de sólidos suspensos de 2,5 g/L. O pH do sistema foi ajustado em 7,5 pela adição NaOH 5%. A temperatura do sistema foi mantida em  $30,0 \pm 1,0$  °C.

Então o lodo foi aerado até atingir um valor de oxigênio dissolvido próximo a saturação ( $7 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ ), este valor medido pelo oxímetro. A seguir, uma amostra do sistema foi retirada para determinar a concentração de substrato, somente para constatar que esta concentração era próxima a zero. Então, a operação de oxigenação foi interrompida e mediu-se a queda da concentração de oxigênio ao longo do tempo. A velocidade de consumo de oxigênio encontrada representou a respiração endógena dos microrganismos. Este mesmo procedimento foi realizado para a determinação da cinética de consumo de oxigênio em diferentes concentrações de substrato.

Ao final, estes resultados de  $q_{O_2}$  e de concentração de substrato foram utilizados para o ajuste da Equação IV.8. A estimação foi feita no programa Statistic. e o método matemático de regressão não linear foi usado.

$$q_{O_2} = q_{O_2\ MAX} * \frac{N - NH_4}{N - NH_4 + K_N} \quad \text{IV.10}$$

Onde:  $q_{O_2}$  = velocidade específica de consumo de oxigênio;

$q_{O_2MAX}$  = velocidade específica máxima de consumo de oxigênio;

$K_N$  = constante de saturação do nitrogênio (mgN/L);

N-NH<sub>4</sub> = concentração de amônia (mgN/L).

#### IV.3.6. Atividade desnitrificante

Durante cada fase de operação do reator (condições I até IV) a medida da atividade desnitrificante foi realizada com a biomassa obtida nos respectivos “pseudos” estados estacionários. Esta medida foi realizada utilizando o nitrito e o nitrato como acceptor de elétrons e o tiosulfato como doador de elétrons, nas concentrações de 300mg/L de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> ou N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e 300mg/L de S-S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, respectivamente. A concentração de biomassa no início do testes foi de 0,3gSST/L.

O período do teste foi de aproximadamente 120 horas e as amostras foram retiradas nos tempos de 0, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120 horas de experimento. Em cada uma destas amostras foram determinadas a concentração de nitrito ou nitrato e a concentração de sulfato. Estas determinações foram realizadas em todos os experimentos em triplicata.

Estes experimentos foram realizados em frascos de soro, de 550 mL de volume total, com tampa de borracha. Nestes tubos, eram colocados 250 mL de meio de cultivo, descrito anteriormente para os ensaios com a cultura pura (vide item IV.2.2), concentrado duas vezes. O volume de inóculo utilizado foi determinado no momento do ensaio, pela análise prévia da concentração celular no interior do reator. A temperatura dos experimentos foi de 30°C e o pH final do experimento era de 7,5, o mesmo do meio de cultivo. Um Shaker, da marca TECNAL, modelo TE 420, foi utilizado nestes experimentos, em uma frequência de 150rpm.

#### IV.3.7. Acompanhamento do ciclo de alimentação durante 24 horas

Além da medida da atividade desnitrificante e da quantificação das velocidades máximas de respiração, foi feito o acompanhamento do reator durante um ciclo de operação (24 horas), determinando-se as velocidades específicas de respiração, a concentração de amônia, nitrato, nitrito, sulfato ao longo deste período.

Para o acompanhamento da concentração de oxigênio dissolvido, foi utilizado um oxímetro da marca Mettler Toledo, modelo Q 4100e. Este equipamento estava conectado a um computador, por uma placa de aquisição de dados, da marca National Instruments. Os valores foram registrados pelo uso do programa Labview.

Após, com estes valores, foi determinada a velocidade de consumo de oxigênio ( $q_{O_2X}$ ), utilizando-se os valores da concentração de oxigênio obtidos no final do período aerado (15min.) e determinou-se o  $q_{O_2X}$  pela Técnica 1, descrita no item IV.3.6. Os valores de  $q_{O_2X}$  determinados foram utilizados para o cálculo da massa de oxigênio consumida durante o período em que o reator permaneceu sob aeração.

Nos períodos em que o reator estava sem aeração, a transferência de oxigênio foi somente pela superfície do líquido, conforme apresentado no item IV.3.2. Para a quantificação deste oxigênio consumido, utilizou-se a equação IV.3 e a relação experimental, apresentada na Figura IV.2, entre o  $K_{LA}$  e o volume do reator  $V_r$ .

#### **IV.3.8. Hibridização *in-situ* por fluorescência - FISH**

Para a caracterização da biomassa, obtida nos experimentos com a operação do reator SBR, foi utilizada a técnica de biologia molecular FISH. Esta técnica está baseada na possibilidade de hibridização de uma sonda (seqüência de nucleotídeos) ao RNA mensageiro 16s do microrganismo. Esta sonda é construída de modo que a sua seqüência de nucleotídeos seja complementar à seqüência do RNAm-16s de um grupo ou uma espécie de microrganismo a qual se deseja determinar.

As amostras coletadas durante as condições operacionais aplicadas no reator SBR foram inicialmente fixadas e conservadas em ambiente a  $-5^{\circ}\text{C}$ , para a posterior análise. O procedimento de fixação consistiu da coleta de 0,3ml de amostra e a sua centrifugação por 10min na rotação de 5000rpm. Após, o sobrenadante foi removido e os sólidos re-suspensos em 0,3mL de uma solução tampão PBS.

Este procedimento foi repetido novamente e a seguir foi adicionado 0,9ml de uma solução 4% de paraformaldeído em PBS. Neste momento, a amostra foi mantida a  $4^{\circ}\text{C}$  por 3 horas e, em seguida, a amostra foi centrifugada novamente e re-suspensa em 0,3ml de PBS, mais duas vezes. Ao final, 0,3ml de etanol absoluto foram adicionados e então esta amostra foi conservada na temperatura de  $-5^{\circ}\text{C}$ .

Neste trabalho procurou-se determinar a presença de algumas comunidades bacterianas autótrofas na biomassa. Para isto, utilizaram-se dez tipos de sondas que estão descritas na Tabela IV.8. Para a espécie *Thiobacillus denitrificans* não foi encontrada uma seqüência de nucleotídeos que tenha sido proposta na literatura para a execução desta análise, ou nos bancos de dados genômicos disponíveis na internet. Assim, a seqüência apresentada na Tabela IV.8 foi construída e a sua utilização está sendo validada em experimentos realizados no Laboratório de Bioquímica, no Centro de Ciências de Biológicas, da UFSC.

**Tabela IV. 8:** Sondas e seqüência de nucleotídeos utilizados na análise de FISH.

Sonda	Seqüência de Nucleotídeos (5`-3')	Grupo / Espécie a ser determinada
EUB mix	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	Eubactérias
Nso190	CGATCCCCTGCTTTTCTCC	Betaproteobactérias oxidadoras de amônia
NIT3	CCTGTGCTCCATGCTCCG	<i>Nitrobacter</i> spp
NEU	CCCCTCTGCTGCACTCTA	<i>Nitrosomanas</i> sp. e <i>Nitrosococcus mobilis</i>
Nmv	TCCTCAGAGACTACTACGCGG	<i>Nitrosococcus mobilis</i>
Ntspa662	GGAATTCCGCGCTCCTCT	<i>Nitrospira</i> spp
Ntco206	CGGTGCGAGCTTGCAAGC	<i>Nitrococcus mobilis</i>
Ntspn693	TTCCCAATATCAACGCATTT	<i>Nitrospina gracilis</i>
Thio51	TCAATGATCCTAATGGTC	<i>Thiobacillus denitrificans</i>
AMX820	AAAACCCCTCTACTTAGTG	Bactérias oxidadoras anaeróbias de amônia

Para a contagem e a qualificação dos grupos ou espécies presentes nas amostras coletadas, foi necessário executar um tratamento químico e físico de desagregação dos flocos microbianos. Para isto, utilizou-se uma solução DMSO 20%, seguido de um período em Shaker e sonicação. Após este procedimento, a contagem das células foi realizada.

Inicialmente, foi determinado o número de células coradas com o DAPI, que é capaz de ligar-se com o DNA dos microrganismos. Assim, este procedimento determina

---

o total de microrganismos presentes em cada amostra, sem diferenciar se eles estão ativos ou não, ou se são bactérias. Procurou-se sempre contar um número próximo a 400 células, para que o erro neste procedimento fosse minimizado. Após, no mesmo campo de imagem, foi determinado o número de células hibridizadas com cada sonda utilizada.



## CAPÍTULO V - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### V. 1. Influência das condições ambientais no crescimento de *T. denitrificans*.

O sucesso na integração dos ciclos do nitrogênio e do enxofre está diretamente relacionado com a atividade de *T. denitrificans*. Neste sentido, dois aspectos podem limitar a aplicação deste processo. Primeiramente, deseja-se que o “start-up” do processo seja o mais rápido possível. E, após este período, caso haja oxidação parcial dos compostos reduzidos de enxofre (formação do enxofre elementar), a velocidade de crescimento deve ser alta o suficiente, de maneira a não ocorrer a lavagem dos microrganismos do reator. O segundo aspecto está relacionado com a influência do doador de elétrons (tiosulfato) na fisiologia do microrganismo. Na tentativa de esclarecer estes dois aspectos, ensaios com uma cultura pura de *T. denitrificans* foram realizados.

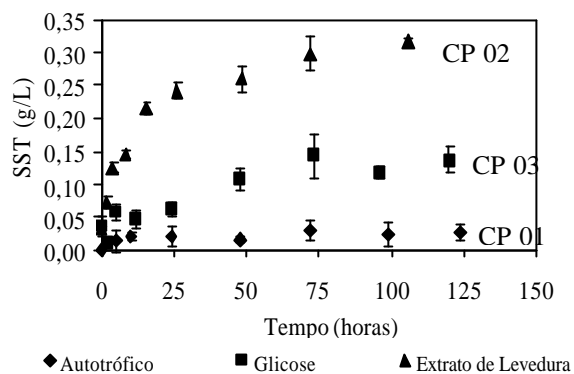
#### V.1.1. Influência de compostos orgânicos.

Com respeito aos baixos valores das velocidades de crescimento, procurou-se estudar a composição do meio de cultivo proposto pela ATCC. A este meio foram adicionados suprimentos alimentares orgânicos (extrato de levedura), como fonte de micronutrientes. Adicionalmente, foi comparada a influência deste composto frente a glicose (para maiores detalhes veja os itens IV.2.1 e 2.2 de Materiais e Métodos).

Na Figura V.1 estão apresentadas as variações das concentrações celulares (expressas em massa de sólidos suspensos totais por unidade de volume - gSST/L) nos experimentos CP 01, CP 02 e CP 03 indicados na Tabela IV.2. Observa-se que o experimento CP 02, que continha extrato de levedura, mostrou-se o mais adequado para o crescimento do *T. denitrificans*, já que no experimento com glicose (CP 03) o crescimento foi menos expressivo, enquanto que no autotrófico (CP 01) praticamente não ocorreu o crescimento.

As Figuras V.2-a, b e c apresentam as curvas obtidas nos ensaios cinéticos relativos ao consumo de nitrato e à produção de sulfato para os ensaios CP 01, 02 e 03, respectivamente. Observou-se que na presença de extrato de levedura na concentração de 500 mg DQO/L (CP 02) ocorreu a imediata produção do sulfato, produto que caracteriza o processo de interesse (oxidação do tiosulfato), com concomitante

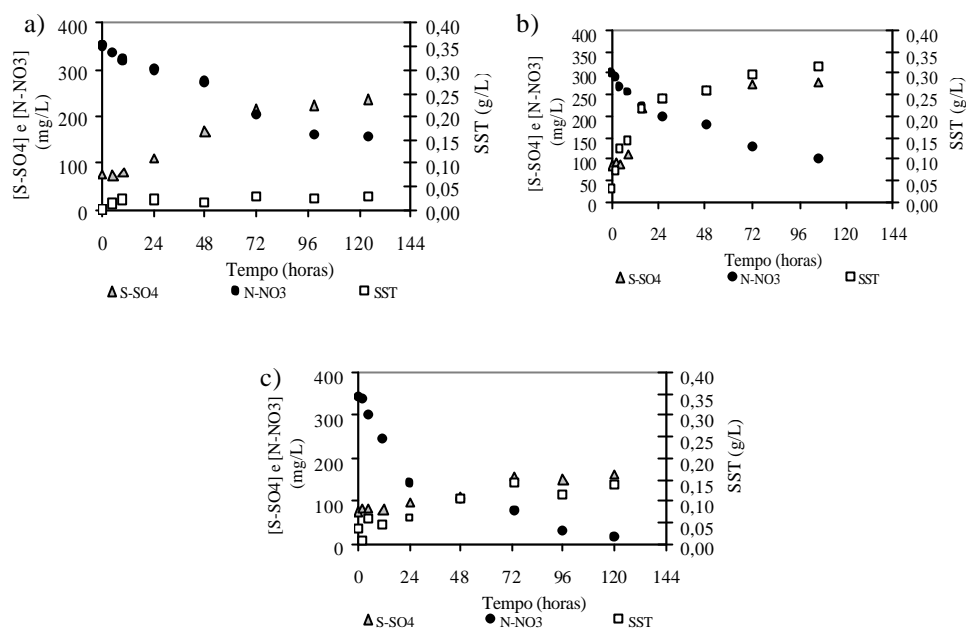
consumo do nitrato, ou seja, a desnitrificação autotrófica (Figura V.2-b). A estequiometria de redução do nitrato realizada neste foi similar à obtida no experimento autotrófico (experimento CP 01) apresentado na Fig. V.2-a.. Este resultado indica a ausência de outra rota metabólica que não fosse a desnitrificação via tiosulfato, como doador de elétrons. que estaria ocorrendo no experimento CP 02.



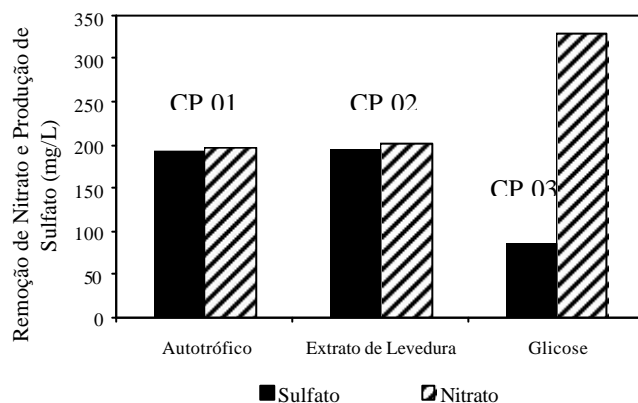
**Figura V. 1:** Influência da fonte de carbono no crescimento do *T. denitrificans*.

Para o experimento com glicose (CP 03), na concentração de 500 mg/L (Figura V.2-c), foi observada uma redução significativa de nitrato durante as primeiras horas de ensaio, sem a concomitante formação de sulfato. Após este intervalo de tempo (24 horas), começou a ser detectada a formação de sulfato, até que o nitrato fosse completamente reduzido.

Acredita-se que a presença da glicose interferiu no catabolismo do *T. denitrificans*, já que este composto poderia estar sendo utilizado como doador de elétrons para a cadeia respiratória, refletindo este fato numa maior velocidade de redução de nitrato e na baixa produção de sulfato. Na Figura V.3 este fenômeno é melhor evidenciado mostrando as concentrações de nitrato consumido e sulfato produzido ao longo destes experimentos. Para o experimento autotrófico (CP 01) e com extrato de levedura (CP 02), a relação entre nitrato consumido (aceptor final) e sulfato produzido (produto da oxidação completa de tiosulfato) foi de 1,01 e 1,03, respectivamente. Enquanto que para o experimento com Glicose (CP 03) a relação foi de 3,91.



**Figura V. 2:** Cinética do consumo de nitrato e produção de sulfato: a) com meio autotrófico (CP 01); b) com meio contendo extrato de levedura (CP 02); c) com meio contendo glicose (CP 03).



**Figura V. 3:** Quantidades de nitrato consumido e de sulfato produzido durante os experimentos (CP 01, CP 02, CP 03) que continham diferentes fontes de carbono na mesma concentração de DQO.

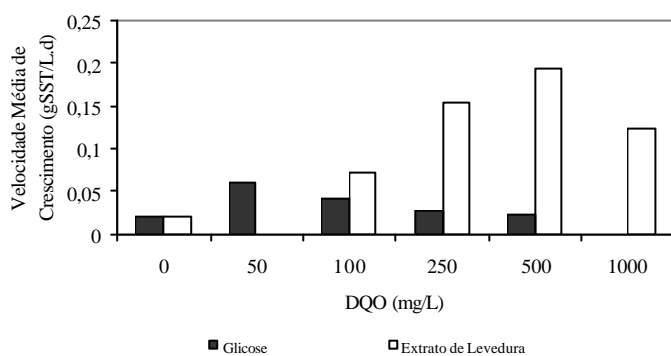
Para quantificar as influências do extrato de levedura e da glicose na velocidade de crescimento (anabolismo) de *T. denitrificans*, assim como na geração de energia (catabolismo) deste microrganismo, foram realizados experimentos com diferentes concentrações destes compostos (experimentos de CP 04 a CP 09, conforme

apresentado na Tabela IV. 2) e seus resultados avaliados em função dos seus efeitos no anabolismo e no catabolismo.

#### ***Efeito sobre o anabolismo***

Na Figura V.4 podem ser observados os resultados desses experimentos (CP 01 até CP 09), notando-se que o aumento da concentração de extrato de levedura (em DQO) influenciou positivamente a velocidade média de crescimento (calculada durante as primeiras 24 horas dos experimentos) até a concentração de 500 mg/L, havendo redução do crescimento para o valor mais elevado, 1000 mg/L.

O aumento da velocidade de crescimento não foi tão expressivo com o aumento da concentração de glicose, sendo que este aumento se deu até a concentração de 50 mgDQO/L, havendo, para valores superiores, redução até o mesmo nível obtido no experimento com meio autotrófico. Como já citado, o efeito da presença da glicose foi, possivelmente, mais significativo no metabolismo de geração de energia (catabolismo).



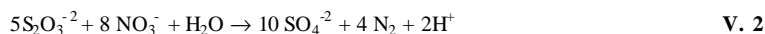
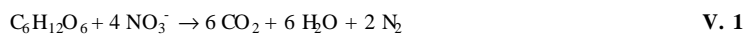
**Figura V. 4:** Influência da concentração de DQO na velocidade média de crescimento de *T. denitrificans* (média nas primeiras 24 horas)

Ainda, cumpre lembrar que o crescimento observado com 500 mg/L de extrato e levedura foi cerca de 9 vezes o observado com o meio autotrófico, podendo-se atribuir esse fato à presença de micronutrientes quando na presença do extrato, o que não ocorre com os demais meios.

#### ***Efeito sobre o catabolismo***

Na Tabela V.1 estão apresentados os valores da relação entre o consumo de substrato (nitrato) e produção do produto (sulfato), medidos pela diferença das concentrações iniciais e finais destes compostos, em cada experimento. Observa-se que o valor desta relação aumenta com o acréscimo da concentração de glicose, o que

confirma que, quando este composto está presente no meio de cultivo a desnitrificação ocorre via fonte de carbono, similar à desnitrificação heterotrófica, que pode ser descrita pela Equação V.1 mostrada a seguir. Ao contrário, quando não existe glicose, o catabolismo do microrganismo segue a rota quimiolitotrófica, conforme a Equação V.2. Observa-se também que os valores obtidos quando da adição de extrato de levedura são próximos ao valor obtido no crescimento autotrófico.



**Tabela V. 1:** Valores do consumo de nitrato e produção de sulfato para os experimentos realizados com as diferentes fontes de carbono.

Experimento	$\Delta\text{S-SO}_4$ (mg/L)	$\Delta\text{N-NO}_3$ (mg/L)	$Y_{\text{N/S}}$ (mgN/mgS)
CP 01 (0)	193	196	1,01
CP 03 (500 <sup>a</sup> )	85	330	3,88
CP 04 (250 <sup>a</sup> )	170	263	1,55
CP 05 (100 <sup>a</sup> )	179	182	1,02
CP 06 (50 <sup>a</sup> )	216	193	0,89
CP 02 (500 <sup>b</sup> )	194	201	1,03
CP 07 (1000 <sup>b</sup> )	228	280	1,33
CP 08 (250 <sup>b</sup> )	121	161	1,31
CP 09 (100 <sup>b</sup> )	190	247	1,30

<sup>a</sup> em mgDQO/L de Glicose; <sup>b</sup> em mg DQO/L de Extrato de Levedura.

Para os cálculos a seguir foi considerado o valor do fator  $Y_{\text{N/S}}$  para o crescimento autotrófico ( $Y_{\text{N/S}} = 1,01$ ), obtido no experimento CP 01. Assim, é possível quantificar quanto do nitrato reduzido em cada experimento foi devido ao metabolismo autotrófico, conhecendo-se os respectivos valores da produção de sulfato, produto que caracteriza a atividade quimiolitotrófica ( $\Delta\text{S-SO}_4$ , Tab. V.1). A seguir, pelos valores do total de nitrato reduzido, conhece-se a quantidade de nitrato reduzido pelo metabolismo heterotrófico (Eq.V 3 e 4). Desta forma, podem-se definir os valores das grandezas  $D_A$

(porcentagem de desnitrificação autotrófica) e  $D_H$  (porcentagem de desnitrificação heterotrófica).

$$N_{\text{autotrófico}} = (\Delta S - SO_4) * Y_{N/S} \quad \text{V. 3}$$

$$\% D_A = \left( \frac{N_{\text{autotrófico}}}{\Delta N - NO_3} \right) \times 100 \quad \text{V. 4}$$

$$\% D_H = 100 - \% D_A \quad \text{V. 5}$$

onde:  $N_{\text{autotrófico}}$  = nitrogênio removido pelo processo autotrófico (mgN/L);

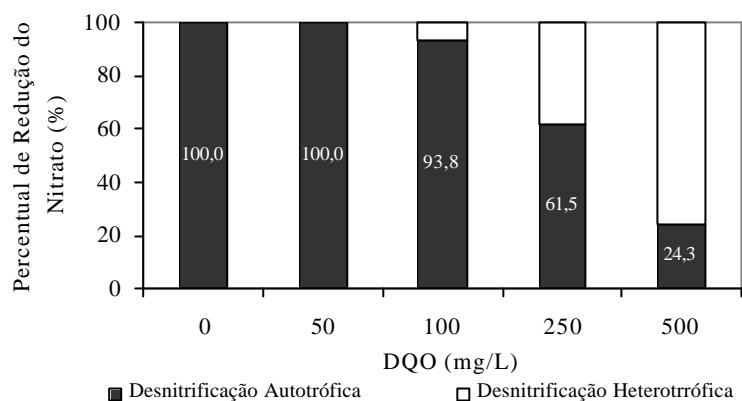
$Y_{N/S}$  = fator de conversão de sulfato produzido em nitrogênio removido (gN/gS);

$D_A$  = porcentagem de desnitrificação autotrófica (%);

$D_H$  = porcentagem de desnitrificação heterotrófica (%).

Na Figura V.5 estão apresentados os resultados da redução de nitrato obtidos com as Equações V.3, 4 e 5, para cada concentração de glicose ensaiada. Observa-se que o aumento da concentração de glicose proporciona uma redução direta da atividade autotrófica de *T. denitrificans*, até um nível da ordem de 20% para a maior concentração de glicose (500 mg DQO/L). Estes resultados indicam que a presença de uma fonte de carbono facilmente metabolizável, como a glicose, pode influenciar no tratamento de uma água residuária, para qual se pretende utilizar a ação metabólica de *T. denitrificans* para a remoção de nitrogênio (desnitrificação autotrófica) ou para a dessulfurização, com a formação do enxofre elementar. Assim, deve-se procurar manter as condições do reator mais próximo as dos presentes em um ambiente autotrófico, para que não ocorram mudanças no sistema catabólico do microrganismo, o que provocaria a inibição de reações representadas pela Eq.V.2 (metabolismo autotrófico).

Como já mencionado, a presença de extrato de levedura não influenciou o catabolismo de *T. denitrificans*, pois foram observados valores do fator  $Y_{N/S}$  (Tabela V.1) próximos ao valor obtido no experimento autotrófico, o que representa conversões do nitrato superiores a 75% do metabolismo quimiolitotrófico (oxidação do tiosulfato). Pode-se considerar que as diferenças entre o percentual de atividade autotrófica calculados nestes experimentos não estão relacionados com a adição de extrato de levedura, atribuindo-se principalmente este fato a pequenas diferenças na quantificação do substrato ( $NO_3$ ) e do produto ( $SO_4$ ).



**Figura V. 5:** Percentual de redução do nitrato por r metabolismo quimiolitotrófico (oxidação do tiosulfato) e heterotrófico, quando da adição de glicose, por *T. denitrificans*.

Desta maneira é possível afirmar que a influência da presença de extrato levedura ocorre preferencialmente sobre o anabolismo deste microrganismo, pouco alterando a forma com que a energia é gerada para o seu crescimento, pois o consumo de nitrato e produção de sulfato determinados nos experimentos apresentaram proporções similares às observadas quando do ensaio em metabolismo autotrófico (1,01 N-NO<sub>3</sub>/S-SO<sub>4</sub>), descartando-se a hipótese de que o extrato de levedura tenha sido o doador de elétrons.

Ao contrário, a glicose claramente serviu como doadora de elétrons, o que levou à maior redução de nitrato.

#### V.1.2. Balanço de enxofre durante a desnitrificação autotrófica

Com o objetivo de delimitar os valores das concentrações de tiosulfato, extrato de levedura e da relação entre o tiosulfato e o nitrato, para que ocorra a oxidação parcial do tiosulfato e uma possível formação de enxofre elementar, foi realizado um planejamento experimental estatístico. Nestes experimentos procurou-se verificar a influência destes compostos no balanço de massa (enxofre).

A relação entre doador / acceptor final de elétrons foi avaliada indiretamente, já que somente a concentração de tiosulfato foi modificada, mantendo-se em todos os experimentos a mesma concentração de nitrato (300mgN/L), conforme já detalhado no

item IV.2.2, do capítulo Materiais e Métodos. Encontram-se detalhados também os níveis das concentrações ensaiadas (vide Tabela IV.3).

A matriz de experimentos realizados pode ser vista na Tabela V.2, juntamente com os principais resultados atingidos, quanto à oxidação de tiosulfato, produção de sulfato e o nível de desbalanço de enxofre nestes experimentos, além da medida dos sólidos suspensos totais. O desequilíbrio do balanço de enxofre foi determinado pela equação IV.1, que descreve este balanço, e indica que a quantidade de enxofre não detectado analiticamente (S %) é determinada pela diferença entre o tiosulfato oxidado ( $S-S_2O_{3i} - S-S_2O_{3f}$ ) e o sulfato produzido.

$$S (\%) = \frac{((S - S_2O_{3i}) - (S - S_2O_{3f})) - (S - SO_{4f})}{((S - S_2O_{3i}) - (S - S_2O_{3f}))} * 100 \quad \text{IV.1}$$

onde:  $S-S_2O_{3i}$  = concentração de tiosulfato no início do experimento (mg $S-S_2O_3/L$ );

$S-S_2O_3$  = concentração de tiosulfato no final do experimento (mg $S-S_2O_3/L$ );

$S-SO_{4f}$  = concentração de sulfato no final do experimento (mg $S-SO_4^{-2}/L$ ).

**Tabela V. 2:** Condições experimentais e resultados atingidos com o planejamento estatístico.

Experimento	$S-S_2O_3^- i$ (mg S/L)	$S-S_2O_3^- f$ (mg S/L)	$S-SO_{4f}$ (mg S/L)	SST (g/L)	DQO (mg/L)	S (mg S/L)	S (não detectado) (%)
CP 10	437	440	0	0,11	101	0	-
CP 11	437	126	179	0,15	351	131	42
CP 12	1100	839	249	0,11	101	11	4
CP 13	1100	790	43	0,19	351	267	86
CP 14	300	93	121	0,15	250	85	41
CP 15	1240	865	378	0,26	250	0	-
CP 16	770	784	0	0,08	0	0	-
CP 17	770	176	139	0,25	500	455	77
CP 18	770	143	134	0,15	250	493	79
CP 19	770	159	114	0,15	250	497	81



---

CP 20	770	357	153	0,16	250	260	63
-------	-----	-----	-----	------	-----	-----	----

---

Com estes resultados, foram avaliados os efeitos do aumento da concentração de tiosulfato e da concentração de extrato de levedura na fisiologia de *T. denitrificans*. Pela análise estatística, com grau de confiança de 95%, foi determinado que estas duas variáveis influenciam significativamente os resultados descritos na Tabela V.2. Assim, os efeitos do aumento da concentração de tiosulfato e extrato de levedura sobre o balanço de massa e sobre a concentração de sólidos (SST), estão apresentados nas Figuras V.6 e 7, respectivamente.

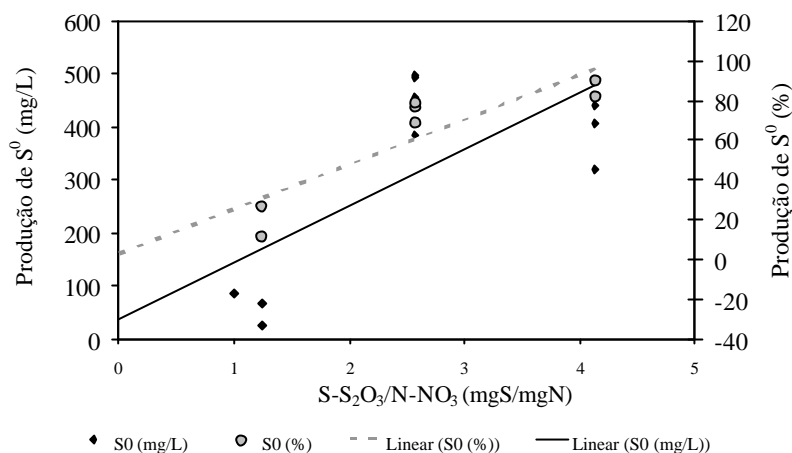
Sabendo-se que a influência do extrato de levedura se dá preferencialmente sobre o anabolismo do *T. denitrificans*, conforme visto nos resultados anteriores (vide o item V.1.1), é possível determinar a influência da relação doador / acceptor de elétrons (tiosulfato / nitrato) no balanço de enxofre, independente da concentração de extrato de levedura. Estes resultados podem ser observados na Figura V.6.

Nos resultados apresentados na Figura V.6 e na Tabela V. 2, pode ser observado uma desigualdade entre as quantidades de tiosulfato oxidado e de sulfato produzido. Este fato pode estar associado ao acúmulo de compostos intermediários, como o enxofre elementar, que é o produto da oxidação parcial do tiosulfato (como já descrito no Capítulo II). Além do enxofre elementar, vários outros intermediários poderiam ser formados, como o sulfito ( $\text{SO}_3^-$ ) e até mesmo o sulfeto de hidrogênio ionizado ( $\text{HS}^-$ ), como relata a literatura (Brüse et. al., 2000). A formação de todos estes compostos contribuiria para o desequilíbrio do balanço de enxofre.

Nota-se, na Figura V.6, que com o aumento da relação doador / acceptor final de elétrons, a quantidade de enxofre oxidado, na forma de tiosulfato, que não foi convertido a sulfato, tornou-se maior. Esta quantidade de enxofre representou valores superiores a 80%, conforme determinados pela Equação IV.1. Nos experimentos em que estes resultados foram atingidos, observou-se que a quantidade de acceptor final de elétrons estava limitando o processo oxidativo do tiosulfato.

A limitação de acceptor de elétrons, observada em alguns experimentos, representa a condição fundamental para a formação do enxofre elementar, como relata a literatura (Lens & Kuenen, 2001). Contudo, relacionando-se a quantidade de enxofre não detectado (S, Eq. IV.1), determinado pelo balanço de massa, e a quantidade de sólidos formado, pode ser descartada a possibilidade de que todo este enxofre esteja na

forma elementar. Pois, possivelmente a presença deste composto seria detectado na análise de sólidos suspensos totais (SST), e, conforme visto na Tabela V.2, os valores de SST determinados são inferiores ao valor de enxofre não detectado ( $S - \text{mg/L}$ ).

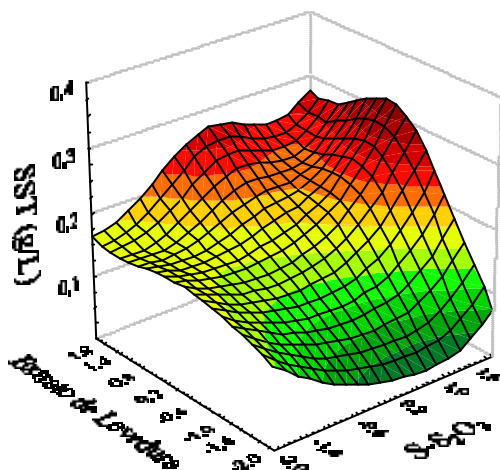


**Figura V. 6:** Influência da relação doador/aceptor final de elétrons sobre a produção de enxofre elementar.

A literatura ainda relata que, durante o processo de oxidação parcial do sulfeto, é observado a formação de uma solução tipo gel, de cor clara (branca), formada por polímeros extra-celulares, células e moléculas de enxofre elementar, que foram excretadas pela célula na forma de anéis de enxofre. As características físico-químicas desta solução influenciam diretamente na recuperação e quantificação do enxofre elementar formado (Schedel e Trüper, 1980; Janssen et. a., 2002). Nos experimentos, onde o maior desequilíbrio do balanço de massa ocorreu, foi observado visualmente a presença de uma solução com a mesma cor.

Apesar da totalidade do desequilíbrio no balanço de enxofre não ser atribuída à formação do enxofre elementar, acredita-se que houve realmente a formação deste composto e, assim, parte da medida da quantidade de sólidos suspensos totais, refere-se à presença do enxofre elementar. Com estes resultados, foi construída a Figura V.7, que relaciona a formação dos sólidos, com a concentração do extrato de levedura e do tiosulfato. Nota-se, nesta figura, que os maiores valores para a concentração de sólidos suspensos totais foram obtidos quando o maior nível das variáveis foram ensaiados. Estes valores foram, de 1239 mg/L para o enxofre na forma de tiosulfato e de 499 mgO<sub>2</sub>/L de extrato de levedura.

Nestas condições tinha-se a maior quantidade de doador de elétrons, ou seja, as condições mais energéticas para o crescimento de *T. denitrificans*. Porém, observou-se que o maior valor da concentração de sólidos atingido, de 0,26g/L, foi inferior aos resultados atingidos anteriormente, durante os estudos cinéticos com diferentes concentrações de extrato de levedura (item V.1.1). Este fato pode ser explicado pela oxidação parcial do tiosulfato, que ocorreu nestes experimentos (CP 10 até 20). Assim, com o acúmulo de intermediários, a energia disponível para o crescimento é menor do que quando ocorre a oxidação total do tiosulfato.

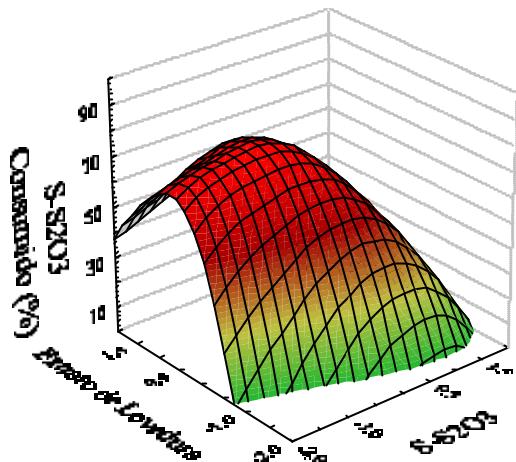


**Figura V. 7:** Influência dos níveis da concentração de tiosulfato e extrato de levedura na fisiologia do *T. denitrificans*.

Na Figura V.8 é apresentado o efeito do aumento da concentração de tiosulfato e extrato de levedura na quantidade de tiosulfato oxidado. Observa-se, nesta figura, que o máximo valor determinado foi de 72%. Os melhores resultados foram obtidos quando a concentração de tiosulfato estava em um valor intermediário. Claramente, observa-se, na Fig. V.8, que o nível de oxidação do tiosulfato foi bastante dependente da quantidade de extrato de levedura adicionado.

Sabe-se que o efeito da adição deste composto (extrato de levedura) não é sobre a oxidação do tiosulfato, conforme os experimentos realizados anteriormente, durante o estudo da influência de compostos orgânicos (vide item V.1.1). Acredita-se que a dependência da oxidação do tiosulfato em relação ao extrato de levedura, observado na Figura V.8, esteja correlacionado com a quantidade de microrganismos presentes em

cada experimento, valor este dependente do teor de extrato de levedura, como visto também no item V.1.1. Assim, em um mesmo tempo de cultivo, a quantidade de tiosulfato oxidada é uma função da concentração celular, que é uma função da concentração de extrato de levedura



**Figura V. 8:** Efeito do aumento da concentração de tiosulfato e extrato de levedura na quantidade de tiosulfato oxidado

## V.2. Estabelecimento do processo de desnitrificação autotrófica via a integração dos ciclos do nitrogênio e do enxofre

### V.2.1. Performance do reator SBR

O estabelecimento do processo de desnitrificação autotrófica, simultaneamente com o processo de nitrificação parcial e oxidação aeróbia do enxofre foi realizado em um único reator SBR, conforme descrito no item Materiais e Métodos (item IV.3.3). Na Tabela V. 3, são apresentadas as principais condições aplicadas neste reator e alguns dos resultados atingidos com este sistema em relação à concentração de oxigênio dissolvido.

Durante a operação do reator na condição II, observou-se que a concentração de oxigênio dissolvido estava muito baixa (próxima a 0,2mg/L). Sabe-se que nesta concentração a atividade das bactérias oxidadoras de amônio e de enxofre encontram-se limitadas, além do que, a manutenção de um sistema nesta condição de aeração é difícil de ser executada e reproduzida.

**Tabela V. 3:** Condições operacionais aplicadas ao reator SBR.

Condição	Aeração	Oxigênio - Fase aerada (mg/L)	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>-</sup> Entrada (mgS/L)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> Entrada (mgN/L)
I	Sem limitação de oxigênio (aeração contínua)	> 5	200	191
II	Com Limitação (15min aerado e 45min sem aeração)	0,2	200	230
III – 1	Com Limitação (15min aerado e 45min sem aeração)	>1	350	236
III – 2	Com Limitação (15min aerado e 60min sem aeração)	>4	350	236
IV	Com Limitação (15min aerado e 60min sem aeração)	>4	500	247

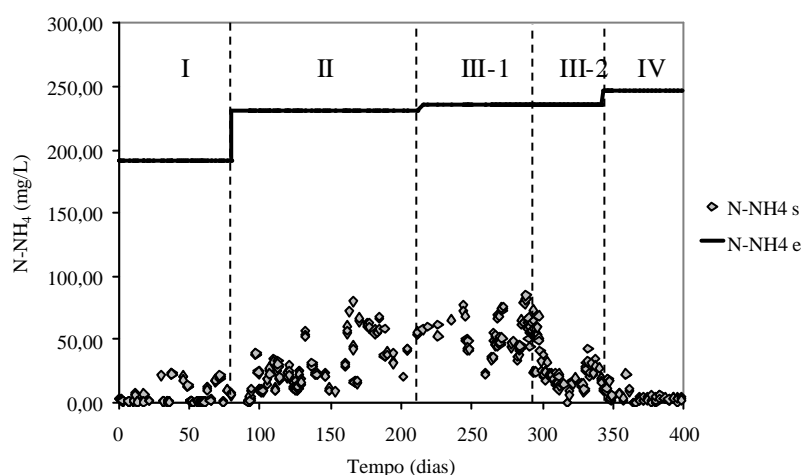
Como pode ser observado na Tabela V.3, na condição III - 1 os níveis de oxigênio dissolvido foram diferentes dos aplicados na condição II, devido às variações no nível de aeração (vazão de ar). Deste modo, optou-se pela prática de vazões de ar maiores, para que durante a fase aerada (15min), a concentração de oxigênio dissolvido

se mantivesse em um valor acima da limitação (condição III – 2 e IV) e que a eficiência do sistema não fosse mais influenciada pelo nível de aeração.

Na Figura V.9 é apresentada a variação da concentração de nitrogênio, na forma de amônia, medido nas diferentes condições operacionais. Observa-se que a prática de diferentes vazões de ar (condição I até IV), influenciou diretamente na quantidade de amônio oxidado. Durante a condição I, observou-se um baixo residual de nitrogênio amoniacal no efluente final do reator, obtendo-se um valor médio de  $7\text{mgN-NH}_4^+/\text{L}$ .

Com a aplicação da aeração intermitente (15min. aerado e 45min. sem aeração), e a operação do reator em baixas concentrações de oxigênio dissolvido ( $0,2\text{mgO}_2/\text{L}$ ) durante o período de aeração, a oxidação do nitrogênio amoniacal foi parcialmente limitada, o que refletiu no aumento da concentração deste composto ( $\text{N-NH}_4^+$ ). No final deste período, o valor da concentração de amônia foi próxima a  $50\text{mg N-NH}_4^+/\text{L}$ .

Na condição III-1, este aumento da concentração de nitrogênio amoniacal foi interrompido, porém a concentração de  $\text{N-NH}_4^+$  permaneceu próxima aos  $50\text{mg/L}$  detectados anteriormente. Com o aumento da vazão de ar (condição III-2) observou-se que, a maior parte da amônia foi oxidada até nitrito ou nitrato. E na condição IV, novamente foi observado um baixo residual de nitrogênio amoniacal.

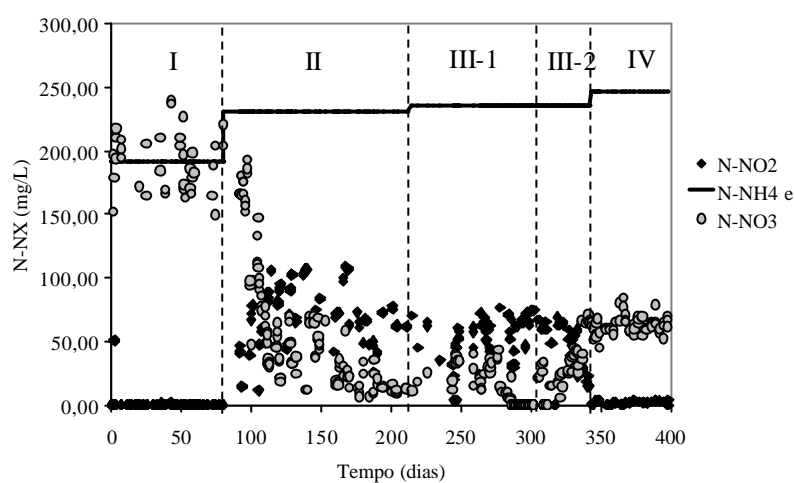


**Figura V. 9:** Concentrações de nitrogênio amoniacal ( $\text{N-NH}_4\text{e}$  = concentração de amônio no meio de alimentação;  $\text{N-NH}_4\text{s}$  = concentração de amônio no efluente) durante a operação do reator SBR.

Na Figura V.10 encontram-se apresentadas as variações dos produtos da oxidação do amônio (nitrito e nitrato), detectados durante operação do reator SBR, nas

diferentes condições ensaiadas. Observou-se que, durante a condição I, a oxidação do amônio ocorreu completamente até nitrato, sem que a presença do nitrito tenha sido detectada. Após, sob forte limitação de oxigênio durante a condição II, o amônio foi convertido parcialmente até nitrito e nitrato. Nesta etapa, as bactérias oxidadoras de nitrito apresentaram atividade, mesmo submetidas a baixas concentrações de oxigênio.

Conforme descrito na Tabela V.3, na condição III-1, o valor de oxigênio dissolvido detectado durante a fase aerada, foi superior ao da condição II. Este fato, influenciou principalmente o metabolismo das bactérias oxidadoras de nitrito, pois inicialmente foram detectados valores superiores para a concentração de nitrato no efluente final, como é mostrado na Figura V.10. Após, nas condições III-2 e IV, com um aumento mais significativo da aeração, observou-se uma redução do residual de nitrito com a parcial formação do nitrato.



**Figura V. 10:** Concentração de nitrogênio na forma de nitrito e nitrato durante a operação do reator SBR

Nos experimentos realizados por Zdradek (2005), em condições de aeração semelhantes à condição IV deste estudo, foi observado um baixo residual de nitrato formado, cerca de 60mgN-NO<sub>3</sub>/L, e o restante do nitrogênio amoniacal alimentado oxidado até nitrito. Assim, pode-se imaginar que durante a condição IV, a maior parte do nitrogênio amoniacal tenha sido oxidado somente até nitrito e posteriormente, desnitrificado.

Pelo balanço de nitrogênio, representado pela equação V.6., foi possível quantificar o nitrogênio removido pelo processo de desnitrificação autotrófica, que

ocorrera no reator SBR durante as condições de limitação de oxigênio. Os resultados obtidos, a partir deste balanço estão apresentados na Figura V.11, que mostra a eficiência de remoção de nitrogênio em cada uma das condições estudadas.

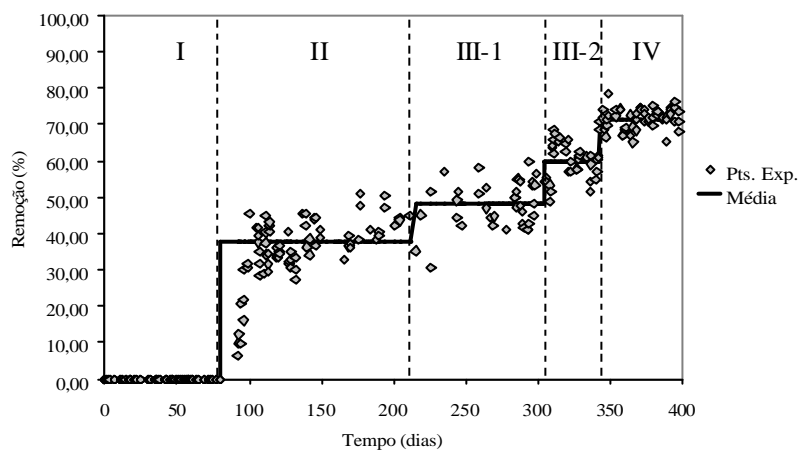
$$N_{\text{Removido}}(\%) = \frac{\sum N_e - \sum N_s}{\sum N_e} * 100 \quad \text{V.6}$$

Onde:  $N_{\text{Removido}}$  = percentual de nitrogênio removido;

$N_e$  = somatório das concentrações de nitrogênio da alimentação do reator (mgN/L);

$N_s$  = somatório das concentrações de nitrogênio na vazão de saída do reator (mg/L).

Como imaginado, durante a condição I, em que não havia períodos anóxicos, a remoção de nitrogênio foi nula. Após, durante as etapas com limitação de oxigênio, a eficiência de remoção de nitrogênio tornou-se evidente. Nota-se na Figura V.11 que, com as mudanças nas condições operacionais aplicadas ao reator, a quantidade de nitrogênio removido foi maior a cada condição. Na condição II, quando somente 200mg/L de  $S-S_2O_3$  foram alimentados ao reator, a eficiência de remoção de nitrogênio foi de 37%. Enquanto na última condição IV, onde 500mg/L de  $S-S_2O_3$  foi alimentado ao reator, a eficiência foi de 72%.



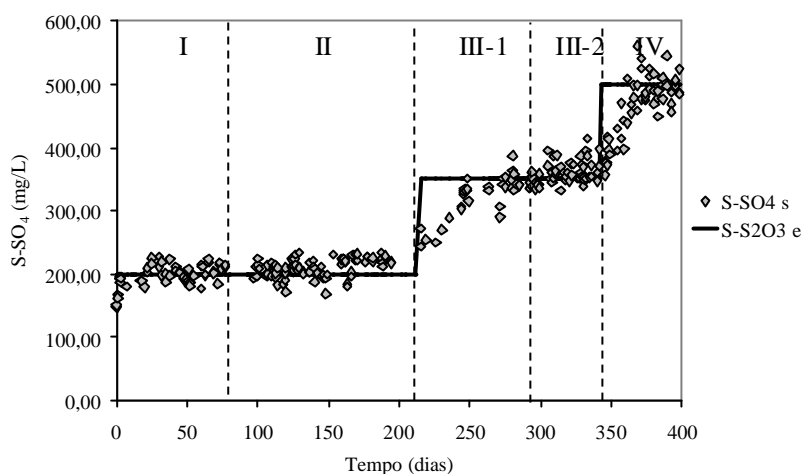
**Figura V. 11:** Remoção de nitrogênio durante a operação do reator SBR

Na Figura V.12, é apresentada a variação da concentração de sulfato durante o período de 400 dias de operação do reator. A formação do sulfato foi observada em



todas as etapas do estudo, independente da condição de aeração. Este fato, indica que as bactérias oxidadoras de enxofre foram capazes de utilizar outros compostos, além do oxigênio, como aceptores finais de elétrons.

Como o conceito do processo em estudo previa, parte do nitrito formado foi utilizado com aceptor final de elétrons na oxidação do tiosulfato alimentado, sendo o nitrito reduzido a nitrogênio gasoso. Assim, pode-se imaginar que o sulfato detectado no efluente final, apresentado na Figura V.12, tenha sido formado por dois metabolismos de respiração: 1) via oxigênio (aeróbio); 2) via nitrito (anóxico).



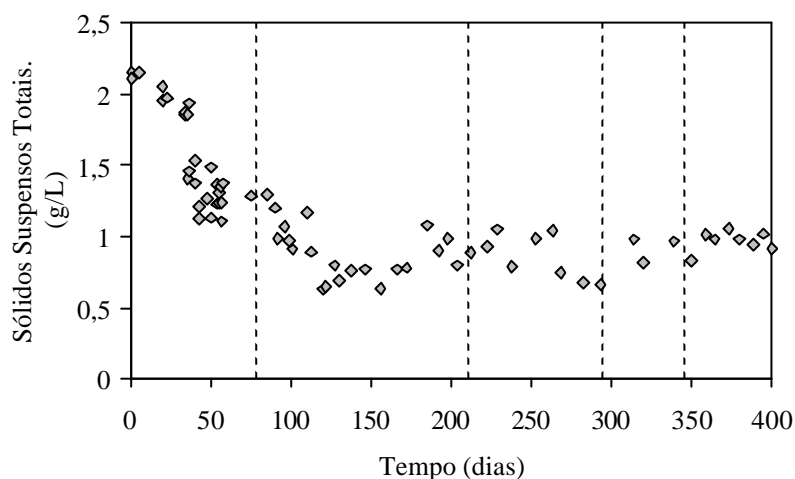
**Figura V. 12:** Concentração de sulfato durante a operação do reator SBR na condições experimentais I, II, III-1, III-2, IV.

Observa-se ainda na Figura V.12, que durante o aumento da concentração de tiosulfato, primeiramente realizado na condição III-1, houve um período transiente (de 200 até 250 dias) onde ocorreu um desequilíbrio no balanço de enxofre, detectando-se neste período, a formação de colóides brancos, com a mesma aparência dos relatados durante os ensaios de desnitrificação autotrófica (item V.1.2). Na condição IV, aumentou-se a concentração de tiosulfato para  $500\text{mgS-S}_2\text{O}_3/\text{L}$  e, novamente, o desequilíbrio do balanço de enxofre foi detectado.

Durante a operação do reator foi realizada a medida da concentração celular, pela análise de sólidos suspensos totais, conforme descrito no item IV.3.4.7 do capítulo Materiais e Métodos. Observa-se na Figura V.13 a variação da concentração de sólidos suspensos totais (SST) durante as condições operacionais aplicadas ao reator SBR.

Durante a condição I houve um decréscimo considerável da concentração de sólidos (SST) no reator, como pode ser observado na Figura V.13. Este decréscimo é atribuído à morte de microrganismos que não se adaptaram às condições experimentais aplicadas ao reator. A redução dos sólidos suspensos totais ocorreu até o 30º dia da operação do reator, após observou-se uma estabilidade nesta medida. Contudo, com a operação do reator sob limitação de oxigênio (condição II), novamente foi detectado um redução na medida de SST (até o 115º dia de operação), atribuído este fato também a morte celular e à adaptação dos microrganismos às condições experimentais.

Após o 115º dia de operação do reator, observou-se que a concentração de células manteve-se praticamente constante. Sabe-se que os valores dos fatores de conversão de substrato em biomassa, para as bactérias oxidadoras de amônio e para as oxidadoras de enxofre, apresentados na literatura, são baixos. Pode-se compreender a estabilidade nos valores de sólidos suspensos totais medidos e adiciona-se que, durante o processo sob limitação de oxigênio, a velocidade de crescimento dos microrganismos é reduzida, conforme observou Zdradek (2005).



**Figura V. 13:** Concentração de sólidos suspensos totais durante a operação do reator SBR.

#### ***Balanco de Massa – Nitrogênio Amoniacal***

A equação V.7 apresenta o balanço de massa para o nitrogênio amoniacal, que está sendo convertido em nitrito. Considera-se que nenhuma quantidade significativa do amônio esteja sendo utilizada para a incorporação na biomassa ou sendo utilizada, como substrato, para outros processos metabólicos, além da nitrificação.

$$\frac{dN - NH_{4s}}{dt} = D * N - NH_{4e} - D * N - NH_{4s} - q_{NH_4} * X \quad \text{V.7}$$

Onde:  $N - NH_{4s}$  = concentração de nitrogênio amoniacal no efluente ou no reator (mgN-NH<sub>4</sub>/L);

$N - NH_{4e}$  = concentração de nitrogênio amoniacal na alimentação do reator (mgN-NH<sub>4</sub>/L);

$D$  = vazão específica de alimentação ( $d^{-1}$ );

$q_{NH_4}$  = velocidade específica de consumo de amônia (mgN-NH<sub>4</sub>/(gSST.d));

$X$  = concentração celular (gSST/L).

Considerando-se um estado pseudo-estacionário, pois a coleta das amostras para a medida da concentração da amônia foi realizada sempre com reator no volume de 2L, tem-se que:

$$\frac{dN - NH_{4s}}{dt} = 0 \quad \text{V.8}$$

e, conseqüentemente:

$$q_{NH_4} = \frac{D * (N - NH_{4e} - N - NH_{4s})}{X} \quad \text{V.9}$$

O valor da velocidade especifica de alimentação ( $D$ ) é definida pela equação V.10:

$$D = \frac{Q}{V_r} = \frac{1}{2} = 0,5d^{-1} \quad \text{V.10}$$

Onde:  $Q$  = vazão de alimentação ( $Q = 1L/d$ );

$V_r$  = volume do reator ( $V_r = 2L$ ).

Com a equação V.9, podem ser calculadas as velocidade especificas de consumo de amônia, para cada condição experimental ensaiada no reator SBR. Os resultados obtidos nesta determinação e os valores médios das concentrações de nitrogênio amoniacal e das concentrações celulares consideradas nos cálculos, podem ser

observados na Tabela V.4, bem como o período em que foi considerado o estado pseudo-estacionário.

A maior diferença do valor da velocidade específica de consumo de amônia ocorreu entre a condição I e II, devido principalmente à redução da concentração celular provocada pela limitação de oxigênio praticada na condição II. Esta redução da biomassa do reator, compensou o acúmulo da amônia que ocorreu nesta condição, elevando o valor da  $q_{NH_4}$ . Após, houve um aumento gradativo da velocidade específica de consumo de amônia, até que fosse atingida o valor de  $124,4 \text{ mgN-NH}_4/(\text{gSST.d})$  na condição IV.

Este valor de  $q_{NH_4}$  é considerado baixo, quando comparado com os valores obtidos por outros autores, como o valor de  $5238 \text{ mgN-NH}_4/(\text{gSST.d})$ , determinado por Wiesmann (1994). Porém, é importante ressaltar que este valor foi determinado em condições experimentais diferentes à aplicada ao reator. Quando compara-se o valor determinado de  $q_{NH_4}$  (Tabela V.4), com os valores determinados por Zdradek (2005) ( $q_{NH_4} = 444 \text{ mgN-NH}_4/(\text{gSST.d})$ ), que operou um reator nitrificante em condições próximas à aplicada neste estudo, a diferença diminuiu, mostrando que as condições operacionais influenciam significativamente na velocidade específica de consumo de amônio.

**Tabela V. 4:** Valores das velocidades específicas de consumo de amônio.

Condição	Período (dias)	N-NH <sub>4e</sub> (mg/L)	N-NH <sub>4s</sub> (mg/L)	X (gSST/L)	$q_{NH_4}$ (mgN-NH <sub>4</sub> /(gSST.d))
I	48 – 75	191,7	5	1,3	71,8
II	150-200	230,1	44,5	0,9	103,1
III-1	275-300	236,1	50,7	0,8	115,9
IV	360-400	247,2	3,3	0,98	124,4

#### *Balço de Massa – Nitrogênio na forma de nitrato*

Após a formação do nitrito, pelo processo de oxidação do amônio, este composto pode ser convertido a nitrato ou a nitrogênio gasoso, como observado neste

trabalho. Para a determinação da velocidade de oxidação de nitrito, optou-se por realizar o balanço de nitrato, já que este é o único produto do processo de oxidação do nitrito.

A equação V.11 apresenta o balanço de massa para o nitrogênio na forma de nitrato, que representa o nitrito oxidado. Considera-se que nenhuma quantidade significativa deste composto (nitrato) foi utilizado pelo processo de desnitrificação autotrófica, observado durante a operação do reator.

$$\frac{dN - NO_{3s}}{dt} = -D * N - NO_{3s} + q_{NO_3} * X \quad \text{V.11}$$

Onde:  $N - NO_{3s}$  = concentração de nitrogênio na forma de nitrato no efluente ou no reator (mgN- $NO_3/L$ );

$D$  = vazão específica de alimentação ( $d^{-1}$ );

$q_{NO_3}$  = velocidade específica de produção de nitrato (mgN- $NO_3/(gSST.d)$ );

$X$  = concentração celular (gSST/L).

Assumindo-se as mesmas considerações quanto aos estados pseudo-estacionários e para a determinação da velocidade específica de alimentação, determinou-se a velocidade específica de produção de nitrato ( $q_{NO_3}$ ). Os valores destas velocidades e os valores assumidos para as concentrações de nitrato e de células estão apresentados na Tabela V.5.

**Tabela V. 5:** Valores das velocidades específicas de produção de nitrato.

Condição	Período (dias)	N- $NO_3$ e (mg/L)	X (gSST/L)	$q_{NO_3}$ (mgN- $NO_3/(gSST.d)$ )
I	48 - 75	187,5	1,3	72,1
II	150-200	23,1	0,9	12,8
III-1	275-300	4,9	0,8	3,1
IV	360-400	64,6	0,98	32,9

**Excluído:**

Observa-se que para a condição II, na qual se estava aplicando a maior limitação de oxigênio, a velocidade específica de produção de nitrato representou 12% da velocidade específica de consumo de amônio. E para a condição IV, onde a limitação foi mais branda, este valor foi de 26%, concluindo-se assim, que a atividade das bactérias oxidadoras de nitrito estava realmente limitada pelas condições ambientais aplicadas no reator.

Observa-se que para a condição II, na qual se estava aplicando a maior limitação de oxigênio, a velocidade específica de produção de nitrato representou 12% da velocidade específica de consumo de amônio. E para a condição IV, onde a limitação

**Formatado:** Recuo: Primeira linha: 1,25 cm

foi mais branda, este valor foi de 26%, concluindo-se assim, que a atividade das bactérias oxidadoras de nitrito estava realmente limitada pelas condições ambientais aplicadas no reator.

#### **Balço de Massa – Nitrogênio removido ( $N-N_2$ )**

Como mencionado anteriormente, parte do nitrito formado, foi convertido a nitrogênio gasoso pelo processo de desnitrificação autotrófica. Pela Equação V.6, pode ser calculada a quantidade de nitrogênio removido, em cada condição experimental, e considera-se que este nitrogênio tenha sido eliminado na forma molecular ( $N-N_2$ ). Desta forma, pelo balanço de nitrogênio removido ( $N-N_2$ ), representado na Equação V.12 pode ser calculada a velocidade do processo de desnitrificação que ocorreu no reator SBR.

$$\frac{dN - N_2}{dt} = -D * N - N_2 + q_{N_2} * X \quad \text{V.12}$$

Onde:  $N-N_2$  = concentração de nitrogênio na forma de molecular eliminado do reator (mgN- $N_2$ /L);

$D$  = vazão específica de alimentação ( $d^{-1}$ );

$q_{N_2}$  = velocidade específica de produção de nitrogênio molecular (mgN- $N_2$ /(gSST.d));

$X$  = concentração celular (gSST/L).

Novamente, assumindo -se as mesmas considerações quanto aos estados pseudo-estacionários e para a determinação da velocidade específica de alimentação, determinou-se a velocidade específica de remoção de nitrogênio ( $q_{N_2}$ ). Os valores destas velocidades e os valores assumidos para as concentrações de nitrogênio e de células estão apresentados na Tabela V.6.

Observa-se, na Tabela V.6, que o valor da velocidade específica de remoção de nitrogênio foi influenciado pela quantidade de tiosulfato adicionada ao meio. Este composto, como mencionado anteriormente, é o doador de elétrons para o processo de desnitrificação autotrófica. Assim, compreendendo-se a relação entre as velocidades específicas de remoção de nitrogênio e a quantidade de tiosulfato alimentado.

Formatado: Recuo: Primeira linha: 1,25 cm

**Tabela V. 6:** Valores das velocidades específicas de remoção de nitrogênio

Condição	Período (dias)	N-N <sub>2</sub> (mg/L)	X (gSST/L)	q <sub>N2</sub> (mgN-N <sub>2</sub> /(gSST.d))
I	48 – 75	0,0	1,3	0,0
II	150-200	87,3	0,9	48,5
III-1	275-300	113,3	0,8	70,8
IV	360-400	176,5	0,98	90,0

**Balço de Massa – Sulfato produzido ( $S-SO_4^{-2}$ )**

Como visto, a quantidade de nitrogênio removido é uma função da quantidade de tiosulfato alimentado. Para quantificar as velocidades de oxidação do tiosulfato, optou-se por realizar o balanço de sulfato produzido, determinando a velocidade específica de produção de sulfato. A Equação V.13 apresenta o balanço de massa para o enxofre na forma de sulfato.

$$\frac{dS - SO_4}{dt} = -D * S - SO_4 + q_{SO_4} * X \quad \text{V.13}$$

Onde: S-SO<sub>4</sub> = concentração de enxofre na forma de sulfato no efluente ou no reator (mg S-SO<sub>4</sub>/L);

D = vazão específica de alimentação (d<sup>-1</sup>);

q<sub>SO<sub>4</sub></sub> = velocidade específica de produção de sulfato (mg S-SO<sub>4</sub>/(gSST.d));

X = concentração celular (gSST/L).

Assumindo-se as mesmas considerações feitas anteriormente, calculou-se os valores das velocidades específicas de produção de sulfato. Os valores destas velocidades e os valores assumidos para as concentrações de sulfato e de células estão apresentados na Tabela V.7.

Como observado na determinação das velocidades específicas de remoção de nitrogênio, ocorreu um aumento progressivo da velocidade específica de produção de sulfato. Pode-se imaginar assim, a existência de uma relação entre estas duas velocidades, que indicaria a quantidade de nitrogênio removido pelo total de sulfato

**Excluído:** → Observa-se, na Tabela V.6, que o valor da velocidade específica de remoção de nitrogênio foi influenciado pela quantidade de tiosulfato adicionada ao meio. Este composto, como mencionado anteriormente, é o doador de elétrons para o processo de desnitrificação autotrófica. Assim, compreendendo-se a relação entre as velocidades específicas de remoção de nitrogênio e a quantidade de tiosulfato alimentado.

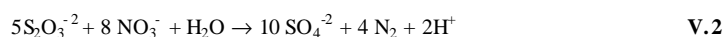
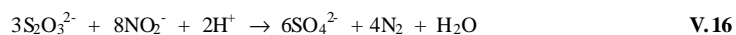
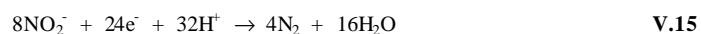
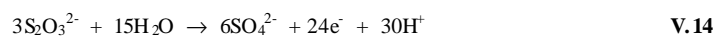
produzido. Correlacionando-se estes valores, observou-se que esta relação está abaixo do valor esperado, para desnitrificação autotrófica via nitrito, de  $0,58\text{gN-N}_2/\text{gS-SO}_4$ . Apesar disto, pode-se questionar se a maior parte do sulfato produzido foi pelo processo anóxico, ou se parte deste sulfato, foi produzido pelo metabolismo aeróbio das bactérias oxidadoras de enxofre.

**Tabela V. 7:** Valores das velocidades específicas de produção de sulfato.

Condição	Período (dias)	N-N <sub>2</sub> (mg/L)	X (gSST/L)	q <sub>SO4</sub> (mg S-SO <sub>4</sub> /(gSST.d))
I	48 – 75	206,4	1,3	79,2
II	150-200	218,6	0,9	121,1
III-1	275-300	344,2	0,8	215,0
IV	360-400	491,1	0,98	250,5

#### *Relação entre a remoção de nitrogênio e a produção de sulfato.*

Uma forma de se verificar se a maior parte do sulfato foi produzido pelo processo anóxico, consiste em se determinar a relação entre nitrogênio removido e o total de sulfato produzido. A Figura V.14 apresenta a relação obtida com os pontos experimentais de remoção de nitrogênio e produção do sulfato, durante a operação do reator. Nesta figura também está apresentado o resultado das relações propostas, para a desnitrificação via nitrito (Eq. V.16), obtida a partir das Eqs. V.14 e V.15 após a aplicação da lei de Hess, e da relação para a desnitrificação via nitrato (Eq. V.2), apresentada anteriormente.

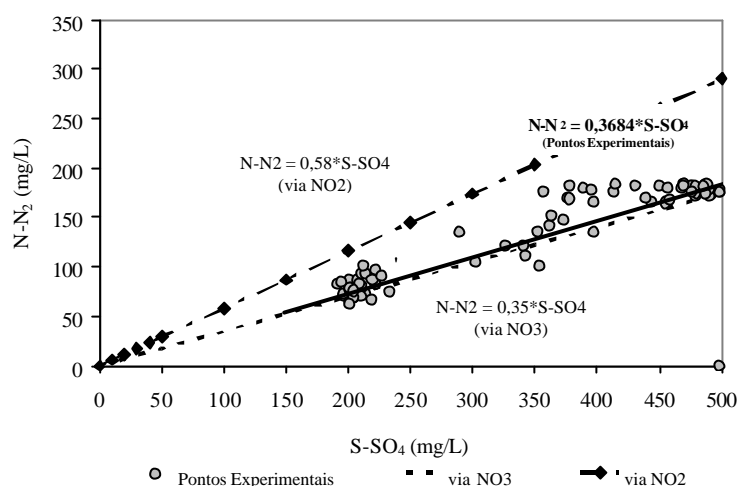


Nota-se na Figura V.14 que a relação experimental entre nitrogênio removido (N-N<sub>2</sub>) e o total de sulfato produzido ( $0,37\text{mgN-N}_2/\text{mgS-SO}_4$ ) está muito próxima da relação estequiométrica da desnitrificação autotrófica via nitrato ( $0,35\text{mgN-N}_2/\text{mgS-$



SO<sub>4</sub>). Este fato pode indicar que a desnitrificação observada no reator esteja sendo realizada via redução do nitrato e não via nitrito, como se havia previsto anteriormente.

Para a elaboração da Figura V.14 foi considerado que todo o sulfato foi produzido pelo metabolismo anóxico, ou seja, a atividade aeróbia das bactérias oxidadoras de enxofre foi considerada como nula ou desprezível. Se esta consideração não for verdadeira, e parte do tiosulfato tenha sido oxidado via oxigênio, a relação experimental determinada entre o nitrogênio removido e o sulfato produzido pelo metabolismo anóxico, tenderia a se aproximar da relação estequiométrica para a desnitrificação via nitrito.



**Figura V. 14:** Relação entre nitrogênio removido e sulfato produzido na condições experimentais II, III-1, III-2, IV.

Considerando que não haja acúmulo de enxofre elementar, sendo todo o tiosulfato oxidado até sulfato e que a velocidade específica de produção de sulfato ( $q_{SO_4}$ ) seja igual a velocidade específica de consumo de tiosulfato ( $q_{S_{2O_3}}$ ), conforme a equação V.17. A equação do balanço de enxofre na forma de sulfato (Equação V.13) pode ser utilizada.

$$q_{S_{2O_3}} = q_{SO_4} \quad \text{V.17}$$

Onde:  $q_{SO_4}$  = velocidade específica de produção de sulfato (mg S-SO<sub>4</sub>/(gSST.d));

$q_{S_{2O_3}}$  = velocidade específica de consumo de tiosulfato (mg S-S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/(gSST.d));

$$\frac{dS - SO_4}{dt} = -D * S - SO_4 + q_{SO_4} * X \quad \text{V.13}$$

Onde: S-SO<sub>4</sub> = concentração de enxofre na forma de sulfato no efluente ou no reator (mgN-N<sub>2</sub>/L);

D = vazão específica de alimentação (d<sup>-1</sup>);

q<sub>SO<sub>4</sub></sub> = velocidade específica de produção de sulfato (mg S-SO<sub>4</sub>/(gSST.d));

X = concentração celular (gSST/L).

A tomada de amostras, para a análise dos compostos, foram realizadas no final do período de alimentação, ou seja, sempre com o reator no seu volume final de 2L. Considerando também estado “pseudo-estacionário” ( $\frac{dS - SO_4}{dt} = 0$ ) e a ausência de sulfato na alimentação do reator, observa-se então que a quantidade de sulfato produzida (S-SO<sub>4</sub>) é função da velocidade de consumo de tiosulfato (q<sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub></sub>), como é mostrado na equação V.18.

$$S - SO_4 = q_{S_{2O_3}} * X * \frac{1}{D} \quad \text{V.18}$$

Por sua vez, a velocidade de consumo de tiosulfato (q<sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub></sub>) é proporcional às velocidades de respiração via oxigênio (Q<sub>O<sub>2</sub></sub>) e da respiração via nitrito ou nitrato (Q<sub>N<sub>2</sub></sub>). Em sistemas em que existam as duas formas de respiração, parte do tiosulfato será oxidado por um metabolismo e o restante pelo outro metabolismo. Considerando também que uma fração “f” do tiosulfato será oxidada pelo metabolismo aeróbio, e uma fração “1 - f” será oxidada pelo metabolismo anóxico, a velocidade específica de consumo de tiosulfato pelo metabolismo anóxico (q<sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub></sub><sup>DA</sup>) é representada pela equação V.19.

$$q_{S_{2O_3}}^{DA} = q_{S_{2O_3}} * (1 - f) \quad \text{V.19}$$

Onde: q<sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub></sub><sup>DA</sup> = velocidade específica de consumo de tiosulfato pelo metabolismo anóxico (mg S-S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/(gSST.d));

f = fração do tiosulfato oxidado pelo metabolismo aeróbio .

A relação entre a produção de nitrogênio gasoso e a produção total de sulfato determinada experimentalmente (Y<sub>N<sub>2</sub>/SO<sub>4</sub></sub>), agora pode ser representada pela equação

V.20, que relaciona as velocidades específicas de produção do nitrogênio gasoso e de consumo de tiosulfato.

$$Y_{N_2/SO_4} = \frac{q_{N_2}}{q_{S_2O_3}} \quad \text{V.20}$$

Onde:  $Y_{N_2/SO_4}$  = relação entre a produção de nitrogênio gasoso e a produção total de sulfato determinada experimentalmente ( $gN-N_2/gS-SO_4$ );

$q_{N_2}$  = velocidade específica de produção de nitrogênio molecular ( $mgN-N_2/(gSST.d)$ );

$q_{S_2O_3}$  = velocidade específica de consumo de tiosulfato ( $mgS-S_2O_3/(gSST.d)$ );

Combinando-se as equações V.19 e 20, obtêm-se a relação da velocidade específica de consumo de tiosulfato pelo processo de desnitrificação autotrófica ( $q_{S_2O_3}^{DA}$ ) e a velocidade específica de remoção de nitrogênio ( $q_{N_2}$ ). Sabe-se também que a  $q_{S_2O_3}^{DA}$  é também proporcional à fração do metabolismo aeróbio. Estas relações estão apresentadas na equação V.21.

$$q_{S-S_2O_3}^{DA} = \frac{q_{N-N_2}}{Y_{N-N_2/S-S_2O_3}} * (1-f) \quad \text{V.21}$$

Fazendo-se o balanço de massa para o sulfato no efluente do reator, produzido somente pelo processo anóxico (desnitrificação autotrófica) (Equação V.22) e para o nitrogênio removido (Equação V.12), tem-se:

$$S - SO_4^{DA} = q_{S_2O_3}^{DA} * X * \frac{1}{D} \quad \text{V.22}$$

Onde:  $S-SO_4^{DA}$  = concentração de sulfato no efluente ou no reator, produzido pela desnitrificação autotrófica ( $mgS-SO_4/L$ );

$q_{S_2O_3}^{DA}$  = velocidade específica de consumo de tiosulfato pelo metabolismo anóxico ( $mgS-S_2O_3/(gSST.d)$ );

$D$  = vazão específica de alimentação ( $d^{-1}$ );

$X$  = concentração celular ( $gSST/L$ ).

$$N - N_2 = N - N_2^{DA} = q_{N_2} * X * \frac{1}{D} \quad \text{V.12}$$

Onde:  $N-N_2$  = concentração de nitrogênio na forma de molecular eliminado do reator (mgN-N<sub>2</sub>/L);

$N-N_2^{DA}$  = concentração de nitrogênio na forma de molecular eliminado do reator pelo processo de desnitrificação autotrófica (mgN-N<sub>2</sub>/L);

$D$  = vazão específica de alimentação (d<sup>-1</sup>);

$q_{N_2}$  = velocidade específica de produção de nitrogênio molecular (mgN-N<sub>2</sub>/(gSST.d));

$X$  = concentração celular (gSST/L).

Multiplicando-se a Equação V.21 pelo termo “ $X * \frac{1}{D}$ ”, obtém-se a equação

V.23:

$$q_{S-S_2O_3}^{DA} * \left( X * \frac{1}{D} \right) = \frac{q_{N-N_2}}{Y_{N-N_2/S-S_2O_3}} * (1-f) * \left( X * \frac{1}{D} \right) \quad \text{V.23}$$

Consid erando-se as equações V.22 e V.12 e V.23, fica-se com:

$$N - N_2 = \frac{Y_{N_2/SO_4}}{(1-f)} * S - SO_4^{DA} \quad \text{V.24}$$

Reorganizando a Equação V. 24, obtêm-se:

$$\frac{N - N_2}{S - SO_4^{DA}} = \frac{Y_{N_2/SO_4}}{(1-f)} = Y_{N_2/SO_4}^{ANOXICO} \quad \text{V.24}$$

Onde:  $N-N_2$  = concentração de nitrogênio na forma de molecular eliminado do reator (mgN-N<sub>2</sub>/L);

$S-SO_4^{DA}$  = concentração de sulfato no efluente ou no reator, produzido pela desnitrificação autotrófica (mgS-SO<sub>4</sub>/L);

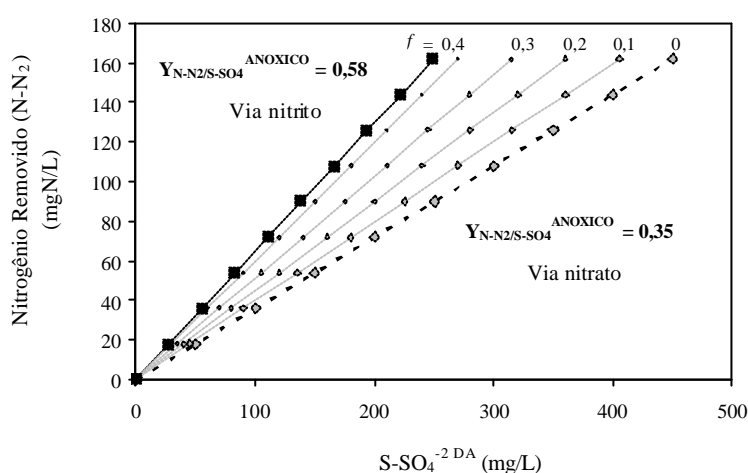
$Y_{N_2/SO_4}$  = relação entre a produção de nitrogênio gasoso e a produção total de sulfato determinada experimentalmente (gN-N<sub>2</sub>/gS-SO<sub>4</sub>);

$f$  = fração do tiosulfato oxidado pelo metabolismo aeróbio;

$Y_{N_2/SO_4}^{ANOXICO}$  = relação entre a produção de nitrogênio gasoso e a produção de sulfato pela desnitrificação autotrófica (gN-N<sub>2</sub>/gS-SO<sub>4</sub>);

Na Figura V.15 apresenta-se a simulação da equação V.24, para diferentes valores de “ $f$ ”. Quando se considera que o metabolismo aeróbio é nulo ou desprezível ( $f = 0$ ), tem-se o menor valor possível para este coeficiente ( $0,35\text{mgN-N}_2/\text{mgS-SO}_4$ ), como mostrado na Figura V.14. Em seguida, imaginando-se que o metabolismo aeróbio, represente valores de  $f$  de 0,1 até 0,4, ou de 10 a 40% do total de sulfato produzido, nota-se que a tendência é de obter valores maiores.

Assim, fica claro que o resultado obtido na predição realizada na Figura V.14 possa ter sido influenciada pela atividade aeróbia das bactérias oxidadoras de enxofre, que, naquele momento, tiveram a sua atividade aeróbia desprezada. Na verdade, considerou-se inicialmente que o valor do fator  $Y_{\text{N-N}_2/\text{S-SO}_4}$  seria igual ao fator de conversão de sulfato produzido em nitrogênio removido pelo processo anóxico ( $Y_{\text{N-N}_2/\text{S-SO}_4}^{\text{ANOXICO}}$ ).



**Figura V. 15:** Relação entre sulfato produzido pelo processo anóxico e a quantidade de nitrogênio removido em diferentes valores do metabolismo aeróbio ( $f$ ).

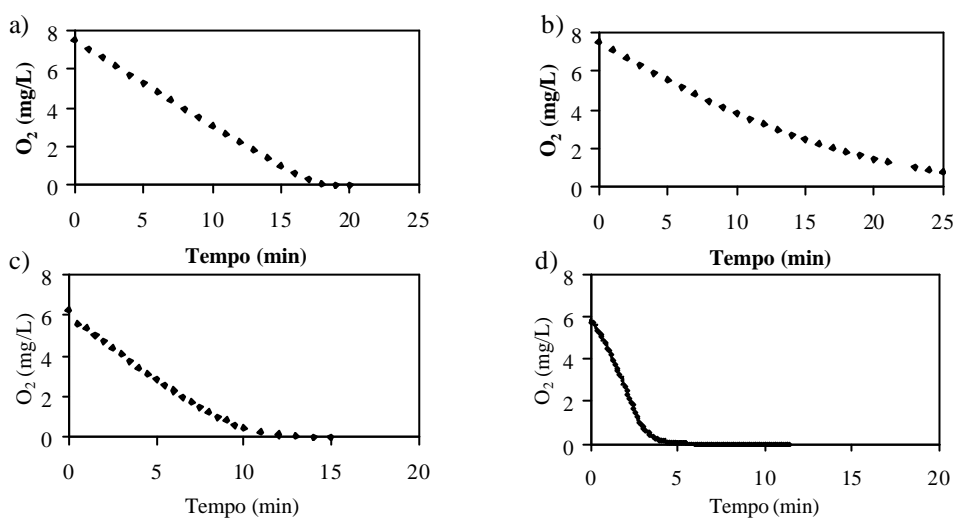
#### *Atividade aeróbia das bactérias oxidadoras de enxofre.*

Com o intuito de determinar se realmente as bactérias oxidadoras de enxofre possuíam a capacidade de respirar via oxigênio, mesmo depois de 45 ou 60min sob condições anóxicas, a velocidade de respiração via oxigênio foi acompanhada durante alguns períodos da operação do reator, utilizando-se o procedimento descrito no item IV.3.6, pela Técnica 1 – Medida direta do  $Q_{O_2}$ . A Figura V.16 apresenta a variação da concentração de oxigênio ao longo do tempo, quando  $20\text{ mgS-S}_2\text{O}_3/\text{L}$  foram

adicionadas ao reator, durante os estados estacionários atingidos nas condições I, II, III-2 e IV.

Para a determinação das velocidades específicas de respiração via oxigênio ( $Q_{O_2}$ ), a partir dos valores da concentração de oxigênio apresentados na Figura V.16, foi necessário determinar a concentração celular no momento em que o ensaio estava sendo realizado. Estes resultados podem ser observados na Tabela V.8.

A partir disto, para avaliar a dependência da velocidade específica de respiração via oxigênio ( $Q_{O_2}$ ) em relação à concentração de oxigênio, foi utilizado o modelo cinético tipo Monod, como o descrito na Equação IV.5, apresentada no item IV.3.6. Este modelo foi ajustado aos pontos experimentais de velocidade específica de respiração e a respectiva concentração de oxigênio ( $O_2$ ), determinados anteriormente, conforme também descrito no item IV.3.6.



**Figura V. 16:** Consumo de oxigênio pelas bactérias oxidadoras de enxofre durante as diferentes condições ambientais. a) Condição I; b) Condição II; c) Condição III-2; d) Condição IV.

Com estes resultados foi possível estimar o valor da constante de saturação para o oxigênio ( $K_o$ ), do modelo cinético (Eq. IV.5), bem como o valor da velocidade específica máxima de consumo de oxigênio ( $Q_{O_2MAX}$ ) determinados para cada ensaio de respirometria, com as biomassas das diferentes condições operacionais estudadas.

O valor da velocidade específica máxima de consumo de oxigênio ( $q_{O_2MAX}$ ), determinado pelo ajuste do modelo cinético, foi crescente conforme as condições operacionais aplicadas ao reator SBR. Este fato indica que a comunidade bacteriana, presente no reator, foi tornando-se mais especializada na oxidação do tiosulfato, em outras palavras, houve um enriquecimento da biomassa em bactérias oxidadoras de enxofre.

Apesar disto, para obter-se um ajuste razoável do modelo cinético (Eq. IV.5) aos pontos experimentais da condição II (vide Fig. V.16-b), foi necessário um valor da constante de saturação ( $K_o$ ) alto ( $K_o > 3\text{mg/L}$ ) (Tab. V.8). Este fato pode indicar que as bactérias oxidadoras de enxofre estavam mais aptas a respirar o nitrito ou o nitrato do que o oxigênio, nesta condição. Com a aplicação de níveis de aeração maiores, condições III-2 e IV, as bactérias oxidadoras de enxofre tornaram-se aptas novamente a respirar o oxigênio, pois os valores das constantes de saturação tornaram-se novamente próximas a da condição I.

**Tabela V. 8:** Parâmetros cinéticos aparentes da Equação IV.5

Condição	Tempo de operação (dias)	Concentração Celular (gSST/L)	$q_{O_2MAX}$ (mgO <sub>2</sub> /gSST.min)	$K_o$ (mg O <sub>2</sub> /L)
I	75	1,28	0,78	0,29
II	190	0,96	1,15	4,08
III-2	316	0,87	1,39	0,24
IV	385	0,98	1,52	0,32

Durante a condição IV, o tempo necessário de aeração para que as bactérias oxidadoras de enxofre retomem à sua velocidade de consumo de oxigênio foi investigado. Este resultado encontra-se apresentado na Figura V.17 que mostra a variação da concentração de oxigênio durante o período de 15 minutos de aeração na ausência de substratos (amônio e tiosulfato) e na presença, somente, de tiosulfato, conforme já relatado no item IV.3.6 do capítulo Materiais e Métodos.

Segundo a metodologia mencionada, quando esta medida foi realizada na ausência dos substratos foi possível determinar o valor do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k<sub>la</sub>) para o período de aeração (15min.). O valor do k<sub>la</sub> foi de 0,54min<sup>-1</sup> e foi considerado que este valor foi o mesmo para o experimento realizado na presença de tiosulfato, já que o volume do reator e as condições de agitação foram mantidas constantes

Nota-se na Figura V.17, para o experimento realizado sem a adição de substrato, que, após o período de 15 minutos com aeração, a variação de oxigênio determinada foi baixa, indicando que a velocidade de respiração desta biomassa estava limitada. Este valor pode ser relacionado com o metabolismo endógeno, denominado-se a velocidade de respiração endógena  $q_{O_2X_{end}}$ . Após esta verificação, foi adicionado tiosulfato, observando-se imediatamente o consumo de oxigênio, indicando que as bactérias oxidadoras de enxofre estavam aptas a oxidar o tiosulfato após o período de aeração de 15min.

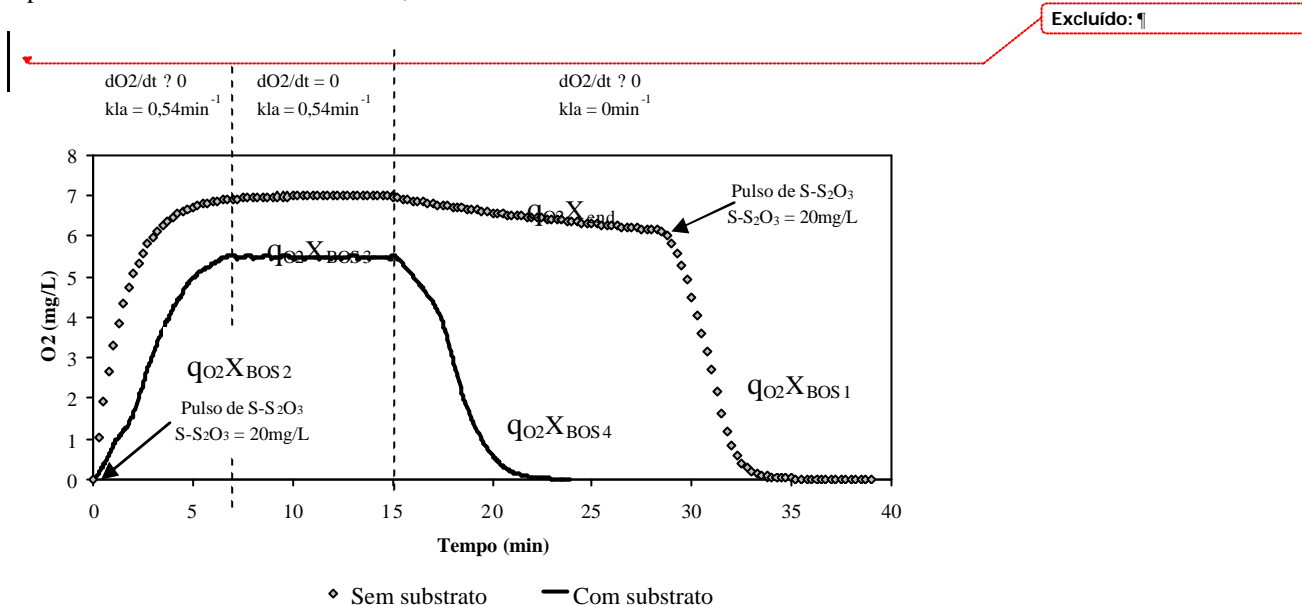
No experimento seguinte, o pulso de tiosulfato foi realizado antes do início do período de aeração, as bactérias oxidadoras de enxofre não estavam mais limitadas pela ausência de substrato, e, se fossem capazes, poderiam oxidar este composto desde o primeiro momento de aeração. Observa-se na Figura V.17 (ensaio “com substrato”) que realmente as BOS podem oxidar o tiosulfato independentemente do tempo de aeração, pois o aumento da concentração de oxigênio durante o período inicial de aeração, foi mais brando que no experimento anterior sem substrato.

Com estes resultados experimentais, as velocidades de respiração das bactérias oxidadoras de enxofre foram determinadas nas diferentes condições de aeração, conforme descrito no item IV.3.6, do capítulo materiais e métodos, pela técnica 2. Primeiramente foi determinada a velocidade após 15min. de aeração sem substrato, este valor representado na Figura V.17 pelo símbolo  $q_{O_2X_{end}}$ , sendo a velocidade de respiração endógena dos microrganismos presentes no experimento. A seguir, neste mesmo experimento, foi adicionado tiosulfato e foi determinada a velocidade de respiração das BOS, representado pelo símbolo  $q_{O_2X_{BOS1}}$  (Fig. V.17).

No experimento realizado todo na presença de tiosulfato, foram determinadas as velocidades de respiração, durante o aumento da concentração de oxigênio dissolvido ( $q_{O_2X_{BOS2}}$ ; Fig. V.17), durante o estado estacionário ( $q_{O_2X_{BOS3}}$ ; Fig. V.17) e quando a



aeração foi interrompida ( $q_{O_2X_{BOS\ 4}}$ ; Fig. V.17). Informa-se que as equações utilizadas para os cálculos dessas velocidades, estão descritas no item IV.3.6.



**Figura V. 17:** Influência do tempo de aeração na atividade das bactérias oxidadoras de enxofre, na presença e na ausência de substrato (Tiosulfato).

Na Tabela V.9 encontram-se apresentados os valores destas velocidades de respiração. Observa-se nesta tabela que, independente do tempo de aeração, o valor de  $q_{O_2X}$  calculado para o experimento com substrato está mais próximo do valor de referência ( $q_{O_2X_{BOS\ 1}}$ ). As diferenças ocorridas podem ser atribuídas a uma adaptação dos microrganismos à condição de aeração, já que na determinação do valor de  $q_{O_2X_{BOS\ 1}}$ , a biomassa estava exposta a condições aeróbias aproximadamente há 30min., o que não aconteceu no experimento seguinte.

Destaca-se, ainda, que o valor da velocidade de respiração endógena ficou muito abaixo dos demais valores de velocidades de respiração determinados. Assim acredita-se que realmente as células estavam limitadas pela ausência do substrato, no primeiro experimento. Conclui-se, portanto, que a atividade aeróbia das bactérias oxidadoras de enxofre foi responsável por parte do sulfato formado.

Desta forma, a relação entre o nitrogênio removido e o sulfato formado ( $Y_{N_2/SO_4}$ ) determinada anteriormente (Figura V.14), de 0,37 mgN-N<sub>2</sub>/mgS-SO<sub>4</sub>, realmente representa um valor abaixo do valor  $Y_{N_2/SO_4}^{ANOXICO}$ , confirmando a discussão anterior.

Imagina-se que se fosse possível calcular a fração  $f'$  e considerá-lo no cálculo efetuado, o valor da relação entre nitrogênio removido e sulfato produzido, pelo processo anóxico, estaria mais próxima ao proposto para a desnitrificação autotrófica via nitrito.

**Tabela V. 9:** Velocidades de respiração das bactérias oxidadoras de amônio nos diferentes períodos de aeração (Fig. V.17).

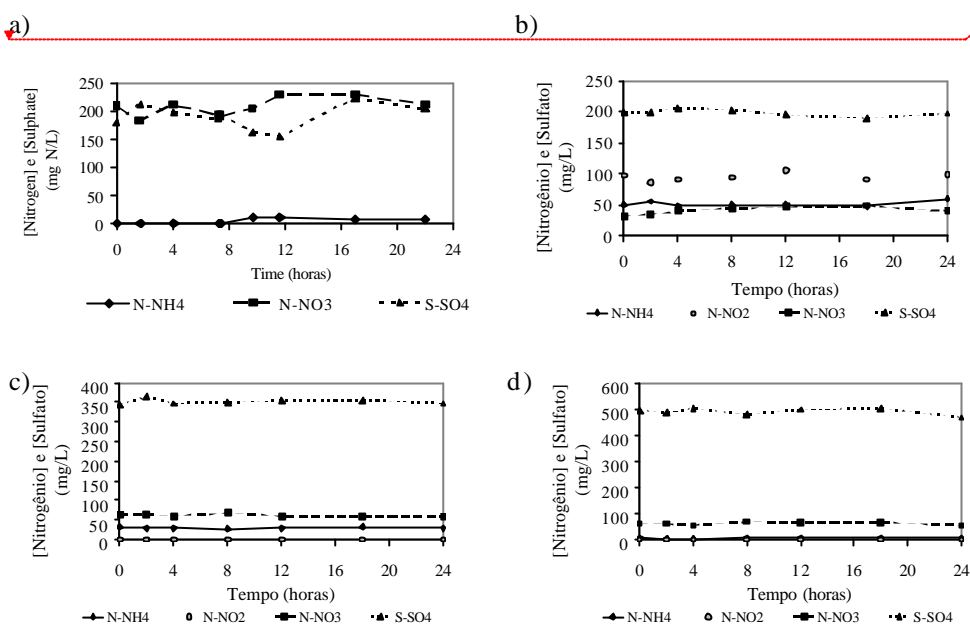
Velocidade de respiração	Valor (mgO <sub>2</sub> /L.min)
$q_{O_2}X_{end}$	0,104
$q_{O_2}X_{BOS1}$	1,830
$q_{O_2}X_{BOS2}$	1,209
$q_{O_2}X_{BOS3}$	1,096
$q_{O_2}X_{BOS4}$	1,232

### V. 2.2. Acompanhamento do ciclo de alimentação em 24 horas

Conforme descrito no item IV.3.2, do capítulo Materiais e Métodos, a operação do reator durante os estados “pseudo-estacionários”, foi feita de modo que o tempo de alimentação do reator fosse distribuído ao longo de 24 horas, completando um ciclo de operação. Porém, é importante observar o que ocorre durante a operação de um ciclo (24 horas), verificando se houve algum acúmulo de substrato ou intermediários das reações de oxidações. Para isto, foi realizado o acompanhamento dos compostos nitrogenados e sulfurosos durante todo o período de alimentação, nas diferentes condições operacionais estabelecidas no reator SBR, seguindo a mesma estratégia proposta por Zdradek (2005).

Em nenhuma das condições operacionais estudadas foram detectados estados transientes, em que existisse acúmulo de intermediários ou dos produtos finais. As variações das concentrações de N-NH<sub>4</sub>, N-NO<sub>3</sub> e S-SO<sub>4</sub> podem ser observadas na Fig. V.18. A Fig. V.18-a, representa a Condição I, a Fig. V.18-b a Condição II, a Fig. V.18-c a Condição III-2, e a Fig. V.18-d a condição IV. Nota-se que o valor médio das

concentrações destes compostos permaneceram em níveis similares aos obtidos nos respectivos estados “pseudo-estacionários”.

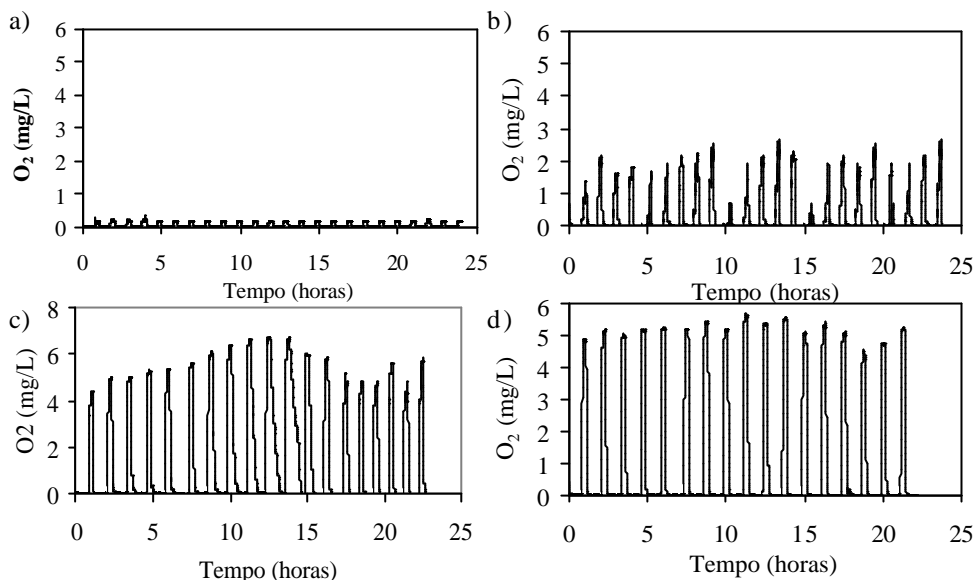


**Figura V. 18:** Variação da concentração das formas nitrogenadas e do sulfato durante as condições operacionais: a) Condição I (dia 60<sup>0</sup>); b) Condição II (dia 180<sup>0</sup>); c) Condição III-2 (dia 340<sup>0</sup>); d) Condição IV (dia 370<sup>0</sup>).

O acompanhamento da variação da concentração de oxigênio dissolvido durante o ciclo de alimentação foi realizado. A Figura V.19 apresenta esta variação da concentração de oxigênio durante as 24 horas de operação do ciclo de alimentação, para condição II (Fig. V.19-a), III-1 (Fig. V.19-b), III-2 (Fig. V.19-c), IV (Fig. V.19-d). Deve-se lembrar que a variação na concentração de oxigênio dissolvido foi bastante significativa, quando se compara um estado pseudo-estacionário (condição operacional) com o outro. Acredita-se que não houve mudança significativa nos níveis da concentração de oxigênio de um ciclo de alimentação para outro, no mesmo estado pseudo-estacionário, podendo-se considerar que estes resultados, apresentados na Figura V.19, descrevem as condições em que os microrganismos estavam expostos, em cada condição operacional.

A concentração de oxigênio durante a fase aeróbia, foi de 0,2mg/L para a condição II e maior que 1mg/L para a condição III-1. Particularmente, nestas duas condições os microrganismos envolvidos na oxidação do amônio e do enxofre poderiam

ter as suas atividades limitadas pela concentração de oxigênio. Nas demais condições, durante a fase aeróbia acredita-se que este tipo de limitação não aconteceu, pois a concentração de oxigênio estava elevada. No entanto, os baixos níveis dos substratos observados nestes estados pseudo-estacionários, podem ter limitado a atividade destes microrganismos.

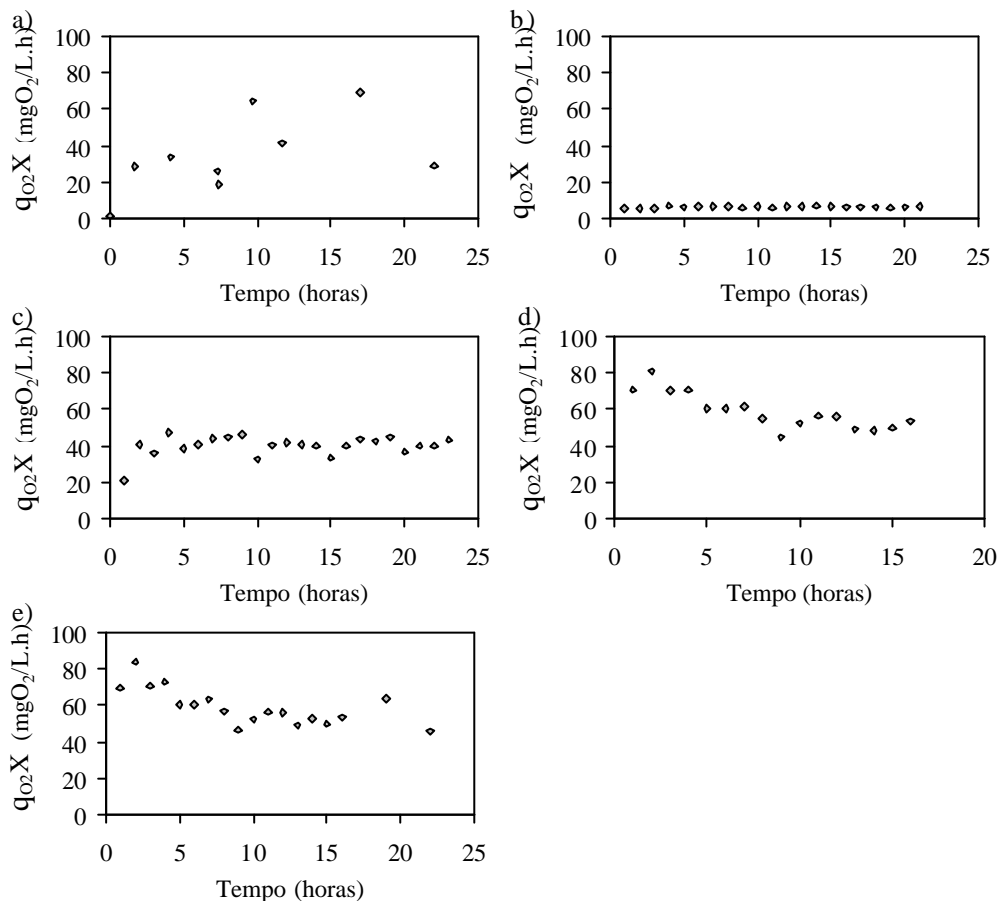


**Figura V. 19:** Variação da concentração de oxigênio durante um ciclo de 24 horas de operação na diferentes condições aplicadas ao reator SBR. a) Condição II (dia 180<sup>o</sup>); b) Condição III-1 (dia 290<sup>o</sup>) ; c) Condição III-2 (dia 340<sup>o</sup>); d) Condição IV (dia 370<sup>o</sup>).

Juntamente com os resultados apresentados anteriormente, foram determinadas as velocidades de respiração ( $q_{O_2X}$ ) dos microrganismos, nas condições operacionais apresentadas anteriormente. Na Figura V.20 estão apresentadas as velocidades de respiração determinadas ao longo de ciclos de alimentação do reator, para cada regime pseudo-estacionário da operação do reator SBR. Durante a condição I, observaram-se as maiores variações no valor da velocidade de respiração, atribuindo-se este fato aos baixos níveis de substrato que estavam limitando o consumo de oxigênio nesta fase, lembrando-se que esta fase caracteriza-se pela plena aeração, portanto, pela disponibilidade de oxigênio dissolvido.

Nas condições seguintes, onde as concentrações dos substratos estavam em um nível menos limitante, as variações das velocidades de respiração foram reduzidas, como pode ser observado nas Figuras V.20-b, c, d e e. Na Condição II, onde a

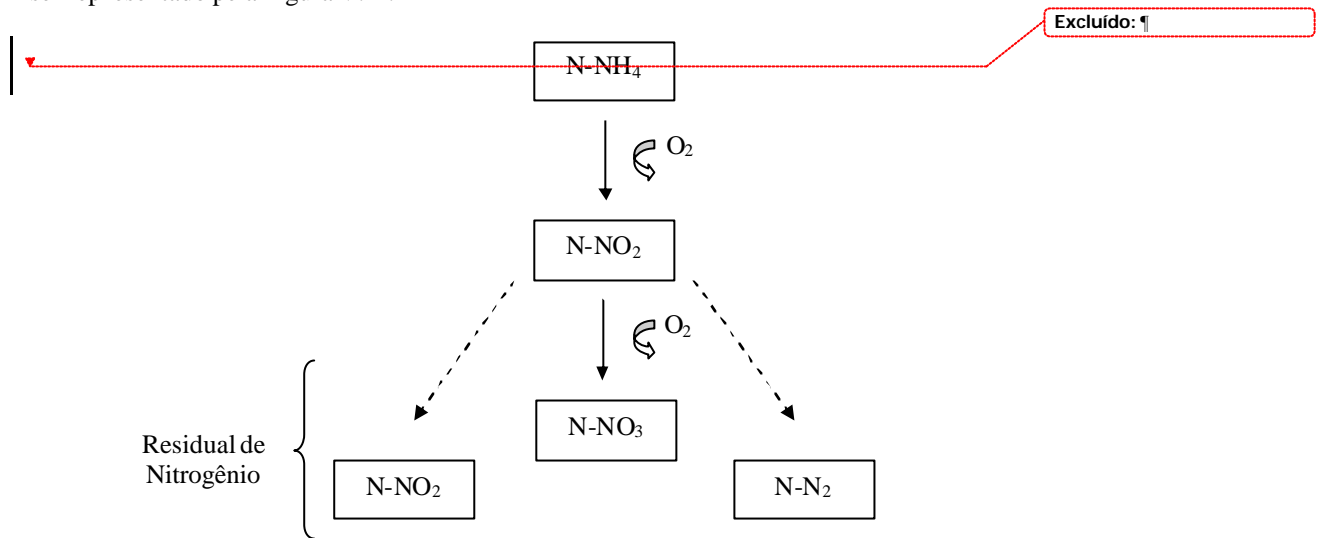
concentração de oxigênio foi de 0,2mg/L, foram medidas as menores velocidades de respiração. Nas condições seguintes, o aumento no valor da concentração de oxigênio dissolvido, durante os períodos aerados, proporcionou um aumento na velocidade de respiração dos microrganismos, lembrando que a medida do  $q_{O_2X}$  eram realizadas no final dos períodos aerados, conforme descrito no item IV.3.8.



**Figura V. 20:** Medida da velocidade de respiração durante um ciclo de 24 horas de operação nas diferentes condições aplicadas ao reator SBR. a) Condição I; b) Condição II; c) Condição III; d) Condição IV; e) Condição V.

O consumo de oxigênio medido nestes experimentos foi proporcional à quantidade de amônio e de tiosulfato oxidado. Considerando-se que o consumo de oxigênio, referente à oxidação do nitrogênio amoniacal, aconteça primeiramente para transformar o amônio até nitrito e, na seqüência, parte deste nitrito seja transformado em nitrato e a outra parte deste composto seja reduzido a nitrogênio molecular ( $N-N_2$ ), o

consumo de oxigênio envolvido nestas transformações do nitrogênio amoniacal pode ser representado pela Figura V.21.



**Figura V. 21:** Transformações do nitrogênio amoniacal possíveis de ter ocorrido no reator SBR.

O total de oxigênio consumido ( $T_{O_2}^1$ ) durante a transformação do amônio até nitrito é proporcional ao residual de nitrogênio na forma de nitrito, nitrato e nitrogênio removido, este último medido pelo balanço de massa. A constante de proporcionalidade é o fator de conversão de oxigênio consumido por nitrito produzido ( $Y_{O_2/N-NO_2}$ ), cujo valor é de  $3,29\text{mgO}_2/\text{mgN-NO}_2$  (Henze, 1999). A equação V.25 descreve esta quantificação.

$$T_{O_2}^1 = (Y_{O_2/NO_2} * (N-NO_2 + N-NO_3 + N-N_2)) * Q \quad \text{v.25}$$

Onde:  $T_{O_2}^1$  = total de oxigênio consumido na oxidação do amônio até nitrito ( $\text{mgO}_2/\text{d}$ );

$Y_{O_2/NO_2}$  = fator de conversão de oxigênio consumido por nitrito produzido ( $\text{gO}_2/\text{gN}$ );

$N-NO_2$  = concentração de nitrogênio na forma de nitrito ( $\text{mgN/L}$ );

$N-NO_3$  = concentração de nitrogênio na forma de nitrato ( $\text{mgN/L}$ );

$N-N_2$  = concentração de nitrogênio eliminado, determinado pelo balanço de nitrogênio ( $\text{mgN/L}$ );

$Q$  = vazão de alimentação ( $\text{L/d}$ )

Somente uma parte deste nitrito será oxidado a nitrato, consumindo mais oxigênio, lembrando-se que se está assumindo que o nitrato não seria consumido pelo metabolismo de desnitrificação autotrófica. Então, o consumo de oxigênio envolvido com a oxidação do nitrito ( $T_{O_2}^2$ ) é proporcional ao residual de nitrato medido no efluente. A equação V.26 descreve este consumo, e apresenta a constante de proporcionalidade  $Y_{O_2/N-NO_3}$ , que representa a quantidade de oxigênio consumido na oxidação do nitrito até nitrato, cujo o seu valor é de 1,06mgO<sub>2</sub>/mgN (Henze, 1999).

$$T_{O_2}^2 = (Y_{O_2/NO_3} * (N - NO_3)) * Q \quad \text{V.26}$$

Onde:  $T_{O_2}^2$  = total de oxigênio consumido durante a transformação do nitrito até nitrato (mg O<sub>2</sub>/d);

$Y_{O_2/N-NO_3}$  = fator de conversão de oxigênio consumido por nitrato produzido a partir do nitrito (gO<sub>2</sub>/gN);

N-NO<sub>3</sub> é a concentração de nitrogênio na forma de nitrato (mgN/L);

Q = vazão de alimentação;

Pelas equações V. 25 e 26 foi calculada a quantidade de oxigênio consumido total teórico ( $T_{O_2}^{total}$ ), apresentando-se estes valores na Tabela V.10 juntamente com a quantidade real de oxigênio consumida medida experimentalmente ( $T_{O_2}^{EXP\ total}$ ), cuja determinação será descrita a seguir.

Primeiramente buscou-se equacionar a quantidade de oxigênio consumido ( $T_{O_2}^t$ ) no volume de reação em um dado instante t, através do produto da velocidade de consumo de oxigênio no instante t ( $q_{O_2}X^t$ ) pelo volume do reator no mesmo instante ( $V_r^t$ ), conforme indica na Equação V.27.

$$T_{O_2}^t = (q_{O_2}X^t * V_r^t) \quad \text{V.27}$$

Onde:  $T_{O_2}^t$  = quantidade de oxigênio consumido no volume de reação em um dado instante t (mgO<sub>2</sub>/h);

$V_r^t$  = volume do reator no mesmo instante t (L).

Como a vazão de alimentação era constante (1 litro de meio a cada 24 horas), a variação do volume é linear com o tempo, ou seja:

$$V_r^t = V_0 + Q * t \quad \text{V.28}$$

onde:  $V_0$  = volume inicial do reator e igual a 1L;

$Q$  = vazão de alimentação e igual 0,0417L/h;

$t$  = tempo em foi realizado a medida (h).

Assim:

$$T_{O_2}^t = q_{O_2} X^t + 0,0417 * q_{O_2} X^t * t \quad \text{V.29}$$

Desta forma, pode-se calcular os valores de  $T_{O_2}^t = f(t)$  para cada valor experimental de  $q_{O_2} X^t$  determinado (vide Fig. V.20), obtendo-se a variação deste valor em função do tempo. A massa total de oxigênio consumido é dado pela integral da equação polinomial de  $T_{O_2}^t$  em função do tempo, multiplicada pela fração de tempo em que o reator permaneceu sob aeração, ou seja:

$$T_{O_2}^{EXP}_{Aer} = \left( \int_0^{t_{O_2}} (T_{O_2}^t f(t)) * dt \right) * t_{O_2} \quad \text{V.31}$$

Onde :  $T_{O_2}^{EXP}_{Aer}$  = massa total de oxigênio consumido durante o período aerado (mgO<sub>2</sub>/h);

$t_{O_2}$  = fração do tempo em que o reator permaneceu aerado;

$T_{O_2}^t f(t)$  = equação polinomial que relaciona a quantidade de oxigênio consumido ( $T_{O_2}^t$ ) e o tempo.

Salienta-se que, para este cálculo, considerou-se que  $q_{O_2} X^t$  e  $V_r^t$  foram constantes em cada período aerado, de aproximadamente 15min.

Além do oxigênio consumido durante os períodos de aeração, foi determinada a quantidade de oxigênio consumido nos períodos sem aeração, onde existia somente a transferência de oxigênio pela superfície do líquido. Este cálculo foi feito pela determinação da velocidade de respiração nestas condições, pela equação do balanço de oxigênio (Eq. IV.3), conforme indicado no item 3.8, do capítulo Materiais e Métodos. Neste cálculo, foi considerado que a variação da concentração de oxigênio com o tempo ( $\frac{dO_2}{dt}$ ) foi nula.

$$\frac{dO_2}{dt} = K_L A * (O_2^{SAT} - O_2) - q_{O_2} X \quad \text{IV.3}$$

Onde:  $O_2$  = concentração de oxigênio do experimento (mg/L);



$O_2^{SAT}$  = concentração de oxigênio na saturação (7,5mg/L - APHA, 1995);

$K_L A$  = coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $h^{-1}$ );

$q_{O_2}$  = velocidade específica de consumo de oxigênio (mgO<sub>2</sub>/gSST.h);

$X$  = concentração celular (gSST/L).

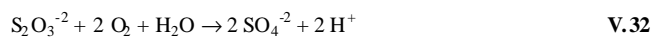
Para isto, é necessário conhecer o valor do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $K_L A$ ) do reator agitado. Conforme indicado no item IV.3.2 (Figura IV.2), este valor foi determinado em diferentes volumes do reator ( $V_r$ ), sem a presença da biomassa e na condição padrão de agitação em que o reator foi operado durante todas as condições operacionais, obtendo-se a equação (vide Figura IV.2, página 36) :

$$K_L A = 3,216 * e^{-0,9636 * V_r} \quad \text{V.31}$$

Com o valor da velocidade de respiração ( $q_{O_2} X$ ) no período sem aeração, foi determinada a quantidade de oxigênio consumido neste período ( $T_{O_2}^{EXP}_{Anox}$ ) sem aeração e quando o reator estava limitado pelo oxigênio, o procedimento realizado para este cálculo foi o mesmo para a determinação do oxigênio consumido durante o período com aeração.

A Tabela V.10, apresenta os valores teóricos do total de oxigênio consumido pela oxidação do nitrogênio amoniacal ( $T_{O_2}$  total), além dos valores experimentais do total de oxigênio consumido medido durante a fase aerada (15min) ( $T_{O_2}^{EXP}_{Aer.}$ ) e durante a fase anóxica (45min ou 60min) ( $T_{O_2}^{EXP}_{Anox}$ ), onde existia somente uma aeração pela agitação da superfície do líquido.

Observou-se que, durante a condição I, a quantidade de oxigênio consumido ( $T_{O_2}^{EXP}$  total) foi um pouco superior à quantidade de oxigênio previsto ( $T_{O_2}$  total). Contudo, cabe ressaltar que, nesta condição, 200mg/L de S-S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> foi alimentado ao reator e oxidado somente via oxigênio, devendo-se adicionar este valor ao valor teórico calculado anteriormente, utilizando-se o fator estequiométrico  $Y_{O_2/S}$  (1gO<sub>2</sub>/gS-S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), obtido da estequiometria da oxidação aeróbia do tiosulfato, Equação V.32.



**Tabela V. 10:** Valores teóricos e experimentais de consumo de oxigênio durante as condições operacionais aplicadas ao reator SBR.

Condição	N Oxidado (mgN/d)	Teórico			Experimental		
		T <sub>O<sub>2</sub></sub> <sup>1</sup> (mg/d)	T <sub>O<sub>2</sub></sub> <sup>2</sup> (mg/d)	T <sub>O<sub>2</sub></sub> total	T <sub>O<sub>2</sub></sub> <sup>EXP</sup> <sub>Aer</sub> (mgO <sub>2</sub> /d)	T <sub>O<sub>2</sub></sub> <sup>EXP</sup> <sub>Anox.</sub> (mgO <sub>2</sub> /d)	T <sub>O<sub>2</sub></sub> <sup>EXP</sup> total
I	190	616	201	818	966	-	966
II	196	635	30	666	556	202	257
III-1	183	599	24	624	432	202	634
III-2	216	700	38	738	506	268	774
IV	232	753	61	814	550	268	818

Na condição II, observou-se que a quantidade de oxigênio consumida foi inferior ao previsto. Este fato pode estar relacionado com os baixos níveis de oxigênio detectados, pois nesta situação a velocidade de consumo de oxigênio é determinada sob condições atípicas. Ou seja, os microrganismos tinham sua atividade limitada pela concentração de oxigênio e, provavelmente, a medida do valor da concentração de oxigênio foi feita em uma faixa próxima ao limite de detecção e precisão do eletrodo.

Nas demais condições, a quantidade de oxigênio consumido foi próxima à prevista pelas equação descritas anteriormente ( $T_{O_2} \text{ total} \sim T_{O_2}^{EXP} \text{ total}$ ). Contudo, nestes cálculos não foi considerada a quantidade de oxigênio necessária para a oxidação do tiosulfato a sulfato, que poderia estar ocorrendo no reator. Esta diferença pode ser atribuída aos valores de  $Y_{O_2/NO_2}$  e  $Y_{O_2/NO_3}$  considerados nos cálculos anteriores, que provavelmente são valores diferentes dos reais, para este caso específico.

Dentre todas as variáveis que podem influenciar a eficiência deste processo, observou-se que o nível de aeração, ou seja, a quantidade de oxigênio suprido ao reator, apresenta um efeito significativo sobre a fisiologia dos microrganismos envolvidos e, conseqüentemente, no desempenho do reator. Com o intuito de melhor observar este efeito, foi determinada a relação entre a quantidade de nitrogênio na forma de amônio alimentado ao reator e a quantidade total de oxigênio consumida, determinada experimentalmente ( $T_{O_2}^{EXP}$ , vide Tabela V.7). Na Tabela V.11 e nas Figuras V.22-a, b, c e d encontram-se os valores desta relação, assim como os valores percentuais de

nitrogênio na forma de N-NH<sub>4</sub>, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e N-N<sub>2</sub>, para cada condição experimental ensaiada.

Observa-se na Tabela V. 11 que, na condição II, na qual o reator foi operado em baixas concentrações de oxigênio, a relação N-NH<sub>4</sub>/O<sub>2</sub> foi muito superior às demais condições. Para evitar-se tendências que podem não representar os fenômenos reais que ocorreram no sistema em estudo, nos cálculos seguintes esta condição II foi desprezada.

**Tabela V. 11:** Valores dos residuais de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e N-N<sub>2</sub>, assim como a quantidade de N-NH<sub>4</sub> alimentada e O<sub>2</sub> consumido, e as respectivas relações N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/O<sub>2</sub> aplicadas em cada condição experimental.

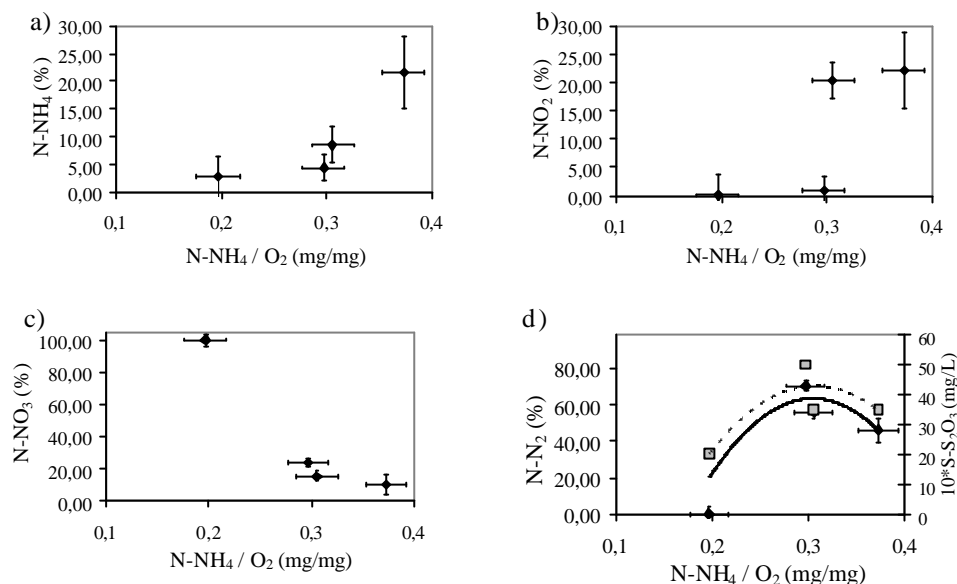
Condição	O <sub>2</sub> (mg/d)	N-NH <sub>4</sub> (mg/d)	N-NH <sub>4</sub> /O <sub>2</sub> (g/g)	N-NH <sub>4</sub> (%)	N-NO <sub>2</sub> (%)	N-NO <sub>3</sub> (%)	N-N <sub>2</sub> (%)
I	966,42	190,00	0,20	2,83	0,03	100,04	0,00
II	257,50	230,40	0,89	14,81	32,96	12,12	40,20
III-1	633,60	236,20	0,37	21,77	22,14	9,88	46,41
III-2	774,20	236,20	0,31	8,50	20,47	15,25	56,08
IV	818,20	243,00	0,30	4,40	1,08	23,89	70,83

Com os valores apresentados anteriormente, Tabela V. 11, foi construída a Figura V.22 que relaciona os valores do residual de nitrogênio amoniacal (Fig.V.22-a), o de nitrito formado (Fig.V.22-b), o de nitrato formado (Fig.V.22-c) e a quantidade de nitrogênio removido pelo balanço de massa, com o valor da relação N-NH<sub>4</sub>/O<sub>2</sub>. Todos os valores de concentrações de nitrogênio, usados nestas figuras, foram obtidos nos estados pseudo-estacionários da operação do reator e foram determinados valores médios e os desvios padrões para cada condição ensaiada, durante o período de operação do reator neste estado pseudo-estacionário.

A relação teórica entre N-NH<sub>4</sub>/O<sub>2</sub> para que ocorra somente a nitrificação parcial até nitrito é de 0,31gN-NH<sub>4</sub>/gO<sub>2</sub> e para que ocorra a nitrificação total este valor é de 0,24 gN-NH<sub>4</sub>/gO<sub>2</sub> (Equações II.1 e II.2). Observa-se na Figura V.21-a que o residual de amônio detectado no reator foi próximo a zero quando se operou o reator em valores abaixo de 0,3gN-NH<sub>4</sub>/gO<sub>2</sub>, ou seja, supria-se oxigênio suficiente para que todo o nitrogênio amoniacal fosse oxidado. Com a operação do reator em condições de limitação de oxigênio, relações N-NH<sub>4</sub>/O<sub>2</sub> superiores a 0,31gN-NH<sub>4</sub>/gO<sub>2</sub>, a quantidade

de nitrogênio oxidado tornou-se menor e, conseqüentemente, um aumento no residual de amônio foi detectado.

De acordo com a Figura V.21-a acredita-se que a operação de um reator em níveis maiores que  $0,3\text{mgN-NH}_4/\text{mgO}_2$ , terá como conseqüência a presença de elevadas concentrações de nitrogênio amoniacal, no efluente final, ao lado de uma redução da remoção de nitrogênio pela ausência de aceptores finais de elétrons para a desnitrificação autotrófica.



**Figura V. 22:** Influência da relação  $\text{NH}_4/\text{O}_2$  nas formas de nitrogênio produzidas no reator SBR: a) N-NH<sub>4</sub>; b) N-NO<sub>2</sub>; c) N-NO<sub>3</sub>; d) N-N<sub>2</sub> (?) e. S-S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ( )

O residual de nitrito foi observado somente quando relações superiores ao valor de  $0,3\text{mgN-NH}_4/\text{mgO}_2$  foram aplicadas no reator, como pode ser observado na Fig. V.22-b. Com estes resultados recomenda-se que a operação do reator ocorra em uma relação próxima ao valor apresentado anteriormente ( $0,3\text{ mgN-NH}_4/\text{mgO}_2$ ), pois o excessivo acúmulo de nitrito pode ocasionar problemas de toxicidade, dependendo da concentração de nitrito e do valor do pH do reator.

A formação do nitrato foi inversamente proporcional ao aumento da relação entre  $\text{N-NH}_4/\text{O}_2$ , como é apresentado na Figura V.22-c. Observou-se um baixo residual de nitrato quando relações superiores a  $0,3\text{gN-NH}_4/\text{gO}_2$  foram utilizadas.

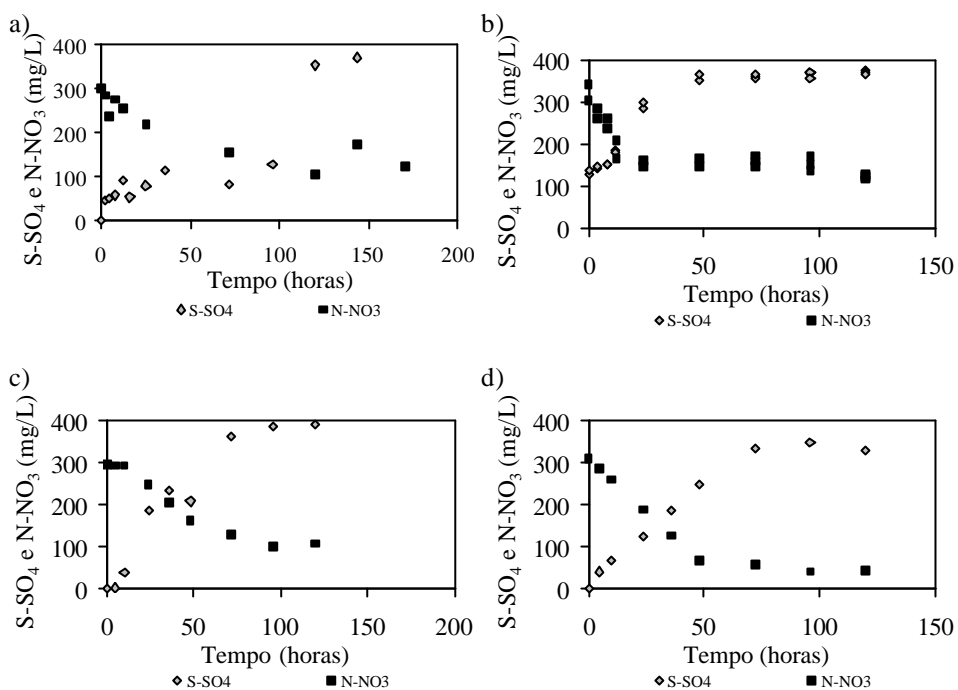
A remoção de nitrogênio, que é uma consequência de todos estes fatores, foi máxima quando o reator foi operado em valores próximos a  $0,3\text{mgN-NH}_4/\text{mgO}_2$ . Como já observado em resultados anteriores (item V.2.1, Figuras V.12 e V14), a porcentagem de nitrogênio removido é influenciada pela quantidade de tiosulfato adicionado, como pode ser observado na Figura V.22-d.

### V. 2.3. Atividade desnitrificante autotrófica.

A caracterização do potencial de desnitrificação dos microrganismos, durante os diferentes estados pseudo-estacionários atingidos, foi feita pela medida das velocidades específicas iniciais de redução do nitrato ou nitrito e a respectiva produção do sulfato (produto da oxidação do tiosulfato), em cada experimento ensaiado, conforme a metodologia descrita no item IV.3.7.

Na Figura V.23 são apresentadas as variações no tempo das concentrações de nitrato e sulfato, detectados durante os experimentos de desnitrificação autotrófica via nitrato, na condição I (Fig.V.23-a), na condição II (Fig.V.23-b), na condição III-2 (Fig.V.23-c), e na condição IV (Fig.V.23-d). Os resultados obtidos da velocidade específicas iniciais de redução de nitrato ( $Q_{\text{NO}_3}$ ) e de produção de sulfato ( $Q_{\text{SO}_4}$ ), para a desnitrificação autotrófica via nitrato estão apresentados na Tabela V. 12. Os valores das velocidades específicas iniciais foram determinados com o valores das concentrações de nitrato e sulfato das primeiras 12 horas.

Nos experimentos de desnitrificação autotrófica via nitrato não foi observada uma grande alteração das atividades das biomassas ensaiadas. Para a comparação do potencial de desnitrificação autotrófica optou-se por comparar as velocidades específicas de produção de sulfato, que representam melhor o metabolismo de interesse (desnitrificação autotrófica via tiosulfato). A velocidade específica de produção de sulfato ( $Q_{\text{SO}_4}$ ) foi similar nas condições II, III-2 e IV, diferenciando-se um pouco na condição I.



**Figura V. 23:** Concentrações de nitrato e sulfato durante o ensaio de atividade desnitrificante autotrófica nas diferentes condições de operação do reator. a) condição I; b) condição II; c) condição III-2; d) condição IV

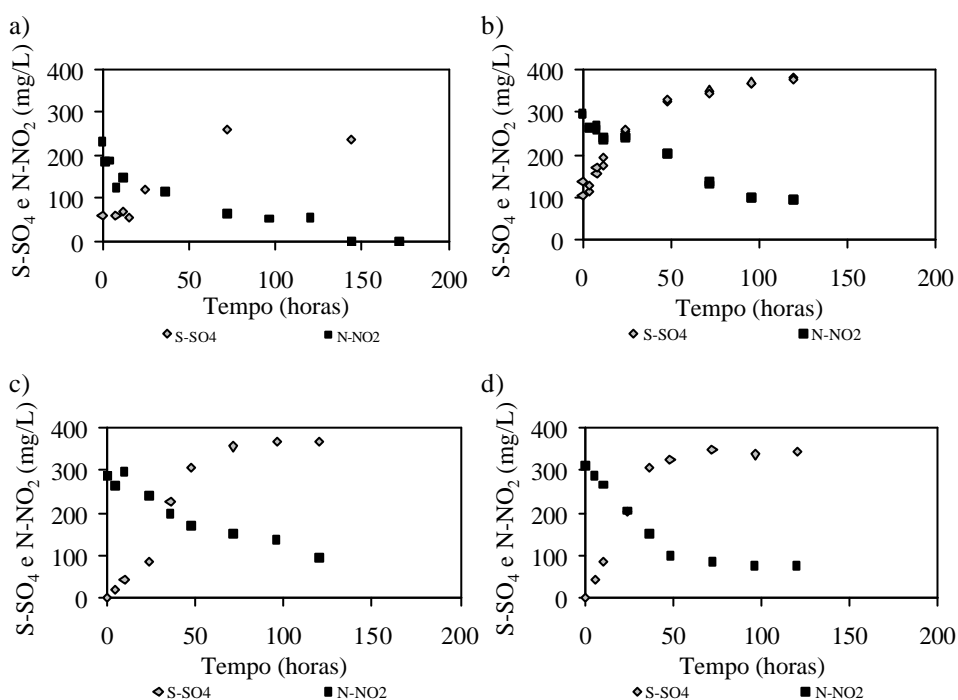
**Tabela V. 12:** Valores das velocidades específicas de consumo de nitrato, de produção de sulfato.

Condições Operacionais	$Q_{NO_3}$ (mgN-NO <sub>3</sub> /gSST.h)	$Q_{SO_4}$ (mgS-SO <sub>4</sub> /gSST.h)
I	5,39	24,61
II	36,85	20,27
III-2	11,64	21,46
IV	16,98	23,65

Simultaneamente a medida da desnitrificação autotrófica via nitrato foi realizado em outro experimento, para a determinação atividade via nitrito, sob as mesmas

condições de doador de elétrons (tiosulfato) e quantidade de biomassa. Os resultados obtidos com estes experimentos estão apresentados na Figura V.24, que mostra a variação das concentrações de nitrito e sulfato determinadas ao longo do tempo. As velocidades iniciais específicas de redução do nitrito ( $q_{N-NO_2}$ ) e produção de sulfato ( $q_{S-SO_4}$ ) estão apresentadas na Tabela V. 13.

Dos resultados indicados na Tabela V.13 observou-se que, diferentemente da atividade de desnitrificação via nitrato, houve um aumento na atividade dos microrganismos quanto à produção do sulfato, refletindo no aumento da capacidade desta biomassa de utilizar o nitrito como acceptor final de elétrons no metabolismo autotrófico. O aumento da atividade de desnitrificação autotrófica via nitrito ocorreu em todas as etapas, o que pode indicar que esta biomassa encontrava-se apta a desnitrificar via nitrito, mesmo nas condições em que o residual de nitrito era baixo no efluente final.



**Figura V. 24:** Concentrações de nitrito e sulfato durante o ensaio de atividade desnitrificante autotrófica nas condições diferentes condições de operação do reator. a) Condição I; b) Condição II; c) Condição III-2; d) Condição IV.

**Tabela V. 13:** Valores das velocidades de consumo de nitrito, de produção de sulfato e da relação estequiométrica entre nitrito e sulfato.

Condições Operacionais	$Q_{N-NO_2}$ (mgN-NO <sub>2</sub> /gSST.h)	$Q_{S-SO_4}$ (mgS-SO <sub>4</sub> /gSST.h)
I	2,13	8,48
II	17,80	18,19
III-2	9,73	23,26
IV	14,65	28,39

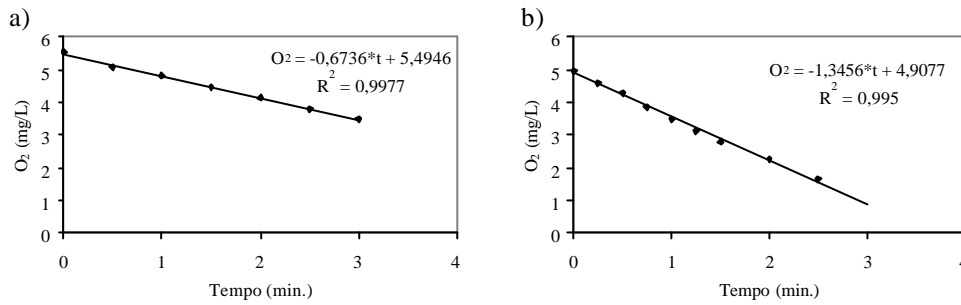
A desnitrificação via nitrito é um processo mais sensível a fenômenos de inibição, independente do tipo de doador de elétrons, como já mencionado. Apesar disto, observou-se nos ensaios com a biomassa do reator, nas diferentes condições operacionais, uma adaptação a este composto. Esta adaptação é refletida, quando compara-se as velocidades específicas de produção do sulfato, obtidas nas diferentes condições operacionais.

#### V.2.4. Atividade Nitrificante

Conforme mencionado no item IV.3.6, durante as condições I e IV foram medidas as atividades nitrificantes dos microrganismos presentes no reator SBR. Esta medida foi realizada pela técnica de respirometria em diferentes concentrações de nitrogênio amoniacal, com o objetivo de determinar em que concentração de substrato a máxima velocidade de consumo de oxigênio era atingida.

Dois exemplos de medidas de velocidade de consumo de oxigênio podem ser observados nas Figuras V.25-a e b, que apresentam a variação da concentração de oxigênio dissolvido quando a biomassa do reator foi exposta a uma concentração de 5mg/L e 20mg/L de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, respectivamente. Ambos os resultados foram obtidos com a biomassa da condição I. Observa-se que a velocidade de consumo de oxigênio ( $q_{O_2X}$ ) foi influenciada pela quantidade de substrato disponível para os microrganismos oxidadores de amônio.





**Figura V. 25:** Variação da concentração de oxigênio ao longo do tempo durante o ensaio de respirometria para a biomassa nitrificante: a) Para a concentração de N-NH<sub>4</sub> de 5mg/L; b) Para a concentração de N-NH<sub>4</sub> de 20mg/L

Com a medida do  $q_{O_2X}$  em outras concentrações de nitrogênio amoniacal, observou-se que a variação desta velocidade ocorreu até a concentração de 50mg/L de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, mantendo-se praticamente constante para maiores valores dessa concentração. A variação da velocidade com a concentração de substrato, apresentou um comportamento típico de fisiologias de crescimento de microrganismos e pode ser descrito por equações cinéticas tipo Monod. A equação IV.10 foi utilizada para o ajuste dos dados experimentais

$$q_{O_2} = q_{O_2 MAX} * \frac{N - NH_4}{N - NH_4 + K_N} \quad \text{IV.10}$$

Onde:  $q_{O_2}$  = velocidade específica de consumo de oxigênio;

$q_{O_2 MAX}$  = velocidade específica máxima de consumo de oxigênio;

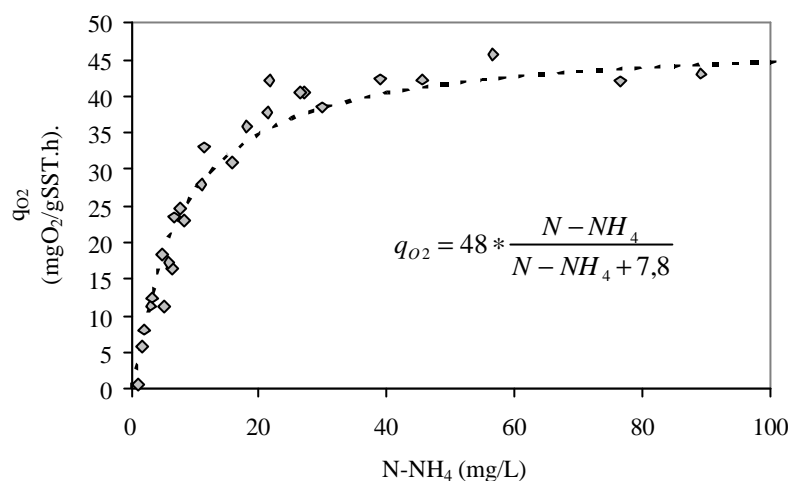
$K_N$  = constante de saturação do nitrogênio (mgN/L);

N-NH<sub>4</sub> = concentração de amônia (mgN/L).

Observa-se na Figura V.26 a variação da velocidade específica de consumo de oxigênio ( $q_{O_2}$ ) com a concentração de nitrogênio amoniacal, obtida no experimento realizado com a biomassa da condição I. Nesta figura está também apresentado o ajuste da Equação IV.10 aos pontos experimentais, bem como os valores dos parâmetros cinéticos obtidos.

O maior valor de  $q_{O_2}$  obtido ficou entre 40 e 50 mgO<sub>2</sub>/gSST.h para concentrações de nitrogênio amoniacal acima de 20mg/L. Estes valores representam

uma atividade de consumo de nitrogênio amoniacal de 9,3 e 11,65mgN-NH<sub>4</sub>/gSST.h, respectivamente. Para a determinação destes valores foi utilizado o fator de conversão de  $Y_{O_2/N}$  de 4,25 mgO<sub>2</sub>/mgN, que considera o total de oxigênio consumido para a oxidação do amônio até nitrato, segundo a estequiometria indicada pelas Equações II.1 e II.2. O valor do  $q_{O_2 \text{ MAX}}$  determinado pelo ajuste da equação IV.10 foi de 48mgO<sub>2</sub>/gSST.h e a constante de saturação ( $K_N$ ) foi de 7,8mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L.



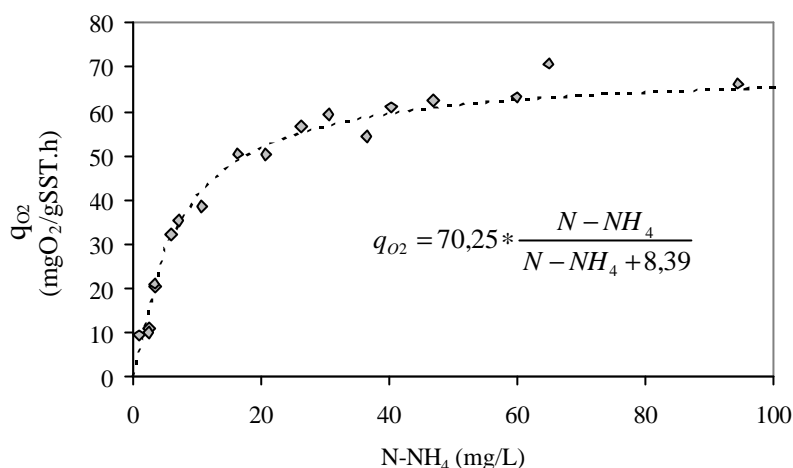
**Figura V. 26:** Variação da velocidade de respiração das bactérias nitrificantes em diferentes concentrações de nitrogênio amoniacal – Condição I.

A variação da velocidade específica de consumo de oxigênio com a concentração de amônio, para a biomassa do reator SBR durante a operação na condição IV, está apresentada na Figura V.27, juntamente com o resultado do ajuste do modelo cinético (Eq. IV.10) aos pontos experimentais.

Observa-se nesta figura que o aumento do valor do  $q_{O_2}$  foi mais significativo até a concentração de 30mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L, um pouco superior ao valor obtido para a biomassa da condição I. O valor do  $q_{O_2 \text{ MAX}}$  determinado pelo ajuste da equação V.23 foi de 70,25mgO<sub>2</sub>/gSST.h e a constante de saturação ( $K_N$ ) foi de 8,39mg/L de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

A operação do reator durante as diferentes condições operacionais propiciou um aumento de 40% na atividade das bactérias oxidadoras de amônio e nitrito, medida pelo aumento da velocidade máxima de consumo de oxigênio, demonstrando que este grupo

de bactérias não tem sua atividade global influenciada pelos períodos anóxicos, ou sob limitação de oxigênio, conforme também observado por Zdraek (2005).



**Figura V.27:** Variação da velocidade de respiração das BOA em diferentes concentrações de nitrogênio amoniacal – Condição IV.

Esta avaliação da fisiologia das bactérias oxidadoras de amônio só foi possível de ser realizada nas condições I e IV, pois é necessário utilizar-se uma quantidade significativa de biomassa nesta metodologia. Conseqüentemente, a retirada desta biomassa pode desestabilizar a operação do reator, evitando-se este procedimento nas condições II, III-1 e III-2. Para estas condições, efetuou-se a medida da velocidade específica de consumo de oxigênio somente na concentração de substrato de 20mgN-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L, conforme descrito no item IV.3.6, pela Técnica 1.

Na Tabela V.11 encontram-se os valores de q<sub>O<sub>2</sub></sub>, determinados durante cada uma das condições operacionais ensaiadas no reator SBR. Nota-se que mesmo na condição II, onde o reator foi operado sob forte limitação de oxigênio, as bactérias oxidadoras de amônio não tiveram a sua atividade influenciada. Com o aumento do nível de aeração, a atividade das BOA aumentou, até o final da operação do reator.

**Tabela V. 14:** Velocidade de respiração das bactérias oxidadoras de amônio durante a operação do reator SBR.

Condição Operacional	Tempo de Operação (dias)	Q <sub>O2</sub> (mgO <sub>2</sub> /gSST.h)
I	72	67,2
II	186	78,6
III-1	289	85,8
III-2	337	99,0
IV	392	124,8

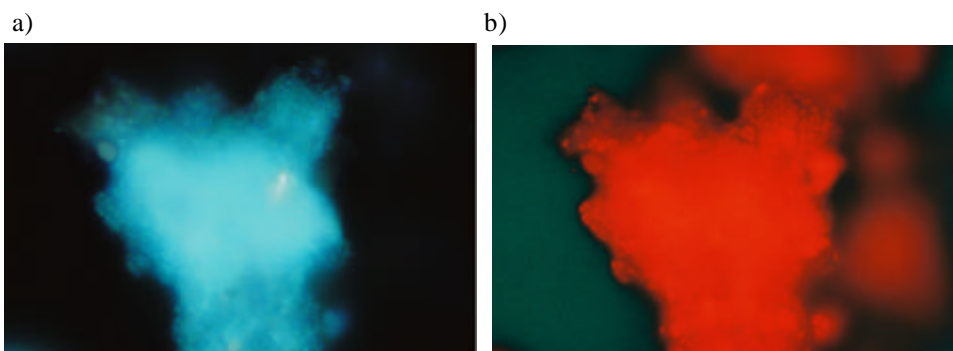
### V.2.5. Hibridização *in-situ* por fluorescência - FISH

Durante a operação do reator SBR, amostras das biomassas foram retiradas de cada condição operacional, com o objetivo de se determinar e quantificar as espécies de microrganismos envolvidos no processo proposto neste trabalho. Para isto, as amostras foram fixadas e posteriormente encaminhadas para análise no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos da UFSC. A técnica de microbiologia adota foi o FISH, conforme mencionado no item IV.3.9

Primeiramente, foi feita a quantificação do total de microrganismos ativos ou não, pelo corante DAPI. Este valor foi tido como referência para as demais determinações e, ao final desta contagem, obteve-se a porcentagem de um grupo ou espécie de microrganismos em relação ao total (corado com DAPI). Este corante reage com o total de DNA presente na amostra, não sendo específico para nenhum tipo de microrganismo e também não indica atividade metabólica, pois não reage com o RNA ribossomal.

Com o uso da sonda EUB mix foi possível quantificar a porcentagem de bactérias ativas nas biomassas das diferentes condições operacionais. A Figura V.27 ilustra a imagem de uma das amostras, corada com DAPI (Fig. V.27.a) e no mesmo campo de visão, a amostra hibridizada pela sonda EUB mix (Fig. V.27.b). Com a

análise destas imagens é possível estimar a porcentagem de bactérias em cada uma das etapas da operação do reator.

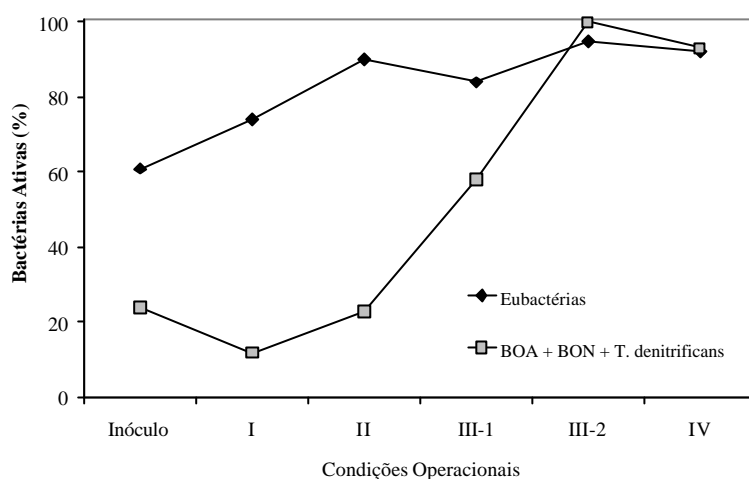


**Figura V. 28:** Foto ilustrativa do lodo da condição III-2, hibridizado com: a) DAPI; b) Sonda EubMix. Aumento de 1000x.

Além do total de bactérias ativas, foi estimado a porcentagem de bactérias oxidadoras de amônio, oxidadoras de nitrito e de *Thiobacilos denitrificans*. O resultado do somatório da porcentagem destes grupos de microrganismos (BOA, BON e *T. denitrificans*) e da porcentagem de bactérias ativas (Eubactérias – EUB mix) para cada condição operacional do reator, está apresentado na Figura V.29.

A quantidade de bactérias ativas (Eubactérias) teve um aumento gradual ao longo da operação do reator SBR. Ao final da operação observou-se porcentagens acima de 90% de Eubactérias, indicando que pouca biomassa presente no reator estava inativa ou morta. Estão presentes no grupo das Eubactérias a maioria dos microrganismos envolvidos nos processos de tratamento de resíduos (bactérias), assim a quantificação deste grupo envolve o maior número de espécies e sub-grupos de microrganismos.

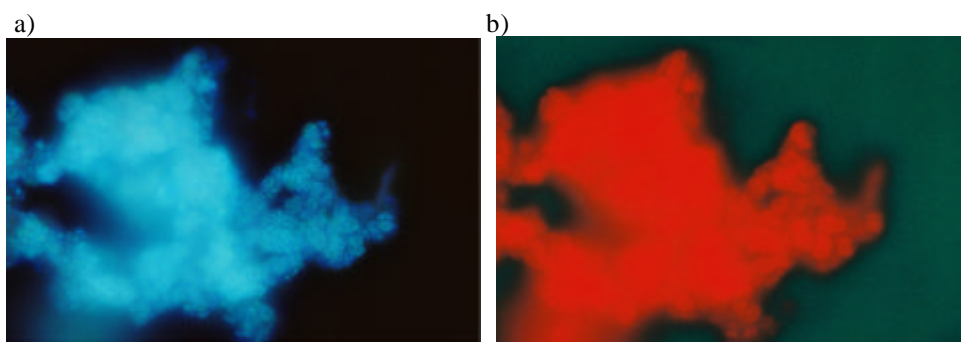
Acredita-se que no processo estudado estejam envolvidas principalmente as bactérias oxidadoras de amônio, as oxidadoras de nitrito e *T. denitrificans*. Nota-se na Figura V.22 que no início da operação do reator, durante as condições I e II, somente uma pequena parte do total de eubactérias era composta por estes microrganismos (BOA + BON + *T. denitrificans*). A partir da condição III, este fato foi alterado e observou-se que a maior parte dos microrganismos ativos pertenciam ao grupo das bactérias oxidadoras de amônio, de nitrito e *T. denitrificans*. Assim, é possível afirmar que os fenômenos observados com a operação do reator (remoção de nitrogênio), ocorreram devido ao metabolismo destes três grupos de microrganismos, como imaginado no projeto deste processo.



**Figura V. 29:** Porcentagem de biomassa ativa (eubactérias) e do total de bactérias oxidadoras de amônio (BOA), de nitrito (BON) e de *T. denitrificans*, durante as várias condições operacionais.

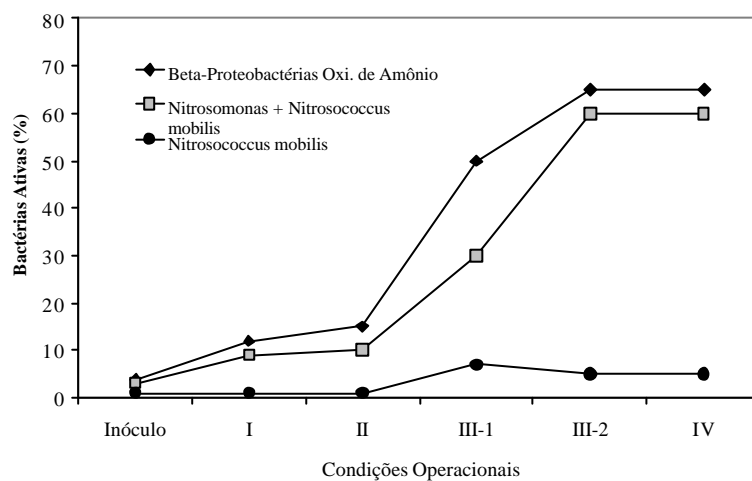
O grupo das bactérias oxidadoras de amônio é constituído por diferentes tipos de de microrganismos. Neste sentido, mesmo dentro deste grupo, fisiologias metabólicas diferentes podem ser encontradas quando se compara estes microrganismos. Assim, foi identificada quais das espécies de bactérias oxidadoras de amônio estavam envolvida no processo de remoção combinada de nitrogênio e enxofre. A Figura V.28 apresenta a foto da amostra obtida na condição III-2, corada com DAPI (Fig. V.28.a) e com a sonda NEU, que hibridiza com o RNA-16s de beta-proteobactérias oxidadoras de amônio. Com a utilização desta sonda tem-se a medida do total de bactérias oxidadoras de amônio presentes na amostra.

As principais espécies de bactérias oxidadoras de amônia são *Nitrosococcus mobilis* e espécies pertencentes ao gênero *Nitrosomonas sp.*. Com a utilização de sondas específicas para estas duas espécies, pode ser determinada qual a principal espécie envolvida no processo em estudo. Os resultados referentes a esta determinação estão apresentados na Figura V.30.



**Figura V. 30:** Foto ilustrativa do lodo da condição III-2, hibridizado com: a) DAPI; b) Sonda NEU. Aumento de 1000x.

Observou-se um aumento significativo das bactérias oxidadoras de amônio durante a operação do reator SBR, principalmente após da terceira condição operacional. Ao final da operação do reator SBR a porcentagem de Beta-Proteobactéria oxidadoras de amônio foi superior a 60% do total de microrganismos. Independentemente da condição operacional, observou-se que uma parcela inferior a 10% era de bactérias da espécie *Nitrosococcus mobilis*, detectadas por uma sonda específica para esta espécie. Assim, o resultado obtido com a sonda para *Nitrosomonas* e *Nitrosococcus mobilis* representa as espécies de bactérias do gênero *Nitrosomonas sp.*

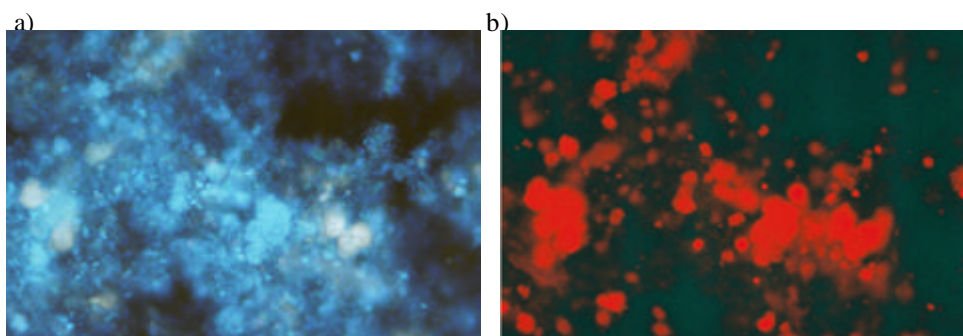


**Figura V. 31:** Porcentagem de bactérias ativas hibridizadas com as sondas para Beta-Proteobactérias oxidadoras de amônio, para *Nitrosomonas* e *Nitrosococcus Mobilis* e para *Nitrosococcus Mobilis*.

As bactérias oxidadoras de nitrito foram identificadas pela sonda NIT3, que hibridiza especificamente com espécies do gênero *Nitrobacter*. A sua presença foi detectada principalmente a partir da condição III, na qual níveis mais elevados de oxigênio foram praticados. Porcentagens entorno de 20% destas espécies foram medidos nas amostras obtidas nas condições III-2 e IV.

No processo de remoção combinada de nitrogênio e enxofre, *T. denitrificans* é o responsável pela conversão do nitrito ou nitrato formado até nitrogênio gasoso. A detecção de sua presença, nas diferentes biomassas obtidas do reator SBR, é de fundamental importância para a confirmação e esclarecimento das interações entre os microrganismos envolvidos neste processo. Para isto, foi projetada uma sonda específica para *T. denitrificans*, tendo-se o cuidado desta seqüência de nucleotídeos escolhida, ser somente complementar ao RNA-16s desta espécie de *Thiobacillus*. Testes complementares estão sendo realizados com uma cultura pura de *T. denitrificans* para validar a sonda projetada. Estes testes estão sendo realizados no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microorganismos.

A Figura V.32 ilustra a foto da amostra obtida na condição III-2, corada com DAPI (Fig. V.31.a) e a amostra hibridizada com a sonda Thio51 (Fig. V.31.b), no mesmo campo de visão. Nota-se que, diferentemente das fotos anteriores, a quantidade de células hibridizadas foi menor, o que aparentemente revela um número menor desta espécie. Contudo ainda é necessário otimizar a metodologia de hibridização da sonda Thio51, o que pode revelar níveis maiores de células hibridizadas.



**Figura V. 32:** Foto ilustrativa do lodo da condição III-2, hibridizado com: a) DAPI; b) Sonda Thio51. Aumento de 1000x.

A presença de *T. denitrificans* foi identificada no inóculo utilizado para a partida do reator SBR, onde foi estimado que cerca de 20% do total de microrganismos eram da



espécie *T. denitrificans*. Após, na condição I, houve significativa redução da quantidade destas bactérias, tornando difícil a estimativa de algum valor de porcentagem desta espécie. Nas condições seguintes, nas quais a limitação de oxigênio começou a ser praticada, novamente a presença de *T. denitrificans* foi determinada. A porcentagem desta espécie esteve entre 5 e 15%, sendo que o máximo valor foi obtido na condição III-2 (15%).

Com estes resultados acredita-se que o processo observado durante a operação do reator SBR, seja uma consequência da atividade metabólica de espécies como: *Nitrossomonas sp.*, *Nitrobacter sp* e *T. denitrificans*. Estes microrganismos seriam as principais espécies envolvidas na integração do ciclo do nitrogênio com o do enxofre.

## VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O processo de desnitrificação autotrófica tem sido aplicado com sucesso para o tratamento de vários tipos de águas residuárias (Sikora e Keeney, 1976; Matsui e Yamamoto, 1986; Sant’Anna et. al., 1996). Diferentes processos foram desenvolvidos com o uso de *T. denitrificans*, seja para o tratamento de águas ou para remoção de sulfeto de gases (Janssen et al., 1997; Koengi e Liu, 2001; Kimura et. al., 2002). No presente trabalho, a aplicação da fisiologia de *T. denitrificans* foi estendida, mostrando-se uma nova potencialidade até então não apresentada concretamente na literatura especializada. A completa integração dos ciclos do nitrogênio e do enxofre foi atingida.

As reações metabólicas envolvidas nestas interações dos ciclos do nitrogênio e do enxofre são em grande número (Eq. II. 1, 18 e 22). Variáveis ambientais como pH, temperatura e concentração de alguns substratos, exercem o controle sobre quais reações e quais espécies de microrganismos estarão envolvidos nesta integração do ciclo do nitrogênio e do enxofre. Assim, a otimização de qualquer processo envolve certamente a otimização do conjunto destas variáveis. Independente disto, no presente trabalho, eficiências acima de 70% de remoção de nitrogênio foram atingidas, valores estes próximos aos obtidos com os processos que utilizam somente tecnologia baseada no ciclo do nitrogênio, como SHARON, ANNAMOX, OLAND e CANON (Jetten et. al., 1999; Kuai e Verstraete, 1998; Sliemers et. al., 2003), os quais encontram-se em um estágio avançado de otimização, ao contrário do processo aqui apresentado.

Como imaginado, a formação do enxofre elementar aconteceria provavelmente nos ambientes sob limitação de oxigênio. Contudo, a flexibilidade de *T. denitrificans* em utilizar outros aceptores finais de elétrons, permitiu a formação do sulfato na maioria das condições operacionais estudadas. Apesar disto, esta possibilidade não foi descartada, pois em condições anóxicas, nos experimentos com a cultura pura de *T. denitrificans*, foi possível detectar um desequilíbrio do balanço de enxofre, que pode estar relacionado com a formação do enxofre elementar. Observou-se conversões acima de 90% do total de tiosulfato consumido em intermediários da oxidação deste substrato. Estes resultados foram atingidos quando a relação entre tiosulfato e nitrato foi de  $3,3\text{gS-S}_2\text{O}_3/\text{gN-NO}_3^-$ .

Conforme relatado no item II.2.2., Wang et. al. (2004) apresentaram a evolução do processo de desnitrificação autotrófica, em diferentes relações entre doador ( $S^{2-}$ ) e acceptor de elétrons ( $NO_3^-$ ), obtendo como resultado eficiências de conversão acima de 90%, como os resultados atingidos neste trabalho. Os resultados descritos por Wang et. al. (2004), foram atingidos quando a operação do processo se dá de forma contínua, em relações próximas a  $5,71gS^{2-}/gN$ . Quando uma quantidade inferior de doador de elétrons foi utilizada, a desnitrificação ocorreu de forma parcial e baixas eficiências foram atingidas.

Durante a operação do reator, o maior valor da relação entre tiosulfato e amônia ensaiado foi de  $2,5gS-S_2O_3/gN-NH_4^+$ . Nesta condição foi detectado que o balanço de enxofre, determinado pela quantidade de tiosulfato alimentado e sulfato produzido foi mais instável que nas condições anteriores. Ou seja, observou-se mais frequentemente desequilíbrios entre os valores de enxofre, nas diferentes formas, o que poderia estar relacionado com a formação do enxofre elementar. Particularmente, a detecção analítica do enxofre elementar é difícil de ser realizada, devido principalmente à alta reatividade deste composto e à sua baixa solubilidade em soluções aquosas. Assim, na maioria dos trabalhos descritos na literatura, a sua presença é determinada pelo balanço de enxofre, o que representa uma limitação quanto à confirmação dos metabolismos e processo de formação deste composto (Buisman et. al, 1991; Janssen et. al., 1998, Wang et. al, 2004).

Neste trabalho, na tentativa de quantificar o enxofre elementar, foram realizadas metodologias de microscopia eletrônica de varedura e análise elementar (Carbono-Hidrogênio-Nitrogênio-Enxofre), contudo, para ambas as técnicas, é necessário que a amostra a ser analisada esteja seca. Durante este processo, acredita-se que a maior parte do enxofre elementar tenha sido oxidado para  $SO_2$ , sendo impossível ter-se uma precisão nesta medida. Porém, é necessário ressaltar que em todas as condições ensaiadas, no reator SBR, o balanço de enxofre foi coerente na maioria do período de operação.

Nos resultados obtidos com o experimento no reator contínuo (SBR) foi observada a flexibilidade das bactérias oxidadoras de enxofre, em trocar de acceptor final de elétrons (de oxigênio para nitrito ou nitrato). Esta flexibilidade torna possível que parte do tiosulfato seja oxidado via oxigênio e parte via nitrito. Assim, é possível que seja necessário aplicar relações superiores entre tiosulfato e nitrogênio, que aquelas

previstas para a desnitrificação autotrófica, para que ocorra a formação do enxofre elementar durante o processo de desnitrificação autotrófica estabelecida no reator SBR.

Exemplos deste fato têm sido constantemente observados durante a nitrificação / desnitrificação heterotrófica simultâneas. Yoo et. al. (1999) verificaram que a relação entre doador de elétrons consumido (DQO) e acceptor de elétrons reduzido ( $\text{NO}_2^-$ ) necessária para a completa redução do nitrito foi de 5,06 gDQO/gN-NH<sub>4</sub>, relação esta muito superior ao proposto pela estequiometria do processo de desnitrificação via nitrito. Zdradek (2005) também relata que durante a operação de um reator SBR, que ocorrera a nitrificação e desnitrificação heterotrófica simultâneas, a quantidade de matéria orgânica necessária para que todo o nitrito seja reduzido, deve ser superior ao previsto pela estequiometria. Este autor recomendou a adição de uma quantidade de acetato (fonte de carbono) de 1,25 a 1,5 vezes o valor proposto pela estequiometria.

Esta recomendação de adicionar um excesso de carbono ao processo de nitrificação e desnitrificação simultâneas é atribuída principalmente ao crescimento excessivo da biomassa heterotrófica, durante o processo anóxico. Zdradek (2005) também indica que, estas bactérias heterotróficas facultativas, tornam-se incapazes de utilizar o oxigênio como acceptor final de elétrons, após serem submetidas a longos períodos anóxicos. Este tema é explorado por outros trabalhos apresentados na literatura, porém nenhuma conclusão definitiva tem sido apontada, sobre em que condição e momento um microrganismo torna-se apto a respirar um dado acceptor de elétrons (Justin e Kelly, 1978; McCiltontock et. al., 1988; Richardson, 2000).

Nos experimentos realizados neste trabalho, observou-se que realmente as bactérias oxidadoras de enxofre são facultativas, ou seja, foram capazes de oxidar o tiosulfato tanto via oxigênio quanto via nitrito ou nitrato, diferentemente dos resultados obtidos por Zdradek (2005). Observou-se nos resultados obtidos com os testes de respirometria que, as condições de aeração influenciam a capacidade facultativa das bactérias oxidadoras de enxofre, mais especificamente, acredita-se que seja o nível de oxigênio que os microrganismos estavam submetidos durante a fase aerada (15min.) que possam estar alterando esta capacidade de respiração facultativa.

A influência do oxigênio sobre a fisiologia de microrganismos facultativos, como *T. denitrificans* e bactérias heterotólicas, foi estudada em outros trabalhos apresentados na literatura, bem como a influência desta variável sobre a fisiologia de bactérias oxidadoras de amônio (Justin e Kelly, 1978; Patureau et. al., 1996; Bae et. al,

2002). Neste sentido, fica claro que, para a otimização do processo de remoção combinada de nitrogênio e enxofre é necessário conhecer que nível de aeração deve ser aplicado no reator.

No acompanhamento da alimentação, durante um ciclo de 24 horas, foi determinada a quantidade de oxigênio consumido para a oxidação dos substratos. Relacionando este resultado com a quantidade de amônio suprido ao reator, observou-se que a melhor condição para a operação do sistema é uma relação de  $0,3\text{g N-NH}_4/\text{g O}_2$ . Nesta situação, foram detectados os menores residuais de amônio, de nitrito e de nitrato e, conseqüentemente, a maior remoção de nitrogênio. A literatura não relata exatamente quais são os níveis e a quantidade de oxigênio necessário para que ocorra a oxidação parcial do amônio e concomitantemente a desnitrificação do nitrito formado. Teoricamente, a quantidade de oxigênio que deve ser adicionado por grama de nitrogênio amoniacal suprido é de  $3,3\text{g O}_2$  (Henze *et al.*, 1997), próximo ao valor determinado experimentalmente.

A quantidade de oxigênio que deve ser adicionado ao sistema é função do tipo de aceptor final de elétrons que se deseja formar (nitrito ou nitrato). Neste processo de remoção combinada de nitrogênio e enxofre, acreditava-se que o nitrito seja o responsável pela integração dos ciclos do nitrogênio e do enxofre. Informações estas baseadas no estudo de Justin e Kelly (1978), que indicam que o nitrito é o único aceptor final de elétrons que pode ser reduzido por *T. denitrificans*, após este microrganismo ter sido submetido a condições aeróbias. Mas, com a operação do reator SBR, ambos, nitrito e nitrato, foram formados e, como apresentado anteriormente, a relação experimental entre nitrogênio removido e sulfato produzido não define diretamente qual destes aceptores foi utilizado. Assim, a conclusão de qual é o aceptor final de elétrons, ou se o microrganismos é realmente capaz de reduzir os dois compostos (nitrito ou nitrato), deve ser feita com cuidado, observando o maior número de experimentos possíveis.

Os testes de atividade desnitrificante autótrofa revelaram que a flora de microrganismos presentes no reator SBR era apta a respirar tanto via nitrito quanto via nitrato. Contudo, observou-se que a atividade desnitrificante via nitrito teve uma evolução, que pode estar relacionada com a adaptação destes microrganismos ao nitrito. Este mesmo fato, aumento do valor da atividade desnitrificante autótrofa ao longo da operação do reator SBR, não foi observado nos experimentos realizados com nitrato.

Assim, pode-se concluir que, provavelmente, o nitrito tenha sido o acceptor de elétrons mais utilizado na remoção de nitrogênio, observada no reator SBR.

Como citado ao longo deste texto, o número de reações que podem estar envolvidas no processo de remoção combinada de nitrogênio e enxofre é muito grande, bem como a quantidade de espécies de microrganismos que podem estar envolvidas (Kuenen et. al. , 1992<sup>2</sup> apud Chazal e Lens, 2000). Com as técnicas de biologia molecular é possível delimitar o número destas espécies e, pelo uso da técnica de FISH, este objetivo foi atingido neste trabalho. Sabe-se que o processo estabelecido no reator SBR é o resultado da ação metabólica dos seguintes grupos:

- Bactérias oxidadoras de amônio, na grande maioria espécies do gênero *Nitrosomonas sp.*, muito poucas espécies como *Nitrosococcus mobilis*;
- Bactérias oxidadoras de nitrito, na grande maioria do gênero *Nitrobacter*, contudo em alguns momentos foi detectado a presença de espécies como *Nitrospira sp.*;
- Bactérias oxidadoras de enxofre, acredita-se que a principal espécie envolvida seja realmente o *T. denitrificans*, porém ainda não é possível descartar a existência de outras espécies.

A detecção de *T. denitrificans* foi realizada pelo uso da sonda Thio51, projetada pela professora Regina Vasconcelos Antonio e a Doutora Alessandra Pellizaro Bento. Este projeto fez-se necessário, devido ao reduzido número de sondas disponíveis na literatura para identificação de *T. denitrificans* e nenhuma destas estarem registradas em um banco de dados genômicos. Sanz et. al. (2005) apresentaram outra sonda para detecção de *T. denitrificans*, diferente da utilizada neste trabalho. Os resultados experimentais obtidos por estes autores indicaram que a sua sonda, não era somente complementar ao RNAm-16s de *T. denitrificans*, mas também a de outras espécies de bactérias oxidadoras de enxofre. Eles observaram também que, pelo uso da técnica CARD-FISH, um maior número de células de *T. denitrificans* foi detectado. Assim, acredita-se que a seqüência de nucleotídeos utilizados na sonda Thio51, pode ser mais acessível à seqüência complementar do RNAm-16s de *T. denitrificans* do que a sonda proposta por Sanz et. al (2005).

---

<sup>2</sup> Kuenen J. G., Robertson L. A. e Tuovinen O. H. (1992). The genera Thiobacillus, Thiomicospora e Thiosphaera; In Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W & Shlefer (Eds) The Prokaryotes, Vol. III, 2638-2657. Springer-Verlag, New York.

O conjunto destes resultados confirmam que a bioquímica observada neste trabalho, pode ser aplicada para o processo de remoção combinada de nitrogênio e enxofre. A potencialidade deste processo e do uso destes microrganismos é muito promissora, principalmente pelo fato da produção do enxofre elementar, que pode ser matéria-prima para outros processos químicos ou biológicos (Tichý et. al., 1994).

Imaginando-se que, em um novo experimento sejam utilizadas as condições experimentais que proporcionaram o melhor desempenho do reator SBR e que o desequilíbrio do balanço de enxofre seja devido à formação de enxofre elementar, pode ser possível atingir valores de eficiências e de redução de custos muito mais significativos que os já obtidos neste trabalho. Imaginando-se que o processo será limitado pela atividade das bactérias oxidadoras de amônio, que possuem a menor velocidade de crescimento ( $0,033\text{h}^{-1}$ ), foram estimadas as condições operacionais necessárias para que ocorra a remoção combinada de nitrogênio e enxofre. Estas condições estão descritas na Tabela VI.1.

**Tabela VI. 1:** Condições operacionais estimadas para que o processo de remoção combinada de enxofre e de nitrogênio possa ser atingido .

Parâmetros de Processo	Condições Operacionais		Unidade
	Condição IV	Estimadas	
Concentração Celular	2,56	3	gSST/L
Tempo de Aeração	15	15	min.
Tempo da Fase Anóxica	60	60	min.
O <sub>2</sub> - Fase aerada	5	5	mg/L
Carga de Nitrogênio	0,12	2,04	gN-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L.d
Carga de Enxofre	0,5	6,74	gS-S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /L.d
N-NH <sub>4</sub> /O <sub>2</sub>	0,5	0,4	gN-NH <sub>4</sub> /gO <sub>2</sub>
Oxigênio Suprido	0,3	5,11	gO <sub>2</sub> /L.d

## VII – CONCLUSÕES

- Neste trabalho a aplicação da fisiologia de *T. denitrificans* foi estendida, obtendo-se a eliminação biológica do nitrogênio, concomitantemente com a integração dos ciclos do nitrogênio e do enxofre, em um único reator, atingindo-se eficiências remoção de nitrogênio satisfatórias;
- Uma das limitações que era imaginada para aplicação da integração do ciclo do nitrogênio e do enxofre é a baixa velocidade de crescimento de *Thiobacillus denitrificans*. Esta limitação foi superada com a utilização do extrato de levedura como suplemento alimentar. Nestes experimentos foram obtidas velocidades de crescimento cerca de 10 vezes maiores que no experimento com meio autotrófico;
- Conclui-se que o efeito da adição de extrato de levedura se dá sobre o anabolismo do *Thiobacillus denitrificans*. Acredita-se que este composto foi fonte de micronutrientes e vitaminas para o seu crescimento. Ao contrário, a glicose claramente serviu como doadora de elétrons, o que contribuiu para uma maior redução de nitrato;
- A formação preferencial do enxofre elementar foi obtida quando relações de acima de 4 gS-S<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/gN-NO<sub>3</sub> foram ensaiadas. Nesta condição, a maior parte do tiosulfato foi oxidada;
- Com a operação do reator SBR foi possível atingir elevadas eficiências de eliminação de nitrogênio, sendo que na última condição operacional esta eficiência foi superior a 70%;
- Independente da condição operacional, a formação do nitrato foi detectada, mostrando que a atividade das bactérias oxidadoras de nitrito não foi completamente inibida pela aplicação dos ciclos de aeração;
- Pelos resultados do balanço de massa, da respirometria e da atividade desnitrificante, acredita-se que a desnitrificação autotrófica, que ocorreu no reator SBR seguiu preferencialmente a via nitrito;



- 
- Com os resultados atingidos do acompanhamento da operação do reator SBR e do seu ciclo de alimentação, recomenda-se a utilização da relação entre N-NH<sub>4</sub> alimentado e oxigênio consumido em torno de 0,3gN-NH<sub>4</sub>/gO<sub>2</sub>, para eficiente operação deste processo;
  - Os microrganismos presentes no reator SBR eram do gênero *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*, além de *T. denitrificans*, identificado pela técnica de Hibridização *in-situ* por fluorescência – FISH, utilizando a sonda Thio51.

## VIII. SUGESTÕES

- Avaliar o uso de outros suplementos alimentares, similares ao extrato de levedura, para o crescimento do *T. denitrificans*;
- Estudar a cinética de desnitrificação autotrófica, em diferentes relações de  $S_2O_3^-$  e  $NO_3^-$  e de  $S_2O_3^-$  e  $NO_2^-$ , avaliando-se a formação do enxofre elementar;
- Substituir o tiosulfato, doador de elétrons, pelo sulfeto de hidrogênio no ensaios cinéticos com a cultura pura de *T. denitrificans* e na alimentação do reator SBR;
- Determinar o efeito da condição de aeração (transferência de oxigênio) na oxidação do tiosulfato e do amônio;
- Determinar o efeito da inibição pelo sulfeto em uma biomassa composta por bactérias oxidadoras de amônio e oxidadoras de enxofre;
- Avaliar o comportamento deste processo no pós-tratamento de um reator anaeróbio onde ocorre a sulfetogênese.

**IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ALBERTSON, O. E. *Nutrient Control – Manual of Practice No. FD-7*. U.S.A: Editora Water Pollution Control Federation, 1983.
- APHA, AWWA, WEF. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Washington, DC: American Public Health Association, 19<sup>o</sup>ed., 1995.
- ATLAS, R. M. E BARTHA, R. *Ecologia microbiana e Microbiología ambiental*. Madrid: Pearson Education S.A., 2002.
- BAE, W., BAEK, S., CHUNG, J., LEE, Y. Optimal operational factors for nitrite accumulation in batch reactors. *Biodegradation*, v. 12, No. 5, p. 359–366, 2002.
- BEAUMONT H. J. E., HOMMES G. N., SAYAVEDRA-SOTO L. A., ARP D. J., ARCIERO D. A., HOOPER A. B., WESTERHOFF H. V. E VAN SPANNING R. J. M. Nitrite Reductase of *Nitrosomonas europaea* Is Not Essential for Production of Gaseous Nitrogen Oxides and Confers Tolerance to Nitrite. *Journal of Bacteriology*, v. 184, No.9, p. 2557–2560, 2002.
- BEAUMONT H. J. E., VAN SCHOOTEN B., LENS S. I., WESTERHOFF H. V. E VAN SPANNING R. J. M. *Nitrosomonas europaea* Expresses a Nitric Oxide Reductase during Nitrification. *Journal of bacteriology*, v. 186, No. 13, p. 4417–4421, 2004.
- BODELIER P. L. E., LIBOCHANT J. A., BLOM C. W. P. M. E LAANBROEK H. J. Dynamics of Nitrification and Denitrification in Root-Oxygenated Sediments and Adaptation of Ammonia-Oxidizing Bacteria to Low-Oxygen or Anoxic Habitats. *Applied and environmental microbiology*, v. 62, No. 11, p. 4100–4107, 1996.
- BROCK T. D. E MADIGAN M. T. *Biology of Microorganisms*. New York: Prentice Hall, 6<sup>o</sup> ed., 1991.
- BRUNET R. C. E GARCIA-GIL L. J. Sulfide-induced dissimilatory nitrate reduction to ammonia in anaerobic freshwater sediments. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 21, p. 131 – 138, 1996.

- BRÜSER T., LENS P. N., TRÜPER H. G. *The biological sulfur cycle. In: Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution: principles and engineering.* London: IWA Publishing, 2000
- BUISMAN C. J. N., IJSPEERT P., HOF A., JANSSEN A. J. H., HAGEN R. T., LETTINGA G. Kinetic Parameters of a Mixed Culture Oxidizing Sulfide and Sulfur with Oxygen. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 38. p. 813-820, 1991.
- CAMPOS, J. L., GARRIDO-FERNÁNDEZ, J. M., MÉNDEZ R. E LEMA J. M. Nitrification at high ammonia loading rates in an activated sludge unit. *Bioresource Technology*, v. 68, p. 141-148, 1999.
- CATALDO, D.A.; HAROON M; SCHRADER, L.E.; YOUNGS, V.L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Comun. Soil Sci. Plant Anal.* V. 6, p. 71-80, 1975.
- CHAZAL P. M. E LENS P. N. L. *Nitrogen elimination. In: Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution: principles and engineering.* London: IWA Publishing, 2000.
- EGLI C., LANGER C., SIEGRIST H. R., ZHENDER A, WAGNER M., VAN DER MEER, J. R. Community analysis of ammonia and nitrite oxidizers during start-up of nitrification reactors. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.69, p. 3213-3222, 2003.
- ETCHEBEHERE C. *Ecologia Microbiana e Ciclos Biogeoquímicos.* Florianópolis (Brasil): V Curso de Tratamento Biológico de Resíduos, 2005.
- ETCHEBEHERE C., ERRAZQUIN I., BARRANDEGUY E., DABERT P., MOLETTA R., MUXI L.. Evaluation of the denitrifying microbiota of anoxic reactors. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 35, p. 259-265, 2001.
- FIELD, J. A. *Anaerobic Biodegradation of Xenobiotic Compounds.* Merida (Mexico): VII Taller y Simposio Latinoamericano sobre Digestión Anaerobia, 2002.
- FUX C., BOCHLER M., HUBER P., BRUNNER I., SIEGRIST H. Biological treatment of ammonium-rich wastewater by parcial nitritation and subsequent anaerobic ammonium oxidation (anammox) in pilot plant. *J. Biotechnology*, v. 99, p. 295-306, 2002.
- GRAY, N. F. *Activated Sludge – Theory and Practice.* New York (USA): Publish by Oxford University Press, 1990.

- GUYNOT M. E., TORIBIO A., QUEVEDO A. E MUSÍ L. (1998). Microflora of dissimilative nitrate reduction in a denitrifying reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* V. 50, p. 396-400.
- HACH. Spectrophotometer Handbook DR/2010. Procedure Manual. Hach Company, 1996-2000.
- HELLINGA C., SCHELLEA A. A. J. C., MULDER J. W., LOOSDRECHT, M. C. M, HEIJNEN J. J. The SHARON process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich wastewater. *Water Science Technology*, v. 9, p. 135-142, 1998.
- HENZE, M.; HARREMOES, P.; JANSEN, J.C.; ARVIN, E *Wastewater treatment – Biological and chemical process.* Alemanha: Springer Verlag, 2<sup>a</sup> Ed., 1997.
- HYMAN M.R., MURTON IAN B. E ARP D.J. Interaction of ammonia monoxygenase from nitrosomonas europea with alkanes, alkenes and alkynes. *Applied Environment Microbial*, v. 54, p. 3187–3190, 1988.
- JANSSEN A. J. H., DIJKMAN H., JANSSEN G. *Novel biological processfor removal of H<sub>2</sub>S and SO<sub>2</sub> from gas streams.* In: *Lens P. N. L. e Hulshoff Pol L. W. (eds). Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution: principles and engineering.* London: IWA Publishing, 2002.
- JANSSEN A. J. H., MA S. C., LENS P., LETTING G Performance of a sulfide-oxidizing expanded-be reactor supplied with dissolved oxygen.
- JANSSEN A. J. H., MEIJER S., BONTSEMA J., LETTINGA G. Application of the Redox Potencial for Controlling a Sulfide Oxidizing Reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 55, p. 65-73, 1998.
- JANSSEN A. J. H., SLEYSTER R., VAN DER KAA C., JOCHEMSEN A., BONTSEMA, J. E LETTING G. Biological sulphide oxidation in a fed-batch reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 47, p. 327-333, 1995.
- JETTEN M. S. M., LOGEMANN S., MUYZER G., ROBERTSON L. A., VRIES S., VAN LOOSDRECHT E KUENES J. G. Novel principles in the microbial conversion of nitrogen compounds. *Antonie van Leeuwenhock*, v. 71, p. 75-93, 1997.
- JETTEN M. S. M., STROUS M., VAN DE PAS-SCHOONEN K. T., SCHALK J., VAN DOGEN U. G. J. M., VAN DE GRAAF A. A., LOGEMANN S., MUYZER

- G., VAN LOOSDRECH M. C. M., KUENE J. G. The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 22, p. 421-437, 1999.
- JUSTIN P. E KELLY D. P. Metabolic Changes in *Thiobacillus denitrificans* Accompanying the Transition from aerobic to anaerobic growth in continuous chemostat culture. *Journal of General Microbiology*, v. 107, p. 131-137, 1978.
- KESTER R. A., DE BOER D. E LAANBROEK H. J. Production of NO and N<sub>2</sub>O by Pure Cultures of Nitrifying and Denitrifying Bacteria during Changes in Aeration. *Applied and environmental microbiology*, v. 63, No.10 , p. 3872–3877, 1997.
- KIMURA K., NAKAMURA M., WATANABE Y. Nitrate removal by combination of elemental sulfur-based and denitrification and membrane filtration. *Water Research*, v. 36, p. 1758-1766, 2002.
- KOENIG A. E LIU L. H. Kinetic model of autotrophic denitrification in sulphur packed-bed reactors. *Water Research*. v. 35, No 8, p. 1969-1978, 2001.
- KUAI L. E VERSTRAET W. Ammonium removal by the oxygen-limited autotrophic nitrification-denitrification system. *Applied Environment. Microbiology*, v.64, No. 11, p. 4500-4506, 1998.
- LAGAS, J. A. *Survey of H<sub>2</sub>S and SO<sub>2</sub> removal process. In: Lens PNL, Hulshoff Pol LW (eds). Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution: principles and engineering.* London: IWA Publishing, 2000.
- LEITÃO R. P., SANTANA F. B., SCHMIDELL, W. N. E SOARES, H. M. *Titulo Provisório: “Nitrificação e Desnitrificação Simultâneas por Bactérias Oxidadoras de Amônio sob Condições Aeróbias”.* Artigo em redação, 2006.
- LEMA, J. M. *Curso de digestão anaeróbia aplicada a resíduos sólidos e líquidos.* Recife: UFPE, 1997.
- LENS P. N. L. E HULSHOFF POL L. W. *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution: principles and engineering.* London: IWA Publishing, 2000.
- LENS P. N. L. E KUENEN J. G. The biological sulfur cycle: new opportunities for environmental biotechnology. *Water Science Technology*, v. 44, No.8, p. 57-66, 2001.

- LENS P. N. L., OMIL F., LEMA J. M. E HULSHOFF POL L. W. *Biological removal of organic sulfate-rich wastewater. In: Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution: principles and engineering.* London: IWA Publishing, 2000.
- LENS P., VISSER A., JANSSEN A. J. H., HULSHOFF POL. L. W. E LETTINGA G. Effect of staging and nitrate addition on sulfidogenic acetate removal. *Water Research*, v. 32, p. 1178-1192, 1999.
- LETTINGA, G. E RINZEMA, A. Anaerobic treatment of sulfate containing wastewater. *Bioenvironmental System.* v. 04, 1985.
- LIN, C., CHANG, F., CHANG, C. Toxic effect of sulfur compounds on anaerobic biogranule. *Journal of Hazardous Materials.* v. 87, p. 11–21, 2001.
- LOOSDRECHT M., JETTEN M., ABMA W. Improving the sustainability of nitrogen removal. *Water 21*, p. 50-52, 2001.
- MADIGAN M. T., MARTINKO J. M. E PARKER J. *Brock biology of microorganisms.* USA: Prentice Hall. 8<sup>ª</sup> ed., 1997.
- MATSUI S. E YAMAMOTO R. A new method of sulphur denitrification for sewage treatment by fluidized bed reactor. *Water Science Technology.* v. 18, p. 355-362, 1986.
- MCCARTY, L. P. Stoichiometry of biological reactions. *Progress in Water Technology.* V. 7, No. 1, p. 157-172, 1975.
- METCALF & EDDY. *Wastewater Engineering – Treatment, Disposal, Reuse.* Terceira edição. New York: Editora McGRAW-HILL INTERNATIONAL, 1991.
- MIDDELBURG, J. J. *The geochemical sulfur cycle. In: Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution: principles and engineering.* London: IWA Publishing, 2000.
- MURNLEITNER E., KUBA T., VAN LOOSDRECHT M. C. M, HEIJNEN J. J. An Integrated Metabolic Model for the Aerobic and Denitrifying Biological Phosphorus Removal. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 54, No. 5, p. 435-452, 1997.
- O’FLAHERTY V. E COLLERAN E. Effect of sulphate addition on volatile fatty acid and ethanol degradation in an anaerobic hybrid reactor: I: process disturbance and remediation. *Bioresarch Technology*, v. 68, p. 109-120, 1999.

- OLSSON L. AND NIELSEN J. *On-line and in situ monitoring of biomass in submerged cultivations. TIBTECH*, v. 15, p. 517 -523, 1997.
- PATUREAU D., BERNET N., MOLETTA R. Effect of oxygen on denitrification in continuous chemostat cultures with *Comamonas sp.* SGL Y2. *Journal of Industrial Microbiology*, v. 16, p. 124-128, 2000.
- PERCHERON G., BERNET N. E MOLETTA R Interactions between methanogenic and nitrate reducing bacteria during the anaerobic digestion of an industrial sulfate rich wastewater. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 29, No. 4 , p. 341-350, 1999.
- POLANCO, F. F., POLANCO F. M., FERNANDEZ N., URUEÑA M. A., GARCIA P. A., VILLAVERDE S. New process for simultaneous removal of nitrogen and sulphur under anaerobic conditions. *Water Research*, v. 35, No 4, p. 1111-1114, 2001.
- POUGHON L., DUSSAP C. L., GROS J. B. Energy Model and Metabolic Flux Analysis for autotrophic Nitrifiers. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 72, No. 4, p. 416-434, 2001.
- PYNAERT K., SMETS B. F., WYFFLES S., BEHEYDT D., SICILIANO S., E VERSTRAETE W. Characterization of an Autotrophic Nitrogen Removing Biofilm form a Highly Loaded Lab-Scale Rotating Biological Contactor. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 06, p. 3626-3635. 2003
- R. TICHÝ, A. JANSSEN, J. T. C. GROTENHUIS, G. LETTINGA E W. H. RULKENS Possibilities for using biologically - produced sulphur for cultivation of *Thiobacilli* with respect to bioleaching processes. *Bioresource Technology*, v. 48, p. 221-227, 1994.
- RASCHE M.E., HYMAN M.R. E ARP D.J. Factors limiting aliphatic chlorocarbon degradation by *Nitrosomonas europaea*: cometabolic inactivation of ammonia monooxygenase and substrate specificity. *Applied and Environment Microbiology*, v. 57, No.10, p. 2986-2994, 1991.
- ROBERTSON L. A. E KUENEN, J. G. Heterotrophic nitrification in *Thiosphaera pantrotropha*: Oxygen uptake and enzyme studies. *Journal Geneneral Microbiology*, v. 134, p. 857-863, 1988.



- RUIZ G., JEISON D., RUBILAR O., CIUDAD G., CHAMY R. Nitrification–denitrification via nitrite accumulation for nitrogen removal from wastewaters. *Bioresource Technology*, v. 97, p. 330–335, 2006.
- SANT’ANNA F. P. S., MARTIN G. E TAHA S. Effect of clorude on the denitrification of ion exchange resin eluates by sulfur oxidizing chemeoautotrophic bacterium. *Revue des Sciences de l’Eau*, v. 3, p. 333-350, 1996.
- SANTANA F. B. *Tratamento anaeróbio de águas residuárias da industria de couros*. Florianópolis: UFSC - *Dissertação de Mestrado*, 2002.
- SCHDEL M. E TRÜPER H. G. Anaerobic Oxidation of Thiosulfate and Elemental Sulfur in *Thiobacillus dneitrificans*. *Archives of Microbiology*, v. 124, p. 205-210, 1980.
- SCHMIDELL W. N. E REGINATTO V. S Processos de eliminação de nitrogênio. Florianópolis: V Curso de Tratamento Biológico de Resíduos, 2005.
- SCHMIDELL W. N. E ZDRADEK C. P. *Transferência de Oxigênio*. Florianópolis: V Curso de Tratamento Biológico de Resíduos, 2005.
- SCHMIDT I. E BOCK E Anaerobic ammonia oxidation with nitrogen dioxide by *Nitrosomonas eutropha*. *Arch Microbiol*, v. 167, p 106–111, 1997.
- SCHMIDT I. E BOCK E. Anaerobic ammonia oxidation by cell-free extracts of *Nitrosomonas eutropha*. *Antonie van Leeuwenhoek*, V. 73, p. 271–278, 1998.
- SCHMIDT I., SLIEKERS O., SCHMID M., CIRPUS I., STROUS M., BOCK E., KUENEN J. G., JETTEN M. S. M. Aerobic and anaerobic ammonia oxidizing bacteria competitors or natural partners? *FEMS Microbiology Ecology*. V. 39, p. 175-181, 2002.
- SCHMIDT I., VAN SPANNING R. J. M. E JETTEN M. S. M. Denitrification and ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea* wild-type, and NirKand NorB-deficient mutants. *Microbiology*, v. 150, p. 4107–4114, 2004.
- SCHMIDT I., ZART D. E BOCK E. Effects of gaseous NO<sub>2</sub> on cells of *Nitrosomonas eutropha* previously incapable of using ammonia as an energy source. *Antonie van Leeuwenhoek*. v. 79, p. 39–47, 2001.

- SEZERINO, P. H. Utilização de biofiltros com macrófitas (vertical constructed wetlands) como pós-tratamento de lagoas de estabilização aplicadas aos dejetos suínos. Florianópolis: *Dissertação de Mestrado* - UFSC, 2002.
- SHI J., FUJISAWA S., NAKAI S. E HOSOMI M. Biodegradation of natural and synthetic estrogens by nitrifying activated sludge and ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Water Research*, v. 38, No. 9 , p. 2323-2330, 2004.
- SIKORA L. J. E KEENEY D. R. Evaluation of a sulfur-*Thiobacillus denitrificans* nitrate removal system. *Journal Environmental Quality*, v. 5, No 3, p. 189-195, 1976.
- SLIEKERS A. O., DERWORT N., GOMEZ J. L. C., STROUS M., KUENEN J. G., JETTEN M. S. M. Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite in one single reactor. *Water Research*. v. 36, p. 2475-2482, 2002.
- SPEECE, R. E. *Anarobic biotechnology for industrial wastewaters*. United States of America: Published by Archae Press, 1995.
- SPERLING, M. V. *Princípios do tratamento biológico de águas residuárias – volume 4*. 1<sup>o</sup> ed. Belo Horizonte: Editora UFMG, 1997.
- STERLING, M. C., LACEY, R. E., ENGLER, C. R., RICKE, S. C. Effects of ammonia nitrogen on H<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> production during anaerobic digestion of dairy cattle manure. *Bioresource Technology*, v. 77, p. 9-18, 2001.
- STROUS M., KUENEN J. G., E JETTEN M. S. M. Key Physiology of Anaerobic Ammonium Oxidation. *Applied and Environmental Microbiology*, v.65, p. 3248 – 3250, 1999.
- STROUS M., VAN GERVEN E., KUENEN J. G. E JETTEN M. S. M. Effects of aerobic and microaerobic conditions on anaerobic ammonium-oxidizing (Anammox) sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, p. 2446-2448, 1997.
- SUBLETTE K. L. Oxidation of Hydrogen Sulfite by *Thiobacillus denitrificans*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 19, p 690-695, 1987.
- SUBLETTE K. L. E SYLVESTER N. D. Oxidation of Hydrogen Sulfite by *Thiobacillus denitrificans*: Desulfurization of Natural Gas. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 19, p. 249-257, 1987a.

- SUBLETTE K. L. E SYLVESTER N. D. Oxidation of hydrogen sulfide by continuous cultures of *Thiobacillus denitrificans*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 19, p. 753 – 758, 1987.
- SUBLETTE K. L. E SYLVESTER N. D. Oxidation of Hydrogen Sulfite by Continuous Cultures of *Thiobacillus denitrificans*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 19. p. 753-758, 1987.
- UEMOTO H. E SAIKI H. Distribution of *Nitrosomonas europaea* and *Paracoccus denitrificans* Immobilized in Tubular Polymeric Gel for Nitrogen Removal. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, No.2, p. 816–819, 2000.
- VADER J.S., VAN. GINKEL C.G, STOKMAN F.M., SPERLING G.M., JONG JDE., BOER WDE., DE. GRAAF J.S, VAN DER. MOST E STOKMAN P.G.W. Degradation of ethinyl estradiol by nitrifying activated sludge. *Chemosphere*, v. 41 No. 8, p. 1239–1243, 2000.
- VALLERO M. V. G. *Sulfate reducing processes at extreme salinity and temperature – extending its application window*. Holanda: Tese de doutorado - Universidade de Wageningen, 2003.
- VAN DONGEN U, JETTEN MSM E VAN LOOSDRECHT M. C. M. The SHARON-anammox process for the treatment of ammonium rich wastewater. *Water Sci. Technology*, v. 44, p. 153–160, 2001.
- VERSTRAETE, W. *Comunicação pessoal durante o XIV SINAFERM*. Florianópolis, 2002.
- VERSTRAETE, W.; PHILIPS, S. Nitrification-denitrification processes and technologies in new contexts. *Environmental Pollution*, v. 102, p.717-726, 1998.
- VISHNIAC W. E SANTER M. The *thiobacilli*. *Bacteriological Reviews*, v.21, No 3, p. 195-213, 1957.
- VOGEL, A. I. *Análise Inorgânica Quantitativa*. Rio de Janeiro: Guanabara, 4ª ed., 1981.
- WANG A. J., DU D. Z, REN N. Q. E CHEN M. Q. An innovative process of simultaneous de-sulfurization and de-nitrification (SDD) by *Thiobacillus denitrificans*. VII Congresso internacional de digestão anaerobia, Canada, 2004.

- WIDDEL F. *Microbiology and ecology of sulphate- and sulfur-reducing bacteria. Em: Biology of anaerobic microorganisms.* London: Wiley e Sons eds, p. 469-586, 1988.
- WIESMAN, U. Biological Nitrogen Removal from Wastewater. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, v. 51, p. 113-154, 1994.
- WYFFELS S., BOECKS P., PYNAERT K., VERSTRAET W., CLEEMPUT O. Sustained nitrite accumulation in a membrane-assisted bioreactor (MBR) for the treatment of ammonium-rich wastewater. *Journal of chemical Technology Biotechnology*, v. 78, p. 412-419, 2003.
- YOO, H., AHN, K.H., LEE, H.J., KWAK, Y.J., SONG, K.G. Nitrogen removal from synthetic wastewater by simultaneous nitrification and denitrification (SND) via nitrite in an intermittently-aerated reactor. *Water Research*. v. 33, No 1, p. 145-154 1999.
- ZANG, T. C. E LAMPE D. G. Sulfur:limestone autotrophic denitrification processes for treatment of nitrate-contaminated water: batch experiments. *Water Research*. v. 33, No 3, p. 589-608, 1999.
- ZART D. e BOCK E. High rate of aerobic nitrification and denitrification by *Nitrosomonas eutrophagrown* in a fermentor with complete biomass retention in the presence of gaseous NO<sub>2</sub> or NO. *Archives Microbiology*, v.169, p. 282–286, 1998.
- 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. Florianópolis: Tese de Doutorado – UFSC, 2002.
- ZENG R. J., YUAN Z. e KELLER J. Improved understanding of the interactions and complexities of biological nitrogen and phosphorus removal processes. *Reviews in Environmental Science & Bio/Technology*, v.3, p. 265–272, 2004.
- ZUMFT, W. G. Cell biology and Molecular basis of denitrifications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 61, p.533-616, 1997.

## X. ANEXOS

### X.1. Experimentos com a Cultura Pura

#### X.1.1. Experimento CP 01 – Meio Autotrófico

Tempo	[X]	Desvio	[S-SO4]	Desvio	[N-NO3]	Desvio
0	0,000	0,019	40,688	8,712	350,450	18,111
5	0,013	0,017	73,570	4,946	335,000	23,747
10	0,020	0,006	79,462	3,214	320,000	7,338
24	0,020	0,015	110,186	9,261	299,408	15,810
48	0,015	0,004	167,449	6,209	273,637	5,607
72	0,028	0,016	216,233	14,582	203,757	9,210
99	0,023	0,018	224,382	10,698	160,640	11,097
124	0,026	0,013	233,688	17,960	154,693	7,417

#### 1.1. Experimento CP 02 – Meio contendo Extrato de levedura (500mg/L)

Tempo	[X]	Desvio	[S-SO4]	Desvio	[N-NO3]	Desvio
0	0,032	0,001	86,289	4,876	301,721	19,521
2	0,072	0,009	91,795	12,824	290,487	8,101
4	0,124	0,008	86,950	6,510	270,002	31,852
8	0,145	0,006	112,939	12,317	257,117	29,635
15,5	0,216	0,011	217,830	3,022	224,572	10,903
26	0,242	0,013	241,121	8,072	199,297	29,203
48,5	0,260	0,018	260,943	28,765	181,951	9,490
72	0,298	0,026	275,039	21,519	130,408	39,362
106	0,317	0,007	280,450	25,630	100,000	

#### 1.2. Experimento CP 03 – Meio contendo Glicose (500mg/L)

Tempo	[X]	Desvio	[S-SO4]	Desvio	[N-NO3]	Desvio
0	0,037	0,014	75,607	2,463	345,003	31,143
2	0,009	0,008	84,197	2,121	338,560	24,568
5	0,056	0,013	84,197	5,516	301,886	32,869
12	0,046	0,013	82,545	7,481	245,387	44,897
24	0,061	0,012	96,365	19,196	142,303	9,490
48	0,107	0,017	110,890	11,667	104,637	10,903
73	0,143	0,034	156,547	9,688	80,353	26,621
96	0,117	0,009	150,105	3,504	31,784	7,311
120	0,137	0,020	160,450	10,876	15,440	5,650

#### 1.3. Experimento CP 04 – Meio contendo Glicose (250mg/L)

Tempo	[X]	Desvio	[S-SO4]	Desvio	[N-NO3]	Desvio
0	0,042	0,005	60,371	2,389	300,000	49,062
4	0,031	0,005	68,493	2,431	271,423	8,761
8	0,019	0,002	96,987	2,920	254,077	5,257

12	0,070	0,010	90,793	4,088	235,492	14,018
24	0,058	0,012	111,647	4,380	208,234	24,531
48	0,060	0,005	150,052	1,460	128,938	3,504
72	0,060	0,015	163,886	8,176	94,246	3,504
96	0,078	0,010	221,700	1,168	59,554	17,522
120	0,055	0,007	230,000	0,584	37,252	14,018

## 1.4. Experimento CP 05 – Meio contendo Glicose (100mg/L)

Tempo	[X]	Desvio	[S-SO4]	Desvio	[N-NO3]	Desvio
0	0,000	0,001	60,906	5,840	308,593	12,265
4		0,005	59,915	10,045	304,876	31,540
8	0,040	0,013	67,844	22,660	254,077	5,257
12	0,047	0,023	80,398	25,930	255,316	49,062
24	0,072	0,008	116,573		194,605	19,274
48	0,080	0,030	197,017	3,504	166,108	28,035
74	0,089	0,008	244,094		136,372	7,009
96	0,074	0,034	252,354	11,680	95,485	1,752
120		0,003	239,800	17,287	126,460	7,009

## 1.5. Experimento CP 06 – Meio contendo Glicose (50mg/L)

Tempo	[X]	Desvio	[S-SO4]	Desvio	[N-NO3]	Desvio
0	0,002	0,005	55,951	15,652	282,557	4,205
4	0,035	0,005	45,709	8,176	236,962	12,616
8	0,018	0,004	80,893		207,226	1,402
12	0,055	0,000	55,785	23,360	208,217	11,214
24	0,062	0,010	105,340		191,367	7,009
48		0,002	177,360	0,934	160,640	5,607
72		0,007	205,937	9,111	151,719	7,009
96	0,080	0,026	265,568	31,770	102,159	21,027
120	0,060	0,011	272,176	22,426	89,273	44,857

## 1.6. Experimento CP 07 – Meio contendo Extrato de Levedura (1000mg/L)

Tempo	[X]	Desvio	[S-SO4]	Desvio	[N-NO3]	Desvio
0	0,058	0,002	43,385	11,401	325,400	12,265
4	0,083	0,006	96,367	14,228	300,500	31,540
8	0,097	0,008	136,218	8,176	280,460	5,257
12	0,102	0,002	141,173	0,000	250,000	49,062
24	0,182	0,026	147,987	0,292	180,000	19,274
48	0,213	0,014	195,477	31,829	44,686	28,035
72	0,335	0,045	214,680	8,760	43,789	7,009
96	0,215	0,011	255,563	0,584	42,546	1,752
120	0,233	0,009	271,462	10,804	44,235	7,009

## 1.7. Experimento CP 08 – Meio contendo Extrato de Levedura (250mg/L)

Tempo	[X]	Desvio	[S-SO4]	Desvio	[N-NO3]	Desvio
0	0,052	0,004	51,704	8,507	310,451	11,863
4	0,152	0,017	52,530	1,527	288,769	12,224
8	0,205	0,053	72,868	34,076	247,882	18,654
14	0,205	0,053	96,648	7,751	217,526	13,778

24	0,206	0,015	177,553	19,197	177,259	12,876
48,5	0,196	0,005	173,527	0,876	153,487	
85	0,234	0,003	173,527	21,918	149,870	

1.8. Experimento CP 09 – Meio contendo Extrato de Levedura (100mg/L)

Tempo	[X]	Desvio	[S-SO4]	Desvio	[N-NO3]	Desvio
0	0,066	0,014	50,981	2,246	301,159	15,995
4	0,064	0,006	55,421	1,527	288,769	12,224
8	0,117	0,005	69,151	33,419	255,935	17,331
14	0,131	0,004	89,077	5,058	229,916	14,217
24	0,138	0,014	120,156	2,801	173,542	7,295
48,5	0,195	0,004	150,497	19,326494	105,000	
85	0,138	0,003	240,560	11,68205	54,400	

## 2. Resultados com a Cultura Mista

Tabela 2.1: Operação do reator SBR

Data	Tempo	[N-NH4] <sup>e</sup> (mg/L)	[N-NH4] <sup>s</sup> (mg/L)	[N-NO2] <sup>s</sup> (mg/L)	[N-NO3] <sup>s</sup> (mg/L)	Eficiência (%)	[S-SO4] (mg/L)
18/10/04	0,00			0,00		0,00	148,29
18/10/04	0,00			0,00		0,00	150,60
19/10/04	1,00	176,95	3,19	0,00	152,65	0,00	
19/10/04	1,00	197,53	3,33	0,00	196,85	0,00	167,45
19/10/04	1,00	193,42	3,52	0,00		0,00	162,82
20/10/04	2,00	176,95	2,84	51,44		0,00	
20/10/04	2,00	197,53	3,21	51,44	178,87	0,00	193,88
20/10/04	2,00	193,42	2,63	50,51		0,00	193,22
21/10/04	3,00	183,54	1,48	0,00	193,90	0,00	194,87
21/10/04	3,00		1,32	0,00	210,70	0,00	186,94
21/10/04	3,00	179,84	1,71	0,00	217,77	0,00	192,89
25/10/04	7,00	185,60	1,01	0,00	208,93	0,00	180,99
25/10/04	7,00	175,31	0,99	0,00	201,86	0,00	
25/10/04	7,00	170,78	0,97	0,00	194,79	0,00	
29/10/04	11,00	193,83	1,71	0,00		0,00	
29/10/04	11,00	204,94	1,21	0,00		0,00	
29/10/04	11,00	195,47	1,48	0,00		0,00	
30/10/04	12,00	179,84	6,34	0,00		0,00	
30/10/04	12,00	185,60	7,39	0,00		0,00	
30/10/04	12,00	175,31	6,14	0,00		0,00	
1/11/04	14,00	170,78	0,53	0,00		0,00	
1/11/04	14,00	193,83	0,45	0,00		0,00	
1/11/04	14,00	204,94	0,78	0,00		0,00	
4/11/04	17,00	195,47		0,00		0,00	
4/11/04	17,00	179,84		0,00		0,00	190,57
4/11/04	17,00	185,60		0,00		0,00	
5/11/04	18,00	170,78	2,67	0,00		0,00	
5/11/04	18,00	193,83	7,10	0,00		0,00	
5/11/04	18,00	204,94	0,93	0,00		0,00	189,24
7/11/04	20,00	195,47		0,00		0,00	
7/11/04	20,00	179,84		0,00	172,10	0,00	179,01
7/11/04	20,00	185,60		0,00		0,00	
9/11/04	22,00	193,42	1,50	0,00		0,00	
9/11/04	22,00	205,35	2,10	0,00		0,00	203,46
9/11/04	22,00	185,60	2,14	0,00		0,00	210,40
12/11/04	25,00	185,60		0,00	165,02	0,00	
12/11/04	25,00	194,65		0,00	205,69	0,00	225,40



Data	Tempo	[N-NH4]e (mg/L)	[N-NH4]s (mg/L)	[N-NO2]s (mg/L)	[N-NO3]s (mg/L)	Eficiência (%)	[S-SO4] (mg/L)
12/11/04	25,00	187,24		0,00		0,00	216,20
17/11/04	30,00	212,35	21,81	0,00		0,00	
17/11/04	30,00	204,12		0,00		0,00	210,50
17/11/04	30,00	194,65		0,00		0,00	227,58
19/11/04	32,00	187,24	1,79	0,00		0,00	
19/11/04	32,00	200,82	1,11	0,00		0,00	220,10
19/11/04	32,00	212,35	1,17	0,00		0,00	198,40
22/11/04	35,00	212,35	0,78	0,00	210,99	0,00	
22/11/04	35,00	204,12	1,85	0,00	184,47	0,00	200,45
22/11/04	35,00	194,65	0,86	0,00		0,00	187,45
23/11/04	36,00	166,26	0,41	1,54		0,00	
23/11/04	36,00	185,19	0,91	0,00		0,00	
23/11/04	36,00	183,13	0,84	0,00		0,00	
24/11/04	37,00	187,24		0,00		0,00	
24/11/04	37,00	200,82		0,00		0,00	
24/11/04	37,00	212,35		0,00		0,00	
25/11/04	38,00	200,82	22,84	0,00	166,50	0,00	
25/11/04	38,00	212,35	23,25	0,00		0,00	197,25
25/11/04	38,00	212,35	22,74	0,00	170,03	0,00	223,94
29/11/04	42,00	204,12		1,54		0,00	
29/11/04	42,00	194,65		2,13		0,00	211,39
29/11/04	42,00	166,26		1,08		0,00	205,44
30/11/04	43,00	185,19		0,00	239,28	0,00	
30/11/04	43,00	183,13		0,00	237,52	0,00	
30/11/04	43,00	187,24		0,00		0,00	
1/12/04	45,00	200,82		0,00		0,00	
1/12/04	45,00	212,35		0,00		0,00	203,46
1/12/04	45,00	183,13		0,00		0,00	203,13
2/12/04	46,00	187,24	20,78	0,00		0,00	
2/12/04	46,00	200,82	21,40	0,00		0,00	
2/12/04	46,00	212,35	18,00	0,00		0,00	
3/12/04	47,00			0,00		0,00	194,50
3/12/04	47,00			0,00		0,00	194,87
5/12/04	49,00	173,25	12,86	0,00	203,92	0,00	
5/12/04	49,00	175,72	13,68	0,00	210,99	0,00	188,92
5/12/04	49,00	176,54	13,99	0,00		0,00	191,24
7/12/04	51,00	173,25	1,83	0,00	196,85	0,00	
7/12/04	51,00	175,72	1,73	0,00	226,91	0,00	190,24
7/12/04	51,00	176,54	1,30	0,00		0,00	208,15
8/12/04	52,00	204,12	1,81	0,00	170,33	0,00	
8/12/04	52,00	194,65	1,85	0,00	173,86	0,00	186,61

Data	Tempo	[N-NH4] <sub>e</sub> (mg/L)	[N-NH4] <sub>s</sub> (mg/L)	[N-NO2] <sub>s</sub> (mg/L)	[N-NO3] <sub>s</sub> (mg/L)	Eficiência (%)	[S-SO4] (mg/L)
8/12/04	52,00	166,26	2,22	0,00		0,00	181,66
9/12/04	53,00	185,19	0,27	0,00		0,00	
9/12/04	53,00	183,13	0,49	0,00	163,26	0,00	
9/12/04	53,00	187,24	0,35	0,00		0,00	
11/12/04	55,00	183,13		0,00		0,00	197,45
12/12/04	56,00	187,24	1,21	0,00	170,33	0,00	
12/12/04	56,00	200,82	1,01	0,00	186,24	0,00	
12/12/04	56,00	212,35	1,13	0,00		0,00	
13/12/04	57,00		0,58	0,00	166,79	0,00	
13/12/04	57,00		0,72	0,00		0,00	
13/12/04	57,00		0,62	0,00		0,00	
14/12/04	58,00	173,25	0,68	0,00	198,62	0,00	
14/12/04	58,00	175,72	0,60	0,00	179,17	0,00	
14/12/04	58,00	176,54	0,51	0,00		0,00	
15/12/04	59,00	173,25	0,80	0,00	182,70	0,00	
15/12/04	59,00	175,72	0,60	0,00		0,00	
15/12/04	59,00	176,54	0,51	0,00		0,00	
16/12/04	60,00	173,25	0,45	0,00		0,00	177,36
16/12/04	60,00	176,54	0,60	0,00		0,00	214,03
17/12/04	61,00	173,25	1,07	0,00		0,00	212,38
17/12/04	61,00	175,72	0,78	0,00		0,00	
18/1/05	63,00	176,54	11,67	0,00		0,00	198,17
18/1/05	63,00	204,12	13,09	0,00		0,00	199,49
18/1/05	63,00	194,65	10,13	0,00		0,00	
20/1/05	65,00	166,26	2,56	0,00		0,00	218,66
20/1/05	65,00	185,19	3,03	0,00		0,00	223,61
20/1/05	65,00	183,13	1,61	0,00		0,00	
24/1/05	69,00	187,24	16,99	0,00		0,00	204,12
24/1/05	69,00	200,82	18,29	0,00		0,00	201,15
24/1/05	69,00	212,35	18,05	0,00		0,00	
27/1/05	72,00	183,13	19,35	0,00	164,96	0,00	184,63
27/1/05	72,00	187,24	19,95	0,00		0,00	
27/1/05	72,00	200,82	21,96	0,00		0,00	
28/1/05	73,00	212,35		0,00	188,64	0,00	216,67
28/1/05	73,00	228,81		0,00		0,00	218,66
28/1/05	73,00	205,76		0,00		0,00	
29/1/05	74,00	204,94	1,02	0,00	149,74	0,00	209,41
29/1/05	74,00	201,23	0,31	0,00	203,87	0,00	207,75
29/1/05	74,00	203,70	0,19	0,00		0,00	
2/2/05	77,00	205,76	9,77	0,00		0,00	210,73
2/2/05	77,00	200,41	10,48	0,00		0,00	
2/2/05	77,00	209,88	10,13	0,00		0,00	214,36

Data	Tempo	[N-NH4] <sub>e</sub> (mg/L)	[N-NH4] <sub>s</sub> (mg/L)	[N-NO2] <sub>s</sub> (mg/L)	[N-NO3] <sub>s</sub> (mg/L)	Eficiência (%)	[S-SO4] (mg/L)
5/2/05	80,00	204,53	7,53	0,00	220,78	0,00	
5/2/05	80,00	205,35	6,22	0,00	203,87	0,00	
5/2/05	80,00	200,00	7,05	0,00		0,00	
17/2/05	92,00	181,51	1,57	46,81	166,83		
17/2/05	92,00	205,17	0,00	40,24	166,83		
17/2/05	92,00	224,10	0,00	42,43	166,83	6,62	
18/2/05	93,00	181,51	2,75	15,41	180,10		
18/2/05	93,00	205,17	5,59	13,94	165,17	9,98	
18/2/05	93,00	224,10	2,04	14,67	180,10	12,18	
19/2/05	94,00	181,51	9,54		175,48		
19/2/05	94,00	205,17	9,42		175,48	9,88	
19/2/05	94,00	224,10	11,43		166,35	20,67	
21/2/05	96,00	181,51			152,26	16,12	
21/2/05	96,00	205,17			160,55	21,75	
21/2/05	96,00	224,10			157,23	29,84	
22/2/05	97,00	181,51	38,64		182,94		
22/2/05	97,00	205,17	38,40		186,26		
22/2/05	97,00	224,10	38,99		192,90		192,56
24/2/05	99,00	226,94	23,38	39,45	94,20	30,81	195,86
24/2/05	99,00	227,88	25,03				
24/2/05	99,00	235,93	24,68	38,58	97,51	31,86	211,06
25/2/05	100,00	231,20	11,43	66,92	47,75	45,46	214,36
25/2/05	100,00	233,09	10,48	71,88			
25/2/05	100,00	238,77	10,36	67,21			225,26
26/2/05	101,00	243,50	11,55	77,82			208,41
26/2/05	101,00	240,19	8,59	78,91			
26/2/05	101,00	238,29	9,66				
27/2/05	102,00	236,40	9,77	98,27			
27/2/05	102,00	235,93	9,42	96,44			
27/2/05	102,00	243,50	9,89				
1/3/05	104,00	240,19			133,18		
1/3/05	104,00	238,29			112,44		
1/3/05	104,00	236,40			110,79		
2/3/05	105,00	235,93	18,41	11,72	107,92	41,49	
2/3/05	105,00	243,50	14,86	11,72	147,52		
2/3/05	105,00	240,19	18,53				
3/3/05	106,00	238,29		47,87	91,07	41,69	197,51
3/3/05	106,00	236,40		48,24	99,49	37,51	200,49
3/3/05	106,00	235,93		47,51	95,28	39,48	
4/3/05	107,00	235,93	25,39	57,73	86,01	28,31	200,82
4/3/05	107,00	243,50	27,40	61,02	78,43	31,48	214,36
4/3/05	107,00	240,19	23,02	58,46	74,21	35,18	

Data	Tempo	[N-NH4] <sub>e</sub> (mg/L)	[N-NH4] <sub>s</sub> (mg/L)	[N-NO2] <sub>s</sub> (mg/L)	[N-NO3] <sub>s</sub> (mg/L)	Eficiência (%)	[S-SO4] (mg/L)
7/3/05	110,00	202,33	31,42	49,70	62,42	29,06	218,66
7/3/05	110,00	201,86	34,73	48,24	77,58		197,84
7/3/05	110,00	211,80	32,49	49,33	70,00		
8/3/05	111,00	213,69	9,89	59,19	48,93	44,77	211,06
8/3/05	111,00	202,33	11,90	57,37	57,36	37,41	206,76
8/3/05	111,00	201,86	10,25	54,81	55,68	40,19	
9/3/05	112,00	211,80	24,91	81,47	32,92	34,23	210,07
9/3/05	112,00	213,69	28,82	88,77	36,29		214,36
9/3/05	112,00	221,73	30,36	84,03	32,08	33,95	
10/3/05	113,00	211,80	33,43	81,47	30,40	31,40	195,53
10/3/05	113,00	213,69	28,11	88,77	33,77	29,50	203,46
10/3/05	113,00	221,73	30,83	82,20	32,08	34,56	201,48
11/3/05	114,00	211,80	19,59	106,30		40,56	210,40
11/3/05	114,00	213,69	18,76	104,84		42,16	
11/3/05	114,00	221,73	20,42	105,94		43,01	182,98
15/3/05	118,00	211,80			45,35		184,30
15/3/05	118,00	213,69			46,86		
15/3/05	118,00	221,73			45,35		184,63
16/3/05	119,00	224,10		78,91	64,56	35,98	191,24
16/3/05	119,00	205,65		81,84	53,94	33,97	
16/3/05	119,00	206,12		79,28	57,65	33,57	201,15
17/3/05	120,00	197,60	20,30	90,97	34,39		209,74
17/3/05	120,00	221,26	21,25	89,51	36,25	33,56	
17/3/05	120,00	219,37	24,68	89,87	36,41		172,40
18/3/05	121,00	221,73	29,65	93,16	21,75	34,81	
18/3/05	121,00	224,10	25,62	94,98	21,58	36,55	
18/3/05	121,00	205,65	21,96	94,98	18,21	34,28	
21/3/05	124,00	206,12	16,75				223,28
21/3/05	124,00	219,37	11,78				
21/3/05	124,00	221,26	12,26				211,39
22/3/05	125,00	243,45	17,34	44,59			202,80
22/3/05	125,00	239,31	12,85	43,49			
22/3/05	125,00	231,03	10,60	43,86			207,09
23/3/05	126,00	216,25	10,13	47,87			212,38
23/3/05	126,00	233,99	11,55	48,24			
23/3/05	126,00	224,53	10,48	47,51			223,94
24/3/05	127,00	222,16	14,62	69,78			231,21
24/3/05	127,00	251,73	12,73	71,25	65,70	40,54	214,03
25/3/05	128,00	224,53	25,03	89,87	49,58		207,42
25/3/05	128,00	243,45	25,51	92,79	48,58	31,45	
25/3/05	128,00	239,31	22,79	91,33	48,29	32,14	

Data	Tempo	[N-NH4]e (mg/L)	[N-NH4]s (mg/L)	[N-NO2]s (mg/L)	[N-NO3]s (mg/L)	Eficiência (%)	[S-SO4] (mg/L)
26/3/05	129,00	231,03	19,00	103,02	33,17	32,83	233,52
26/3/05	129,00	216,25	14,98	102,29	33,31	30,37	210,07
26/3/05	129,00	233,99	16,75	102,29	32,60	35,20	210,07
29/3/05	132,00	224,53	56,50	68,69	24,46	33,35	
29/3/05	132,00	222,16	53,19	65,04	37,16	30,06	203,79
29/3/05	132,00	215,66	52,48	66,50	38,16	27,14	200,82
3/4/05	137,00	243,45	30,24	102,29		45,56	204,45
3/4/05	137,00	239,31	28,70	104,11			204,12
3/4/05	137,00	236,36	31,66	103,02			218,00
5/4/05	139,00	243,45	22,19	107,40	11,62	42,00	221,96
5/4/05	139,00	236,36	22,43	106,67		45,38	212,05
6/4/05	140,00	221,73	22,19	107,40	11,62	36,31	208,41
6/4/05	140,00	205,65	22,43				188,26
8/4/05	142,00	206,12		69,05	66,70	34,14	201,15
8/4/05	142,00	219,37		64,31	70,55	38,52	
8/4/05	142,00	221,26			64,56		201,48
11/4/05	145,00	243,45		69,05	66,70	44,24	211,72
11/4/05	145,00	239,31		64,31	70,55	43,65	
11/4/05	145,00	231,03			64,56		196,85
12/4/05	146,00	216,25	23,73	74,90	38,16	36,74	193,88
12/4/05	146,00	233,99	21,37	69,78	38,73	44,49	
12/4/05	146,00	224,53	21,25		36,88		200,16
14/4/05	148,00	222,16			68,84		192,56
14/4/05	148,00	215,66			51,43		
14/4/05	148,00	251,73			53,86		168,77
15/4/05	149,00	224,53	10,48	82,93	44,01	38,79	
15/4/05	149,00	243,45	11,67	84,39	47,01	41,23	
15/4/05	149,00	239,31	9,54		48,01		200,16
19/4/05	153,00	233,99	8,95				231,21
25/4/05	159,00	224,53					216,67
25/4/05	159,00	215,66					223,94
26/4/05	160,00	243,45	28,94	69,42			224,27
26/4/05	160,00	239,31	31,18	69,42			
27/4/05	161,00	243,45		72,34	15,76		
27/4/05	161,00	239,31		72,34	18,75		223,94
27/4/05	161,00	236,36			20,04		224,27
28/4/05	162,00	243,45	54,84		17,18		
28/4/05	162,00	239,31	60,87		15,61		218,33
28/4/05	162,00	236,36	56,85				220,31
29/4/05	163,00	261,79		72,34	29,31		
29/4/05	163,00	262,97		72,34	33,45		184,96

Data	Tempo	[N-NH4]e (mg/L)	[N-NH4]s (mg/L)	[N-NO2]s (mg/L)	[N-NO3]s (mg/L)	Eficiência (%)	[S-SO4] (mg/L)
29/4/05	163,00	255,28	72,11		36,16		180,33
2/5/05	166,00	239,31	80,51	99,73	30,60		
2/5/05	166,00	247,00	45,14	97,17	23,32	32,94	204,12
2/5/05	166,00	262,97	42,18		22,89		195,86
3/5/05	167,00	222,16	17,23	108,50	58,28		
3/5/05	167,00	215,66	15,81	109,59			
3/5/05	167,00	243,45	16,28				230,22
5/5/05	169,00	239,31	16,75	105,94	22,04	39,52	
5/5/05	169,00	236,36	15,57	108,50	26,32	36,37	222,29
5/5/05	169,00	243,45	17,82		27,32		231,54
6/5/05	170,00	239,31	64,31	63,58	22,89	37,00	
6/5/05	170,00	236,36	67,14	61,75	22,46	35,96	221,96
6/5/05	170,00	243,45			13,62		232,20
12/5/05	176,00	236,36	60,05	72,71	13,62	38,07	219,32
12/5/05	176,00	261,79	62,06				
13/5/05	177,00	262,97	58,51	60,66	9,48	51,08	228,57
13/5/05	177,00	255,28	63,00	65,04	6,20	47,42	228,57
13/5/05	177,00	239,31	59,57		14,76		
16/5/05	180,00	247,00		48,24	24,89		
16/5/05	180,00	262,97		48,97	34,45		
17/5/05	181,00	222,16	55,79	67,59			
17/5/05	181,00	215,66	57,44	66,13			220,31
17/5/05	181,00	243,45	55,20				225,59
19/5/05	183,00	239,31	57,33	65,40			
19/5/05	183,00	236,36	55,32	67,23			
20/5/05	184,00	239,31	66,43	47,14			
20/5/05	184,00	236,36	58,27	48,24	6,48	40,98	
20/5/05	184,00	243,45	67,97				
23/5/05	187,00	239,31		50,43	9,19		
23/5/05	187,00	236,36		46,41	10,91		233,52
23/5/05	187,00	261,79					225,26
24/5/05	188,00	262,97	58,98	26,33	24,32	38,41	
24/5/05	188,00	255,28	37,22	25,96	35,45		218,66
24/5/05	188,00	239,31	37,57		35,45		212,38
26/5/05	190,00	247,00	38,75	42,03	16,04	40,22	
26/5/05	190,00	262,97	40,41	40,20	20,75	39,42	226,92
26/5/05	190,00	222,16	37,81				228,90
30/5/05	194,00	239,31	38,87	73,07	14,76	47,06	
30/5/05	194,00	236,36	32,25	72,34	13,19	50,17	219,32
30/5/05	194,00	243,45	31,07		13,33		217,00
6/6/05	201,00	239,31	21,13	75,63	11,05	42,01	

Data	Tempo	[N-NH4]e (mg/L)	[N-NH4]s (mg/L)	[N-NO2]s (mg/L)	[N-NO3]s (mg/L)	Eficiência (%)	[S-SO4] (mg/L)
6/6/05	201,00	236,36		77,82	10,76		
6/6/05	201,00	261,79			16,47		
9/6/05	204,00	262,97	41,71	63,21	9,05	44,21	
9/6/05	204,00	255,28	42,42	61,39	10,91	43,56	
9/6/05	204,00	239,31	42,54		12,33		
16/6/05	211,00	247,00	54,37	61,39	13,76	44,98	
16/6/05	211,00	262,97	54,01	62,12	12,33		
16/6/05	211,00	222,16	56,14		12,62		
20/6/05	215,00	216,25	58,26	70,55	11,16	35,27	244,02
20/6/05	215,00	233,99					271,74
24/6/05	219,00	224,53	60,05	44,98	18,20	45,12	
24/6/05	219,00	222,16					254,62
1/7/05	226,00	215,66	62,04	62,03	25,36	30,71	250,55
1/7/05	226,00	243,45	53,05	65,04		51,49	
5/7/05	230,00	216,25					270,11
10/7/05	235,00	233,99	65,48	35,04		57,04	288,87
10/7/05	235,00	224,53					
19/7/05	244,00	222,16					306,80
19/7/05	244,00	215,66	76,96	31,07	12,19	44,25	302,73
19/7/05	244,00	243,45	72,23	32,54	19,33	49,03	
20/7/05	245,00	216,25	68,68	3,69	32,17	51,66	325,56
20/7/05	245,00	233,99		23,04			332,08
20/7/05	245,00	224,53		19,75			
21/7/05	246,00	216,25		3,69			329,63
21/7/05	246,00	233,99	50,58	48,60	40,44		335,34
21/7/05	246,00	224,53	48,81	47,14	40,30		
22/7/05	247,00	222,16	48,45	3,69	33,17		332,89
22/7/05	247,00	215,66	43,37	44,95	36,31	42,21	332,08
22/7/05	247,00		41,36	45,32	38,87		
23/7/05	248,00	243,45	42,42				351,65
23/7/05	248,00	224,53		60,29	34,74		334,52
23/7/05	248,00	233,99		51,89			
24/7/05	249,00	243,45		57,73			315,77
24/7/05	249,00	224,53		53,35	34,74		
3/8/05	259,00	243,45		45,32	40,73		
3/8/05	259,00	224,53	24,20	57,37	28,60	50,93	
3/8/05	259,00	233,99	22,08	61,39	15,19	57,84	
7/8/05	263,00	243,45					336,97
7/8/05	263,00	224,53		23,41			332,89
8/8/05	264,00	259,42		21,21			
8/8/05	264,00	244,64	36,03	72,37	21,61	46,85	

Data	Tempo	[N-NH4]e (mg/L)	[N-NH4]s (mg/L)	[N-NO2]s (mg/L)	[N-NO3]s (mg/L)	Eficiência (%)	[S-SO4] (mg/L)
8/8/05	264,00	244,05	34,38	62,88	18,47	52,58	
9/8/05	265,00	254,10	35,92				
9/8/05	265,00	244,05	48,93		12,48		
9/8/05	265,00	244,05	55,55		12,19		
10/8/05	266,00	254,10	48,22				
10/8/05	266,00	244,05	52,59				
10/8/05	266,00	244,05	53,19				
11/8/05	267,00	254,10	46,80				
11/8/05	267,00	244,05	45,85	65,80	24,26	44,31	
11/8/05	267,00	244,05	45,38	68,72			
12/8/05	268,00	254,10	44,91	65,80			
12/8/05	268,00	244,05	69,39	58,50			
12/8/05	268,00	244,05	67,14	51,19			
13/8/05	269,00	254,10	68,56	51,19			
13/8/05	269,00	244,05	48,69	62,15	29,87	42,34	
13/8/05	269,00	244,05	47,03	60,69			
14/8/05	270,00	254,10	51,65	59,96			
14/8/05	270,00	244,05	45,73	62,88	26,48	44,64	
14/8/05	270,00	244,05	47,39	62,88			
15/8/05	271,00	216,25	51,53	62,88	25,40		306,80
15/8/05	271,00	233,99	72,70	42,43	29,60		289,68
15/8/05	271,00	224,53	74,95	44,62	36,59		
16/8/05	272,00	222,16	75,78	43,89	33,45		
17/8/05	273,00	216,25					351,65
17/8/05	273,00	233,99					341,86
19/8/05	275,00	216,25					353,28
19/8/05	275,00	233,99					337,79
20/8/05	276,00	233,99			35,45		
20/8/05	276,00	224,53			37,73		
21/8/05	277,00	222,16			43,16		
21/8/05	277,00	215,66					
22/8/05	278,00	224,53	43,96		13,90		
22/8/05	278,00	233,99	47,03	76,76	14,47	40,91	
23/8/05	279,00	243,45	48,45		10,62		336,16
23/8/05	279,00	224,53					349,20
24/8/05	280,00	243,45					363,88
24/8/05	280,00	224,53					386,71
25/8/05	281,00	243,45					332,89
25/8/05	281,00	224,53					358,17
26/8/05	282,00	244,64	33,90		10,62		
26/8/05	282,00	244,05	36,39		9,34		



Data	Tempo	[N-NH4]e (mg/L)	[N-NH4]s (mg/L)	[N-NO2]s (mg/L)	[N-NO3]s (mg/L)	Eficiência (%)	[S-SO4] (mg/L)
27/8/05	283,00	254,10					
27/8/05	283,00	244,05	37,45		10,33		
27/8/05	283,00	244,05	41,48		10,05		
28/8/05	284,00	254,10	43,13				
28/8/05	284,00	244,05	45,38	70,91	5,91	49,93	
28/8/05	284,00	244,05	45,02	71,64	5,63	49,89	
29/8/05	285,00	254,10					340,23
29/8/05	285,00	244,05	65,61	57,77	5,20	47,32	341,86
29/8/05	285,00	244,05	62,06	51,92	4,48	51,46	340,23
30/8/05	286,00	254,10	63,71		22,61		
30/8/05	286,00	244,05	63,12	67,99	22,18		
30/8/05	286,00	244,05	79,80	30,01	0,00	55,00	
31/8/05	287,00	254,10		32,20	0,00		
31/8/05	287,00	244,05	78,62	31,47	0,00	54,89	
31/8/05	287,00	244,05					
1/9/05	288,00	254,10					
1/9/05	288,00	244,05	81,93	29,28	0,00	54,43	
1/9/05	288,00	244,05	85,12	42,43	0,00	47,73	
2/9/05	289,00	216,25		32,93	0,00		
2/9/05	289,00	233,99	63,36	62,88	0,00	46,05	
2/9/05	289,00	224,53	66,20	62,15	0,00	42,84	
3/9/05	290,00	222,16	67,26	62,15	0,00	41,75	
5/9/05	292,00	222,16	63,71		0,00		336,16
5/9/05	292,00	215,66	55,20		0,00		345,12
5/9/05	292,00	243,45	57,33		0,00		
6/9/05	293,00	216,25	54,01		0,00		338,60
6/9/05	293,00	233,99	73,53	64,34	0,00	41,08	351,65
6/9/05	293,00	224,53	65,01	67,26	0,00	41,09	
7/9/05	294,00	216,25	58,86	65,07	0,00	42,69	353,28
7/9/05	294,00	233,99	24,56	67,99	0,00		362,25
7/9/05	294,00	224,53	24,56	65,80	0,00	59,76	
8/9/05	295,00	222,16	24,44				
8/9/05	295,00	215,66	54,49		0,00		
8/9/05	295,00		54,13		0,00		
9/9/05	296,00	243,45	54,61				334,52
9/9/05	296,00	224,53	60,16	44,62	0,00	53,33	345,12
9/9/05	296,00	233,99	59,57	47,54	0,00	54,22	
10/9/05	297,00	243,45	68,56				
10/9/05	297,00	224,53	51,17	72,37	0,00	44,97	
10/9/05	297,00	233,99	49,16	72,37	0,00	48,06	342,68
11/9/05	298,00	243,45	41,12	72,37	0,00	53,38	340,23

Data	Tempo	[N-NH4]e (mg/L)	[N-NH4]s (mg/L)	[N-NO2]s (mg/L)	[N-NO3]s (mg/L)	Eficiência (%)	[S-SO4] (mg/L)
12/9/05	299,00	243,45					336,16
12/9/05	299,00	224,53	32,96	65,02	0,00	56,36	358,17
12/9/05	299,00	244,05	25,27	63,16	0,00		
13/9/05	300,00	259,42	38,28		0,00		
14/9/05	301,00	244,05	21,01	74,57	0,00		
14/9/05	301,00	244,05	23,02	74,57	0,00		
15/9/05	302,00	254,10	25,74	74,57	0,00		
15/9/05	302,00	244,05	17,58		0,00		
15/9/05	302,00	244,05	24,68				
16/9/05	303,00	254,10	32,49				
18/9/05	305,00	254,10					371,21
18/9/05	305,00	244,05					395,67
18/9/05	305,00	244,05	22,90	67,26	21,71	54,16	
19/9/05	306,00	254,10	24,09	67,26	22,42	55,23	
19/9/05	306,00	244,05	21,96	67,26	22,42	54,25	
20/9/05	307,00	233,99					350,02
21/9/05	308,00	224,53					361,43
21/9/05	308,00	222,16	17,58	59,96	25,99	53,40	
21/9/05	308,00	215,66	18,65	59,96	32,41	48,52	345,12
22/9/05	309,00	243,45	24,20	59,96	33,84	51,53	386,71
22/9/05	309,00	216,25	14,62		0,00		
22/9/05	309,00	233,99	15,81		0,00		351,65
23/9/05	310,00	224,53	13,91		0,00		357,35
23/9/05	310,00	222,16	15,45	65,80	0,00	63,43	
23/9/05	310,00	215,66	11,16	65,80	0,00	64,31	363,06
24/9/05	311,00	243,45	10,60	65,80	0,00	68,62	387,52
24/9/05	311,00	216,25	22,90	59,23	0,00	62,02	
24/9/05	311,00	233,99	20,89	59,23	0,00	65,76	
27/9/05	314,00	224,53	14,62	48,59	15,29	65,04	368,77
28/9/05	315,00	233,99	15,10	48,97	15,29	66,09	332,89
30/9/05	317,00	243,45	0,00	0,00			361,43
30/9/05	317,00	224,53	0,00	0,00			349,20
2/10/05	319,00	254,10	8,95	62,88	18,14	64,59	354,09
2/10/05	319,00	244,05	5,87	69,45	16,71	62,29	361,43
4/10/05	321,00	254,10	17,94	63,61	6,01	65,54	346,75
4/10/05	321,00	244,05	15,45	65,80	23,85	56,93	375,29
6/10/05	323,00	254,10	18,41	65,80	25,28	56,91	356,54
6/10/05	323,00	244,05	19,59	63,61	14,57	59,94	373,66
30/9/05	317,00	243,45	0,00	0,00			361,43
30/9/05	317,00	224,53	0,00	0,00			349,20
1/10/05	318,00	244,05					

Data	Tempo	[N-NH4]e (mg/L)	[N-NH4]s (mg/L)	[N-NO2]s (mg/L)	[N-NO3]s (mg/L)	Eficiência (%)	[S-SO4] (mg/L)
2/10/05	319,00	254,10	8,95	62,88	18,14	64,59	354,09
2/10/05	319,00	244,05	5,87	69,45	16,71	62,29	361,43
4/10/05	321,00	254,10	17,94	63,61	6,01	65,54	346,75
4/10/05	321,00	244,05	15,45	65,80	23,85	56,93	375,29
6/10/05	323,00	254,10	18,41	65,80	25,28	56,91	356,54
6/10/05	323,00	244,05	19,59	63,61	14,57	59,94	373,66
10/10/05	327,00	216,25	15,10	51,92	24,41	57,72	353,28
10/10/05	327,00	233,99	13,09	59,23	26,91	57,60	352,46
11/10/05	328,00	222,16	12,61	38,78	35,11	61,06	386,71
11/10/05	328,00	215,66	14,98	35,86	35,11	60,15	361,43
12/10/05	329,00	216,25	9,30	47,54	26,55	61,44	354,09
12/10/05	329,00	233,99	10,72	50,46	26,55	62,51	372,85
13/10/05	330,00	216,25	28,23	51,92	38,68		368,77
13/10/05	330,00	233,99	25,27	54,85	37,61		339,42
14/10/05	331,00	222,16	31,66	54,85	44,75		347,57
14/10/05	331,00	215,66	26,45	54,12	39,39		354,09
15/10/05	332,00	243,45	43,01	41,70	43,67		350,83
15/10/05	332,00	224,53	32,84	43,89	41,89		395,67
16/10/05	333,00	243,45	20,77	57,77	40,46		414,43
16/10/05	333,00	224,53	24,32	59,96	42,60		386,71
17/10/05	334,00	243,45	29,17	22,71	25,68		353,28
17/10/05	334,00	224,53	31,18	24,90	31,25	61,10	350,83
19/10/05	336,00	259,42	22,79	30,01	65,44	54,42	354,09
19/10/05	336,00	244,64	23,38	28,55	66,51	51,59	372,03
20/10/05	337,00	254,10	29,29	28,55	40,34	61,36	361,43
23/10/05	340,00	244,05	27,64	18,33	64,72	54,65	346,75
24/10/05	341,00	254,10	19,47	14,67	66,51	60,39	371,21
24/10/05	341,00	244,05	19,47	14,67	70,79	57,00	397,31
25/10/05	342,00	254,10	17,23	14,67	66,15	61,41	
26/10/05	343,00	244,05	10,01	0,74	65,79	68,64	
26/10/05	343,00	254,10	10,60	0,74	62,58	70,91	
28/10/05	345,00	244,05	8,95	0,74	59,73	71,56	356,54
28/10/05	345,00	244,05	11,67	0,74	51,52	73,81	377,74
29/10/05	346,00	244,05	18,05	3,22	55,09	68,71	376,11
29/10/05	346,00	244,05	19,24	3,15	54,73	68,40	376,92
30/10/05	347,00	244,05	17,34	2,78	53,66	69,76	372,03
30/10/05	347,00	254,10	17,11	3,29	64,72	66,50	416,87
31/10/05	348,00	244,05	2,44	2,78	68,29	69,88	
31/10/05	348,00	254,10	3,15	2,42	67,58	71,21	413,61
1/11/05	349,00	254,10	5,63	4,54	44,75	78,39	396,49
1/11/05	349,00	244,05	6,22	4,02	56,87	72,50	388,34

Data	Tempo	[N-NH4]e (mg/L)	[N-NH4]s (mg/L)	[N-NO2]s (mg/L)	[N-NO3]s (mg/L)	Eficiência (%)	[S-SO4] (mg/L)
6/11/05	354,00	244,05	8,00	0,00	60,09	72,10	394,86
6/11/05	354,00	254,10	7,05	0,00	59,02	74,00	429,92
9/11/05	357,00	244,05	1,73	0,00	61,16	74,23	469,87
9/11/05	357,00	244,05	3,98	0,00	59,02	74,19	414,43
11/11/05	359,00	254,10	22,31	2,71	58,66	67,07	397,31
13/11/05	361,00	244,05	9,30	1,47	65,79	68,63	438,89
13/11/05	361,00	254,10	11,19	1,39	65,79	69,15	509,82
16/11/05	364,00	244,05	0,00	0,74	80,42	66,75	454,38
16/11/05	364,00	244,05	0,00	0,74	66,15	72,59	468,00
18/11/05	366,00	244,05	0,00	0,74	84,70	64,99	498,56
18/11/05	366,00	254,10	0,00	0,74	77,21	69,32	478,63
20/11/05	368,00	244,05	4,81	1,61	71,14	68,22	458,64
20/11/05	368,00	244,05	2,79	1,32	66,15	71,21	498,20
20/11/05	368,00	254,10	1,87	1,45	65,44	72,94	560,37
23/11/05	371,00	244,05	2,56	1,36	58,64	74,37	525,36
23/11/05	371,00	254,10	4,65	2,63	58,60	74,07	476,00
26/11/05	374,00	244,05	4,33	3,44	55,64	74,02	475,63
26/11/05	374,00	244,05	3,68	3,54	64,10	70,78	479,56
26/11/05	374,00	244,05	2,47	3,82	59,87	72,89	485,63
29/11/05	377,00	254,10	2,40	2,54	69,41	70,74	492,12
29/11/05	377,00	244,05	5,87	2,46	63,56	70,54	524,63
29/11/05	377,00	244,05	0,00	2,49	66,87	71,58	512,36
2/12/05	380,00	254,10	0,00	3,05	68,79	71,73	516,36
2/12/05	380,00	244,05	4,98	1,54	54,69	74,92	469,46
5/12/05	383,00	254,10	6,32	1,63	59,74	73,36	478,42
5/12/05	383,00	244,05	6,00	1,38	59,87	72,44	489,46
5/12/05	383,00	244,05	3,68	2,04	59,00	73,48	449,87
8/12/05	386,00	254,10	3,45	2,59	64,56	72,22	498,87
8/12/05	386,00	244,05	3,47	2,57	63,91	71,34	476,36
8/12/05	386,00	244,05	3,88	2,46	62,00	72,00	510,37
11/12/05	389,00	254,10	2,54	3,54	64,87	72,08	501,23
11/12/05	389,00	244,05	2,36	3,88	63,58	71,39	544,69
11/12/05	389,00	244,05	2,87	3,44	78,65	65,19	497,45
14/12/05	392,00	254,10	3,64	3,44	57,63	74,53	487,63
14/12/05	392,00	244,05	3,86	2,85	56,81	73,97	468,74
14/12/05	392,00	244,05	3,91	2,96	59,90	72,64	456,69
17/12/05	395,00	244,05	4,01	2,64	64,45	70,87	497,80
17/12/05	395,00	254,10	0,00	2,64	62,54	74,35	504,78
20/12/05	398,00	244,05	4,57	3,58	69,52	68,17	524,36
20/12/05	398,00	254,10	3,52	3,64	67,23	70,72	486,36
20/12/05	398,00	240,57	2,56	0,00	61,45	73,39	485,21

2.2. Influência da fração do metabolismo aeróbio (  $f$  ) na determinação do fator experimental de conversão  $Y_{N-N_2/S-SO_4}^{ANOXICO}$ .

$$[N - N_2] = \frac{Y_{N-N_2/S-SO_4}}{(1-f)} * [S - SO_4]^{DA} \quad \text{V.18}$$

$$\frac{[N - N_2]}{[S - SO_4]^{DA}} = \frac{Y_{N-N_2/S-SO_4}}{(1-f)} = Y_{N-N_2/S-SO_4}^{ANOXICO} \quad \text{V.19}$$

Tabela 2.2: Valores de Nitrogênio Removido e Sulfato Produzido, para diferentes valores de  $f$  e considerando-se  $Y_{N-N_2/SSO_4}$  igual a 0,35.

S-SO4	N-N2				
	$f = 0$	$f = 0,1$	$f = 0,2$	$f = 0,3$	$f = 0,4$
0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
50,0	18,0	19,4	21,9	100,0	29,2
100,0	36,0	38,9	43,8	200,0	58,3
150,0	54,0	58,3	65,6	300,0	87,5
200,0	72,0	77,8	87,5	400,0	116,7
250,0	90,0	97,2	109,4	500,0	145,8
300,0	108,0	116,7	131,3	600,0	175,0
350,0	126,0	136,1	153,1	700,0	204,2
400,0	144,0	155,6	175,0	800,0	233,3
450,0	162,0	175,0	196,9	900,0	262,5

2.3. Respirometria pela Técnica 1, para as Bactérias Oxidadoras de Enxofre

Tabela 2.3.: Valores das concentrações de oxigênio,  $q_{O_2}$  e  $Q_{O_2}$  determinado pela Eq. IV.5 – Condição I.

Tempo (min)	O2		
	(mg/L)	$q_{O_2}$	$Q_{O_2}$ (Eq. IV.5)
0,00	7,68	0,74	0,75
0,50	7,48	0,73	0,75
1,00	7,26	0,72	0,75
1,50	7,04	0,72	0,75
2,00	6,82	0,71	0,75
2,50	6,59	0,71	0,75
3,00	6,37	0,71	0,75
3,50	6,15	0,70	0,74
4,00	5,93	0,70	0,74
4,50	5,71	0,70	0,74
5,00	5,49	0,71	0,74
5,50	5,27	0,71	0,74
6,00	5,05	0,71	0,74
6,50	4,82	0,71	0,74
7,00	4,60	0,71	0,73
7,50	4,38	0,72	0,73

8,00	4,16	0,72	0,73
8,50	3,94	0,72	0,73
9,00	3,72	0,73	0,72
9,50	3,50	0,73	0,72
10,00	3,28	0,73	0,72
11,00	2,83	0,73	0,71
12,00	2,39	0,73	0,70
13,00	1,95	0,72	0,68
14,00	1,51	0,71	0,65
15,00	1,06	0,70	0,61
16,00	0,76	0,67	0,56
17,00	0,54	0,64	0,51
18,00	0,14	0,39	0,25
19,00	0,00	0,18	0,00
20,00	0,00	0,12	0,00

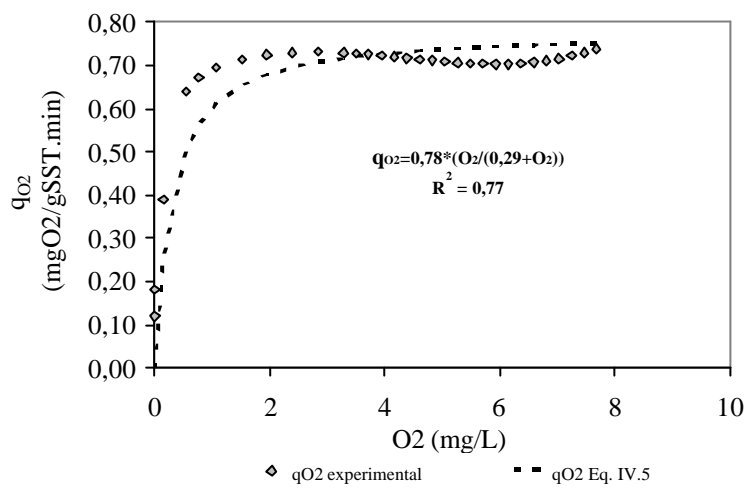


Figura 2.1.: Ajuste da Eq. IV.5 aos pontos experimentais de velocidade específica de consumo de oxigênio – Condição I.

Tabela 2.4.: Valores das concentrações de oxigênio,  $q_{O_2}$  e  $Q_{O_2}$  determinado pela Eq. IV.5 – Condição II.

Tempo (min)	O <sub>2</sub> (mg/L)	$q_{O_2}$	$q_{O_2}$ (Eq. IV.5)
0,00	4,23	0,56	0,50
0,50	4,00	0,53	0,48
1,00	3,78	0,51	0,47
1,50	3,57	0,49	0,45
2,00	3,38	0,47	0,44
2,50	3,19	0,45	0,42
3,00	3,01	0,43	0,41
3,50	2,84	0,41	0,39
4,00	2,68	0,39	0,38
4,50	2,53	0,38	0,36

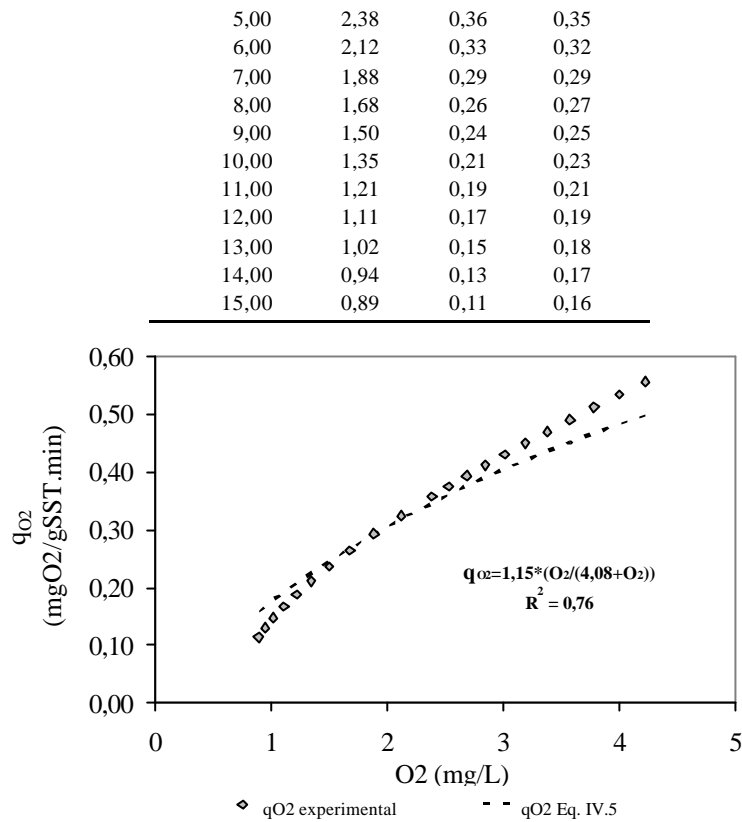


Figura 2.2.: Ajuste da Eq. IV.5 aos pontos experimentais de velocidade específica de consumo de oxigênio – Condição III-2.

Tabela 2.5.: Valores das concentrações de oxigênio, q<sub>O<sub>2</sub></sub> e q<sub>O<sub>2</sub></sub> determinado pela Eq. IV.5 – Condição III-2.

Tempo (min)	O <sub>2</sub> (mg/L)	q <sub>O<sub>2</sub></sub>	q <sub>O<sub>2</sub></sub> (Eq. IV.5)
0,00	6,24	1,32	1,32
0,50	5,58	1,32	1,31
1,00	5,36	1,32	1,31
1,50	5,03	1,31	1,30
2,00	4,74	1,30	1,30
2,50	4,40	1,29	1,29
3,00	4,08	1,28	1,28
3,50	3,76	1,26	1,27
4,00	3,40	1,25	1,26
4,50	3,12	1,23	1,25
5,00	2,84	1,21	1,24
5,50	2,56	1,18	1,23
6,00	2,30	1,16	1,21
6,50	2,00	1,13	1,19
7,00	1,75	1,10	1,16

7,50	1,50	1,07	1,13
8,00	1,25	1,04	1,09
8,50	1,01	1,00	1,04
9,00	0,83	0,96	0,99
9,50	0,61	0,92	0,89
10,00	0,44	0,88	0,78
11,00	0,26	0,79	0,60
12,00	0,14	0,69	0,41
13,00	0,06	0,52	0,21
14,00	0,04	0,37	0,15
15,00	0,03	0,00	0,11

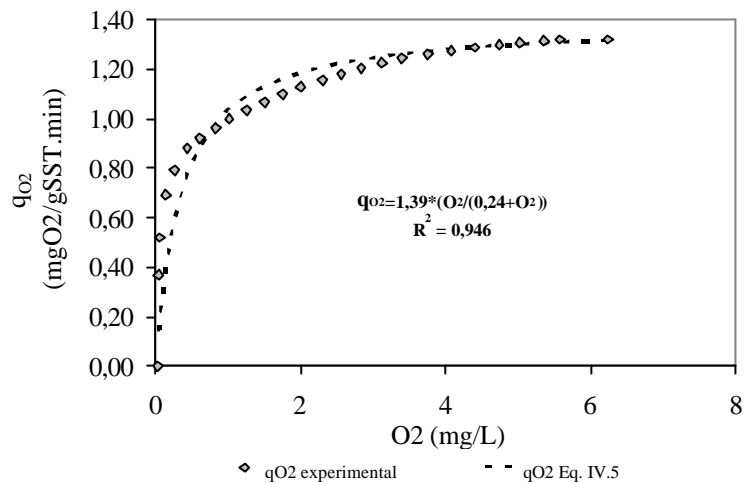


Figura 2.3.: Ajuste da Eq. IV.5 aos pontos experimentais de velocidade específica de consumo de oxigênio – Condição III-2.

Tabela 2.6.: Valores das concentrações de oxigênio, q<sub>O<sub>2</sub></sub> e q<sub>O<sub>2</sub></sub> determinado pela Eq. IV.5 – Condição IV.

Tempo (min)	O <sub>2</sub> (mg/L)	q <sub>O<sub>2</sub></sub>	q <sub>O<sub>2</sub></sub> (Eq. IV.5)
0,00	5,81	2,72	2,61
0,25	5,58	2,54	2,60
0,50	5,26	2,37	2,59
0,75	4,91	2,20	2,58
1,00	4,50	2,04	2,57
1,25	4,05	1,88	2,55
1,50	3,59	1,74	2,52
1,75	3,13	1,59	2,49
2,00	2,69	1,46	2,46
2,25	2,17	1,32	2,40
2,50	1,64	1,20	2,30
2,75	1,18	1,08	2,16
3,00	0,83	0,96	1,98
3,25	0,59	0,85	1,78
3,50	0,40	0,75	1,53



3,75	0,27	0,65	1,26
4,00	0,18	0,56	1,00
4,25	0,12	0,48	0,77
4,50	0,09	0,40	0,59
4,75	0,07	0,32	0,47
5,00	0,05	0,25	0,35
5,25	0,03	0,19	0,27
5,50	0,03	0,13	0,20
5,75	0,02	0,08	0,17
6,00	0,02	0,04	0,14
6,25	0,01	0,00	0,11
6,50	0,01	0,00	0,10
6,75	0,01	0,00	0,08
7,00	0,01	0,00	0,07
7,25	0,01	0,00	0,07
7,50	0,01	0,00	0,06
7,75	0,01	0,00	0,05
8,00	0,01	0,00	0,05
8,25	0,01	0,00	0,05
8,50	0,01	0,00	0,05
8,75	0,01	0,00	0,05
9,00	0,01	0,00	0,05

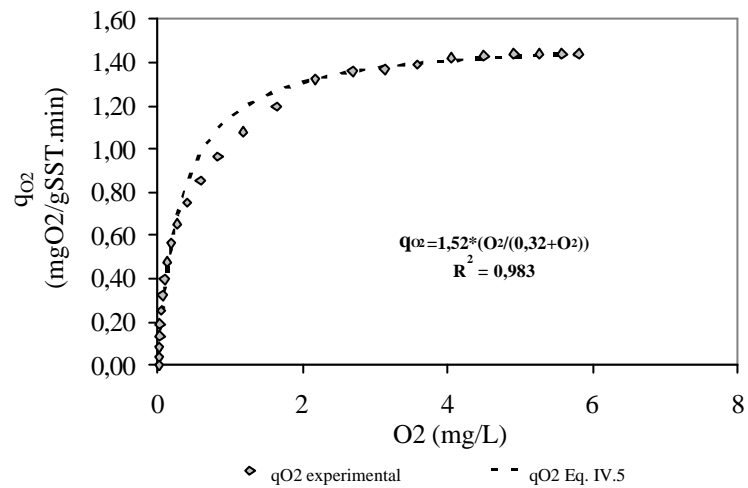


Figura 2.4.: Ajuste da Eq. IV.5 aos pontos experimentais de velocidade específica de consumo de oxigênio – Condição IV.

2.4. Respirometria pela Técnica 3, para as Bactérias Oxidadoras de Enxofre na presença e na ausência de substrato (Tiosulfato)

Tabela 2.7.: Valores das concentrações de oxigênio durante o teste de respirometria, pela Técnica 3, para as Bactérias Oxidadoras de Enxofre.

Sem Substrato		Com Substrato		Sem Substrato		Com Substrato	
Tempo	O2	Tempo	O2	Tempo	O2	Tempo	O2
0,00	0,00	0,00	0,01	19,50	6,61	19,75	0,77
0,25	1,04	0,25	0,13	19,75	6,59	20,00	0,59
0,50	1,92	0,50	0,34	20,00	6,58	20,25	0,46
0,75	2,67	0,75	0,58	20,25	6,56	20,50	0,33
1,00	3,32	1,00	0,81	20,50	6,54	20,75	0,25
1,25	3,86	1,25	1,01	20,75	6,52	21,00	0,18
1,50	4,33	1,50	1,19	21,00	6,51	21,25	0,12
1,75	4,72	1,75	1,36	21,25	6,50	21,50	0,10
2,00	5,06	2,00	1,59	21,50	6,48	21,75	0,07
2,25	5,35	2,25	2,00	21,75	6,47	22,00	0,05
2,50	5,59	2,50	2,33	22,00	6,45	22,25	0,04
2,75	5,80	2,75	2,77	22,25	6,44	22,50	0,03
3,00	5,97	3,00	3,06	22,50	6,43	22,75	0,02
3,25	6,12	3,25	3,40	22,75	6,43	23,00	0,01
3,50	6,25	3,50	3,70	23,00	6,42	23,25	0,01
3,75	6,36	3,75	3,94	23,25	6,40	23,50	0,01
4,00	6,46	4,00	4,23	23,50	6,38	23,75	0,01
4,25	6,53	4,25	4,42	23,75	6,36		
4,50	6,60	4,50	4,63	24,00	6,35		
4,75	6,66	4,75	4,82	24,25	6,34		
5,00	6,71	5,00	4,95	24,50	6,32		
5,25	6,75	5,25	5,07	24,75	6,31		
5,50	6,79	5,50	5,16	25,00	6,30		
5,75	6,82	5,75	5,21	25,25	6,29		
6,00	6,84	6,00	5,33	25,50	6,27		
6,25	6,86	6,25	5,38	25,75	6,26		
6,50	6,88	6,50	5,45	26,00	6,25		
6,75	6,90	6,75	5,51	26,25	6,23		
7,00	6,91	7,00	5,53	26,50	6,22		
7,25	6,92	7,25	5,45	26,75	6,21		
7,50	6,93	7,50	5,48	27,00	6,20		
7,75	6,94	7,75	5,52	27,25	6,19		
8,00	6,95	8,00	5,45	27,50	6,18		
8,25	6,95	8,25	5,45	27,75	6,17		
8,50	6,96	8,50	5,48	28,00	6,15		
8,75	6,96	8,75	5,53	28,25	6,14		
9,00	6,97	9,00	5,45	28,50	6,11		

---

9,25	6,97	9,25	5,45	28,75	6,01
9,50	6,97	9,50	5,51	29,00	5,81
9,75	6,98	9,75	5,53	29,25	5,58
10,00	6,98	10,00	5,47	29,50	5,26
10,25	6,98	10,25	5,47	29,75	4,91
10,50	6,98	10,50	5,47	30,00	4,50
10,75	6,98	10,75	5,47	30,25	4,05
11,00	6,98	11,00	5,47	30,50	3,59
11,25	6,98	11,25	5,47	30,75	3,13
11,50	6,98	11,50	5,47	31,00	2,69
11,75	6,98	11,75	5,47	31,25	2,17
12,00	6,99	12,00	5,47	31,50	1,64
12,25	6,99	12,25	5,47	31,75	1,18
12,50	6,99	12,50	5,45	32,00	0,83
12,75	6,99	12,75	5,48	32,25	0,59
13,00	6,99	13,00	5,52	32,50	0,40
13,25	6,99	13,25	5,44	32,75	0,27
13,50	6,99	13,50	5,47	33,00	0,18
13,75	6,99	13,75	5,47	33,25	0,12
14,00	6,99	14,00	5,47	33,50	0,09
14,25	6,99	14,25	5,47	33,75	0,07
14,50	6,99	14,50	5,47	34,00	0,05
14,75	6,99	14,75	5,47	34,25	0,03
15,00	6,99	15,00	5,53	34,50	0,03
15,00	6,97	15,25	5,44	34,75	0,02
15,25	6,93	15,50	5,34	35,00	0,02
15,50	6,90	15,75	5,19	35,25	0,01
15,75	6,88	16,00	5,04	35,50	0,01
16,00	6,86	16,25	4,88	35,75	0,01
16,25	6,85	16,50	4,71	36,00	0,01
16,50	6,83	16,75	4,55	36,25	0,01
16,75	6,80	17,00	4,38	36,50	0,01
17,00	6,78	17,25	4,17	36,75	0,01
17,25	6,77	17,50	3,88	37,00	0,01
17,50	6,75	17,75	3,47	37,25	0,01
17,75	6,74	18,00	3,00	37,50	0,01
18,00	6,72	18,25	2,55	37,75	0,01
18,25	6,70	18,50	2,12	38,00	0,01
18,50	6,69	18,75	1,76	38,25	0,01
18,75	6,67	19,00	1,46	38,50	0,01
19,00	6,65	19,25	1,19	38,75	0,01
19,25	6,63	19,50	0,97	39,00	0,01

---

2.5. Acompanhamento das concentrações de amônia, nitrito, nitrato e sulfato durante o ciclo de alimentação (24 horas).

Tabela 2.8.: Valores das concentrações de amônia, nitrito, nitrato e sulfato – Condição I.

Tabela 2.9.: Valores das concentrações de amônia, nitrito, nitrato e sulfato – Condição II.

Tempo	N-NH4	N-NO2	N-NO3	S-SO4
0	50,36	97,86	32,47	198,74
2	55,69	85,94	34,69	199,66
4	49,87	90,68	40,56	205,63
8	50,47	94,36	44,69	203,21
12	50,23	106,3	46,87	194,56
18	48,79	91,48	48,97	189,74
24	60,35	98,54	40,32	197,41

Tabela 2.10.: Valores das concentrações de amônia, nitrito, nitrato e sulfato – Condição III-2

Tempo	N-NH4	N-NO2	N-NO3	S-SO4
0	32,15	0,00	62,49	344,69
2	29,16	0,00	63,45	364,45
4	28,56	0,00	60,25	347,89
8	27,89	0,00	67,89	350,36
12	30,18	0,00	60,23	354,23
18	31,54	0,00	59,84	356,21
24	29,44	0,00	58,63	347,89

Tabela 2.11.: Valores das concentrações de amônia, nitrito, nitrato e sulfato – Condição IV.

Tempo	N-NH4	N-NO2	N-NO3	S-SO4
0	5,64	0,00	62,54	494,69
2	3,24	0,00	59,87	484,57
4	2,58	0,00	54,65	501,64
8	6,21	0,00	68,69	478,96
12	5,44	0,00	64,36	497,85
18	5,69	0,00	65,46	501,36
24	7,41	0,00	54,69	467,54

Tabela 2.13.: Valores das concentrações de oxigênio utilizadas para a determinação da velocidade de consumo de oxigênio durante o acompanhamento do ciclo de alimentação – Condição II.

O <sub>2</sub> (mg/L) em diferentes períodos (horas) do ciclo de alimentação									
Tempo (min)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0,00	0,17	0,15	0,15	0,21	0,15	0,16	0,17	0,16	0,16
0,17	0,17	0,11	0,14	0,17	0,15	0,15	0,14	0,15	0,16
0,33	0,13	0,08	0,11	0,14	0,12	0,12	0,11	0,12	0,16
0,50	0,12	0,07	0,07	0,13	0,11	0,08	0,09	0,08	0,15
0,67	0,11	0,06	0,06	0,10	0,08	0,07	0,06	0,07	0,12
0,83	0,09	0,04	0,05	0,09	0,06	0,06	0,05	0,06	0,09
1,00	0,08	0,04	0,04	0,07	0,05	0,05	0,04	0,05	0,07
1,17	0,07	0,03	0,04	0,06	0,04	0,04	0,04	0,04	0,06
1,33	0,06	0,03	0,03	0,05	0,03	0,03	0,03	0,03	0,05
1,50	0,05	0,03	0,03	0,05	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04
1,67	0,04	0,02	0,03	0,04	0,03	0,02	0,02	0,02	0,03
1,83	0,04	0,02	0,02	0,04	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03
2,00	0,04	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03

Continuação...

O <sub>2</sub> (mg/L) em diferentes períodos (horas) do ciclo de alimentação									
Tempo (min)	10	11	12	13	14	15	16	17	18
0,00	0,17	0,16	0,16	0,17	0,18	0,18	0,18	0,18	0,17
0,17	0,16	0,12	0,15	0,17	0,17	0,15	0,14	0,15	0,15
0,33	0,15	0,11	0,12	0,13	0,16	0,13	0,11	0,11	0,12
0,50	0,12	0,08	0,08	0,12	0,13	0,10	0,10	0,10	0,11
0,67	0,09	0,07	0,07	0,09	0,09	0,08	0,08	0,08	0,09
0,83	0,07	0,06	0,06	0,08	0,08	0,07	0,07	0,07	0,07
1,00	0,06	0,05	0,05	0,06	0,07	0,06	0,05	0,06	0,06
1,17	0,05	0,04	0,04	0,05	0,05	0,05	0,04	0,05	0,05
1,33	0,04	0,03	0,03	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
1,50	0,03	0,03	0,03	0,04	0,04	0,03	0,03	0,03	0,04
1,67	0,03	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
1,83	0,03	0,02	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
2,00	0,02	0,02	0,02	0,03	0,02	0,03	0,02	0,02	0,03

Continuação...

O <sub>2</sub> (mg/L) em diferentes períodos (horas) do ciclo de alimentação			
Tempo (min)	19	20	21
0,00	0,16	0,15	0,16
0,17	0,13	0,15	0,15
0,33	0,11	0,12	0,12
0,50	0,08	0,11	0,08
0,67	0,07	0,08	0,07
0,83	0,06	0,06	0,06
1,00	0,05	0,05	0,05
1,17	0,04	0,04	0,04
1,33	0,04	0,03	0,03
1,50	0,03	0,03	0,03
1,67	0,03	0,03	0,02
1,83	0,03	0,02	0,02
2,00	0,03	0,02	0,02

Tabela 2.14.: Valores das concentrações de oxigênio utilizadas para a determinação da velocidade de consumo de oxigênio durante o acompanhamento do ciclo de alimentação – Condição III-1.

O <sub>2</sub> (mg/L) em diferentes períodos (horas) do ciclo de alimentação									
Tempo (min)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0,00	1,37	1,89	1,20	1,79	1,22	1,89	1,83	2,20	2,16
0,25	1,23	1,83	1,17	1,79	1,05	1,83	1,71	1,77	1,79
0,50	1,08	1,71	0,95	1,46	0,87	1,71	1,52	1,43	1,46
0,75	0,96	1,52	0,77	1,17	0,15	1,56	1,32	1,17	1,17
1,00	0,87	1,32	0,62	0,95	0,11	1,39	1,14	0,95	0,95
1,25	0,78	1,14	0,51	0,76	0,10	1,23	0,99	0,77	0,76
1,50	0,69	0,99	0,42	0,60	0,08	1,08	0,86	0,62	0,60
1,75	0,62	0,86	0,36	0,48	0,06	0,96	0,74	0,51	0,48
2,00	0,54	0,74	0,29	0,40	0,05	0,87	0,63	0,42	0,40
2,25	0,47	0,63	0,23	0,33	0,04	0,78	0,54	0,36	0,33
2,50	0,41	0,54	0,20	0,27	0,03	0,69	0,48	0,29	0,27
2,75	0,37	0,48	0,16	0,21	0,03	0,62	0,41	0,23	0,21
3,00	0,34	0,41	0,14	0,18	0,02	0,54	0,37	0,20	0,18
3,25	0,30	0,37	0,12	0,14	0,02	0,47	0,33	0,16	0,14
3,50	0,26	0,33	0,10	0,12	0,02	0,41	0,27	0,14	0,12
3,75	0,23	0,27	0,08	0,10	0,02	0,37	0,26	0,12	0,10
4,00	0,21	0,26	0,06	0,08	0,02	0,34	0,22	0,10	0,08
4,25	0,19	0,22	0,05	0,06	0,02	0,30	0,21	0,08	0,06
4,50	0,17	0,21	0,04	0,05	0,02	0,26	0,19	0,06	0,05

Continuação...

O <sub>2</sub> (mg/L) em diferentes períodos (horas) do ciclo de alimentação									
Tempo (min)	10	11	12	13	14	15	16	17	18
0,00	1,83	2,10	2,65	2,06	1,56	2,03	1,77	2,39	1,39
0,25	1,71	2,03	2,61	1,79	1,39	2,02	1,43	2,16	1,23
0,50	1,56	2,02	2,20	1,46	1,23	1,93	1,17	1,79	1,08
0,75	1,39	1,93	1,77	1,17	1,08	1,80	0,95	1,46	0,96
1,00	1,23	1,80	1,43	0,95	0,96	1,88	0,77	1,17	0,87
1,25	1,08	1,88	1,17	0,76	0,87	1,89	0,62	0,95	0,78
1,50	0,96	1,89	0,95	0,60	0,78	1,83	0,51	0,76	0,69
1,75	0,87	1,83	0,77	0,48	0,69	1,71	0,42	0,60	0,62
2,00	0,78	1,71	0,62	0,40	0,62	1,52	0,36	0,48	0,54
2,25	0,69	1,52	0,51	0,33	0,54	1,32	0,29	0,40	0,47
2,50	0,62	1,32	0,42	0,27	0,47	1,14	0,23	0,33	0,41
2,75	0,54	1,14	0,36	0,21	0,41	0,99	0,20	0,27	0,37
3,00	0,47	0,99	0,29	0,18	0,37	0,86	0,16	0,21	0,34
3,25	0,41	0,86	0,23	0,14	0,34	0,74	0,14	0,18	0,30
3,50	0,37	0,74	0,20	0,12	0,30	0,63	0,12	0,14	0,26
3,75	0,34	0,63	0,16	0,10	0,26	0,54	0,10	0,12	0,23
4,00	0,30	0,54	0,14	0,08	0,23	0,48	0,08	0,10	0,21
4,25	0,26	0,48	0,12	0,06	0,21	0,41	0,06	0,08	0,19
4,50	0,23	0,41	0,10	0,05	0,19	0,37	0,05	0,06	0,17

Tabela 2.15.: Valores das concentrações de oxigênio utilizadas para a determinação da velocidade de consumo de oxigênio durante o acompanhamento do ciclo de alimentação – Condição III-2.

Tempo (min)	O <sub>2</sub> (mg/L) em diferentes períodos (horas) do ciclo de alimentação								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0,00	4,42	4,95	5,00	5,27	5,35	5,52	6,06	6,10	6,23
0,25	4,42	4,95	4,95	5,27	5,30	5,39	5,97	6,04	6,19
0,50	4,32	4,86	4,85	5,18	5,22	5,20	5,84	5,92	6,04
0,75	4,12	4,73	4,76	5,09	5,07	5,10	5,74	5,83	5,98
1,00	3,90	4,61	4,53	4,91	4,91	4,95	5,61	5,72	5,90
1,25	3,65	4,34	4,18	4,77	4,80	4,70	5,46	5,57	5,79
1,50	3,37	3,97	3,93	4,57	4,61	4,45	5,37	5,45	5,69
1,75	3,08	3,76	3,70	4,38	4,37	4,20	5,22	5,31	5,61
2,00	2,75	3,57	3,34	4,10	4,06	3,98	5,09	5,20	5,49
2,25	2,46	3,36	3,00	3,66	3,72	3,83	4,95	5,03	5,37
2,50	2,13	2,98	2,83	3,44	3,48	3,58	4,74	4,94	5,30
2,75	1,79	2,67	2,70	3,09	3,21	3,36	4,60	4,80	5,20
3,00	1,52	2,36	2,52	2,86	3,00	3,01	4,39	4,69	5,08
3,25	1,23	2,14	2,26	2,61	2,61	2,67	4,13	4,62	4,99
3,50	0,98	1,93	1,96	2,43	2,32	2,38	3,94	4,47	4,92
3,75	0,74	1,50	1,47	2,11	2,09	2,12	3,84	4,33	4,78
4,00	0,58	1,22	1,19	1,95	1,78	1,87	3,62	4,23	4,60
4,25	0,43	1,12	1,16	1,57	1,66	1,70	3,55	4,17	4,49
4,50	0,31	0,92	1,06	1,31	1,52	1,45	3,29	4,05	4,41
4,75	0,24	0,72	0,85	1,13	1,37	1,31	3,14	3,91	4,36
5,00	0,20	0,62	0,81	0,92	1,15	1,20	3,02	3,87	4,26

Continuação...

Tempo (min)	O <sub>2</sub> (mg/L) em diferentes períodos (horas) do ciclo de alimentação								
	10	11	12	13	14	15	16	17	18
0,00	6,12	6,26	5,06	5,15	5,13	4,52	4,52	4,52	
0,25	6,02	6,22	4,96	4,98	4,50	4,36	4,36	4,36	
0,50	5,98	6,18	4,85	4,80	4,52	4,16	4,16	4,16	
0,75	5,90	6,14	4,73	4,61	4,56	3,94	3,94	3,94	
1,00	5,85	6,10	4,62	4,43	4,56	3,72	3,72	3,72	
1,25	5,78	6,06	4,51	4,24	4,57	3,49	3,49	3,49	
1,50	5,71	6,02	4,40	4,05	4,59	3,26	3,26	3,26	
1,75	5,65	5,98	4,29	3,85	4,61	3,04	3,04	3,04	
2,00	5,55	5,94	4,17	3,65	4,62	2,81	2,81	2,81	
2,25	5,51	5,88	4,07	3,45	4,64	2,57	2,57	2,57	
2,50	5,43	5,84	3,99	3,28	4,67	2,34	2,34	2,34	
2,75	5,39	5,80	3,86	3,09	4,68	2,09	2,09	2,09	
3,00	5,34	5,76	3,76	2,91	4,69	1,84	1,84	1,84	
3,25	5,25	5,72	3,66	2,73	4,70	1,62	1,62	1,62	
3,50	5,20	5,68	3,55	2,56	4,72	1,40	1,40	1,40	
3,75	5,13	5,62	3,45	2,38	4,73	1,20	1,20	1,20	
4,00	5,06	5,58	3,35	2,22	4,74	1,01	1,01	1,01	
4,25	5,01	5,54	3,24	2,05	4,76	0,83	0,83	0,83	
4,50	4,94	5,50	3,14	1,86	4,77	0,66	0,66	0,66	
4,75	4,86	5,46	3,03	1,70	4,78	0,52	0,52	0,52	
5,00	4,81	5,39	2,93	1,57	4,78	0,43	0,43	0,43	

Tabela 2.16.: Valores das concentrações de oxigênio utilizadas para a determinação da velocidade de consumo de oxigênio durante o acompanhamento do ciclo de alimentação – Condição IV.

Tempo (min)	O <sub>2</sub> (mg/L) em diferentes períodos (horas) do ciclo de alimentação								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0,00	4,56	5,15	4,95	5,19	5,19	5,22	4,76	5,12	5,47
0,25	4,25	5,00	4,80	5,06	5,02	5,08	4,53	5,02	5,32
0,50	3,93	4,75	4,56	4,89	4,79	4,92	4,30	4,90	5,15
0,75	3,62	4,43	4,27	4,64	4,56	4,71	4,05	4,75	4,96
1,00	3,30	4,12	3,96	4,38	4,33	4,49	3,77	4,61	4,75
1,25	2,97	3,78	3,64	4,04	4,07	4,22	3,52	4,42	4,55
1,50	2,67	3,42	3,34	3,73	3,78	3,98	3,25	4,24	4,31
1,75	2,32	3,07	3,03	3,44	3,55	3,72	3,00	4,06	4,08
2,00	2,02	2,70	2,72	3,12	3,25	3,41	2,74	3,87	3,84
2,25	1,73	2,38	2,43	2,82	3,00	3,15	2,49	3,67	3,60
2,50	1,46	2,02	2,13	2,52	2,75	2,90	2,20	3,46	3,35
2,75	1,17	1,69	1,85	2,23	2,49	2,64	1,95	3,27	3,11
3,00	0,90	1,40	1,57	1,94	2,25	2,36	1,73	3,07	2,87
3,25	0,68	1,09	1,33	1,66	2,02	2,11	1,49	2,87	2,65
3,50	0,49	0,82	1,11	1,36	1,80	1,88	1,26	2,68	2,45
3,75	0,36	0,60	0,87	1,10	1,57	1,64	1,04	2,48	2,25
4,00	0,26	0,40	0,66	0,84	1,35	1,41	0,81	2,27	2,03
4,25	0,19	0,27	0,47	0,63	1,12	1,20	0,63	2,09	1,82
4,50	0,16	0,18	0,34	0,44	0,93	1,00	0,46	1,90	1,60
4,75	0,14	0,14	0,25	0,32	0,74	0,79	0,34	1,75	1,38
5,00	0,11	0,11	0,19	0,23	0,56	0,64	0,24	1,56	1,16

Continuação...

Tempo (min)	O <sub>2</sub> (mg/L) em diferentes períodos (horas) do ciclo de alimentação								
	10	11	12	13	14	15	16	17	18
0,00	5,25	5,52	5,17	5,24	5,14	4,25	4,62	5,17	
0,25	5,12	5,48	5,07	5,06	5,07	4,19	4,50	5,05	
0,50	4,97	5,35	4,91	4,88	4,97	4,10	4,32	4,86	
0,75	4,79	5,19	4,69	4,65	4,82	4,00	4,18	4,67	
1,00	4,61	5,01	4,49	4,43	4,66	3,83	3,97	4,48	
1,25	4,43	4,81	4,23	4,19	4,47	3,68	3,80	4,24	
1,50	4,23	4,61	4,00	3,95	4,30	3,49	3,59	3,98	
1,75	4,03	4,43	3,78	3,72	4,07	3,31	3,39	3,74	
2,00	3,85	4,21	3,53	3,46	3,86	3,11	3,16	3,51	
2,25	3,65	4,00	3,28	3,19	3,65	2,91	2,94	3,29	
2,50	3,45	3,79	3,03	2,93	3,45	2,70	2,73	3,07	
2,75	3,27	3,56	2,78	2,66	3,24	2,49	2,52	2,82	
3,00	3,07	3,34	2,54	2,43	3,02	2,26	2,31	2,59	
3,25	2,88	3,13	2,31	2,19	2,80	2,05	2,11	2,36	
3,50	2,68	2,95	2,08	1,96	2,59	1,84	1,90	2,15	
3,75	2,51	2,77	1,86	1,73	2,39	1,61	1,71	1,91	
4,00	2,33	2,58	1,64	1,51	2,19	1,40	1,52	1,70	
4,25	2,16	2,41	1,42	1,28	1,99	1,20	1,32	1,49	
4,50	1,99	2,11	1,20	1,08	1,79	1,01	1,14	1,29	
4,75	1,81	1,79	1,01	0,88	1,60	0,83	0,98	1,08	
5,00	1,64	1,29	0,83	0,69	1,41	0,69	0,82	0,91	



Tabela 2.17.: Valores das velocidades de consumo de oxigênio durante o acompanhamento do ciclo de alimentação e os respectivos valores da quantidade de oxigênio consumido ( $T_{O_2}^t$ ) – Condição I.

Tempo (h)	$q_{O_2X}$ (mgO <sub>2</sub> /L.min)	$q_{O_2X}$ (mgO <sub>2</sub> /L.h)	$T_{O_2}^t$ (mgO <sub>2</sub> /h)
0,0	0,029	1,723	1,723
1,7	0,480	28,800	30,860
4,1	0,559	33,549	39,327
7,3	0,434	26,021	33,935
7,4	0,313	18,779	24,569
9,7	1,069	64,152	90,080
11,7	0,689	41,326	61,472
17,0	1,147	68,832	117,588
22,0	0,482	28,901	55,393
24,0	0,578	34,676	69,352

Tabela 2.18.: Valores das velocidades de consumo de oxigênio durante o acompanhamento do ciclo de alimentação e os respectivos valores da quantidade de oxigênio consumido ( $T_{O_2}^t$ ) – Condição II.

Tempo (h)	$q_{O_2X}$ (mgO <sub>2</sub> /L.min)	$q_{O_2X}$ (mgO <sub>2</sub> /L.h)	$T_{O_2}^t$ (mgO <sub>2</sub> /h)
1	0,094	5,628	5,863
2	0,092	5,502	5,961
3	0,099	5,958	6,703
4	0,122	7,344	
5	0,106	6,348	7,671
6	0,110	6,576	8,220
7	0,113	6,762	8,734
8	0,110	6,582	8,776
9	0,103	6,204	8,531
10	0,115	6,894	9,767
11	0,101	6,042	8,811
12	0,112	6,708	10,062
13	0,112	6,720	10,360
14	0,120	7,194	11,391
15	0,113	6,780	11,018
16	0,107	6,432	10,720
17	0,108	6,480	11,070
18	0,105	6,306	11,036
19	0,100	6,018	10,782
20	0,106	6,342	11,627
21	0,110	6,576	12,330

Tabela 2.19.: Valores das velocidades de consumo de oxigênio durante o acompanhamento do ciclo de alimentação e os respectivos valores da quantidade de oxigênio consumido ( $T_{O_2}^t$ ) – Condição III-1.

Tempo (h)	$q_{O_2X}$ (mgO <sub>2</sub> /L.min)	$q_{O_2X}$ (mgO <sub>2</sub> /Lh)	$T_{O_2}^t$ (mgO <sub>2</sub> /h)
1	0,353	21,156	22,038
2	0,674	40,467	43,839
3	0,597	35,819	40,296
4	0,786	47,143	55,000
5	0,641	38,456	46,468
6	0,675	40,521	50,651
7	0,730	43,782	56,552
8	0,742	44,536	59,381
9	0,765	45,876	63,080
10	0,541	32,486	46,022
11	0,669	40,123	58,513
12	0,692	41,526	62,289
13	0,681	40,889	63,037
14	0,664	39,842	63,083
15	0,554	33,258	54,044
16	0,665	39,876	66,460
17	0,724	43,445	74,219
18	0,706	42,336	74,088

Tabela 2.20.: Valores das velocidades de consumo de oxigênio durante o acompanhamento do ciclo de alimentação e os respectivos valores da quantidade de oxigênio consumido ( $T_{O_2}^t$ ) – Condição III-2.

Tempo (h)	$q_{O_2X}$ (mgO <sub>2</sub> /L.min)	$q_{O_2X}$ (mgO <sub>2</sub> /L.h)	$T_{O_2}^t$ (mgO <sub>2</sub> /h)
1	1,174	70,437	73,372
2	1,342	80,497	87,205
3	1,166	69,954	78,698
4	1,174	70,461	82,205
5	1,005	60,309	72,873
6	1,004	60,213	76,456
7	1,019	61,165	70,444
8	0,909	54,537	72,716
9	0,742	44,490	61,174
10	0,872	52,315	74,113
11	0,936	56,155	81,893
12	0,930	55,780	83,670
13	0,817	48,992	75,529
14	0,801	48,075	76,119

15	0,830	49,803	80,930
16	0,890	53,389	88,982

Tabela 2.21.: Valores das velocidades de consumo de oxigênio durante o acompanhamento do ciclo de alimentação e os respectivos valores da quantidade de oxigênio consumido ( $T_{O_2}^t$ ) – Condição IV.

Tempo (h)	$q_{O_2X}$ (mgO <sub>2</sub> /L.min)	$q_{O_2X}$ (mgO <sub>2</sub> /L.h)	$T_{O_2}^t$ (mgO <sub>2</sub> /h)
1	1,157	69,437	72,330
2	1,392	83,497	90,455
3	1,176	70,540	79,358
4	1,210	72,610	84,712
5	1,005	60,309	72,873
6	1,004	60,213	75,266
7	1,053	63,165	81,588
8	0,942	56,537	75,383
9	0,775	46,490	63,924
10	0,872	52,315	74,113
11	0,936	56,155	81,893
12	0,930	55,780	83,670
13	0,817	48,992	75,529
14	0,873	52,360	82,903
15	0,830	49,803	80,930
16	0,890	53,389	88,982

2.6. Atividade desnitrificante autotrófica da biomassa presente no reator SBR durante a sua operação nas diferentes condições experimentais.

Tabela 2.22.: Valores das concentrações de nitrito e sulfato determinadas durante o ensaio cinético via nitrito

Condição I			Condição II		
Tempo (h)	S-SO <sub>4</sub> (mg/L)	N-NO <sub>2</sub> (mg/L)	Tempo (h)	S-SO <sub>4</sub> (mg/L)	N-NO <sub>2</sub> (mg/L)
0,0	60,0	230,0	0,0	137,4	296,6
2,0		184,0	0,0	102,7	294,4
4,0		187,3	4,0	113,6	263,0
8,0	59,2	124,5	4,0	128,5	261,5
12,0	66,8	147,9	8,0	154,2	257,9
16,0	55,9		8,0	168,4	266,7
25,0	119,2		12,0	172,7	235,2
36,0		116,4	12,0	193,2	238,9
72,0	259,9	64,7	24,0	254,0	241,8
96,0		52,5	24,0	260,6	241,1
120,0		53,3	48,0	325,0	200,9
144,0	235,0	0,0	48,0	329,3	203,8

171,0	0,0	72,0	350,8	128,6
		72,0	344,1	137,4
		96,0	365,3	98,7
		96,0	369,3	99,4
		120,0	379,8	93,6
		120,0	375,9	95,1

Continuação...

Condição III-2			Condição IV		
Tempo (h)	S-SO <sub>4</sub> (mg/L)	N-NO <sub>2</sub> (mg/L)	Tempo (h)	S-SO <sub>4</sub> (mg/L)	N-NO <sub>2</sub> (mg/L)
0,0	0,0	285,6	0,0	310,3	0,0
5,0	18,8	264,5	5,0	288,3	42,6
10,0	42,4	296,6	10,0	266,3	85,1
24,0	84,8	239,6	24,0	204,8	204,3
36,0	224,2	197,3	36,0	152,0	306,5
48,0	306,0	168,8	48,0	99,3	326,5
72,0	355,8	149,1	72,0	85,4	347,9
96,0	365,6	136,6	96,0	74,6	336,5
120,0	368,8	95,7	120,0	75,7	342,6

Tabela 2.24.: Valores das concentrações de nitrato e sulfato determinadas durante o ensaio cinético via nitrato.

Condição I			Condição II		
Tempo (h)	S-SO <sub>4</sub> (mg/L)	N-NO <sub>3</sub> (mg/L)	Tempo (h)	S-SO <sub>4</sub> (mg/L)	N-NO <sub>3</sub> (mg/L)
0,0	0,0	300,0	0,0	128,5	306,2
2,0	47,6	284,0	0,0	137,4	342,9
4,0	51,2	236,0	4,0	144,7	261,3
8,0	57,8	274,4	4,0	148,0	285,8
12,0	92,6	254,0	8,0	153,2	237,5
16,0	53,5		8,0	153,9	261,3
25,0	79,8	218,5	12,0	187,3	210,4
36,0	114,3		12,0	183,0	165,6
72,0	81,8	156,0	24,0	285,7	147,2
96,0	126,9		24,0	297,9	161,5
120,0	351,8	103,8	48,0	351,5	165,6
144,0	369,3	174,0	48,0	365,0	149,3
171,0	562,1	122,4	72,0	362,6	173,7
			72,0	356,0	159,4
			72,0	367,9	149,3
			96,0	369,3	151,3
			96,0	373,2	169,6
			96,0	356,0	139,1
			120	377,1855	128,88
			120	372,5603	116,6526
			120	368,5959	122,7663

Continuação...

Condição III-2			Condição IV		
Tempo (h)	S-SO <sub>4</sub> (mg/L)	N-NO <sub>3</sub> (mg/L)	Tempo (h)	S-SO <sub>4</sub> (mg/L)	N-NO <sub>3</sub> (mg/L)
0,0	296,4	0,0	0,0	310,3	0,0
5,0	292,8	2,4	5,0	284,8	40,5
10,0	292,1	36,7	10,0	259,3	66,0
24,0	249,3	186,7	24,0	188,0	125,3
36,0	203,7	233,2	36,0	126,9	184,6
48,0	163,0	207,4	48,0	65,7	249,7
72,0	128,7	361,5	72,0	56,5	334,7
96,0	100,9	384,3	96,0	40,4	349,5
120,0	106,6	417,7	120,0	43,5	327,4