Renata Medici Frayne Cuba

# AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE USO DO METANO COMO DOADOR DE ELÉTRONS PARA A DESNITRIFICAÇÃO EM REATOR ANÓXICO HORIZONTAL DE LEITO FIXO.

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Engenharia Civil – área: Hidráulica e Saneamento

Orientador: Prof. Tit. Eugenio Foresti

SERVIÇO DE BIBLIOTECA EESC-USP DE S. CARLOS

DEDALUS - Acervo - EESC
31100052148

São Carlos

2005

Class. TESE-EESC
Cutt. C733
Tombo T113/05
Sysno 1445443

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

C962a

Cuba, Renata Médici Frayne
Avaliação do potencial de uso do metano como doador de elétrons para a desnitrificação em reator anóxico horizontal de leito fixo / Renata Médici Frayne Cuba. -- São Carlos, 2005.

Dissertação (Mestrado) -- Escola de Engenharia de São Carlos-Universidade de São Paulo, 2005.
Área: Hidráulica e Saneamento
Orientador: Prof. Tit. Eugenio Foresti.

1. Desnitrificação. 2. Metano. 3. Remoção de nitrogênio. I. Título.

**FOLHA DE JULGAMENTO**

Candidato: Bacharel **RENATA MÉDICI FRAYNE CUBA**

Dissertação defendida e julgada em 24-03-2005 perante a Comissão Julgadora:

APROVADA

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

APROVADA

Dr. **FÁBIO ALEXANDRE CHINALIA**
(Pós-Doutorando/CNPq)

APROVADA

Prof. Dr. **JOSÉ ROBERTO GUIMARÃES**
(Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP)

Profa. Titular **MARIA DO CARMO CALIJURI**
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em
Engenharia (Hidráulica e Saneamento) e
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

*Às minhas filhas, Carolina e Ana Laura, por terem compartilhado parte da infância para a realização deste trabalho e ao meu esposo, Francisco, pelo amor, incentivo e, principalmente, companheirismo.*

## AGRADECIMENTOS

Entre todos os capítulos deste trabalho o de agradecimentos, provavelmente, foi o mais difícil de escrever, pois, são poucas as palavras capazes de refletir a gratidão que sinto pelas pessoas com quem tive o privilégio de dividir meu dia-dia durante estes dois últimos anos.

Por isso, começo agradecendo ao Prof. Eugenio Foresti por ter confiado em mim quando me aceitou como sua orientada.

Confesso que a princípio pensei que o peso desta confiança seria grande, pois eu tinha como orientador um "gigante" dentro da área de saneamento e a última coisa que eu queria fazer era decepcioná-lo. No entanto, seu amplo conhecimento junto à sua generosidade e carinho em transmiti-lo, a compreensão com os erros alheios e a disposição e amabilidade em ajudar a resolvê-los, tornou a execução deste trabalho em uma valiosa e gratificante oportunidade de aprendizado.

Agradeço também ao Prof. Marcelo Zaiat que, apesar das diversas obrigações com o departamento e com seus orientados legítimos, ainda encontra tempo, disposição e bom humor para escutar dúvidas e problemas dos orientados "adotados", contribuindo, de maneira singular, para o êxito de todo aquele que o procura.

Ao Prof. Campos pelo incentivo e apoio prestados, até mesmo através de pequenos detalhes como uma mensagem de boa sorte, quando o mestrado ainda era uma possibilidade e não um fato.

Minha eterna gratidão à querida Beth Moraes, pelo apoio e carinho concedidos durante uma etapa muito difícil da minha vida. Sua generosidade e capacidade para ajudar ao próximo mostraram-me o quanto ainda devo melhorar como ser humano.

Aos professores José Aberto e Maria Bernadete pela valiosa contribuição dada ao trabalho através das observações e sugestões durante o exame de qualificação.

À Dra. Eloísa que durante as análises de microscopia óptica e os ensaios de microbiologia demonstrou ser uma profissional dedicada, responsável e capaz, conquistando meu respeito e admiração.

À Dra. Isabel Sakamoto pela realização das análises de DGGE, que se tornaram importantes ferramentas para a compreensão dos resultados.

À amiga Tininha pelas análises de microscopia óptica e a boa vontade e paciência em procurar respostas para minhas dúvidas sobre microbiologia.

Às amigas Madalena, Larissa e Cristina pela amizade e solidariedade prestadas quando precisei me afastar do laboratório durante uma parte da etapa experimental.

À amiga Valquíria por ter me recebido com tanto carinho e paciência no LPB

Aos colegas Betão, Ari, Márcia Damianovic, Dalva, Fábio A. Chinalia, Arnaldo, Fernandão e Rogers pelos conselhos e observações oportunas que contribuíram para a compreensão e execução do meu trabalho.

Aos colegas de laboratório Bruna, Ana Flávia, Júlia, Flavinha, Andréa, Katt, Luiz Hamilton, Kátia, Mércia, Kariana, Luana, Thiago e Edu pelos agradáveis momentos de descontração compartilhados durante o dia-dia do LPB.

Às técnicas Janja e Ana Paula Paim pela dedicação e paciência nas análises físico-quimicas.

Aos funcionários Sá, Pavi, André, Rose, Paulo, Júlio e D. Terezinha que tornaram meu trabalho mais próspero devido à seriedade e competência com que desempenham suas funções.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho.

Ao CNPQ pela bolsa concedida

*"Na realidade há duas coisas que são diferentes: saber e crer que se sabe. A ciência consiste em saber; em crer que se sabe está a ignorância."*

Hipócrates

## RESUMO

CUBA, R. M. F. (2005) Avaliação do potencial de uso do metano como doador de elétrons para a desnitrificação em reator anóxico horizontal de leito fixo. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005

A presente dissertação apresenta e discute os resultados do trabalho experimental cujo objetivo foi avaliar a remoção de nitrogênio na forma de nitrato ($N\text{-}NO_3^-$) pelo processo de desnitrificação biológica em Reator Anóxico Horizontal de Leito Fixo (RAHLF) contendo matrizes de espuma de poliuretano, em escala de laboratório, utilizando gás metano como fonte de carbono e único doador de elétrons adicionado ao sistema. Para concentrações iniciais de $N\text{-}NO_3^-$ de 20 $mg.l^{-1}$ e 40 $mg.l^{-1}$ no substrato sintético, foi possível obter diminuição das concentrações iniciais em 85% e 50%. No entanto, os altos níveis de redução de $N\text{-}NO_3^-$, obtidos sob condições limitantes de metano, deram suporte à hipótese de que parte da remoção do $N\text{-}NO_3^-$ foi realizada mediante a utilização de compostos reduzidos de enxofre ou nitrogênio, tais como: $S^o$, $HS^-$ ou $NH_4^+$, provavelmente formados sob condições anóxicas, simultaneamente com o processo de desnitrificação. Foi possível verificar, também, a influência da relação carbono ($mg.l^{-1}$ $CH_4$) / nitrogênio ($mg.l^{-1}$ $N\text{-}NO_3^-$) no estabelecimento das rotas metabólicas de desnitrificação predominantes, quais sejam, a redução dissimilativa do nitrogênio à amônia (RDNA) ou a desnitrificação. Adicionalmente, foram realizados ensaios em reatores tipo batelada, com o objetivo de se medir o consumo de metano. Porém, os resultados não foram satisfatórios, provavelmente em razão da diversidade microbiana presente no inóculo. Foram realizadas análises de microscopia óptica e de fluorescência, assim como de DGGE, para avaliar a diversidade e as alterações nas populações microbianas ao longo do RAHLF e do tempo de experimento. Os diferentes sistemas utilizados apresentaram limitações relacionadas à baixa solubilidade do gás metano no meio líquido, à resistência à transferência de massa da fase gasosa para a líquida e desta última para a biomassa aderida à espuma.

Palavras-chave: desnitrificação, metano, remoção de nitrogênio

## ABSTRACT

CUBA, R. M. F. (2005) Potential of methane utilization as electron donor for denitrification in horizontal flow fixed bed anoxic reactor. M.Sc. Dissertation – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005

This study presents and discusses experimental work results conducted with the purpose of evaluating nitrate - nitrogen ($NO_3^-$-N) removal by biological denitrification process in a lab scale horizontal flow fixed bed anoxic reactor (RAHLF), using methane gas as sole carbon source and electron donor. Support media for microorganisms were polyurethane foam matrixes. For initial $NO_3^-$-N concentrations of 20 mg.$l^{-1}$ and 40 mg.$l^{-1}$ present in synthetic substrate, it was possible to obtain 85% and 50% removal respectively. These high reduction rates, obtained under limiting conditions of methane, sustained the idea of part of the of $NO_3^-$-N removal being accomplished by reductive sulfur or nitrogen species utilization, such as: $S^o$, $HS^-$ or $NH_4^+$, probably formed under anoxic conditions simultaneously to denitrification process. It was possible to verify also carbon (mg.$l^{-1}$ $CH_4$) / nitrogen (mg.$l^{-1}$ $NO_3^-$-N) ratio effect in denitrification metabolic paths establishment, i.e. dissimilative reduction of nitrogen to ammonia or denitrification itself. In addition, batch tests where conducted with methane consumption measuring purpose. Yet, results where not satisfactory probably due to great microbial diversity present in inoculum. Optical microscopy and fluorescence exams where developed, as well as, DGGE, in order to evaluate diversity and alterations in bacterial populations as a function of reactor's length and time. Different systems used in experimental work presented limitations due to low methane gas solubility in bulk liquid and mass transfer resistance from gas to liquid phase and from this to fixed biomass.

Keywords: denitrification, methane, nitrogen removal

# LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fatores inibitórios para as rotas assimilativa e dissimilativa do nitrato. ..... 8

Figura 2. Regiões de concentrações aproximadas de $O_2$ que inibiriam a síntese enzimática e sua atividade para cada etapa do processo de desnitrificação.Nir – Nitrito redutase e Nar – Nitrato redutase ..... 15

Figura 3. Esquema do equipamento experimental. (1) Recipiente com substrato nitrificado, (2) Bomba de ar para recirculação do gás do *head space*, (3) Balões de gás para reserva de metano, (4) Pedra porosa (5) Bomba peristáltica (6) RAHLF, (7) Pontos de amostragem de líquido e biomassa, (8) Pontos de amostragem de gás, (9) Selo Hídrico. ..... 20

Figura 4. Sistema utilizado na parte experimental: (a) Reator Anóxico Horizontal de Leito Fixo (RAHLF), (b) recipiente para armazenamento do substrato sintético nitrificado. ..... 21

Figura 5. Foto do material suporte utilizado para a imobilização da biomassa ..... 22

Figura 6. Esquema do sistema em batelada utilizado para medir metano consumido.(1) Reator anóxico, volume total 10,4 l, (2) Bomba de ar para recirculação do gás do *head space*, (3) Septo para amostragem de gás, (4) Pedra porosa (5) Espumas retiradas do RAHLF (6) Lodo desnitrificante, (7) Mangueira para amostragem de líquido. ..... 29

Figura 7. Foto do reator operado em sistema de batelada utilizado para medir o consumo de metano ..... 30

Figura 8. Esquema da metodologia utilizada. $M_1$, $M_2$, $M_3$ = massas de sólidos voláteis aderidos, sendo $M_1 > M_2 > M_3$ ..... 33

Figura 9. Foto dos reatores utilizados para medir o consumo de metano. ..... 33

Figura 10. (a) Esquema da coluna para readaptação do inóculo desnitrificante. (1) coluna, (2) bomba de ar para recirculação do metano, (3) Balões de gás contendo metano, (4) válvula agulha, (5) mangueira de silicone; (b) foto da coluna ..... 34

Figura 11. Concentração de $N\text{-}NO_3^-$ ($mg.l^{-1}$) no afluente e efluente do reator em diferentes TDH. ..... 36

Figura 12. Metano ao longo do reator e em diferentes TDH. ..... 37

Figura 13. Concentração de $N\text{-}NH_4^+$ ($mg.l^{-1}$) no efluente do reator em diferentes TDH. ..... 37

Figura 14. Concentração de $N\text{-}NO_2^-$ ($mg.l^{-1}$) no efluente do reator em diferentes TDH. ..... 38

Figura 15. Perfil espacial da concentração de $N\text{-}NO_3^-$ ($mg.l^{-1}$) após cinqüenta dias de operação e TDH de 12 horas. L/D = localização dos pontos de amostragem ao longo do reator ..... 39

Figura 16. Perfil espacial da concentração de $N\text{-}NO_2^-$ ($mg.l^{-1}$) após cinqüenta dias de operação e TDH de 12 horas. L/D = localização dos pontos de amostragem ao longo do reator ..... 39

Figura 17. Perfil espacial da concentração de $N\text{-}NH_4^+$ ($mg.l^{-1}$) após cinqüenta dias de operação e TDH de 12 horas. L/D = localização dos pontos de amostragem ao longo do reator ..... 40

Figura 18.- Resultados comparativos entre os valores acumulados de $N\text{-}NO_3^-$ ($mg.l^{-1}$) que foi reduzido ao longo do reator e a variação da concentração de $N\text{-}NH_4^+$($mg.l^{-1}$) . 40

Figura 19. Presença de microrganismos fotoanoxigênicos. Amostra retirada do ponto de amostragem 3 do reator, após três meses de operação. Os pequenos pontos amarelados dentro da célula podem ser depósitos de enxofre. ..... 43

Figura 20. Variação de sólidos aderidos à espuma ao longo de reator, na etapa final da parte experimental. Na Figura: SAT/g esp. = sólidos aderidos totais/g de espuma; SAV/g esp. = sólidos aderidos voláteis/g de espuma; SAF/g esp. = sólidos aderidos fixos/g de espuma..... 43

Figura 21. Resultados comparativos entre os valores acumulados de $N\text{-}NO_3^-$ ($mg.l^{-1}$) que foi reduzido ao longo do reator e a variação da concentração de $N\text{-}NH_4^+$ ($mg.l^{-1}$)..... 45

Figura 22. Comparação entre a variação da concentração de $N\text{-}NH_4^+$ ($mg.l^{-1}$) ao longo do reator durante cada fase. Fase 1 – 20mg.$l^{-1}$ de $N\text{-}NO_3^-$; Fase 2 – 40mg.$l^{-1}$ de $N\text{-}NO_3^-$ ..... 46

Figura 23. Comparação entre as concentrações de $N\text{-}NO_3^-$ ($mg.l^{-1}$) durante as diferentes fases de operação. L/D = localização dos pontos de amostragem ao longo do reator .... 47

Figura 24. Concentração de $N\text{-}NO_3^-$ ($mg.l^{-1}$) na presença e ausência da pedra porosa ao longo do reator. L/D = localização dos pontos de amostragem ao longo do reator ..... 48

Figura 25. Resultados da concentração de $N\text{-}NO_3^-$ ($mg.l^{-1}$) no afluente e efluente do reator nos dias em que o fornecimento de metano foi prejudicado. ..... 49

Figura 26. Principais morfologias presentes ao longo RAHLF após 1 mês de operação. Os números diante de cada letra representam os pontos de amostragem situados ao longo do RAHLF: (1a) bacilos, (1b) *methanosarcina,* (1c) filamento, (2a) bacilos agregados, (2b) filamentos, (2c) *methanosarcina,* (3a) agregados de bacilos, (3b) filamento, (3c) organismo fotoanoxigênico, (4a) agregado de bacilos, (4b) agregado de cocos, (4c) filamento. ..... 51

Figura 27. Principais morfologias presentes ao longo do RAHLF após seis meses de operação. Os números diante de cada letra representam os diferentes pontos de amostragem alocados ao longo do reator. (1a) bacilos finos, (1b) bacilos em cadeia, (2a) filamento, (2b) agrupamento de células. ..... 52

Figura 28. Variação da concentração de $N\text{-}NO_3^-$ ($mg.l^{-1}$) durante o perfil temporal do sistema operado em batelada ..... 55

Figura 29. Variação da concentração de $N\text{-}NO_2^-$ ($mg.l^{-1}$) durante o perfil temporal do sistema operado em batelada ..... 55

Figura 30. Variação da concentração de $N\text{-}NH_4^+$ ($mg.l^{-1}$) durante o perfil temporal do sistema operado em batelada ..... 56

Figura 31. Variação da concentração de metano durante o perfil temporal realizado no sistema operado em batelada ..... 56

Figura 32. Variação do volume de nitrogênio durante o perfil temporal ..... 57

Figura 33. Fotografia de microrganismos fototróficos anoxigênicos presentes no reator de ensaio. ..... 58

Figura 34. Resultados obtidos para as concentrações de $N\text{-}NO_3^-$ ($mg.l^{-1}$) no efluente da coluna durante o período de adaptação e concentração inicial de $N\text{-}NO_3^-$ de 40 $mg.l^{-1}$. 58

Figura 35. Variação na concentração de $N\text{-}NO_3^-$ ($mg.l^{-1}$) para aproximadamente 16 $g.l^{-1}$ de SVA. R – reatores, C – controles. ..... 59

Figura 36. Variação na concentração de $N\text{-}NO_3^-$ ($mg.l^{-1}$) para aproximadamente 10 $g.l^{-1}$ de SVA. R – reatores, C – controles. ..... 60

Figura 37. Variação na concentração de $N\text{-}NO_3^-$ $(mg.l^{-1})^-$ para aproximadamente 1,7 $g.l^{-1}$ de SVA. R – reatores, C – controle ..... 60

Figura 38. Morfologias observadas através de microscopia eletrônica de varredura. Fotos de (a) até (e) retiradas da superfície da espuma; fotos de (f) até (h) retiradas da parte interna da espuma.(a) arranjo de cocobacilos; (b) bacilos com bordas arredondadas e célula pedunculada semelhante à extensão citoplasmática; (c) arranjo de células cocóides; (d) bacilos com dimensões diversas e bordas arredondadas retos e curvos, cocobacilos e biopolímeros. ..... 61

Figura 39 . Fotos de microscopia comum e de fluorescência tiradas de amostras de biomassa provenientes do reator operado em batelada (fotos de (a) a (f)) e da coluna de adaptação (fotos (g) e (h)) (a) bacilos, (b) bacilos em cadeia, (c) bacilos e cocos, (d) filamentos). ..... 64

Figura 40. Resultados do processo de extração do DNA para o domínio *Archaea* da biomassa retirada de cada reator utilizado durante o experimento. I = inóculo, R1 = biomassa proveniente dos pontos 1,2 e 3 do RAHLF, R2= biomassa proveniente dos pontos 4 e 5 do RAHLF, B1 = biomassa retirada do reator operado em batelada com recirculação de metano,B2 = biomassa retirada da coluna de adaptação. ..... 66

Figura 41. Resultados do processo de extração do DNA para o domínio *Bacteria* da biomassa retirada de cada reator utilizado durante o experimento. I = inóculo, R1 = biomassa proveniente dos pontos 1,2 e 3 do RAHLF, R2= biomassa proveniente dos pontos 4 e 5 do RAHLF, B1 = biomassa retirada do reator operado em batelada com recirculação de metano,B2 = biomassa retirada da coluna de adaptação. ..... 67

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição do substrato sintético nitrificado. ..... 23

Tabela 2. Características esperadas para o substrato sintético ..... 24

Tabela 3. Composição da solução de sais minerais adicionada ao substrato sintético utilizado em ambas fases e concentração final de cada constituinte no substrato. ..... 24

Tabela 4. Composição da solução de metais utilizado em ambas fases e concentração final de cada constituinte no substrato. ..... 25

Tabela 5 Parâmetros e metodologia de análise ..... 26

Tabela 6. Parâmetros e metodologia de análise ..... 31

Tabela 7. Valores de pH ao longo do reator ..... 45

Tabela 8. Variação do pH ao longo do reator durante a fase 2. ..... 46

Tabela 9. Principais morfologias presentes no RAHLF ..... 50

Tabela 10. Valores de massa de sólidos voláteis aderidos determinados.no final do ensaio. ..... 59

Tabela 11. Principais morfologias presentes nos sistemas utilizados para medir o consumo de metano ..... 63

# SUMÁRIO

RESUMO.....vi
ABSTRACT.....vii
LISTA DE FIGURAS.....viii
LISTA DE TABELAS.....xii
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....1
2 OBJETIVO GERAL.....4
3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....4
4 REVISÃO DA LITERATURA.....5
4.1 Aspectos Gerais.....5
4.2 Nitrificação.....5
4.3 Desnitrificação.....6
4.3.1 Aspectos Gerais.....6
4.3.2 Fonte de Carbono.....9
4.3.2.1 Metano como fonte de carbono.....10
4.3.3 Relação carbono/nitrogênio (C/N).....11
4.3.4 Acúmulo de Intermediários.....12
4.3.4.1 Concentração de Oxigênio Dissolvido.....14
4.3.4.2 Temperatura.....16
4.3.4.3 Valores de pH.....17
4.3.4.4 Presença de metais traços.....17
4.3.5 Cinética do processo.....18
5 MATERIAL E MÉTODOS.....20
5.1 Reator Anóxico Horizontal de Leito Fixo RAHLF.....20
5.1.1 Instalação experimental.....20
5.1.2 Suporte para Imobilização do Biofilme.....22
5.1.3 Inóculo.....22
5.1.4 Substrato Nitrificado Sintético.....23
5.1.5 Parâmetros físico-químicos e métodos de análise.....25
5.1.6 Estudos Microbiológicos.....27

5.1.6.1 Acompanhamento morfológico ..... 27
5.1.6.2 Análises de Biologia Molecular ..... 27
5.2 Ensaios para determinação de consumo de metano ..... 29
5.2.1 Sistema operado em batelada com recirculação de metano ..... 29
5.2.1.1 Instalação experimental ..... 29
5.2.1.2 Inóculo ..... 30
5.2.1.3 Substrato Nitrificado Sintético ..... 31
5.2.1.4 Fonte de Carbono ..... 31
5.2.1.5 Parâmetros físico-químicos e métodos de análise ..... 31
5.2.1.6 Estudos Microbiológicos ..... 32
5.2.2 Reatores anóxicos com diferentes concentrações de sólidos aderidos voláteis – utilização do *shaker* ..... 32
5.2.2.1 Reatores ..... 32
5.2.2.2 Inóculo ..... 34
5.2.2.3 Substrato e fonte de carbono ..... 35
5.2.2.4 Parâmetros físico-químicos e métodos de análise ..... 35
5.2.2.5 Estudos microbiológicos ..... 35
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... 36
6.1 RAHLF ..... 36
6.1.1 Fase 1 – Utilização de substrato sintético nitrificado com concentração de N-$NO_3^-$ igual a 20 mg.$l^{-1}$ ..... 36
6.1.2 Fase 2 – Utilização de substrato nitrificado sintético com concentração de N-$NO_3^-$ igual a 40 mg.$l^{-1}$ ..... 45
6.1.3 Caracterização morfológica ..... 49
6.2 Ensaios para determinação de consumo de metano ..... 54
6.2.1 Sistema operado em batelada com recirculação de metano. ..... 54
6.2.2 Reatores anóxicos com diferentes concentrações de sólidos aderidos voláteis – utilização do *shaker* ..... 58
6.3 Influência da configuração do reator e disponibilidade de metano sobre a seleção da população microbiana ..... 62
7. CONCLUSÕES ..... 69
7.1. Utilização do RAHLF ..... 69

7.2 Ensaios para medir o consumo de metano ..... 70
7.2.1 Sistema operado em batelada com recirculação de metano ..... 70
7.2.2 Reatores anóxicos com diferentes concentrações de sólidos aderidos voláteis – utilização do *shaker* ..... 70
8 SUGESTÕES ..... 71
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 72

# 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Entre os diversos problemas enfrentados pela população mundial deste novo século, a escassez de água somada à sua deterioração são os mais preocupantes. Esta situação vê-se mais agravada em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, onde o crescimento econômico não acompanha o populacional, acarretando sérios problemas ambientais que refletem direta ou indiretamente na saúde e bem estar da população.

Entre as diferentes linhas de pesquisa, o estudo da remoção de compostos nitrogenados é de grande interesse, tanto do ponto de vista ambiental quanto de saúde pública.

Apesar da grande importância nos processos metabólicos de plantas e animais, esses compostos também podem tornar-se prejudiciais ao ambiente sob certas condições, causando a eutrofização de sistemas aquáticos, diminuição na concentração de oxigênio dissolvido (OD) na água e mortandade de diversas espécies de peixes.

No que se refere à saúde pública, o consumo de água com concentrações de nitrato e nitrito acima dos limites estabelecidos por lei é preocupante pois, os mesmos, poderiam estar associados com a incidência de doenças tais como: câncer em órgãos dos aparelhos digestivo e urinário (GULIS *et al.*, 2001), alterações morfo-funcionais na glândula tiróide (ZAKI *et al.*,2003) e metahemoglobinemia, condição na qual a concentração de hemoglobina no sangue é reduzida resultando na diminuição da capacidade do sangue de transportar oxigênio e que de acordo com Gelberg *et al.* (1997), afeta, principalmente, crianças de até seis meses de idade, podendo inclusive, levar à morte.

Por estes motivos, a legislação brasileira referente ao lançamento de compostos nitrogenados nos corpos receptores tem se tornado cada vez mais restritiva. Em decorrência, com o objetivo de enquadrar as características físico-químicas dos efluentes a serem lançadas nos corpos receptores à legislação vigente, além da necessidade de remover matéria orgânica, as estações de tratamento devem começar a se adaptar, adotando sistemas de tratamento que incorporem a etapa de remoção de

nutrientes, como nitrogênio e fósforo, o que resulta, em geral, no aumento dos custos de implantação e operação desses sistemas.

Pelo exposto, é de suma importância o fomento a estudos relacionados com a utilização de técnicas eficientes e de baixo custo que visem garantir tais características.

No caso da remoção de nitrogênio, os processos biológicos de nitrificação seguido de desnitrificação vêm se mostrando eficientes, podendo, assim, substituir processos físico–químicos como osmose reversa ou troca iônica que, além de apresentarem custos relativamente altos, de acordo com Kesserü *et al.* (2002), também geram uma "salmoura" residual que deve ser devidamente disposta.

No entanto, apesar das vantagens do tratamento biológico na remoção de nutrientes, deve ser levado em consideração que, como estes processos ocorrem somente depois que a maior parte da matéria orgânica foi oxidada, uma fonte de carbono suplementar deve ser adicionada ao sistema como doador de elétrons para o processo de desnitrificação, visto que a maioria dos microorganismos desnitrificantes é heterotrófica e requerem substrato orgânico para o crescimento celular (CALLADO, 2001; KESSERÜ *et al.*, 2002; ISLAS – LIMA *et al.*, 2003).

Devido à necessidade de uma fonte de carbono exógena, o processo de desnitrificação biológica pode se tornar demasiadamente oneroso tornando-se economicamente inviável. Por isso, a identificação de fontes de carbono baratas e eficientes é indispensável.

No processo de desnitrificação diversas são as fontes de carbono que podem ser utilizadas.

No caso do Brasil, em especial, o etanol, tem se destacado devido ao fato de ser um composto produzido em grande escala no país a partir da cana de açúcar, e atualmente estar sendo comercializado a valores acessíveis.

Porém, sua produção e preço se encontram vinculados à demanda de mercado, o que pode vir a se tornar um fator limitante na sua utilização no processo de desnitrificação.

Desta maneira, uma alternativa para minimizar custos relacionados com a fonte de carbono a ser utilizada no processo seria a utilização de subprodutos provenientes das unidades que antecedem a etapa de desnitrificação, como é o caso do metano, principal constituinte do biogás gerado no processo anaeróbio e que, no Brasil, apesar

de ser um gás combustível, geralmente não é reaproveitado, sendo queimado após sua geração.

De acordo com Rhee (1978), Houbron *et al.* (1999), Rajapakse *et al.* (1999); Costa *et al.*(2000); Islas–Lima *et al.* (2003), o metano resultou ser eficiente como doador de elétrons para o processo de desnitrificação.

Há algum tempo, o Laboratório de Processos Biológicos da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo vem levando a cabo pesquisas que visam à remoção de nutrientes e já se pôde verificar, em alguns casos, a participação do metano no processo de desnitrificação (CALLADO, 2001).

Mais recentemente, estudos realizados por Santos (2003), que comparou a eficiência entre distintas fontes de carbono (metanol, etanol e metano) no processo de desnitrificação biológica, constatou a ocorrência da desnitrificação completa com todos os doadores de elétrons, porém, com diferentes velocidades.

Ono (2004), operando reator aeróbio/anóxico em batelada seqüencial de bancada, utilizando metano como único doador de elétrons na fase anóxica, constatou a remoção de nitrogênio amoniacal através da nitrificação parcial até nitrito (fase aeróbia), e subseqüente desnitrificação.

No entanto, fatores como: (a) presença de oxigênio molecular dissolvido, (b) microrganismos envolvidos no processo e (c) possíveis rotas metabólicas e (d) intermediários formados, ainda são motivos de discussões entre os pesquisadores quando a fonte de carbono utilizada é o metano.

Devido a tais observações e com o objetivo de dar continuidade aos trabalhos enfocados na remoção de nutrientes de efluentes de sistemas de tratamento de esgotos, este trabalho tem como finalidade contribuir para o desenvolvido de sistemas viáveis técnica e economicamente, visando à otimização da utilização de recursos nos processos de remoção de nitrogênio de esgotos sanitários.

## 2 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial de uso do metano como único doador de elétrons na remoção de nitrogênio na forma de nitrato mediante o processo de desnitrificação em ambiente anóxico.

## 3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Medir o consumo de metano durante o processo de desnitrificação e comparar com o consumo teórico.
- Verificar a influência da concentração de metano no estabelecimento das rotas metabólicas preferenciais que se estabelecem na presença de nitrato em condições anóxicas, quais sejam, a redução dissimilativa do nitrogênio à amônia (RDNA) ou a desnitrificação.
- Caracterizar a diversidade microbiana durante a etapa experimental

# 4 REVISÃO DA LITERATURA

## 4.1 Aspectos Gerais

O acelerado crescimento populacional e industrial dos últimos tempos ocasionou não somente o aumento na demanda de água, mas, também, maior e mais complexa contaminação dos recursos hídricos.

Como resultado de tal complexidade, os custos para o tratamento de efluentes domésticos e industriais são cada vez mais elevados, direcionando a atenção de muitos pesquisadores para o estudo e desenvolvimento de processos voltados não somente para a qualidade final do efluente, mas também, que demandem menores recursos financeiros.

Desta forma, sistemas combinando o processo anaeróbio em uma primeira etapa, seguido pela nitrificação e desnitrificação biológica para remoção de nitrogênio, vêm apresentando bons resultados no tratamento de efluentes, além da possibilidade de redução de custos.

## 4.2 Nitrificação

A nitrificação biológica é considerada o primeiro passo para a remoção biológica de nitrogênio de águas residuais.

A nitrificação resulta de reações bioquímicas em que o íon amônio ($NH_4^+$) é oxidado a nitrito ($NO_2^-$) e este a nitrato ($NO_3^-$) na presença de oxigênio, ou seja, em ambiente aeróbio, em etapas seqüenciais, conforme resumidamente representadas pelas equações 1 e 2 apresentadas a seguir.

$$NH_4^+ + \frac{3}{2}O_2 \rightarrow NO_2^- + H_2O + 2H^+ \qquad (1)$$

$$NO_2^- + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow NO_3^- \qquad (2)$$

As altas demandas de oxigênio para oxidação da amônia (RUIZ *et al.,* 2002), e bicarbonato para o tamponamento da solução do sistema, são, provavelmente, os principais fatores relevantes no aspecto econômico.

Entre as inúmeras espécies comumente encontradas em reatores aeróbios que participam da etapa de nitrificação, podem ser citadas, por exemplo, *Nitrosomomas* sp., bactérias responsáveis pela oxidação do íon amônio ($NH_4^+$) a íon nitrito ($NO_2^-$) que será oxidado a íon nitrato ($NO_3^-$) por *Nitrobacter* sp., (HENZE, 1997; METCALF e EDDY, 1998; CRITES e TCHOBANOGLOUS, 2000), sendo ambos microrganismos autotróficos.

As condições ambientais de pH, temperatura, concentração de oxigênio dissolvido e presença de inibidores podem afetar o processo, devido à sensibilidade das bactérias a esses fatores.

### 4.3 Desnitrificação

#### 4.3.1 Aspectos Gerais

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

O termo desnitrificação é utilizado para definir a conversão biológica de compostos oxidados de nitrogênio, como nitrato e nitrito a formas gasosas mais reduzidas $N_2O$ (óxido de nitrogênio) e $N_2$ (nitrogênio), liberando-os do meio.

De acordo com Schmidt *et al.* (2003), a desnitrificação biológica pode ser descrita como uma classe de respiração anóxica onde os elétrons provenientes, por exemplo, da matéria orgânica, de compostos reduzidos de enxofre ou do hidrogênio molecular, são transferidos para os compostos de nitrogênio oxidados em vez de serem transferidos para o oxigênio. Nesse sentido, a força motriz gerada a partir da movimentação do próton é utilizada para regeneração de ATP e, portanto, para a geração de energia bioquímica.

Por esse motivo, o processo de desnitrificação deve ocorrer, preferencialmente, em ambientes onde o oxigênio molecular não esteja presente, pois sua presença implicaria no favorecimento da respiração aeróbia.

De fato, Madigan *et al.* (1997), ao compararem as cadeias transportadoras de elétrons do metabolismo aeróbio com a da respiração anóxica do nitrato em *E. coli*, demonstraram que o processo aeróbio tem potencial para a condução de três prótons, o

que equivale a três estágios de conservação de energia, enquanto que a respiração do nitrato permite somente a condução de dois prótons. Esse fato pode ser explicado quando se compara o potencial de redução do par $NO_3^-/NO_2^-$ com o do par $O_2/H_2O$, sendo este último maior.

Além disso, de acordo com Whatley (1981), as enzimas envolvidas na respiração anóxica do nitrato somente são formadas onde as condições para a redução dissimilativa estejam presentes.

No entanto, em ambientes anaeróbios, além do favorecimento da remoção do nitrato por meio da desnitrificação, também chamada de redução dissimilativa do nitrato a $N_2$, outros dois tipos de reduções também podem ocorrer, com a diferença de que não ocorre a eliminação do nitrato propriamente dita, senão sua transformação dentro do sistema. É o caso da redução dissimilativa do nitrato à amônia (RDNA) e da redução assimilativa.

Tanto na redução assimilativa, quanto na RDNA, o produto da redução do nitrato é o mesmo (amônia). No entanto, no primeiro caso, ele será utilizado como fonte de nitrogênio para o crescimento celular incorporando-se à biomassa, ao passo que, na RDNA, a amônia formada se acumula no meio.

De acordo com Tiedje (1988), o principal objetivo da RDNA é servir como "canalizador" de elétrons para permitir a reoxidação do NADH sendo, geralmente, observada em ambientes onde há excesso de fonte de carbono com relação à concentração de nitrogênio.

Apesar de o produto final de ambos os processos ser o mesmo, as rotas metabólicas de cada um são controladas por diferentes fatores.

Na Figura 1 se encontra ilustrada a comparação entre os processos assimilativos e dissimilativos para a redução do nitrato .

Por outro lado, a desnitrificação e a RDNA competem pelos íons de nitrato em condições de anaerobiose. Desta forma, o conhecimento dos fatores que favoreçam a redução até $N_2$ devem estar bem estabelecidos.

Com relação aos microrganismos envolvidos no processo, segundo Metcalf e Eddy (1998), as principais espécies de bactérias são: *Pseudomonas* sp., *Alcaligenes* sp. *Achromobacter* sp, *Aerobacter* sp, *Bacillus* sp, *Brevibacterium* sp, *Flavobacterium* sp, *Lactobacillus* sp, *Micrococcus* sp, *e Spirillum* sp.

Kesserrü *et al.* (2001), utilizando diferentes fontes de carbono (ácido succínico, etanol e ácido acético) e sob diferentes tempos de detenção hidráulica, observaram alta atividade de desnitrificação por células imobilizadas de *Pseudomonas butanovora*.

De acordo com Tiedje (1988), a *Pseudomonas* sp é a espécie predominante encontrada na natureza, provavelmente devido à sua versatilidade e competitividade pelo substrato orgânico em ambientes naturais, terrestres ou aquáticos.

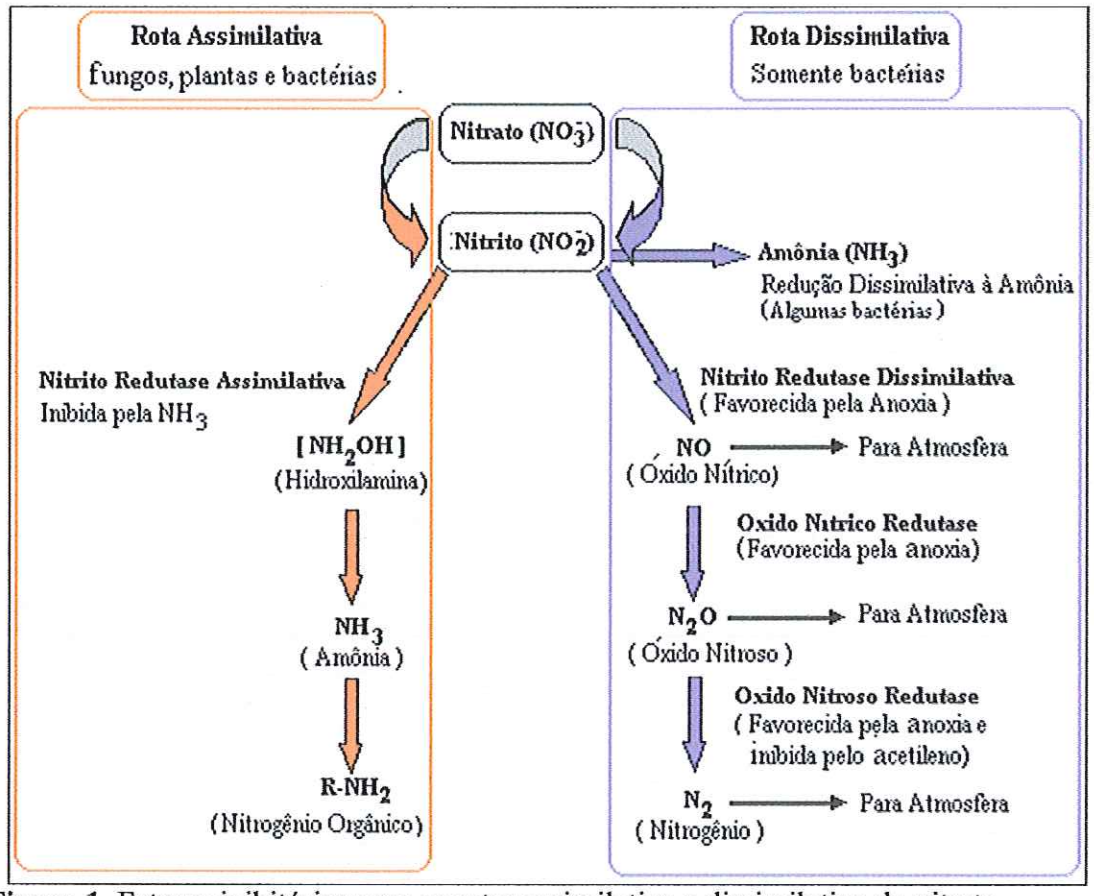


**Figura 1.** Fatores inibitórios para as rotas assimilativa e dissimilativa do nitrato.
Fonte: Madigan *et al.*(1997).

Segundo Callado (2001), as bactérias responsáveis pela desnitrificação são anaeróbias facultativas autótrofas ou heterótrofas. No entanto, no esgoto sanitário, a desnitrificação ocorre, geralmente, por ação de bactérias heterótrofas, ou seja, microrganismos que necessitam de substrato orgânico para seu crescimento..

Devido à predominância de tais microrganismos e ao fato de que geralmente a desnitrificação ocorre no final do processo de tratamento das águas residuárias, onde a maior parte da matéria orgânica já foi removida, há a necessidade de se introduzir uma fonte exógena de carbono no sistema.

Uma alternativa para minimizar custos decorrentes da necessidade de utilização de fonte de carbono complementar é a utilização de fontes endógenas provenientes de etapas anteriores ao pós-tratamento.

Desta forma, a utilização do gás metano como fonte de carbono alternativa para o processo de desnitrificação tem sido estudada por diversos pesquisadores da área, tais como: Werner e Kayser (1991), Thalasso *et al.* (1997), Costa *et al.* (2000), Santos (2003).

De acordo com a literatura, as variáveis ambientais que podem afetar o processo de desnitrificação são descritas a seguir.

### 4.3.2 Fonte de Carbono

Diversas são as fontes de carbono que podem ser utilizadas para otimizar o processo, porém, de acordo com Hanaki e Polprasert (1989), e Mosquera–Corral *et al.* (2001), há preferência por compostos orgânicos de baixa massa molecular, como por exemplo, o metanol ou o acetato devido às suas propriedades não fermentativas.

Blaszczyk *et al.* (1980),[1] *apud* Wilderer (1986), trabalhando com glicose como fonte de carbono e doador de elétrons para o processo de desnitrificação, constataram o acúmulo de nitrito e a permanência do pH abaixo de 7, o que não ocorreu para o caso do etanol e acetato, sugerindo que o processo de fermentação possa ter sido o responsável pela queda do pH, implicando na presença de microrganismos capazes de realizar ambos processos: fermentação e desnitrificação.

De fato, diversos são os estudos realizados com metanol (HANAKI e POLPRASERT, 1989; HER e HUANG, 1995; BILANOVIC *et al.*, 1999; SANTOS, 2003). No entanto, a utilização do metanol possui algumas desvantagens econômicas relacionadas com custos de aquisição e remoção do álcool residual devido à sua toxicidade ao sistema.

Com relação à remoção do metanol excedente, existe a possibilidade de ser efetuado o tratamento biológico anaeróbio para minimizar custos (HANAKI e POLPRASERT, 1989; PAULO *et al,* 2000). Porém, a alta demanda de metanol para a

---

[1] BLAS ZCZYK, M., MYCIELSKI, R., JAWOROWSKA-DEPTUCH, H. e BRZOSTEK, K. (1980) Effects of various sources of organic carbon and high nitrite and nitrate concentrationon the selection of denitrifying bactéria I: stationary cultures. *Acta Microbiol. Pol.* Vol. 29, pg. 397 – 406.

desnitrificação completa, da ordem de 3 kg de metanol / kg $N\text{-}NO_3^-$ (WERNER e KAYSER, 1991; RAJAPAKSE e SCUTT, 1999), ainda implica em gastos elevados.

Para Her e Huang (1995), que, além do metanol, utilizaram outras três fontes diferentes de carbono (ácido acético, glicose e ácido benzóico) no processo de desnitrificação biológica, a eficiência desejável e a menor relação carbono/nitrogênio (C/N) requerida para aproximar-se da desnitrificação completa foram relacionadas com a estrutura química e a massa molecular da fonte de carbono utilizada.

As principais observações destes autores foram: (a) Quando se utilizou o composto aromático (ácido benzóico), a eficiência da desnitrificação foi significativamente menor quando comparada com os compostos não aromáticos, para mesma relação C/N; (b) A mínima relação C/N requerida para obter-se a desnitrificação completa foi maior para o ácido benzóico do que para os outros três compostos não aromáticos; (c) Na comparação dos três compostos não aromáticos (metanol, ácido acético e glicose), pôde-se constatar que a menor proporção C/N necessária para obter-se a desnitrificação completa aumentou com o aumento da massa molecular.

#### 4.3.2.1 Metano como fonte de carbono

Entre as diversas fontes de carbono estudadas como doadores de elétrons para o processo de desnitrificação, o metano vem despertando grande interesse dos pesquisadores, devido, principalmente, ao fato de ser um dos subprodutos da digestão anaeróbia, diminuindo assim, a necessidade de aquisição de fontes de carbono exógenas. Além disso, o aproveitamento do metano, ao invés de sua queima, integraria todo o processo de tratamento em uma nova etapa do desenvolvimento que prevê minimizar a geração de resíduos através de seu aproveitamento.

Rajapakse e Scutt (1999), Houbron *et al.* (1999), Costa *et al.* (2000); Santos (2003), demonstraram a eficiência do metano como agente redutor no processo de desnitrificação. No entanto, Thalasso *et al.* (1997), defendendo a hipótese de que o processo de desnitrificação utilizando metano como fonte de carbono é realizado por um consórcio de microrganismos, onde, em uma primeira etapa, o metano é oxidado na presença de oxigênio por organismos aeróbios produzindo intermediário orgânico.que, posteriormente, será utilizado por organismos desnitrificantes (em ambiente anóxico) como fonte de carbono, questionaram a potencialidade de aplicação do processo em escalas maiores, pois, de acordo com seus resultados, o aumento na eficiência de

desnitrificação estaria relacionado com o aumento da pressão parcial de oxigênio, teoricamente utilizado na produção do intermediário orgânico.

Eisentraeger *et al.* (2001), estudando a utilização do metano como fonte de carbono para a desnitrificação de águas subterrâneas *in situ*, chegaram à conclusão de que esse processo somente ocorreria se bactérias metanotróficas aeróbias e desnitrificantes anaeróbias interagissem em um sistema heterogêneo.

Mais recentemente, Islas-Lima *et al.* (2003), apresentaram resultados de ensaios de desnitrificação que confirmavam a oxidação anóxica do metano no processo.

Para a realização dos ensaios, os autores utilizaram frascos âmbar, com capacidade volumétrica de 550 m*l*, como reatores operados em sistema de batelada. Cada frasco, inclusive os controles, foi inoculado com lodo desnitrificante proveniente de um reator contínuo de mistura alimentado com acetato. As concentrações finais de sólidos suspensos voláteis e $N\text{-}NO_3^-$ no meio foram de 6,5 $g.l^{-1}$ e 35 $mg.l^{-1}$ respectivamente. Diferentes volumes de metano foram adicionados nos reatores para se obter pressões parciais deste gás da ordem de 1,8 a 35,7 kPa. No caso dos controles a atmosfera foi substituída por gás hélio.

Os resultados obtidos pelos pesquisadores, mostraram que a velocidade de consumo do nitrato, da ordem de 0,25g $N\text{-}NO_3^-\ g^{-1}SSV.d^{-1}$, foi independente da pressão parcial de metano quando esta era superior ou igual a 8,8 kPa. No entanto, a menores pressões parciais os valores para a velocidade de consumo do nitrato foram menores, indicando que o processo dependia da disponibilidade de doador de elétrons.

Paralelamente, foram feitas análises da composição da atmosfera gasosa dos reatores que revelaram a ausência de oxigênio e uma clara diminuição do metano. Tais resultados, juntamente com a ausência de consumo de nitrato observado nos reatores controles sugeriu a utilização do metano como fonte de carbono no processo.

### 4.3.3 Relação carbono/nitrogênio (C/N)

Um dos aspectos que preocupa os pesquisadores é a relação C/N no processo de desnitrificação, principalmente porque, de acordo com Tiedje (1988), em condições anóxicas e na presença de uma alta relação de C/N, há a possibilidade de competição entre a redução dissimilativa do nitrato a $N_2$ (seqüência 1) e a redução dissimilativa do nitrato a amônia ($NH_4^+$) (seqüência 2).

$$NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2 \quad (1)$$

$$NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NH_4^+ \quad (2)$$

De acordo com o pesquisador, em ambiente onde a concentração de nitrato é limitada, a necessidade de canalizar a transferência de elétrons envolvidos no processo faz com que a redução à amônia ocorra.

Martienssen e Schöps (1999), estudando a dinâmica de uma população desnitrificante composta por três espécies de microrganismos: Grupo a - *Staphylococcus sp;* Grupo b - *Pseudomonas pseudoalcaligene* e Grupo c - *Bacillus niacini*, observaram que a espécie *Pseudomonas pseudoalcaligene,* capaz de reduzir nitrato a $N_2O$ ou $N_2$ sem acúmulo de intermediário, foi a mais favorecida quando a relação C/N foi mantida baixa e igual a 2,5.

Por outro lado, quando se trabalha com uma relação muito baixa de C/N, o processo completo de desnitrificação também pode ser comprometido, ocasionando, geralmente, o acúmulo do composto intermediário, nitrito. A explicação para este fato está relacionada com a constatação de que, provavelmente, todo o carbono estaria sendo consumido na primeira etapa do processo (nitrato a nitrito), não sobrando fonte disponível para as etapas posteriores (seq. 1).

Houbron *et al.* (1999), utilizando o metano como fonte de carbono no processo de desnitrificação e na presença de oxigênio (3,5 mg $l^{-1}$), encontraram a relação C/N (massa) de 3,6 para meio sintético e 4,6 para águas residuárias reais.

No entanto, os valores ideais para a relação C/N variam de acordo com a fonte de carbono utilizada, a origem do inóculo, a condição de aerobiose ou anoxia e a hidrodinâmica do reator, devendo, portanto, ser analisada para cada caso específico.

### 4.3.4 Acúmulo de Intermediários

De acordo com a seqüência 1, que apresenta os possíveis passos envolvidos no processo de desnitrificação completa ($NO_3^- \rightarrow N_2$), pode-se considerar a formação de três produtos intermediários, $NO_2^-$, NO e $N_2O$.

No entanto, a maioria dos estudos relacionados com a formação de intermediários no processo de desnitrificação está voltada para a formação do nitrito ($NO_2^-$), provavelmente devido ao efeito inibitório que este ou algum de seus subprodutos ácidos possam ocasionar ao processo.

A suspeita de que houve a inibição do processo de desnitrificação devido à formação de subprodutos ácidos foi verificada por Beccari *et al.* (1983), ao analisar as mudanças ocorridas nas velocidades de redução do nitrato e nitrito em valores de pH inferiores e superiores a 7,5.

Neste estudo, os autores observaram que, em valores de pH superiores a 7,5, a diminuição na velocidade de redução do nitrito estava associada à queda na velocidade de redução do nitrato, efeito esse que foi considerado normal devido às mudanças no metabolismo natural dos microrganismos. No entanto, quando se trabalhou em valores de pH inferiores a 7,5, somente a velocidade de redução do nitrito foi afetada, levantando a hipótese do efeito inibitório causado pelo aumento na concentração de ácido nitroso livre.

Abeling e Seyfried (1992), constataram a inibição do processo de desnitrificação quando a concentração de $HNO_2$ atingiu a concentração de 0,13 mg. $l^{-1}$ (0,04 mg. $l^{-1}$ N), sugerindo que este, e não o nitrito diretamente, fosse o responsável pela inibição do processo.

De acordo com Wilderer *et al.* (1987), os mecanismos responsáveis pelo acúmulo de nitrito podem ser: (a) repressão da síntese da nitrito redutase ou; (b) seleção e enriquecimento dos microrganismos que são responsáveis pela redução $NO_3^- \rightarrow NO_2^-$.

Aparentemente, de acordo com os resultados cinéticos obtidos a partir de estudos que enfocaram o efeito da concentração de nitrato sobre a velocidade de redução do nitrito, Almeida *et al.* (1995) e Kornaros *et al.* (1996), observaram diminuição de 72% e 62%, respectivamente, na velocidade de redução do nitrito na presença de nitrato e seu posterior restabelecimento, após o consumo quase que total do nitrato. Tais resultados reforçariam, portanto, a primeira hipótese levantada por Wilderer *et al.* (1987).

Kornaros *et al.* (1996), acreditam que, além de afetar a redução do nitrito, aparentemente, o nitrato também afeta a atividade de outras enzimas usadas na desnitrificação, como a NO redutase e a $N_2O$ redutase.

Segundo Cox e Payne (1973),[2] *apud* Kornaros (1996), as enzimas da nitrito redutase são proteínas solúveis, localizadas no espaço periplasmático, e não estão associadas com a conservação de energia, enquanto que, de acordo com Knowles

---

COX, C.D., e PAYNE, W.J. (1973) Separation of Soluble Denitrifying Enzimes and Cytochromes from *Pseudomonas perfectomarinus*. *Can. J. Microbiol.*, vol. 19, pg. 861

(1982), quase todas as enzimas responsáveis pela redução do nitrato a nitrito estão associadas com a membrana celular e envolvidas com conservação de energia.

De acordo com tais observações, é de se esperar que, em um ambiente onde ocorra competição entre esses receptores de elétrons, a redução do nitrato seja favorecida, acumulando-se assim nitrito.

Além disso, outros fatores como pH, temperatura e oxigênio dissolvido também podem ocasionar o acúmulo de intermediários no meio.

#### 4.3.4.1 Concentração de Oxigênio Dissolvido

A redução do nitrato a gás nitrogênio pelo processo da desnitrificação é uma alternativa da respiração biológica, onde as bactérias oxidam anaerobiamente a matéria orgânica usando nitrato como receptor final de elétrons (CALLADO, 2001), promovendo, assim, a desnitrificação do meio. No entanto, caso o oxigênio molecular esteja presente, os microrganismos o usarão preferivelmente ao nitrato como receptor final de elétrons. Por isso, diversos pesquisadores recomendam que o processo ocorra em ambientes anaeróbios ou com baixas concentrações de oxigênio dissolvido.

O efeito inibitório do oxigênio no processo de desnitrificação torna-se maior com o aumento da concentração de $O_2$, sendo observado, em alguns casos, a diminuição de até 35 % na velocidade específica de desnitrificação para a concentração de oxigênio de apenas 0,09 mg/l (OH e SILVERSTEIN, 1999).

De acordo com Tiedje (1988), o oxigênio pode afetar o processo de desnitrificação de duas maneiras: (a) repressão da síntese de enzimas associadas com o processo e, (b) inibição da atividade enzimática.

Na Figura 2 se encontra ilustrado, de maneira aproximada, as regiões de concentração de $O_2$ que levam à inibição da síntese enzimática e sua atividade em cada etapa do processo de desnitrificação.

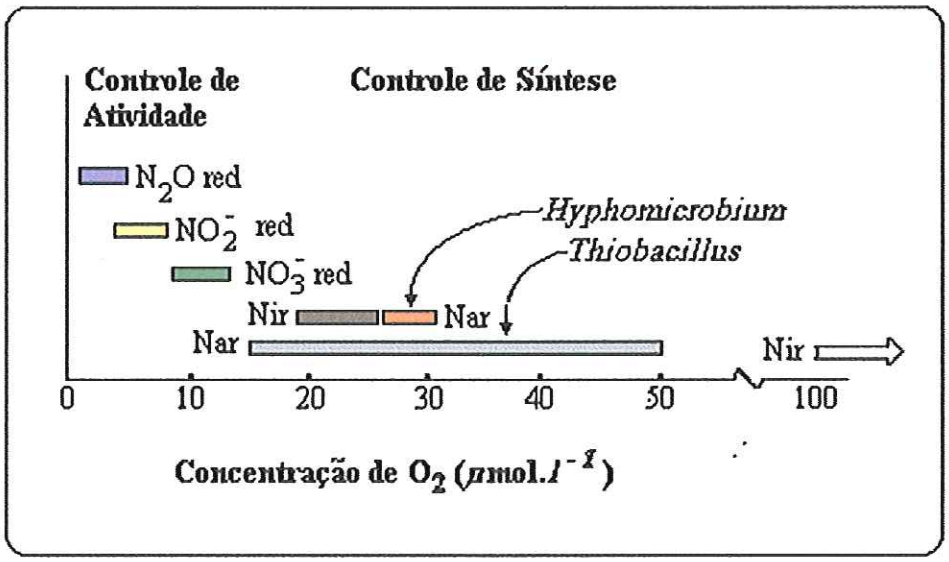


**Figura 2.** Regiões de concentrações aproximadas de $O_2$ que inibiriam a síntese enzimática e sua atividade para cada etapa do processo de desnitrificação.Nir – Nitrito redutase e Nar – Nitrato redutase
Fonte: Tiedje, (1988).

Para Jobbágy *et al.* (2000) e Plósz *et al.*(2002), o impacto da penetração de oxigênio em sistemas anóxicos é altamente dependente da velocidade de desnitrificação.

Nos casos em que a velocidade de consumo de nitrato é relativamente alta, o impacto observado é considerado pequeno. No entanto, a baixas velocidades de desnitrificação, tal impacto é mais significativo (JOBBÁGY *et al,* 2000).

No entanto, quando a fonte de carbono utilizada como doador de elétrons para o processo de desnitrificação é o metano, há divergências entre os pesquisadores com relação à presença ou ausência de oxigênio molecular.

Por um lado, existem aqueles que apóiam a teoria de que a redução do nitrato ocorre devido à associação de bactérias metanotróficas, que em uma primeira etapa, oxidam o metano aerobiamente produzindo intermediário orgânico, que, posteriormente, será utilizado anaerobiamente como fonte de carbono pelas desnitrificantes (WERNER e KAYSER, 1991; THALASSO *et al.*, 1997; HOUBRON *et al.*, 1999; COSTA *et al.*, 2000; EISENTRAEGER *et al.*, 2001).

Com relação ao intermediário formado, também existem opiniões diversas.

Para Werner e Kayser (1991), o metanol seria o intermediário formado na oxidação do metano pelas metanotróficas, sendo, em seguida, utilizado pelas metilotróficas (desnitrificantes).

No entanto, Costa *et al.* (2000), estudando a população microbiana e formação de intermediários no processo de desnitrificação em reator de leito fixo sob condições

limitantes de oxigênio e utilizando metano como doador de elétrons, propuseram que o acetato, e não o metanol, é produzido pelas metanotróficas e, em seguida, utilizado como doador de elétrons para a desnitrificação.

Essa hipótese pode ser sustentada pelos resultados obtidos por Santos (2003), que, em seus experimentos de desnitrificação com metano como única fonte de carbono, utilizando reatores em batelada, observou a presença de arqueas metanogênicas utilizadoras de acetato, permitindo supor que o acetato estava sendo produzido durante o processo.

Porém, a formação de outros intermediários não pode ser completamente descartada

Outra linha de pesquisa está apoiada em estudos mais recentes que demonstraram a oxidação anóxica do metano no processo de desnitrificação. (ISLAS-LIMA *et al.*,2002)

#### 4.3.4.2 Temperatura

A dependência do processo de desnitrificação com a temperatura se assemelha ao processo heterotrófico aeróbio, que pode ser descrito mediante a expressão exponencial apresentada na seguinte equação (HENZE *et al.*, 1997):

$$\mu_{max\,(T)} = \mu_{max\,(20\,^{o}C)} \exp\left(\kappa\left(T-20\right)\right) \qquad (3)$$

sendo:

$\mu_{max}$ = velocidade máxima de crescimento específico ($d^{-1}$)

T = temperatura ($^{o}C$)

k = constante de temperatura ($^{o}C^{-1}$), seu valor varia de 0,06 – 0,12

Segundo Vieira (2000), a diminuição na taxa de desnitrificação com o abaixamento da temperatura ocorre por duas razões: (a) a maioria das bactérias heterotróficas desnitrificantes é mesofílica, faixa de temperatura entre 10° C e 45° C, e tem sua atividade enzimática afetada com o decréscimo da temperatura; (b) a temperatura afeta a solubilidade do oxigênio no meio.

Em seus experimentos em recipientes anóxicos abertos, Plósz *et al.* (2002), verificaram que, quando as velocidades de respiração eram baixas, a diminuição da temperatura, que pode aumentar significativamente a concentração de oxigênio dissolvido, causou conseqüências negativas no processo de desnitrificação.

#### 4.3.4.3 Valores de pH

O valor ótimo de pH do meio para a desnitrificação, de acordo com Knowles (1982), Wang *et al.*, (1995) e Metcalf e Eddy (1998), está entre 7 e 8.

Este mesmo intervalo foi estabelecido como ótimo para a atividade microbiana por Beaubien *et al.* (1995), ao monitorarem a atividade metabólica no processo de desnitrificação a diferentes valores de pH através da produção específica de gás.

Além disso, tais autores constataram, também, que pequenas variações (± 0,5 unidades) além dos valores estabelecidos, em curto prazo, podem provocar decréscimo de até 80 % do valor máximo na velocidade de produção específica de gás. No entanto, quando se forneceu ao sistema prazo suficiente para sua adaptação, os valores máximos de velocidade de produção específica de gás a diferentes valores de pH (6,5; 7,0; 7,5; 8,0 e 8,5) não sofreram alterações significativas.

Segundo Glass *et al.* (1998), o pH do meio está relacionado diretamente com a disponibilidade de prótons no espaço periplasmático que são utilizados pelas enzimas nitrito redutase. Desta forma, em pH mais elevado, a quantidade de prótons disponíveis para a redução do nitrito é muito baixa, acumulando-o no meio e influenciando o processo como um todo.

#### 4.3.4.4 Presença de metais traços

A desnitrificação é um processo respiratório que envolve várias proteínas com metais contendo co-fatores.

Alguns exemplos de metais que participam no metabolismo de microrganismos desnitrificantes citados por Stouthamer (1988), são: (a) ferro - usado por citocromos para a transferência de elétrons, tanto pelas enzimas nitrato como nitrito redutase.; (b) cobre - participa como co-fator na regulagem da enzima redutase associada à redução do nitrito e do $N_2O$; (c) molibdênio - está envolvido na regulagem da enzima redutase que atua sobre o nitrato e de outras enzimas redutoras.

No entanto, entre todos os metais traços bioativos estudados, o ferro foi o que apresentou maior importância no processo, sendo inclusive, o principal responsável pelo aumento na eficiência de desnitrificação (LABBÉ *et al.*, 2003).

Em seu trabalho, Houbron *et al.* (1999) observaram variações no consumo máximo de metano pelas metanotróficas após a adição de 80 $\mu g.l^{-1}$ de cobre no meio reacional. Na primeira situação (ausência de cobre), os autores obtiveram um consumo

máximo de 1,75 mmol $CH_4$ $l^{-1}.h^{-1}$, alcançado em 20 horas, enquanto que, na presença de cobre, as bactérias metanotróficas se mostraram mais aptas em oxidar metano, atingindo consumo máximo de 3,5 mmol $CH_4$ $l^{-1}.h^{-1}$ alcançado em 60 horas.

No entanto, Santos (2003), analisando o efeito da variação das condições nutricionais em reatores desnitrificantes alimentados com metano na presença e ausência de oxigênio, constatou que, nos reatores que receberam complementação de solução de metais, a rota metabólica predominante não foi a desnitrificante, já que não foi detectada a presença de $N_2O$ no ensaio de atividade desnitrificante.

### 4.3.5 Cinética do processo

As etapas consecutivas da redução do nitrato a $N_2$ no processo de desnitrificação ocorre segundo a seqüência 1 apresentada no item 4.3.3.

No entanto, considerando-se que as velocidades de redução do NO e $N_2O$ são maiores que as velocidades de redução do nitrato e nitrito, de maneira que não haja acúmulo destas espécies no meio, então o processo de desnitrificação pode ser representado pela seqüência 3 (KORNAROS *et al.*, 1996), que representa o modelo cinético de reações múltiplas irreversíveis em série com um único produto intermediário descrito por Silveira (1996).

$$NO_3^- \xrightarrow{K_1} NO_2^- \xrightarrow{K_2} N_2 \qquad (3)$$

De fato, Walter *et al* (1978), em seus ensaios com *P. denitrificans* (ATCC 13867) que cresceram em meio à base de levedura à 30° C e com nitrato, nitrito e óxido nitroso ($N_2O$) como receptores de elétrons (em reatores separados), constataram que a redução do $N_2O$ foi muito mais rápida que a do nitrito e, durante a redução do nitrito pouco ou nenhum $N_2O$ foi detectado.

Santos (2003), em seus ensaios para obtenção de parâmetros cinéticos aparentes utilizando reatores operados em ciclos de batelada de 24h e mantidos em câmara rotativa incubadora (150 rpm e 30° C), utilizando metano como único doador de elétrons no processo de desnitrificação, obteve dados experimentais que se ajustaram ao modelo anteriormente descrito, tendo nitrito com único intermediário, sendo que o consumo de nitrato seguiu reação de primeira ordem e o do nitrito de ordem zero.

Especificamente, com relação ao processo de desnitrificação utilizando metano como fonte de carbono, deve-se dar especial atenção aos fatores que possam vir a afetar

sua concentração no meio reacional, como por exemplo, temperatura, transferência de massa e hidrodinâmica do reator no sentido de se evitar, desta maneira, que a baixa solubilidade do metano em água se torne o fator limitante do processo.

Além disso, devido às controvérsias com relação à concentração de oxigênio molecular no meio, assim como, a falta de conhecimentos mais aprofundados sobre os microrganismos envolvidos e rotas metabólicas utilizadas, a presença ou ausência de oxigênio é outro fator a ser levado em consideração no processo de desnitrificação, tendo metano como doador de elétrons.

# 5 MATERIAL E MÉTODOS

## 5.1 Reator Anóxico Horizontal de Leito Fixo RAHLF

### 5.1.1 Instalação experimental

Para a realização da parte experimental foi utilizado o equipamento ilustrado na Figura 3.

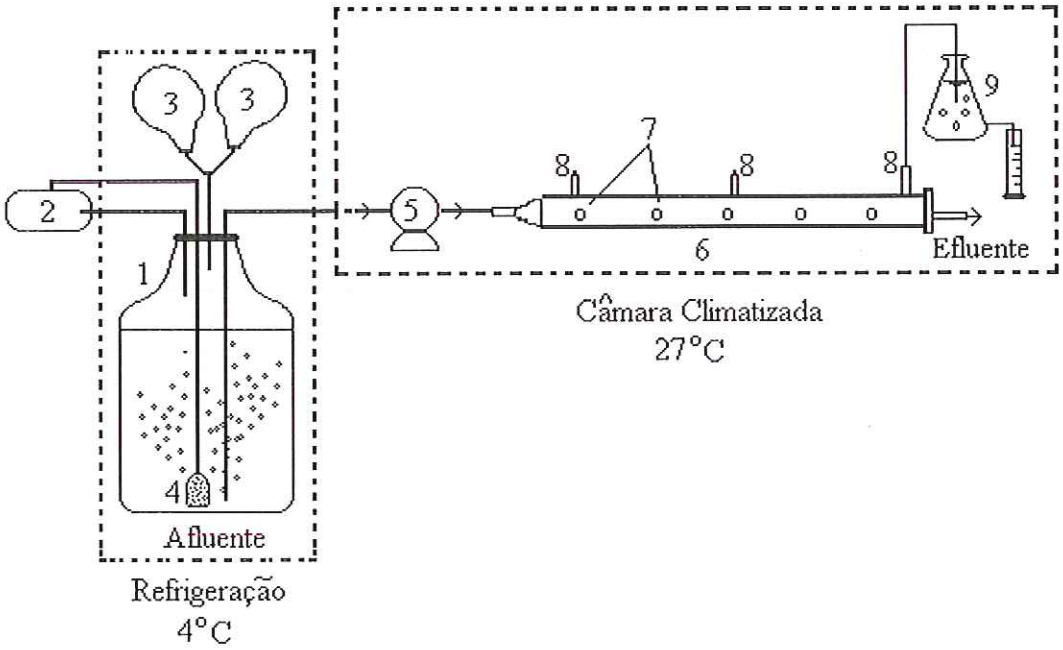


**Figura 3.** Esquema do equipamento experimental. (1) Recipiente com substrato nitrificado, (2) Bomba de ar para recirculação do gás do *head space*, (3) Balões de gás para reserva de metano, (4) Pedra porosa (5) Bomba peristáltica (6) RAHLF, (7) Pontos de amostragem de líquido e biomassa, (8) Pontos de amostragem de gás, (9) Selo Hídrico.

O sistema foi operado sob alimentação contínua, adotando-se, primeiramente, tempo de residência no reator horizontal de aproximadamente 4 horas nos primeiros 40 dias de operação, passando para 12 horas até o final do experimento. A câmara climatizada foi mantida à temperatura de 27° C,

O metano era introduzido no sistema através do recipiente (1), que esteve mantido sob refrigeração com o objetivo de aumentar a solubilidade do gás e diminuir a possibilidade de que alguma reação ocorresse. Para manter uma atmosfera de metano ao longo de todo período de operação, foi adotado o uso de balões de gás (3) que permanentemente eram reabastecidos com metano.

Com o objetivo de minimizar problemas decorrentes da transferência de massa da fase gasosa para a líquida, aumentando assim a concentração de metano dissolvido, o gás no *head space* do recipiente (1) era recirculado, utilizando-se bomba de ar adaptada para esse fim, e reintroduzido no meio líquido mediante pedra porosa, de maneira a formar pequenas bolhas de gás.

O reator foi confeccionado em vidro borossilicato e apresentava 100 cm de comprimento (L) e 5,04 cm de diâmetro (D). A capacidade total do reator era de 1800 m*l* de volume útil reacional. Havia pontos de amostragem intermediários, ao longo do comprimento do reator, alocados em posições correspondentes à relação L/D de 1, 5, 10, 14, 19 e 20 e que, posteriormente também, serão identificados como P1, P2, P3, P4, P5 e Saída respectivamente.

Na Figura 4 são apresentadas fotos do sistema utilizado

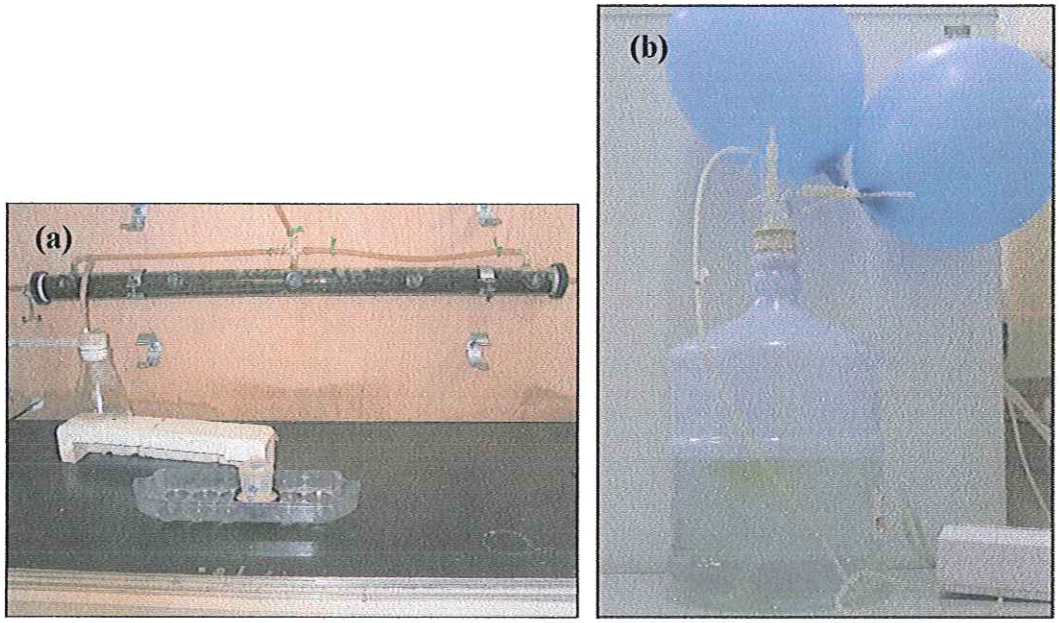


**Figura 4.** Sistema utilizado na parte experimental: (a) Reator Anóxico Horizontal de Leito Fixo (RAHLF), (b) recipiente para armazenamento do substrato sintético nitrificado.

Além das adaptações anteriormente mencionadas, para garantir a presença de metano na atmosfera interna localizada sobre o leito ao longo de todo o reator, foi preciso fechar as duas primeiras saídas de gás presente no modelo original. Tais saídas foram, posteriormente, utilizadas para o monitoramento qualitativo de metano ao longo do reator. Desta maneira, a única saída de gás na nova configuração passou a estar situada na posição L/D de 19, conectada a um dispositivo de deslocamento de líquido.

Essa configuração de reator, conforme apresentado na Figura 3, foi adaptada do modelo desenvolvido por Zaiat (1996).

### 5.1.2 Suporte para Imobilização do Biofilme

O material suporte utilizado foi espuma de poliuretano com densidade de 20 $kg.m^{-3}$, e na forma de cubos com 5 mm de lado aproximadamente (ver Figura 5). A porosidade esperada para o leito era de aproximadamente 40%.

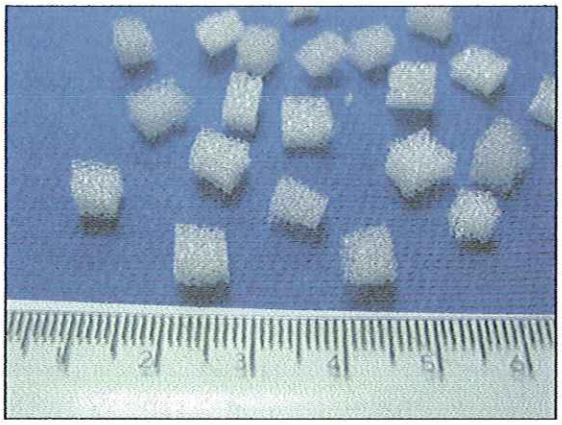

**Figura 5.** Foto do material suporte utilizado para a imobilização da biomassa

### 5.1.3 Inóculo

O reator foi inoculado com lodo proveniente do reator UASB da Avícola Dacar situada na cidade de Tietê – SP

A escolha deste material esteve amparada em sua ampla diversidade microbiana e nos bons resultados apresentados até o momento em outras pesquisas realizadas no Laboratório de Processos Biológicos da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC-USP).

Para a imobilização na espuma de poliuretano foi utilizada a técnica proposta por Zaiat (1996).

Após a inoculação da espuma amostras em triplicada foram separadas para a determinação de massa de sólidos (totais, voláteis e fixos) aderidos por massa de espuma.

Posteriormente, ao término do experimento, amostras de espuma foram retiradas ao longo do reator (em triplicata) para, da mesma forma, determinar a massa de sólidos aderida, para comparação com o resultado obtido com o inóculo.

Para determinar os sólidos aderidos à espuma, os mesmos foram separados da matriz mediante lavagem com água destilada num tubo falcon (15 ml) e com o auxílio de um bastão de vidro, até que a espuma se apresentasse visivelmente livre de sólidos..

Todo o volume de enxágüe foi transferido para cápsulas de porcelana e submetido à determinação de sólidos de acordo com o Standart Methods for Examination of Water and Wastewater (1998).

Depois de seca, a espuma teve sua massa determinada para obtenção da relação massa de sólido/massa de espuma.

### 5.1.4 Substrato Nitrificado Sintético

Para garantir a concentração constante de nitrato no afluente do reator na fase experimental durante os primeiros 50 dias de operação (Fase 1), foi utilizado o substrato nitrificado sintético com as mesmas características ao do utilizado por Santos (2003). A partir do 51º dia (Fase 2), o mesmo teve sua composição alterada.

As composições de tais substratos encontram-se detalhadas nas Tabelas 1 a 4.

**Tabela 1.** Composição do substrato sintético nitrificado.

| COMPOSTO | CONCENTRAÇÃO ($mg.l^{-1}$) | |
|---|---|---|
| | Fase 1 | Fase 2 |
| Nitrato de Potássio ($KNO_3$) | 144,28 | 288,56 |
| Fosfato de Potássio ($KH_2PO_4$) | 74,58 | 149,16 |
| Sulfato de Sódio ($Na_2SO_4$) | 10,35 | 10,35 |
| Uréia ($CON_2H_4$) | 8,57 | 6,43 |
| Bicarbonato de Sódio ($NaHCO_3$) | 100 | 100 |
| Solução de sais minerais | 5 $ml.l^{-1}$ | 5 $ml.l^{-1}$ |
| Solução de metais | 10 $ml.l^{-1}$ | 10 $ml.l^{-1}$ |

Fonte: Adaptado de Santos (2003)

**Tabela 2**. Características esperadas para o substrato sintético

| COMPONENTE | CONCENTRAÇÃO (mg.$l^{-1}$) | |
|---|---|---|
| | Fase 1 | Fase 2 |
| N-NTK | 4,0 | 3,0 |
| N-$NO_3$ | 20,0 | 40,0 |
| $SO_4^{-2}$ | 7,0 | 7,0 |
| $PO_4^{-3}$ | 17,0 | 34,0 |
| Alcalinidade bicarbonato | 61 | 61 |

Fonte. Adaptado de Santos (2003)

**Tabela 3**. Composição da solução de sais minerais adicionada ao substrato sintético utilizado em ambas fases e concentração final de cada constituinte no substrato.

| COMPOSTO | CONCENTRAÇÃO (g. $l^{-1}$) | CONCENTRAÇÃO (mg. $l^{-1}$) FINAL NO SUBSTRATO |
|---|---|---|
| Cloreto de Sódio (NaCl) | 50,0 | 250,0 |
| Cloreto de Magnésio hexahidratado ($MgCl.6\ H_2O$) | 1,4 | 7,0 |
| Cloreto de Cálcio dihidratado ($CaCl_2\ .2\ H_2O$) | 0,9 | 4,5 |

Fonte. Adaptado de Santos (2003)

**Tabela 4.** Composição da solução de metais utilizado em ambas fases e concentração final de cada constituinte no substrato.

| COMPOSTO | CONCENTRAÇÃO ($g.l^{-1}$) | CONCENTRAÇÃO FINAL NO SUBSTRATO ($mg.\ l^{-1}$) |
|---|---|---|
| Ácido Nitroloacético (NTA) | 1,28 | 12,8 |
| $FeCl_3.6H_2O$ | 1,35 | 13,5 |
| $MnCl_2.4H_2O$ | 0,1 | 1,0 |
| $CoCl_2.6H_2O$ | 0,024 | 0,24 |
| $Na_2MoO_4.H_2O$ | 0,024 | 0,24 |
| NaCl | 1,0 | 10,0 |
| $CaCl_2.2H_2O$ | 0,1 | 1,0 |
| $ZnCl_2$ | 0,1 | 1,0 |
| $CuCl_3.2H_2O$ | 0,025 | 0,25 |
| $H_3BO_3$ | 0,01 | 0,1 |
| $Na_2SeO_3.5H_2O$ | 0,026 | 0,26 |
| $NiCl_2.6H_2O$ | 0,12 | 1,2 |

Adaptado de Santos (2003)[3]

### 5.1.5 Parâmetros físico-químicos e métodos de análise

Inicialmente, durante o período de adaptação do sistema, a amostragem foi realizada três vezes por semana, sempre coletando amostras do afluente e efluente. No entanto, após 50 dias de operação, o monitoramento passou a ser realizado ao longo de todo reator e somente uma vez por semana, já que este tipo de amostragem geralmente ocasiona certa desestabilização ao sistema.

---

[3] Fonte Original: ZINDER, S. H.; SOWERS, K.R.; FERRY,J.G. (1984) Methanosarcina thermophila s. Nov. a thermophilic, acetotrofic, methane-producing bacterium . *International Journal of Systematic Bacteryology,* 35: 522 – 523.

A decisão de realizar perfis semanais surgiu devido a uma reoxidação do nitrogênio devido a uma possível microaeração no segmento final do reator ou durante a coleta do efluente.

Os parâmetros analisados, assim como a metodologia utilizada se encontram detalhados na Tabela 5.

**Tabela 5** Parâmetros e metodologia de análise

| PARÂMETRO/UNIDADE | METODOLOGIA |
|---|---|
| pH | Potenciométrico |
| $N\text{-}NH_4^+$ (mg N. $l^{-1}$) | Titulométrico/Espectrofotométrico |
| $N\text{-}NO_2^-$ (mg N. $l^{-1}$) | Espectrofotométrico |
| $N\text{-}NO_3^-$ (mg N. $l^{-1}$) | Espectrofotométrico |
| [1] STA (g sólidos/g. espuma) | Gravimétrico |
| [2] SFA (g sólidos/g. espuma) | Gravimétrico |
| [3] SVA (g sólidos/g. espuma) | Gravimétrico |
| Composição do gás (%) | Cromatografia gasosa |
| Caracterização Morfológica | Microscopia Óptica |

1 Sólidos Totais Aderidos; 2 Sólidos Fixos Aderidos; 3 Sólidos Voláteis Aderidos

No início do experimento, quando somente se monitorou o afluente e efluente do reator, as concentrações de $N\text{-}NO_3^-$ (nitrogênio na forma de nitrato), $N\text{-}NO_2^-$ (nitrogênio na forma de nitrito) e $N\text{-}NH_4^+$ (nitrogênio amoniacal), foram determinadas de acordo com técnicas descritas no Standart Methods for Examination of Water and Wastewater (1998).

Com relação ao $N\text{-}NH_4^+$, para evitar possíveis perdas para a atmosfera na forma de $N\text{-}NH_3$, o volume necessário para análise era coletado em frascos separados e acidificado com 1 gota (± 50 $\mu l$) de ácido sulfúrico concentrado.

O metano contido na parte superior do reator foi monitorado a partir dos pontos de amostragem situados em L/D de 1, 10 e 19 que, posteriormente, serão citados como entrada, meio e saída do reator.

Para a análise da composição da atmosfera interna do reator foi utilizado cromatógrafo Gow-Mac com coluna Porapak Q, de 2 m de comprimento e diâmetro de ¼". O forno operou à temperatura de 50° C e o gás de arraste utilizado foi o hidrogênio.

Devido ao fato de não haver perdas consideráveis de sólidos, não foi preciso realizar análises dos mesmos.

No entanto, quando o monitoramento passou a ser realizado ao longo do reator, a concentração de $N\text{-}NH_4^+$ passou a ser determinada no FIA (Flow Injection Analysis) cuja técnica também se encontra descrita no Standart Methods for Examination of Water and Wastewater (1998), pois esta metodologia requer menor volume de amostra.

Para determinação das concentrações de $N\text{-}NO_3^-$ e $N\text{-}NO_2^-$ foi utilizado espectrofotômetro UV/VIS Perkinfelmer-lambda EZ150

### 5.1.6 Estudos Microbiológicos

#### 5.1.6.1 Acompanhamento morfológico

O acompanhamento das diferentes morfologias constituintes da biomassa ao longo do reator e ao longo do período de pesquisa, foi realizado através de microscopia óptica comum e de contraste de fase, em microscópico Olympus (BX 60).

Para isso, eram retiradas dos reatores pequenas quantidades de espuma contendo o material biológico a ser analisado. Quando necessário, a conservação do material para análise era feita sob refrigeração à temperatura de aproximadamente 4° C por período de até dois dias.

#### 5.1.6.2 Análises de Biologia Molecular

Além das análises de microscopia óptica, a diversidade microbiana também foi acompanhada por meio de técnicas de Biologia Molecular que compreenderam as seguintes etapas:

**(a) Extração de DNA da biomassa**

Esta etapa foi realizada de acordo com protocolo descrito por Griffiths *et al.* (2000), seguido pela purificação do DNA mediante a utilização do kit Wizard DNA Clean-UP System (Promega) de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante.

**(b) Amplificação por meio de reação de polimerização em cadeia (PCR).**

Depois de extraído, o material genético das amostras teve os fragmentos do gene de DNAr 16S, dos Domínios Archaea (*primer* 1100FGC-1400R) e Bacteria (*primer* 968FGC-1392R), amplificados utilizando-se a técnica de PCR.

Os *primers* para o Domínios Archaea e Domínio Bactéria utilizados no ensaio foram descritos por Kudo *et al.* (1997) e Nielsen *et al.* (1999).

As amplificações foram realizadas em termociclador "Gene Amp PCR System 2400" (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, Conn.).

**(c) Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)**

Para separação dos fragmentos amplificados obtidos na etapa (b) foi utilizado sistema DGGE-*D Code*$^{TM}$ - *Universal Mutation Detection System* (Bio-Rad, Inc., Hercules, Califórnia). O gradiente do gel desnaturante utilizado para o Domínio Archaea foi de 35-55 % enquanto que para o Domínio Bacteria, foi de 40-60 %.

Os géis foram corados com marcador Vistra Green e observados em sistema de ultravioleta Eagle Eye TMIII (Stratagene) acoplado a microcomputador e Software Eagle Sight.

O protocolo utilizado foi adaptado, de acordo com os equipamentos disponíveis, a partir do protocolo apresentado por Sakamoto (2001).

As amostras de biomassa retiradas ao longo do experimento foram separadas em dois grupos, o primeiro proveniente dos pontos de amostragem 1, 2 e 3 e o segundo dos pontos 4 e 5.

Optou-se em separar as amostras desta maneira devido às semelhanças nas morfologias presentes observadas na microscopia óptica. A seguir, a biomassa foi conservada em freezer à temperatura aproximada de -20$^{o}$ C por um período de tempo de aproximadamente 5 meses.

No caso particular da amostra de lodo utilizada para a inoculação do RAHLF, esta ficou armazenada sob as mesmas condições por um período de 9 meses.

## 5.2 Ensaios para determinação de consumo de metano

### 5.2.1 Sistema operado em batelada com recirculação de metano

#### 5.2.1.1 Instalação experimental

Após aproximadamente 120 dias de operação e próximo ao término da parte experimental ocorreu rompimento no corpo do RAHLF na região próxima à entrada, impossibilitando que outros ensaios complementares fossem realizados.

Devido a isso, novo sistema foi adaptado com o objetivo de tentar medir o consumo de metano durante o processo de desnitrificação para complementação de resultados.

Esse novo sistema, encontra-se esquematizado na Figura 6.

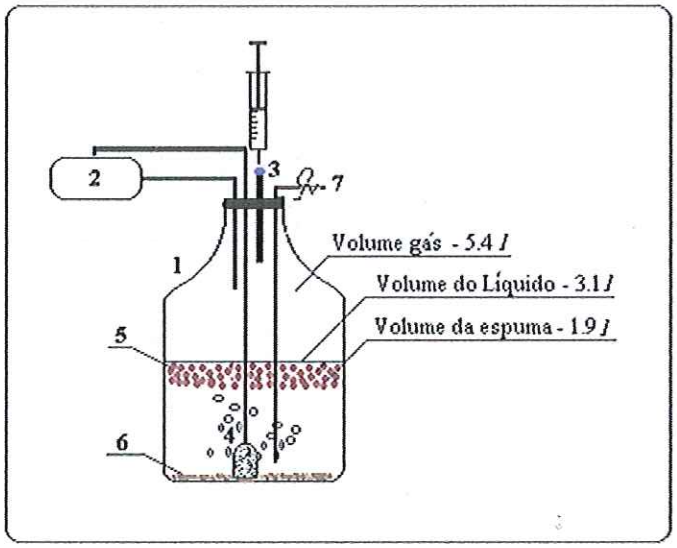


**Figura 6.** Esquema do sistema em batelada utilizado para medir metano consumido.(1) Reator anóxico, volume total 10,4 l, (2) Bomba de ar para recirculação do gás do *head space*, (3) Septo para amostragem de gás, (4) Pedra porosa (5) Espumas retiradas do RAHLF (6) Lodo desnitrificante, (7) Mangueira para amostragem de líquido.

O reator consistia de um recipiente de plástico com capacidade total aproximada de 10,4 *l*. Além disso, o gás no *head space* era recirculado e novamente introduzido no meio líquido através de uma pedra porosa mediante a utilização de uma bomba de ar adaptada para esse fim.

As amostras de gás do *head space* eram retiradas com uma seringa através de um septo adaptado ao sistema, enquanto que as amostras líquidas para análises

microbiológicas e físico-químicas eram retiradas com uma seringa a partir de uma mangueira.

A turbulência criada dentro do sistema pela recirculação do gás, não foi suficiente para garantir a homogeneização do sistema, porém, grande parte do material aderido à espuma desprendeu-se (6). Por isso, o cuidado em cada descarte foi redobrado para evitar perda de lodo.

Todo o sistema foi mantido em câmara climatizada a 27 °C e o ciclo de operação foi de aproximadamente 80 horas.

Na Figura 7 se encontra apresentada a foto do reator utilizado

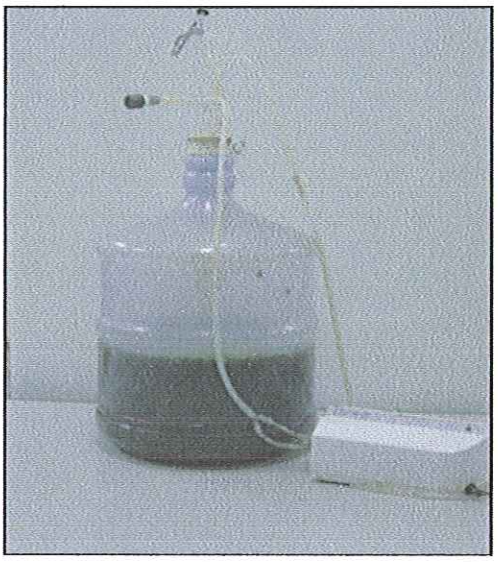

**Figura 7**. Foto do reator operado em sistema de batelada utilizado para medir o consumo de metano

**5.2.1.2 Inóculo**

O reator foi inoculado com o lodo desnitrificante, proveniente do RAHLF da etapa anterior.

Com o intuito de se garantir a presença de toda a biota aderida à matriz, optou-se por transferir a espuma do RAHLF diretamente para o novo reator. No entanto, somente foi utilizada a espuma que se encontrava na primeira metade do RAHLF, tendo em vista os resultados obtidos durante sua operação e apresentados nas seções 6.1.1, 6.1.2 e 6.1.3.

#### 5.2.1.3 Substrato Nitrificado Sintético

Nesta etapa, o substrato utilizado possuía as mesmas características que o da Fase 2 da etapa anterior e cujas características estão apresentadas nas Tabelas de 1 a 4.

#### 5.2.1.4 Fonte de Carbono

A fonte de carbono utilizada nesta etapa da parte experimental também foi o metano.

Após a inoculação do reator e adição do substrato nitrificado, a atmosfera do *head space* do reator era trocada, borbulhando-se metano (100%) por aproximadamente 20 minutos. Essa mesma rotina foi repetida para cada ciclo. O suplemento adicional de metano era realizado de acordo com o decaimento do gás, verificado por meio de cromatografia ao longo de cada ciclo.

#### 5.2.1.5 Parâmetros físico-químicos e métodos de análise

Os parâmetros analisados assim como a metodologia utilizada se encontram detalhados na Tabela 6.

**Tabela 6.** Parâmetros e metodologia de análise

| PARÂMETRO/ UNIDADE | METODOLOGIA |
|---|---|
| pH | Potenciométrico |
| $N\text{-}NH_4^+$ (mg N. $l^{-1}$) | Titulométrico |
| $N\text{-}NO_2^-$ (mg N. $l^{-1}$) | Espectrofotométrico |
| $N\text{-}NO_3^-$ (mg N. $l^{-1}$) | Espectrofotométrico |
| Composição do gás (%) | Cromatografia gasosa |
| Caracterização Morfológica | Microscopia Óptica |

Durante os primeiros 25 dias foram feitas análises diárias da concentração de $N\text{-}NO_3^-$, $N\text{-}NO_2^-$, composição do gás do *head space* e medido o pH. Neste período, como

não foi possível a utilização do FIA para as análises das concentrações de $N\text{-}NH_4^+$, as mesmas, não foram realizadas com a mesma freqüência.

Após esse período, o sistema entrou em equilíbrio dinâmico aparente, sendo então realizado perfil temporal.

Durante o perfil, foram determinadas as concentrações de $N\text{-}NO_3^-$, $N\text{-}NO_2^-$ e $N\text{-}NH_4^+$, analisada a composição do gás do *head space*, medido o pH e ainda realizadas análises da morfologia microbiana.

Depois de coletadas, as alíquotas com 15 m*l* de amostras eram centrifugadas por 5 minutos e à velocidade de 6000 rpm para separação do lodo. Imediatamente, uma parcela do sobrenadante era acidificada com 50 μ*l* de ácido sulfúrico concentrado e armazenada em geladeira para posterior determinação do $N\text{-}NH_4^+$ no FIA (Flow Injection Analysis), conforme o Standart Methods for Examination of Water and Wastewater (1998).

Os demais parâmetros foram analisados seguindo os mesmos protocolos das análises da primeira etapa.

#### 5.2.1.6 Estudos Microbiológicos

Nesta etapa as análises microbiológicas das morfologias presentes seguiram os mesmos protocolos descritos nos itens 5.1.6.1 e 5.1.6.2

Com relação ao tempo de conservação da biomassa, este foi de aproximadamente 4 meses, sob as mesmas condições que as anteriores.

### 5.2.2 Reatores anóxicos com diferentes concentrações de sólidos aderidos voláteis – utilização do *shaker*

#### 5.2.2.1 Reatores

Neste ensaio, optou-se por trabalhar com recipientes menores para a montagem dos reatores, utilizando-se frascos de vidro com capacidade volumétrica de 400 m*l*, dispostos em *shaker* submetido à velocidade rotacional de 45 rpm e temperatura constante de 30 $^{o}$C.

Foram utilizados três grupos de reatores, sendo que cada grupo, foi inoculado com diferentes quantidades de espuma. No final do ensaio foi determinada a massa seca de espuma limpa utilizada, assim como a massa de sólidos voláteis aderidos. Para esse

ultimo cálculo, foi levado em consideração o valor médio de sólidos voláteis aderidos por grama de espuma determinados anteriormente, no final do experimento realizado com o RAHLF.

O experimento foi realizado em duplicata, inclusive os reatores controle, perfazendo o total de doze reatores.

Após serem inoculados e receberem 300 ml de substrato nitrificado sintético, cujas características foram às mesmas que no primeiro ensaio, os reatores foram devidamente fechados e a atmosfera dos mesmos substituída por gás metano, introduzindo-o e retirando-o dos frascos mediante a utilização de agulhas por aproximadamente 20 minutos, enquanto que os controles receberam nitrogênio pelo mesmo processo e período de tempo. Logo após, foram feitas as análises químicas e de gás, cujos resultados foram considerados como correspondentes ao instante t= 0.

Na Figura 8 se encontra esquematizado a metodologia utilizada.

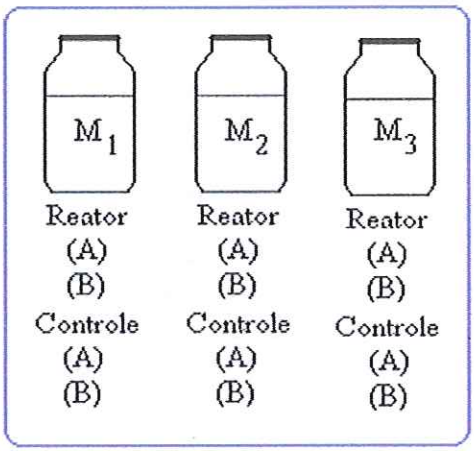


**Figura 8.** Esquema da metodologia utilizada. $M_1$, $M_2$, $M_3$ = massas de sólidos voláteis aderidos, sendo $M_1 > M_2 > M_3$.

Na Figura 9 é apresentada a foto dos reatores utilizados no ensaio.

**Figura 9.** Foto dos reatores utilizados para medir o consumo de metano.

### 5.2.2.2 Inóculo

O inóculo utilizado nesta etapa foi proveniente do ensaio anterior (batelada), que se encontrava conservado sob refrigeração à temperatura de aproximadamente 4° C por um período de 30 dias. Devido a isso, foi preciso, primeiramente, readaptá-lo às condições do processo de desnitrificação com a utilização do metano.

Para alcançar o objetivo, foi utilizada uma coluna de aproximadamente 60 cm de altura, 2 cm de diâmetro e capacidade volumétrica (vazia) de 160 m*l*.

O esquema e a foto da coluna se encontram apresentados na Figura 10.

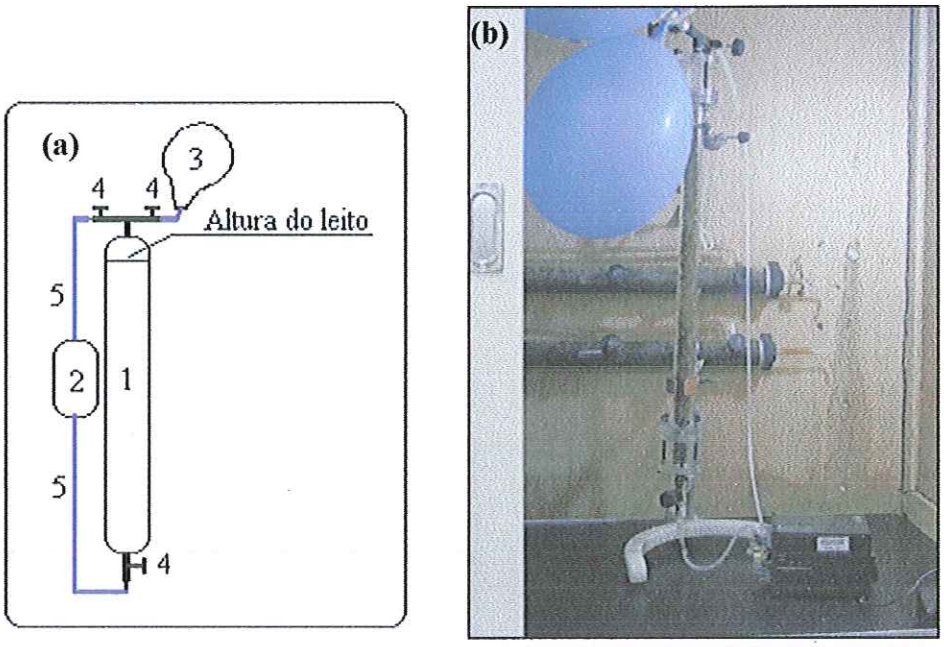


**Figura 10. (a)** Esquema da coluna para readaptação do inóculo desnitrificante. (1) coluna, (2) bomba de ar para recirculação do metano, (3) Balões de gás contendo metano, (4) válvula agulha, (5) mangueira de silicone; **(b)** foto da coluna

O sistema foi operado em batelada com ciclos de 24 h durante 20 dias. Ao término de cada ciclo, eram determinadas as concentrações das diferentes formas de nitrogênio seguindo os mesmos protocolos das análises anteriores..

A coluna foi praticamente toda preenchida com as espumas provenientes do reator utilizado no ensaio anterior sem, no entanto, promover à compactação do leito. O volume da coluna passou a ser de aproximadamente 100 m*l*.

Em sua parte superior, foi deixado um espaço de aproximadamente 5cm (*head space*). Além disso, foi utilizada bomba de ar (2) para efetuar a recirculação do metano da parte superior da coluna para sua parte inferior, por onde também era colocado e retirado o substrato.

No 21º dia de operação foram retiradas amostras para a realização dos estudos microbiológicos descritos nas seções 5.1.6.1 e 5.1.6.2.

.Nesta etapa, também foram realizadas análises de microscopia de varredura para poder avaliar se o material que seria utilizado no ensaio se encontrava bem colonizado já que no ensaio anterior boa parte do material havia se desprendido das matrizes.

O material restante foi utilizado para a incubação dos reatores que foram utilizados no ensaio anteriormente apresentado na seção 5.2.2.

#### 5.2.2.3 Substrato e fonte de carbono

O substrato utilizado possuía as mesmas características que ao do ensaio anterior, cujas características se encontram apresentadas nas Tabelas 1 a 4.

Da mesma forma, a fonte de carbono foi unicamente gás metano.

#### 5.2.2.4 Parâmetros físico-químicos e métodos de análise

Após a inoculação dos reatores, os mesmos foram mantidos em um *shaker* sob velocidade rotacional de 45 rpm e temperatura de 30° C, por um período de 60 horas.

Foram retiradas amostras ao longo deste período para determinação das concentrações das diferentes formas de nitrogênio. Todas as análises foram feitas de acordo com o Standart Methods for Examination of Water and Wastewater (1998). Paralelamente, foi analisada também a composição da atmosfera dos reatores por cromatografia de gás.

#### 5.2.2.5 Estudos microbiológicos

O protocolo seguido foi o mesmo ao apresentado no item 5.1.6.1 e 5.1.6.2, o tempo de conservação da biomassa foi de aproximadamente 3 meses, sob as mesmas condições que as anteriores.

Nesta etapa, também foram realizadas análises de microscopia óptica de varredura seguindo protocolo descrito por Terán (1995).

# 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 6.1 RAHLF

### 6.1.1 Fase 1 – Utilização de substrato sintético nitrificado com concentração de N-$NO_3^-$ igual a 20 mg.$l^{-1}$

Durante os primeiros 40 dias de operação com tempo de detenção hidráulica (TDH) de 4 horas, observou-se baixa eficiência de remoção de N-$NO_3^-$ (Figura 11). Por outro lado, análises da composição do gás na parte superior do reator (Figura 12) revelaram a presença de metano em toda sua longitude, afastando a hipótese de que tal eficiência fosse decorrente da falta de fonte de carbono.

Desta forma, com o objetivo de diminuir a concentração de N-$NO_3^-$ no efluente do reator, o TDH foi aumentado para 12 horas, refletindo diretamente na detecção do metano ao longo do reator, como mostrado na Figura 12, sem no entanto, melhorar sua eficiência na remoção de N-$NO_3^-$ (Figura 11)

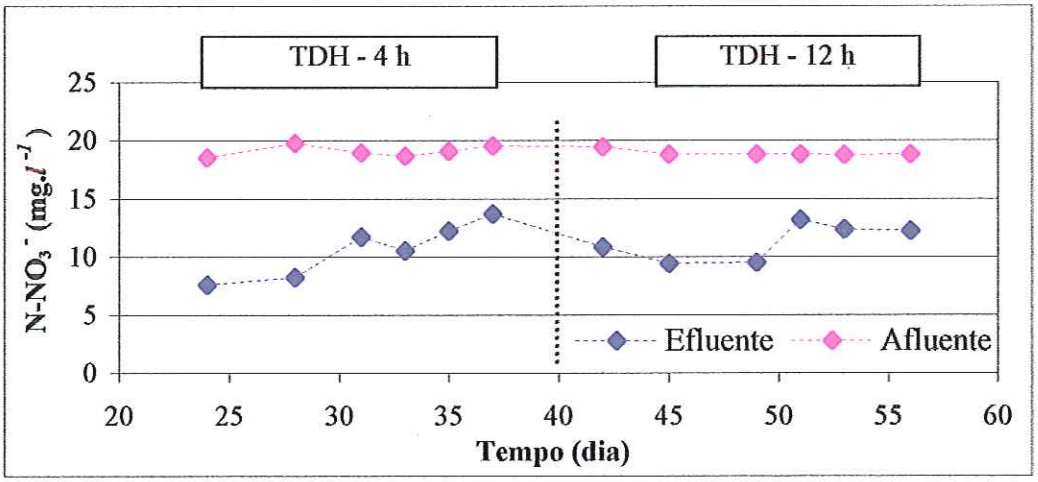


**Figura 11.** Concentração de N-$NO_3^-$ (mg.$l^{-1}$) no afluente e efluente do reator em diferentes TDH.

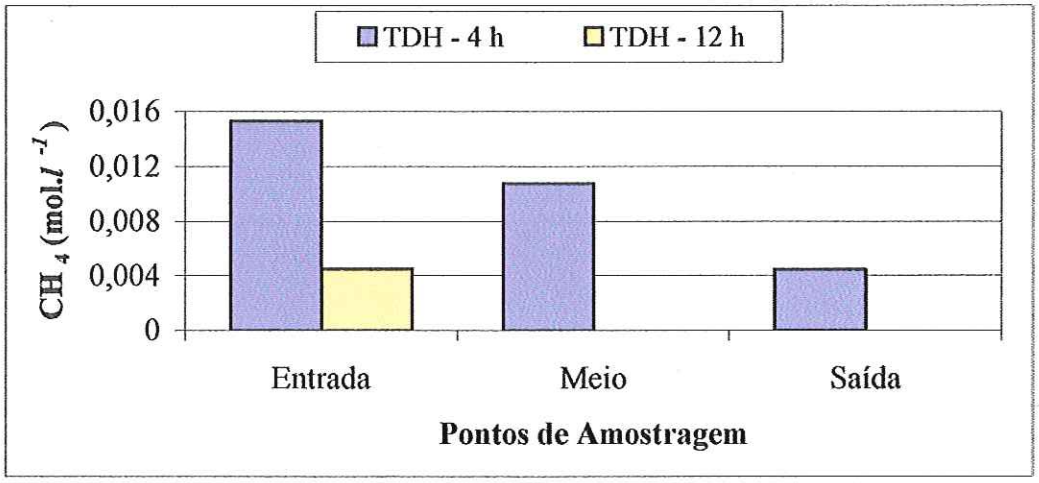


**Figura 12.** Metano ao longo do reator e em diferentes TDH.

Além das análises para determinação de $N\text{-}NO_3^-$, também foram realizadas análises de $N\text{-}NH_4^+$ e $N\text{-}NO_2^-$, que se encontram apresentadas nas Figuras 13 e 14, respectivamente.

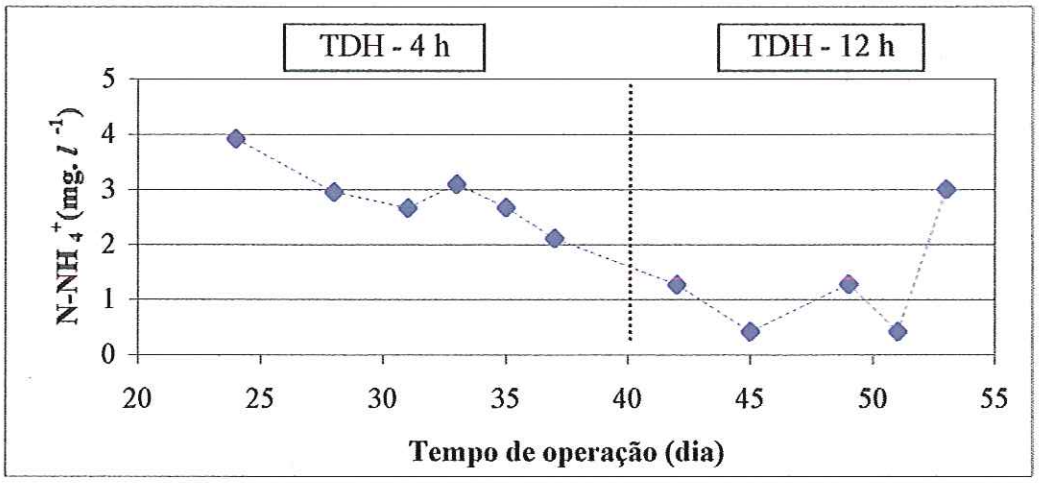


**Figura 13.** Concentração de $N\text{-}NH_4^+$ ($mg.l^{-1}$) no efluente do reator em diferentes TDH.

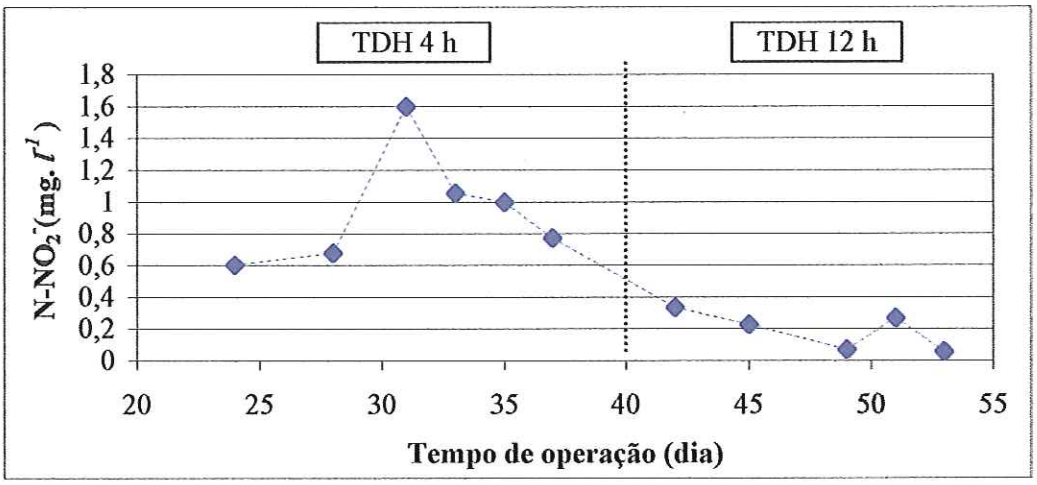


**Figura 14.** Concentração de $N\text{-}NO_2^-$ ($mg.l^{-1}$) no efluente do reator em diferentes TDH.

Devido aos elevados resultados da concentração de $N\text{-}NO_3^-$ obtidos durante o monitoramento, foi realizado um perfil espacial no reator após 50 dias de operação para certificar-se de que realmente o sistema não estava respondendo adequadamente à remoção de nitrato e novamente repetido quatro dias depois.

Os resultados obtidos para as concentrações de $N\text{-}NO_3^-$, $N\text{-}NO_2^-$, e $N\text{-}NH_4^+$ estão apresentados nas Figuras 15 a 17. Tais resultados correspondem à média dos dois perfis, que não apresentaram variações significativas.

Como pode ser observado comparando-se as Figuras 11 e 15, o monitoramento somente na entrada e saída do reator não estava representando sua eficiência real.

Com relação à transformação de $N\text{-}NO_3^-$, pode-se verificar na Figura 15, que aproximadamente 80 % da concentração inicial de nitrato foi transformado até o ponto de amostragem 5. Porém, a partir desse ponto, até o final do reator, houve uma reoxidação do nitrogênio reduzido, devido, possivelmente, à ocorrência de zonas microaeradas na parte final do reator ou durante o momento da coleta do efluente ou devido à formação de caminhos preferenciais no reator.

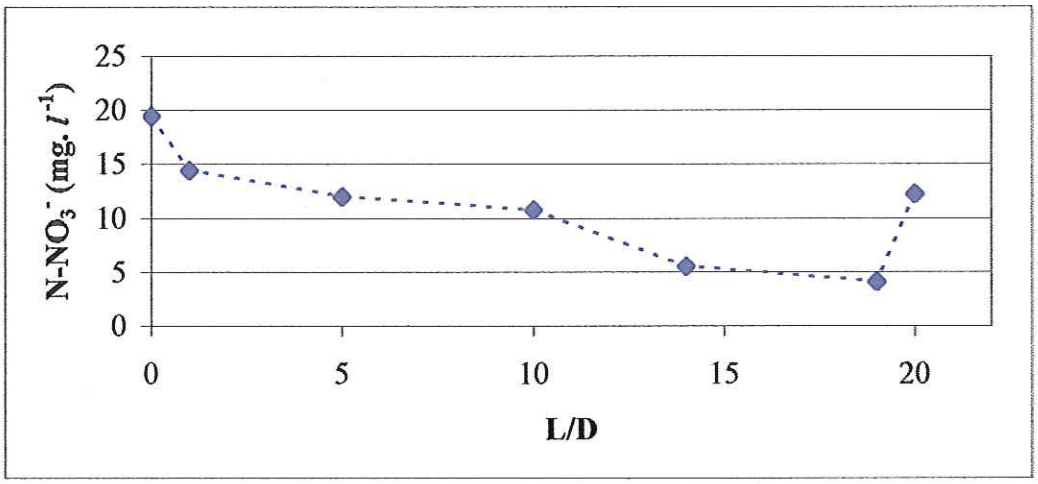


**Figura 15.** Perfil espacial da concentração de $N\text{-}NO_3^-$ ($mg.l^{-1}$) após cinqüenta dias de operação e TDH de 12 horas. L/D = localização dos pontos de amostragem ao longo do reator

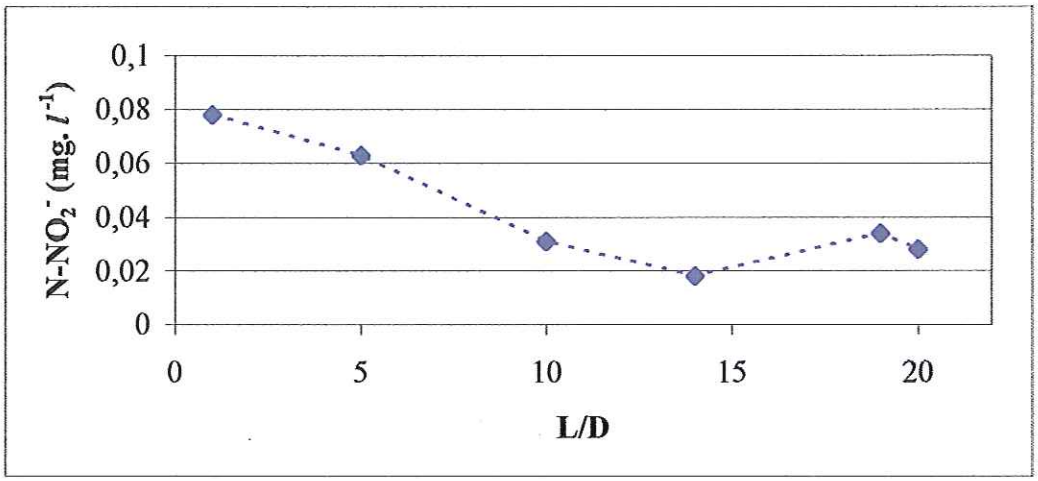


**Figura 16.** Perfil espacial da concentração de $N\text{-}NO_2^-$ ($mg.l^{-1}$) após cinqüenta dias de operação e TDH de 12 horas. L/D = localização dos pontos de amostragem ao longo do reator

Outro fator que chamou a atenção foi a alta concentração de $N\text{-}NH_4^+$ em pontos localizados na parte intermediária do reator, como mostrado na Figura 17.

Tais concentrações levantaram a suspeita de que, ao invés de o reator estar removendo $N\text{-}NO_3^-$ pelo processo de desnitrificação, o mesmo estaria efetuando a rota dissimilativa de redução do nitrato à amônia.

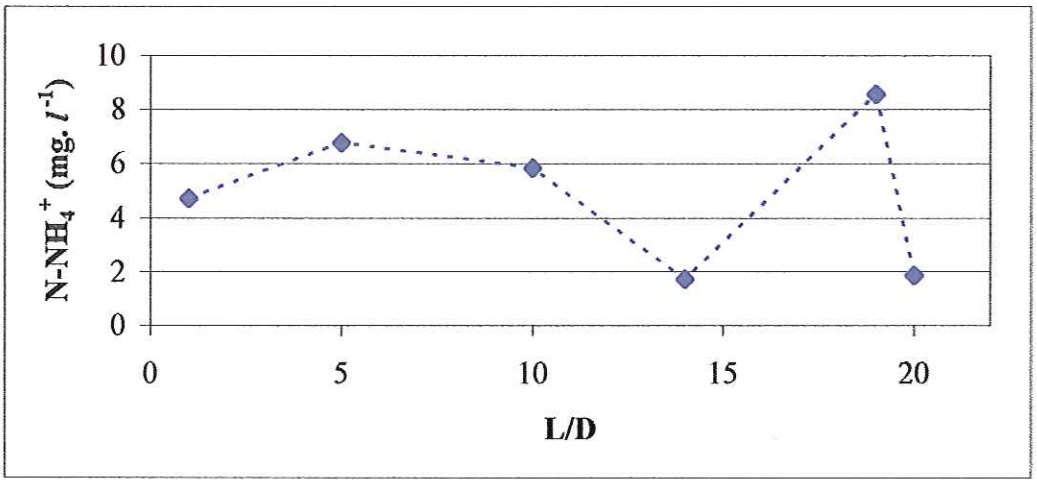


**Figura 17.** Perfil espacial da concentração de $N\text{-}NH_4^+$ ($mg.l^{-1}$) após cinqüenta dias de operação e TDH de 12 horas. L/D = localização dos pontos de amostragem ao longo do reator

Essa hipótese pode ser mais bem avaliada na Figura 18 onde se encontram os resultados dos valores acumulados de $N\text{-}NO_3^-$ que foi reduzido (N- nitrato) ao longo do reator, juntamente com as variações nas concentrações de $N\text{-}NH_4^+$ (N-amoniacal)

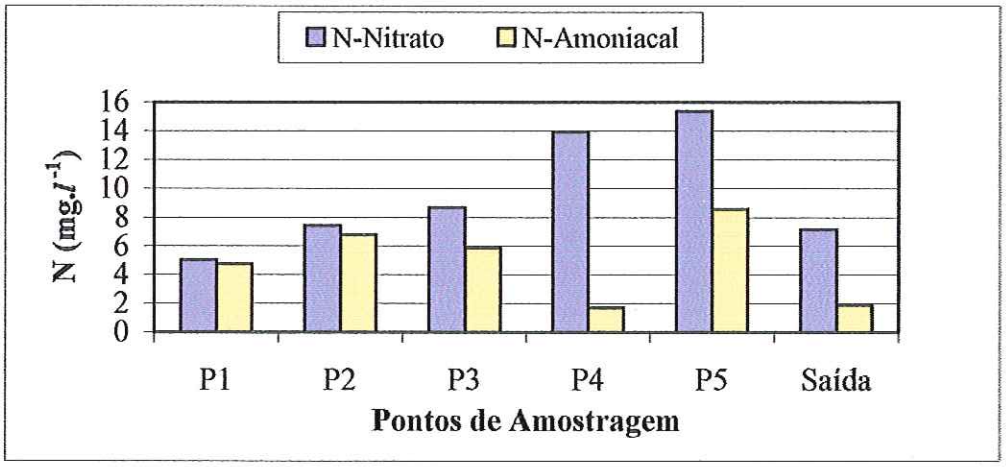


**Figura 18.-** Resultados comparativos entre os valores acumulados de $N\text{-}NO_3^-$ ($mg.l^{-1}$) que foi reduzido ao longo do reator e a variação da concentração de $N\text{-}NH_4^+$($mg.l^{-1}$) .

Como pode ser observado na Figura 18, no ponto de amostragem P1, onde foi coletada a primeira amostra, houve a redução de aproximadamente $5mg.l^{-1}$ de $N\text{-}NO_3^-$ e a concentração de $N\text{-}NH_4^+$ formada no mesmo ponto foi praticamente a mesma. Tal comportamento se repetiu, também, no segundo ponto de amostragem (P2).

Este resultado levanta a hipótese de que a redução dissimilativa do nitrato à amônia estivesse ocorrendo, em vez da desnitrificação, devido, provavelmente, a uma

relação desfavorável C/N pontos no interior do reator. No entanto, não foi possível medir diretamente a concentração de metano dissolvido ao longo do reator para comprovar essa hipótese.

Devido a isso, foram aplicados os dados teóricos da solubilidade do metano em água pura à temperatura média do efluente do reator, que se manteve em 24° C ± 0,5 ° C, na equação estequiométrica teórica da redução do nitrato utilizando o metano como doador de elétrons (eq. 4), apresentada por Islas-Lima *et al.* (2003)

$$5CH_4 + 8NO_3^- \rightarrow 4N_2 + 8OH^- + 5CO_2 + 6H_2O \qquad \Delta G^0 = -960 \text{ kJ mol}^{-1} \quad (4)$$

De acordo com a Equação 4, para cada 112 g de $N\text{-}NO_3^-$ a ser reduzido se necessitaria de 80 g de metano. Levando em consideração que o substrato sintético apresentava concentração de 0,02 $g.l^{-1}$ de $N\text{-}NO_3^-$, a concentração teórica de metano necessária seria de 0,014 $g.l^{-1}$. No entanto, fixando temperatura de 24° C, no reator a solubilidade aproximada deste gás seria de 0,025$g.l^{-1}$, ou seja, o substrato poderia conter fonte de carbono em excesso com relação à quantidade de nitrato adicionado, proporcionando, assim, condição favorável para ocorrência da redução dissimilativa do nitrato à amônia (RDNA).

Segundo Tiedje (1988), em um ambiente onde há concentração limitada de $N\text{-}NO_3^-$, a necessidade de canalizar a transferência de elétrons envolvidos no processo de desnitrificação faz com que a RDNA ocorra.

Por outro lado, o processo de redução do nitrato à amônia para assimilação celular poderia estar descartado, já que, de acordo com Madigan *et al.* (1997), tal processo é comum acontecer quando no meio reacional há carência de nitrogênio amoniacal. Porém, neste caso, o substrato continha aproximadamente 4 $mg.l^{-1}$de $N\text{-}NH_4^+$ disponíveis para assimilação.

Outro ponto a ser analisado ao interpretar os resultados da Figura 18 é a brusca diminuição da concentração de $N\text{-}NH_4^+$ no ponto P4, juntamente com um aumento na concentração de $N\text{-}NO_3^-$ que foi reduzido. Esse fato chama a atenção, pois, quanto mais próximo ao final do reator, mais escassa seria a concentração de metano disponível para o processo, sendo de se esperar que a concentração de $N\text{-}NO_3^-$ reduzido também diminuísse.

Neste caso, a queda na concentração de $N\text{-}NH_4^+$ do meio, juntamente com a elavada concentração de $N\text{-}NO_3^-$ que foi reduzido, poderia ter as seguintes explicações:

1) Na parte final do reator, devido à baixa concentração de metano, parte do N-$NH_4^+$ teria sido utilizado (como doador de elétrons) no processo de desnitrificação. Essa hipótese pode ser sustentada por resultados encontrados por Mulder *et al.* (1995), que, ao pesquisarem o processo de desnitrificação em reatores operados em sistema de batelada, constataram a utilização do nitrogênio amoniacal como doador de elétrons no processo de desnitrificação, apesar de a concentração de nitrito estar sempre abaixo dos limites de detecção de seus equipamentos.

Tal processo encontra-se representado na Equação 5.

$$3NO_3^- + 5NH_4^+ \rightarrow 4N_2 + 9H_2O + 2H^+ \qquad \Delta G^0 = -297 \text{ kJ mol}^{-1} \qquad (5)$$

2) Outra hipótese seria a de que, no início do reator, a relação C/N favoreceu o processo de redução dissimilativa do nitrato à amônia, que teria sido utilizada na parte final do reator como doador de elétrons para a redução do sulfato, conforme a Equação 6. Essa hipótese foi analisada por Fdz-Polanco *et al* (2001), em estudos realizados durante o tratamento da vinhaça em um reator anaeróbio de leito fluidificado que, após analisarem as concentrações dos diferentes compostos de nitrogênio e enxofre e o subseqüente balanço de massa dos mesmos nos meios líquido e gasoso, constataram uma evolução incomum na concentração dos mesmos no reator.

$$SO_4^{2-} + 2NH_4^+ \rightarrow S + N_2 + 4H_2O \qquad \Delta G^0 = -47{,}8 \text{ kJ mol}^{-1} \qquad (6)$$

Paralelamente à redução do sulfato, outros microrganismos poderiam estar utilizando os compostos reduzidos de enxofre como fonte complementar de elétrons para o processo de desnitrificação. De acordo com Koenig e Liu, (2001), o exemplo da desnitrificação autotrófica utilizando *Thiobacillus denitrificans* pode ser uma alternativa à desnitrificação heterotrófica quando a fonte de carbono se encontra escassa. Tal processo se encontra representado pela Equação 7.

$$NO_3^- + 1{,}1S + 0{,}4CO_2 + 0{,}76H_2O + 0{,}08NH_4^+ \xrightarrow{\text{Thiobacillus denitrificans}} 0{,}5N_2 + 1{,}10SO_4^{2-} + 1{,}28H^+ + 0{,}08C_5H_7O_2N \qquad (7)$$

Essa última hipótese foi levantada a partir dos resultados de microscopia óptica obtidos durante o monitoramento do reator, onde, como mostrado na Figura 19, foram encontrados microrganismos fototróficos anoxigênicos que utilizam compostos reduzidos de enxofre para seu crescimento.

Os resultados de sólidos fixos aderidos à espuma determinados ao longo do reator na etapa final do experimento (Figura 20), mostraram pequenas variações nas concentrações destes sólidos. Tais variações poderiam ter sido resultantes da formação e posterior consumo de enxofre elementar.

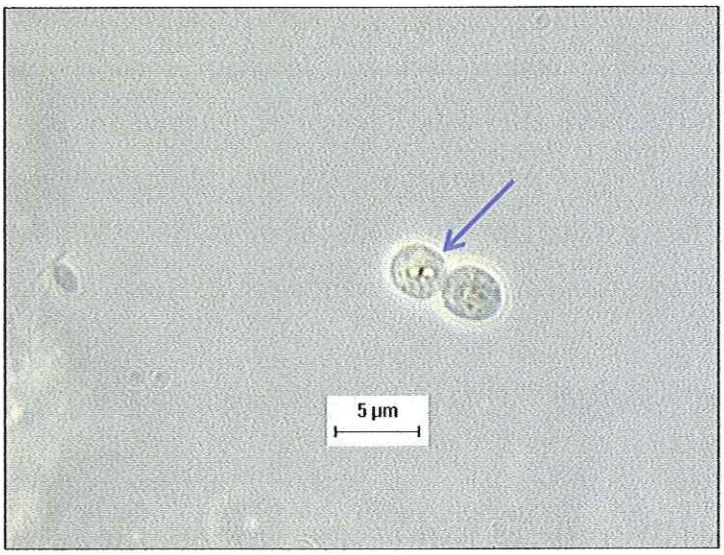


**Figura 19.** Presença de microrganismos fotoanoxigênicos. Amostra retirada do ponto de amostragem 3 do reator, após três meses de operação. Os pequenos pontos amarelados dentro da célula podem ser depósitos de enxofre.

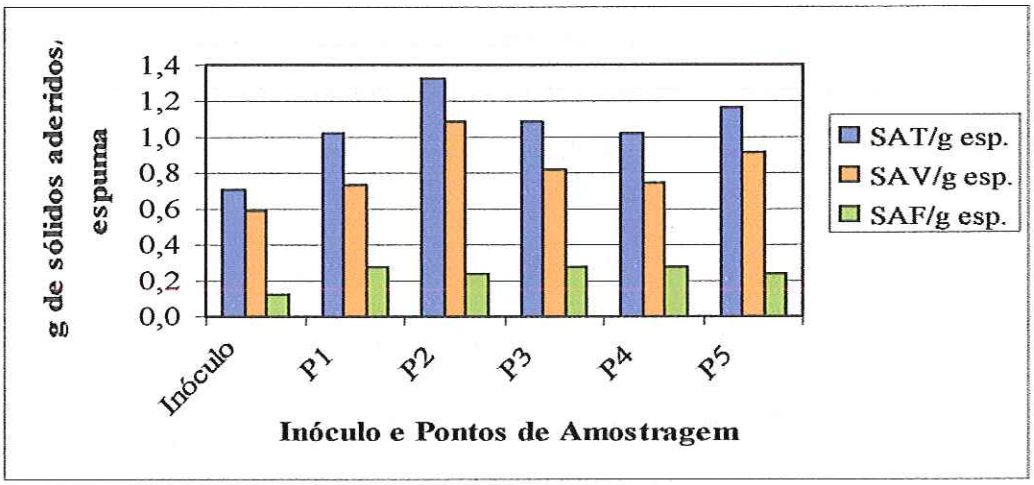


**Figura 20.** Variação de sólidos aderidos à espuma ao longo de reator, na etapa final da parte experimental. Na Figura: SAT/g esp. = sólidos aderidos totais/g de espuma; SAV/g esp. = sólidos aderidos voláteis/g de espuma; SAF/g esp. = sólidos aderidos fixos/g de espuma.

De acordo com Madigan *et al.* (1997), muitos microrganismos fototróficos anoxigênicos podem crescer autotroficamente utilizando $CO_2$ como fonte de carbono e

compostos reduzidos de enxofre como doadores de elétrons, em condições anaeróbias e na presença de luz.

A possibilidade de presença de luz no reator não é um fato remoto já que, apesar de o mesmo ter sido mantido em câmara escura, cabe aclarar que a mesma não era mantida fechada 100 % do tempo, ocasionando a entrada de luz no ambiente.

Uma terceira hipótese, também levantada devido à presença de bactérias fototróficas, seria a de que, no início do reator, tanto o sulfato como o nitrato estivessem sendo reduzidos na presença de metano, e, posteriormente, as formas reduzidas de enxofre, tais como $HS^-$ e $SO_3^{2-}$, eram novamente oxidadas a sulfato ($SO_4^{2-}$) por microrganismos quimiolitotróficos que utilizavam o nitrato remanescente como receptor de elétrons.

A Equação 8, apresentada por Mulder *et al.* (1995), representa parte da hipótese proposta.

$$8NO_3^- + 5HS^- + 3H^+ \rightarrow 4N_2 + 5SO_4^{2-} + 4H_2O \qquad \Delta G^0 = \text{-3721 kJ/reação} \qquad (8)$$

Com relação à redução do sulfato na presença de metano, estudos *in situ* realizados por Iversen e Jorgensen (1985), utilizando sulfato e metano marcados ($^{35}SO_4^{-2}$ e $^{14}CH_4$) demonstraram a oxidação anaeróbia do metano enquanto que Valentine e Reeburgh (2000), propuseram, para esse processo, mecanismo que envolve a participação de árqueas oxidantes de metano e bactérias redutoras de sulfato. Esse mecanismo se encontra apresentado nas Equações 9, 10 e 11, sendo essa última, a equação global do processo.

$$CH_4 + HCO_3^- \rightarrow CH_3COO^- + H_2O \qquad \Delta G^0 = +31{,}0\ kJ.mol^{-1} \qquad (9)$$

$$CH_3COO^- + SO_4^{2-} \rightarrow 2HCO_3^- + HS^- \qquad \Delta G^0 = -47{,}3\ kJ.mol^{-1} \qquad (10)$$

$$CH_4 + SO_4^{2-} \rightarrow HCO_3^- + HS^- + H_2O \qquad \Delta G^0 = -16{,}6\ kJ.mol^{-1} \qquad (11)$$

Apesar de a oxidação do sulfato na presença de nitrato ser considerada improvável pela termodinâmica, pesquisadores como Awadallah *et al.* (1998), conseguiram remover simultaneamente, por meio de processos biológicos, nitrato, nitrito, sulfato e DQO de águas residuárias provenientes de indústria de fertilizantes.

No entanto, esta última hipótese somente explicaria à elevada redução de N-$NO_3^-$ na parte final do reator, sem explicar a diminuição de N-$NH_4^+$.

Na Tabela 7, encontram-se apresentados os resultados do perfil de pH realizado ao longo do reator .

**Tabela 7.** Valores de pH ao longo do reator

| Entrada | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | Saída |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 7,85±0,02 | 7,94±0,02 | 8.02±0,02 | 8,01±0,02 | 8,01±0,02 | 8,00±0,02 | 7,62±0,02 |

### 6.1.2 Fase 2 – Utilização de substrato nitrificado sintético com concentração de N-$NO_3^-$ igual a 40 mg.$l^{-1}$

Como os resultados dos primeiros perfis demonstraram a possibilidade de estar havendo preferencialmente a utilização da rota metabólica de redução do nitrato a amônia ao invés da rota desnitrificante e sendo o provável motivo a alta relação C/N ($CH_4$/N-$NO_3^-$), optou-se, então, por aumentar a concentração de N-$NO_3^-$, que passou de 20 mg. $l^{-1}$ para 40 mg. $l^{-1}$, sem fazer qualquer alteração no fornecimento de metano.

Desta forma, foi possível verificar se a hipótese de que a relação C/N no meio estava desfavorável para o processo era verdadeira.

Na Figura 21 são apresentados os resultados da concentração acumulada de N-$NO_3^-$ (N-Nitrato) que foi reduzido ao longo do reator e as variações das concentrações de N-$NH_4^+$ (N-Amoniacal), obtidos durante o período de monitoramento nesta segunda fase.

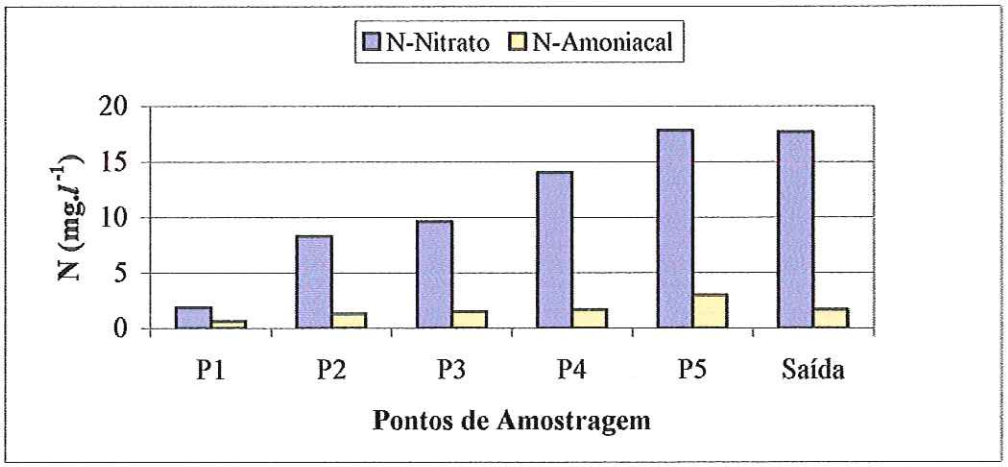


**Figura 21.** Resultados comparativos entre os valores acumulados de N-$NO_3^-$ (mg.$l^{-1}$) que foi reduzido ao longo do reator e a variação da concentração de N-$NH_4^+$ (mg.$l^{-1}$).

Como pode ser observado, o aumento na concentração de N-$NO_3^-$, alterando, assim, a relação C/N, refletiu, como esperado, no perfil da concentração de N-$NH_4^+$ ao

longo do reator. Esses resultados podem sustentar a hipótese de que, na Fase 1, a concentração de metano dissolvido estava em excesso com relação à concentração de N-$NO_3^-$, fato este que, provavelmente, ocasionou o desvio na rota metabólica.

A comparação entre a variação da concentração de N-$NH_4^+$(mg.$l^{-1}$) nas duas fases encontra-se apresentada na Figura 22.

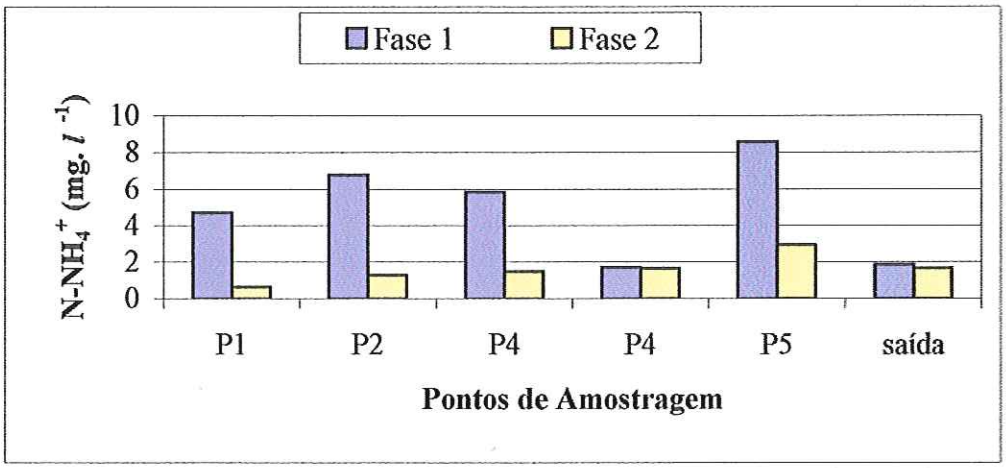


**Figura** 22. Comparação entre a variação da concentração de N-$NH_4^+$ (mg.$l^{-1}$) ao longo do reator durante cada fase. Fase 1 – 20mg.$l^{-1}$ de N-$NO_3^-$; Fase 2 – 40mg.$l^{-1}$ de N-$NO_3^-$

Como pode ser visto, durante a primeira fase, as concentrações de N-$NH_4^+$ foram bem mais elevadas do que na fase 2. Por outro lado, como a concentração de N-$NH_4^+$ na segunda fase teve uma variação pequena ao longo de todo reator, neste caso, sua utilização como doador de elétrons, na parte final do reator, onde provavelmente havia muito pouco metano, ficaria descartada.

Desta maneira, a hipótese de que compostos reduzidos de enxofre tenham sido utilizados como de fonte alternativa de elétrons, poderia explicar tal fato.

Os valores médios de pH ao longo do reator nos diferentes pontos de amostragem encontram-se apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8.** Variação do pH ao longo do reator durante a fase 2.

| Entrada | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | Saída |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 7,68±0,02 | 7,71±0,02 | 7,83±0,02 | 7,83±0,02 | 7,87±0,02 | 7,87±0,02 | 7,77±0,02 |

Também foi feita a comparação entre os perfis espaciais da concentração de N-$NO_3^-$ (mg.$l^{-1}$) que foi reduzida longo do reator durante cada fase, com o objetivo de

comparar as velocidades de redução entre cada fase. Os resultados se encontram apresentados na Figura 23.

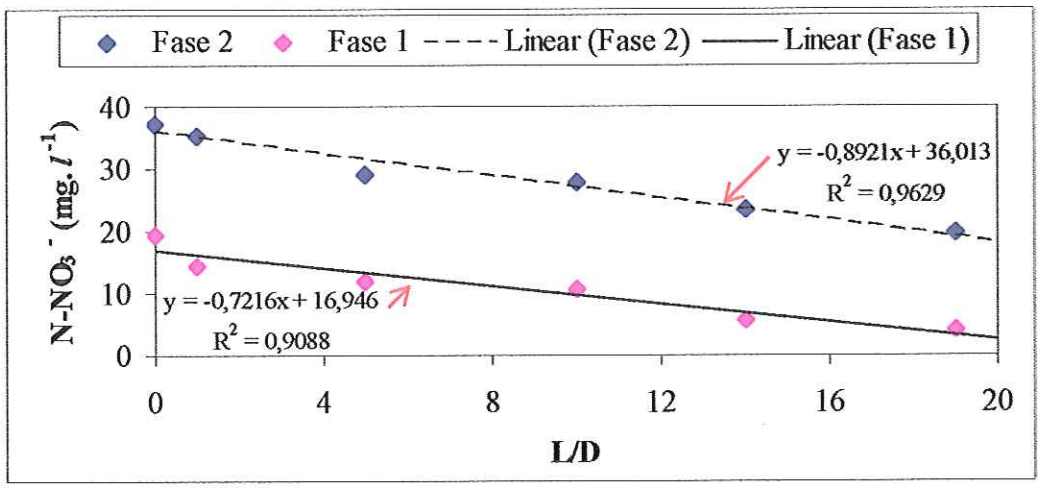


**Figura 23.** Comparação entre as concentrações de $N\text{-}NO_3^-$ ($mg.l^{-1}$) durante as diferentes fases de operação. L/D = localização dos pontos de amostragem ao longo do reator

Como pode ser observado, desconsiderando-se o último ponto referente à saída do reator, os perfis das contrações de $N\text{-}NO_3^-$ ao longo do reator foram semelhantes em ambas fases, no entanto, a diferença entre as velocidades de redução do $N\text{-}NO_3^-$ em cada fase, representadas pelos coeficientes angulares das retas, pode ser devido à provável predominância de diferentes rotas metabólicas em cada fase, anteriormente discutidas.

No entanto, esses resultados ainda são relativamente vagos com relação à participação do metano, direta ou indiretamente, no processo de desnitrificação.

Devido a isso, são apresentados, a seguir, os resultados obtidos em duas diferentes situações nas quais a suplementação de metano foi diminuída mediante: (a) retirada da pedra porosa utilizada para melhorar a solubilização do metano no meio, (Figura 24); e (b) interrupção da recirculação de metano no reservatório de substrato (Figura 25)

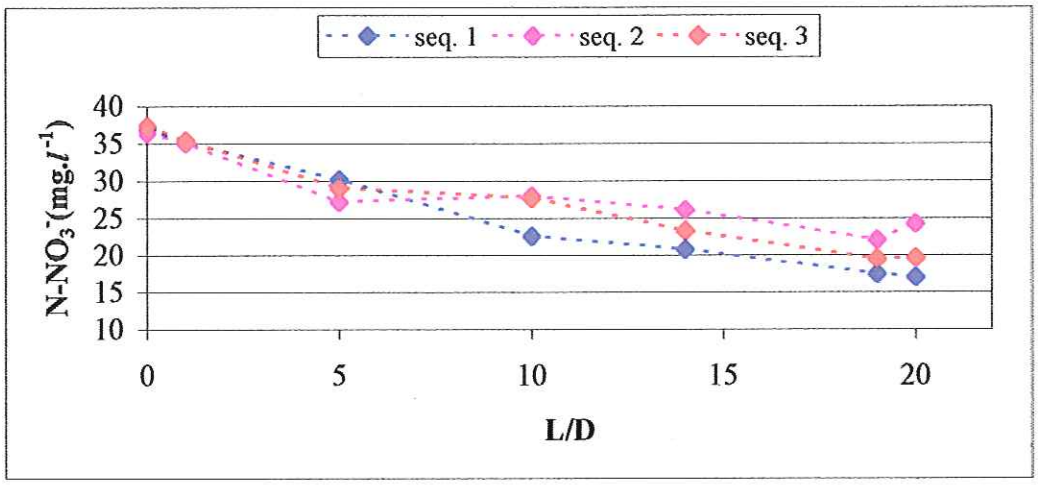


**Figura 24.** Concentração de $N\text{-}NO_3^-$ ($mg.l^{-1}$) na presença e ausência da pedra porosa ao longo do reator. L/D = localização dos pontos de amostragem ao longo do reator

Na Figura 24 são apresentados os resultados das concentrações médias de $N\text{-}NO_3^-$ ($mg.l^{-1}$) ao longo do reator para as seguintes situações:

I) Seqüência 1 - apresenta os resultados da concentração média de $N\text{-}NO_3^-$ ao longo do reator após ter sido estabelecido o equilíbrio dinâmico aparente.

II) Seqüência 2 - mostra a resposta imediata do reator para a redução do $N\text{-}NO_3^-$, após a retirada da pedra porosa de dentro do recipiente de alimentação

III) Seqüência 3 – resultado da concentração média de $N\text{-}NO_3^-$ após a reintrodução de uma pedra porosa (nova e de menor tamanho) no recipiente de alimentação, durante vinte dias de monitoramento.

Como pode ser observado, a retirada da pedra porosa ocasionando a diminuição na concentração de metano dissolvido no meio líquido, teve reflexos imediatos na resposta do reator com relação à concentração de $N\text{-}NO_3^-$. Porém, tal eficiência não foi afetada nos pontos iniciais alocados nas posições L/D = 1 e 5, ao contrário dos demais pontos, provavelmente porque a concentração de metano disponibilizada pela recirculação de gás sem a presença da pedra porosa ainda foi suficiente para manter a atividade metabólica dos microrganismos.

Por outro lado, quando a nova pedra porosa foi colocada, a eficiência do reator voltou a melhorar sem, no entanto, atingir o seu valor máximo anterior, devido, provavelmente, à menor capacidade da pedra porosa na formação de bolhas (detectada visualmente) em decorrência do seu menor tamanho e ao fato desta ser nova.

Em outras situações, durante a segunda fase, também houve ocasiões em que o fornecimento de metano foi praticamente interrompido, já que a falta de recirculação do gás no reservatório de substrato, diminuía bruscamente sua solubilização.

Na Figura 25 são apresentados os resultados da concentração de $N\text{-}NO_3^-$ ($mg.l^{-1}$) obtidos na saída do reator nas vezes em que o fornecimento de metano foi prejudicado.

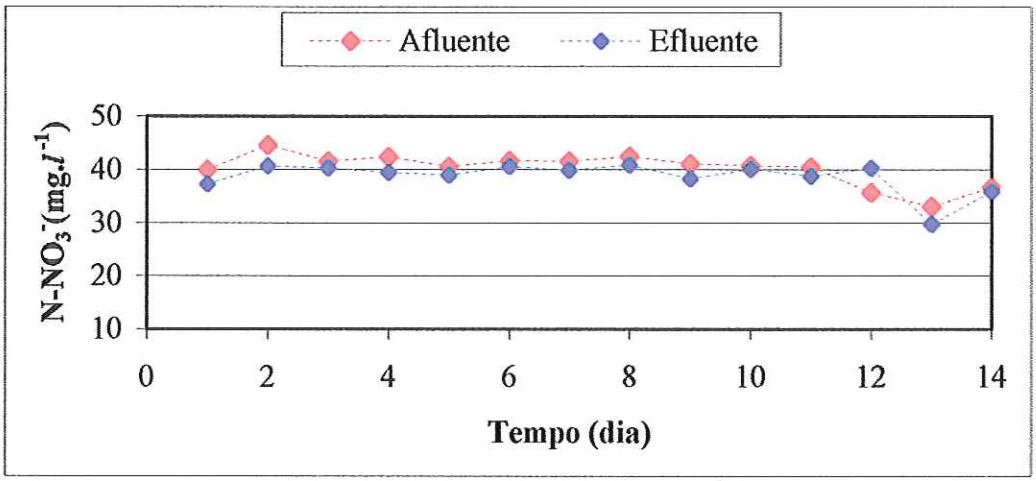


**Figura 25.** Resultados da concentração de $N\text{-}NO_3^-$ ($mg.l^{-1}$) no afluente e efluente do reator nos dias em que o fornecimento de metano foi prejudicado.

Como pode ser observado, nos dias em que não houve a recirculação do metano, os valores da concentração de $N\text{-}NO_3^-$ no afluente e efluente praticamente não sofreram alterações, demonstrando a necessidade de introdução do metano no meio.

### 6.1.3 Caracterização morfológica

Durante todo o período experimental foram coletadas amostras de biomassa para acompanhar as possíveis alterações morfológicas na biota, ao longo do RAHLF

Na Tabela 9 são apresentadas as principais morfologias predominantes ao longo do RAHLF, durante o período de operação.

Pode ser observado na Tabela 9 que, no primeiro mês de operação, as principais morfologias presentes eram os bacilos, geralmente encontrados em aglomerados, seguidos pelos organismos filamentosos, principalmente até o quarto ponto de amostragem. Já no quinto ponto, os filamentos começaram a se apresentar com maior freqüência, indicando o provável início de processo de uma seleção dentro do reator.

**Tabela 9.** Principais morfologias presentes no RAHLF

| Morfologias semelhantes encontradas | | RAHLF 1 mês de operação | | | | | | RAHLF 6 meses de operação | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | **In.*** | **P1** | **P2** | **P3** | **P4** | **P5** | **P1** | **P2** | **P3** | **P4** | **P5** |
| **Domínio *Archaea*** | *Methanosaetha sp.* | + | | | | | | | | | | + |
| | *Methanosarcina sp.* | ++ | + | + | | | + | | | | ++ | ++ |
| **Domínio *Bacteria*** | Filamentos | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| | Bacilos | +++ | ++ | +++ | +++ | +++ | ++ | +++ | ++ | ++ | | |
| | Coco-bacilos | | + | | | | | + | + | + | | |
| | Cocos | ++ | | | | + | + | | | ++ | ++ | ++ |

* In.= inóculo

+: morfologia raramente presente

++: morfologia presente

+++: morfologia presente com freqüência

Com relação às morfologias semelhantes às árqueas metanogênicas, supõe-se que estas eram "resíduos" do lodo utilizado para a inoculação do reator, visto que o lodo foi proveniente de um reator anaeróbio.

Após, aproximadamente, seis meses de operação, novas amostras de biomassa foram retiradas ao longo do reator e pôde-se observar que houve alterações nas morfologias presentes, passando as formas filamentosas a se apresentarem com maior freqüência. No entanto, os microrganismos com morfologias diferentes aos filamentos continuaram a se apresentar sob forma de aglomerados ou em cadeias.

Cabe ressaltar que, nesta última fase, a disponibilidade de metano tornou-se ainda mais escassa, devido ao aumento na concentração de nitrato no afluente, fator esse que pode ter influenciado na composição da biomassa.

As Figuras 26 e 27 apresentam as fotos de microscopia óptica comum e de contraste de fase das principais morfologias presentes ao longo do reator durante o primeiro e sexto mês de operação.

EESC-USP Biblioteca DE S. CARLOS

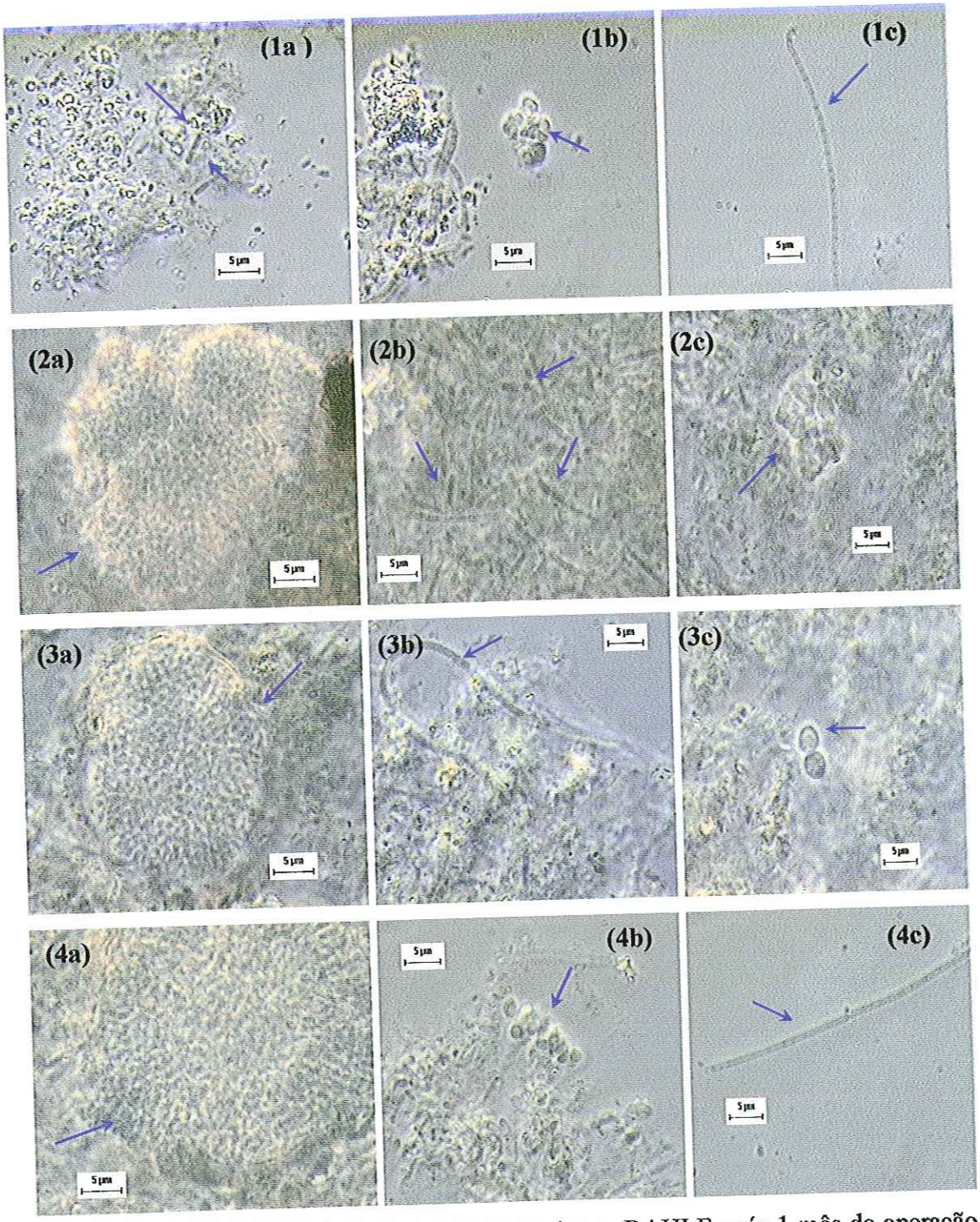


**Figura 26.** Principais morfologias presentes ao longo RAHLF após 1 mês de operação. Os números diante de cada letra representam os pontos de amostragem situados ao longo do RAHLF: (1a) bacilos, (1b) *methanosarcina*, (1c) filamento, (2a) bacilos agregados, (2b) filamentos, (2c) *methanosarcina*, (3a) agregados de bacilos, (3b) filamento, (3c) organismo fotoanoxigênico, (4a) agregado de bacilos, (4b) agregado de cocos, (4c) filamento.

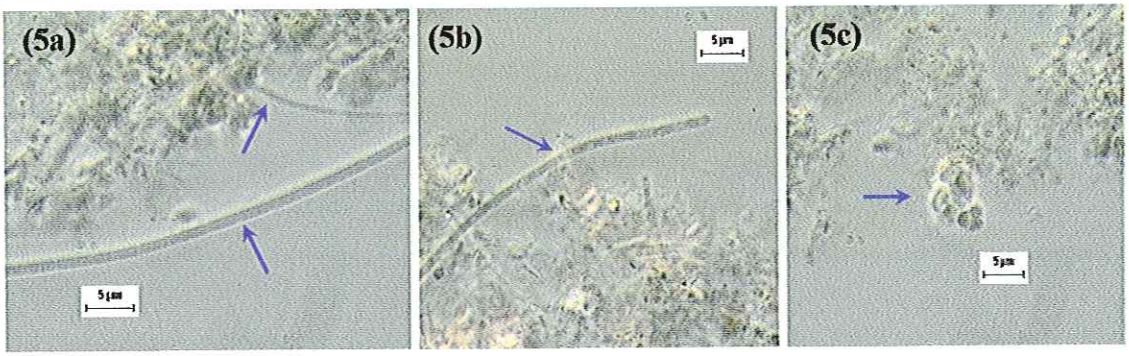


**Figura 26 (continuação).** Principais morfologias presentes ao longo RAHLF após 1 mês de operação. Os números diante de cada letra representam os pontos de amostragem situados ao longo do RAHLF: (5a) filamentos, (5b) filamento, (5c) *methanosarcina.*

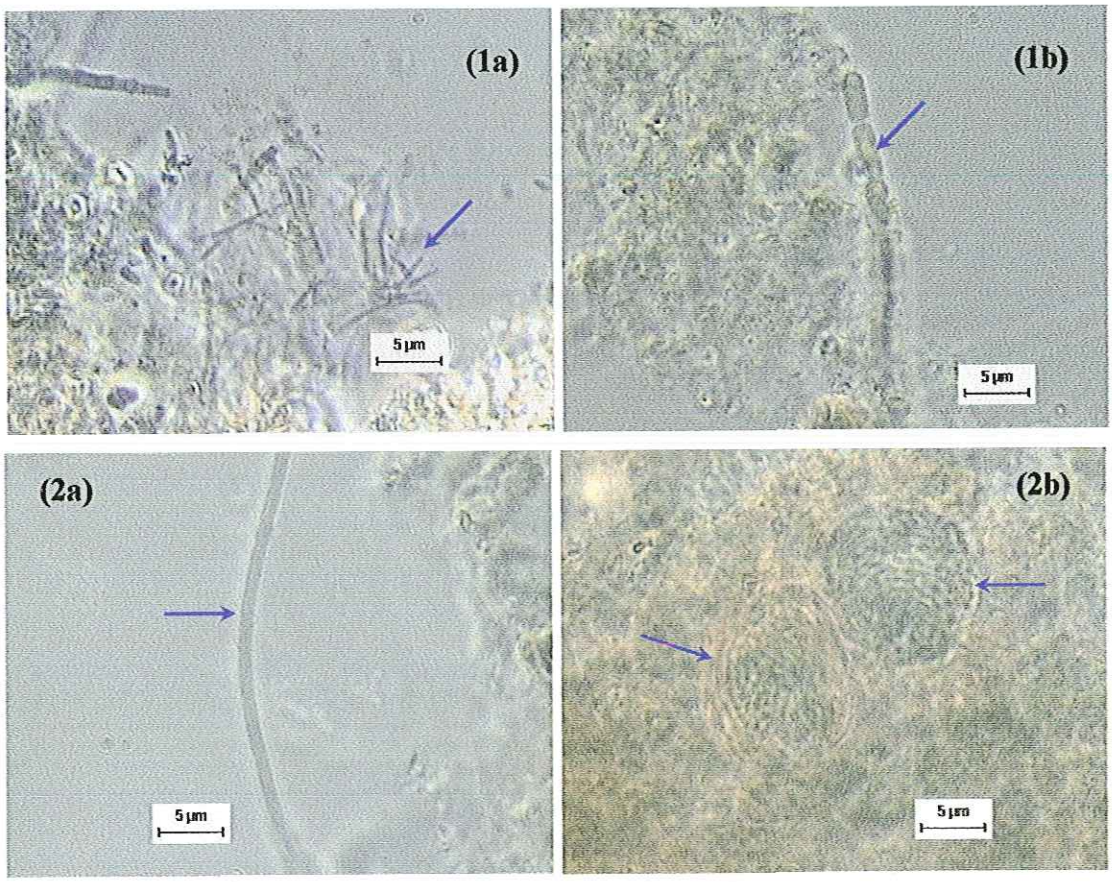


**Figura 27.** Principais morfologias presentes ao longo do RAHLF após seis meses de operação. Os números diante de cada letra representam os diferentes pontos de amostragem alocados ao longo do reator. (1a) bacilos finos, (1b) bacilos em cadeia, (2a) filamento, (2b) agrupamento de células.

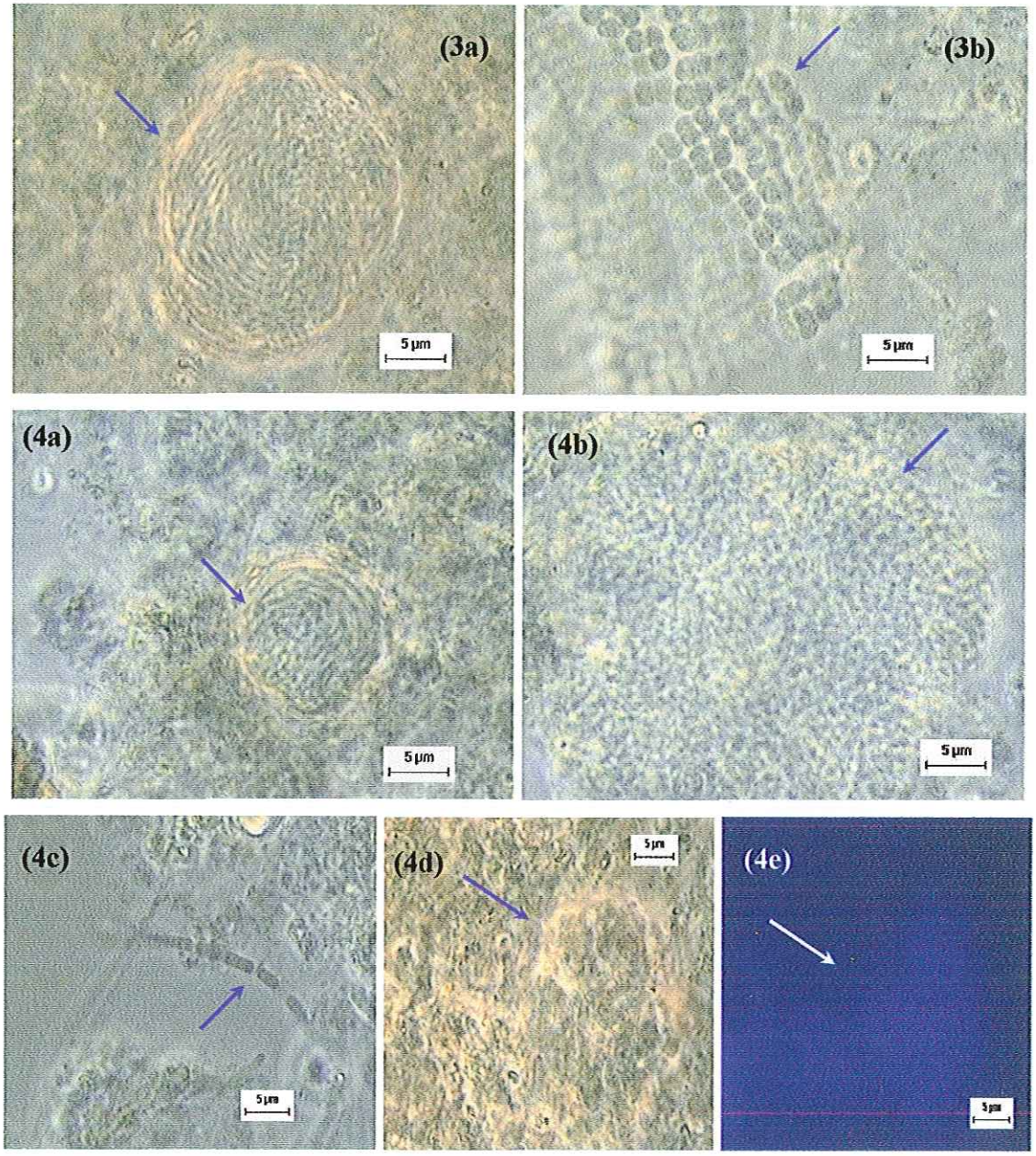


**Figura 27 (continuação).** Principais morfologias presentes ao longo do RAHLF após seis meses de operação. Os números diante de cada letra representam os diferentes pontos de amostragem alocados ao longo do reator. (3a) agrupamento de células, (3b) Thiopédia (fotoanoxigênica), (4a) aglomerado de cocos (4b) agregados de bacilos, (4c) filamento, (4d) *Methanosarcina*, (4e) *methanosarcina* fluorescente.

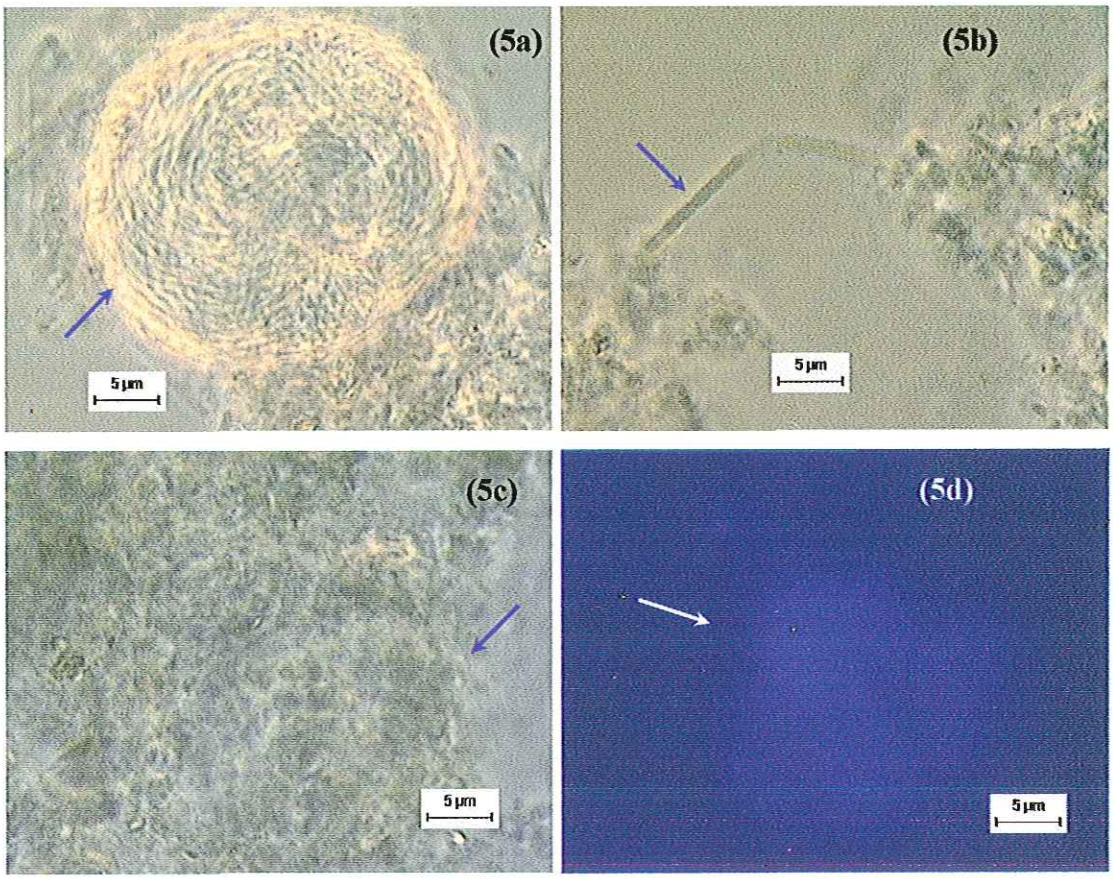


**Figura 27 (continuação).** Principais morfologias presentes ao longo do RAHLF após seis meses de operação. Os números diante de cada letra representam os diferentes pontos de amostragem alocados ao longo do reator. (5a) agrupamento de células, (5b) filamento, (5c) *methanosarcina* (5d) *methanosarcina* fluorescente.

## 6.2 Ensaios para determinação de consumo de metano

### 6.2.1 Sistema operado em batelada com recirculação de metano.

A seguir, nas Figuras 28 a 32, são apresentados os resultados obtidos durante o perfil temporal do sistema, após aproximadamente um mês de operação.

Cabe destacar que o sistema somente recebeu complementação de metano duas vezes durante todo o perfil, complementações estas que se encontram devidamente marcadas nas Figuras apresentadas.

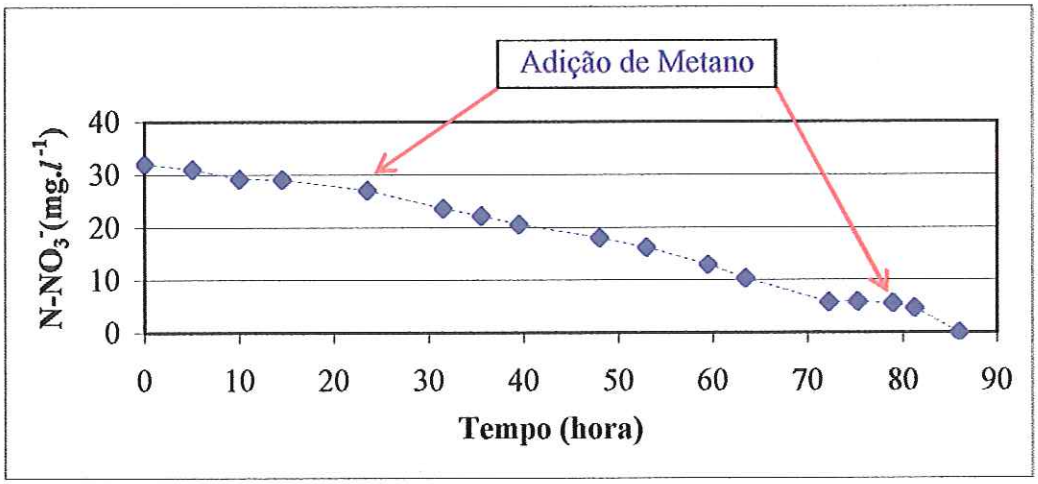


**Figura 28.** Variação da concentração de $N\text{-}NO_3^-$ ($mg.l^{-1}$) durante o perfil temporal do sistema operado em batelada.

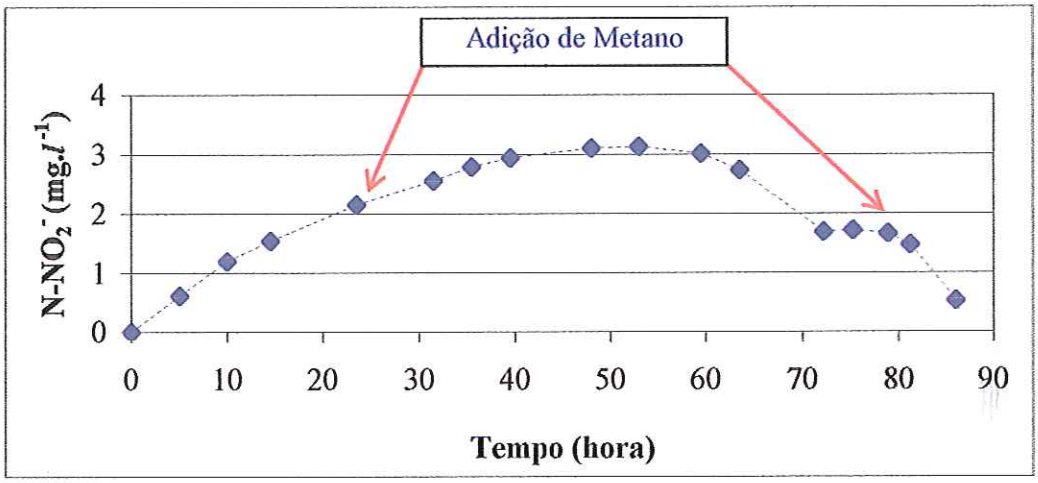


**Figura 29.** Variação da concentração de $N\text{-}NO_2^-$ ($mg.l^{-1}$) durante o perfil temporal do sistema operado em batelada.

Como pode ser observado, nas Figuras 28 e 29 o consumo de $N\text{-}NO_3^-$ e a formação e consumo de $N\text{-}NO_2^-$ foi relativamente constante, até o ponto em que a concentração de metano ficou muito baixa, após aproximadamente 75 horas. Devido a isso, foi preciso realimentar o sistema com metano, de maneira que o processo pudesse prosseguir.

O motivo pelo qual optou-se por não abastecer constantemente o sistema com metano foi o de se evitar que a relação C/N ($CH_4(mg.l^{-1})/N\text{-}NO_3^-(mg.l^{-1})$) aumentasse demasiadamente, o que poderia ocasionar o desvio da rota metabólica para a formação de nitrogênio amoniacal.

E, realmente, esse fato pode ser visto na Figura 30, que exibe os resultados da concentração de ($N\text{-}NH_4^+$) ($mg.l^{-1}$) ao longo do tempo.

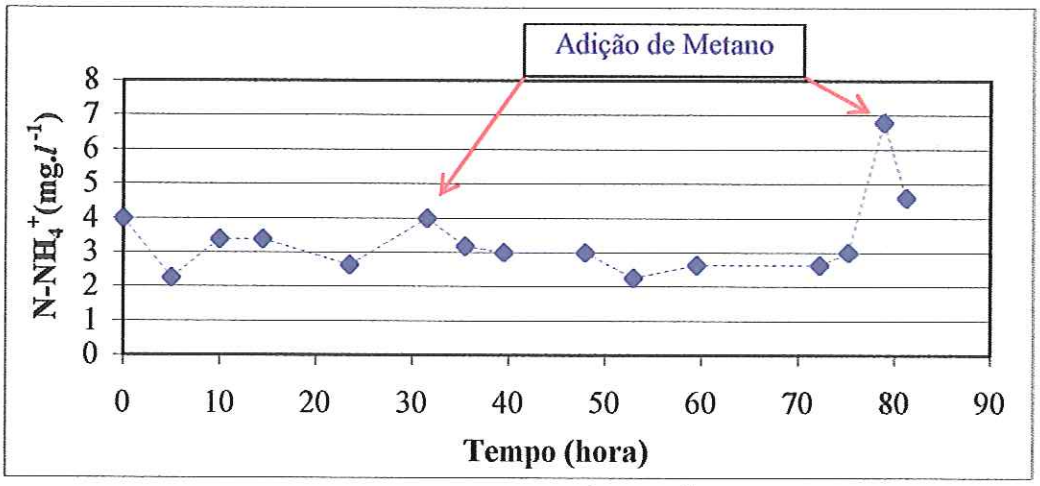


**Figura 30.** Variação da concentração de $N\text{-}NH_4^+$ ($mg.l^{-1}$) durante o perfil temporal do sistema operado em batelada.

Nesta figura, o maior pico de concentração aconteceu exatamente quando no final do experimento, foi preciso reabastecer o sistema com metano. A concentração de $N\text{-}NH_4^+$ no tempo t = 0 é conseqüência do residual da batelada anterior ao perfil, que não foi possível ser retirado.

As Figuras 31 e 32 apresentam os resultados de consumo de metano e formação de nitrogênio, respectivamente, ao longo do tempo.

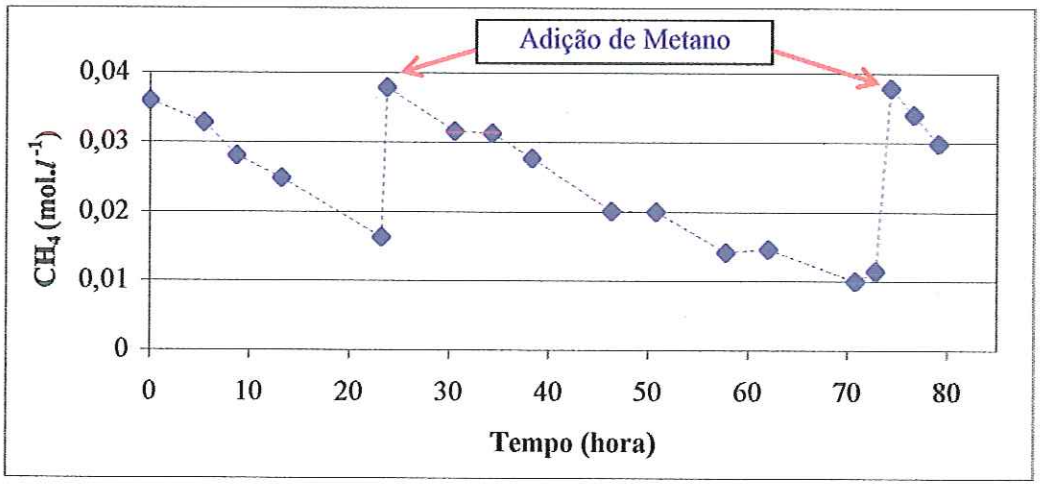


**Figura 31.** Variação da concentração de metano durante o perfil temporal realizado no sistema operado em batelada.

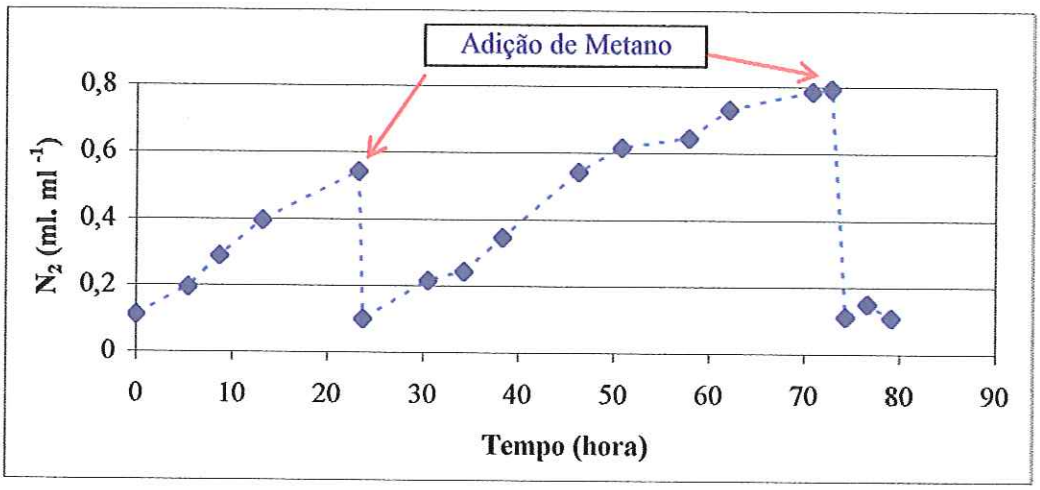


**Figura 32.** Variação do volume de nitrogênio durante o perfil temporal

Com os resultados obtidos durante o monitoramento do metano, foi possível fazer uma estimativa de quanto metano foi consumido em cada intervalo de tempo e comparar com a necessidade teórica de acordo com a quantidade de $N\text{-}NO_3^-$ reduzida no mesmo intervalo de tempo (resultados não mostrados).

Os resultados de tal comparação revelaram que houve, na prática, um consumo muito maior de metano, algumas vezes chegando a dez vezes superior ao teórico. Tais valores poderiam ser explicados pela possível presença de outros organismos que também estivessem utilizando o metano em seus metabolismos.

Desta maneira, a hipótese da redução do sulfato na presença de metano e posterior utilização de compostos reduzidos de enxofre por microrganismos fototróficos, anteriormente apresentada, também seria válida para esta situação.

E realmente, as análises de microscopia óptica revelaram a presença de bactérias fototróficas anoxigênicas púrpuras (Figura 33), assim como no sistema anterior.

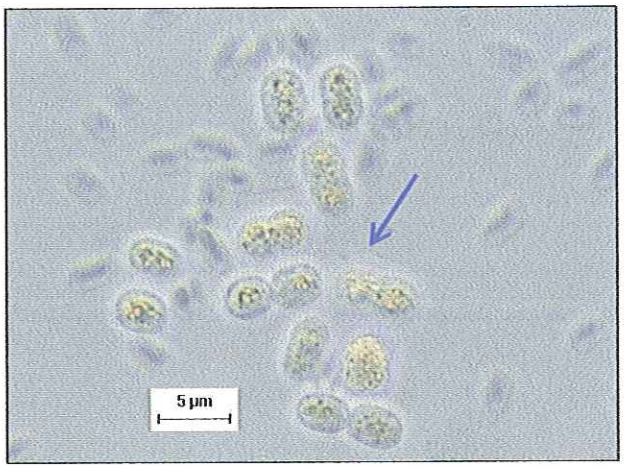


**Figura 33.** Fotografia de microrganismos fototróficos anoxigênicos presentes no reator de ensaio.

### 6.2.2 Reatores anóxicos com diferentes concentrações de sólidos aderidos voláteis – utilização do *shaker*

Como explicado na seção 5.2.2.2, antes de os reatores serem inoculados, foi preciso readaptar os microrganismos às condições semelhantes do ensaio utilizando uma coluna vertical como reator..

Na Figura 34 são apresentados os resultados da concentração de $N\text{-}NO_3^-$ ($mg.l^{-1}$) no efluente da coluna, ao longo do período de adaptação para um TDH de 24 horas.

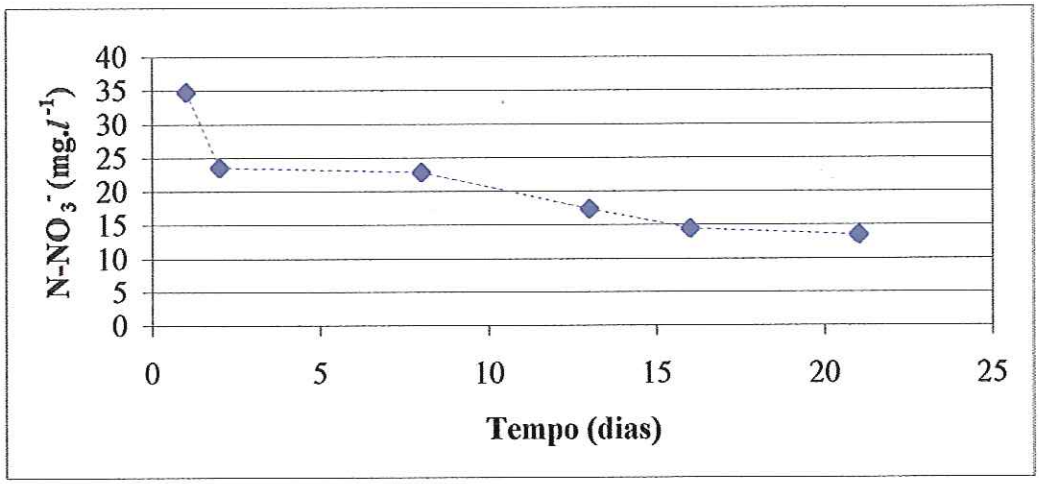


**Figura 34.** Resultados obtidos para as concentrações de $N\text{-}NO_3^-$ ($mg.l^{-1}$) no efluente da coluna durante o período de adaptação e concentração inicial de $N\text{-}NO_3^-$ de 40 $mg.l^{-1}$.

Segundo os resultados apresentados, pode-se observar que, após 21 dias de funcionamento, o sistema começou a apresentar condições de equilíbrio dinâmico aparente, com uma eficiência de remoção superior a 60 %. Com relação às

concentrações de $N\text{-}NO_2^-$ e de $N\text{-}NH_4^+$ ao longo do período, ambas concentrações permaneceram abaixo dos limites de detecção dos equipamentos utilizados.

Na Tabela 10 encontram-se apresentados os resultados da determinação de sólidos voláteis aderidos, realizados no final do experimento para se ter o conhecimento aproximado da biomassa presente em cada reator.

**Tabela 10.** Valores de massa de sólidos voláteis aderidos determinados.no final do ensaio.

| | REATORES | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $M_1$ | | $M_2$ | | $M_3$ | |
| | A | B | A | B | A | B |
| Massa de espuma (g) | 5,67 | 5,36 | 3,28 | 3,26 | 0,60 | 0,59 |
| Massa de SVA (g) | 4,99 | 4,72 | 2.89 | 2,87 | 0,53 | 0,52 |
| | CONTROLES | | | | | |
| | A | B | A | B | A | B |
| Massa de espuma (g) | 5,4 | 5,23 | 3,35 | 3,22 | 0,68 | 0,70 |
| Massa de SVA (g) | 4,75 | 4,6 | 2,95 | 2,82 | 0,60 | 0,62 |

As Figuras 35 a 37 apresentam os resultados obtidos na determinação das concentrações de $N\text{-}NO_3^-$ ($mg.l^{-1}$) para cada concentração de SVA.

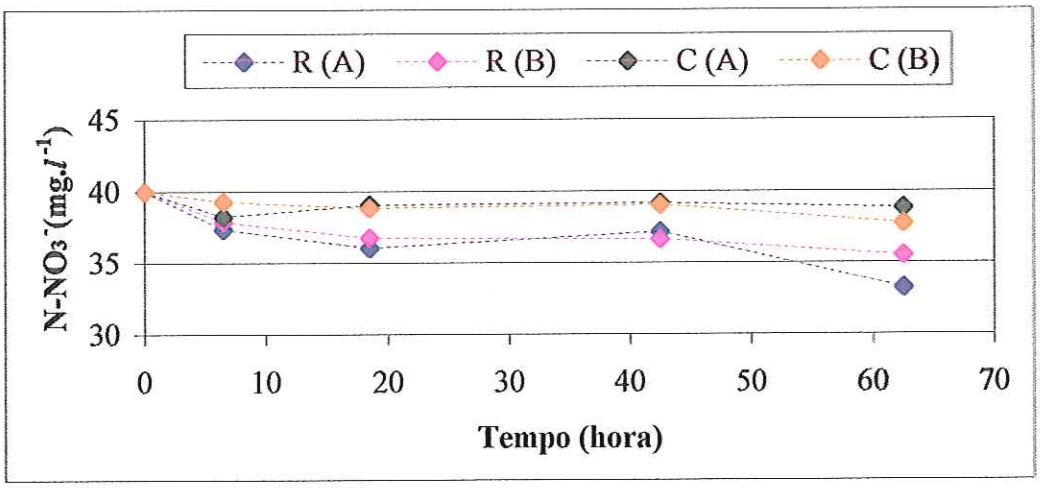


**Figura 35.** Variação na concentração de $N\text{-}NO_3^-$ ($mg.l^{-1}$) para aproximadamente 16 $g.l^{-1}$ de SVA. R – reatores, C – controles.

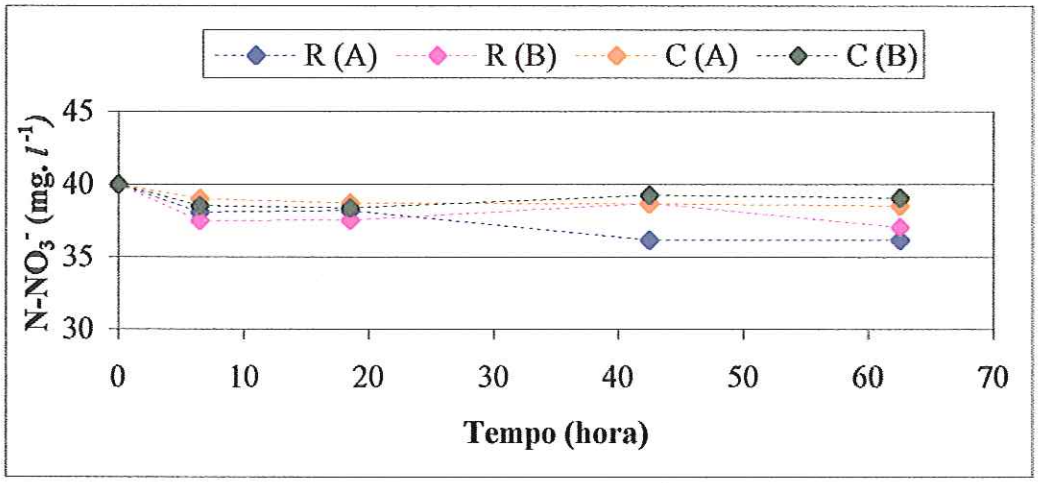


**Figura 36.** Variação na concentração de N-$NO_3^-$ (mg.$l^{-1}$) para aproximadamente 10 g.$l^{-1}$ de SVA. R – reatores, C – controles.

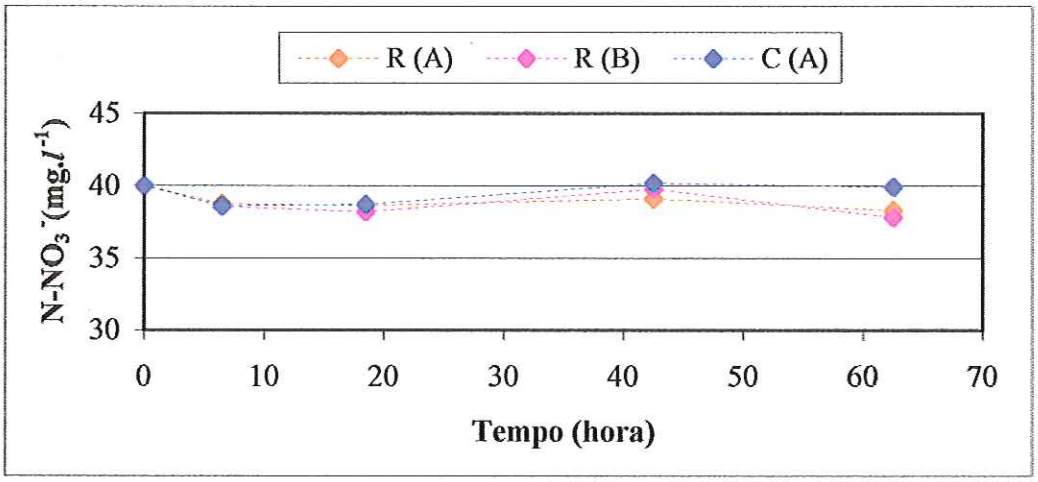


**Figura 37.** Variação na concentração de N-$NO_3^-$ (mg.$l^{-1}$)$^-$ para aproximadamente 1,7 g.$l^{-1}$ de SVA. R – reatores, C – controle

Os resultados obtidos não foram satisfatórios, tendo havido baixa remoção de N-$NO_3^-$, independentemente da concentração de SVA utilizada. No entanto, levando-se em consideração os bons resultados obtidos durante a etapa de adaptação, quando se utilizou configuração diferente de reator e maior concentração de SVA, supõe-se que as concentrações de SVA utilizadas possam ter sido baixas (apesar de os resultados de microscopia eletrônica de varredura, apresentados na Figura 38, terem revelado que as matrizes utilizadas no ensaio se encontravam bem colonizadas) ou o mecanismo para auxiliar na solubilização do metano no meio (*shaker*) não foi o adequado ou ambas, resultando na baixa eficiência alcançada.

Com relação ao consumo de metano, as análises realizadas ao longo do período de ensaio demonstraram que praticamente não houve variação.

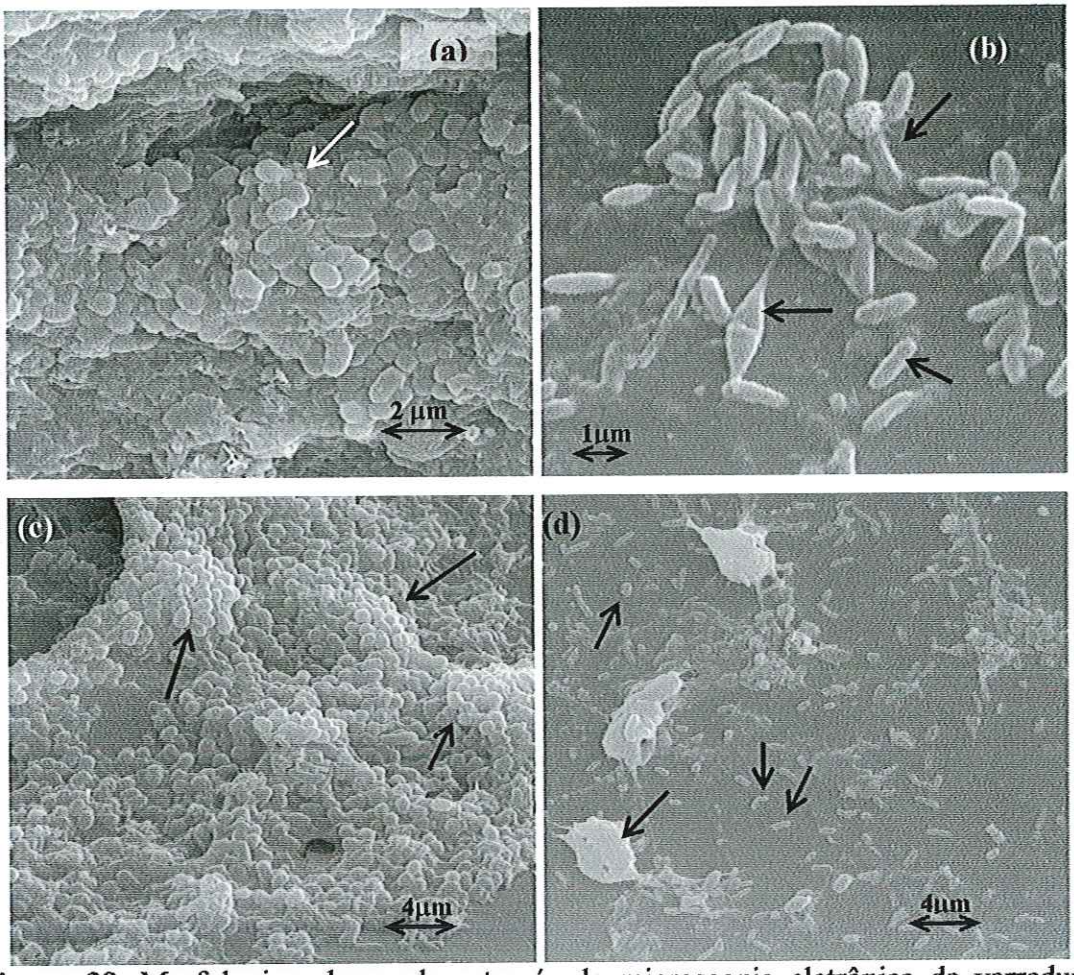


**Figura 38.** Morfologias observadas através de microscopia eletrônica de varredura. Fotos de (a) até (e) retiradas da superfície da espuma; fotos de (f) até (h) retiradas da parte interna da espuma.(a) arranjo de cocobacilos; (b) bacilos com bordas arredondadas e célula pedunculada semelhante à extensão citoplasmática; (c) arranjo de células cocóides; (d) bacilos com dimensões diversas e bordas arredondadas retos e curvos, cocobacilos e biopolímeros.

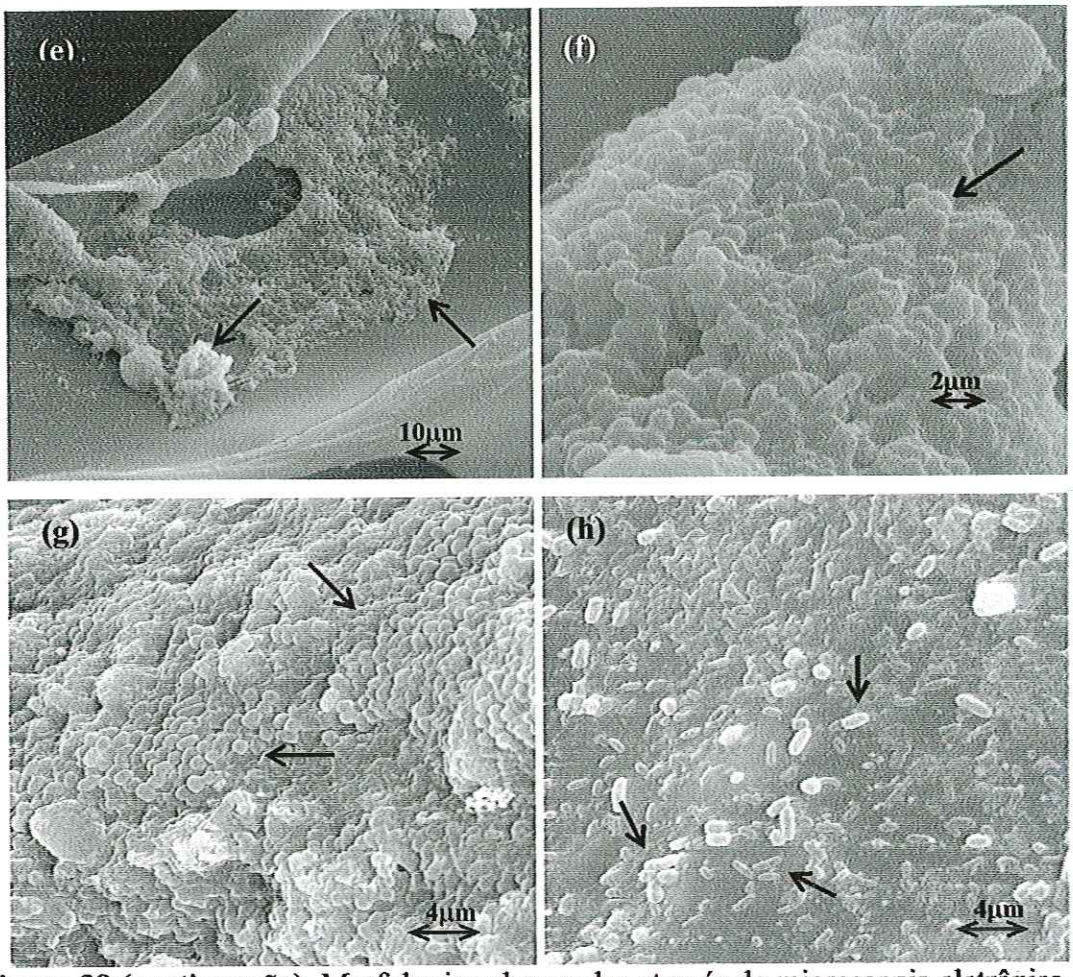


**Figura 38 (continuação).** Morfologias observadas através de microscopia eletrônica de varredura. Fotos (e) colonização da espuma com células aglomeradas e biopolímeros; (f) células cocóides; (g) arranjo de células cocóides; (h) bacilos com dimensões diversas

## 6.3 Influência da configuração do reator e disponibilidade de metano sobre a seleção da população microbiana

A comparação entre os resultados dos estudos microbiológicos obtidos a partir da análise da biomassa proveniente dos diferentes sistemas utilizados: (a) RAHLF; (b) reator operado em batelada com recirculação de metano; (c) reator vertical operado em batelada com recirculação de metano (coluna de adaptação), permitiram verificar as variações na biota devido à disponibilidade de metano para o metabolismo celular, já que, basicamente, a principal diferença entre cada configuração utilizada estava relacionada com o fornecimento e solubilização do metano.

Na Tabela 11 são apresentadas as principais morfologias presentes nas duas últimas configurações.

**Tabela 11.** Principais morfologias presentes nos sistemas utilizados para medir o consumo de metano

| Morfologias semelhantes Encontradas | | Sistema 1 B.R. $_{CH4}$ | Sistema 2 C.A |
|---|---|---|---|
| **Domínio** *Archaea* | *Methanosarcina sp.* | + | |
| **Domínio** *Bacteria* | Filamentos | ++ | + |
| | Bacilos | +++ | +++ |
| | Células cocóides | | ++ |

B.R$_{CH4}$ – Batelada com recirculação de metano
C.A. – Coluna de adaptação
+: morfologia raramente presente
++: morfologia presente
+++: morfologia predominante

Quando comparados com os da Tabela 9 (pg. 50), os resultados apresentados na Tabela 11 demonstram a relação entre a disponibilidade de metano e a predominância de determinada morfologia no meio,

No primeiro caso, quando se utilizou o RAHLF, a principal limitação do sistema estava relacionada com a impossibilidade de fornecer continuamente metano ao longo do reator. Desta maneira, a quantidade de metano disponível para os microrganismos ficou limitada à capacidade máxima de solubilização deste gás no substrato nitrificado armazenado no recipiente de alimentação. Junto com a carência de metano, foi observada a predominância de organismos filamentosos ou agrupados em colônias ou em cadeias, assim como a presença de árqueas na parte final do reator.

No segundo sistema, anteriormente apresentado na Figura 7 (pg. 30), o metano era introduzido constantemente no reator, onde ocorria o processo de desnitrificação, garantindo, assim, fonte de carbono suficiente para o crescimento celular. Quando se analisou a biomassa presente, após aproximadamente um mês de operação, pôde-se constatar uma considerável alteração na morfologia predominante, passando os bacilos a serem a morfologia mais freqüente no sistema. Além disso, os agrupamentos ou cadeias de microrganismos já não se apresentaram com tanta freqüência.

No entanto, o novo reator não possuía um adequado sistema de homogeneização, o que levou à formação de "zonas mortas". Provavelmente, por esse motivo, foi possível encontrar tanto microrganismos filamentosos, assim como árqueas, nas amostras analisadas.

Por outro lado, quando se analisou a biomassa proveniente da coluna apresentada na Figura 10 (pg. 34), constatou-se uma especificidade ainda maior. Neste caso, a presença de filamentos foi muito rara e tampouco se pôde detectar a presença de organismos semelhantes às árqueas.

Tais resultados permitem supor que, ao ir modificando a configuração do reator para aumentar a disponibilidade de metano, os microrganismos capazes de utilizá-lo em seu metabolismo encontraram o ambiente propício para seu desenvolvimento, passando a predominar no sistema.

Na Figura 39 estão apresentadas as fotos de microscopia comum e de fluorescência retiradas de amostras provenientes dos dois últimos sistemas mencionados.

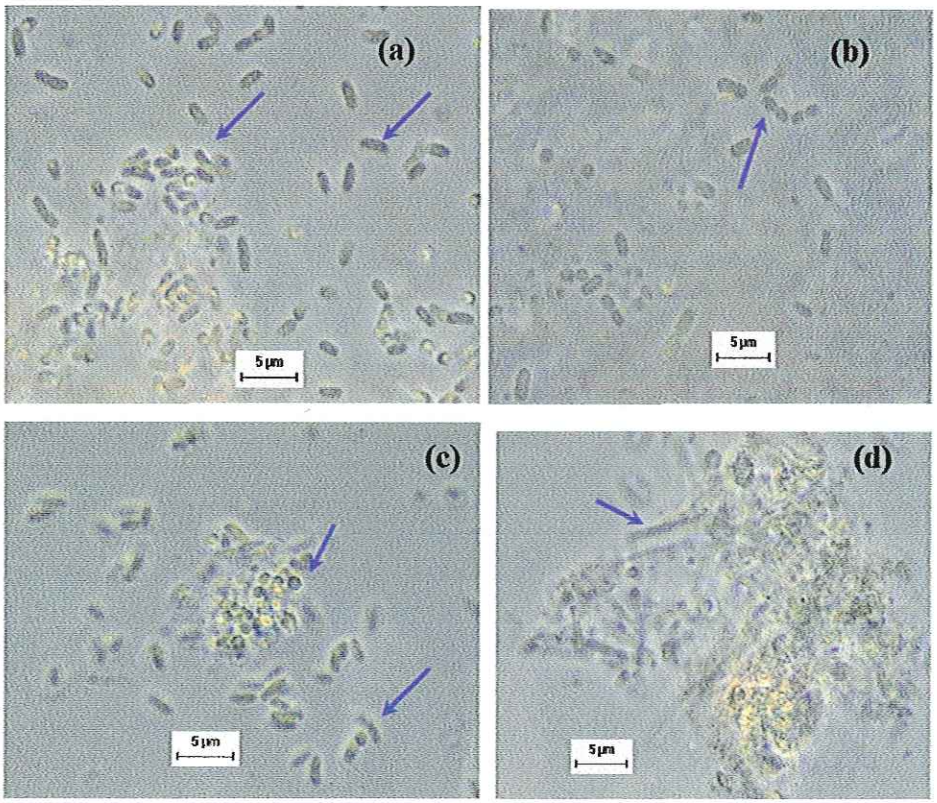


**Figura 39 .** Fotos de microscopia comum e de fluorescência tiradas de amostras de biomassa provenientes do reator operado em batelada (fotos de (a) a (f)) e da coluna de adaptação (fotos (g) e (h)) **(a)** bacilos, **(b)** bacilos em cadeia, **(c)** bacilos e cocos, **(d)** filamentos).

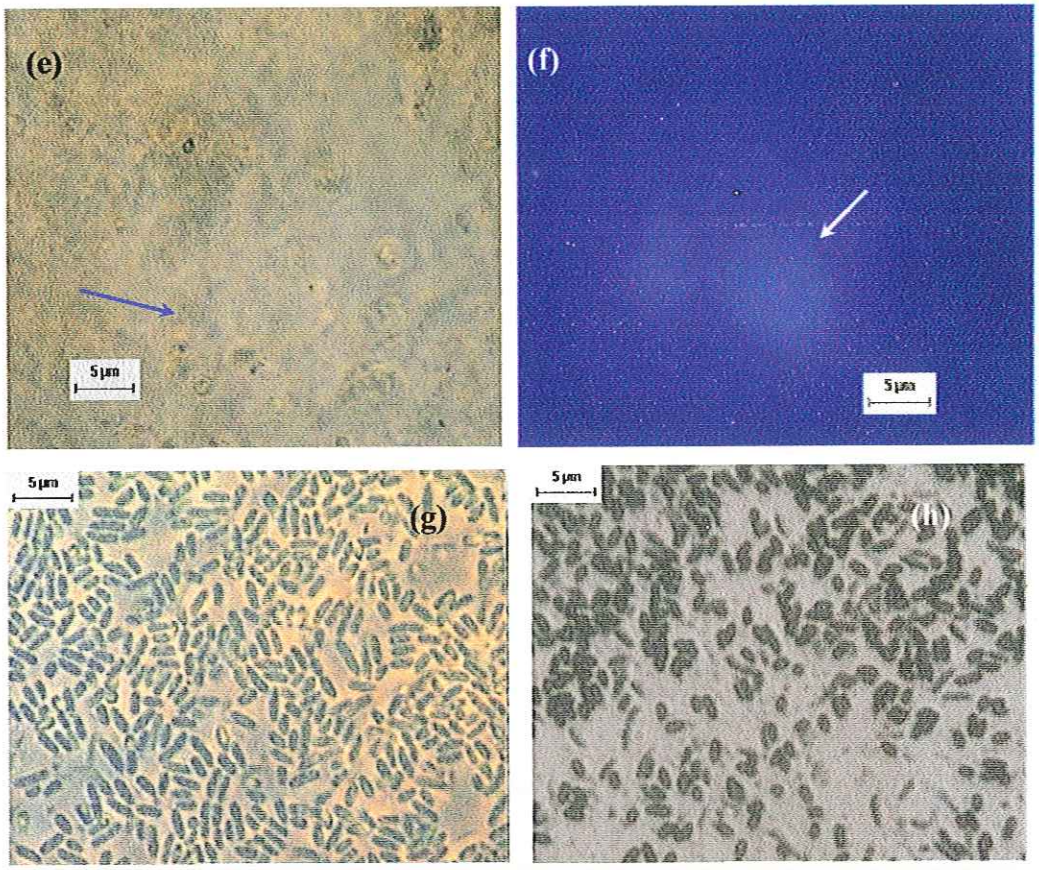


**Figura 39 (continuação)** . Fotos de microscopia comum e de fluorescência tiradas de amostras de biomassa provenientes do reator operado em batelada (fotos de (a) a (f)) e da coluna de adaptação (fotos (g) e (h)): (a) bacilos, (b) bacilos em cadeia, (c) bacilos e cocos, (d) filamentos). (e) *methanosarcina* (f) *methanosarcina* fluorescente, (g) bacilos, (h) coloração de gram – bacilos gram-negativos

A seleção contínua da população microbiana pode ser sustentada, também, pelos resultados das análises de Biologia Molecular, apresentados nas Figuras 40 e 41, Tais resultados revelaram que as diferentes configurações dos reatores levaram à seleção da população microbiana, tanto no domínio *Archaea* como no domínio *Bacteria.*

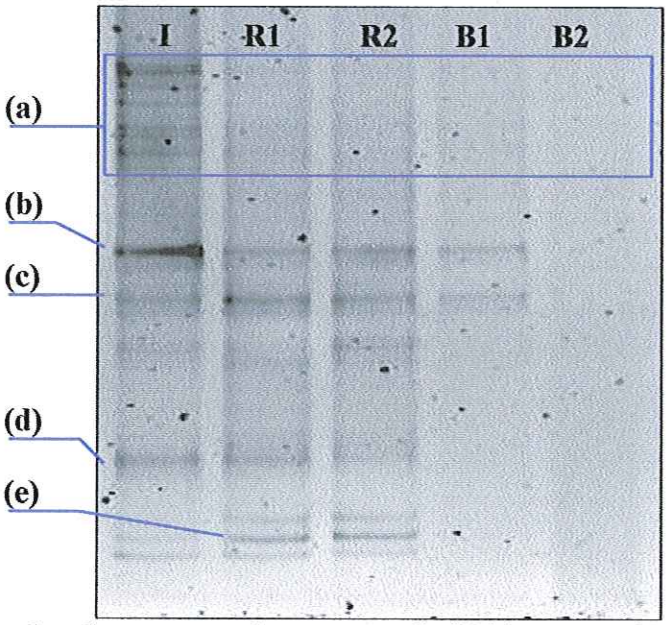


**Figura 40.** Resultados do processo de extração do DNA para o domínio *Archaea* da biomassa retirada de cada reator utilizado durante o experimento. **I** = inóculo, **R1** = biomassa proveniente dos pontos 1,2 e 3 do RAHLF, **R2**= biomassa proveniente dos pontos 4 e 5 do RAHLF, **B1** = biomassa retirada do reator operado em batelada com recirculação de metano,**B2** = biomassa retirada da coluna de adaptação.

Com relação ao domínio *Archaea*, houve seleção gradual das populações representadas nas bandas (b) (c) e (d), conforme a suplementação e solubilização do metano, disponibilizando-o para os microrganismos, foi melhorando de acordo com o reator utilizado, terminando por desaparecerem por completo na coluna de adaptação.

Já as populações delimitadas pelo retângulo (a), aparentemente, se mostraram as mais sensíveis às novas condições impostas a elas visto que tais bandas só se apresentaram na amostra proveniente do inóculo.

Ambas situações poderiam ser explicadas por Clarens *et al.*, (1998), que em seus estudos sobre a produção de metano a partir de cultura de *Methanosarcina mazei,* observaram que o crescimento desses microrganismos e a produção de gás, a partir do acetato, não foi inibida na presença de 15 mM. $l^{-1}$ de nitrato e sim quando se adicionou ao sistema cultura de *Pseudomonas stutzeri,* dando início ao processo de desnitrificação.

Os autores sugeriram que esse fato ocorreu devido à formação de compostos reduzidos de nitrogênio como, por exemplo, o óxido nitroso, e não pela presença de nitrato ou competição pelo substrato.

Desta forma, levando em consideração que o inóculo utilizado no início dos experimentos foi proveniente de um reator anaeróbio, é de se esperar que este

apresentasse ampla diversidade de organismos metanogênicos que tiveram seu crescimento inibido quando se deu início ao processo de desnitrificação.

Esse pode ser um dos motivos pelo qual, provavelmente, a coluna de adaptação não apresentou nenhuma banda relativa a este domínio, já que, sua configuração, poderia ter proporcionado as condições mais favoráveis ao processo de desnitrificação, utilizando metano como fonte de carbono.

Por outro lado, as bandas (e), aparentemente, encontraram no RAHLF ambiente mais adequado que nos outros reatores, visto que as mesmas aparecem com maior destaque na biomassa proveniente deste sistema, e voltaram a desaparecer nos reatores em batelada.

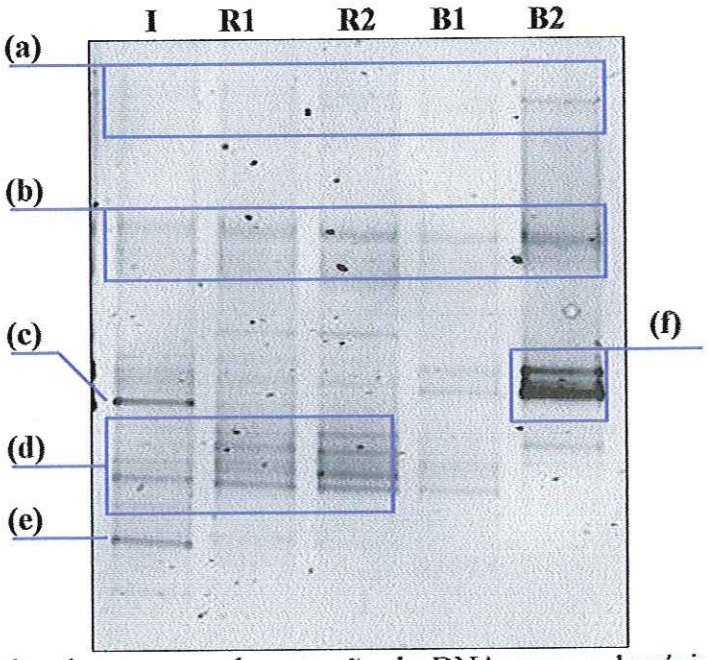


**Figura 41.** Resultados do processo de extração do DNA para o domínio *Bacteria* da biomassa retirada de cada reator utilizado durante o experimento. I = inóculo, R1 = biomassa proveniente dos pontos 1,2 e 3 do RAHLF, R2= biomassa proveniente dos pontos 4 e 5 do RAHLF, B1 = biomassa retirada do reator operado em batelada com recirculação de metano,B2 = biomassa retirada da coluna de adaptação.

Para o domínio *Bacteria* a situação foi um pouco diferente já que, neste caso, predominou o favorecimento das populações presentes.

No caso das populações (a), (b) e (f), pode-se perceber a possível dependência destas para com a disponibilidade de metano no meio, principalmente aquelas identificadas pelas bandas (b) e (f). Por outro lado, as populações identificadas pelas bandas (c) e (d) apresentaram comportamento contrário, visto que as mesmas já não

puderam mais ser identificadas desde o princípio do experimento quando se utilizou o RAHLF.

No caso das populações identificadas pela letra (d), estas tiveram seu crescimento mais favorecido no RAHLF

Também pode ser visto que, apesar de o RAHLF ter apresentado morfologias distintas ao longo de seu comprimento, os resultados para ambos domínios foram semelhantes, revelando certa homogeneidade das populações presentes.

# 7. CONCLUSÕES

## 7.1. Utilização do RAHLF

De acordo com os resultados obtidos a partir do estudo realizado com o RAHLF, pôde-se concluir que:

A maior limitação do sistema foi a impossibilidade de suplementar metano ao longo do reator, principalmente em sua parte final. Sob este ponto de vista, pode-se afirmar que a atual configuração do RAHLF não é a adequada para o processo de desnitrificação utilizando metano como fonte de carbono.

Com base nos resultados obtidos a partir da variação da relação C/N, e nos ensaios de transferência de massa e supressão de metano, pode-se inferir que apesar da baixa disponibilidade do metano, este de alguma maneira foi utilizado no processo metabólico dos microrganismos, sem poder precisar se sua participação no processo de desnitrificação foi direta ou indireta.

A presença de organismos capazes de utilizar compostos reduzidos de enxofre como doadores de elétrons juntamente com os altos níveis de redução de nitrato obtidos na presença de baixas concentrações de gás metano deram suporte à hipótese de que parte da remoção do nitrato, ou até mesmo toda remoção, estivesse sendo realizada mediante a utilização de compostos tais como: $S^o$, $HS^-$ ou $NH_4^+$, provavelmente formados sob condições anóxicas, simultaneamente com o processo de desnitrificação.

Desta forma, conclui-se que aparentemente, o metano pode ser utilizado como doador de elétrons em outros processos metabólicos que não envolvam necessariamente a redução do nitrato.

## 7.2 Ensaios para medir o consumo de metano

### 7.2.1 Sistema operado em batelada com recirculação de metano

O principal fator limitante deste ensaio foi a falta de um eficiente sistema de homogeneização que pode ter influenciado no tempo transcorrido para a desnitrificação completa de 40 $mg.l^{-1}$ de $N\text{-}NO_3^-$.

A comparação entre o consumo teórico de metano com o consumo real no processo de desnitrificação não é uma prática recomendável quando não se trabalha com inóculo puro, visto que há possibilidade de que outros microrganismos metanotróficos, utilizem este gás em seus processos metabólicos.

O elevado tempo que foi preciso para a desnitrificação completa de 40 $mg.l^{-1}$ de $N\text{-}NO_3^-$, aproximadamente 80 horas, assemelhando-se às velocidades de desnitrificação endógenas, não permite afirmar que o metano consumido tenha sido utilizado diretamente no processo de desnitrificação como fonte de carbono.

No entanto, assim como no experimento anterior, ficou evidente que o metano foi utilizado, de alguma maneira, no metabolismo de microrganismos presentes no sistema.

### 7.2.2 Reatores anóxicos com diferentes concentrações de sólidos aderidos voláteis – utilização do *shaker*

A comparação dos resultados das concentrações de $N\text{-}NO_3^-$ obtidos nos diferentes sistemas de trabalho, demonstrou que os sistemas utilizando recirculação de gás para a solubilização do metano foram mais eficazes que àquele com utilização do *shaker* à velocidade rotacional de 45 rpm.

Tais resultados demonstram a necessidade de se utilizar equipamentos ou configurações de reatores que diminuam os problemas decorrentes da transferência de massa entre a fase gasosa e a líquida, garantindo à biomassa o acesso ao metano.

Os resultados da análise de microscopia de varredura obtidos a partir de amostra de espuma retirada da coluna de adaptação revelaram que as mesmas se encontravam bem colonizadas, tanto na parte externa como interna da espuma, demonstrando que o material utilizado como meio suporte foi apropriado para as espécies de microrganismos presentes.

# 8 SUGESTÕES

Sugere-se a realização de estudos mais específicos sobre as características dos microrganismos responsáveis pelo processo de desnitrificação em ambientes anóxicos cuja fonte de carbono seja o metano, assim como as rotas metabólicas envolvidas no processo.

O desenvolvimento ou aperfeiçoamento de novas configurações de reatores que permitam a solubilização do gás metano na fase líquida, disponibilizando-o para os microrganismos também pode ser objeto de outras pesquisas.

Outro fator importante a ser estudado, é a interferência de compostos como o $SO_4^{-2}$, o $CO_2$ e compostos reduzidos de enxofre, no processo de desnitrificação que envolva o metano como fonte de carbono.

Posteriormente, sugere-se a utilização do próprio biogás produzido em reator anaeróbio, utilizado para tratamento de águas residuárias, como fonte de elétrons para reator desnitrificante.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J. S.; REIS, M. A. M.; CARRONDO, M.J.T. (1995). Competition between nitrate and nitrite reduction in denitrification by *Pseudomonas fluorescens. Biotechnology and Bioengeneering*, v.48, p.476-484.

ABELING, U.; SEYFRIED, C. (1992). Anaerobic – aerobic treatment of high – strength ammonium wastewater – nitrogen removal via nitrite. *Wat. Sci.Technol.,* v.26 n.56, p.1007-1015.

AWDALLAH, R. M.; SOLTAN, M.E.; SHABER, M.S.A.; MOALLA, S. M. N. (1998). Bacterial removal of nitrate, nitrite and sulphate in wastewater. *Water Research,* v.32, n.10, p.3080-3084.

BECCARI, M.; PASSINO, R.; RAMADORI, R.; TANDOI, V. (1983). Kinetics of dissimilatory nitrate and nitrite reduction in suspended growth culture. *Journal of Water Pollution Control Federation,* v.55, n.1, p.58-64.

CALLADO, N.H. (2001). *Reatores seqüenciais em batelada em sistema anaeróbio / aeróbio tratando esgoto sanitário sintético com remoção de nutrientes.* 227p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos. 2001.

CAMPOS, J.R.; PAGLIUSO, J.D. (1999). Tratamento de gases gerados em reatores anaeróbio. *In:* TRATAMENTO DE ESGOTOS SANITÁRIOS POR PROCESSO ANAERÓBIO E DISPOSIÇÃO CONTROLADA NO SOLO. Campos, J.R. (coordenador). Rio de Janeiro. ABES. Projeto PROSAB.

CLARENS, M.; BERNET, N.; DELGENÈS, J.; MOLETTA, R. (1998). Effects of nitrogen oxides and denitrification by *Pseudomonas stutzeri* on acetotrophic methanogenesis by *Methanosarcina mazei. FEMS Microbiology and Ecology*, v.25, p.271-276 .

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

CRITES, R.; TCHOBANOGLOUS, G. (2000). Sistemas de Manejo de Aguas Residuales para Núcleos Pequeños y Descentralizados. v.1, McGraw-Hill.

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

FDZ-POLANCO, F.; FDZ-POLANCO, M.; FERNADEZ, N.; URUEÑA, M. A.; GARCIA, P. A.; VILLAVERDE, S. (2001). New process for simultaneous removal of nitrogen and sulfur under anaerobic conditions. *Water Research*, v.35, n.4, p.1111-1114.

GLASS, C.; SILVERSTEIN, J. (1998). Denitrification kinetics of high nitrate concentration water: pH effect on inhibition and nitrite accumulation. *Water Research,* v.32, n.3, p.831-839.

GEJLSBJERG, B.; FRETTE, L.; WESTERMANN, P. (1998). Dinamics of $N_2O$ production from activated sludge. *Water Research*, v.32, n.7, p.2113-2121.

GRIFFITHS, R. I. *et al.* (2000.) Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA-and rRNA-based microbial communit composition. *Applied and Environmental Microbiology,*v. 66, n. 12, p. 5488-5491.

GULIS, G.; CZOMPOLYOVA, M.; CERHAN, J.R. (2001). An ecologic study of nitrate in municipal drinking and cancer incidence in Trnava Districi, Slovakia. *Environmental Research*, v.88, p.182-187.

HENZE, M; HARREMOËS, P.; JANSEN, J.L.C; ARVIN, E.(1997). *Wastewater Treatment - Biological and Chemical Processes*. 2th. ed. Springer.

HER, J.; HUANG, J. (1995). Influences of carbon source and C/N ratio on nitrate / nitrite denitrificacion and carbon breakthrough. *Bioresource technology,* v.54, p.45-51.

HOWARD, P. H.; MEYLAN, W. M. (1997). *Handbook of Physical properties of organic chemicals*. Howard, P. Meyland, W.eds.

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

IVERSEN, N.; J□RGENSEN, B. B. (1985). Anaerobic methane oxidation rates at the sulfate-methane transition in marine sediments from Kattegat and Skagerrak (Denmark). *Limnol. Oceanogr.,* v.30, n.5, p.944-955.

JOBBÁGY, A.; SIMON, J.; PLÓSZ, B. (2000). The impact of oxygen penetration on the estimation of denitrification rates in anoxic processes. *Water Research,* v.34, n.9, p.2606-2609.

JEWELL, W.J.; NELSON, Y.M.; WILSON, M.S. (1992). Methanotrophic bacteria for nutrient removal from wastewater: attached film system. *Water Environment Research,* v.64, n.6, p.756-765.

KESSERU, P.; KISS, I.; BIHARI, Z.; POLYÁK, B. (2002). Investigation of the denitrification activity of immobilized *Pseudomonas butanovora* cells in the presence of different organic substrates. *Water Research,* v.36, n.9, p.1565-1571.

KNOWLES, R. (1982). Denitrification. *Microbiol. Rev.,* v.46, p.43-70.

KOENIG, A.; LIU, L. H. (2001) Kinetic model of autotrophic denitrification in sulfur packed-bed reactors. *Water Research,* v.35, n.8, p.1969-1978.

KORNAROS, M. ZAFIRI, C.; LYBERATOS, G. (1996). Kinetics of denitrification by *Pseudomonas denitrificans* under growth conditions limited by carbon and/or nitrate or nitrite. *Water Environmental Research,* v.68, n.5, p.934-945.

KUDO, Y. *et al* (1997).Methanogen flora of paddy soils in Japan . FEMS *Microbiology Ecology,* v. 22, p.39-48

LABBÉ, N.; PARENT, S.; VILLEMUR, R. (2003). Addition of trace metals increases denitrification rate in closed marine systems. *Water Research,* v.37, p.914-920.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J.(1997). *Brock Biology of Microrganisms* 8th. ed., Prentice Hall.

MARTIENSSEN, M.; SCHÖPS, R.(1999). Population dynamics of denitrifiing bacteria in a model biocummunity. *Water Research,* v.33, n.3, p.639-646.

METCALF e EDDY (1998). Ingenieria de Aguas Residuales - Tratamiento, vertido y reutilización. v.1, 3th.ed., McGraw-Hill.

MULDER, A.; VAN DE GRAFF, A. A. ROBERTSON, L. A.; KUENEN, J. G. (1995) Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor *FEM Microbiology Ecology,* v.16 p.177-184.

NIELSEN, A.T. *et al.* (1999). Identification of a novel group of bacteria in sludge from a deteriored biological phosphoorus removal reactor. *Applied and Environmental Microbiology,* v.65, n.3, p.1251-1258.

OH, J.; SILVERSTEIN, J. (1999). Oxygen inhibition of activated sludge denitrification. *Water Research*, v.33, n.8, p.1926-1937.

ONO, A. F. (2004). Destrinitrificação via nitrito utilizando metano como único doador de elétrons em reator nitrificante/desnitrificante: resultados iniciais e perspectivas. In: III SEMINÁRIO DO PROJETO TEMÁTICO: DESENVOLVIMENTO, ANÁLISE, APRIMORAMENTO E OTIMIZAÇÃO DE REATORES ANAERÓBIOS PARA TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS, 2004, São Caetano do Sul, SP. Anais de trabalhos orais.

PAULO, P.L.; BO, J.; REBAC, S.; POL, L. H.; Lettinga, G. (2000). Thermophilic anaerobic digestion of methanol in UASB reactor. In: VI OFICINA E SEMINÁRIO LATINO-AMERICANO DE DIGESTÃO ANAERÓBIA, Recife. Anais, v.1.

PLÓSZ, G.B.; JOBBÁGY, A. ; GRADY LESLIE JR, C.P.; (2003). Factors influencing deterioration of denitrification by oxygen entering an anoxic reactor through the surface. *Water Research,* v.37, p.853-863.

RAJAPAKSE, J.P.; SCUTT, J.E. (1999). Denitrification with natural gas and various new growth media. *Water Research,* v.33, n.18, p.3726-3734.

RHEE, G. Y.; FUHS, W. (1978). Wastewater denitrification with one-carbon compounds as energy source. *Journal Water Pollution Control Federation.* v.9, p.2111-2119.

RUIZ, G.; JEISON, D.; CHAMY, R. (2002). Denitrification with high nitrite accumulation for the treatment of wastewater with high ammonia concentration. *Water Research,* v.37, p.1371-1377.

SAKAMOTO, I. K. (2001) *Comparação da estrutura de comunidades microbianas presentes em sistemas de lodos ativados modificados para remoção biológica de fósforo em excesso, utilizando a técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE).* 162p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2001.

SANTOS, S.G. (2003). *Utilização do metanol, etanol e metano como doadores de elétrons para a desnitrificação.* São Carlos. 129p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2003

SILVEIRA, B.I. (1996). *Cinética Química das Reações Homogêneas.* São Paulo, Brasil: Edgard Blücher LTDA, .

SOLLO JR., F.W.; MUELLER, H.F; LARSON, T.E. (1976). *Journal Water Pollution Control Federation,* v.48, n.7, p.1840-1842.

STOUTHAMER, A. H. (1988) Dissimilatory reduction of oxidized nitrogen compounds. In. BIOLOGY OF ANAEROBIC MICROORGANISMS. Zhender, A. J. B.: Whiley & Sons. Cap. 5.

TERÁN, C. F. J. (1995) Tratamento de Esgoto Sintético Empregando Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado. Estudo do biofilme. 320p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 1995.

THALASSO, F.; VALLECILLO, A.; GARCÍA-ENCINA, P.; FDZ-POLANCO, F. (1997). The use of metane as a sole carbon source for wastewater denitrification. *Water Research,* v.31, n.1, p.55-60.

TIEDJE, J. M. (1988) Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. In. BIOLOGY OF ANAEROBIC MICROORGANISMS. Zhender, A. J. B.: Whiley & Sons. Cap. 4.

VALENTINE, D. L.; REEBURGH, W. S. (2000). New perspectives on anaerobic methane oxidation. *Environmental Microbiology,* v. 2, n.5, p. 477-484.

VIEIRA, L.G.T (2000). *Desenvolvimento de sistema misto (aeróbio / anaeróbio) de leito fixo para remoção de nitrogênio de esgoto sanitário pré-tratado em reator anaeróbio.* 144p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2000.

WALTER, B.; SIDRANSKY, E.; KRISTJANSSON, J.K.; HOLLOCHER, T.C. (1978) Inhibition of denitrification by uncouplers of oxidative phosphorylation. *Biochemistry,* v.17, p.3039-3042.

WANG, J., BALTZIS, B.; LEWANDOWSKI, G. (1995) Fundamental Denitrification Kinetic Studies with *Pseudomonas denitrificans. Biotech. Bioeng.,* v.47, p.27-41.

WHATLEY, F. R. (1981) Dissimilatory nitrate reduction. In. BIOLOGY OF INORGANIC NITROGEN AND SULFUR. Trebst, A.; Bothe, H. New York: Springer Verlang.

WERNER, M.; KAISER, R. (1991) Denitrification with biogas as external carbon source. *Water Science and Technology,* v.23, p.701-708.

WILDERER, P.A.; JONES, W.L.; DAU, U. (1987). Competition in denitrification systems affecting reduction rate and accumulation of nitrite. *Water Research,* v. 22, n.2, p.239-245.

ZAIAT, M. (1996). *Desenvolvimento de reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) para tratamento de águas residuárias.* 157p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 1996.