UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E SANEAMENTO

WILLIANE VIEIRA MACÊDO

Influência de diferentes sais e da pressão osmótica em sistema de tratamento de esgoto sanitário de regiões de escassez hídrica

Versão Corrigida
São Carlos
2018

WILLIANE VIEIRA MACÊDO

Influência de diferentes sais e da pressão osmótica em sistema de tratamento de esgoto sanitário de regiões de escassez hídrica

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

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic

São Carlos
2018

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

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

Vieira Macêdo, Williane
V141i Influência de diferentes sais e da pressão osmótica em sistema de tratamento de esgoto sanitário de regiões de escassez hídrica / Williane Vieira Macêdo; orientadora Márcia Helena Rissato Zamarioli Damianovic. São Carlos, 2018.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2018.

1. Salinidade. 2. Pressão osmótica. 3. Nitrificação. 4. Desnitrificação. 5. Nitrificação e desnitrificação simultânea. I. Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Engenheira **WILLIANE VIEIRA MACÊDO**

Título da dissertação: "Influência de diferentes sais e da pressão osmótica em sistema de tratamento de esgoto sanitário de regiões de escassez hídrica".

Data da defesa: 11/12/2018.

Comissão Julgadora:	**Resultado:**
Profa. Dra. **Marcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic (Orientadora)** (Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)	Aprovada
Prof. Associado **Eduardo Bessa Azevedo** (Instituto de Química de São Carlos/IQSC-USP)	APROVADA
Prof. Dr. **Eduardo Lucena Cavalcante de Amorim** (Universidade Federal de Alagoas/UFAL)	APROVADO

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:
Prof. Dr. **Eduardo Mario Mendiondo**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Associado **Luís Fernando Costa Alberto**

A minha mãe Sonia,
por ter tornado tudo possível.

AGRADECIMENTOS

Sou grata a Deus e à vida, pela oportunidade de estudar e pesquisar e a meus pais, Sonia e Wellington, por terem dedicado suas vidas para que eu e minha irmã pudéssemos desfrutar deste privilégio.

Sou grata ao meu parceiro da vida, Rodrigo M. Valença, por ser meu ponto firme, meu melhor amigo, pelo amor e cuidado, por ter feito comigo este mestrado, pelo dia a dia, por tudo.

Sou grata a todos os meus professores pelos ensinamentos (Colégio Santa Catarina, São Francisco de Assis, Fismat Curso, Universidade Federal de Alagoas, The University of Kansas, Universidade de São Paulo).

Sou grata a meus avós maternos e paternos pelo amor incondicional, especialmente a vó Vanda e vô Teixeira, por serem exemplo de luta e resistência nas adversidades da vida.

Agradeço ao Prof. Dr. Eduardo Lucena Amorim por todas as oportunidades desde o meu primeiro ano de graduação, por acreditar e confiar em mim e no meu trabalho, pelos incentivos, portas abertas, direcionamentos, inspiração e amizade.

Agradeço imensamente à Prof. Dra. Márcia H. R. Z. Damianovic, minha orientadora, por todas as oportunidades que me deu, pela confiança, orientação, compreensão, ensinamentos e pelas portas abertas.

Ao Prof. Dr. Eduardo Bessa Azevedo, além de gratidão, gostaria de registrar minha admiração. Muito obrigada por me orientar, conduzir, ensinar, acolher e escutar, pelas horas e horas de aulas sobre fundamentos, possibilidades e sobre a vida. Sou e serei eternamente grata por tudo que o senhor fez e faz por mim, ainda que sempre diga "só estou fazendo a minha obrigação, minha principal função aqui na instituição é como professor!". Obrigada pelas brincadeiras, pela sinceridade de sempre e por ter me orientado também.

Muito obrigada ao Prof. Dr. Marcelo Zaiat, pelos ensinamentos, amizade, oportunidades e pelas vezes que chorei na sua sala, rs. Principalmente, por me abrir as portas e me estender a mão.

Agradeco ao Prof. Dr. Carlos Ruberto Fragoso Jr. por todo suporte necessário e por ter coletado comigo os sedimentos no estuário CELMM - Maceió - AL.

Sou grata as minhas amigas de longa data, Gabriela Rodrigues, Luiza Rijo e Rafaela Cavalcanti por sempre me ouvirem, rirem e chorarem comigo, por comemorarem minhas conquistas e sacudirem minha poeira quando precisei. Pela preocupação, pelo amor, pelo companherismo, pela presença, pela revisão dos meus textos.

Muito obrigada aos meus amigos do Grupo da Pipoca (Jeny Ventura, Felipe Eng Sanchéz e Diana Guevara), por alegrar a minha rotina, pelos almoços, pelos chás e cafés no LPB e fora dele, por torcerem, ajudarem e partilharem, por terem me ajudado a conduzir este trabalho, pela amizade sincera. Gostaria de agradecer especialmente ao Felipe, por pacientemente revisar meus textos e apresentações, por me lembrar que sou capaz todas as vezes que precisei e pelos ensinamentos sobre a vida.

Minha gratidão a Isabel Sakamoto, por todos os ensinamentos, pelas conversas, por me motivar e impulsionar, por toda a ajuda que foi além das análises de biomol, por alimentar as minhas ideias, muito obrigada, Belzinha.

Muito obrigada também aos amigos Elias Neto, Laís Soares e Renata Solcia que sempre me estenderam a mão, torceram por mim e me ajudaram. Foi muito importante poder contar com vocês. Muito obrigada também à Carla E. D. Santos, pelas orientações, direcionamentos, lutas e perrengues que passamos juntas.

Sou muito grata a todos os colegas, técnicos e professores do LPB, por todos os ensinamentos e colaborações.

Finalmente, muito obrigada ao programa PPGSHS/EESC/USP e as agências de financiamento CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e FAPESP - Projeto temático 2015/06246-7.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Edital de Referência: PROEX - 0487.

Por ser de lá,
Do sertão, lá do cerrado
Lá do interior do mato
Da caatinga do roçado.
Eu quase não saio
Eu quase não tenho amigos
Eu quase que não consigo
Ficar na cidade sem viver contrariado.
Por ser de lá
Na certa por isso mesmo
Não gosto de cama mole
Não sei comer sem torresmo
Eu quase não falo
Eu quase não sei de nada
Sou como rês desgarrada
Nessa multidão boiada caminhando a esmo.

Gilberto Gil & Jose Domingos

RESUMO

MACÊDO, W. V. **Influência de diferentes sais e da pressão osmótica em sistema de tratamento de esgoto sanitário de regiões de escassez hídrica**. 2018. 187 f. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito inibidor dos sais NaCl, $MgCl_2$ e $CaCl_2$, em mistura e separadamente, nas comunidades microbianas em sistema descontínuos e contínuos para o tratamento de esgoto sanitário de regiões de escassez hídrica. Foi avaliado o estabelecimento da nitrificação e desnitrificação simultânea (NDS) sem o controle da concentração de oxigênio dissolvido mediante à aeração contínua por meio de reatores contínuos de leito fixo estruturado na presença (Reator salino, RS) e ausência (Reator Controle, RC) dos sais de estudo. Nos sistemas descontínuos, um planejamento fatorial e ensaios complementares isotônicos para as pressões osmóticas (PO) de 5, 15 e 30 atm foram realizados para a comunidade nitrificante e para a comunidade desnitrificante afim de investigar os efeitos de inibição, antagonismo, sinergismo e estímulo dos sais em mistura e separadamente. Os efeitos dos sais foram diferentes para as comunidades nitrificante e desnitrificante e as maiores taxas específicas de nitrificação e desnitrificação obtidas foram de 0,11 mgN $gSSV^{-1}$ min^{-1} e 0,065 mgN $gSSV^{-1}$ min^{-1}, respectivamente. Os ensaios em batelada permitiram inferir que o efeito de inibição de cada sal é distinto quando em mistura ou separadamente, independentemente da PO aplicada e que o efeito de toxicidade específica de cada sal é superior ao efeito de inibição da PO do meio, podendo estar relacionado à capacidade de osmoregulação dos microrganismos por solutos compatíveis. Nos reatores contínuos, a NDS foi estabelecida sob aeração contínua com concentrações médias de OD de 6 mg L^{-1}, alcançando eficiências de oxidação de NH_4^+ e de remoção de N-Total de 60% e 56,3% no RC e 95,9% e 65,8% no RS na Fase 1 com PO de 1,7 atm. Isto evidenciou que a presença dos sais em concentração moderada foi benéfica ao sistema nas condições estudadas e para os inóculos aplicados. A deficiência da remoção de N-total em relação ao que foi nitrificado foi atribuida à falta de doadores de elétrons suficientes para promover a desnitrificação heterotrófica. A remoção de DQO no RS foi pouco afetada pelo aumento da PO, tendo eficiência reduzida de 97,2% para 86,2% com o aumento da PO de 1,7 para 9 atm. Análises de PCR/DGGE indicaram que a diversidade microbiana de ambientes salinos é tão grande ou maior que a de ambientes de água doce e o sequenciamento genético evidenciou que os inóculos possibilitaram a inserção de populações capazes de atuar no ciclo do nitrogênio sob condições de elevada salinidade, destacando-se os gêneros *Aeromonas*, *Rheinhemera*, *Azospirillum*, *Thioalkalivibrio* e *Pseudoalteromonas*.

Palavras-chave: Salinidade. Pressão osmótica. Nitrificação e desnitrificação simultânea.

ABSTRACT

MACÊDO, W. V. **Influence of different salts and osmotic pressure in the treatment of wastewater from water scarcity regions**. 2018. 187 f. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

The aim of this research was to evaluate the inhibitory effect of NaCl, $MgCl_2$ and $CaCl_2$ salts, in mixture and separately, on microbial communities in batch and continuous systems for the treatment of wastewater from regions with water scarcity. The establishment of simultaneous nitrification and denitrification process (SND) was assessed without dissolved oxygen control and under continuos aeration in structured bed reactors in the presence (Saline Reactor, SR) and absence (Control Reactor, CR) of the studied salts. In the batch reactors, a factorial design and complementary isotonic experiments for the osmotic pressures (OP) of 5, 15 and 30 atm were performed to investigate the effects of inhibition, antagonism, synergism, and stimulation of the salts alone and in mixture. The salts caused distinct effects on the nitrifying and denitrifying communities and the highest nitrification and denitrification specific rates obtained were 0.11 mgN $gSSV^{-1}$ min^{-1} and 0.065 mgN $gSSV^{-1}$ min^{-1}, respectively. In the studied conditions, the results of the batch experiments showed that the inhibitory effect of each salt is different when they are alone or in mixture, regardless of the applied OP. It was observed that the microbial communities are more negatively affected by the specific toxic effect of each salt than by the unspecific inhibitory effect of the OP, which may be related to the osmoregulation capacity of the microorganisms by compatible solutes system. In the continuous reactors CR and SR, SND was established under continuous aeration at average DO concentrations of 6 mg L^{-1}, achieving NH_4^+ oxidation and total nitrogen removal efficiencies of 60% and 56.3% in CR, and 95.9 % and 65.8% in SR in Phase 1 with OP of 1.7 atm. This data indicates that the presence of the salts in moderate concentration was beneficial to the system for the studied conditions and inoculum. The total nitrogen removal did not achieve higher efficiencies possibly due to the lack of electron donors, which supports heterotrophic denitrification. The COD removal in the SR was not greatly affected by the increase on OP as the efficiency reduced from 97.2% to 86.2% as the OP increased from 1.7 to 9 atm. PCR/DGGE analyses indicated that the microbial diversity of saline environments is as great as in freshwater ones. Genetic sequencing of the biomass showed the presence of bacterial populations capable of consuming oxidized and reduced forms of nitrogen under high osmotic pressure such as the genus *Aeromonas*, *Rheinhemera*, *Azospirillum*, *Thioalkalivibrio* and *Pseudoalteromonas*.

Key words: Salinity. Osmotic pressure. Simultaneous nitrification and denitrification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Salinidade dos poços de abastecimento de água subterrânea na região Nordeste do Brasil e no norte do estado de Minas Gerais. 36
Figura 2 - Estrutura do biofilme no processo de nitrificação e desnitrificação simultânea. 45
Figura 3 - Fluxograma do procedimento experimental deste trabalho. 52
Figura 4 - Coeficientes de atividade iônica (γ) em função da concentração molal de cada sais NaCl, $MgCl_2$ e $CaCl_2$. 61
Figura 5 - Desenho esquemático do reator biológico de leito estruturado com sistema de aeração. 63
Figura 6 - Coleta do sedimento bentônico no CELMM. 66
Figura 7 - Fluxograma do procedimento experimental com identificação das etapas desenvolvidas e ordem e agrupamento dos resultados. 69
Figura 8 - Resíduos em função da variável resposta obtida para o Planejamento Experimental A (nitrificação). 72
Figura 9 - Gráfico de Pareto obtido por meio do planejamento experimental A (nitrificação). 72
Figura 10 – Superfícies de resposta que mostra a resposta taxa máxima de nitrificação via $N\text{-}NH_4^+$ ($r_{N\text{-}máx}$) relacionando aos fatores NaCl e $MgCl_2$ (a), NaCl e $CaCl_2$ (b) e $MgCl_2$ e $CaCl_2$ (c). 75
Figura 11 - Consumo de nitrogênio amoniacal na condição de pressão osmótica de 5 atm para os sais NaCl, $MgCl_2$ e $CaCl_2$. 78
Figura 12 - Consumo de nitrogênio amoniacal na condição de pressão osmótica de 15 atm para os sais NaCl, $MgCl_2$ e $CaCl_2$. 78
Figura 13 - Consumo de nitrogênio amoniacal na condição de pressão osmótica de 30 atm para os sais NaCl, $MgCl_2$ e $CaCl_2$. 79
Figura 14 - DGGE das amostras do planejamento experimental (1 - 8) e dos Ensaios Complementares (9 - 17) comparadas à biomassa do ensaio controle (0). 85
Figura 15 - Dendograma das amostras do planejamento experimental A (nitrificação) gerado a partir do gel de DGGE. 86
Figura 16 - Dendograma das amostras dos ensaios complementares de nitrificação gerado a partir do gel de DGGE. 87
Figura 17 - Gel e dendograma das amostras dos ensaios do planejamento experimental A e ensaios complementares de nitrificação. 88
Figura 18 - Representação dos índices de diversidade (Shannon) e riqueza (Chao) das populações bacteriana para as amostras do planejamento experimental A (nitrificação) em ordem decrescente. 89
Figura 19 - Representação dos índices de diversidade (Shannon) e riqueza (Chao) das populações bacteriana para as amostras dos ensaios complementares de nitrificação. As colunas em azul são referentes aos ensaios com NaCl, vermelhas aos ensaios com $MgCl_2$ e verde aos ensaios com $CaCl_2$. 89
Figura 20 - Identificação das bandas recortadas nos ensaios nitrificantes para identificação filogenética por sequenciamento. 91
Figura 21 - Árvore filogenética dos microrganismos sequenciados referentes ao estudo de nitrificação (Uncultured *Methanosaeta sp.* foi usado como grupo externo). 96

Figura 22 - Gráfico dos resíduos e valores observados para o planejamento experimental B (desnitrificação). 101
Figura 23 - Gráfico de Pareto para o Planejamento Experimental B. 102
Figura 24 - Superfícies de resposta que mostra a resposta taxa máxima de desnitrificação via $N\text{-}NH_4^+$ ($r_{DN\text{-}máx}$) relacionando aos fatores NaCl e $MgCl_2$ (a), NaCl e $CaCl_2$ (b) e $MgCl_2$ e $CaCl_2$ (c). 103
Figura 25 - Consumo de nitrato na condição de pressão osmótica de 5 atm para os sais NaCl, $MgCl_2$ e $CaCl_2$. 106
Figura 26 - Consumo de nitrato na condição de pressão osmótica de 15 atm para os sais NaCl, $MgCl_2$ e $CaCl_2$. 106
Figura 27 - Consumo de nitrato na condição de pressão osmótica de 30 atm para os sais NaCl, MgCl e $CaCl_2$. 107
Figura 28 - As três possíveis relações entre a degradação de NO_3^- e a concentração de oxigênio dissolvido (OD): I - o aumento da concentração de OD afeta negativamente a degradação do NO_3^-; II - a concentração de OD é positiva para a degradação do NO_3^- em uma determinada faixa controlada e negativa quando superior ao ponto ótimo; III - a degradação DO NO_3^- é afetada positivamente pelo OD até o ponto ótimo e constante para concentrações de OD superiores à ótima. 112
Figura 29 - DGGE das amostras do planejamento experimental B (1 - 8) e dos ensaios complementares (9 - 17) de desnitrificação comparadas à biomassa do ensaio controle (0). 113
Figura 30 - Dendograma das amostras do planejamento experimental B. 114
Figura 31 - Dendograma das amostras dos ensaios complementares de desnitrificação. 115
Figura 32 - Relação entre os índices de diversidade e riqueza bacteriana para as amostras do planejamento experimental B (desnitrificação). A composição do meio de cada condição está descrita na Tabela 19. 116
Figura 33 - Relação entre os índices de diversidade e riqueza bacteriana para as amostras dos ensaios complementares de desnitrificação. Os ensaios em azul são com NaCl, os em vermelho são com $MgCl_2$ e os em verde são com $CaCl_2$. A composição do meio de cada condição está descrita na Tabela 19. 117
Figura 34 - Bandas recortadas e sequenciadas geneticamente referente aos ensaios de desnitrificação heterotrófica com acetato de sódio como fonte de doador de elétrons. 118
Figura 35 - Árvore filogenética dos microrganismos identificados referentes aos ensaios de desnitrificação (Grupo externo: *Methanosaeta sp*.). 120
Figura 36 - Reatores Controle e Salino em operação. 126
Figura 37 - Concentrações de nitrogênio amoniacal afluente e efluente e eficiência de oxidação do amônio e de remoção de nitrogênio total no Reator Controle (RC). FA: Fase de Adaptação; FU: Fase Única. 127
Figura 38 - Concentrações efluente de nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) no reator rontrole (RC). FA: fase de adaptação; FU: fase única. 127
Figura 39 - Material biológico viscoso formado nas hastes dos reatores controle e salino semelhante ao descrito como substância extracelular polimérica (EPS). 130
Figura 40 - Nitrogênio amoniacal afluente, efluente, eficiência de oxidação da amônia e de remoção de nitrogênio total no Reator Salino (RS). FA: Fase de Adaptação (PO:

1,7 atm / salinidade: 0,3 wt%); F1: Fase 1 (PO: 5,25 atm / salinidade: 1 wt%); F3: Fase 3 (PO: 9 amt / salinidade: 1,7 wt%). 131
Figura 41 - Concentrações efluente de nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) no Reator Salino (RS). 131
Figura 42 - Perfil das eficiências de oxidação de N-$NH4^+$, desnitrificação e remoção de N-total ao longo do período operacional do reator salino. FA: Fase de Adaptação (PO: 1,7 atm / salinidade: 0,3 wt%); F1: Fase 1 (PO: 5,25 atm / salinidade: 1 wt%); F3: Fase 3 (PO: 9 amt / salinidade: 1,7 wt%). 133
Figura 43 - Gráficos *Box-plot* da distribuição das eficiências de oxidação de N-NH_4^+ (a), de desnitrificação (b) e de remoção de nitrogênio total (c) nas três fases operacionais do reator salino. No eixo de x, (1) refere-se à fase 1, (2) à fase 2 e (3) à fase 3. 138
Figura - 44 - Variação da DQO afluente e efluente e eficiência de remoção nos reatores controle (a) e salino (b) ao longo do período operacional. FA: fase de adaptação; FU: fase única; F1: fase 1; F2: fase 2; F3: fase 3. 142
Figura 45 - Gráfico *Box-plot* da distribuição da eficiências de oxidação de remoção de DQO nas três fases operacionais do reator salino. 1 - Fase 1; 2 - Fase 2; 3 - Fase 3. 144
Figura 46 - Microscopia de contraste de fase do material biológico coletado no RC (a) e no RS (b) com observação em escala de 10µm indicada nas figuras. 148
Figura 47 - DGGE das amostras de biomassa coletadas no reator controle (RC) e nas três fases operacionais do reator salino (RS1, RS2 e RS3). 150
Figura - 48 - Dendograma das amostras referentes às fases operacionais dos reatores controle e salino. RC: reator controle; RS1: reator salino fase 1; RS2: reator salino fase 2; RS3: reator salino fase 3. 150
Figura - 49 - Índice de diversidade Shannon normalizado para cada fase operacional dos reatores controle e salino e seus respectivos Índices Chao (número de bandas), dispostos acima de cada coluna. 151
Figura 50 - Bandas que foram recortadas para a identificação das populações do domínio *Bacteria* por sequenciamento proveniente da biomassa dos reatores controle e salino nas fases estudadas. 152
Figura 51 - Árvore filogenética dos microrganismos sequenciados referentes aos reatores contínuos (Grupo externo: *Methanosarcina sp*.). 155

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais resultados de alguns dos trabalhos revisados a respeito do processo de nitrificação e desnitrificação simultânea sob regime de microaeração. 46
Tabela 2 - Influência da salinidade (wt% de NaCl) em diferentes processos de tratamento biológico para remoção de matéria nitrogenada. 50
Tabela 3 - Composição das soluções de macro e micronutrientes. 55
Tabela 4 - Variáveis independentes (fatores) e seus respectivos valores codificados e reais. 56
Tabela 5 - Matriz do Planejamento Experimental A (nitrificação) e B (desnitrificação) e a apresentação da força iônica e pressão osmótica de cada condição. 56
Tabela 6 - Ensaios complementares (apenas um par iônico para compor a salinidade) e respectivas força iônica e pressão osmótica de cada condição. 57
Tabela 7 - Concentrações máximas encontradas para os íons que compõe os sais de estudo na área monitorada (ertão do estado de Alagoas). 65
Tabela 8 - Estimativa da atividade iônica dos sais de estudo, correspondente pressão osmótica conferida por cada sal e pressão osmótica da solução final. 65
Tabela 9 - Características físico-químicas da água residuária de estudo (esgoto sanitário simulado). 66
Tabela 10 - Matriz de condições experimentais e respostas do Planejamento experimental A (nitrificação). 71
Tabela 11 - ANOVA para o efeito dos sais alcalinos NaCl, $MgCl_2$ e $CaCl_2$ na taxa máxima específica de nitrificação ($r_{N'máx}$). 75
Tabela 12 - Composição do meio reacional e respostas obtidas nos ensaios complementares. 77
Tabela 13 - Taxas máximas específicas de nitrificação obtidas neste trabalho e nos trabalhos de Uygur (2006) e Wang e et al. (2015) para diferentes faixas pressões osmóticas. 81
Tabela 14 - Características do meio reacional de cada condição experimental estudada e apresentadas no gel de DGGE da Figura 14. 85
Tabela 15 - Identificação das populações do domínio *Bacteria* das bandas recortadas do gel de DGGE dos ensaios de nitrificação. 93
Tabela 16 - Matriz das condições experimentais e as respectivas respostas que compõe o planejamento experimental B (desnitrificação). 101
Tabela 17 - ANOVA para o efeito dos sais NaCl, $MgCl_2$ e $CaCl_2$ na taxa máxima específica de desnitrificação. 104
Tabela 18 - Composição do meio reacional e respectivas respostas obtidas nos ensaios complementares de desnitrificação utilizando acetato de sódio como fonte de doadores de elétrons. 105
Tabela 19 - Caracteristicas do meio reacional de cada condição experimental estudada e apresentadas no gel de DGGE da Figura 29. 114
Tabela 20 - Identificação das populações do domínio *Bacteria* das bandas recortadas do gel de DGGE dos ensaios de desnitrificação. 119
Tabela 21 - Caracteristicas das fases operacionais dos reatores controle e salino referente à pressão osmótica, tempo de detenção hidráulico e oxigênio dissolvido. 124
Tabela 22 - Remoção média da matéria nitrogenada nos reatores controle (RC) e salino (RS) em cada fase operacional. 132

Tabela 23 - Teste de normalidade aplicado às eficiências de oxidação de amônio e de remoção de nitrogênio total nas fases operacionais 1, 2 e 3. 140
Tabela 24 - Diferença estatística entre as eficiências alcançadas em cada fase operacional para a oxidação de nitrogênio amoniacal e remoção de nitrogênio total. 140
Tabela 25 - Valores médios de remoção de DQO nos reatores controle e salino para cada fase operacional. 141
Tabela 26 - Teste de normalidade aplicado aos valores referentes as eficiências de remoção de DQO obtidas em cada fase operacional. 144
Tabela 27 - Condutividade elétrica afluente e efluente nas fases operacionais do reator salino. 145
Tabela 28 - Valores médios do pH e alcalinidade afluente e efluente em cada fase para o reator controle e salino. 145
Tabela 29 - Balanço de massa referente a alcalinidade gerada e consumida no meio reacional em cada fase. 146
Tabela 30 - Concentração média dos sólidos suspensos voláteis (SSV), sólidos suspensos fixos (SSF) e sólidos suspensos totais (SST) no efluente dos reatores RC e RS. 147
Tabela 31 - Composição da salinidade afluente nos reatores contínuos RC e RS em cada fase operacional. 151
Tabela 32 - Identificação das populações do domínio *Bacteria* das bandas recortadas do gel de DGGE das amostras dos reatores contínuos. 154

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anammox	Anaerobic Ammonium Oxidation
ANOVA	Análise de Variância
APHA	Associação Americana de Saúde Pública, do inglês "*American Public Health Association"*
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CE	Condutividade elétrica
CELMM	Complexo estuarino lagunar Mundaú-Manguaba
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DNA	Ácido Desoxirribonucleico, do inglês *deoxyribonucleic acid*
DQO	Demanda química de oxigênio
E1	Etapa 01
E2	Etapa 02
E3	Etapa 03
EESC	Escola de Engenharia de São Carlos
EPS	Substância extracelular polimérica, do inglês "*extracelluar polymeric substance"*
ESALQ	Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"
ETE	Estação de tratamento de esgoto
F	valor da função F
F1	Fase 01
F2	Fase 02
F3	Fase 03
FA	Fase de adaptação
FU	Fase única
GL	Grau de liberdade
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MO	Matéria orgânica
MQ	Média quadratic

MQ_R	Média quadrática da regressão
MQ_r	Média quadrática dos resíduos
MQ_{faj}	Média quadrática da falta de ajuste
MQ_{ep}	Média quadrática do erro puro
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NDS	Nitrificação e desnitrificação simultânea
NTK	Nitrogênio total Kjeldahl
N-total	Nitrogênio total
OD	Oxigênio dissolvido
PAD	Programa Água Doce
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês *polymerase chain reaction*
PVC	Policloreto de vinila, do inglês *polyvinyl chloride*
RC	Reator controle
RS	Reator salino
SQ	Soma quadratic
SSF	Sólidos suspensos fixos
SST	Sólidos suspensos totais
SSV	Sólidos suspensos voláteis
ST	Sólidos totais
TDH	Tempo de dentenção hidráulico
UASB	Reator anaeróbio de manta de lodo, do inglês, upflow anaerobic sludge blanket reactor
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE SIMBOLOS

C_0	Concentração inicial
C_N	Concentração de nitrogênio
C/N	Relação carbono/nitrogênio
c_i	Concentração de íon
C_I	Concentração do inibidor
Cs'	Concentração específica de substrato
e^-	Elétron
i	coeficiente de Van't Hoff
I	Força iônica da solução
k	Constante de velocidade da reação relacionada ao modelo cinético
K_I	Constante de saturação do inibidor
K_m	Constante de consumo do substrato
K_s	Constante de saturação de substrato
pH	Potencial hidrogeniônico
R	Constante universal dos gases
r	Taxa específica do consumo de nitrogênio
$r_{máx}$	Taxa máxima de consumo do substrato
$r_{DN\text{-}máx}$'	Taxa máxima específica de nitrificação via $N\text{-}NH_4^+$
$r_{N\text{-}máx}$'	Taxa máxima específica de desnitrificação
r_s	Taxa de consumo de substrato
t	Tempo
T	Temperatura
wt%	Porcentagem em peso, do inglês *weight percent*
$ZnCl_2$	Cloreto de zinco
z_i	Carga do íon
α	Atividade
π	Pressão osmótica
γ	Coeficiente de atividade

SUMÁRIO

1. Introdução geral **29**

2. Objetivo geral e específicos **33**

3. Revisão da literatura **34**

3.1 O consumo de águas salinas e a relação com a escassez hídrica *34*

3.2 Aspectos fundamentais da atividade iônica dos eletrólitos e a pressão osmótica total ... *37*

3.3. Os processos de nitrificação e desnitrificação *41*

3.4 Nitrificação e desnitrificação simultânea (NDS) sob diferentes sistemas de aeração *45*

3.5 Efeito da salinidade em sistemas biológicos de tratamento *48*

4. Materiais e Métodos **51**

4.1 Procedimento experimental global *51*

4.2 Análises físico-químicas *52*

4.3 Análises de biologia molecular *53*

4.4 Macronutrientes e Micronutrientes *54*

4.5 Ensaios de nitrificação e desnitrificação em batelada *55*

4.5.1 Planejamento experimental e ensaios complementares 55

4.5.2 Inóculo utilizado nos ensaios em batelada 57

4.5.3 Procedimento experimental das bateladas 58

4.5.4 Cálculo da atividade específica de nitrificação e de desnitrificação 59

4.5.5 Cálculo dos coeficientes de atividade iônica e pressão osmótica 61

4.6. Reatores biológicos contínuos *62*

4.6.1 Reator de Leito Fixo Estruturado 62

4.6.2. Material suporte para a imobilização da biomassa 63

4.6.3 Água residuária de estudo nos sistemas contínuos 64

4.6.4 Inóculo e *Start up* 66

4.6.5 Monitoramento da eficiência dos processos 67

5. Resultados e Discussões **69**

PARTE I - Planejamento experimental e ensaios complementares para Nitrificação *69*

5.1.1 Planejamento fatorial para nitrificação via $N\text{-}NH_4^+$ 70

5.1.2 Ensaios complementares de nitrificação via $N\text{-}NH_4^+$ 76

5.1.3 Discussão geral dos resultados dos ensaios de nitrificação em bateladas 80

5.1.4 Análises de biologia molecular das amostras do planejamento fatorial A e ensaios complementares de nitrificação 84

5.1.5 Sequenciamento genético das bandas recortadas do gel de DGGE dos ensaios de nitrificação 91

PARTE II - Planejamento experimental e ensaios complementares para desnitrificação ... *100*

5.2.1 Planejamento experimental para desnitrificação 100

5.2.2 Ensaios complementares ao planejamento fatorial B (desnitrificação) 105

5.2.3 Discussão geral dos resultados dos ensaios em batelada de desnitrificação 108

5.2.4 Análises de Biologia Molecular das amostras do planejamento fatorial B e ensaios complementares de desnitrificação 113

5.2.5 Sequenciamento genético das bandas recortadas do gel de DGGE dos ensaios de desnitrificação 118

PARTE III - Reatores Contínuos de Leito Estruturado *124*

5.3.1 Fases operacionais dos reatores contínuos Controle (RC) e Salino (RS) 124

5.3.2 Remoção de Nitrogênio - Estabelecimento da nitrificação e desnitrificação simultânea (NDS) e a influência da pressão osmótica 126

5.3.3 Remoção de demanda química de oxigênio (DQO) nos reatores biológicos controle e salino 141
5.3.4 pH, condutividade elétrica, alcalinidade e a série de sólidos suspensos 145
5.3.5 Microscopia óptica de contraste de fase 147
5.3.6 Análises de biologia molecular 149
5.4 Discussão geral dos resultados das Partes I, II e III deste trabalho 158
6. Conclusão 161
7. Referências Bibliográficas 163
ANEXO I 183
ANEXO II 186

1. Introdução geral

A demanda crescente por água potável em regiões de clima árido e semi-árido vem aumentando a salinização de aquíferos subterrâneos devido à associação de fatores como a elevada evapotranspiração, escassez ou inexistência de corpos hídricos superficiais, intensa explotação de águas subterrâneas, baixa recarga hídrica e salinização de solos (NATIV et al., 1997; TWEED et al., 2011; YAOUTI et al., 2009). No Brasil, a escassez hídrica afeta principalmente os estados do Nordeste e o estado de Minas Gerais provocando a salinização da água subterrânea que abastece os semi-áridos e sertões destes estados, originando um esgoto sanitário salino. Assim, o esgoto sanitário nestas localidades possui elevadas dureza, alcalinidade e concentrações de diversos íons como Na^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, K^+, Cl^- e SO_4^{2-} (LIMA et al., 2008; BRASIL, 2012), podendo comprometer a atividade microbiana de sistemas de tratamento biológico de esgoto sanitário (CHEN et al., 2008).

No tratamento de esgoto sanitário, a remoção conjunta da matéria orgânica e nitrogenada atende ao objetivo de construir e operar estações de tratamento mais compactas e menos dispendiosas. Nos processos convencionais de remoção de nitrogênio, a nitrificação e desnitrificação ocorrem em câmaras aeróbias e anóxicas separadas. No entanto, o processo de nitrificação e desnitrificação simultâneas (NDS) ocorre em um mesmo meio reacional por meio da estratificação das bactérias que irão se agrupar de modo a formar um biofilme heterogêneo (HE et al., 2009; LIAO et al., 2010; POCHANA; KELLER, 1999). As bactérias nitrificantes, autotróficas e aeróbias, ocupam a parte mais externa do biofilme oxidando o íon amônio do meio e utilizando o oxigênio dissolvido como aceptor final de elétrons. Já as bactérias desnitrificantes heterotróficas, colonizam a parte mais interna do floco ou biofilme, reduzindo a N_2 o nitrogênio oxidado e contribuindo também para o consumo da matéria orgânica, fonte de doadores de elétrons (POCHANA; KELLER, 1999).

As mudanças nas características da estrutura do biofilme, variações na abundância e diversidade microbiana e no desempenho metabólico destes organismos são consequências das elevadas concentrações de sais em sistemas biológicos. Estas

alterações podem ocorrer devido à pressão osmótica (PO) exercida nas células ou ao efeito tóxico direto dos íons na comunidade bacteriana (LEFEBVRE; MOLETTA, 2006; SERRANO, 1996; ZHAO et al., 2016). Grande parte dos trabalhos que investigam o efeito da salinidade em comunidades microbianas considera apenas o cloreto de sódio para a composição do meio. Em águas naturais e em algumas águas residuárias de

processos agroindustriais, é comum a existência de muitos ânions em concentrações elevadas, como cloretos, sulfatos e carbonatos, geralmente associados aos cátions sódio, magnésio, cálcio, potássio e alguns metais vestigiais. A água do mar, de estuários, de salmouras naturais e corpos d'água em regiões áridas são alguns exemplos de sistemas hídricos com elevada salinidade, como o da região de estudo deste trabalho (ANEXO I) e de sistemas relatados por outros autores (DasSARMA e DasSARMA, 2006; LEFEBVRE; MOLETTA, 2006). A região de estudo que foi utilizada para caracterizar a composição da água residuária base deste trabalho é composta por 18 municípios do sertão do estado de Alagoas, região semi-árida do país.

Por isso, avaliar outros eletrólitos de grande concentração em águas naturais como os cloretos de magnésio e cálcio, separadamente e em mistura com o cloreto de sódio, seria de valiosa contribuição para melhorar os sistemas de tratamento de águas residuárias, a partir da compreensão dos efeitos de inibição causados por estes sais aos organismos em processos biológicos. Para tanto, é necessário o estudo de parâmetros instrínsecos aos íons, como a atividade iônica em soluções de eletrólitos mistos e individualizados, para que possam ser relacionados à pressão osmótica exercida nas células microbianas e a sua real disponibilidade reacional. Desta forma, os resultados poderiam indicar se o efeito inibidor de uma solução salina está relacionado à natureza dos compostos em solução ou à pressão osmótica causada por eles.

A partir das considerações anteriores, este trabalho objetivou em duas etapas distintas, investigar o efeito de diferentes sais de cloretos e da pressão osmótica nas comunidades microbianas nitrificantes e desnitrificantes. Na primeira etapa, esta investigação se deu por meio de ensaios em bateladas para soluções de eletrólitos mistos e individuais em diferentes pressões osmóticas. Na segunda etapa, reatores de leito fixo estruturado com alimentação contínua foram utilizados para a investigação do efeito da aplicação gradual da pressão osmótica baseada na salinidade da água de abastecimento da região de estudo, o sertão alagoano. Nesta etapa, os reatores foram submetidos à aeração contínua sem controle da concentração de oxigênio dissolvido para que também fosse avaliado o estabelecimento da NDS sob tais condições.

2. Objetivo geral e específicos

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito osmótico inespecífico e a toxicidade específica dos sais NaCl, $MgCl_2$ e $CaCl_2$ nas comunidades microbianas nitrificantes e desnitrificantes em bateladas, e avaliar o efeito da PO no estabelecimento da NDS em reatores contínuos de leito estruturado sob aeração contínua sem controle da concentração de oxigênio dissolvido (OD).

Os objetivos específicos foram:

- Avaliar o efeito dos sais NaCl, $MgCl_2$ e $CaCl_2$ e da pressão osmótica em mistura e em soluções individuais na atividade e estrutura da comunidade microbiana nitrificante;
- Avaliar o efeito dos sais NaCl, $MgCl_2$ e $CaCl_2$ e da pressão osmótica em mistura e em soluções individuais na atividade e estrutura da comunidade microbiana desnitrificante;
- Avaliar o estabelecimento e desempenho da nitrificação e desnitrificação simultânea em reator de leito estruturado sob aeração contínua, sem controle do OD;
- Avaliar a influência da pressão osmótica de eletrólitos mistos em reator contínuo de leito estruturado para a remoção de matéria orgânica e nitrogenada;
- Caracterizar a comunidade microbiana do biofilme dos reatores contínuos e associá-la aos processos de conversão observados.

3. Revisão da literatura

3.1 O consumo de águas salinas e a relação com a escassez hídrica

Regiões de climas áridos e semi-áridos estão sujeitas a longos períodos de seca, o que ocasiona a salinização de solos e, consequentemente, de águas substerrâneas. A salinização de aquíferos em regiões áridas pode ser atribuida à acentuada evapotranspiração, possível intrusão salina, explotação exacerbada dos lençois freáticos e dissolução de evaporito no processo de recarga dos aquíferos (TWEED et al., 2011; YAOUTI et al., 2009). A elevada evapotranspiração e restrita recarga hídrica ocasiona um baixo gradiente hidráulico, sendo a principal causa da concentração de sais em aquíferos (NATIV et al., 1997). Além disso, a sua própria formação geológica e posição espacial no globo, bem como a relação com as mudanças climáticas, podem originar aquíferos naturalmente salinos (WALTER et al., 2017).

A crescente demanda por água potável, além de acelerar a salinização de aquíferos, aumenta o consumo de água salinas para fins domésticos menos nobres, cultivo, criação de animais e na indústria, gerando efluentes com elevada concentração de sais. As águas subterrâneas são de crucial importância para o desenvolvimento e manutenção da vida em regiões de climas áridos, sendo na maioria das vezes a única fonte de água (JILALI, 2006; MONDAL et al., 2010; SINGH, 2011).

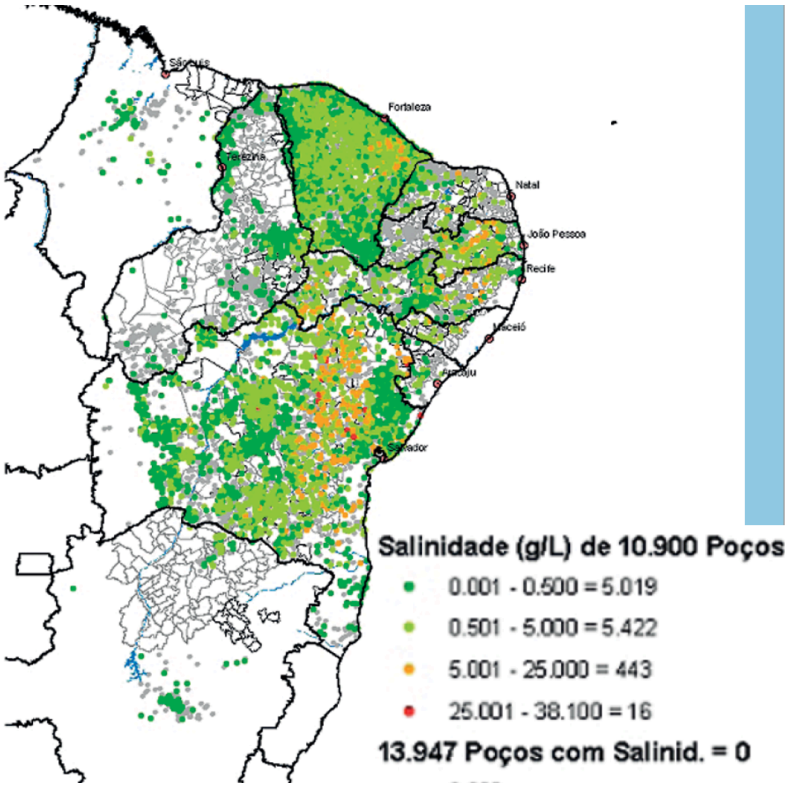
Águas subterrâneas salinas são comuns em regiões de climas árido e, juntamente à escassez hídrica, são problemas discutidos mundialmente (ABEDIN et al., 2014; JILALI, 2006). Em regiões rurais de Bangladesh, por exemplo, no ano de 2009, 15 milhões de pessoas já consumiam água salina e 30 milhões de pessoas não possuíam acesso à água potável (ABEDIN et al., 2014; HOQUE, 2009). A principal razão para a elevada salinidade nesta região é a intrusão salina acentuada nos períodos de seca. No norte da China, a severa escassez hídrica ocasionou a grande explotação de águas subterrâneas. Esta prática tem contribuído para a salinização de aquíferos associada à intrusão salina na região (FOSTER et al., 2004; JIANG et al, 2009). No Irã, um estudo desenvolvido para avaliar a qualidade da água subterrânea para irrigação evidenciou os riscos da aplicação desta água no solo, o que ocasionaria o retorno dos sais em concentrações ainda maiores para os aquíferos, devido à elevada evapotranspiração na

região (JILALI, 2006). No Marrocos, a elevada salinidade do aquífero Bou-Areg é atribuida às formações geológicas naturais e à ação antropogênica, similar ao relatado para a ocorrência desta característica no oeste Australiano (RENGASAMY, 2006; YAOUTI et al., 2009). No sul de Israel, um estudo desenvolvido por Nativ et al. (1997) atribuiu esta salinidade às características climatológicas da região. Outra causa possivelmente responsável pela salinização de aquíferos é a deposição fóssil de águas salinas e origem meteórica, como investigado na região sul da França (KHASKA et al., 2013).

A região de Karoo na África do Sul depende completamente do abastecimento de água subterrânea. Nessa região, as características topográficas dos maciços rochosos e climatológicas vêm aumentando a concentração de sais nos aquíferos ao longo do tempo (ADAMS et al., 2001). Já estudos desenvolvidos em regiões áridas do México evidenciam que além das práticas agrículas, da elevada explotação nos poços e da intrusão salina, as fontes dos principais íons alcalinos e alcalinos terrosos em aquíferos salinos também podem ser associadas à processos erosivos de rochas como albitas (CARDONA et al., 2004; MAHLKNECHT et al., 2004).

Grande parte do território brasileiro, especialmente na região Nordeste e o norte do estado de Minas Gerais sofre com a falta de água, e na maioria das vezes, nos sertões brasileiros, a captação subterrânea é a única fonte de água para consumo animal e humano, gerando assim, um esgoto sanitário salino e concentrado (LIMA et al., 2008). Lima et al. (2008) desenvolveram um estudo que mapeou a variação da concentração de sais na água subterrânea do nordeste brasileiro para a obtenção de uma visão geral da salinidade da água neste espaço geográfico. Os autores relataram que os maiores índices de salinidade estão concentrados na porção central do Nordeste, gradualmente crescente do litoral ao interior da região, na razão inversa ao índice pluviométrico. Destaca-se com salinidade elevada (concentração de sais de 2000 a 8000 mg L^{-1}) regiões como o agreste e sertão dos estados de Alagoas, Bahia, Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte. A Figura 01 apresenta o mapeamento da salinidade em gramas por litro nos poços que abastecem as regiões do semiárido do país.

Figura 1 – Salinidade dos poços de abastecimento de água subterrânea na região Nordeste do Brasil e no norte do estado de Minas Gerais.



Fonte: Adaptado de Brasil (2012).

No estado de Alagoas, além do uso não regulamentado das fontes de água subterrâneas e da intrusão salina, outro fator que apresenta risco à qualidade dos aquíferos por intensificar a salinização é o uso de efluentes pré-tratados das indústrias de cana-de-açúcar na irrigação (NOBRE et al., 2007). Em Pernambuco, na região de Recife, a salinização foi atribuída à intensificação da explotação da água e perfuração indiscriminada de poços, à proximidade a ecossistemas salinos como estuários e mangue que contribuem para a recarga dos aquíferos, ao clima, à urbanização e à atividade antropogênica (CABRAL et al., 2008; CARY et al., 2015; MONTENEGRO et al., 2006). Apesar de águas salinas e salobras serem um problema em diversos países, a dessalinização é um processo pouco aplicado por exigir muito investimento financeiro e energético (SHANNON et al., 2009). Desta forma, o uso de águas salinas gera um esgoto sanitário e industrial altamente concentrado em sais, sendo um fator importante a ser considerado em tecnologias de tratamento.

No ANEXO I, está apresentada a caracterização da água consumida em 18 municípios do sertão alagoano realizada pelo Programa Água Doce (PAD). Essa iniciativa do governo federal promovida pelo Ministério do Meio Ambiente objetivou a instalação e operação de dessalinizadores no semi-árido e sertão brasileiro, beneficiando 20 milhões de habitantes, o que representam 22% do total de municípios brasileiros (BRASIL, 2012). Todavia, segundo a mesma fonte, a água dessalinizada é destinada apenas para ingestão direta e preparo de alimentos, o que justifica a geração de um esgoto sanitário concentrado em sais e em matéria orgânica e nitrogenada, devido à indisponibilidade de água e baixa renda per capita, fatores associados ao consumo de menores voulmes de água. Dentre os íons quantificados, destacam-se as concentrações de Na^{+}, Mg^{2+}, Ca^{2+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-} e CO_3^{2-}, os mesmos elementos identificados em grandes concentrações pelos autores dos trabalhos supracitados nesta seção.

Assim, é necessária a investigação do efeito da salinidade composta por eletrólitos mistos no tratamento biológico de efluentes com essas características, uma vez que o efeito inibidor dos sais nas comunidades microbianas é conhecido, podendo causar lise celular e reduzir a diversidade e atividade microbiana (AMINZADEHA et al., 2009; CHEN et al., 2008; LEFEVBRE; MOLLETA, 2006; VAN DEN BRAND et al., 2015). Contudo, estudos que permitam associar os sais isoladamente ou combinados à eficiência dos processos de conversão de matéria orgânica e nitrogenada em esgoto sanitário ainda são escassos, limitando-se à interferência do NaCl.

3.2 Aspectos fundamentais da atividade iônica dos eletrólitos e a pressão osmótica total

Para diluição infinita, assume-se que o estado padrão dos íons em solução é tal que todas as atividades se aproximam das concentrações em quantidade de matéria e os coeficientes de atividade se aproximam da unidade; entretanto, essa suposição não tem validade para soluções reais de concentração finita (TRUESDELL; JONES, 1974). Em soluções concentradas, a distância média entre os íons diminui e menos moléculas de água interpostas estão disponíveis para cercar cada íon, forçando-as a se unirem, induzindo a formação do complexo iônico. Além disso, o ambiente é mais intenso na presença de íons multivalentes do que monovalente. (TRUESDELL; JONES, 1969).

Muitas equações foram desenvolvidas para se estimar o coeficiente de atividade de vários eletrólitos. Essas equações foram, de modo geral, baseadas no abaixamento do ponto de congelamento, elevação do ponto de ebulição, redução da pressão de vapor ou solubilidade das forças eletromotoras (HAMER; WU, 1972). É importante enfatizar que a maioria destas equações estão limitadas a forças iônicas relativamente baixas. O método mais utilizado para avaliar a atividade dos íons é a equação de Debye-Huckel, que é justificada por estudos teóricos e amplamente referenciada, embora seja limitada por forças iônicas de até 0,1 molal. A equação de Davies contempla soluções com força iônica de até 0,5 molal, porém não contém parâmetros ajustáveis para cada sal individualmente. Sua precisão experimental expressa que o parâmetro mais importante na solubilidade é o efeito da associação iônica. Para todos os outros parâmetros, pode-se esperar que, com forças iônicas baixas, o efeito seja ou o mesmo para diferentes sais, ou não muito expressivo (DAVIES, 1938).

MACINNES (1919) estabeleceu alguns conceitos importantes sobre os coeficientes de atividade (γ). Em seu trabalho, foi discutido que a atividade dos íons cloreto é independente da atividade do íon positivo univalente. Para cloretos alcalinos, a condutância equivalente dos íons cloreto é constante, e para concentrações crescentes, esta condutância diminui devido à diminuição na ionização do cloreto ou à diminuição de sua mobilidade. Esses fatores afetam diretamente a concentração efetiva (a atividade) dos íons cloreto. Outro conhecimento importante discutido por MacInnes (1919) é que a atividade dos íons K^+ e Cl^- em uma solução de KCl é a mesma, já que ambos os íons têm quase a mesma massa e mobilidade e são univalentes. Assim, a suposição de MacInnes é que os coeficientes de atividade de íons individuais são aproximadamente os mesmos do coeficiente de atividade média em soluções de cloreto alcalino. Robinson e Stokes (1940; 1945; 1948; 1949; 1959) discutiram ainda, a atividade e osmolalidade de muitos eletrólitos e seus respectivos coeficientes em função da molalidade dos sais (até 5m). Esses estudos permitem estimar a atividade dos sais em soluções simples, embora não possam ser aplicados às misturas.

Em águas naturais ou águas residuárias, é comum a existência de muitos eletrólitos em concentrações consideravelmente elevadas, como cloretos, sulfatos e carbonatos, geralmente associados aos cátions sódio, magnésio, cálcio, potássio e alguns

metais vestigiais. Água do mar, estuários, salmouras naturais e corpos d'água em regiões áridas são alguns exemplos de sistemas hídricos com elevada salinidade. Para avaliar processos que ocorrem em ambientes naturais, a atividade de íons deve ser estimada com base em suposições de modelos desenvolvidos para soluções de sal único, já que nenhum modelo foi desenvolvido especificamente para soluções complexas de múltiplos íons em concentrações variáveis e elevadas (TRUESDELL; JONES, 1969). Trusdell e Jones (1969) afirmaram que o cálculo de coeficientes de atividade em uma fonte natural de sais altamente concentrados exigiria a suposição de que o coeficiente de atividade de íons em soluções simples pode ser estendido para soluções complexas de mesma força iônica.

É importante ressaltar que, em misturas, a força iônica total é constante, mas a atividade média de um sal pode depender da força iônica exercida pelo outro sal (HARNED; OWEN, 1958). Por outro lado, neste trabalho especificamente, utilizando a caracterização do sertão Alagoano como área de estudo, há principalmente sais de cloretos, onde os pares iônicos são mínimos em comparação aos pares iônicos formados com outros ânios (regra de Harned) e somente necessário nos cálculos mais exatos, não se aplicando para o estudo dos principais sais em águas naturais, já que outros elementos desconhecidos podem também estar presentes nesses ambientes, o que seria outro fator que poderia influenciar na solubilidade dos sais em geral (GARRELS; CHRIST, 1965).

Embora existam muitos elementos químicos diferentes em águas naturais, algumas simplificações devem ser feitas para a aplicabilidade em sistemas de tratamento de águas residuárias. Garrels e Thompson (1962) consideraram que a suposição de MacInnes ($\gamma K + = \gamma Cl- = \gamma KCl$) é válida não apenas para soluções de KCl puro, mas também para soluções complexas como a água do mar. Em seu estudo, os autores também consideraram a condição de MacInnes para os coeficientes de atividade de cálcio e magnésio, assumindo que não há complexação de íons significativa em solução aquosa de força iônica elevada (água do mar). Assim, os coeficientes de atividade do sal puro são os mesmos que na água do mar com a mesma força iônica. Em seu estudo, Garrels e Thompson (1962) calcularam a distribuição das principais espécies dissolvidas, partindo do pressuposto de que as interações entre os principais íons resultam apenas na formação de pares de íons; os autores acreditam que os principais íons existam como espécies não complexadas na água do mar. Essencialmente, todos os íons Na^+ e K^+ estão não

complexados e apenas 10 a 15% de Ca^{2+} e Mg^{2+} estão presos a ânions. Os ânions, por outro lado, com exceção de Cl^-, são fortemente complexados (GARREL; THOMPSON, 1962; GARREL; CHRIST, 1965). O efluente deste estudo possui em sua composição diversos compostos, porém, por simplificação e aplicabilidade prática no campo de tratamento de efluentes, de acordo com estudos anteriores disponíveis na literatura, apenas os principais íons (Na^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Cl^-) serão considerados devido às suas elevadas concentrações.

Reilly e Wood (1970) desenvolveram equações para estimar os coeficientes de atividade a fim de predizer as propriedades das misturas com mais precisão. Os autores conseguiram equações para soluções contendo dois cátions diferentes e outra equação para soluções de três sais diferentes de um ânion comum. Embora essas equações representem um avanço na previsão de concentração efetiva em misturas, elas consideram soluções livres de impurezas, o que não é adequado para águas naturais. Além disso, essas equações são ideais para experimentos que exijam elevada precisão. Ainda, Bates et al. (1970), com base na teoria da hidratação iônica, sugeriram uma abordagem para avaliar os coeficientes de atividade individuais dos íons em soluções concentradas de cloretos uni-univalentes e di-univalentes não associados. Seu trabalho considerou especialmente o número de hidratação (número de mols de água ligados a um mol de eletrólito, independentemente de como ele é distribuído entre os cátions e ânions), assumindo que os íons cloreto não são hidratados. Da conclusão dos autores, pode-se também considerar que, em soluções concentradas em sais, o magnésio é o cátion de menor disponibilidade reacional em comparação a outros cátions alcalinos e alcalinos terrosos. Este fato deve-se a associação do soluto a uma considerável fração da água disponível, já que quatro mols de cloreto de magnésio se ligam a 1 kg de água (55,51 mols) enquanto 6 mols de cloreto de sódio requerem menos da metade do volume de água para a solubilização completa dos íons.

Truesdell e Jones (1974) desenvolveram um software para calcular o equilíbrio químico em águas naturais denominado "WATEQ". Neste software, os autores consideraram as equações de Debye-Huckel e MacInnes com parâmetros ajustáveis. Para elevadas concentrações, os coeficientes de atividade calculados pelos autores mostraram-se de acordo com os coeficientes médios calculados por Bates e et al. (1970) baseados na

equação de Robinson e Stokes (1949). Para estimar esses coeficientes, os autores assumiram que os coeficientes de atividade em soluções simples são iguais àqueles em soluções complexas da mesma força iônica. Embora eletrólitos mistos em soluções concentradas possam indicar que essa suposição nem sempre é verdadeira, os desvios da dependência da força iônica são pequenos e considerados insignificantes (PYTKOWICZ; KESTER, 1969; TRUESDELL; JONES, 1969; YEATTES et al., 1972).

Outros estudos discutiram a atividade de eletrólitos em soluções concentradas de um sal e também de misturas (GREENBERG; MOLLER, 1989; HARVIE; WEARE, 1980; MILLERO; SCHREIBER, 1982; PITZER; KIM, 1974; PITZER; MAYORGA, 1973; WHITFIELD, 1973). Alguns desses autores consideraram todos os principais elementos presentes na água do mar, no entanto, esses modelos ainda deixam a desejar em fundamentos termodinâmicos e são baseados em parâmetros empíricos, os quais carregam erros experimentais. Também é importante ressaltar que essa precisão dos coeficientes de atividade é substancialmente melhorada quando comparada ao modelo WATEQ apenas para soluções com força iônica superior a 4 molal, o que não é o caso deste estudo.

Em conclusão, para se avaliar o efeito da salinidade no tratamento biológico de águas residuárias, é necessário estimar a concentração efetiva (atividade) dos íons, e assim, estimar a pressão osmótica no meio. Desta forma, os autores podem direcionar a inibição microbiana, relacionando-a com a toxicidade de um íon específico, devido a sua natureza, ou com pressão osmótica exercida sobre a biomassa. Para alcançar esses coeficientes, neste estudo, foi assumido que os coeficientes de atividade em soluções simples são iguais àqueles em soluções complexas de mesma força iônica e os dados de Robinson e Stokes (1959) foram a base para esta estimativa.

3.3. Os processos de nitrificação e desnitrificação

O nitrogênio é um dos principais constituintes das águas residuárias urbanas e de efluentes de processos agroindustriais, como as indústrias alimentícias, têxteis e de cortumes. A presença deste elemento químico em corpos hídricos, em suas formas reduzidas (amoniacal) (NH_4^+ e NH_3) e oxidadas (nitrito NO_2^- e nitrato NO_3^-) podem causar a eutrofização do meio, ser tóxico à biota e ainda dificultar ou tornar ineficiente o

processo de desinfecção em águas de abastecimento (EBELING et al., 2006; FOWLER, 1947). No esgoto sanitário, a matéria nitrogenada biodegradável está presente geralmente na forma de nitrogênio orgânico solúvel e particulado, nitrogênio amoniacal e também nitrato (METCALF; EDDY, 2003).

A remoção destes compostos de águas residuárias, pode ocorrer por meio de diversas tecnologias baseadas em processos biológicos ou fisico-químicos, sendo os processos biológicos geralmente mais efetivos e menos dispendiosos. Dentre as tecnologias biológicas de remoção do nitrogênio, diferentes processos foram desenvolvidos e continuam sendo estudados, tais como a nitrificação e desnitrificação convencional, oxidação anaeróbia do amônio (Anammox), desnitrificação autotrófica, nitrificação e denitrificação simultânea (NDS), entre outros (AHN, 2006).

No processo convencional de remoção de nitrogênio, duas etapas são estabelecidas em ambientes separados – a nitrificação e a desnitrificação. A amonificação, reação que precede os processos de nitrificação e desnitrificação, ocorre transformando o nitrogênio orgânico em nitrogênio amoniacal (NH_4^+) como segue na Equação 01. No primeiro estágio, na unidade destinada à nitrificação, o NH_4^+ é convertido em nitrito (NO_2^-) (Equação 02) e posteriormente em nitrato (NO_3^-) (Equação 03) por bactérias principalmente autotróficas (nitrificantes), em ambiente submetido à aeração (METCALF; EDDY, 2003; SLIEKERS et al., 2002). O processo global de nitrificação está representado na Equação 04. A taxa de consumo de nitrogênio amoniacal, para biomssa adaptada, será influenciada pela configuração do reator, tipo de substrato e concentração de amônio no afluente (AHN, 2006). Na oxidação do NH_4^+ são necessárias 4,57 mg de O_2 para oxidar cada miligrama de NH_4^+. Ainda, na nitrificação, são liberados íons H^+ que podem modificar o pH do meio reacional caso o mesmo não possua alcalinidade suficiente para equilibrar o sistema. Estima-se, por estequiometria (Equação 4), que são necessários 7,14g de $CaCO_3$ para cada grama de NH_4^+ oxidado (METCALF; EDDY, 2003). No tratamento de esgoto sanitário salino proveniente de regiões com escassez hídrica, a adição de álcalis ao sistema pode ser dispensada devido às elevadas concentrações de hidrogenocarbonato, como pode ser visto no Anexo I deste trabalho.

$$RNH_2 + H_2O + H^+ \rightarrow ROH^- + NH_4^+ \quad (01)$$

$$NH4^+ + 1{,}5\ O_2 \rightarrow NO_2^- + 2H^+ + H_2O \quad (02)$$

$$NO_2^- + 0{,}5O_2 \rightarrow NO_3^- \quad (03)$$

$$NH_4^+ + 2HCO_3^- + 2O_2 \rightarrow NO_3^- + 2CO_2 + 3H_2O \quad (04)$$

Em sequência, para a remoção do nitrato formado na nitrificação, o processo de desnitrificação se dá em meio anaeróbio-anóxico por meio da redução deste composto a nitrogênio gasoso (N_2), apontada na Equação 05. Além disso, quando a nitrificação é incompleta, algumas bactérias desnitrificantes são capazes de reduzir o NO_2^- a N_2 pela "via curta" (Equação 06).

$$2NO_3^- + 10H^+ + 10e^- \rightarrow N_2 + 2OH^- + 4H_2O \quad (05)$$

$$2NO_2^- + 6H^+ + 6e^- \rightarrow N_2 + 2OH^- + 2H_2O \quad (06)$$

Sendo a nitrificação um processo aeróbio, os organismos nitrificantes dependem estritamente da disponibilidade de oxigênio para oxidar o amônio, sendo o oxigênio o aceptor final de elétrons no processo. As bactérias nitrificantes são geralmente quimioautotróficas, o que significa que estes organismos utilizam carbono inorgânico para a multiplicação celular. As principais bactérias envolvidas no processo de nitritação (Equação 02) são as bactérias do gênero *Nitrosomonas, Nitrosococcus, Nitrosospira, Nitrosolobus* e *Nitrosovibrio*. Já as bactérias atuantes no processo da nitratação (Equação 03), convertendo o NO_2^- a NO_3^-, são as bactérias do gênero *Nitrobacter, Nitrococcus, Nitrospira, Nitrospina* e *Nitrocystis* (METCALF; EDDY, 2003). Mediante condições operacionais específicas em sistemas de tratamento ou em ambientes naturais, os gêneros *Nitrosonomas europea* e *Nitrosolobus multiformis* podem ainda produzir a partir do amônio, óxido nitroso (N_2O) e até mesmo dinitrogênio (N_2) (KUENEN; ROBERTESON, 1994).

A complexidade de bactérias nitrificantes se estende ainda para a existência de organismos heterotróficos, que utilizam compostos orgânicos no processo de oxidação de compostos nitrogenados reduzidos sem a obtenção de energia a partir deste processo (KUENEN; ROBERTESON, 1994). Algumas nitrificantes heterotróficas são capazes

também de desnitrificar os produtos da nitrificação, tendo suas atividades metabólicas influenciadas pela concentração de NH_4^+ no meio, ou a concentração desta substância combinada com concentrações de NO_3^- e NO_2^- (CASTIGNETTI; HOLLOCHER, 1984; KUENEN; ROBERTESON, 1994). Vale ressaltar que a taxa de crescimento e desempenho metabólico das bactérias nitrificantes no geral podem ser afetados por fatores tais como pH, temperatura, alcalinidade, concentração de OD e o efeito da carga orgânica (AHN, 2006).

A desnitrificação pode ser desempenhada por bactérias facultativas heterotróficas ou autotróficas, reduzindo os compostos formados na nitrificação (NO_2^- e NO_3^-) a compostos como NO^-, N_2O e N_2, mediante a presença de um doador de elétrons (LEE; WELANDER, 1996). Nos processos heterotróficos, a matéria orgânica presente no meio reacional atua como fonte de energia e carbono. Já para a desnitrificação autotrófica, os doadores de elétrons são substâncias inorgânicas como compostos sulfurosos (hidrogenosulfeto HS^- e sulfeto S^{2-}) e hidrogênio (H_2) (VAN LOOSDRECHT; JETTENL, 1998). Além dos fatores ambientais como temperatura e pH, o desempenho da desnitrificação heterotrófica é afetado pela matéria orgânica disponível (LEE; WELANDER, 1996). Para a desnitrificação heterotrófica os principais gêneros de microrganismos envolvidos são *Achromobacter, Acinetobacter, Agrobacterium, Alcaligenes, Arthrobacter, Bacillus, Chromobacterium, Corynebacterium, Flavobacterium, Hypomicrobium, Moraxella, Neisseria, Paracocus, Propinibacterium, Pseudomonas, Rhizobium, Phodopseudomonas* e *Spirillume Vibrio* (METCALF; EDDY, 2003).

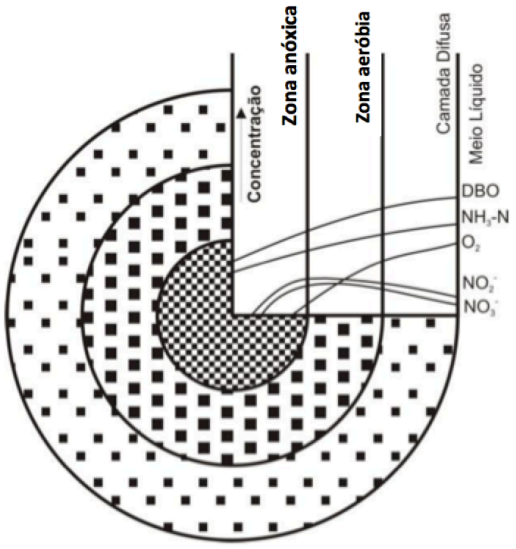
Apesar da grande parte dos organismos desnitrificantes empregados em sistemas de tratamento serem anóxicos/anaeróbios, a desnitrificação das formas nitrogenadas oxidadas em ambientes aeróbios também é comprovada. Lloyd et al. (1987) estudaram o efeito de elevadas concentrações de OD em organismos desnitrificantes. Os autores obtiveram taxas de redução dos compostos oxidados (NO_3^- e NO_2^-) satisfatórias mesmo com concentrações de OD próxima à saturação. Ressalta-se que o inóculo utilizado por Lloyd et al. (1987) foi proveniente de sedimentos bentônicos marinhos. Apesar da desnitrificação aeróbia ser um processo termodinamicamente desfavorável, este

mecanismo foi proposto por Robertson e Kuenen (1984) e vem sendo estudada por diversos autores (JI et al., 2015).

3.4 Nitrificação e desnitrificação simultânea (NDS) sob diferentes sistemas de aeração

Para a construção e operação de estações de tratamento mais compactas e econômicas, sistemas que possuam unidades de tratamento capazes de abrigar comunidades microbianas diversas vêm sendo cada vez mais estudados. Na remoção de matéria nitrogenada, promovida sequencialmente por bactérias nitrificantes e desnitrificantes, a nitrificação e desnitrificação simultânea (NDS) segue a linha de eficiência associada à redução de custos. O processo de nitrificação e desnitrificação simultânea se dá a partir da estruturação de flocos compostos por diferentes microrganismos e é entendido, principalmente, como um processo físico (HE et al., 2009). As bactérias nitrificantes ocupam a área mais externa do floco ou biofilme em contato com o OD do meio para a oxidação do NH_4^+ e as bactérias desnitrificantes ocupam a parte mais interna, reduzindo o nitrogênio oxidado a N_2, como pode ser visto na Figura 02.

Figura 2 - Estrutura do biofilme no processo de nitrificação e desnitrificação simultânea.



Fonte: He et al. (2009).

O OD é um componente essencial para a nitrificação, em contrapartida, a desnitrifcação é favorecida sob condições anóxicas. Diversos trabalhos optam pelo uso de

sistemas intermitentes de aeração, com alternância de períodos na ordem de horas aerados e não aerados favorecendo alternadamente as comunidades microbianas (BARANA et al., 2013; LI et al., 2008; LIM et al., 2012; MOURA et al., 2012; SANTOS et al., 2016; YAMAGIWA et al., 1995; ZHANG et al., 2016). Porém, em concentrações superiores à 2,5mg L^{-1} , o OD pode penetrar o biofilme e destruir as células que compõem o ambiente anóxico rapidamente, se não for completamente consumido pelos microrganismos da camada mais externa (CAO et al., 2017), o que pode explicar insatisfatórios desempenhos obtidos na NDS com regime de aeração interminente. Já na microaeração em sistemas de NDS, o oxigênio é fornecido continuamente em baixas concentrações e entende-se que esta estratégia promove o consumo do OD logo na camada superficial do biofilme, não permitindo que, por difusividade, a zona anóxica seja comprometida. A Tabela 01 mostra os resultados obtidos em alguns estudos que avaliaram o uso da microaeração em sistemas de NDS.

Tabela 1 – Principais resultados de alguns dos trabalhos revisados a respeito do processo de nitrificação e desnitrificação simultânea sob regime de microaeração.

Tecnologia	**Concentração aproximada de OD**	**Características afluente (concentrações médias)**	**Resultados Principais**	**Referência**
Lodos ativados	1,5 – 2 mg L^{-1}	Não especificado $DQO_{solúvel}$: 295 mgO_2 L^{-1} NTK: 18,6 mgN L^{-1}	94% de oxidação de N-NH_4^+ E e 70% de remoção de N-total.	WISTROM& SCHROEDER (1995)
Reatores em batelada sequencial	0,5 mg L^{-1}	Esgoto sanitário DQO_{total}: 371 mgO_2 L^{-1} NTK: 39,2 mgN L^{-1}	Taxa de nitrificação igual a de desnitrificação (completa NDS).	MUNCH et *al*. (1996)
Reatores em batelada sequencial	0,8 mg L^{-1}	Efluente de um abatedouro anaerobiamente tratado DQO_{total}: 860-3540 mgO_2 L^{-1} NTK: 160-280 mgN L^{-1}	NDS de 95% com adição de MO solúvel	POCHANA e KELLER (1999)
Lodos ativados	0,48 mg L^{-1}	Sintético: glicose como fonte de C DQO_{total}: 313 mgO_2 L^{-1} NTK: 30,8 mgN L^{-1}	55% de remoção de N-total e 98% de remoção de DQO	HOLAKOO et al. (2005)
Lodos ativados	0,5 mg L^{-1}	Efluente de um restaurante e esgoto sanitário DQO_{total}: 537 mgO_2 L^{-1} NTK: 75 mgN L^{-1}	92% de remoção de N-total e 93% de remoção de DQO	BUENO et *al.* (2017)
Batelada sequencial com biofilme	0,35 mg L^{-1}	Sintético: fenol como fonte de C DQO_{total}: 800-1200 mgO_2 L^{-1} NTK: 102-130 mgN L^{-1}	Remoção de N-NH_4^+ de 76,91% e de N-total de 70,23%	MA et *al.* (2017)

Fonte: Autoria própria.

Ainda que bons resultados tenham sido obtidos em sistemas operados em concentrações de oxigênio dissolvido tão baixas quanto as apresentadas na Tabela 01, operacionalmente, há grandes limitações. O controle da concentração de OD em uma faixa estrita em unidades operacionais em escala plena exige um aparato mais sofisticado e preciso, além do constante monitoramento destes sistemas e controle do fornecimento de oxigênio, uma vez que esse irá depender da atividade microbiana (BUENO, 2011; BUENO et al., 2017). Além disto, em unidades de remoção de matéria orgânica e nitrogenada, bactérias heterotróficas aeróbias irão competir pelo oxigênio disponível no meio reacional, podendo limitar o processo de nitrificação (VAN LOOSDRECHTL et al., 1995; MOSQUERA-CORRAL et al., 2005).

O princípio da nitrificação e desnitrificação simultânea estabelece que o contato com as substâncias necessárias aos processos e também tóxicas a eles, deve ser controlada a partir do estabelecimento da expessura do biofilme e/ou do floco (POCHANA; KELLER, 1999). Desta forma, o estabelecimento da desnitrificação heterotrófica em regime de aeração contínua depende estritamente da formação do biofilme e da comunidade microbiana presente no processo. A nitrificação e a desnitrificação devem ocorre em sistema dinâmico a todo momento, e por isso, o controle de baixas concentração de OD ou a aeração intermitente talvez sejam estratégias desnecessárias para o bom funcionamento da NDS. Em contrapartida, poucos trabalhos testaram o desempenho de tal sistema com aeração contínua sem o controle do OD para a remoção de matéria nitrogenada e orgânica.

Di Bella e Torregrossa (2013) obtiveram em seu trabalho 90% de eficiência no processo de NDS sob aeração contínua e concentração de OD em torno de 7mg L^{-1} em um sistema de lodos ativados. Liao et al. (2010) também obtiveram eficientes resultados de NDS com aeração contínua com concentrações de OD entre 3-4 mg L^{-1} em um reator de leito móvel. Virdis et al. (2011) obtiveram 89% de eficiência no sistema NDS em um reator bioeletroquímico com concentração de OD próxima a 6 mg L^{-1}. A grande parte dos trabalhos que utilizam concentrações de OD mais elevadas desenvolvem o sistema de NDS em reatores de batelada sequencial, tendo descontinuidade no sistema de aeração e gerando uma período anóxico-anaeróbio (DING et al., 2011; GIESEKE et al., 2002; MARIN et al., 2016; MUNCH; KELLER, 1996; RAHIMI et al., 2011).

Não foi encontrado na literatura nenhum trabalho desenvolvido que investigue a remoção de matéria orgânica e nitrogenada por NDS sob aeração contínua e não controlada em reator de leito fixo estruturado.

3.5 Efeito da salinidade em sistemas biológicos de tratamento

Sabe-se do efeito inibidor dos sais em na atividade metabólica bacteriana, podendo também causar lise celular e reduzir a diversidade mcirobiana. Por isso, o efeito da salinidade em sistemas biológicos para o tratamento de águas residuárias tem sido discutido extensivamente por diversos autores (ABOU-ELELA et al., 2010; ALOUI; SAYADI, 2009; AMINZADEH et al., 2009; CHEN et al., 2008; CORSINO et al., 2016; CUI et al., 2016; HE et al., 2017; JIN et al., 2012; KARGI; DINCER, 1996; KARTAL et al., 2006; LEFEBVRE; MOLETTA, 2006; LIU et al., 2015, 2016; McCARTY; McKINNEY, 1961; SHE et al., 2016; UYGUR; KARGIU, 2003; VAN DEN BRAND et al., 2015; ZHAO et al., 2016). No entanto, a grande maioria destes estudos considera apenas o cloreto de sódio para a composição da salinidade e não associa as concentrações estudadas à pressão osmótica e, como consequência, é incerto afirmar se os efeitos são devido a mecanismos de toxicidade dos íons para com a comunidade microbiana ou devido à pressão osmótica elevada exercida sobre as células.

Como descrito por Serrano (1996), a salinidade tem dois possíveis efeitos tóxicos sobre as células que são 1) o efeito osmótico inespecífico e 2) a toxicidade específica dos íons em sistemas celulares definidos. Em meios reacionais concentrados em sais, os organismos desenvolvem defesas com base no ajuste osmótico, por meio de sistemas de transporte de íons e produção ou transporte de moléculas orgânicas (SERRANO, 1994; 1996). Estes mecanismos de proteção são baseados em duas estratégias de osmorregulação. A primeira está relacionada à manutenção de uma elevada concentração de KCl no citoplasma como estratégia de osmorregulação para a manutenção das atividades metabólicas. *Arqueas* halofílicas, por exemplo, desenvolvem este primeiro mecanismo sob elevadas concentrações de sais (ZAHRAN, 1996; DASSARMA; DASSARMA, 2006).

O segundo processo se dá através de solutos compatíveis, também nomeados osmoprotetores. Este processo é mais comum em bactérias Gram negativas e positivas e

possui dois mecanismos para seu modo de ação sob condições salinas: primeiro para aumentar a pressão osmótica intracelular e segundo para estabilizar macromoléculas celulares (GALINSK; TRUPER, 1994; LIPPERT; GALINSK, 1992; ZAHRAN, 1996). Os compostos osmoprotetores ou solutos compatíveis são geralmente aminoácidos, açúcares e polióis, como por exemplo glicina, betaína, ectoína, sacarose e glicerol, que não perturbam os processos metabólicos e não têm carga líquida ao pH fisiológico (DASSARMA; DASSARMA, 2006; ZAHRAN, 1996).

Pouco se sabe sobre a relação destes diferentes compostos com a regulação osmótica mediante a diferentes constituintes salinos e diferentes concentrações. Um estudo desenvolvido utilizando bactérias do gênero *Azospirillum*, por exemplo, o qual está relacionado ao ciclo de nitrogênio, tanto no processo de nitrificação quanto na desnitrificação, investigou a influência de diferentes sais na atividade metabólica e reprodução celular das bactérias. Os autores concluiram que diferentes sais influenciam diferentemente este gênero bacteriano, seguindo a sequência de maior inibição na ordem dos cloretos de sódio, cálcio e magnésio (SUHAIL; MAHDIA, 2011). Ainda, o gênero *Azospirillum* é comumente associado ao acúmulo de substâncias como glutamato, protina, glicina betaína e trealose para regulação osmótica (TRIPATHI et al., 1998), mas não se sabe da possível relação destes solutos compatíveis mediante à exposição celular a diferentes sais.

O principal problema para a compreensão da toxicidade salina é a escassez de informações sobre os mecanismos moleculares e sobre a relevância fisiológica de diferentes alvos e respostas de defesa. Na literatura, a investigação quanto a tolerância ao sal por diferentes microrganismos está quase sempre relacionada à causa e efeito (NGUYEN; JOSHI, 1994). Para sistemas de tratamento biológico de águas residuárias, o impacto negativo da salinidade já vem sendo amplamente comprovado e a Tabela 02 apresenta alguns resultados a respeito deste tema. No entanto, não foi encontrado na literatura estudos que investiguem o efeito de diferentes sais separadamente e/ou em mistura em sistemas biológicos nas concentrações encontradas na natureza, com exceção de poucos trabalhos que consideram a composição da água do mar, para bactérias que atuam no ciclo do nitrogênio.

Tabela 2 - Influência da salinidade (wt% de NaCl) em diferentes processos de tratamento biológico para remoção de matéria nitrogenada.

Processo	Biomassa (inóculo)	Salinidade de melhor desempenho	Salinidade crítica	Referência
Nitrificação e desnitrificação	Lodos ativados	0 wt%	2 wt%	DINÇER e KARGI (1999)
Remoção de carbono orgânico total	Lodos ativados	0,05 wt%	0,5 wt%	WANG et al. (2005)
Desnitrificação autotrófica com sulfeto e heterotrófica	Lodo anaeróbio	3,5 wt%	4 wt%	AMINZADEH et al. (2009)
Remoção de DQO, NH_4^+ e DBO	Lodos ativados	< 4 wt%	4 wt%	ALOUI et al. (2009)
Nitrificação parcial	Lodos ativados	0,75 wt%	1,02 wt%	YE et al. (2009)
Remoção de DQO	Lodos ativados	1 wt%	2 wt%	ABOU-ELEA et al. (2010)
Desnitrificação autotrófica com sulfeto	Lodo anaeróbio	3,5 wt%	3,5 wt%	LIU et al. (2015)
Desnitrificação heterotrófica	Lodo anaeróbio	0,2 wt%	1 wt%	LIU et al. (2015)
Nitrificação	Sedimentos de um estuário	3 wt%	6,5 wt%	CUI et al. (2016)
Nitrificação e desnitrificação pela via curta	Lodos ativados	0,9 wt%	4,2 wt%	SHE et al. (2016)
Desnitrificação autotrófica com sulfeto	Lodo anaeróbio	3,5 wt%	7 wt%	LIU et al. (2016)
Remoção de DQO e nitrificação	Lodos ativados	1 wt%	3 wt%	ZHANG et al. (2016)

Fonte: Autoria própria.

4. Materiais e Métodos

4.1 Procedimento experimental global

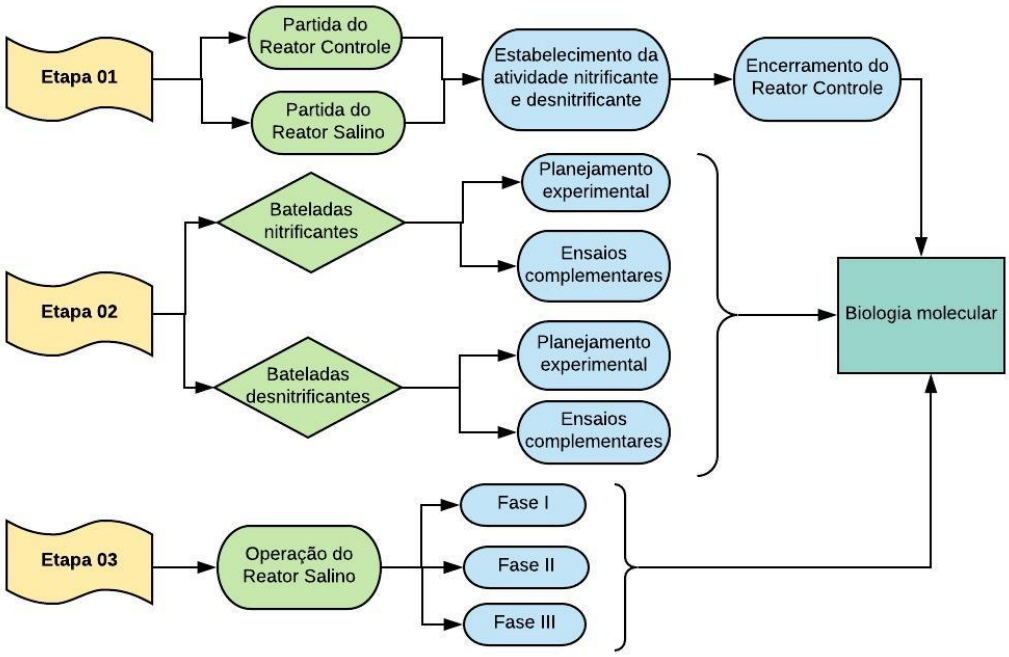
Este trabalho foi desenvolvido em três etapas. Na primeira etapa (E1), dois reatores de leito fixo estruturado (Reator Controle – RC e Reator Salino – RS) de mesmas dimensões foram operados sob as mesmas condições de temperatura, inóculo, tempo de detenção hidráulica, vazão de aeração e carga orgânica e nitrogenada. A água residuária de estudo que alimentou o RS continha diferentes concentrações dos sais NaCl, $MgCl_2$ e $CaCl_2$ descritas do tópico 'Água Residuária de estudo' e o RC foi operado sem a aplicação de sais que conferissem pressão osmótica ao meio reacional. O objetivo principal foi avaliar além do efeito de diferentes pressões osmótica no RS, o estabelecimento da NDS sob aeração contínua. Desta forma, o RC foi monitorado para que os resultados das eficiências de nitrificação via $N\text{-}NH_4^+$, desnitrificação e remoção da Demanda Química de Oxigênio (DQO) fossem possivelmente atribuídos às condições operacionais.

O RC foi encerrado ao atingir a fase estacionária, ou seja, após apresentar certa estabilidade nas concentrações efluentes dos parâmetros monitorados. A estabilização foi considerada por ser um período de no mínimo 15 dias onde a variação das eficiências de remoção de matéria nitrogenada não fosse superior a 10%. O biofilme aderido presente nesse reator possuía as atividades nitrificantes e desnitrificantes bem estabelecidas e por isso, a biomassa pôde ser empregada para o desenvolvimento da Etapa 02 (E2).

Na E2, foram realizados em bateladas os planejamentos fatoriais e os ensaios complementares a fim de se estudar a influência dos sais NaCl, $MgCl_2$ e $CaCl_2$ em mistura e separadamente em diferentes concentrações por meio da variação da pressão osmótica (5, 15 e 30 atm). Foi realizado um total de 52 bateladas, 26 para os ensaios de nitrificação e 26 para os de desnitrificação, referentes ao planejamento fatorial (16), ensaios complementares (9) e ensaio controle (1). O ensaio controle continha a mesma carga orgânica e nitrogenada dos outros ensaios, bem como macro e micronutrientes. O objetivo deste ensaio foi avaliar o pontencial cinético da biomassa utilizada com inóculo nestes ensaios.

Paralelamente à E2, a Etapa 03 (E3) configurou a operação do RS por três fases operacionais. As fases 1 (F1), 2 (F2) e 3 (F3) foram caracterizadas pela PO aplicada de 1,7; 5,25 e 9 atm, respectivamente. Estas pressões osmóticas correspondem respectivamente a 8, 25 e 42,5% da PO da água de abastecimento da região de estudo (aproximadamente 21 atm). O objetivo inicial deste trabalho foi a operação do reator por mais fases de modo que a PO final fosse igual à da água de abastecimento da região de estudo. No entanto, ao se atingir a terceira fase (PO de 9 atm), a comunidade nitrificante não obteve desempenho satisfatório, comprometendo o sistema por inteiro. Ao fim da operação do RC e de cada fase operacional do RS (F1, F2 e F3), e também ao fim dos experimentos em bateladas, amostras da biomassa foram coletadas para as análises de biologia molecular. A descrição esquemática do procedimento experimental global deste trabalho está apresentada no fluxograma da Figura 03.

Figura 3 - Fluxograma do procedimento experimental deste trabalho.



Fonte: Autoria pória.

4.2 Análises físico-químicas

As análises da série nitrogenada, nitrogênio amoniacal ($N\text{-}NH_4^+$), nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-), a Demanda Química de Oxigênio (DQO), os sólidos suspensos voláteis

(SSV), sólidos suspensos fixos (SSF) e sólidos suspensos totais (SST) foram quantificadas seguindo o protocolo do *The Standard Methods for the Examination of Waste and Wastewater* (APHA, 2005). Na determinação de DQO, foi adotado o protocolo estabelecido por Tzeng e Chen (1993) para a precipitação do cloreto a partir da reação com nitrato de prata em amostras afluentes e efluentes dos reatores contínuos. Os pH das soluções foram medidos por meio de um potenciômetro Denver Instrument (UB-10 model). A condutividade elétrica foi medida utilizando-se um condutivímetro Digimed Digimed® DM-31. O OD foi monitorado por meio de uma sonda de medidor por luminescência Hach® HQ40d multi. As alcalinidades afluente e efluente dos reatores contínuos foram monitoradas a partir de titulação com ácido sulfúrico, segundo o método estabelecido por Ripley et al. (1986).

A vazão dos reatores contínuos foi medida por coleta de volume em intervalos de 120 minutos (2 horas) e 1440 minutos (24 horas) em provetas graduadas para a minimização de erros de medição. A vazão de oxigênio na aeração dos reatores contínuos foi monitorada e controlada através de um gasômetro instalado na rede gasosa imediatamente antes da entrada nos reatores.

4.3 Análises de biologia molecular

A análise da comunidade microbiana foi realizada para a biomassa de todas as bateladas e amostras de cada fase operacional dos reatores contínuos. A extração de DNA genômica dessas amostras foi realizada usando-se FastDNA^{R} Spin for Soil (MP). Na etapa da PCR (reação em cadeia da polimerase, do inglês, *Polymerase Chain Reaction*), utilizou-se o *set de primers* 968FGC - 1401R, referentes ao Domínio *Bacteria* (NUBEL et al., 1996). O programa de corrida do termociclador (Eppendorf AG - 22331 Hamburg) foi de pré desnaturação de 95 °C por 7 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 segundos; anelamento a 56°C por 45 segundos; extensão a 72°C por 60 segundos; extensão final a 72°C por 10 minutos; resfriamento a 4°C. O produto da PCR foi separado por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo gradiente desnaturante de 45% a 65% (MUYZER et al., 1993). O DGGE (eletroforese em gel de gradiente desnaturante, do inglês, *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), foi realizado no DCode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad). As condições de corrida do

DGGE foram de 75V, temperatura de 60°C por 16 horas. A leitura do perfil padrão das bandas do DGGE foi realizado no Sistema de Fotodocumentação (L.PixTouch - Loccus Biotechnology) sob a exposição de 254 nm UV. A partir do perfil de bandas do DGGE foi utilizado o programa BioNumerics versão 7.0 para o cálculo do coeficiente de similaridade e a construção do dendrograma. O cálculo dos índices ecológicos foi feito no programa Past.

As bandas selecionadas do DGGE foram recortadas com auxilio do vazador específico para bandas acoplado a uma pipeta. A escolha das bandas recortadas foi relacionada com o perfil de intensificação das bandas em determinadas condições experimentais. As bandas recortadas foram inseridas nos tubos de 0,5 ml com 20 µl de água estéril para a recuperação do DNA, o qual foram re-amplificadas nas condições da PCR já descritas, com primer 968F sem o GC clamp. O produto da PCR foi purificado usando-se o Kit Illustra GFX PCR DNA e Gel Band Purification (GE Healthcare). O produto da PCR purificado foi sequenciamento pelo método Sanger pelo Laboratório de Biotecnologia Animal da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ/USP. O processamento das sequências obtidas foi realizado no programa "SeqMan" do software DNASTAR (*Lasergene sequence analysis*) para retirada do primer e das bases com picos de baixa qualidade. Em seguida, essas sequências foram comparadas no Banco de Dados NCBI-database usando BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) para aproximação da identidade filogenética. A árvore filogenética foi construída usando-se as distâncias evolutivas baseadas no modelo Tamura-Nei (1993) e método Neighbor-Join com valores de bootstrap de 500, usando o programa MEGA versão 7.0 (KUMAR et al., 2016).

4.4 Macronutrientes e Micronutrientes

Considerando-se a importância da disponibilidade de nutrientes para promover a multiplicação celular e o desenvolvimento dos microrganismos presentes nos sistemas, foram utilizadas as soluções de macro e micronutrientes descritas por Torres (1992). Para cada litro de afluente dos reatores contínuos, bem como para cada litro de meio reacional das bateladas, foram adicionados 2,5 ml de macronutrientes e 1 ml de micronutrientes. Os macronutrientes (NaCl, $MgCl_2$ e $CaCl_2$) não foram adicionados no afluente do RS nem

nas bateladas referentes aos planejamentos fatoriais pela disponibilidade em excesso destas substâncias. As composições das soluções supracitadas estão descritas na Tabela 03.

Tabela 3 – Composição das soluções de macro e micronutrientes.

Solução	Componente	Concentração (g L^{-1})
Macronutrientes	NaCl	100
	$CaCl_2.2H_2O$	2,8
	$MgCl_2.6H_2O$	1,8
Micronutrientes	Ácido Nitrilotriacético (NTA)	12,8
	$FeCl_3.6H_2O$	1,35
	$MnCl_2.4H_2O$	0,1
	$CoCl_2.6H_2O$	0,024
	$CaCl_2.2H_2O$	0,1
	$ZnCl_2.4H_2O$	0,1
	$CuCl_2.4H_2O$	0,025
	H_3BO_3	0,01
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,024
	NaCl	1
	$Na_2SeO_3.5H_2O$	0,026
	$NiCl_2.6H_2O$	0,12

Fonte: Torres (1992).

4.5 Ensaios de nitrificação e desnitrificação em batelada

4.5.1 Planejamento experimental e ensaios complementares

Para investigar a significância estatística da concentração dos sais NaCl, $MgCl_2$ e $CaCl_2$, foram realizados dois planejamentos fatoriais completos. A variável resposta foi a atividade específica de nitrificação ($mgN\text{-}NH_4^+ gSSV^{-1}min^{-1}$) para o planejamento fatorial A e a atividade específica de desnitrificação ($mgN\text{-}NO_3^- gSSV^{-1}min^{-1}$) para o planejamento fatorial B. Um total de oito experimentos para cada planejamento fatorial 2^3 com uma réplica genuína em todos os pontos foram realizados, totalizando-se 16 bateladas por planejamento. Todas as bateladas foram realizadas em ordem aleatória para se evitar erros sistemáticos. Os níveis escolhidos para cada fator foram baseados na concentração dos eletrólitos em águas naturais fornecidas para abastecimento doméstico em áreas com a escassez de água. Além disto, a concentração dos sais variou em um invervalo em que a solução eletrolítica mista pudesse ter PO entre 6 atm a 33 atm, equivalente a 1wt% a 6wt% de salinidade em NaCl. Dessa forma, foi possível comparar

os resultados disponíveis na literatura com os do presente trabalho em termos de PO. Os valores codificados e reais estão dispostos na Tabela 04.

Tabela 4 - Variáveis independentes (fatores) e seus respectivos valores codificados e reais.

	Valores codificados e reais	
Fatores	-1	+1
NaCl (g L^{-1})	5	30
$MgCl_2$ (g L^{-1})	3	12
$CaCl_2$ (g L^{-1})	3	12

Fonte: Autoria própria.

A matriz dos ensaios do planejamento fatorial e o processamento dos dados foram feitos utilizando-se o software Statistica® 13.0. Já para a análise de variância (ANOVA) foi utilizado o software Chemoface® 1.61. A matriz que caracteriza as condições dos meios reacionais para os planejamentos fatoriais se apresenta na Tabela 05.

Tabela 5 - Matriz do Planejamento fatorial A (nitrificação) e B (desnitrificação) e a apresentação da força iônica e pressão osmótica de cada condição.

Ordem de execução	**Ensaio**	**Concentração codificada**			**Força Iônica (molal L^{-1})**	**Pressão Osmótica (atm)**
		NaCl	**$MgCl_2$**	**$CaCl_2$**		
1	3	-1	1	-1	0,544	8,40
2	6	1	-1	1	0,931	21,30
3	4(2)	1	1	-1	0,971	21,80
4	4	1	1	-1	0,971	21,80
5	6(2)	1	-1	1	0,931	21,30
6	5	-1	-1	1	0,504	7,90
7	2(2)	1	-1	-1	0,688	18,80
8	1(2)	-1	-1	-1	0,26	5,20
9	5(2)	-1	-1	1	0,504	7,90
10	8	1	1	1	1,215	24,30
11	2	1	-1	-1	0,688	18,80
12	7	-1	1	1	0,787	11,0
13	8(2)	1	1	1	1,215	24,30
14	7(2)	-1	1	1	0,787	11,0
15	1	-1	-1	-1	0,260	5,20
16	3(2)	-1	1	-1	0,544	8,40

Fonte: Autoria própria.

A fim de se avaliar o efeito de um determinado sal no sistema, sem a interferência dos efeitos da interação entre os sais, três diferentes PO (5, 15 e 30 atm) foram

investigadas separadamente para cada eletrólito de interesse (NaCl, $MgCl_2$ e $CaCl_2$). Uma batelada sem solução eletrolítica (controle) para nitrificação e uma para desnitrificação também foram realizadas.

A Tabela 06 apresenta as condições experimentais dos ensaios complementares desenvolvidos para a nitrificação e para a desnitrificação.

Tabela 6 - Ensaios complementares (apenas um par iônico para compor a salinidade), respectivas força iônica e pressão osmótica de cada condição.

Sal	Ensaio	Concentração (g L^{-1})	Força Iônica	Pressão Osmótica (atm)
NaCl	9	7,84	0,134	5,0
	10	26,15	0,447	15
	11	54,50	0,932	30
$MgCl_2$	12	12,70	0,133	5,0
	13	40,10	0,430	15
	14	75,20	0,789	30
$CaCl_2$	15	13,06	0,137	5,0
	16	43,84	0,460	15
	17	81,67	0,857	30

Fonte: Autoria própria.

4.5.2 Inóculo utilizado nos ensaios em batelada

Os reatores em batelada foram inoculados com biomassa a partir do RC já em estado estacionário operado também neste trabalho. O reator de leito estruturado aeróbio-anóxico RC será descrito nesta sessão em tópicos seguintes. Este reator foi previamente inoculado 90 dias antes da extração da biomassa com uma composição de lodo aeróbio de um sistema de lodo ativado, lodo anaeróbio de uma unidade UASB tratando de esgoto doméstico e lodo bentônico do Complexo Estuarino Lagunar Mundaú-Manguába – Maceió/AL, que possui em média uma salinidade de 3wt%. A biomassa não foi previamente adaptada a condições salinas. O reator contínuo foi operado para a remoção de materia orgânica e nitrogenada de efluente sintético com cargas semelhantes à de esgoto sanitário concentrado estabelecido por Metcalf e Eddy (2003) e apresentou bom desempenho das atividades nitrificante e desnitrificante previamente à retirada da biomassa para a inoculação dos reatores em bateladas.

O leito estruturado do RC, como descrito, foi composto por hastes de espuma de 3 cm de diâmetro. Cada batelada recebeu como inóculo um pedaço de 1,5 cm deste

material suporte. O cilindro de 1,5 cm de altura e 3 cm de diâmetro foi recortado em 6 pedaços menores para facilitar o contato do meio reacional com os microrganismos aderidos à espuma. Este procedimento foi similar ao descrito por outros autores que desenvolveram ensaios semelhantes (MOURA, 2011; 2014; SANTOS, 2014).

4.5.3 Procedimento experimental das bateladas

Os frascos utilizados para todas as bateladas possuiam volume total de 200 mL e volume reacional de 100 mL. Todos os experimentos foram realizados ao longo de 480 minutos (8 horas). As concentrações de $N\text{-}NH_4^+$ para o planejamento A e as concentrações de $N\text{-}NO_3^-$ e $N\text{-}NO_2^-$ para o planejamento B. A coleta das alíquotas foi feita a cada 90 minutos por meio de seringas para o monitoramento das concentrações dos substratos de interesse e foi respeitado o volume máximo de retirada de 10% do volume total reacional.

Todos os reatores em batelada foram inoculados com 1,5cm de espuma extraidas do reator controle (RC) imediatamente antes do início dos ensaios e recortada em seis pedaços menores. Ao fim dos ensaios, os pedaços de espuma foram transferidos para um tubo Falcon de 50 mL com água destilada em volume conhecido e esferas de vidro de 2 mm de diâmetro para facilitar o desprendimento da biomassa. Em seguida, este volume foi somado ao do meio reacional para a retirada de uma alíquota usada para a análise de sólidos suspensos voláteis (SSV) para o cálculo da atividade específica no final do experimento. O restante foi centrifugado por 5 minutos a 10000 rpm e devidamente armazenado para as análises de biologia molecular a - 20°C.

Para as bateladas do planejamento A, ar atmosférico foi continuamente fornecido ao sistema usando-se um compressor de ar capaz de saturar o meio com OD. O sistema de aeração foi composto por mangueiras, pedra porosa difusora e um sistema em série de dois lavadores de gás contendo uma solução de NaOH (50%) para remoção de CO_2 a fim de se evitar a formação de íons carbonato (CO_3^{2-}), a depender do pH das soluções. A importância deste sistema se deve ao fato de quê, considerando-se a baixa solubilidade de carbonatos de cálcio e magnésio (0,014 e 0,1 g L^{-1} a 25°C), a presença de CO_3^{2-} possivelmente precipitaria os cátions divalentes do sistema, invalidando os ensaios.

Nos ensaios de nitrificação, o pH foi controlado ao longo de todo o período experimental de 8 horas sendo padronizado inicialmente para 6,5 e medido e corrigido, quando necessário, a cada 90 minutos, para que não saísse da faixa de 6,5 a 7. A correção do pH se deu pela adição de ácido clorídrico concentrado (HCl 38%) ou hidróxido de sódio concentrado (NaOH 50%) em volumes que não ultrapassaram em totalidade 40 μL, sendo os volumes e concentrações de Cl^- e/ou Na^+ insignificantes comparado aos volumes reacionais e concentração inicial dos íons. Nos ensaios de desnitrificação, o pH foi padronizado para a faixa de 6,5 - 7 mas não foi monitorado ao longo do experimento para que as condições anóxicas fossem mantidas.

Já para as bateladas do planejamento B, em condições anóxicas, N_2 gasoso foi fluxado em cada frasco por 5 minutos para troca gasosa, para a eliminação do oxigênio. Os reatores foram agitados em um *shaker* rotativo a 170 rpm com temperatura controlada de 25°C. A composição de todos os experimentos em batelada teve a combinação de eletrólitos correspondentes determinada pelo planejamento fatorial ou ensaios complementares das Tabelas 05 e 06. No planejamento A e nos ensaios complementares de nitrificação, adiconou-se cloreto de amônio (NH_4Cl) para fornecer uma concentração inicial de nitrogênio amoniacal de 30 mgN-$NH_4^+L^{-1}$.

Já para o Planejamento B e nos ensaios complementares desnitrificantes, foi adicionado nitrato de sódio ($NaNO_3$) para fornecer uma concentração inicial de 40 mgN-$NO_3^-L^{-1}$ e acetato de sódio em concentração correspondente a uma DQO de 500 mgO_2 L^{-1} como fonte de doadores de elétrons. Também, para que não houvesse limitação na nitrificação por ausência de carbono inorgânico e melhor controle do pH, foi adicionado a cada batelada hidrogenocarbonato de sódio em concentração de 0,5 g L^{-1} nos ensaios nitrificantes e desnitrificantes.

4.5.4 Cálculo da atividade específica de nitrificação e de desnitrificação

A atividade específica das bactérias nitrificantes e desnitrificantes foi estimada a partir da modelagem cinética do consumo dos compostos nitrogenados, referentes a cada um dos planejamentos, em um perfil temporal. A taxa máxima de nitrificação e desnitrificação foi determinada a partir da Equação 07.

$$(-r) = \frac{dC_N}{dt} = k.f(C_N) \qquad (07)$$

Onde:

r = taxa específica do consumo de nitrogênio ($mgN.SSV^{-1}.min^{-1}$)

C_N = concentração de N (mg) por massa (g) de SSV no tempo t ($mgN\ L^{-1}\ gSSV^{-1}$)

k = constante de velocidade da reação (min^{-1})

t = tempo (min)

A equação 08 mostra o modelo cinético de Monod. Para estimar a quantidade de biomassa presente em cada experimento, foi considerado que este parâmetro se manteve constate ao longo do período reacional. A concentração de substrato específica considera a biomassa presente em cada sistema.

$$\frac{dC_{S'}}{dt} = r_s = r_{máx'}.\frac{C_{S'}}{K_S + C_{S'}} \quad (08)$$

Em que:

C_s' = concentração de composto nitrogenado por concentração de SSV ($mgN\ gSSV^{-1}$);

t = tempo;

r_s = velocidade de consumo de substrato ($mgN\ gSSV^{-1}\ min^{-1}$);

$r_{máx}$ = velocidade máxima de consumo do substrato ($mgN\ gSSV^{-1}\ min^{-1}$)

K_s = constante de saturação de substrato;

Em condições nas quais a concentração do substrato é baixa e muito menor que a constate de saturação (K_s), como para águas residuárias com carga orgânica semelhantes às do esgoto sanitário, a equação cinética de Monod pode ser reescrita como demonstrado na equação 09, considerando como uma constante k'.

$$\frac{dC_{S'}}{dt} = r_s = k'.C_s' \quad (09)$$

Integrando-se a equação acima, a cinética de primeira ordem é descrita pela equação 10:

$$\ln(C_s) = \ln(C_0) - k.t \quad (10)$$

que pode ser reescrita da seguinte forma (equação 11)

$$C_s = C_o.e^{-k'.t} \quad (11)$$

em que:

k' = constante aparente de crescimento microbiano (min^{-1});

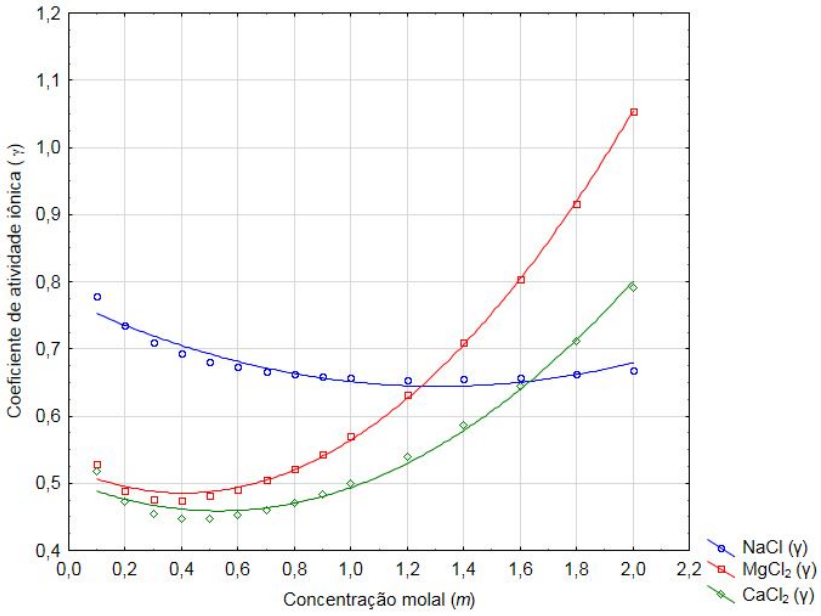
C_o = concentração inicial de substrato ($mg\ L^{-1}$);

Os dados brutos foram ajustados à função exponencial que representa a cinética de primeira ordem descrita acima por meio do software Statistica® 13.0 com o algorítimo Levenberg-Marquardt.

4.5.5 Cálculo dos coeficientes de atividade iônica e pressão osmótica

Para calcular os coeficientes de atividade dos sais estudados, imprescindíveis para o cálculo da pressão osmótica, foram utilizados os dados estabelecidos por Stokes (1948) e Robinson e Stokes (1949), válidos para soluções a 25°C. Estes dados foram ajustados a um polinômio de quarta ordem que relacionasse a concentração molal dos sais NaCl (equação 12), $MgCl_2$ (equação 13) e $CaCl_2$ (equação 14) e os coeficientes de atividade destes sais em solução, como mostrado na Figura 04.

Figura 4 - Coeficientes de atividade iônica ($\boldsymbol{\gamma}$) em função da concentração molal de cada sais NaCl, $MgCl_2$ e $CaCl_2$.



Fonte: Autoria própria.

$$NaCl\ (\boldsymbol{\gamma}) = 0{,}077x^4 - 0{,}346x^3 + 0{,}736x^2 - 0{,}456x + 0{,}561 \qquad R^2 = 0{,}999 \qquad (12)$$

$$MgCl_2\ (\boldsymbol{\gamma}) = 0{,}0599x^4 - 0{,}3067x^3 + 0{,}5874x^2 - 0{,}501x + 0{,}8183 \qquad R^2 = 0{,}995 \qquad (13)$$

$$CaCl_2\ (\boldsymbol{\gamma}) = 0{,}0801x^4 - 0{,}3867x^3 + 0{,}7728x^2 - 0{,}5201x + 0{,}5558 \qquad R^2 = 0{,}998 \qquad (14)$$

Para as soluções de eletrólitos mistos, foram adotadas as simplificações estabelecidas por Truesdell e Jones (1974) onde assume-se que os coeficientes de atividade em soluções simples são iguais àqueles em soluções complexas da mesma força iônica. Assim, a atividade das soluções mistas foi determinada a partir do cálculo da força iônica resultante da solução, expressa na Equação 15. Com a força iônica resultante de cada uma das soluções, o coeficiente de atividade foi extraido das equações 12, 13 e 14 para cada um dos eletrólitos. Por fim, estes coeficientes foram utilizados para se estimar a atividade de cada sal e calcular a pressão osmótica resultante da solução.

$$I = \sum_{i=1}^{n} c_i z_i^2 \quad (15)$$

Onde:

I = força iônica da solução ($mol.kgH_2O^{-1}$);

c_i = concentração do íon ($mol.kgH_2O^{-1}$);

z_i = carga do íon;

A pressão osmótica, por sua vez, foi cálculada a partir da Equação 16.

$$\pi = R.T.\sum_{i}^{n} \alpha.\, i \quad (16)$$

Onde:

π = pressão osmótica (atm);

R = constante universal dos gases ($atm.L.mol^{-1}.K^{-1}$);

T = temperatura da solução (K);

α = atividade;

i = fator de van't Hoff

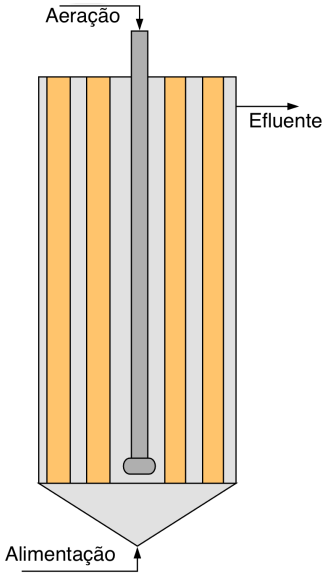
4.6. Reatores biológicos contínuos

4.6.1 Reator de Leito Fixo Estruturado

Os reatores contínuos controle (RC) e salino (RS) foram construidos em acrílico, em formato cilíndrico, com diâmetro interno de 8 cm e 30 cm de altura. Os reatores possuíam uma base cônica com mesmo diâmetro do reator e altura de 8 cm, destinada para acúmulo de biomassa a ser descartada (caso necessário). O volume total dos reatores foi de 1,65 litros e volume útil de 1,3 litros devido ao leito estruturado com porosidade de

78%. Os reatores foram operados em sistema contínuo em fluxo ascendente como apresentado na Figura 05.

Figura 5 - Desenho esquemático do reator biológico de leito estruturado com sistema de aeração.



Fonte: Autoria própria.

Os reatores foram mantidos em câmara climatizada a 30±1°C e a alimentação do afluente foi feita por meio do uso de bombas dosadoras SMART digital modelo DDA da fabricante Grundfos (Dinamarca) com capacidade máxima de 9 L h^{-1}. A aeração dos sistemas foi promovida por meio de compressores de ar providos de difusor de micro bolhas conectado na extremidade dos tubos de inox de saída de ar. Foi instalado um fluxômetro com capacidade de medição de 0 a 15 L min^{-1} na linha de aeração de cada um dos reatores contínuos a fim de controlar e equalizar a vazão de ar alimentada nos sistemas. A aeração foi mantida constante e em saturação após o período de adaptação com vazão de ar média de 3 L min^{-1}. O ajuste feito nos fluxômetros e a medição da concentração de oxigênio dissolvido no meio reacional foi feita diariamente.

Não foi necessária a instalação de bombas de recirculação do meio reacional, uma vez que a suspensão das bolhas de ar promovia a mistura completa do meio reacional, considerando-se que o volume útil dos reatores era de apenas 1,3 litros.

4.6.2. Material suporte para a imobilização da biomassa

O material suporte que constituiu o leito dos reatores foi espuma de poliuretano. Quatro hastes de PVC de 30 cm de comprimento em cada reator foram utilizadas como

eixo vertical para envolver a espuma e formar estruturas cilíndricas de 3 cm de diâmetro e 20 cm de comprimento. As hastes foram fixadas na base do reator e as principais características da espuma foram obtidas por Silva et al. (2006): densidade aparente de 23 g L^{-1}, porosidade de 92%, principal diâmetro de poro de 543 μm e área superficial específica de 43,8 $m^2 g^{-1}$.

4.6.3 Água residuária de estudo nos sistemas contínuos

O efluente simulado empregado neste estudo para alimentação dos reatores contínuos continha DQO e concentração de nitrogênio total de aproximadamente 600 mgO_2 L^{-1} e 60 mgN L^{-1}, baseado nas características de esgoto sanitário concentrado (METCALF; EDDY, 2003). Para tanto, a composição da água residuária continha (mg L^{-1}): sacarose (534,75), cloreto de amônio (229,3) e hidrogenocarbonato de sódio (500). A matéria nitrogenada foi introduzida no sistema na forma de $N\text{-}NH_4^+$ já que é de amplo conhecimento que a conversão do nitrogênio orgânico à nitrogênio amoniacal é um processo rápido e que não limita os sistemas de tratamento de esgoto sanitário.

Além dos compostos citados acima, a água residuária de estudo aplicada ao RS tomou por base a caracterização da água de abastecimento de 18 municípios do sertão do estado de Alagoas, no Nordeste brasileiro, executada pelo Governo Federal no escolpo do Programa Água Doce (PAD) (BRASIL, 2012). O Anexo I traz as concentrações dos principais íons detectados na água consumida pela população no ano de 2015 dos municípios de Pariconha, São José da Tapera, Senador Rui Palmeira, Maravilha, Mata Grande, Olho D'água do Casado, Ouro Branco, Palmeira dos Índios, Pão de Açucar, Inhapi, Carneiros, Poços de Trincheiras, Santana do Ipanema, Major Isidorio, Estrela de Alagoas, Quebrangulo, Delmiro Gouveia e Piranhas.

A partir desta caracterização, foram comparadas as concentrações dos íons detectados. Os íons de maior concentração são os cátions Na^+, Mg^{2+}, Ca^{2+} e o anion Cl^- e as concentrações mais elevadas destes elementos foram a base para a água residuária de estudo. Tomando-se as concentrações dos elementos supracitados, assumiram-se os parâmetros estabelecidos no item 4.5.5 ‘Cálculo dos coeficientes de atividade e pressão osmótica’ deste trabalho para estimar os coeficientes de atividade.

Na Tabela 07, estão relacionadas as concentrações que foram quantificadas de cada íon selecionado para este estudo e a equivalente concentração dos respectivos cloretos.

Tabela 7 - Concentrações máximas encontradas para os íons que compõem os sais de estudo na área monitorada (sertão do estado de Alagoas) e as concentrações equivalentes dos respectivos cloretos.

Elemento	Concentração máxima encontrada (g L^{-1})	Sal de cloreto correspondente	Concentração do sal correspondente (g L^{-1})	Concentração final do elemento
Na^{+}	11,12	NaCl	28	11,0
Mg^{2+}	3,06	$MgCl_2$	11,77	3,0
Ca^{2+}	1,30	$CaCl_2$	3,61	1,3
Cl^{-}	24,00	-	-	28,1

Fonte: Autoria própria.

Com isto, os parâmetros eletroquímicos para o cálculo da pressão osmótica foram quantificados e estão apresentados na Tabela 08.

Tabela 8 - Estimativa da atividade das soluções de estudo, correspondente pressão osmótica conferida por cada sal e pressão osmótica da solução final.

Sal	Massa (g)	Molalidade (mol kgH_2O^{-1})	Força iônica (molal L^{-1})	Coeficientes de atividade	Atividade (molal L^{-1})	Pressão osmótica (atm)	Pressão osmótica da solução (atm)
NaCl	28,00	0,479	0,947	0,659	0,315	15,70	**21,2**
$MgCl_2$	11,77	0,124		0,480	0,059	4,42	
$CaCl_2$	3,61	0,033		0,457	0,015	1,11	

Fonte: Autoria própria.

O aumento progressivo da pressão osmótica aplicada ao sistema foi idealizado para que a concentração proporcional de cada sal fosse mantida, baseado na caracterização da região de estudo (ANEXO I). No entanto, ao atingir a pressão osmótica de 9 atm, que corresponde a 42,5% da salinidade máxima encontrada na região-base, o sistema entrou em colapso e a operação do reator salino foi finalizada (Fase 3).

A Tabela 09 apresenta a composição da água residuária de estudo para o RC e RS em suas respectivas fases operacionais. Após preparo, os reservatórios de alimentação dos reatores foram mantidos a 3 °C para evitar fermentação da matéria orgânica. Cada ciclo de alimentação durou em média 5 dias e a cada troca de ciclo foi feita a assepsia dos tanques de alimentação.

Tabela 9 - Características físico-químicas da água residuária de estudo (esgoto sanitário simulado).

	Reator Controle	Reator Salino		
		Fase I	Fase II	Fase III
DQO (mg L^{-1})	600	600	600	600
Concentração de $N\text{-}NH_4^+$ (mg L^{-1})	60	60	60	60
NaCl (g L^{-1})	N/A	1,87	6,22	11,20
$MgCl_2$ (g L^{-1})	N/A	0,78	2,62	4,71
$CaCl_2$ (g L^{-1})	N/A	0,24	0,80	1,44
Salinidade (wt%)	N/A	0,3	1,00	1,7
Pressão Osmótica (atm)	N/A	1,7	5,25	9
% da PO Final	N/A	8%	25%	42,5%

Fonte: Autoria própria.

4.6.4 Inóculo e *Start up*

Os reatores contínuos RC e RS foram inoculados simultaneamente com uma mistura composta por: 50% de lodo aeróbio proveniente da estação de tratamento de lodos ativados para o tratamento de esgoto sanitário da Fábrica de Motores Volksvagem (São Carlos/SP), 25% de lodo anaeróbio de um UASB empregado no tratamento de água residuária de produção avícola na cidade Pereiras/SP e 25% de sendimentos bentônicos do Complexo Estuarino Lagunar Mundaú-Manguaba (CELMM) (Maceió/AL). Esta proporção foi escolhida a fim de favorecer a seleção de microrganismos nitrificantes. A concentração de sólidos voláteis totais do lodo aeróbio e do lodo anaeróbio foi de 29,85 g L^{-1} e 48,3 g L^{-1}, respectivamente.

Sedimentos bentônicos foram coletados em um complexo estuarino no estado de Alagoas objetivando-se a inserção de microrganismos autotróficos e heterotróficos resistentes à salinidade, já que este ambiente possui salinidade próxima a do mar (3 wt%). Os sedimentos foram coletados na lagoa Mundaú, próximo à embocadura do estuário, em janeiro de 2018 em maré baixa por meio de uma draga Ekman (Figura 06). Os sedimentos foram colocados em caixa térmica a 4°C e transportados sob refrigeração e possuía 0,045 gSVT g sedimento^{-1}.

Figura 6 - Coleta do sedimento bentônico no Complexo Estuarino Lagunar Mundaú- Manguaba.

Fonte: Autoria própria.

Considerando-se o volume útil dos reatores de 1,3 L, 50% do volume foi preenchido com a mistura dos inóculos descrita acima e 50% da água residuária de alimentação. Os reatores foram mantidos em sistema fechado com aeração média (3 $mgO_2\ L^{-1}$) e após 10 dias, o sistema foi aberto para que o excesso do inóculo fosse lavado gradualmente, iniciando-se a fase de adaptação.

4.6.5 Monitoramento da eficiência dos processos

As análises fisico-químicas de DQO, nitrogênio amoniacal, nitrito, nitrato, pH, OD e condutividade elétrica foram realizados três vezes por semana. As análises de alcalinidade, sólidos suspensos voláteis e totais foram realizadas uma vez por semana. As eficiências de remoção de DQO, nitrificação (oxidação de $N\text{-}NH_4^+$), desnitrificação e remoção de nitrogênio total foram calculadas de acordo com as equações 17, 18, 19 e 20, respectivamente.

$$\%DQO = \frac{[DQO]af - [DQO]ef}{[DQO]af} \times 100 \qquad (17)$$

Sendo:

%DQO = remoção de DQO;

[DQO]af = DQO afluente;

[DQO]ef = DQO efluente;

$$\%\text{Ox. N-}NH_4^+ = \frac{[N-NH_4^+]af-[N-NH_4^+]\text{ef}}{[N-NH_4^+]af} \times 100 \quad (18)$$

Sendo:

%Ox. N-NH_4^+ = eficiência de nitrificação;

[N-NH_4^+]af = concentração de nitrogênio amoniacal afluente;

[N-NH_4^+]ef = concentração de nitrogênio amoniacal efluente;

$$\%\text{Rem. N-Total} = \frac{[\boldsymbol{N-NH_4^+}]\boldsymbol{af}-([\boldsymbol{N-NH_4^+}]\mathbf{ef}+[\boldsymbol{N-NO_2^-}]+[\boldsymbol{N-NO_3^-}])}{[\boldsymbol{N-NH_4^+}]\mathbf{af}} \times \mathbf{100} \quad (19)$$

Sendo:

%Rem. N-Total = remoção de nitrogênio total;

[N-NH_4^+]af = concentração de nitrogênio amoniacal afluente;

[N-NH_4^+]ef = concentração de nitrogênio amoniacal efluente;

[N-NO_2^-] = concentração de nitrito efluente;

[N-NO_3^-] = concentração de nitrato efluente;

$$\%\text{Desn.} = \frac{([\boldsymbol{N-NH_4^+}]\boldsymbol{af})\times(\%\mathbf{Ox}.\boldsymbol{N-NH_4^+})-([\boldsymbol{N-NO_2^-}]+[\boldsymbol{N-NO_3^-}])}{([\boldsymbol{N-NH_4^+}]\boldsymbol{af})\times(\%\boldsymbol{Ox}.\boldsymbol{N-NH_4^+})} \times \mathbf{100} \quad (20)$$

Sendo:

%Desn. = eficiência de desnitrificação;

[N-NH_4^+]af = concentração de nitrogênio amoniacal afluente;

[N-NH_4^+]ef = concentração de nitrogênio amoniacal efluente;

%Ox. N-NH_4^+ = eficiência de nitrificação;

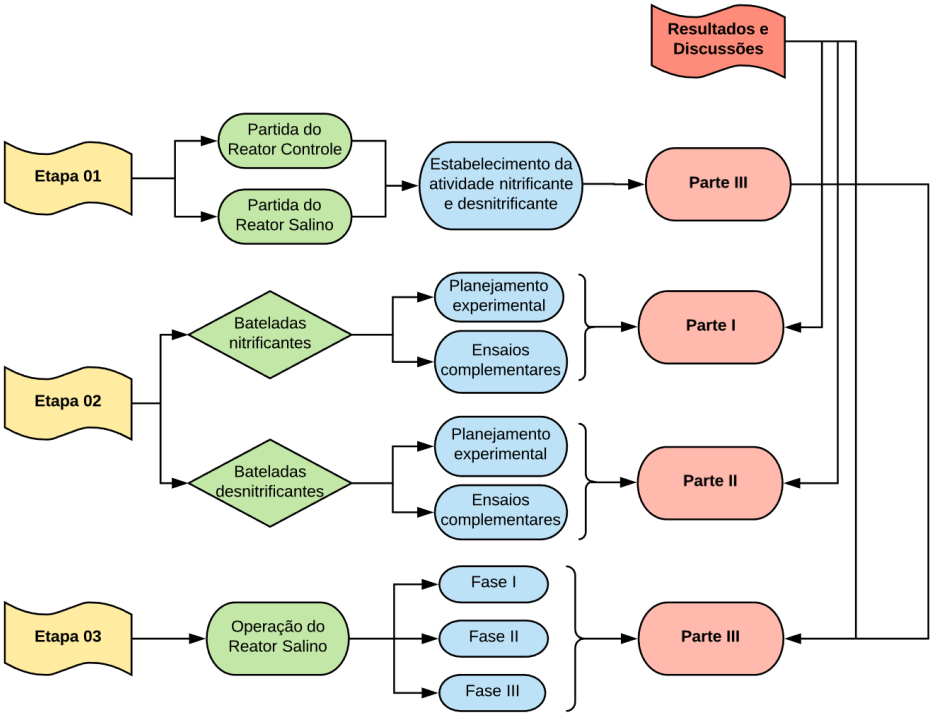
[N-NO_2^-] = concentração de nitrito efluente;

[N-NO_3^-] = concentração de nitrato efluente.

5. Resultados e Discussões

Os resultados e discussões deste manuscrito foram divididos em três partes. As Parte I e II contemplam os dados obtidos na Etapa 2 (Figura 03), referentes, respectivamente, aos ensaios em batelada de nitrificação e desnitrificação. Já os resultados e discussões dos reatores contínuos de leito fixo estruturado, foram descritos e discutidos na Parte III. A Figura 07 apresenta esquematicamente a ordem de apresentação dos resultados e sua relação com as Etapas 01, 02 e 03 desenvolvidas no presente trabalho.

Figura 7 - Fluxograma do procedimento experimental com identificação das etapas desenvolvidas e ordem e agrupamento dos resultados.



Fonte: Autoria própria.

PARTE I - Planejamento experimental e ensaios complementares para Nitrificação

Nesta primeira sessão dos resultados, serão discutidos os ensaios em batelada referentes ao planjamento fatorial e ensaios complementares A (nitrificação). O uso de

planejamentos fatoriais é geralmente aplicado para a otimização de processos por meio da investigação da influência de fatores em determinados níveis. No entanto, neste trabalho, considerando-se a inibição da atividade microbiana por elevadas concentrações de sais, o principal objetivo foi determinar influência de cada sal estudado, a magnitude dos efeitos e a interação entre estes.

Além de manter todos os experimentos em uma mesma faixa de pH, o controle deste parâmetro para que fosse mantido abaixo de 7,0 permitiu que não se formasse carbonato em concentrações tais que pudessem gerar precipitados. Assim, os lavadores de gás em série e o controle do pH se mostraram uma estratégia eficiente para o controle das formas inorgânicas de carbono já que não foi observado precipitados em nenhuma das bateladas do planejamento A e nos ensaios complementares de nitrificação.

5.1.1 Planejamento fatorial para nitrificação via N-NH_4^+

Ensaios cinéticos de nitrificação desenvolvidos anteriormente por Moura (2011; 2014), Santos (2014) e Silva (2016), os quais utilizaram inóculos semelhantes ao deste trabalho, com exceção do sendimento bentônico, relatam que os dados ajustaram-se ao modelo cinético de ordem zero, o que significa que a velocidade da reação não é afetada pela concentração inicial do substrato.

No entanto, neste trabalho, o perfíl observado em todas as condições experimentais não se ajustaram com precisão em uma equação linear, a qual descreve o comportamento de cinética de ordem zero. Os resultados, por sua vez, mostraram que o perfíl de consumo do substrato segue um comportamento mais rápido nos primeiros instantes e um perfil mais linear após os 90 primeiros minutos. Possivelmente, isto se deve ao fato do desenvolvimento e inibição de diferentes populações microbianas presente no inóculo, a influência da concentração de substrato disponível e do efeito da toxicidade do meio.

O comportamento microbiano provavelmente é semelhante ao modelo cinético de Inibição Não-Competitiva, no qual a velocidade da reação é influenciada pela presença de um composto inibidor que não compete com o mesmo sítio ativo ocupado pelo substrato (BAILEY; OLLIS, 1986). Este modelo cinético considera as constantes de

consumo do substrato (K_M), de inibição (K_I) e a concentração do inibidor (C_I) em função de diferentes concentrações iniciais do substrato.

Para sistemas de eletrólitos mistos, a quantificação destes parâmetros se torna complexa e inespecífica, devido à heterogeneidade de cada condição caracterizada pela inibição de diferentes compostos e do efeito conjunto da pressão osmótica. Além disto, o objetivo deste trabalho não é a determinação de tais parâmetros, e sim a identificação do efeito tóxico de diferentes sais e da pressão osmótica.

A variável resposta para cada condição experimental foi calculada por meio do ajuste ao modelo cinético de primeira ordem, já que o perfil de consumo do substrato mostrou bom ajuste a este modelo, com R^2 superiores a 0,96 na maior parte dos ensaios. O mesmo comportamento foi observado para os ensaios cinéticos de desnitrificação que serão discutidos na Parte II desta seção (5. Resultados e Discussão). A matriz contendo os resultados obtidos está apresentada na Tabela 10.

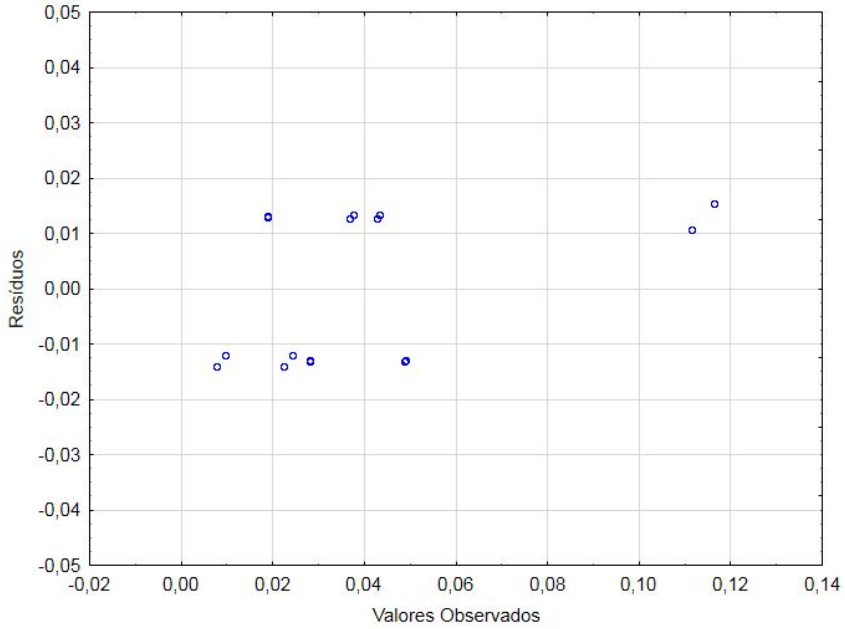
Tabela 10 - Matriz de condições experimentais e respostas do Planejamento experimental A (nitrificação).

	Variáveis Independentes			**Variável resposta**	**Pressão osmótica da condição (atm)**
Condição	**NaCl (g L^{-1})**	**$MgCl_2$ (g L^{-1})**	**$CaCl_2$ (g L^{-1})**	**Taxa de nitrificação (mgN $gSSV^{-1}$ min^{-1})**	
1	5	3	3	$1{,}1\times10^{-1}$	5,2
2	30	3	3	$2{,}2\times10^{-2}$	18,8
3	5	12	3	$2{,}7\times10^{-2}$	8,4
4	30	12	3	$3{,}7\times10^{-2}$	21,8
5	5	3	12	$4{,}9\times10^{-2}$	7,9
6	30	3	12	$1{,}9\times10^{-2}$	21,3
7	5	12	12	$3{,}7\times10^{-2}$	11,0
8	30	12	12	$8{,}3\times10^{-3}$	24,3

Fonte: Autoria própria.

O gráfico na Figura 08 mostra que os resíduos (diferença entre os valores observados e os valores estimados) não apresentam uma estrutura, ou seja, que estão aleatoriamente distribuídos, indicando que a falta de ajuste se deve provavelmente ao erro puro experimental.

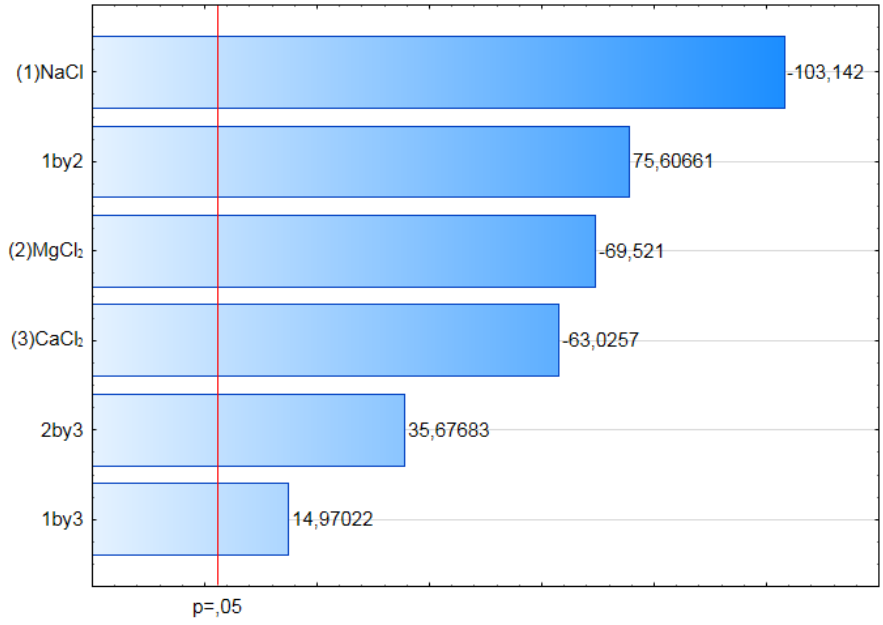
Figura 8 - Resíduos em função da variável resposta obtida para o Planejamento Experimental A (nitrificação).



Fonte: Autoria própria.

A identificação das variáveis independentes significativas e a magnitude do efeito de cada cada fator para o processo de nitrificação estão representadas pelo gráfico de Pareto (Figura 09).

Figura 9 - Gráfico de Pareto obtido por meio do planejamento experimental A (nitrificação).



Fonte: Autoria própria.

A partir do gráfico de Pareto observa-se que os efeitos dos sais estudados bem como o da interação entre eles foram significativos para o processo, no qual "1by2" representa o efeito da interação entre os sais NaCl (1) e $MgCl_2$ (2), "1by3" o efeito da interação entre os sais NaCl e $CaCl_2$ (3) e, por fim, o efeito "2by3" que representa a interação entre os fatores $MgCl_2$ e $CaCl_2$. O sal de maior influência negativa para a taxa de nitrificação na faixa de estudo abordada foi o cloreto de sódio (-103,14), seguido do cloreto de magnésio (-69,52) e, do cloreto de cálcio (-63,03).

O segundo maior efeito observado para a nitrificação foi a interação dos cloretos de sódio e de magnésio no sistema (75,61) que juntamente às interações dos fatores 2 e 3 e dos fatores 1 e 3, influenciaram de forma positiva o processo. Este resultado pode ser relacionado ao fenômeno de antagonismo entre cátions divalentes para com cátions monovalentes, no caso das interações "1by3" e "1by2". McCarty e McKinney (1961) propuseram essa relação antagônica para o efeito destes sais na atividade das bactérias anaeróbias. Os autores obtiveram resultados que mostram que sais dos cátions divalentes Mg^{2+} e Ca^{2+} atenuam e até eliminam o efeito inibitório de sais de sódio (cloreto e acetato).

McFarlane (1968) estudou o mesmo efeito tóxico dos cloretos de sódio, magnésio e cálcio em ovos de *Acheta domesticus*. O autor concluiu que a toxicidade da concentração de 30 g L^{-1} de NaCl foi atenuada pela presença em solução de 1 g L^{-1} de $CaCl_2$ ou $MgCl_2$. McFarlane (1968) propõe que a presença de um cátion divalente inibe a tendência de que os íons Na^+ possuem em se acumular na parede de carga negativa do ovo, aumentando a pressão osmótica do meio, fazendo com que o organismo perca água e colapse. Apesar de pertencerem a domínios diferentes, este mecanismo pode ocorrer de forma semelhante em bactérias. O mecanismo pelo qual cátions divalentes são antagônicos ao efeito negativo de cátions monovalentes é ainda desconhecido.

Também para bactérias anaeróbias, Feijoo et al. (1995) desenvolveram testes com aproximadamente 30 g L^{-1} de NaCl para investigar o efeito da concentração deste sal na produção de metano. Os autores testaram soluções com apenas NaCl e soluções com composição semelhante à água do mar, com a adição de concentrações menores de Mg^{2+}, Ca^{2+}, K^+ e SO_4^-. A solução de eletrólitos mistos teve ação inibidora na produção de

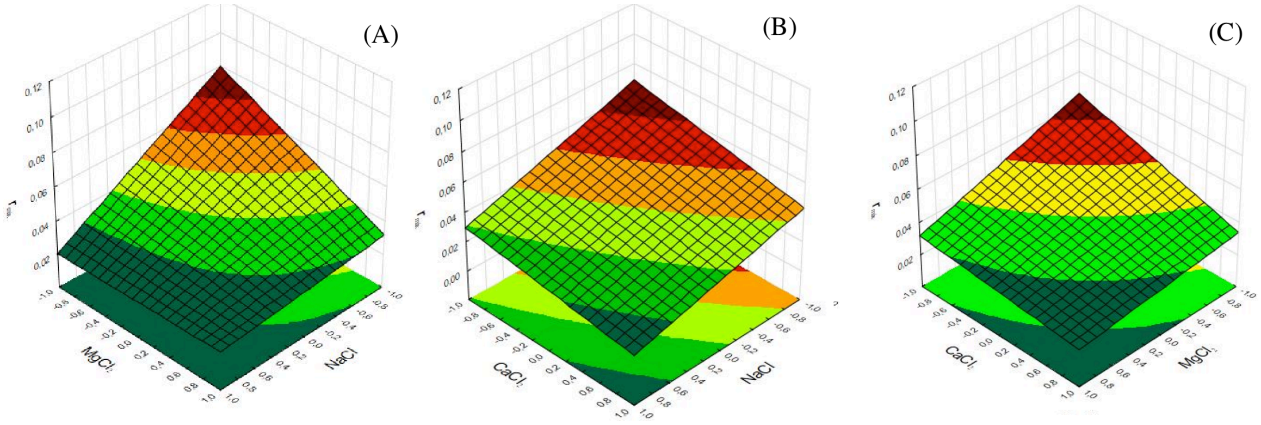
metano inferior à solução de apenas NaCl, o que levou os autores a supor o possível efeito antagônico entre os elementos, ainda para lodos adaptados à salinidade.

McCarty e McKinney (1961) relataram que a ação tóxica de sais em comunidades microbianas em sistemas de tratamento está geralmente associada aos cátions, e que os ânions, como o íon cloreto, exercem função pouco significativa. Ao avaliar o efeito de inibição de cátions também em processos anaeróbios, Kulgeman e McCarty (1965) concluíram que a magnitude do efeito negativo da presença dos cátions estudados decresce na ordem sódio, cálcio e magnésio e sugerem o mesmo princípio de antagonísmo já citado. Além disso, os autores identificaram o efeito de sinergismo em soluções de eletrólitos mistos de modo que a concentração não tóxica de um determinado sal passa a ser tóxica na presença de outro sal.

A significância da interação dos sais $MgCl_2$ e $CaCl_2$ não foi descrito em literatura. Possivelmente, este efeito positivo está associado ao antagonismo de ambos os cátions divalentes com o efeito tóxico do íon sódio. O efeito de cátions em sistemas biológicos de tratamento de águas residuárias deve ser uma combinação da natureza e concentração de todos os cátions, mediantes às relações de antanogismo, sinergismo, nutrição e toxicidade (KULGEMAN; McCARTY, 1965).

Superfícies de resposta que relacionam graficamente as concentrações de dois dos fatores estudados com a variável resposta estão dispostas na Figura 10. Nesta figura, estão em sequência as superfícies referentes ao efeito dos sais NaCl e $MgCl_2$ (a), NaCl e $CaCl_2$ (b) e, finalmente, dos sais $MgCl_2$ e $CaCl_2$ (c) em relação à taxa máxima de nitrificação via $N\text{-}NH_4^+$ ($mgN\text{-}NH_4^+$ $gSSV^{-1}$ min^{-1}). Por meio destas superfícies, observa-se que quanto menor a concentração dos sais, independentemente da natureza deles, maior a taxa da reação e que os fatores influenciam de maneira semelhante a variável resposta.

Figure 10 – Superfícies de resposta que mostra a resposta taxa máxima de nitrificação via $N\text{-}NH_4^+$ ($r_{N\text{-}máx}$) relacionando aos fatores NaCl e $MgCl_2$ (a), NaCl e $CaCl_2$ (b) e $MgCl_2$ e $CaCl_2$ (c).



Fonte: Autoria própria.

A equação 21 traz o modelo de regressão obtido para representar o comportamento da variável resposta mediante à variação das variáveis independentes.

$$Y = 0{,}0386 - 0{,}0172(X_1) - 0{,}0116(X_2) - 0{,}0105(X_3) + 0{,}0126(X_1)(X_2) - 0{,}0025(X_1)(X_3) - 0{,}006(X_2)(X_3) \quad (21)$$

Em que:

X_1 = concentração de NaCl normalizada para $-1 \leq X_1 \leq 1$

X_2 = concentração de $MgCl_2$ normalizada, para $-1 \leq X_2 \leq 1$

X_3 = concentração de $CaCl_2$ normalizada, para $-1 \leq X_3 \leq 1$

A significância estatística da regressão foi avaliada por meio da análise de variância (ANOVA) do modelo de regressão utilizando-se o software Chemoface® 1.61. A ANOVA está disposta na Tabela 11.

Tabela 11 - ANOVA do modelo de regressão para o planejamento fatorial de nitrificação.

	SQ	**GL**	**MQ**	**F**	**p**
Regressão	$2{,}82 \times 10^{-3}$	6	$4{,}67 \times 10^{-4}$	10,93	0,0011
Residual	$3{,}85 \times 10^{-4}$	9	$4{,}28 \times 10^{-5}$		$4{,}3754 \times 10^{-8}$
Falta de ajuste	$3{,}77 \times 10^{-4}$	1	$3{,}77 \times 10^{-4}$	392,78	
Erro puro	$7{,}68 \times 10^{-6}$	8	$9{,}61 \times 10^{-7}$		
Total	$3{,}0 \times 10^{-3}$	15			
R^2	0,88				
R^2 explicável	0,99				

SQ – soma quadrática; GL – graus de liberdade; MQ – média quadática; F - valor da Função F; p - valor de p (intervalo de confiança de 95%). Fonte: Autoria própria.

Pode-se dizer que o modelo é estatisticamente significativo já que a razão MQ_R/MQ_r (média quadrática da regressão / média quadrática do resíduo) é maior que $F_{6,9}$. No entanto, a falta de ajuste é evidente, já que a razão MQ_{faj}/MQ_{ep} (média quadrática da falta de ajuste / média quadrática do erro puro) é muito maior que $F_{1,8}$. Isso mostra que um modelo linear não é o mais adequado para descrever a influência dos sais estudados no processo de nitrificação, embora eles sejam fatores significativos para o processo.

Isso sugere que um modelo polinomial de ordem superior a um, possivelmente descreveria melhor o comportamento da variável resposta em função dos fatores. O ajuste dos dados obtidos a um modelo polinomial só seria possível caso os fatores tivessem sido estudados em três ou mais níveis. No entanto, o objetivo do planejamento fatorial neste trabalho foi apenas identificar a significância dos fatores no processo estudado e a magnitude dos efeitos, já que é amplamente conhecido o efeito negativo de sais na maioria dos sistemas biológicos. Desta forma, um planejamento fatorial preliminar respondeu ao objetivo deste trabalho.

A partir da variável resposta obtida para cada condição, entende-se que a natureza dos sais e a interação entre eles são os fatores que mais influenciaram o processo de nitrificação em ambientes salinos, já que não foi observada uma tendência que relacionesse o aumento da pressão osmótica com a diminuição da variável resposta. Isto pode ser afirmado já que para semelhantes PO, como nas condições 04 (21,8 atm) e 06 (21,2 atm), as taxas máximas de nitrificação via $N\text{-}NH_4^+$ obtidas foram distintas, sendo 3.7×10^{-2} e 1.9×10^{-2} $mgN\text{-}NH_4^+$ $gSSV^{-1}$ min^{-1}, respectivamente. Como também, a obtenção da mesma taxa máxima de nitrificação via $N\text{-}NH_4^+$ para condições com diferentes PO como observado para as condições 04 e 07, nas quais a resposta obtida foi de 3.7×10^{-2} $mgN\text{-}NH_4^+$ $gSSV^{-1}$ min^{-1} para pressões osmóticas de 21,8 e 11 atm, respectivamente.

5.1.2 Ensaios complementares de nitrificação via $N\text{-}NH_4^+$

A matriz experimental e as respectivas respostas para cada condição estão descritas na Tabela 12.

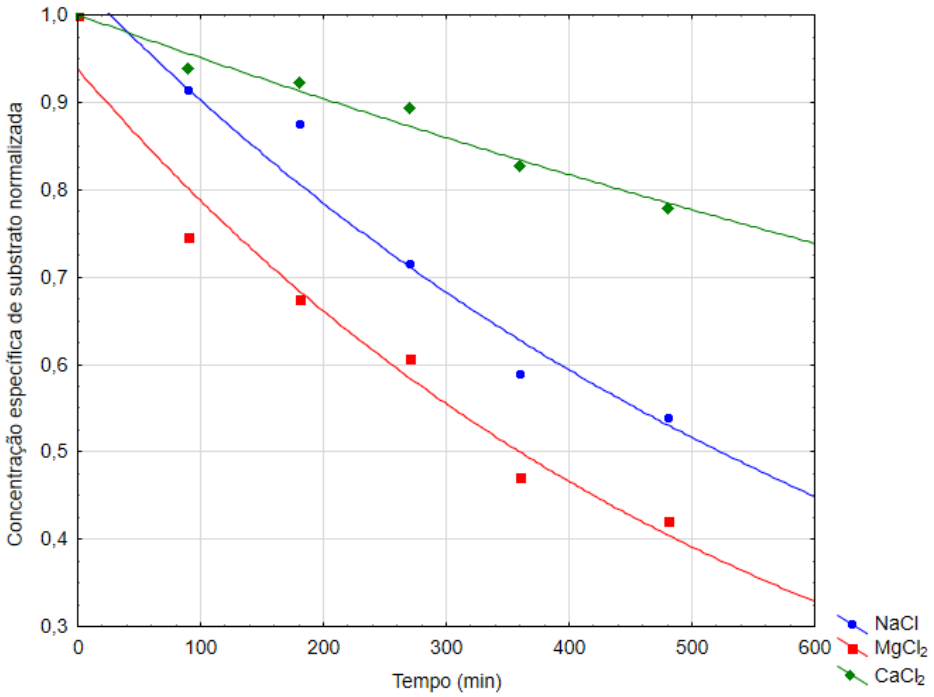
Tabela 12 - Composição do meio reacional e respostas obtidas nos ensaios complementares.

Sal	Ensaio	Concentração ($g\ L^{-1}$)	Coeficiente de atividade	Pressão Osmótica (atm)	Taxa máxima de nitrificação via $N\text{-}NH_4^+$ ($mgN\ gSSV^{-1}\ min^{-1}$)
Branco	0	-	-	-	$6{,}0\times10^{-2}$
NaCl	9	7,84	0,761	5	$4{,}8\times10^{-2}$
	10	26,15	0,687	15	$2{,}7\times10^{-2}$
	11	54,5	0,658	30	$2{,}7\times10^{-2}$
$MgCl_2$	12	12,68	0,512	5	$6{,}3\times10^{-2}$
	13	40,98	0,476	15	$3{,}4\times10^{-2}$
	14	75,19	0,519	30	$3{,}0\times10^{-2}$
$CaCl_2$	15	13,06	0,498	5	$1{,}7\times10^{-2}$
	16	43,84	0,446	15	$1{,}2\times10^{-2}$
	17	81,67	0,477	30	$7{,}1\times10^{-3}$

Fonte: Autoria própria.

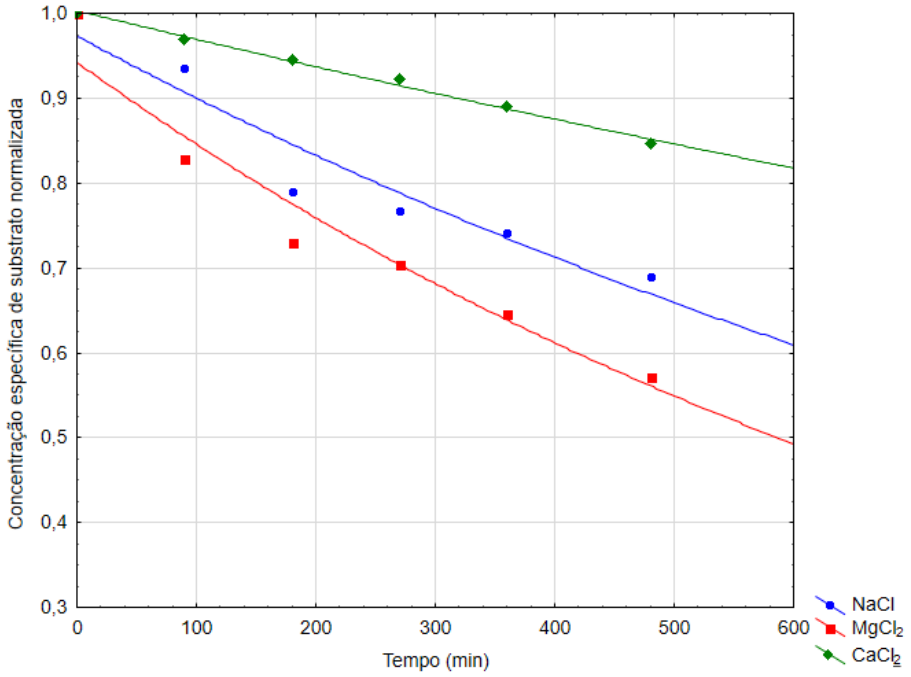
A partir dos dados da Tabela 12, fica evidente que apesar da PO exercer influência no desempenho dos microrganismos, a toxicidade específica da natureza dos íons tem efeito superior, uma vez que resultados distintos foram obtidos para soluções isotônicas (condições 09, 12 e 15, por exemplo). Também, observa-se que à medida que a PO aumenta, independentemente do sal de estudo, a taxa de reação tende a diminir, mas este fato pode estar relacionado à toxicidade do íon que aumenta em concentração como consequência do aumento da pressão do meio. As Figuras 11, 12 e 13 mostram graficamente o comportamento da cinética de consumo no nitrogênio amoniacal normalizados em PO fixa para cada um dos sais de estudo.

Figura 11 - Consumo de nitrogênio amoniacal na condição de pressão osmótica de 5 atm para os sais NaCl, $MgCl_2$ e $CaCl_2$.



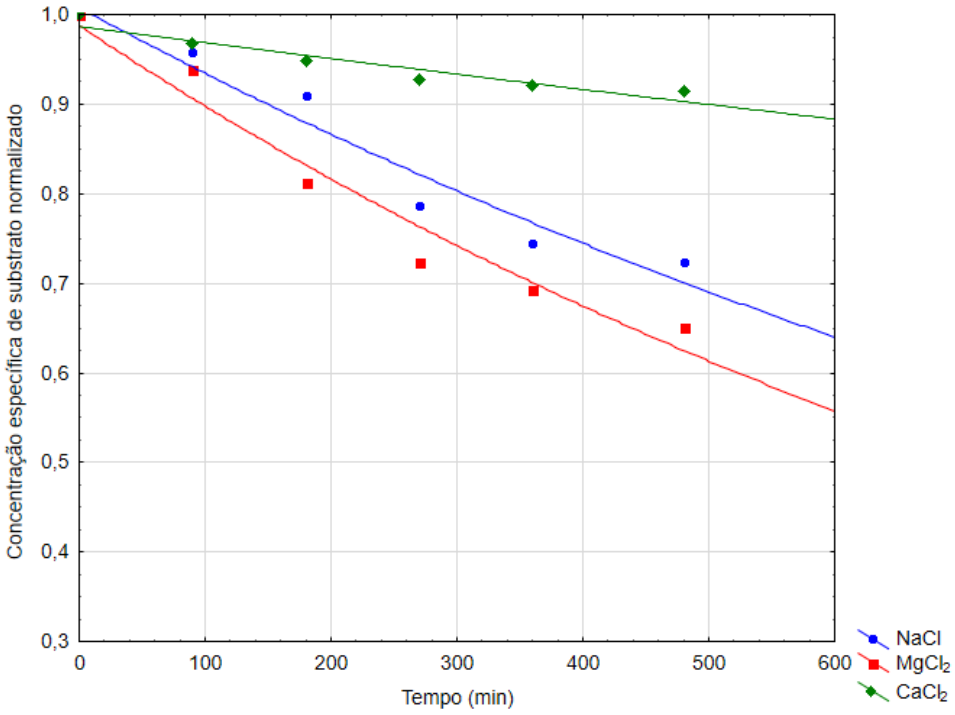
Fonte: Autoria própria.

Figura 12 - Consumo de nitrogênio amoniacal na condição de pressão osmótica de 15 atm para os sais NaCl, $MgCl_2$ e $CaCl_2$.



Fonte: Autoria própria.

Figura 13 - Consumo de nitrogênio amoniacal na condição de pressão osmótica de 30 atm para os sais NaCl, $MgCl_2$ e $CaCl_2$.



Fonte: Autoria própria.

A partir dos ensaios complementares, observa-se que todos os sais afetaram negativamente a taxa das reações uma vez que as constantes cinéticas específicas foram inferiores comparadas a obtida no ensaio branco (0), com exceção do $MgCl_2$ em pressão osmótica de 5 atm com taxa máxima de nitrificação ($r_{N\text{-}máx}$') via $N\text{-}NH_4^+$ de $6{,}3\times10^{-2}$ $mgN\text{-}NH_4^+$ $gSSV^{-1}$ min^{-1}. Para todas as POs, o melhor desempenho observado foi para os ensaios com $MgCl_2$ quando comparado aos outros sais.

Os resultados que mostraram maior inibição nos ensaios complementares são referentes às soluções de $CaCl_2$, para todas as pressões osmóticas estudadas. Já em soluções mistas, este sal possui o menor efeito negativo dentre os sais estudados. Ainda, ao contrário do exposto no gráfico de Pareto (Figura 09), o cloreto de sódio não foi o sal causador de maior inibição para ensaios com apenas um composto. A comparação destes resultados permite inferir que o mecanismo de inibição causado pelos sais é diferente quando em soluções mistas ou de único sal, o que pode estar relacionado à interação antagônica e sinérgica entre estes compostos. Assim, é evidenciada a importância de se

avaliar o efeito de inibição de sais em comunidades microbianas de sistemas de tratamento e a composição real destas águas residuárias.

5.1.3 Discussão geral dos resultados dos ensaios de nitrificação em bateladas

A maior $r_{N\text{-}máx}$' via $N\text{-}NH_4^+$ obtida neste trabalho foi de $1{,}1\times10^{-1}$ $mgN\text{-}NH_4^+$ $gSSV^{-1}$ min^{-1} mostrando que a composição de sais aplicada na condição 01 foi benéfica ao sistema uma vez que a $r_{N\text{-}máx}$' da condição 01 foi quase duas vezes maior que a referente ao ensaio controle. Isto pode estar relacionado ao efeito de "estímulo" descrito por Kulgeman e McCarty (1965) para baixas concentrações destes sais. Para estes autores, em sistemas anaeróbios, a concentração ideal é de aproximadamente 0,5 g L^{-1} de cada sal.

A salinidade tem dois possíveis efeitos tóxicos sobre as células: o efeito osmótico inespecífico e a toxicidade específica dos íons em sistemas celulares definidos (SERRANO, 1996). A toxicidade específica dos íons pôde ser observada neste trabalho, por exemplo, ao se comparar que apesar da elevada PO da condição 04 (21,8 atm), a $r_{N\text{-}máx}$' desta condição ($3{,}7\times10^{-2}$ $mgN\text{-}NH_4^+$ $gSSV^{-1}$ min^{-1}) foi igual ou superior a das condições 03 ($2{,}7\times10^{-2}$ $mgN\text{-}NH_4^+$ $gSSV^{-1}$ min^{-1}) e 07 ($3{,}7\times10^{-2}$ $mgN\text{-}NH_4^+$ $gSSV^{-1}$) cujas POs são inferiores (8,40 e 11 atm) (Tabela 10).

Ainda, observa-se que possivelmente a comunidade microbiana foi selecionada pela natureza do íon de maneira mais evidente que pela PO do meio, já que para ensaios com POs distintas (15 e 30 atm), a $r_{N\text{-}máx}$' obtida para as condições de mesmos sais foram iguais ou próximas. Este fato pode ser observado ao comparar as condições 10 e 11 (NaCl) nas quais a $r_{N\text{-}máx}$' é de $2{,}7\times10^{-2}$ $mgN\text{-}NH_4^+$ $gSSV^{-1}$ e para as condições 13 e 14 ($MgCl_2$), com $r_{N\text{-}máx}$' $3{,}4\times10^{-2}$ e $3{,}0\times10^{-2}$ $mgN\text{-}NH_4^+$ $gSSV^{-1}$ (Tabela 12).

Comparando-se os resultados dos ensaios complementares aos obtidos no planejamento fatorial A, é passível de conclusão que a PO de 5 atm não é inibidora da atividade microbiana nitrificante, já que todos os experimentos com esta condição mostraram taxa de reação superior ou próxima ao ensaio controle, seja para soluções de eletrólitos mistos (condição 01 com $1{,}1\times10^{-1}$ $mgN\text{-}NH_4^+$ $gSSV^{-1}$ min^{-1} e PO de 5,24 atm), quanto para as soluções de sais individualizados ($6{,}3\times10^{-2}$ $mgN\text{-}NH_4^+$ $gSSV^{-1}$ min^{-1} para condição 12 e $4{,}8\times10^{-2}$ $mgN\text{-}NH_4^+$ $gSSV^{-1}$ min^{-1} para condição 09), com exceção do

ensaio com $CaCl_2$ (condição 15) (Tabelas 10 e 12). Os resultados para PO em torno de 5 atm deste trabalho foram próximos ou superiores aos encontrados por Uygur (2006), cuja $r_{N\text{-máx}}$' para condição salina de 1wt% de NaCl, equivalente à pressão osmótica de 6,3 atm, foi de aproximadamente 5×10^{-2} mgN $gSSV^{-1}$ min^{-1}.

Observa-se por meio dos valores dispostos na Tabela 12, que nos ensaios com NaCl e com $MgCl_2$, comparando-se as condições de PO de 5 e 15 atm, há uma redução na atividade microbiana mais pronunciada que quando comparadas as condições de PO de 15 e 30 atm. Isto indica que uma maior quantidade de populações microbianas é capaz de adaptar-se às concentrações moderadas destes sais, mas que há uma seleção natural mediante às concentrações maiores que possivelmente independe da PO (condições 09 e 10 e condições 12 e 13). Assim, para PO de 5 atm, há possivelmente uma associação da capacidade de adaptação e de seleção ao inibidor, mas para as POs de 15 e 30 atm, a capacidade de adaptação foi esgotada e a atividade microbiana restante se deve à seleção de organismos tolerantes a cada sal individualmente por toxicidade específica.

A Tabela 13 apresenta as $r_{N\text{-máx}}$' obtidas neste trabalho para soluções de eletrólitos mistos e isolados comparando-se-as a outros trabalhos desenvolvidos também para investigar a influência da salinidade na atividade microbiana nitrificante.

Tabela 13 - Taxas máximas específicas de nitrificação obtidas neste trabalho e nos trabalhos de Uygur (2006) e Wang e et al. (2015) para diferentes faixas pressões osmóticas.

	Literatura		**Este trabalho**			
Pressão osmótica (atm)	**Wang et al. (2015)**	**Uygur (2006)**	**Eletrólitos mistos**	**NaCl**	**$MgCl_2$**	**$CaCl_2$**
0	$1,1\times10^{-1}$	$5,0\times10^{-2}$	$6,0\times10^{-2}$	$6,0\times10^{-2}$	$6,0\times10^{-2}$	$6,0\times10^{-2}$
5 - 6	$6,2\times10^{-2}$	$4,0\times10^{-2}$	$1,1\times10^{-1}$	$4,8\times10^{-2}$	$6,3\times10^{-2}$	$1,7\times10^{-2}$
10 - 12	$5,2\times10^{-2}$	$3,5\times10^{-2}$	$3,7\times10^{-2}$	-	-	-
15 - 17	$3,3\times10^{-2}$	$2,5\times10^{-2}$	-	$2,8\times10^{-2}$	$3,4\times10^{-2}$	$1,2\times10^{-2}$
21 - 23	$2,0\times10^{-2}$	$2,3\times10^{-2}$	$3,7\times10^{-2}$	-	-	-
28 - 30	$1,7\times10^{-2}$	$2,0\times10^{-2}$	-	$2,7\times10^{-2}$	$3,0\times10^{-2}$	$8,0\times10^{-3}$

Fonte: Autoria própria.

No trabalho de Wang et al. (2015), um reator em batelada sequencial foi operado com o aumento gradual da salinidade. No estágio estacionário de casa fase, ensaios cinéticos foram desenvolvidos para avaliar a atividade específica da biomassa. Os autores

utilizaram uma composição semelhante à água marinha, com maior concentração de cloreto de sódio e a presença em pequenas concentrações de íons como Mg^{2+}, Ca^{2+}, SO_4^-, K^+, Fe^{2+}, entre outros. A biomassa utilizada para os ensaios cinéticos foi adaptada gradualmente à salinidade, diferentemente do que foi feito neste trabalho. Já no estudo desenvolvido por Uygur (2006), que também utilizou biomassa de um reator operado em batelada sequencial com o aumento gradual da salinidade para os ensaios cinéticos, a composição da salinidade era apenas de NaCl.

Nota-se que a biomassa no presente trabalho foi favorecida pelo aumento da PO para 5 atm para o ensaio de eletrólitos mistos, com taxa máxima de nitrificação superior à obtida por Uygur (2006) e Wang et al. (2015), com constante cinética de $1{,}1\times10^{-1}$; $6{,}2\times10^{-2}$ e $4{,}0\times10^{-2}$ mgN-NH_4^+ gSSV^{-1} min^{-1}, respectivamente. A partir dos resultados para a faixa de PO de 21 a 23 atm, observa-se que o melhor desempenho foi para a solução de eletrólitos mistos do presente trabalho, evidenciando-se que a composição da água residuária influencia diretamente na atividade microbiana, independentemente do período de adaptação aplicado à biomassa.

No mais, para eletrólitos mistos e para os sais NaCl e $MgCl_2$, os resultados foram próximos aos dos autores Uygur (2006) e Wang et al. (2015) para todas as faixas de PO, indicando que o longo período de adaptação da biomassa não favoreceu necessariamente os sistemas dos autores citados pois, possivelmente, a seleção de organismos halotolerantes se dá rapidamente. As variações observadas são certamente devidas às diferentes comunidades microbianas estabelecidas em cada sistema.

Desconsiderando-se a toxicidade específica dos íons, a capacidade de acumular solutos compatíveis para a osmoregulação está relacionada à resistência a diferentes POs por meio do estabelecimento do balanço isoosmótico entre o meio e o interior da célula para que o volume celular seja mantido. Esta resistência seleciona as bactérias capazes de se adaptarem a meios salinos, justificando-se neste trabalho a grande variação nas constantes cinéticas de nitrificação para diferentes pressões osmóticas. Estes solutos compatíveis que se acumulam em organismos halofílicos e halotolerantes são geralmente aminoácidos, açúcares e polióis, como por exemplo glicina, betaína, ectoína, sacarose e glicerol, que são moléculas orgânicas que podem ser sintetizadas ou transportadas pelas bactérias e não perturbam os processos metabólicos por não possuir carga líquida ao pH

fisiológico (DASSARMA; DASSARMA, 2006; WOOD et al., 2001; ZAHRAN, 1996).

Ainda, os diferentes compostos que atuam como osmoprotetores podem ser armazenados nas células em diferentes concentrações em quantidade de matéria e em consequência, as bactérias que acumulam cada composto desempenharão diferentes capacidades de osmoregulação. Os açúcares, como a sacarose e trealose, são geralmente acumulados por bactérias com menor capacidade de suportar elevadas POs e os derivados de aminoácidos como a trimetilglicina e a ectoína são os osmoprotetores mais importantes, geralmente acumulados por bactérias resistentes à elevadas salinidades (GALINSK, 1993).

Bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas Gram negativas, como *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Alteromonas* e *Acinetobacter*, usam principalmente betaína, ectoína ou glicina como solutos compatíveis para o estabelecimento do balanço isoosmótico e gram positivas, como *Bacillus* e *Marinoccocus*, utilizam prolina, ectoína ou diaminoácido N-acetilado (DASSARMA; DASSARMA, 2006). Isto indica que cada gênero bacteriano possui características enzimáticas ligadas à sua filogenía, e em consequência, cada grupo bacteriano tem resistênca distinta a diferentes sais e a diferentes doses, o que corrobora com a possível justificativa disposta para os resultados obtidos neste item.

Ainda, a partir da existência de enzimas halotolerantes em organismos não-halotolerantes, como a termolisina e a glutaminase das bactérias *Micrococcus luteus* e *Bacillus subtilis* (FUKUCHI et al., 2003), responsáveis pela produção dos solutos compatíveis, supõe-se que este seja um mecanismo de adaptação de bactérias não-halotolerantes às condições salinas, pois diversos solutos compatíveis são produzidos por bactérias não adaptadas às elevadas salinidades quando submetidas a condições de estresse osmótico.

Agora, em relação a maior toxicidade de um cátion em relação a outro, em soluções mistas ou de apenas um sal, este fenômeno está possivelmente ligado à influência tóxica e/ou estimulante de determinado cátion na comunidade microbiana e às relações de sinergismo e antagonismo em relação aos outros íons presentes em solução. Os estudos do efeito tóxico de cátions em bactérias estão geralmente relacionados aos metais tóxicos Ag^{+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Hg^{2+}, Ni^{2+}, Pb^{2+} e Zn^{2+} (GRADD; GRIFFITHS,

1978; HALL, 2002; LEMIRE et al., 2013; SILVER, 1996; SILVER; PHUNG, 2005). Não foram encontrados na literatura trabalhos específicos que investiguem o mecanismo bioquímico de toxicidade do Na^{+}, Mg^{2+} e Ca^{2+} em comunidades microbianas nitrificantes e/ou desnitrificantes.

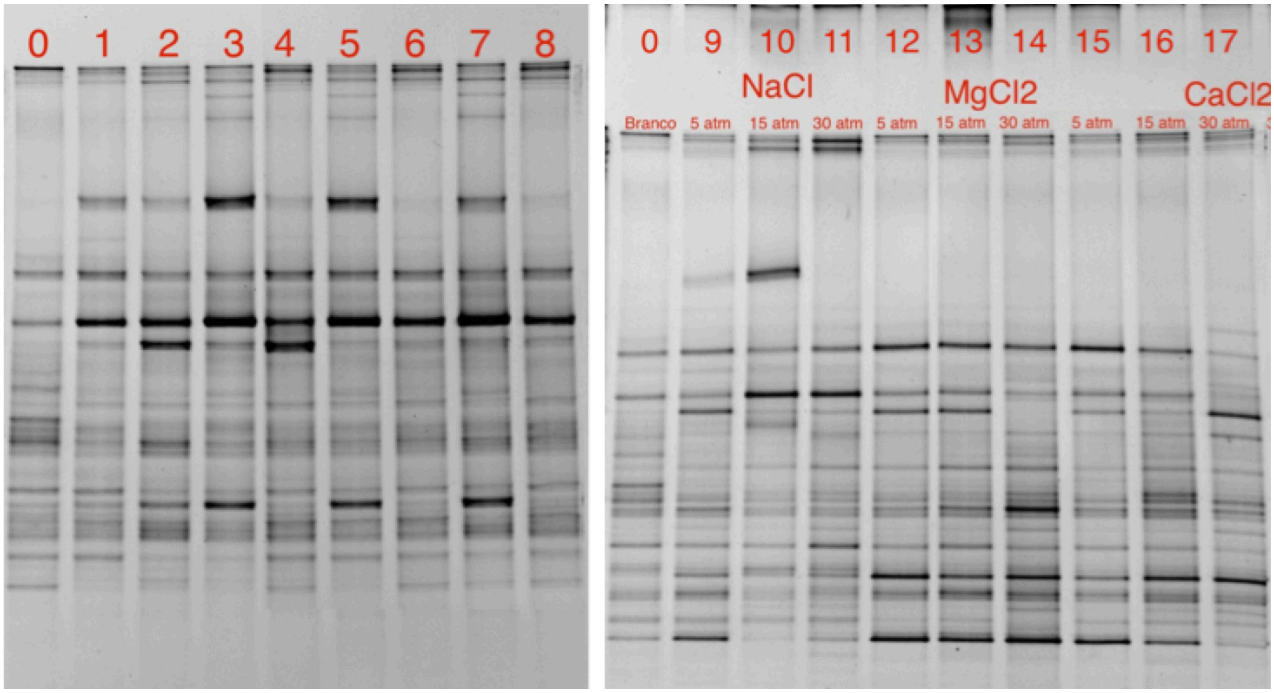
A toxicidade de metais em bactérias está geralmente relacionada à ligação do metal aos grupos sulfidril das proteínas das bactérias causando inibição da atividade microbiana ou afetando a estrutura proteica. Além disso, estes cátions podem causar a formação excessiva de radicais livres, causando um estresse oxidativo nas células procarióticas (HALL, 2001; LEMIRE et al., 2013). Com isso, estudos indicam que diferentes metais causam tipos distintos de lesões em células microbianas, como resultado de estresse oxidativo, disfunção de proteínas ou danos na membrana. Assim, os metais estudados para toxicidade microbiana e supracitados têm um comportamento possivelmente relacionado às atividades enzimáticas, interrompendo a função da membrana plasmática ou danificando o DNA (LEMIRE et al., 2013).

Com isso, é passível de conclusão que a maior resistência a determinados sais que a outros esteja relacionada com o efeito tóxico do sal em solução, à capacidade de osmoregulação microbiana e à composição proteica da membrana plasmática das bactérias.

5.1.4 Análises de biologia molecular das amostras do planejamento fatorial A e ensaios complementares de nitrificação

As populações bacterianas das bateladas foram comparadas por PCR/DGGE. Na Figura 14, referente aos ensaios do planejamento experimental (1-8) e aos ensaios complementares (0-17), observa-se que a estrutura das comunidades microbianas foi afetada pelas diferentes concentrações e composições das soluções.

Figura 14 - DGGE das amostras do planejamento experimental (1 - 8) e dos Ensaios Complementares (9 - 17) comparadas à biomassa do ensaio controle (0).



Fonte: Autoria própria.

A composição salina e a PO de cada condição experimental estão apresentadas na Tabela 14, para a melhor avaliação dos resultados a partir da imagem do gel de DGGE.

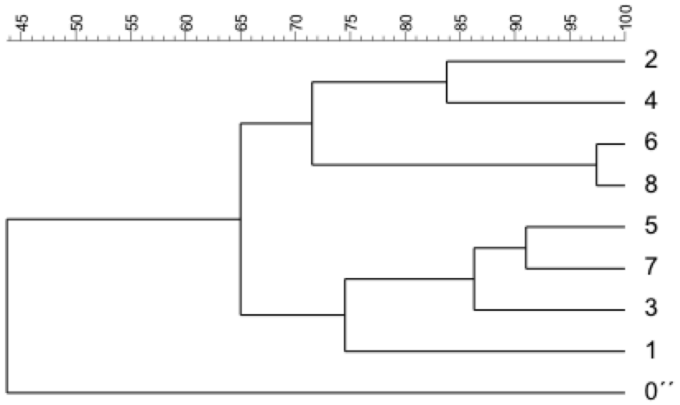
Tabela 14 - Características do meio reacional de cada condição experimental estudada e apresentadas no gel de DGGE da Figura 14.

Planejamento experimental					**Ensaios complementares**				
Condição experimental	NaCl ($g\ L^{-1}$)	$MgCl_2$ ($g\ L^{-1}$)	$CaCl_2$ ($g\ L^{-1}$)	Pressão osmótica (atm)	Condição experimental	NaCl ($g\ L^{-1}$)	$MgCl_2$ ($g\ L^{-1}$)	$CaCl_2$ ($g\ L^{-1}$)	Pressão osmótica (atm)
0	0	0	0	0	9	7,84	0	0	5
1	5	3	3	5,2	10	26,15	0	0	15
2	30	3	3	18,8	11	54,5	0	0	30
3	5	12	3	8,4	12	0	12,68	0	5
4	30	12	3	21,8	13	0	40,98	0	15
5	5	3	12	7,9	14	0	75,19	0	30
6	30	3	12	21,3	15	0	0	13,06	5
7	5	12	12	11	16	0	0	43,84	15
8	30	12	12	24,3	17	0	0	81,67	30

Fonte: Autoria própria.

A partir dos dendogramas gerados para cada gel, pode-se comparar a similaridade das populações de bactérias em cada uma das condições. O dendograma referente ao primeiro gel compara as amostras do planejamento fatorial A (Figura 15).

Figura 15 - Dendograma das amostras do planejamento experimental A (nitrificação) gerado a partir do gel de DGGE.



Fonte: Autoria própria.

A partir do dendograma da Figura 15 observa-se maior similaridade entre as condições 06 e 08 (97%), as quais possuem concentração máxima de NaCl e $CaCl_2$ e PO semelhantes (21,2 e 24,3 atm). No entanto, as $r_{Nmáx}$' via $N\text{-}NH_4^+$ são distintas, sendo a taxa da condição 06 superior a da condição 08. Esta diferença pode ser atribuída à baixa concentração do $MgCl_2$ que pode atenuar o efeito inibitório do NaCl por efeito antagônico e não favorecer um possível sinergismo (KULGEMAN; McCARTY, 1965; McCARTY; McKINNEY, 1961; McFARLANE, 1968). Também, as condições 05 e 07 que possuem 89% de similaridade entre si, são caracterizadas por possuírem concentrações mínimas de NaCl e máximas de $CaCl_2$, sendo diferenciadas, assim como as condições 06 e 08, apenas pela concentração de $MgCl_2$, e sendo a taxa de nitrificação da condição (05) também superior à da condição (07).

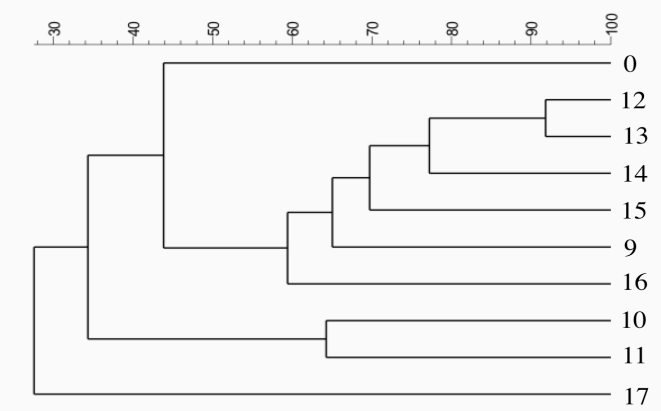
Este padrão indica que o magnésio é o elemento que expressa menor influência na diferenciação da estrutura microbiana, independente das concentrações dos outros fatores, no entanto, afeta significativamente a atividade dos microrganismos autotróficos.

Comparadas ao ensaio controle (0), observa-se que a estrutura microbiana de todas as condições de 01 a 08 possuem apenas 44% de similaridade com a biomassa inicial aos sistemas, evidenciando a influência dos sais na modificação da comunidade nitrificante. Ainda, o agrupamento por similaridade entre as condições pares (02, 04, 06 e 08) e ímpares (01, 03, 05 e 07) pode estar associada às concentrações de NaCl e à faixa

da PO, já que as condições 01, 03, 05 e 07 são caracterizadas pela concentração mínima de NaCl e por POs menores (variando entre 5,2 a 10,11 atm) e as condições 02, 04, 06 e 08 caracterizadas por concentrações de NaCl máximas e faixa de PO mais elevadas (18,8 a 24,3 atm).

Na Figura 16 é apresentado o dendograma referente ao gel dos ensaios complementares.

Figura 16 - Dendograma das amostras dos ensaios complementares de nitrificação gerado a partir do gel de DGGE.

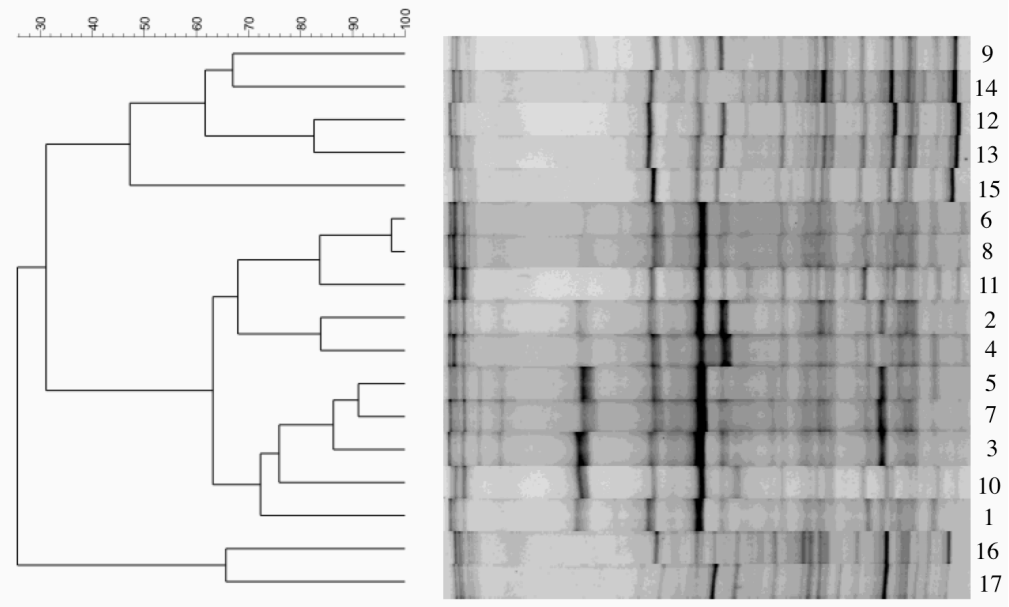


Fonte: Autoria própria.

Observa-se a partir do dendograma da Figura 16 que a similaridade entre a condições 12, 13 e 14 (grupo em que o $MgCl_2$ foi avaliado) é maior quando comparada aos grupos dos sais NaCl e $CaCl_2$. Isto mostra que, possivelmente, a seleção foi feita majoritariamente pela natureza do sal e não pela pressão osmótica aplicada ao sistema. Ainda, esta suposição se confirma ao se observar que para as mesmas pressões osmóticas de estudo, a similaridade com o ensaio controle é distinta para cada sal, sendo para PO de 30 atm, as similaridades de 44% ($MgCl_2$), 34% (NaCl) e 28% ($CaCl_2$).

Com a aplicação de traçadores nos dois geis da imagem da Figura 14, foi possível unir as imagens e avaliar a similaridade entre as amostras como um todo, como apresentado na Figura 17.

Figura 17 - Gel e dendograma das amostras dos ensaios do planejamento experimental A e ensaios complementares de nitrificação.

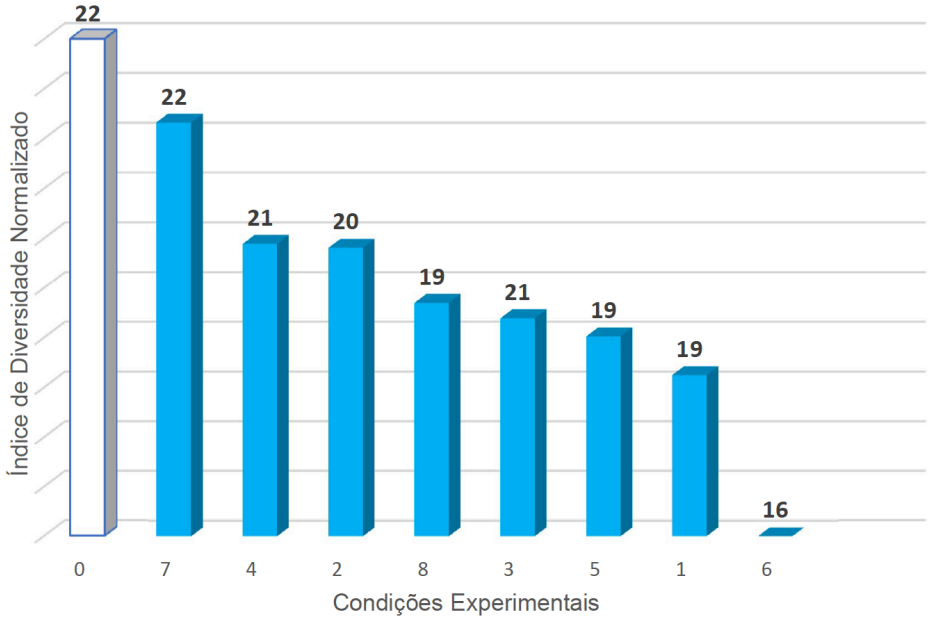


Fonte: Autoria própria.

Observa-se que os dois grupos de ensaios pares e ímpares descritos no primeiro dendograma mantiveram o mesmo padrão, mas com a incorporação da condição 10 (NaCl 15 atm) no grupo dos ímpares e da condição 11 (NaCl 30 atm) no grupo dos pares, indicando que a estrutura microbiana também é influenciada pela PO. Mais uma vez observa-se que os ensaios que continham apenas $MgCl_2$ mantiveram-se agrupados por similaridade independentemente da pressão osmótica, indicando que os organismos selecionados pelo magnésio são resistentes a diferentes POs.

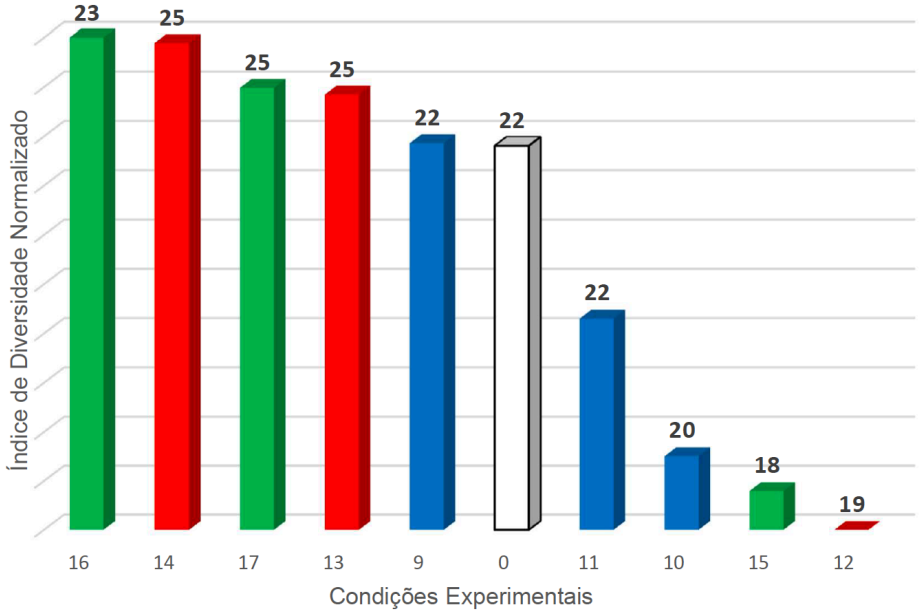
Os índices de diversidade (Shannon) e riqueza (Chao) foram calculados a partir do perfil de bandas do DGGE por meio do software Past® e variaram de 2,93 a 2,40 e de 16 a 25, respectivamente. Para a melhor observação destas variações entre condições experimentais, os índices foram normalizados de 0 a 1, em que 0 corresponde ao menor índice encontrado e 1 ao maior. As Figura 18 (planejamento experimental) e 19 (ensaios complementares) apresentam as condições experimentais dispostas da que continha maior índice de diversidade para a de menor. Ainda, o Índice Chao, que representa o número de bandas quantificadas, está disposto para cada condição na extremidade superior da representação de cada condição experimental.

Figura 18 - Representação dos índices de diversidade (Shannon) e riqueza (Chao) das populações bacteriana para as amostras do planejamento experimental A (nitrificação) em ordem decrescente.



Fonte: Autoria própria.

Figura 19 - Representação dos índices de diversidade (Shannon) e riqueza (Chao) das populações bacteriana para as amostras dos ensaios complementares de nitrificação. As colunas em azul são referentes aos ensaios com NaCl, vermelhas aos ensaios com $MgCl_2$ e verde aos ensaios com $CaCl_2$.



Fonte: Autoria própria.

Para as condições de eletrólitos mistos, observa-se que houve pouca variação da diversidade microbiana, com queda em relação ao ensaio controle, indicando seleção de

organismos resistentes às condições de salinidade. A condição 06 foi a de menor diversidade dentre as condições estudadas, com máximas concentrações de NaCl e $CaCl_2$ e concentração mínima de $MgCl_2$. Já para condição 07, o índice de diversidade foi maior em relação às outras condições, indicando que os cloretos de magnésio e cálcio, quando em soluções de eletrólitos mistos, exercem um efeito negativo menor na seleção de populações de bactérias.

Para os ensaios complementares, as condições 13, 14, 16 e 17, de pressões osmóticas de 15 e 30 atm, os índices de diversidades foram superiores às demais, inclusive ao ensaio controle. Apesar de uma tendência decrescente na riqueza de espécies faunísticas ser esperada com o aumento da salinidade em águas continentais, esse padrão parece ser menos reprodutível se aplicado a comunidades microbianas (BEN-DOV et al., 2008; HERLEMANN et al., 2011; WANG et al., 2011). No estudo desenvolvido por Wang et al. (2011), o objetivo foi investigar o padrão de distribuição de diversidade e riqueza microbiana em um gradiente de salinidade em Lagos do Tibete, na China, considerando-se as concentrações dos íons K^+, Na^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Cl^-, SO_4^-, CO_3^{2-}, HCO_3^- e de nitrogênio e fósforo total nas águas. O número de bandas nas análises de DGGE para os autores variou de 8 a 33 e relacionou-se positivamente a variação da diversidade com a salinidade dos ambientes e concentração de magnésio, assim como visto neste estudo, com variação no número de bandas de 16 a 25, sendo maior riqueza taxonômica observada para as condições mais extremas de salinidade.

Segundo Wang et al. (2011), não houve redução significativa na riqueza taxonômica do bacterioplâncton com o aumento da salinidade nos lagos investigados durante dois anos consecutivos. Os autores consideram que o aumento na riqueza de taxons pode ser uma consequência da maior disponibilidade de nicho para espécies halotolerantes e espécies de água doce em um nível intermediário de salinidade. Resultados seguindo a mesma tendência foram encontrados neste estudo já que, para os ensaios complementares, as condições de maior pressão osmótica para os cloretos de magnésio e cálcio tendem a possuir maior diversidade microbiana, superior ainda ao ensaio controle, o que não foi observado para as soluções de cloreto de sódio.

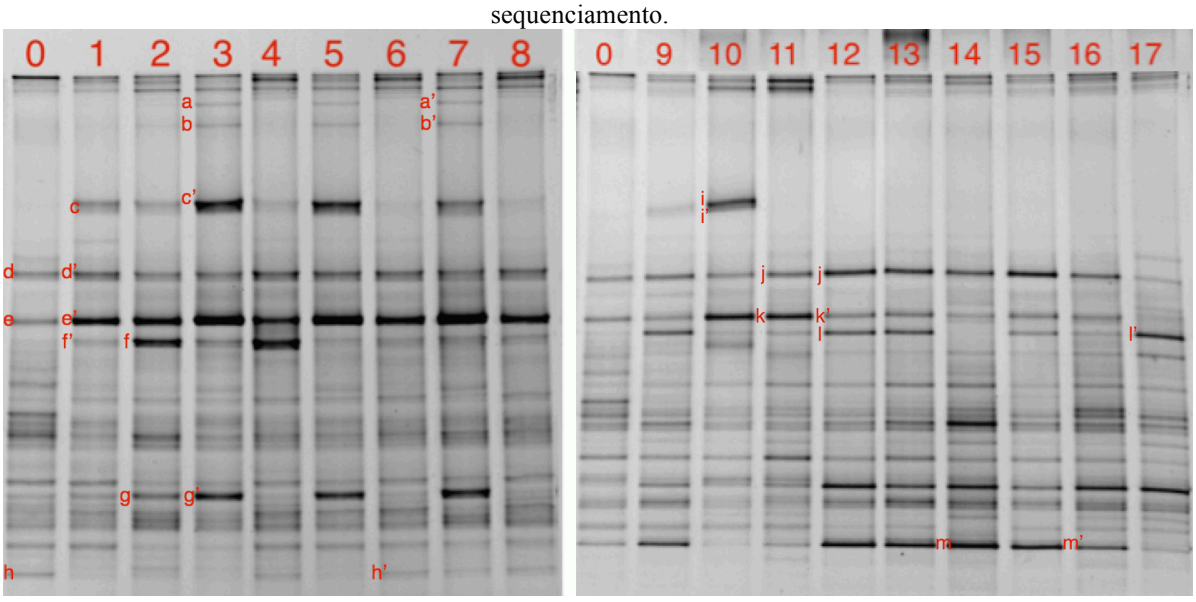
A flora bacteriana dos ambientes salinos é tão diversa quanto a sua contraparte de água doce. No entanto, as bactérias halotolerantes não definem necessariamente um

grupo de bactérias filogeneticamente relacionados, mas representam um grupo que evoluiu em muitos grupos diferentes de organismos. O amplo espectro inclui, por exemplo, as *Halomonas*, *Pseudomonas* e *Actinopolyspora* e toda uma gama de bastonetes e cocos Gram-positivos, como *Bacillus*, *Micrococcus* e *Salinicoccus* (GALINSKI; TRUPER, 1994; ZAHRAN, 1996).

5.1.5 Sequenciamento genético das bandas recortadas do gel de DGGE dos ensaios de nitrificação

Observou-se a partir dos géis da Figura 14 o aparecimento e intensificação de algumas bandas em determinadas condições. A fim de identificar as comunidades microbianas resistentes a determinadas concentrações e POs, foi feito o recorte e sequenciamento genético das bandas de interesse em duplicata, identificadas na Figura 20. A composição da salinidade e pressão osmótica de cada condição experimental foi apresentada na Tabela 14 do ítem '5.1.4 Análises de biologia molecular das amostras do planejamento fatorial A e ensaios complementares de nitrificação'.

Figura 20 – Identificação das bandas recortadas nos ensaios nitrificantes para identificação filogenética por sequenciamento.



Fonte: Autoria própria.

O sequenciamento resultou na identificação das populações de maior interesse para compreensão do processo de nitrificação. A Tabela 15 apresenta as bandas sequenciadas e suas respectivas similaridades com as sequências de microrganismos do

domínio *Bacteria* comparada com o banco genético Blast NCBI. As populações identificadas também estão representadas na árvore filogenética da Figura 21.

Tabela 15 - Identificação das populações do domínio *Bacteria* das bandas recortadas do gel de DGGE dos ensaios de nitrificação.

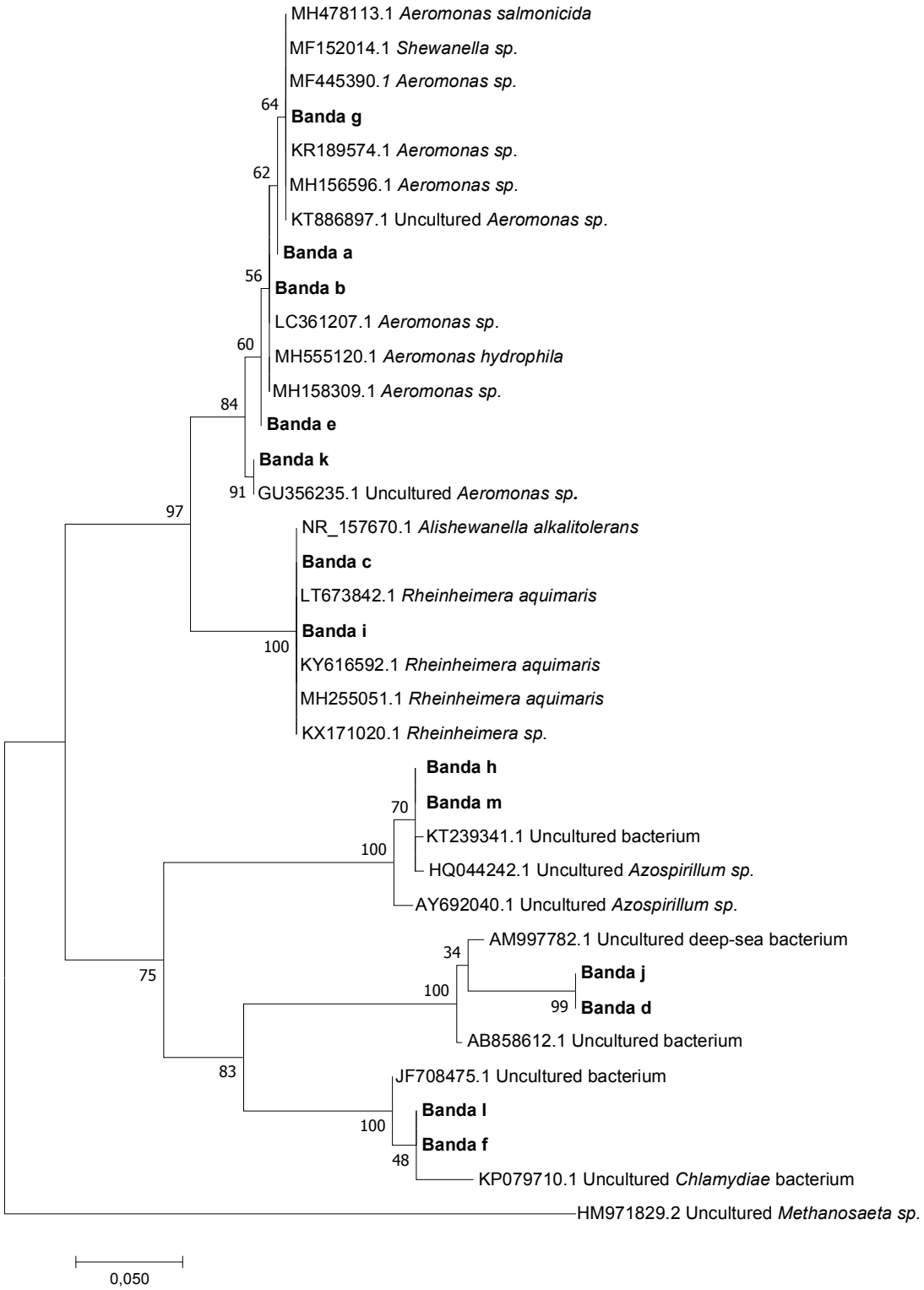
Banda	Microrganismo	Número de acesso	Similaridade (%)	Classificação taxonomica
a	*Aeromonas aquatic*	KX553919.1	100	*Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Aeromonadales; Aeromonadaceae; Aeromonas.*
b	Uncultured bacterium	KP797890.1	100	*Bacteria*; environmental samples.
c	*Alishewanella alkalitolerans*	NR_157670.1	100	*Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Alteromonadales; Alteromonadaceae; Alishewanella.*
d	Uncultured bacterium	LC276051.1	93	Bacteria; environmental samples.
e	*Aeromonas sp.*	MH158309.1	99	*Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Aeromonadales; Aeromonadaceae; Aeromonas.*
f	Uncultured bacterium	KM281168.1	100	Bacteria; amostra ambiental.
g	*Aeromonas sp.*	MF445390.1	100	*Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Aeromonadales; Aeromonadaceae; Aeromonas.*
h	Uncultured *Azospirillum sp.*	AY692040.1	98	*Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; Rhodospirillaceae; Azospirillum.*
i	*Rheinheimera aquimaris*	KY616510.1	100	*Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Chromatiales; Chromatiaceae; Rheinheimera.*
j	Bacterium enrichment	KM210542.1	94	Bacteria; amostra ambiental.
k	*Aeromonas sharmana*	KC469704.1	99	*Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Aeromonadales; Aeromonadaceae; Pseudaeromonas*

Conclusão

Banda	Microrganismo	Número de acesso	Similaridade (%)	Classificação taxonomica
l	Uncultured *Chlamydiae*	KP079710.1	99	*Bacteria; Chlamydiae*; environmental samples.
m	Uncultured *Azospirillum sp.*	HQ044242.1	99	*Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; Rhodospirillaceae; Azospirillum;* environmental samples.

Fonte: Autoria própria.

Figura 21 - Árvore filogenética dos microrganismos sequenciados referentes ao estudo de nitrific
(Uncultured *Methanosaeta sp.* foi usado como grupo externo).



Fonte: Autoria própria.

A maior parte das populações bacterianas identificadas estão relacionadas às classes *Gammaproteobacteria* e *Alphaproteobacteria*, corroborando os resultados de trabalhos que também avaliaram as caracteristicas filogenéticas da biomassa de sistemas de tratamento de águas residuárias salinas e também de ambientes naturais com elevada concentração de sais (DASSARMA; DASSARMA, 2006; QUARTAROLI et al., 2017; WANG et al., 2011, 2015; ZHAO et al., 2016).

As bandas identificadas pelas letras ***a*** e ***b*** estão presentes apenas nas condições 03, 05 e 07. A banda ***c***, que também se intensifica nestas condições, aperece também na condição experimental 01, bem como a banda ***g***. A sequência genética correspondente às bandas ***a***, ***b***, ***c*** e ***g*** possuem 100% de similaridade com os organismos *Aeromonas aquatica*, *Aeromonas* não cultivada, *Alishewanella alkalitolerans* e *Aeromonas sp*. As condições nas quais estes organismos aparecem ou intensificam a banda correspondente são condições de PO amenas (5 - 11 atm) em relação às outras condições e que possuem concentração de NaCl de 5 g L^{-1}.

As bandas ***d, e, j*** e ***k*** permaneceram presentes em todas as condições. Pela posição dos dois geis e pelo resultado do sequenciamento, as bandas ***d*** e ***e*** e as bandas ***j*** e ***k*** possivelmente pertencem ao mesmo gênero. Comparadas ao ensaio controle, nas condições de eletrólitos mistos, a banda ***e*** foi favorecida pela presença dos sais e nas condições de eletrólitos isolados, esta população foi favorecida por POs mais elevadas em solução de NaCl (15 e 30 atm), correspondentes às condicões 10 e 11. Isto indica maior resistência a este sal que aos demais compostos estudados e elevada adaptação a PO de condicões extremas, sendo cabível inferir que são bactérias halotolerantes. Estas bandas possuem 100% de similaridade com bactérias do gênero *Aeromonas*.

O gênero *Alishewanella* está associado a ambientes marinhos e de condições extremas (de temperatura, salinidade ou pH) (SISINTHY et al., 2017; TRIMARCO et al., 2006). As *Aeromonas*, por sua vez, estão geralmente associadas a ambientes aquáticos marinhos e de água doce, com a oxidação de nitrogênio amoniacal, desnitrificação heterotrófica convencional e também com a desnitrificação aeróbia de nitrato. Este gênero bacteriano é associado a sedimentos de ambientes aquáticos naturais e a grande versatilidade de adaptação (ABEYTA e WELKELL, 1998; CARTER et al., 1995). Estudos identificaram este gênero bacteriano como halotolerante, resistente à elevada

alcalinidade e relacionado à elevada capacidade de nitrificação autotrófica, heterotrófica e desnitrificação aeróbia (CHEN et al., 2014; DUAN et al., 2015; QUARTAROLI et al., 2017).

Também pelo posicionamento da banda e pela sequência genética identificada, supõe-se que as bandas ***f*** e ***l*** pertençam à mesma espécie. Estas bandas possuem 99% de similaridade com bactérias do gênero *Chlamydia*. Neste estudo essa população foi favorecida por elevadas POs, pela elevada concentração de NaCl quando em eletrólitos mistos e de $MgCl_2$ quando em soluções de eletrólitos isolados. Esta tendência pode indicar que bactérias deste gênero possuem alta versatilidade adaptativa e diferentes mecanismos de osmoregulação, a depender do meio. O filo *Chlamydiae* está amplamente relacionado a sistemas de lodos ativados para o tratamento de águas residuárias, geralmente associado a processos de nitrificação e desnitrificação simultânea, presente em ambientes aeróbios e anóxicos, o que corrobora com os resultados deste trabalho (FENG et al., 2018; JU et al., 2014; MOHAMED et al., 2010; QIU et al., 2016; YAN et al., 2016). Pode-se inferir que, apesar de não haver registros na literatura a respeito, estas bactérias são possivelmente halotolerantes e beneficiadas pela presença de magnésio.

As bandas ***h*** e ***m*** possuem 98% e 99%, respectivamente, de similaridade com bactérias do gênero *Azospirillum*. Neste estudo, para as soluções de eletrólitos mistos, estas bactérias foram favorecidas nas condições de elevada PO (condições 02, 04, 06 e 08), também caracterizadas pela concentração máximas de NaCl. Nas soluções com a presença de apenas um dos sais, essa população se intensificou em todas as condições de 5 atm e em todas as condições em que o eletrólito foi o $MgCl_2$, indicando que o magnésio é possivelmente o cátion menos tóxico dentre os estudados para as bactérias do gênero *Azospirillum*, e são beneficiadas por qualquer um dos sais em concentrações moderadas.

O gênero *Azospirillum* é comumente associado ao solo e à fixação de nutrientes, ao crescimento de plantas, a ambientes microaeróbios (TRIPATHI et al., 2002) e também à remoção de nitrogênio amoniacal e fósforo em sistemas de tratamento (WANG et al., 2015b). É sabido que para adaptar-se a meios com elevada PO, este gênero bacteriano acumula substâncias como glutamato, protina, glicina betaína e trealose (TRIPATHI et al., 1998) e que, apesar de estar geralmente associado à sensibilidade a estresse osmótico (HAMDIA; EL-KOMY, 1997; HAMDIA et al., 2004; SUHAIL; MAHDIA, 2011;

TRIPATHI et al., 2002), neste estudo mostrou-se tolerante a elevadas concentrações de diferentes sais. Suhail e Mahdia (2011) investigaram o efeito de diferentes sais em bactérias do gênero *Azospirillum* e concluíram que os sais obdecem a magnitude de inibição na seguinte ordem: NaCl > $CaCl_2$ > $MgCl_2$. Este resultado corrobora o obtido no prsente estudo.

Por fim, a banda ***i*** apresenta 100% de similaridade com bactérias *Rheinheimera aquimaris*. Esta banda foi identificada apenas na condição 09 e 10, indicando que este gênero bacteriano é favorecido pela presença de NaCl em concentração próxima à marinha, característica provavelmente relacionada à sua filogenia. Esse gênero bacteriano está amplamente relacionado a ambientes naturais com elevada salinidade, como regiões marinhas, nascentes termais, lagos hipersalinos e salmoras naturais (GASHEMI et al., 2010; MERCHANT et al., 2007; SCHMIDT et al., 2006; TEKERE et al., 2015; YOON et al., 2007). O gênero *Rheinheimera* também foi identificado em sistemas de tratamento de águas residuárias salinas para remoção de matéria orgânica e nitrogenada (OSAKA et al., 2008; CAPELLO et al., 2016).

PARTE II - Planejamento experimental e ensaios complementares para desnitrificação

5.2.1 Planejamento experimental para desnitrificação

Seguindo a mesma matriz experimental e os mesmos objetivos propostos para o desenvolvimento do planejamento fatorial e ensaios complementares de nitrificação, ensaios para avaliar a atividade desnitrificante heterotrófica foram desenvolvidos e estão discutidos nesta sessão.

O pH inicial de todos os ensaios foram padronizados conforme descrito nos métodos deste trabalho para uma faixa de 6,5 - 7 e foi medido ao fim do experimento e estando na faixa de 7 - 8,2. Não foi observada a formação de nenhum precipitado, assegurando a pressão osmótica inicial e disponibilidade reacional dos íons inorgânicos ao longo do experimento.

O monitoramento das concentrações de nitrito foi feito a fim de se determinar se houve ou não desnitrificação incompleta. No entanto, a concentração de nitrito manteve-se constante ou variando entre 0 - 2 mgN-NO_2^- L^{-1} ao longo do experimento em todos os ensaios. Como a concentração inicial de nitrato (NO_3^-) foi de aproximadamente 40 mg L^{-1} em todas as condições, as concentrações de nitrito nos sitemas foram desconsideradas para o cálculo da constante cinética da reação.

A variável resposta do planejamento experimental B e dos ensaios complementares desnitrificantes foi a taxa máxima de desnitrificação ($r_{DN\text{-}máx}$') (mgN-NO_3^- $gSSV^{-1}$ min^{-1}) e foi obtida como descrito nos métodos deste trabalho, também obedecendo cinética de primeira ordem por melhor representar o perfil temporal da concentração de nitrato. Ao contrário do observado neste trabalho, o comportamento linear do consumo de nitrato foi relatado em outros estudos cinéticos desenvolvidos para a obtenção da taxa da reação de desnitrificação (MOURA, 2011; 2014; SANTOS, 2014; SILVA, 2016).

A matríz experimental e as variáveis respostas estão dispostas na Tabela 16.

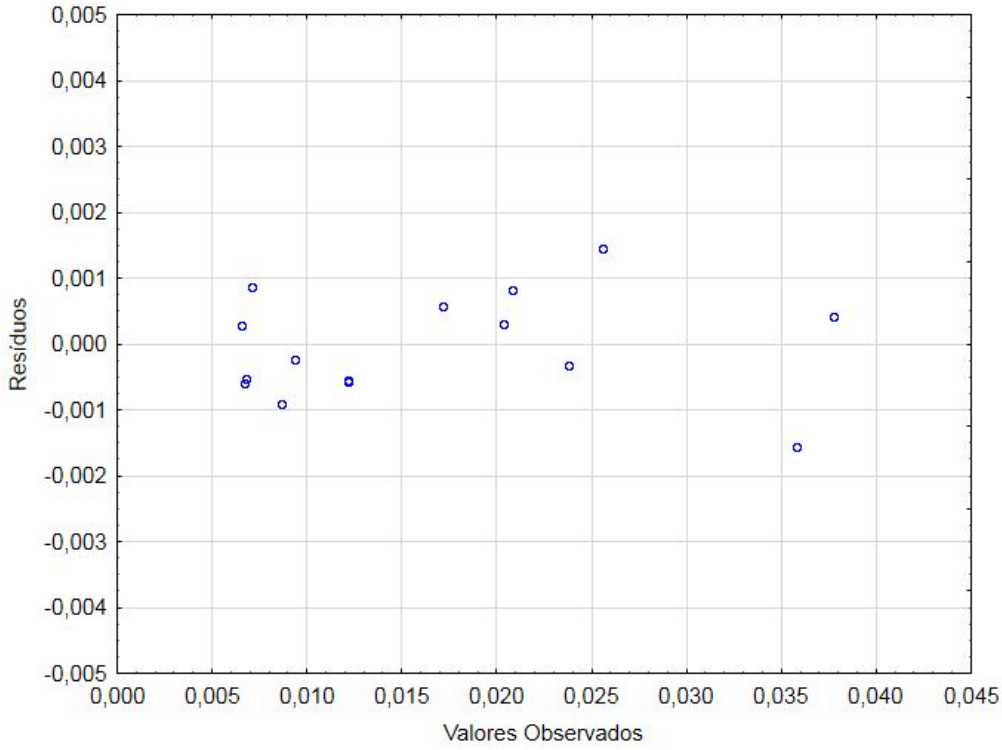
Tabela 16 - Matriz das condições experimentais e as respectivas respostas que compõe o planejamento experimental B (desnitrificação).

Condição	Variáveis Independentes			Variável resposta	Pressão osmótica (atm)
	NaCl	$MgCl_2$	$CaCl_2$	Taxa máxima de desnitrificação mgN $gSSV^{-1}$ min^{-1}	
				Réplica	
1	5	3	3	3.7×10^{-2}	5,2
2	30	3	3	1.7×10^{-2}	18,8
3	5	12	3	2.1×10^{-2}	8,4
4	30	12	3	9×10^{-3}	21,8
5	5	3	12	2.5×10^{-2}	7,9
6	30	3	12	6.8×10^{-3}	21,3
7	5	12	12	1.2×10^{-2}	11,0
8	30	12	12	6.8×10^{-3}	24,3

Fonte: Autoria própria.

A distribuição aleatória dos resíduos neste planejamento experimental pode ser observada no gráfico da Figura 22. Assim, compreende-se que a falta de ajuste ao modelo de regressão apresentado a seguir possivelmente se deve ao erro puro experimental.

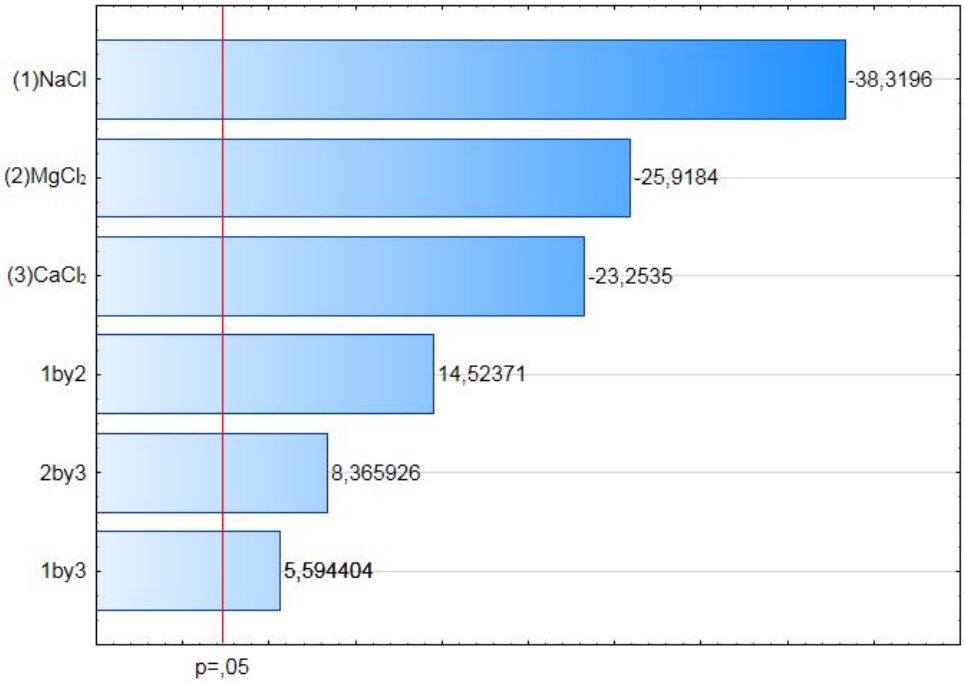
Figura 22 - Gráfico dos resíduos e valores observados para o planejamento experimental B (desnitrificação).



Fonte: Autoria própria.

A Figura 23 apresenta o gráfico de Pareto referente ao planejamento fatorial B que apresenta a significância estatística dos fatores estudados e a magnitude dos efeitos na variável resposta.

Figura 23 - Gráfico de Pareto para o Planejamento Experimental B.



Fonte: Autoria própria.

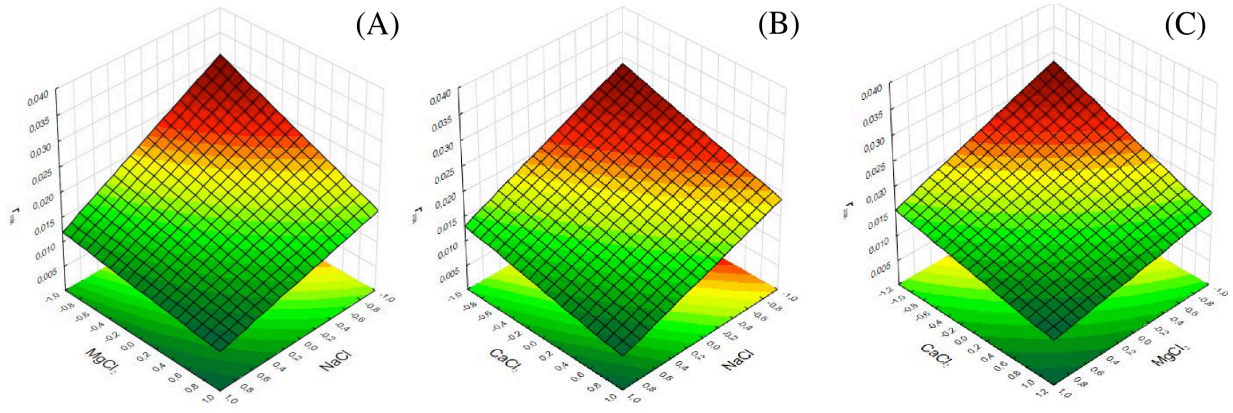
Por meio do gráfico de Pareto da figura 23, observa-se que todos os fatores estudados foram significativos, bem como a interação entre eles. Os cloretos de sódio, magnésio e cálcio, assim como no processo de nitrificação, afetam negativamente o processo, de forma semelhante quanto à magnitude do efeito, seguindo a ordem o cloreto de sódio (NaCl) (-38,32), o cloreto de magnésio ($MgCl_2$) (-25,92) e o cloreto de cálcio ($CaCl_2$) (-23,25). A interação entre os sais teve efeito positivo no sistema, sendo o efeito da interação entre NaCl e $MgCl_2$ (1by2) de maior magnitude, assim como observado para o planejamento fatorial A. Desta forma, assim como prosposto por diversos autores (FEIJOO et al., 1995; KULGEMAN; McCARTY, 1965; McCARTY; McKINNEY, 1961; McFARLANE, 1968), o efeito antagônico de um cátion divalente para com um monovalente foi observado para a comunidade microbiana desnitrificante por meio do efeito positivo das interações "1by2" (NaCl e $MgCl_2$) e "1by3" (NaCl e $CaCl_2$). Além disso, o possível efeito de sinergismo positivo entre cátions divalentes também foi

observado neste estudo para o planejamento experimental B, uma vez que a interação entre os sais $MgCl_2$ e $CaCl_2$ (2by3) também foi positiva.

Seguindo um padrão semelhante ao observado para as bactérias autotróficas nitrificantes, a inibição da atividade desnitrificante seguiu resultado diferente ao observado por Kulgeman e McCarty (1965), em relação a ordem da magnitude de inibição dos sais estudados, sendo o sódio o mais tóxico, seguido do cálcio e por fim, magnésio. Os autores citados realizaram seu estudo para bactérias anaeróbias, que desempenham atividade heterotrófica, assim como a desnitrificação avaliada neste trabalho.

Superfícies de resposta que relacionam graficamente o efeito dos fatores estudados estão apresentadas na Figura 24. Por meio destas superfícies, observa-se que quanto menor a concentração dos sais, indepentendemente da natureza deles, maior a taxa da reação e que os fatores influenciam a resposta de forma semelhante.

Figura 24 - Superfícies de resposta que mostra a resposta taxa máxima de desnitrificação via $N\text{-}NO_3^-$ ($r_{DN\text{-}máx}$) relacionando aos fatores NaCl e $MgCl_2$ (a), NaCl e $CaCl_2$ (b) e $MgCl_2$ e $CaCl_2$ (c).



Fonte: Autoria própria.

Com os resultados obtidos para cada condição experimental, um modelo matemático de regressão (equação 22) foi construído para relacionar a influência das concentrações dos sais na taxa da reação.

$$Y = 0{,}0167 - 0{,}0068.X_1 - 0{,}0046.X_2 - 0{,}0041.X_3 + 0{,}0026.X_1.X_2 + 0{,}001.X_1.X_3 + 0{,}0015.X_2.X_3 \quad (22)$$

Em que:

X_1 = concentração de NaCl normalizada para $-1 \leq X_1 \leq 1$

X_2 = concentração de $MgCl_2$ normalizada, para $-1 \leq X_2 \leq 1$

X_3 = concentração de $CaCl_2$ normalizada, para $-1 \leq X_3 \leq 1$

A significância estatística da regressão foi avaliada a partir da análise de variância (ANOVA) do modelo de regressão gerada utilizando o software Chemoface®. A ANOVA está apresentada na Tabela 17.

Tabela 17 - ANOVA para o efeito dos sais NaCl, $MgCl_2$ e $CaCl_2$ na taxa máxima específica de desnitrificação.

	SQ	**DF**	**MQ**	**F**	**p**
Regressão	$4{,}43 \times 10^{-4}$	6	$7{,}38 \times 10^{-5}$	44,86	$3{,}34 \times 10^{-6}$
Residual	$1{,}48 \times 10^{-5}$	9	$1{,}65 \times 10^{-6}$		0,001
Falta de ajuste	$1{,}12 \times 10^{-5}$	1	$1{,}12 \times 10^{-5}$	24,67	
Erro puro	$3{,}63 \times 10^{-6}$	8	$4{,}53 \times 10^{-7}$		
Total	$4{,}58 \times 10^{-4}$	15			
R^2	0,97				
R^2 explicável	0,99				

SQ – soma quadrática; DF – graus de liberdade; MQ – média quadática; F - valor da Função F; p - valor de p (intervalo de confiança de 95%). Fonte: Autoria própria.

O modelo de regressão seria estatisticamente significativo e preditivo já que a razão entre a MQ da regressão e a MQ dos resíduos (MQ_R/MQ_r) é pelo menos dez vezes maior que $F_{6,9}$. No entanto, o modelo não é bem ajustado aos dados experimentais, já que a razão entre a MQ da falta de ajuste e a MQ do erro puro MQ_{faj}/MQ_{ep} é maior que $F_{1,8}$. Isto mostra que, assim como para o modelo gerado a partir do planejamento fatorial A (nitrificação), um modelo linear não é o mais adequado para descrever a influência dos sais estudados no processo de desnitrificação, embora eles sejam fatores significativos para o processo. Isso sugere que um modelo polinomial de ordem superior a um possivelmente descreveriria melhor o comportamento da variável resposta em função dos fatores.

5.2.2 Ensaios complementares ao planejamento fatorial B (desnitrificação)

Ensaios complementares que avaliam diferentes POs para cada sal de estudo individualmente foram realizados, bem como um ensaio controle com os sais NaCl, $MgCl_2$ e $CaCl_2$ apenas em concentrações de macronutrientes. A matriz experimental e as respectivas respostas estão apresentadas na Tabela 18.

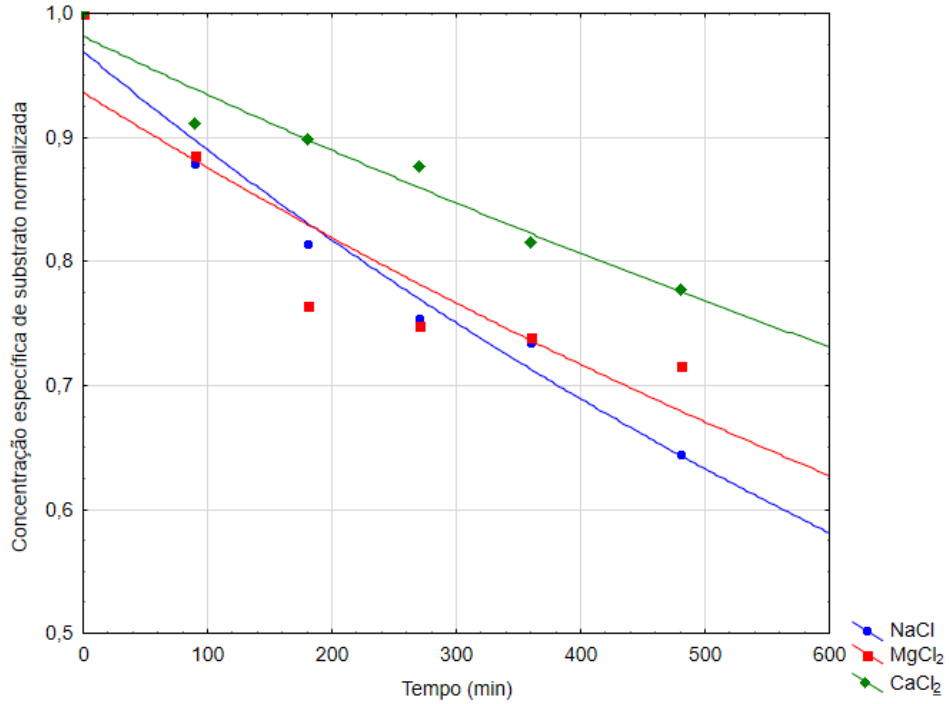
Tabela 18 - Composição do meio reacional e respectivas respostas obtidas nos ensaios complementares de desnitrificação utilizando acetato de sódio como fonte de doadores de elétrons.

Sal	Ensaio	Concentração ($g\ L^{-1}$)	Coeficiente de atividade	Pressão Osmótica (atm)	Taxa máxima de desnitrificação ($mgN\ gSSV^{-1}\ min^{-1}$)
Branco	0	-	-	-	$6{,}4\times10^{-2}$
NaCl	9	7,84	0,761	5	$4{,}3\times10^{-2}$
	10	26,15	0,687	15	$3{,}5\times10^{-2}$
	11	54,5	0,658	30	$2{,}1\times10^{-2}$
$MgCl_2$	12	12,68	0,512	5	$3{,}2\times10^{-2}$
	13	40,98	0,476	15	$2{,}7\times10^{-2}$
	14	75,19	0,519	30	$2{,}1\times10^{-2}$
$CaCl_2$	15	13,06	0,498	5	$1{,}8\times10^{-2}$
	16	43,84	0,446	15	$1{,}8\times10^{-2}$
	17	81,67	0,477	30	$5{,}9\times10^{-3}$

Fonte: Autoria própria.

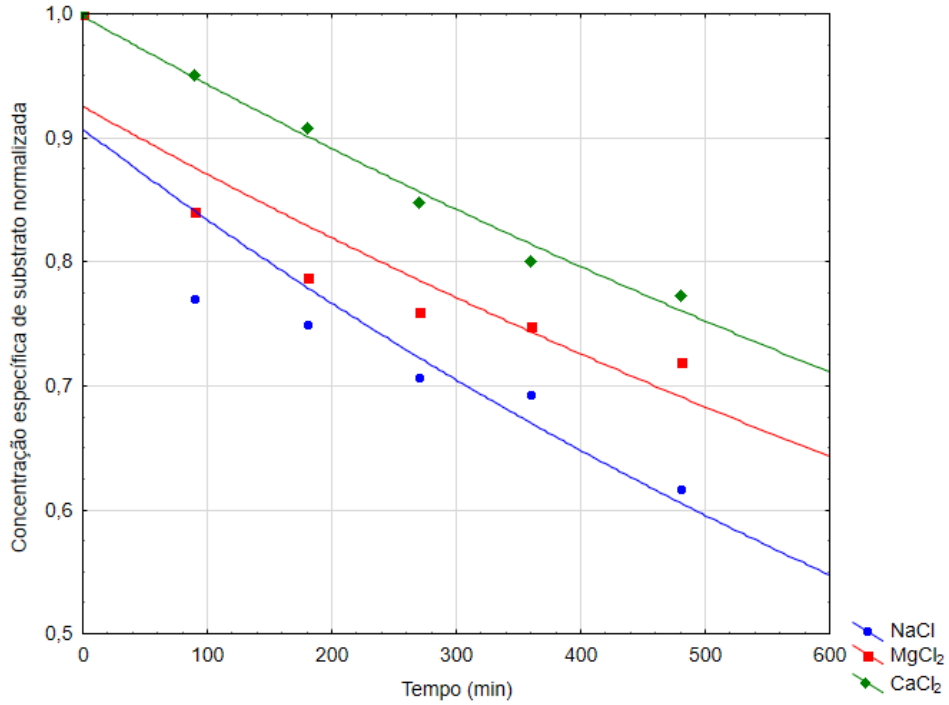
Com os resultados dos ensaios das condições 9 a 17, pode-se inferir que a natureza dos sais estudados exerce influência na atividade desnitrificante heterotrófica, já que para soluções isotônicas, $r_{DN\text{-}máx}$' distintas foram obtidas. Observou-se que o aumento da PO exerce inibição, porém, podendo estar associado à toxicidade dos íons. As figuras 25, 26 e 27 apresentam os gráficos que relacionam de forma normalizada a cinética de consumo do nitrato em solução para cada PO estudada nos diferentes sais.

Figura 25 - Consumo de NO_3^- na condição de pressão osmótica de 5 atm para os sais NaCl, $MgCl_2$ e $CaCl_2$.



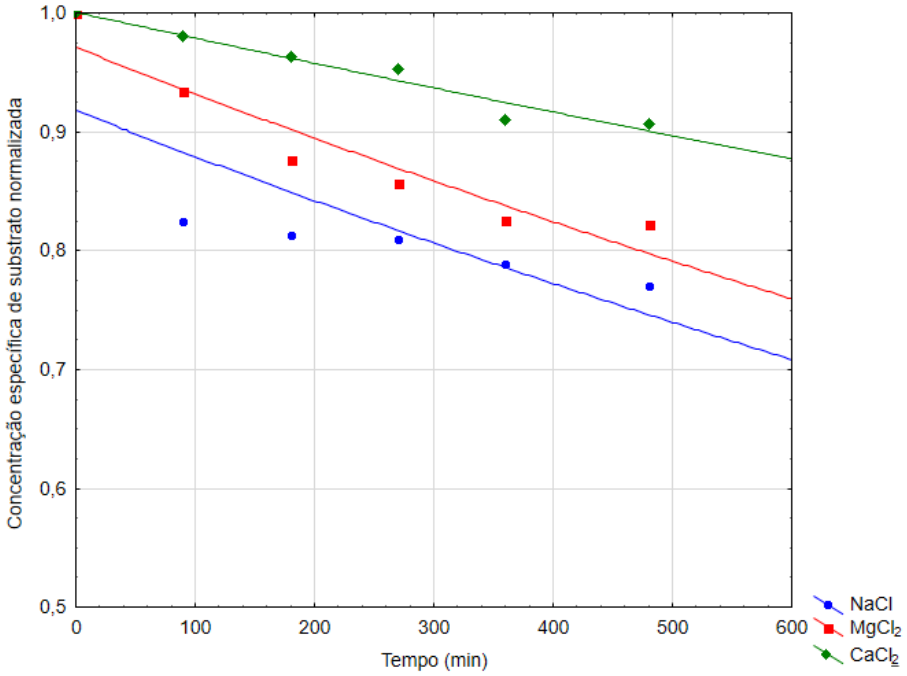
Fonte: Autoria própria.

Figure 26 - Consumo de NO_3^- na condição de pressão osmótica de 15 atm para os sais NaCl, $MgCl_2$ e $CaCl_2$.



Fonte: Autoria própria.

Figura 27 - Consumo de NO_3^- na condição de pressão osmótica de 30 atm para os sais NaCl, MgCl e $CaCl_2$.



Fonte: Autoria própria.

Observa-se por meio dos gráficos das Figuras 25, 26 e 27 que a cinética de consumo do substrato pela comunidade microbiana atuante é mais inibida pelo $CaCl_2$, seguido do $MgCl_2$ e, por fim, NaCl. O efeito da presença destes sais na PO de 5 atm reduziu a $r_{DN\text{-}máx}$ em, aproximadamente, 30, 50 e 70%, respectivamente, quando comparados ao ensaio controle.

Ainda, contrário ao observado para os ensaios do planejamento fatorial B (Figura 23) em que o NaCl é o sal de maior efeito negativo quando em solução de eletrólitos mistos, este mesmo sal é o menos inibidor em soluções de apenas um sal, quando comparado aos outros eletrólitos estudados.

Por meio dos gráficos das figuras 25, 26 e 27 e da Tabela 18 entende-se que a PO possivelmente exerce efeito inibidor na atividade microbiana, já que a taxa de consumo do nitrato diminui quando a pressão aumenta, porém a complexidade do mecanismo de inibição não permite que isto seja afirmado, já que a inibição pela natureza dos íons também é conhecida.

Para os ensaios com PO de 30 atm, observa-se que as mesmas constantes cinéticas foram obtidas para as condições com NaCl e $MgCl_2$, mas que para com $CaCl_2$, este parâmetro foi muito inferior, evidenciando mais uma vez a associação dos mecanismos de inibição, tanto pela pressão causada nas células microbianas quanto pela toxicidade específica do íon analisado.

Os ajustes à cinética de primeira ordem apresentados nos gráficos das figuras 25, 26 e 27 mostram que, caso o primeiro ponto fosse desconsiderado (ponto no minuto zero), os demais pontos seriam ajustados com maior precisão no modelo cinético (R^2 igual ou superior a 0,97). Isto ocorre pois nos 90 primeiros minutos, a comunidade microbiana consumiu a maior parte do substrato, caracterizando um comportamento cinético inicial, já que a inibição ocorreu mais efetivamente após esse período, evidenciando uma segunda cinética mais lenta. No entanto, ao desconsiderar o período dos 90 primeiros minutos, a compreensão do processo é modificada e não representa o que de fato ocorreu. Por este motivo, todos os pontos foram considerados para a obtenção da taxa máxima específica de desnitrificação em um único ajuste à cinética de primeira ordem, nos quais foram obtidos R^2 iguais ou superiores a 0,9. No ANEXO II deste trabalho, estão apresentados os gráficos considerando os dois comportamentos cinéticos que poderiam ser interpretados. A compreensão de um constante cinética inicial e uma secundária impossibilitaria a comparação entre os resultados obtidos para os sais, com os resultados do planejamento experimental e com os relatados na literatura.

Sugere-se que ao avaliar a inibição por sais, trabalhos futuros façam amostragens em curtos intervalos de tempo (a cada 15 minutos, por exemplo), nas duas primeiras horas. Assim, a cinética microbiana mediante a presença tóxica dos sais poderá ser melhor representada em um ajuste de cinética de inibição com a obtenção dos demais parâmetros que representam este modelo, como a constante de inibição (C_I).

5.2.3 Discussão geral dos resultados dos ensaios em batelada de desnitrificação

Quando comparadas as respostas obtidas para todas as bateladas referentes à desnitrificação heterotrófica, vê-se que embora as interações entre os sais possuam efeito positivo na variável resposta, em meios isotônicos (condições 01, 09, 12 e 15), a presença de apenas NaCl em solução é menos prejudicial à atividade metabólica desnitrificante

que a presença dos três sais de estudo na proporção estudada. Além disso, nas condições com apenas NaCl nas POs 5, 15 e 30, as $r_{DN\text{-}máx}$ obtidas foram superiores à maioria das respostas obtidas nas condições de eletrólitos mistos, independentemente da PO. Este fato é importante pois evidencia a necessidade de se investigar o efeito da salinidade composta por eletrólitos mistos, como presente na natureza, uma vez que o efeito da salinidade equivalente composta por apenas um sal é discordante. As $r_{DN\text{-}máx}$ das condições 01 e 09 (PO de 5 atm, aproximadamente), por exemplo, são $4{,}3\times10^{-2}$ e $3{,}7\times10^{-2}$ $mgN\text{-}NO_3^-\ gSSV^{-1}\ min^{-1}$. A presença de diferentes íons em concentrações tóxicas pode exigir maior complexidade no processo de adaptação e seleção microbiana, comparada à presença de apenas um sal, ainda que em mesma PO.

Quando comparados ao resultado da condição controle, a presença dos sais não foi benéfica ao sistema desnitrificante, diferentemente do observado para o processo de nitrificação. Possivelmente, o efeito de antagonismo proposto por McCarty e McKinney (1961) não foi superior ao efeito de sinergismo causado devido às elevadas concentrações dos sais, afetando comunidade bacteriana desnitrificante. A inibição causada pelo $CaCl_2$ nos ensaios para os sais individualmente foi a maior, assim como observado para a comunidade nitrificante. Todas as constantes cinéticas encontradas para os ensaios de 5 e 15 atm com apenas NaCl ou $MgCl_2$ (Tabela 18) foram superiores às encontradas para soluções de eletrólitos mistos (com excessão da condição 01) (Tabela 16). Isto mostra que possivelmente a comunidade microbiana heterotrófica é mais sensível à presença conjunta de diferentes cátions, ao sinergismo entre eles e à presença do cálcio, quando comparada à comunidade autotrófica nitrificante. Também, se ignorado o efeito tóxico específico dos íons, a capacidade de osmoregulação das bactérias heterotróficas é maior quando em soluções de apenas um sal, o que pode estar vinculado ao possível sinergismo negativo em soluções mistas.

Para as bactérias desnitrificantes heterotróficas, segue o mesmo raciocínio quanto à possível justificativa sobre o mecanismo de osmoregulação e da toxicidade específica dos diferentes cátions, discutida anteriormente para os ensaios de nitrificação, que são: pelo acúmulo de solutos compatíveis específicos para diferentes populações bacterianas, pela composição da membrana plasmática e pelas possíveis disfunções metabólicas causadas pelos cátions em solução, atingindo diferentemente cada população

(DASSARMA; DASSARMA, 2006; FUKUCHI, 2003; GALINSK; TRUPER, 1994; LEMIRE et al., 2013; LIPPERT; GALINSK, 1992; WOOD et al., 2001; ZAHRAN, 1996).

Nos trabalhos desenvolvidos por Moura (2014), Munch e Keller (1999) e Santos (2014), a constante cinética específica para o consumo de $N\text{-}NO_x$ no tratamento de efluentes não salinos semelhantes ao esgoto sanitário variou entre $5{,}0\times10^{-2}$ e $1{,}1\times10^{-1}$ $mgN\text{-}NO_x\ gSSV^{-1}\ min^{-1}$. Neste trabalho, a constante cinética para o ensaio controle, referente à capacidade de desnitrificação da biomassa utilizada como inóculo nos experimentos em batelada foi de $6{,}5\times10^{-2}$ $mgN\text{-}NO_3\ gSSV^{-1}\ min^{-1}$, indicando que possivelmente a biomassa contivesse poucas populações capazes de desnitrificar heterotroficamente em meio anóxico.

Panswad e Anan (1999) avaliaram o consumo específico de nitrato sob diferentes salinidades (em NaCl) em um sistem contínuo com unidades sequenciais anaeróbia/anóxica/aeróbia com recirculação e obtiveram para as salinidades de 0,5wt% (3 atm), 1wt% (6,3 atm) e 3wt% (17,6 atm) as constantes cinéticas de $5{,}5\times10^{-2}$; $4{,}2\times10^{-2}$ e $3{,}6\times10^{-2}$ $mgN\text{-}NO_3^-\ gSSV\ min^{-1}$, respectivamente. Os autores concentraram gradativamente o sal presente no sistema, pretendendo a adaptação da biomassa. Já neste trabalho, para condições 09, 10 e 11, com concentrações de 9 (5 atm); 26,15 (15 atm) e 54,5 (30 atm) $g\ L^{-1}$, respectivamente, foram obtidas as constantes de $4{,}3\times10^{-2}$; $3{,}5\times10^{-2}$ e $2{,}1\times10^{-2}$ $mgN\text{-}NO_3^-\ gSSV\ min^{-1}$.

A comparação destes resultados mostra que, possivelmente, a adaptação da biomassa à presença de sais não é fator decisivo na melhora do desempenho do processo de desnitrificação, o que pode estar relacionado ao fato da rápida adaptabilidade de determinadas populações e à seleção natural de outras.

Para Wang et al. (2015), a taxa específica de desnitrificação caiu de $7{,}1\times10^{-1}$ para $3{,}7\times10^{-1}$ $mgN\text{-}NO_3^-\ gSSV\ min^{-1}$ com o aumento da salinidade de 0 wt% para 5 wt% (28 atm) em NaCl. Os valores encontrados pelos autores *op. cit.* são superiores aos resultados deste trabalho, possivelmente devido à comunidade microbiana atuante nos sistemas. Ademais, os ensaios cinéticos desenvolvidos pelos autores tiveram concentração inicial de 303 $mgN\text{-}NO_3^-\ L^{-1}$ e avaliou-se o comportamento de uma comunidade em sistema de reator em bateladas sequenciais. No presente trabalho, a concentração inicial de $N\text{-}NO_3^-$

foi 40 mg L^{-1} e o ajuste cinético do perfil temporal da concentração de nitrato foi de primeira ordem, o que pode explicar a diferença entre os resultados deste trabalho e de Wang et al. (2015). Os autores não informaram o ajuste cinético aplicado no respectivo trabalho.

A existência de ambientes anóxicos e aeróbios possivelmente caracterizou o RC do qual a biomassa foi retirada para as bateladas realizadas neste trabalho. A formação de diferentes ambientes se deve ao biofilme aderido ao material suporte com a estratificação das colônias bacterianas. Ambientes com diferentes níveis de concentração de OD provavelmente favoreceram o estabelecimento de populações desnitrificantes capazes de co-utilizar os dois aceptores finais de elétrons disponíveis: O_2 e NO_3^- (HERNANDEZ et al., 1991; PATUREAU et al., 2000). Além disso, no tópico 5.2.5 do presente trabalho referente ao sequenciamento genético, foi identificado que parte das populações bacterianas sequenciadas estão relacionadas ao processo de desnitrificação aeróbia e de nitrificação heterotrófica.

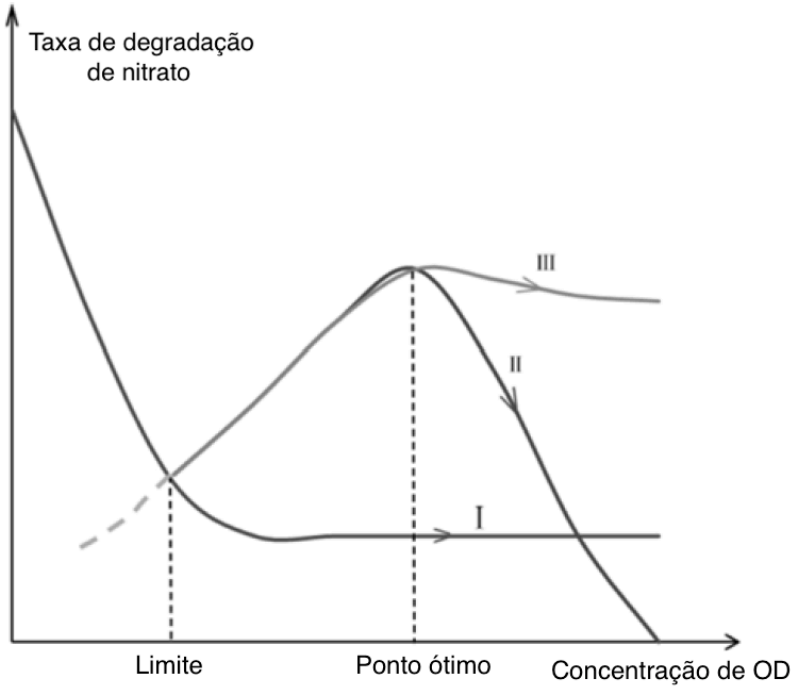
As condições ambientais do RC possivelmente caracterizaram uma comunidade microbiana adaptada para variações no nível de OD e a inoculação desta biomassa nas bateladas completamente anóxicas pode ter prejudicado o desempenho bacteriano pela brusca mudança do meio reacional. Apesar do efeito prejudicial da presença de OD estar comumente relacionado ao processo de desnitrificação, a co-respiração de nitrato e oxigênio é um mecanismo de evolução de bactérias desnitrificantes associado à ambientes com níveis instáveis de oxigênio, com a existência em um mesmo ambiente de porções anóxicas e aeróbias (HERNANDEZ et al., 1991; JI et al., 2014; PATUREAU et al., 2000).

Apesar do uso do oxigênio como aceptor final de elétrons ser termodinamicamente mais favorável que o uso do NO_3^-, a capacidade de desnitrificação aeróbica tem sido associada à expressão de uma enzima periplásma redutase do nitrato em vez da redutase ligada à membrana geralmente expressa em bactérias desnitrificantes anaeróbias, evitando o efeito inibitório do oxigênio. Estudos mostraram que o oxigênio é capaz de regular a respiração do nitrato por meio da inibição da síntese de enzimas como uma proteína semelhante à proteína FNR, que seria novamente ativada após uma

sequência de eventos, modificando o estado redox intracelular (HERNANDEZ et al., 1991; PATUREAU et al., 2000).

Na desnitrificação em meio aeróbio, as bactérias desnitrificantes são, via de regra, favorecidas pela diminuição da concentração de oxigênio dissolvido, no entanto, diferentes relações entre a taxa de redução do nitrato e a concentração de OD foram propostas na literatura (JI et al., 2015; PATUREAU et al., 2000). No gráfico apresentado na Figura 28, a taxa de desnitrificação pode estar relacionada à concentração de OD de três maneiras distintas, incluindo o efeito negativo da baixa concentração de oxigênio para bactérias que desempenham esta atividade em meio aeróbio. Como apresentado na figura 28, a rota II sugere que a taxa de redução de NO_3^- seja beneficiada pelo OD entre a concentração limítrofe e ponto ótimo. Já a rota III mostra que a taxa de desnitrificação é favorecida pelo aumento da concentração de OD até o ponto ótimo e que não é significativamente afetada para altas concentrações de OD.

Figura 28 - As três possíveis relações entre a degradação de NO_3^- e a concentração de oxigênio dissolvido (OD) : I - o aumento da concentração de OD afeta negativamente a degradação do NO_3^-; II - a concentração de OD é positiva para a degradação do NO_3^- em uma determinada faixa controlada e negativa quando superior ao ponto ótimo; III - a degradação DO NO_3^- é afetada positivamente pelo OD até o ponto ótimo e constante para concentrações de OD superiores à ótima.

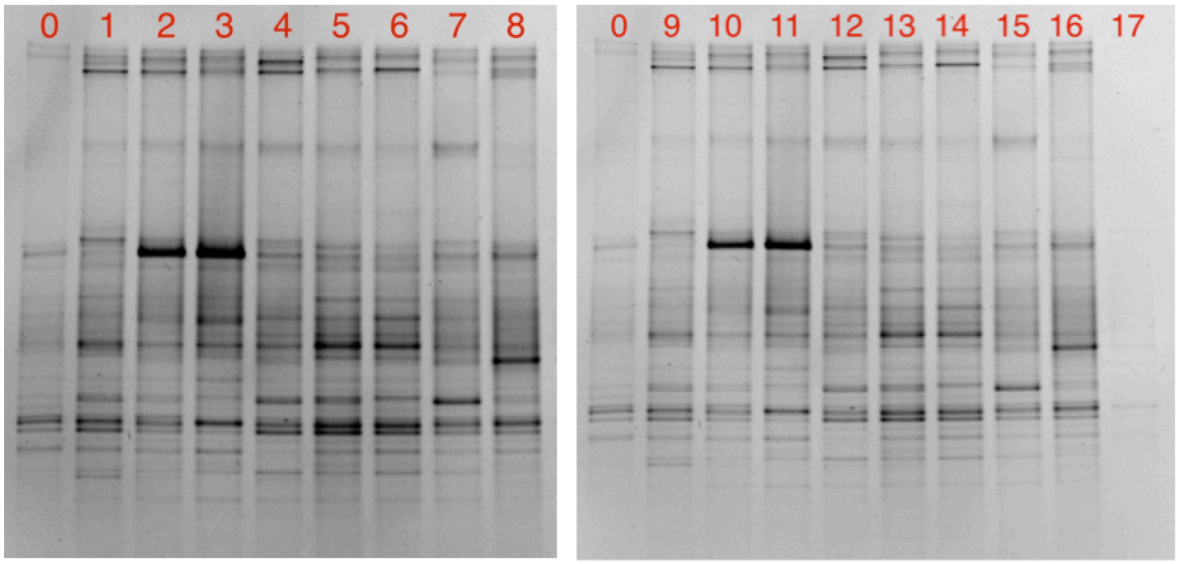


Fonte: JI et al. (2015).

5.2.4 Análises de Biologia Molecular das amostras do planejamento fatorial B e ensaios complementares de desnitrificação

Análises de biologia molecular foram realizadas para a biomassa presente em todos os ensaios de desnitrificação, seguindo o mesmo procedimento descrito para o estudo da nitrificação neste trabalho. Inicialmente, as populações bacterianas do planejamento fatorial B e dos ensaios complementares foram comparadas por PCR/DGGE. Na Figura 29, referente aos ensaios do planejamento fatorial (1 - 8) e aos ensaios complementares (0; 9 - 17), observa-se que a estrutura das comunidades microbianas também foi modificada pelas diferentes concentrações e composições das soluções quando comparadas à população bacteriana do ensaio controle (0).

Figura 29 - DGGE das amostras do planejamento experimental B (1 - 8) e dos ensaios complementares (9 - 17) de desnitrificação comparadas à biomassa do ensaio controle (0).



Fonte: Autoria própria.

A composição salina e a PO de cada condição experimental está apresentada na Tabela 19, para a melhor avaliação dos resultados a partir da imagem do gel de DGGE.

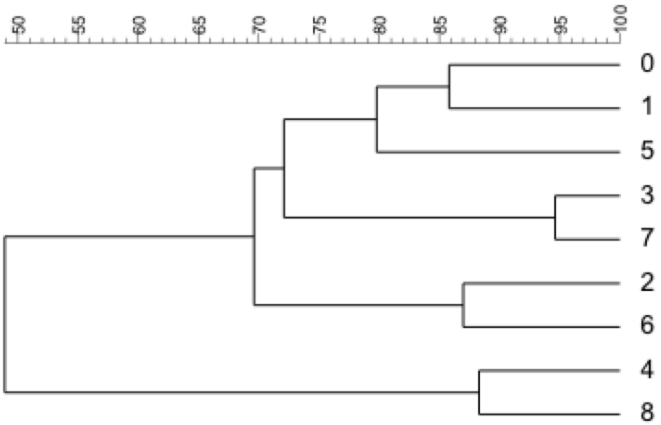
Tabela 19 - Caracteristicas do meio reacional de cada condição experimental estudada e apresentadas no gel de DGGE da Figura 29.

Planejamento experimental					Ensaios complementares				
Condição experimental	NaCl ($g\ L^{-1}$)	$MgCl_2$ ($g\ L^{-1}$)	$CaCl_2$ ($g\ L^{-1}$)	Pressão osmótica (atm)	Condição experimental	NaCl ($g\ L^{-1}$)	$MgCl_2$ ($g\ L^{-1}$)	$CaCl_2$ ($g\ L^{-1}$)	Pressão osmótica (atm)
0	0	0	0	0	9	7,84	0	0	5
1	5	3	3	5,2	10	26,15	0	0	15
2	30	3	3	18,8	11	54,5	0	0	30
3	5	12	3	8,4	12	0	12,68	0	5
4	30	12	3	21,8	13	0	40,98	0	15
5	5	3	12	7,9	14	0	75,19	0	30
6	30	3	12	21,3	15	0	0	13,06	5
7	5	12	12	11	16	0	0	43,84	15
8	30	12	12	24,3	17	0	0	81,67	30

Fonte: Autoria própria.

O dendograma referente ao primeiro gel (condições 1 a 8 e condição controle 0) dos ensaios de desnitrificação compara as amostras do planejamento fatorial B e está apresentado na Figura 30. Por meio deste gráfico, pôde-se comparar a similaridade da estrutura microbiana entre as condições experimentais.

Figura 30 - Dendograma das amostras do planejamento experimental B.



Fonte: Autoria própria.

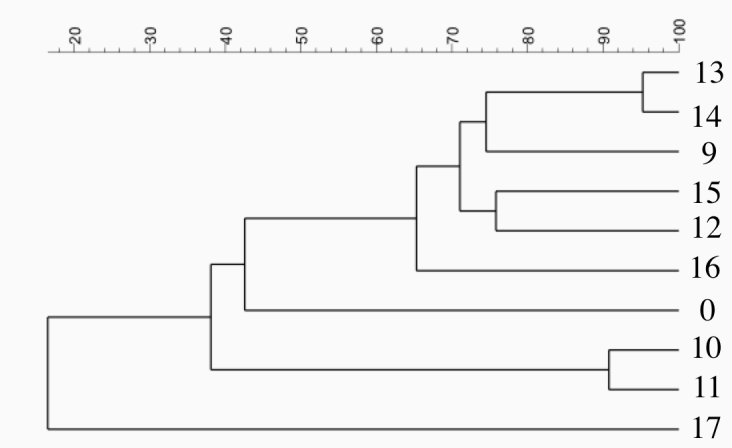
A partir do dendograma (Figura 30) observa-se maior similaridade entre as condições 03 e 07 (94%), as quais possuem concentração mínima de NaCl e máxima de $MgCl_2$, diferindo apenas nas concentrações de $CaCl_2$. As taxas de desnitrificação destas condições são distintas, sendo a da condição 03 superior à da condição 07, indicando que

o $CaCl_2$ apesar de influenciar a atividade metabólica, não modifica a estrutura das comunidades microbianas tanto quanto os outros sais estudados.

Outras duplas com elevada similaridade microbiana são as condições 02 e 06 (87%) e as condições 04 e 08 (88%). Para ambos os pares, ocorre um padrão similar ao descrito para as condições 03 e 07, em que as concentrações de NaCl e $MgCl_2$ são iguais em cada par e apenas a concentração de $CaCl_2$ é distinta. Considerando-se que as pressões osmóticas das quatro condições (02, 04, 06 e 08) são similares, mais uma vez é evidenciada a influência dos cloretos de sódio e magnésio na diferenciação das populações microbianas e da influência negativa do cloreto de cálcio na atividade microbiana, já que as constantes cinéticas das condições com concentração mínima deste fator são superiores às de concentração máxima.

A Figura 31 apresenta o dendograma referente ao gel de DGGE dos ensaios complementares de desnitrificação.

Figura 31 - Dendograma das amostras dos ensaios complementares de desnitrificação.



Fonte: Autoria própria.

Nas condições de 15 e 30 atm para os sais NaCl e $MgCl_2$ verifica-se elevada similaridade entre as populações de bacterias (Figura 31), sendo de 90% para as condições 10 e 11 (NaCl) e de 95% para as condições 13 e 14 ($MgCl_2$). Isto indica que as populações resistentes a cada um destes sais sofrem inibição na atividade metabólica, mas permanecem se multiplicando. Assim, as estruturas microbianas são semelhantes, porém as constantes cinéticas são distinas.

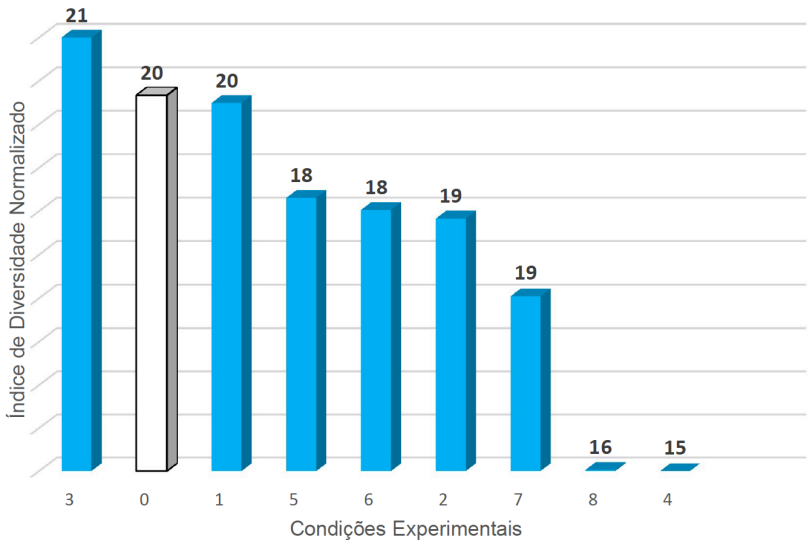
Ao comparar as condições 11 (NaCl) e 14 ($MgCl_2$), as quais possuem a mesma $r_{DN\text{-}máx}$ de $2{,}1\times10^{-2}$ mgN $gSSV^{-1}$ min^{-1}, observa-se que a similaridade entre as estruturas

microbianas é de apenas 38%. Este fato indica que para a comunidade microbiana estudada, o fator de seleção das populações predominantemente é a toxicidade específica dos íons, pois apesar da mesma constante cinética ter sido obtida para a mesma PO, a composição da comunidade microbiana é distinta.

Nas condições 15, 16 e 17, em que o sal estudado é o cloreto de cálcio, observa-se que as condições possuem baixa similaridade entre si e comparadas ao ensaio controle. Como visto para o estudo da nitrificação, o cloreto de cálcio mostrou-se ser o sal que causa maior inibição e seleção de comunidades microbianas.

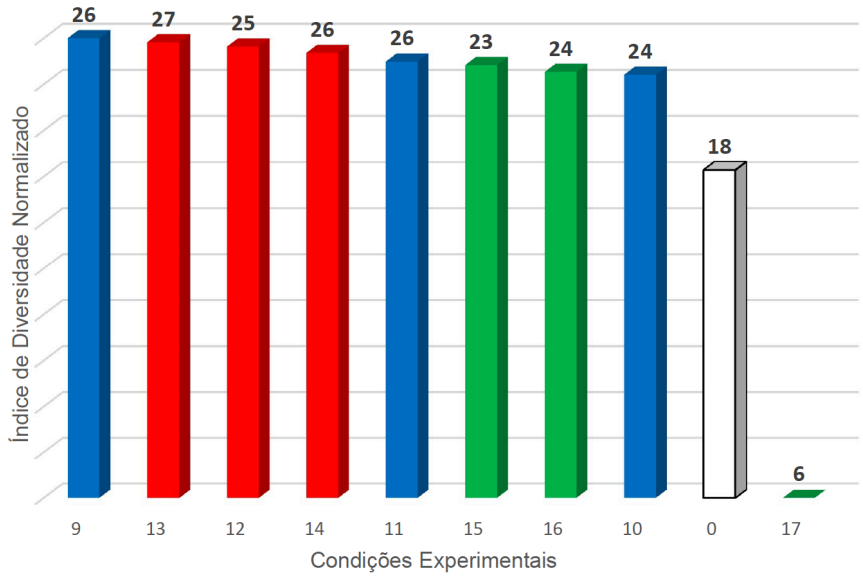
A partir das curvas densiométricas do perfil das bandas do DGGE, os índices de diversidade e riqueza (Shannon-Winer e Chao) foram calculados por meio do software Past® e relacionados graficamente. A Figura 32 mostra os índices de diversidade das amostras de eletrólitos mistos (planejamento fatorial B) com seus respectivos números de bandas, que representam o Índice de riqueza (Chao), e a Figura 33 apresenta o gráfico dos índices Shannon e Chao para as amostras das condições dos ensaios complementares desnitrificação. Os índices estão dispostos de forma normalizada e decrescente onde a base para normalização foi a amplitude do Índice de Shannon, que variou de 2,84 (1) a 1,66 (0).

Figura 32 - Relação entre os índices de diversidade e riqueza bacteriana para as amostras do planejamento experimental B (desnitrificação). A composição do meio de cada condição está descrita na Tabela 19.



Fonte: Autoria própria.

Figura 33 - Relação entre os índices de diversidade e riqueza bacteriana para as amostras dos ensaios complementares de desnitrificação. Os ensaios em azul são com NaCl, os em vermelho são com $MgCl_2$ e os em verde são com $CaCl_2$. A composição do meio de cada condição está descrita na Tabela 19.



Fonte: Autoria própria.

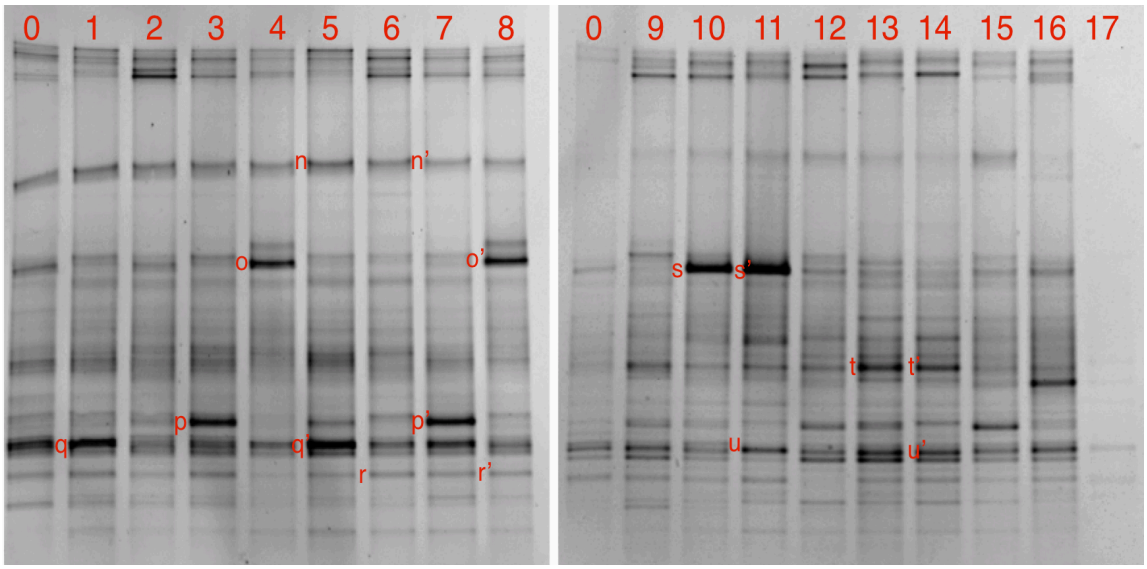
Para o primeiro grupo (Figura 32), observa-se que não há grande variação na diversidade microbiana quando comparados ao ensaio controle. Os ensaios 05, 06, 07 e 08 seguem uma tendência de menor riqueza e diversidade e são caracterizados por possuirem concentração máxima de $CaCl_2$, diferentemente dos quatro primeiros ensaios. Com isso, supõe-se que mesmo em soluções de eletrólitos mistos, este sal possui maior influência na modificação da estrutura da comunidade bacteriana por meio de seleção de organismos específicos. Para o segundo grupo (Figura 33), não há variação significativa na diversidade microbiana.

Mais uma vez, quando comparados ao ensaio controle, e observando a amplitude da variação dos índices de diversidade, estes resultados corroboram com o descrito por outros autores a respeito da não redução significativa na riqueza taxonômica com o aumento da salinidade e do indicativo de que a flora bacteriana dos ambientes salinos seja tão diversa quanto a flora de ambientes de água doce (BEN-DOV et al., 2008; GALINSK; TRUPER, 1994; HERLEMANN et al., 2011; ZAHRAN, 1996; WANG et al., 2011).

5.2.5 Sequenciamento genético das bandas recortadas do gel de DGGE dos ensaios de desnitrificação

Para identificar as populações desnitrificantes resistentes às condições extremas de salinidade, foi feito o recorte das bandas de interesse para sequenciamento genético. As bandas recortadas em duplicata para sequenciamento estão identificadas na Figura 34. A composição da salinidade e pressão osmótica de cada condição experimental está apresentada na Tabela 19 do ítem '5.2.4 Análises de biologia molecular das amostras do planejamento experimental B e ensaios complementares de desnitrificação'.

Figura 34 - Bandas recortadas e sequenciadas geneticamente referente aos ensaios de desnitrificação heterotrófica com acetato de sódio como fonte de doador de elétrons.



Fonte: Autoria própria.

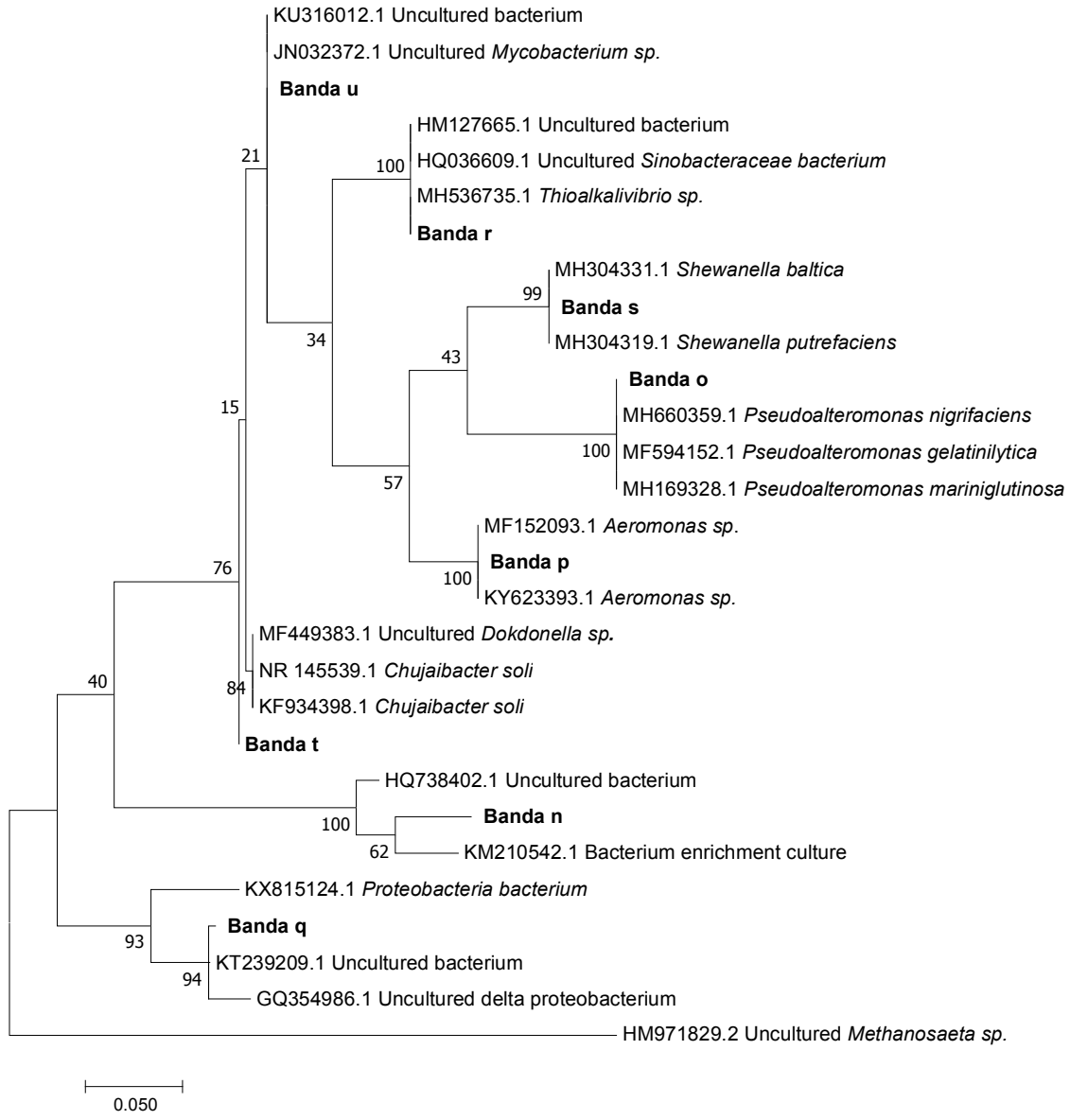
O sequenciamento resultou na identificação das populações de maior interesse para compreensão do processo de desnitrificação. Na Tabela 20 se apresentam as bandas sequenciadas de microrganismos do domínio *Bacteria* relatados no banco genético Blast NCBI e na Figura 35 apresenta-se a árvore filogenética bacteriana.

Tabela 20 - Identificação das populações do domínio *Bacteria* das bandas recortadas do gel de DGGE dos ensaios de desnitrificação.

Banda	Microrganismo	Número de acesso	Similaridade (%)	Classificação taxonomica
n	Uncultured bacterium	HQ738402.1	94	*Bacteria*; environmental samples.
o	*Pseudoalteromonas nigrifaciens*	MH660359.1	100	*Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Alteromonadales; Pseudoalteromonadaceae; Pseudoalteromonas.*
p	*Aeromonas sp.*	KY623393.1	99	*Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Aeromonadales; Aeromonadaceae; Aeromonas.*
q	*Proteobacteria bacterium*	KX815124.1	93	*Bacteria; Proteobacteria.*
r	*Thioalkalivibrio sp.*	MH536735.1	100	*Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Chromatiales; Ectothiorhodospiraceae; Thioalkalivibrio.*
s	*Shewanella baltica*	MH304331.1	100	*Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Alteromonadales; Shewanellaceae; Shewanella.*
t	*Chujaibacter soli*	NR_145539.1	99	*Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Xanthomonadales; Xanthomonadaceae; Chujaibacter.*
u	*Uncultured Mycobacterium sp.*	JN032372.1	100	*Bacteria; Actinobacteria; Corynebacteriales; Mycobacteriaceae;Mycobacterium; environmental samples.*

Fonte: Autoria própria.

Figure 35 - Árvore filogenética dos microrganismos identificados referentes aos ensaios de desnitrificação (Grupo externo: *Methanosaeta sp*.).



Fonte: Autoria própria.

As bactérias identificadas pertencem às classes *Actinobacteria*, *Gammaproteobacteria* e *Deltaproteobacteria*. Bactérias dos gêneros *Actinobacter*, *Pseudomonas* e *Proteobacteria* foram isoladas por outros autores em amostras de ambientes de águas e solos salinos e são descritas pela capacidade de osmoregulação (ZAHRAN et al., 1997). Schauer et al. (2010) examinaram comunidades bacterianas em

três bacias do leste do Oceano Atlântico Sul para determinar a diversidade e biogeografia de comunidades bacterianas em sedimentos superficiais de águas profundas e identificaram em todos os três pontos bactérias das classes *Gammaproteobacteria* e *Deltaproteobacteria*, os quais compreendem a maioria das populações identificadas por sequenciamento neste trabalho. Estas classes bacterianas são dominantes em sistemas de tratamento de esgoto sanitário, estando relacionadas à desnitrificação heterotrófica convencional (YE; ZHANG, 2013). Ainda, Ji et al. (2015) propuseram uma árvore filogenética que relaciona diferentes filos de bactérias desnitrificantes aeróbias, dentre elas estão bactérias do gênero *Actinobacteria* e *Pseudomonas*.

A banda ***u*** esteve presente em todas as bateladas dos ensaios complementares, próxima da banda ***q***. Esta afirmação pode ser feita a partir da análise comparativa da amostra referente ao ensaio controle presente nos dois geis. A banda ***u*** possui 100% de similaridade com bactérias do gênero *Mycobacterium*, o qual possui diversas espécies identificadas em sistemas de tratamento de esgoto sanitário convencional e salino e está também relacionado à degradação aeróbia de compostos orgânicos recalcitrantes (CYDZIK-KWIATKOWSKA; ZIELINSKA, 2016; FRITSCHE; HOFRICHTER, 2005; YE; ZHANG, 2013). Espécies de *Mycobacterium* estão também fortemente relacionadas a ambientes lacustres eutrofizados, sedimentos de maguezais e regiões marinhas (JACOBS et al., 2009; LU et al., 2011).

A banda ***r*** também permaneceu em todas as condições testadas e possui 100% de similaridade com bactérias *Thioalkalivibrio sp.* Bactérias deste gênero são quimiolitoautotróficas e obrigatoriamente haloalcalifílicas, identificadas em estuários e relacionadas à atividade de desnitrificação em sedimentos com baixas concentrações de oxigênio dissolvido. São também relacionadas à oxidação de enxofre e à desnitrificação autotrófica, isoladas geralmente de ambientes marinhos (GUEVARA et al., 2014; POPINAKO et al., 2016; SOROKIN et al., 2001, 2003, 2018).

Bactérias do gênero *Shewanella* estão relacionadas a diversas atividades biológicas como a desnitrificação e a amonificação. Ainda, estas populações são capazes de crescer em meio anóxico a partir da fermentação de compostos orgânicos ou da respiração utilizando aceptores de elétrons como o nitrato e nitrito, tiossulfato e óxido ferroso. Este gênero foi encontrado tanto em sistemas de tratamento de águas residuárias

por lodos ativados, quanto em ambientes naturais com temperatura e salinidade equivalente à da água do mar (HOLT et al., 2005; NICHOLS et al., 2000; XU et al., 2005, YOON et al., 2014). A banda ***s*** possui 99% de similaridade com a bacteria *Shewanella baltica* e está presente em todas as condições testadas, porém intensificou-se nas condições 10 e 11, caracterizadas pela concentração de NaCl, indicando que bactérias deste gênero são possivelmente halotolerantes e beneficiadas pela presença desse sal.

A banda ***o*** destaca-se pela intensidade nas condições 04 e 08, que possuem elevadas POs e concentrações máximas dos cloretos de sódio e magnésio. Esta banda possui 100% de similaridade com bactérias do gênero *Pseudoalteromonas*, como a espécie *Pseudoalteromonas mariniglutinosa.* Diversas espécies deste gênero são classificadas como halotolerantes e resistêntes a metais tóxicos além de possuirem respostas positivas à influência de ambientes marinhos (IVANOVA et al., 1998; ZAGHMOURI et al., 2018; ZHUANG et al., 2010). Patrauchan et al. (2005) avaliaram a influência de íons Ca^{2+} em bactérias deste gênero e concluíram que o cálcio provoca mudanças globais nos perfis de proteínas celulares e extracelulares de *Pseudoalteromonas sp.* e que essas mudanças são mais pronunciadas quando a bactéria cresce em biofilmes do que quando cresce em cultura planctônica. *Pseudoalteromonas* são geralmente isoladas de ambientes marinhos e responsáveis por boa parte da desnitrificação que ocorre em zonas anóxicas e de baixas concentrações de oxigênio em sedimentos profundos do mar (BOWMAN et al., 1998; BRETTAR et al., 2001; GAO et al., 2011).

Nas condições 03 e 07 observa-se a presença intensa da banda ***p***. Estas condições são caracterizadas por POs amenas, semelhantes a de ambientes marinhos e com concentração máxima de estudo para o cloreto de magnésio. Esta banda possui 99% de similaridade com bactérias do gênero *Aeromonas,* também identificadas nos ensaios de nitrificação. Como descrito anteriormente, estas bactérias estão presentes marjoritariamente em ambientes aquáticos de águas salinas e doces e desempenham atividades importantes quanto ao ciclo do nitrogênio em meio líquido e em solos (ABEYTA; WELKELL, 1988; CARTER et al., 1995). Quanto à desnitrificação, as *Aeromonas* estão relacionadas à respiração de nitrato na presença de oxigênio

(desnitrificação aeróbia) (CHEN et al., 2014; DUAN et al., 2015; PATUREAU et al., 2000).

A banda ***t*** foi relacionada a bactéria *Chujaibacter soli* com 99% de similaridade. Esta bactéria foi relatada na literatura pela primeira e única vez em 2015 por Kim e et al., isolada do solo da Ilha Chuja, na Coreia do Sul. Esta bactéria teve crescimento ótimo em pH 7, temperatura 28 - 30 °C, 0wt% NaCl e possui maior similaridade com bactérias da familia *Xanthomonadaceae* (KIM et al., 2015). Como esta população foi identificada pela maior intensidade desta banda nas condições 13 e 14, a partir deste estudo, pode-se inferir que as bactérias *Chujaibacter soli* são resistentes a elevadas POs (15 e 30 atm) quando o sal em questão é o cloreto de magnésio.

A banda ***n*** foi escolhida para sequenciamento por estar presente em todas as condições de eletrólitos mistos, porém sua similaridade foi de 100% com bactérias não cultivadas. Por fim, a banda ***q*** possui 100% de similaridade com bactérias também não cultivadas do filo *Proteobacteria*, o qual é o filo que contém a maior parte de espécies de bactérias desnitrificantes aeróbias (JI et al., 2015).

PARTE III - Reatores Contínuos de Leito Estruturado

5.3.1 Fases operacionais dos reatores contínuos Controle (RC) e Salino (RS)

Neste item estão apresentados os resultados obtidos durante todo o período operacional dos reatores contínuos RC e RS. O RC foi operado sem a adição de compostos inorgânicos que conferissem pressão osmótica ao sistema, a fim de se avaliar o efeito da NDS sob aeração contínua sem controle de OD. Este reator foi operado durante 72 dias, com uma fase de adaptação e uma fase operacional com estabilização. Os resultados deste período foram considerados suficientes para avaliar o desempenho da NDS sem a interferência de sais.

A operação do RS durou 155 dias e foi dividida em três fases, além do período de adaptação de 15 dias. A interrupção da operação deste reator se deu devido aos resultados insatisfatórios e não recuperação da comunidade microbiana nitrificante após o aumento da PO. As fases foram diferenciadas apenas em relação à PO aplicada ao sistema, como apresentado na Tabela 21. Os reatores foram operados sob controle de temperatura a 30±1 °C e com tempo de dentenção hidráulico de 12 horas, como aplicado em trabalho anteriores (MOURA, 2011; 2014; SANTOS, 2014). O TDH foi controlado por meio de ajuste da bomba dosadora e medido pela coleta da vazão efluente em períodos de 2 e 24 horas para a minimização de erros. Na Tabela 21 estão os resultados médios da medição do TDH e da concentração de OD no meio líquido, medidos diariamente, bem como a salinidade, PO e duração em dias de cada fase operacional.

Tabela 21 - Caracteristicas das fases operacionais dos reatores controle e salino referente à pressão osmótica, tempo de detenção hidráulico e oxigênio dissolvido.

	Fase operacional	Pressão osmótica (atm)	Salinidade (wt%)	Duração (dias)	TDH (horas)	Oxigênio Dissolvido (mg L^{-1})
Reator Controle	Única	-	-	72	12,3±1,4	6,1 ± 0,4
Reator Salino	1	1,7	0,3	55	12,2±1,3	6,0 ± 0,3
	2	5,25	1	55	12,5±0,7	6,8 ± 0,3
	3	9	1,7	24	12,5±0,4	7,2±0,2

Fonte: Autoria própria.

Observa-se que o TDH medido manteve-se próximo do TDH teórico adotado para este experimento. Além disso, a concentração de oxigênio dissolvido manteve-se em torno de 6 mg L^{-1}, com excessão da Fase III, em que o consumo deste foi reduzido, já que

houve uma queda na eficiência da oxidação do nitrogênio amoniacal e declínio na eficiência de remoção de DQO. Tanto a DQO quanto a concentração de nitrogênio afluente foram mantidas constantes ao longo de todas as fases experimentais e semelhantes para os dois reatores contínuos, com cargas orgânica e nitrogenada aplicadas de 1,2 kgDQO m^{-3} dia^{-1} e 0,12, kgN m^{-3} dia^{-1}, respectivamente.

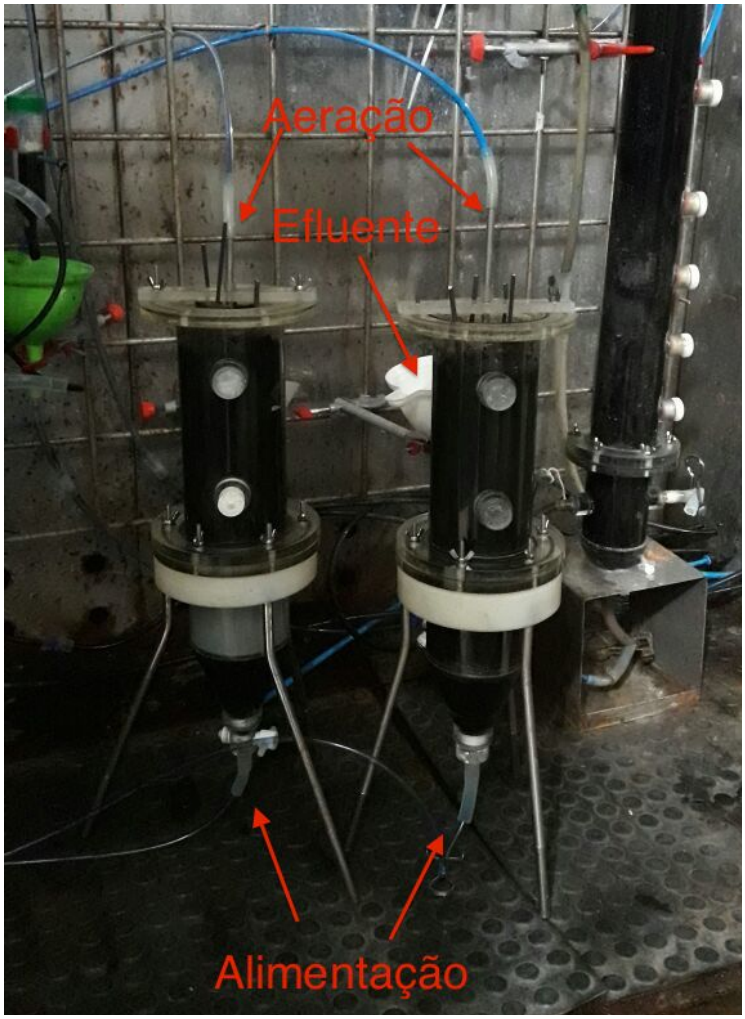
O período de inoculação se deu por 10 dias nos quais os reatores foram mantidos apenas sob regime de mistura, proporcionada pela aeração contínua. A abertura do sistema foi baseada na observação de atividade nitrificante. A fase de adaptação para ambos os reatores teve duração de 26 dias. O fim da fase de adaptação foi caracterizado pelo declínio constante da DQO e da concentração de $N\text{-}NH_4^+$ efluente, iniciando a Fase I do RS e a Fase Única do RC.

Na fase de adaptação, para ambos os reatores, a carga orgânica carbonácea aplicada foi de 1,6 kgDQO m^{-3} dia^{-1} e a carga nitrogenada aplicada foi de 0,16 kgN m^{-3} dia^{-1}. A partir do ínico das primeiras fases operacionais (Fase única e Fase I), estas cargas foram reduzidas para 1,2 kgDQO m^{-3} dia^{-1} e 0,12, kgN m^{-3} dia^{-1}, respectivamente. Isto ocorreu pois a ideia inicial deste trabalho idealizava a operação dos reatores na carga aplicada inicialmente (adaptação), mas devido ao aumento da PO e consequentemente, a possível fragilidade do sistema, considerou-se prudente reduzir para as cargas orgânicas carbonácea e nitrogenada que foram aplicadas nas fases operacionais seguintes, a qual constitui concentrações também consideradas de esgoto sanitário concentrado (METCALF; EDDY, 2003).

Durante todas as fases operacionais, a relação C/N adotada para os reatores foi de 10. Esta relação é apontada na literatura como sendo a ideal para a nitrificação e desnitrificação heterotrófica simultâneas (FU et al., 2010; SANTOS et al., 2016). O encerramento da operação do RC e a mudança das fases as quais o RS foi submetido foram mediantes a observação de estado estacionário, com respeito à remoção de matéria orgânica e nitrogênio. Considerou-se, para tanto, a estabilização das eficiências de remoção de DQO e de $N\text{-}NH_4^+$ por pelo menos 15 dias consecutivos, com valores que não variassem mais que 10%.

Na Figura 36 estão apresentados os RC e RS em operação com entradas de aeração e alimentação identificadas, bem como o ponto de coleta do efluente.

Figure 36- Reatores biológicos de leito fixo estruturado Controle e Salino em operação.



Fonte: Autoria própria.

5.3.2 Remoção de Nitrogênio - Estabelecimento da nitrificação e desnitrificação simultânea (NDS) e a influência da pressão osmótica

5.3.2.1 Reator biológico de leito fixo estruturado Controle

O principal objetivo da operação do RC foi avaliar o desempenho da remoção de matéria orgânica e nitrogenada em sistema de aeração contínua sem a influência da salinidade. As concentrações afluente e efluente de $N\text{-}NH_4^+$ bem como as eficiências de oxidação de amônio e de remoção de nitrogênio total se apresentam no gráfico da Figura 37 e as concentrações efluentes de nitrito e nitrato no gráfico da Figura 38.

Figure 37 - Concentrações de nitrogênio amoniacal afluente e efluente e eficiência de oxidação do amônio e de remoção de nitrogênio total no Reator Controle (RC). FA: Fase de Adaptação; FU: Fase Única.

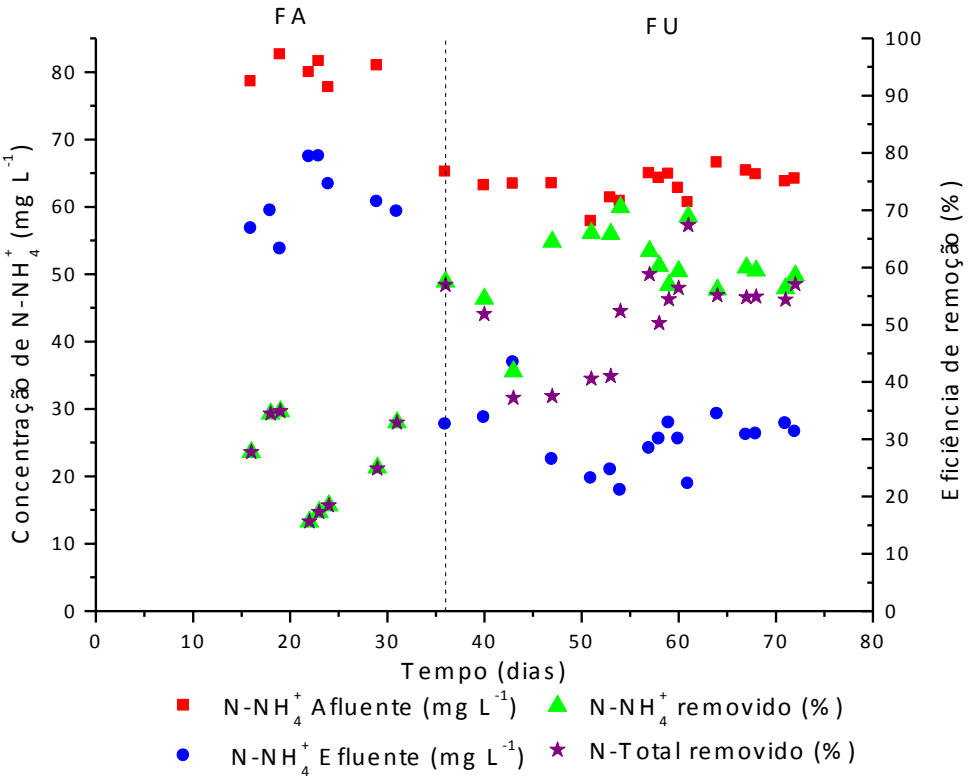
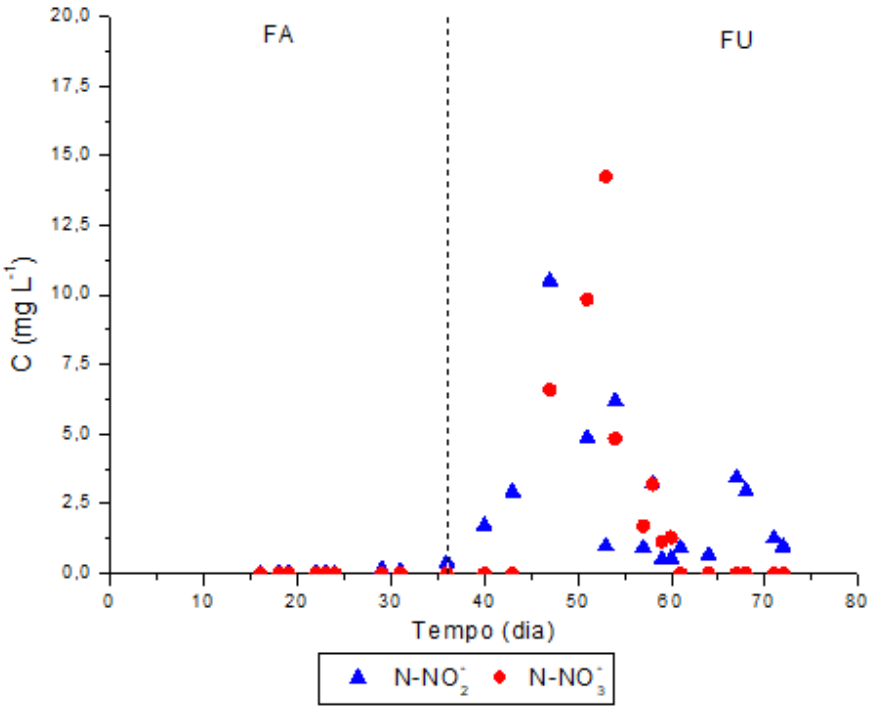


Figure 38 - Concentrações efluente de nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) no reator rontrole (RC). FA: fase de adaptação; FU: fase única. C: concentração.



Fonte: Autoria própria.

A partir do gráfico da Figura 37, observa-se que as eficiências de remoção de N-NH_4^+ e de nitrogênio total (soma das formas nitrogenadas) mantiveram-se semelhantes no período estacionário da fase única (a partir do 55° dia operacional). Com o aumento da nitrificação, que caracterizou a transição da fase de adaptação para a fase única, o desempenho da desnitrificação levou em torno de 15 dias (do 40° ao 55° dia operacional) para ser estabilizada mediante ao aumento da concentração de formas oxidadas de nitrogênio. Após a estabilização do sistema, a eficiência média da fase única para a oxidação do NH_4^+ e remoção de N-total foram de 60% e 56,3%, respectivamente, evidenciando o bom estabelecimento da NDS e sugerindo que a nitrificação foi a etapa limitante do processo.

As concentrações de nitrito e nitrato aumetaram entre os 40° e 60° dias operacionais, chegando a atingir os valores de 10,5 e 14,5 mgN-NO_x L^{-1}, respectivamente. No entanto, mantiveram-se próximas à zero na fase de adaptação e inferiores à 5 mg L^{-1} no período estacionário da fase única.

Durante a fase de adaptação da biomassa aos processos de nitrificação e desnitrificação, visando a remoção de nitrogênio, observou-se que a oxidação do amônio na etapa incial esteve entre 20 e 30% (Figura 37). Embora a concentração de OD durante a fase de adaptação estivesse em torno de 3 mg L^{-1}, a baixa eficiência de nitrificação foi creditada à falta de oxigênio para a reação de oxidação do NH_4^+ devido possivelmente às reações de oxidação aeróbia da matéria orgânica e a resitência à transferência de massa para o biofilme. Por esta razão, utilizou-se a estratégia de aumento de aeração, com OD mantido em média em 6 mg L^{-1}, a partir do 36° dia de operação e também, como medida auxiliar, foi realizado o descarte de uma substância polimérica aderida ao suporte. Com isto, foram verificados efeitos positivos com eficiência média de oxidação de amônio superior a 60%, evidenciando que a transferência de OD foi limitante para o processo na fase de adaptação.

A presença do polímero aderido ao material suporte foi creditada à produção de substância extracelular polimérica (EPS, do inglês *extracelular polymeric substante*), conforme relatado em outros trabalhos com a mesma configuração de reator, como também em estudos que investigaram a influência da salinidade na remoção biológica de

matéria orgânica e nitrogenada (MOURA, 2011; 2014; SANTOS, 2014; WANG et al., 2015).

O descarte da EPS se deu a partir da rápida retidada e raspagem das hastes para a remoção deste material que se desprendia facilmente da espuma. Após esta remoção e o aumento da concentração de oxigênio dissolvido no meio, observou-se a maior eficiência de nitrificação e o declínio temporário da eficiência de desnitrificação. Como observado por Santos (2014), a aderência de material viscoso semelhante ao descrito neste trabalho possivelmente dificultou a transferência de OD para o interior da espuma, prejudicando o processo de nitrificação.

O incremento na oxidação de amônio não foi acompanhado pela desnitrificação, acarretando acúmulo de nitrito e nitrato, conforme pode ser visualizado nos resultados apresentados na Figura 38. A queda na eficiência da desnitrificação no período imediatamente após o aumento da nitrificação se deu possivelmente pelo aumento repentino da concentração de compostos nitrogenados na forma oxidada no meio reacional. A provável penetração do oxigênio dissolvido mais profundamente no biofilme não foi considerada como possivelmente inibidora do processo de desnitrificação uma vez que a atividade desnitrificante logo foi reestabelecida, como pode ser visto na Figura 37, mesmo com a maior disponibilidade de OD.

Na Figura 39 apresenta-se uma fotografia da EPS retirada do material suporte do reator. Destaca-se que material similar foi formado no reator que recebeu adição de sais (RS), requerendo que o descarte fosse realizado em duas ocasiões. Os descartes no RS ocorreram no 47° e 121° dias operacionais e amostras coletadas nos dois reatores contínuos foram submetidas à microscopia óptica. No RS, a segunda remoção do material polimérico não apresentou impacto positivo ou negativo nas remoções de DQO ou de nitrogênio. As hipóteses levantadas a respeito da EPS estão discutidas no tópico de biologia molecular deste trabalho (tópico 5.3.6).

Figura 39 - Material biológico viscoso formado nas hastes dos reatores controle e salino semelhante ao descrito como substância extracelular polimérica (EPS).

Fonte: Autoria própria.

5.3.2.2 Desempenho de reator biológico de leito fixo estruturado submetido a salinidade (Reator Salino)

O RS foi operado em três fases, em que a diferenciação foi feita pelo incremento da PO aplicada (1,7; 5,25 e 9 atm) mantendo-se as proporções dos sais estudados na composição do afluente. Na Figura 40 estão apresentadas graficamente as concentrações afluente e efluente de $N\text{-}NH_4^+$ e as eficiências de oxidação do $N\text{-}NH_4^+$ e da remoção de nitrogênio total. Já as concentrações efluente de NO_2^- e de NO_3^- estão apresentadas na Figura 41. Os resultados representam todo o período operacional com a delimitação de cada fase.

Figura 40 - NH_4^+ afluente, efluente, eficiência de oxidação do NH_4^+ e de remoção de nitrogênio total no reator salino. FA: Fase de Adaptação (PO: 1,7 atm / salinidade: 0,3 wt%); F1: Fase 1 (PO: 5,25 atm / salinidade: 1 wt%); F3: Fase 3 (PO: 9 amt / salinidade: 1,7 wt%).

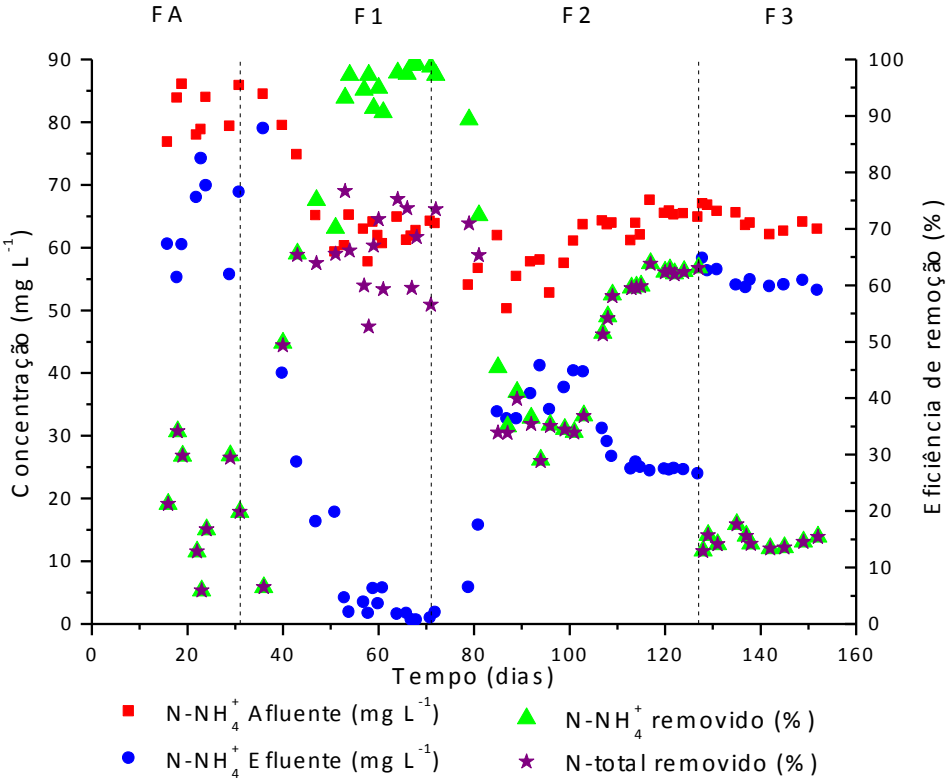
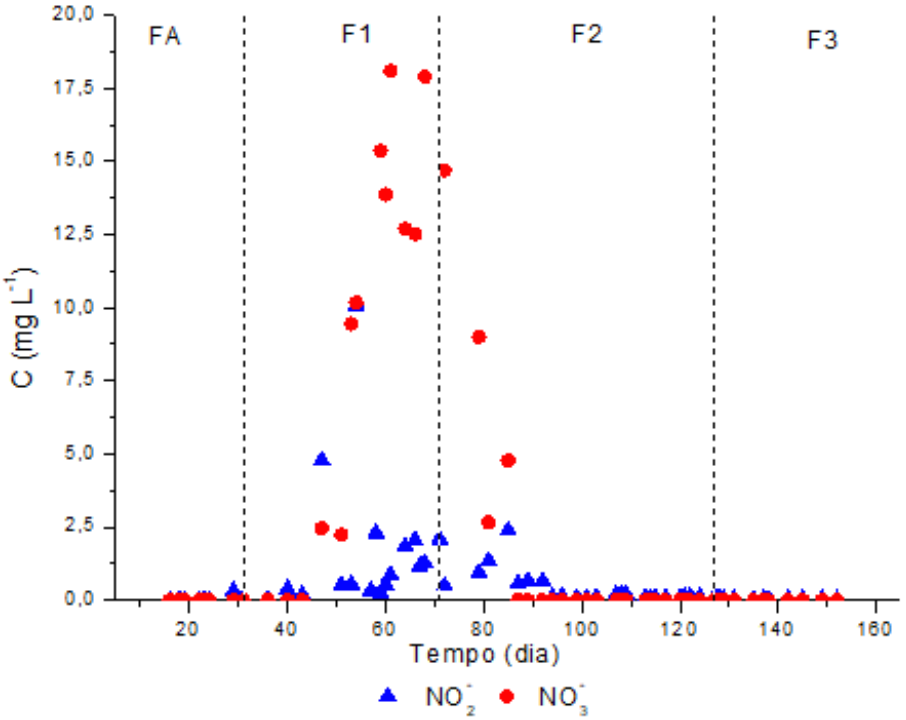


Figura 41 - Concentrações efluente de nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) no Reator Salino (RS).



Fonte: Autoria própria.

A Tabela 22 contém os resultados médios obtidos em cada fase operacional nos dois reatores em relação às remoções de matéria nitrogenada.

Tabela 22 - Remoção média da matéria nitrogenada nos reatores controle (RC) e salino (RS) em cada fase operacional.

		Eficiência de oxidação do $N\text{-}NH_4^+$ (%)	Eficiência de desnitrificação (%)	Eficiência de remoção de N-Total (%)
Reator Controle	**Fase única**	60 ± 3,6	94,1 ± 4,2	56,3 ± 4,2
Reator Salino	**Fase 1 (F1)**	95,9 ± 2,8	68,4 ± 8,3	65,76 ± 7,5
	Fase 2 (F2)	60,8 ± 2,6	99,7 ± 0,14	60,62 ± 2,7
	Fase3I (F3)	14,7 ± 1,3	99,6 ± 0,6	14,67 ± 1,3

Fonte: Autoria própria.

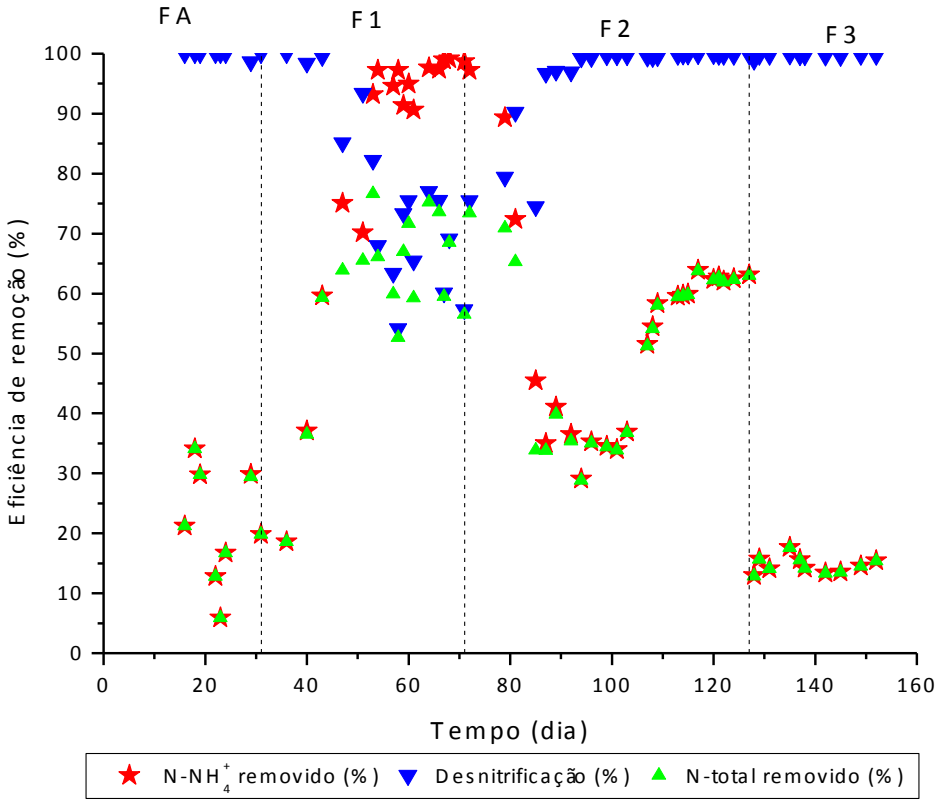
A eficiência média de oxidação do NH_4^+ de 95,9% (Tabela 22) no período estável da Fase 1 pode ser observada na Figura 40 por meio dos valores para este processo apontados entre 90 e 100%. A nitrificação mostrou-se beneficiada pela presença da salinidade em PO de 1,7 atm quando comparado aos resultados obtidos para o RC (Figuras 37 e 40). A fase 1 foi caracterizada dentre as fases operacionais do RS por ser a única em que as eficiências de oxidação do nitrogênio amoniacal e a remoção do nitrogênio total divergiram.

Com a formação média de aproximadamente 57,6 $mgN\text{-}NO_x\ L^{-1}$ (tomando-se por base 95,9% de eficiência de nitrificação), se desconsiderada a massa de nitrogênio amoniacal incorporada à multiplicação celular, observou-se a redução na desnitrificação em média de 100 para 68,4%, processo o qual só voltou a atingir máxima eficiência (Figura 40 e Tabela 22) quando a oxidação do NH_4^+ caiu para valores inferiores a 70% (por volta do 80° dia operacional). Durante o período de estabilidade da fase 1, a desnitrificação média de 68,4% foi ocasionada, possivelmente, pela ausência de doadores de elétrons suficientes para a redução dos compostos nitrogenados oxidados.

A Figura 42 apresenta um gráfico contendo as eficiências de oxidação do amônio, de desnitrificação e de remoção de N-total. Por meio deste gráfico, analisando-se o balanço estabelecido no processo de NDS, observa-se que quando a eficiência de oxidação de $N\text{-}NH_4^+$ está abaixo de 70%, esta eficiência coincidiu com a remoção total de nitrogênio. Isto mostra que para eficiências de nitrificação inferiores à 70%, a oxidação do NH_4^+ foi a etapa limitante do processo. Já para eficiências de nitrificação

superiores à 70%, vê-se que a eficiência de remoção de nitrogênio total foi inferior à de nitrificação, o que caracteriza a desnitrificação como a etapa limitante da NDS. Damianovic et al. (2018) também relatou limitação da remoção de nitrogênio total por ausência de doadores de elétrons em sistema ocorrendo nitrificação e desnitrificação heterotrófica simultanemante para condições onde a nitrificação foi otimizada.

Figura 42 - Perfil das eficiências de oxidação de N-$NH4^{+}$, desnitrificação e remoção de N-total ao longo do período operacional do reator salino. FA: Fase de Adaptação (PO: 1,7 atm / salinidade: 0,3 wt%); F1: Fase 1 (PO: 5,25 atm / salinidade: 1 wt%); F3: Fase 3 (PO: 9 amt / salinidade: 1,7 wt%).



Fonte: Autoria própria.

Segundo Philips et al. (2002), a desnitrificação heterotrófica via nitrato utilizando sacarose como fonte de carbono acontece segundo a equação 23.

$$C_{12}H_{22}O_{11} + 9{,}6H^{+} + 9{,}6NO_3^{-} \rightarrow 4{,}8N_2 + 12CO_2 + 15{,}8H_2O \qquad (23)$$

Por meio da equação (23), observa-se que são necessários 342 mg (1 mmol) de sacarose (correspondente a uma DQO de 1120 mgO_2 L^{-1}) para reduzir 134,4 mg (9,6 mmol) de N-NO_3^{-}. No cenário operacional do presente trabalho, a máxima concentração

de $N\text{-}NO_3^-$ possível de ser gerada foi de 60 mg L^{-1}, e para a desnitrificação heterotrófica desta concentração de nitrato, seria necessária uma concentração de 152,7 mg L^{-1} de sacarose, correspondente a uma DQO de 500 mgO_2 L^{-1}. A DQO média inserida no sistema foi de 600 mgO_2 L^{-1}, que em teoria, seria suficiente para suportar a desnitrificação heterotrófica via nitrato. No entanto, a oxidação da matéria orgânica (MO) por bactérias heterotróficas aeróbias possivelmente consumiu parte da MO disponível, impossibilitando que a DQO afluente estivesse disponível em totalidade para a redução do NO_3^- e NO_2^- gerado. Desta forma, a redução de todo o nitrogênio oxidado quando a nitrificação atingiu eficiência média de 95,9% foi comprometida.

Estima-se que apenas pouco mais da metade (58%) da DQO disponível tenha sido consumida do processo de desnitrificação heterotrófica. Esta afirmativa baseia-se no fato de que a desnitrificação heterotrófica apenas atingiu eficiências próximas à 100% para oxidações de NH_4^+ inferiores à 70% no sistema. Com 70% do nitrogênio afluente oxidado, tem-se em teoria a formação de 42 $mgNO_x$ L^{-1} e para que esta concentração seja reduzida a N_2 pela via descrita na equação 23 é necessária uma massa de sacarose equivalente a uma DQO de 350 mgO_2 L^{-1}. Quando concentrações de sacarose superiores à correspondente a 350 mgO_2 L^{-1} de DQO foram necessárias, ou seja, quando houve formação de mais de 42 $mgNO_x$ L^{-1}, a desnitrificação foi interrompida.

Assim, pode-se inferir que se a comunidade microbiana heterotrófica não desnitrificante consumiu cerca de 42% da DQO alimentada ao sistema e que 58% foi consumida no processo de desnitrificação, seria necessária uma DQO afluente de 830 mgO_2 L^{-1} para suportar a desnitrificação heterotrófica completa da carga nitrogenada do sistema, sugerindo para a condição da Fase 1 uma relação C/N ideal de 13,8.

Com exceção da Fase 1 do RS, a remoção de nitrogênio total foi em todas as condições avaliadas próxima da eficiência da oxidação do $N\text{-}NH_4^+$, indicando o bom estabelecimendo da NDS em regime de aeração contínua sem o controle de OD, com cargas nitrogenadas oxidadas de aproximadamente 0,115; 0,073 e 0,018 e cargas nitrogenadas removidas de 0,08; 0,073 e 0,018 kgN m^{-3} dia^{-1} nas fases I, II e III, respectivamente, evidenciando novamente que a PO de 1,7 atm favoreceu a nitrificação e que a possível deficiência na disponibilidade de doadores de elétrons comprometeu o processo de NDS.

Poucos trabalhos na literatura relataram resultados de sistemas de NDS sob aeração contínua com elevadas concentrações de OD (DI BELLA; TORREGROSSA, 2013; RAHIMI et al., 2011; MARIN et al., 2016). A maior parte dos trabalhos optam pelo controle de baixos níveis de OD (inferior a 2 mg L^{-1}) (Tabela 1), pelo estabelecimento de sistemas de aeração intermitente (BARANA et al., 2013; MOURA, 2014; MOURA et al., 2012; SANTOS et al., 2016) ou bateladas sequenciais com períodos anóxicos para favorecer a desnitrificação heterotrófica convencional (DI BELLA; TORREGROSSA, 2013; MARIN et al., 2016; RAHIMI et al., 2011).

Reatores de leito estruturado e tempo de detenção hidráulica (TDH) de 12 horas foram utilizados por Moura et al. (2012) e Santos et al. (2016) em sistemas de aeração intermitente. Para Santos et al. (2016), a melhor eficiência de remoção de N-Total foi de aproximadamente 84% para relação de C/N de 2,9 com carga orgânica nitrogenada removida de 0,366 kgN m^{-3} dia^{-1}. A baixa relação C/N e elevada remoção de nitrogênio foi associada à atividade anammox complementar. Já Moura et al. (2012) obtiveram 82% de remoção de N-Total para carga nitrogenada aplicada de 0,06 kgN m^{-3} dia^{-1}, que corresponde a 50% da carga aplicada neste trabalho. Os autores utilizaram relação C/N de aproximadamente 12, indicando maior disponibilidade de doadores de elétrons que puderam ser empregados na desnitrificação heterotrófica, caracterizando maior eficiência na remoção de N-total comparada a este trabalho.

Proporções semelhantes de DQO e das concentrações de $N\text{-}NH_4^+$ afluente foram aplicadas para testar diferentes períodos de aeração, duração de ciclo e concentrações de OD em um sistema de batelada sequencial por Marin et al. (2016). Estes autores obtiveram 70% de remoção de N-Total para longos períodos de aeração em ciclos de 12 horas e concentração de OD de 4 mg L^{-1}, o que corrobora os resultados obtidos neste trabalho. Para Rahimi et al. (2011), as cargas orgânicas carbonácea e nitrogenada utilizadas foram um pouco inferiores às deste trabalho e o sistema estudado foi o de bateladas sequenciais com leito fixo. Os autores obtiveram eficiência de remoção de N-total de 73,68% e satisfatório estabelecimento da NDS em ciclos de oito horas, inferior ao TDH aplicado no presente trabalho (12 horas).

No estudo desenvolvido por Di Bella e Torregrossa (2013), os autores propuseram o desempenho da NDS sem o controle da concentração de OD, atingindo valores

próximos à saturação (6 - 8 mg L^{-1}) em um sistema de bateladas sequenciais com carga nitrogenada semelhante a do presente trabalho e o dobro da carga carbonácea. Os autores alcançaram remoção de N-total de 70-80% e em média 77% da conversão de N-NH_4^+, o que mostra que esta foi a etapa limitante do processo de NDS e que a elevada relação C/N de 16/1 aplicada no sistema favoreceu a desnitrificação heterotrófica. Não foram encontrados relatos na literatura referentes ao estabelecimento da NDS em reatores de leito fixo/estruturado sob aeração contínua sem o controle de OD.

Os trabalhos de Uygur e Kargi (2003), Wang et al. (2005; 2015) e Zhao et al. (2016) avaliaram a influência da salinidade nos processos de remoção de matéria orgânica e nitrogenada. Vale ressaltar que todos estes trabalhos consideraram para a composição da salinidade apenas o NaCl, o que muitas vezes não representa águas residuárias reais, com exceção de Wang et al (2015), que avaliaram uma composição semelhante a da água do mar. No presente trabalho, a salinidade em wt% e, consequentemente, a PO em cada fase considera a composição da salinidade aplicada com 64,5% de NaCl, 27,15% de $MgCl_2$ e 8,35% de $CaCl_2$ relativa à composição da água residuária simulada referente a regiões de escassez hídrica, tomando-se por base o sertão do estado de Alagoas.

No presente trabalho, o aumento da PO impactou a atividade microbiana nitrificante, tendo eficiência reduzida de 96% para 60,8% quando houve o incremento da salinidade de 0,3 para 1 wt% (1,7 para 5,25 atm), e novamente de 60,8% para 14,7% quando a salinidade foi aumentada de 1 para 1,7 wt% (5,25 para 9 atm). Uygur e Kargi (2003) relataram a diminuição da eficiência de nitrificação de 96% para 39% com o aumento gradual da salinidade de 0 a 6 wt% (equivalente de 0 a 33 atm) em um sistema de lodos ativados. Também em um sistema de lodos ativados, Wang et al. (2005) avaliaram o impacto de diferentes concentrações de NaCl na taxa de consumo de oxigênio e encontraram que não houve mudanças significativas para salinidade de até 0,05 wt%, mas que o sistema passou a ser afetado quando a salinidade aplicada foi de 0,2 wt% (1,3 atm) e que o sistema foi comprometido para salinidade de 1 wt% (6,3 atm).

Zhao et al. (2016), em um sistema de batelada sequencial operado por 240 dias, observaram o estabelecimento da eficiência de oxidação do N-NH_4^+ em 95% para salinidade de até 2 wt%. Com o aumento da salinidade de 2 para 3 wt%, a eficiência caiu

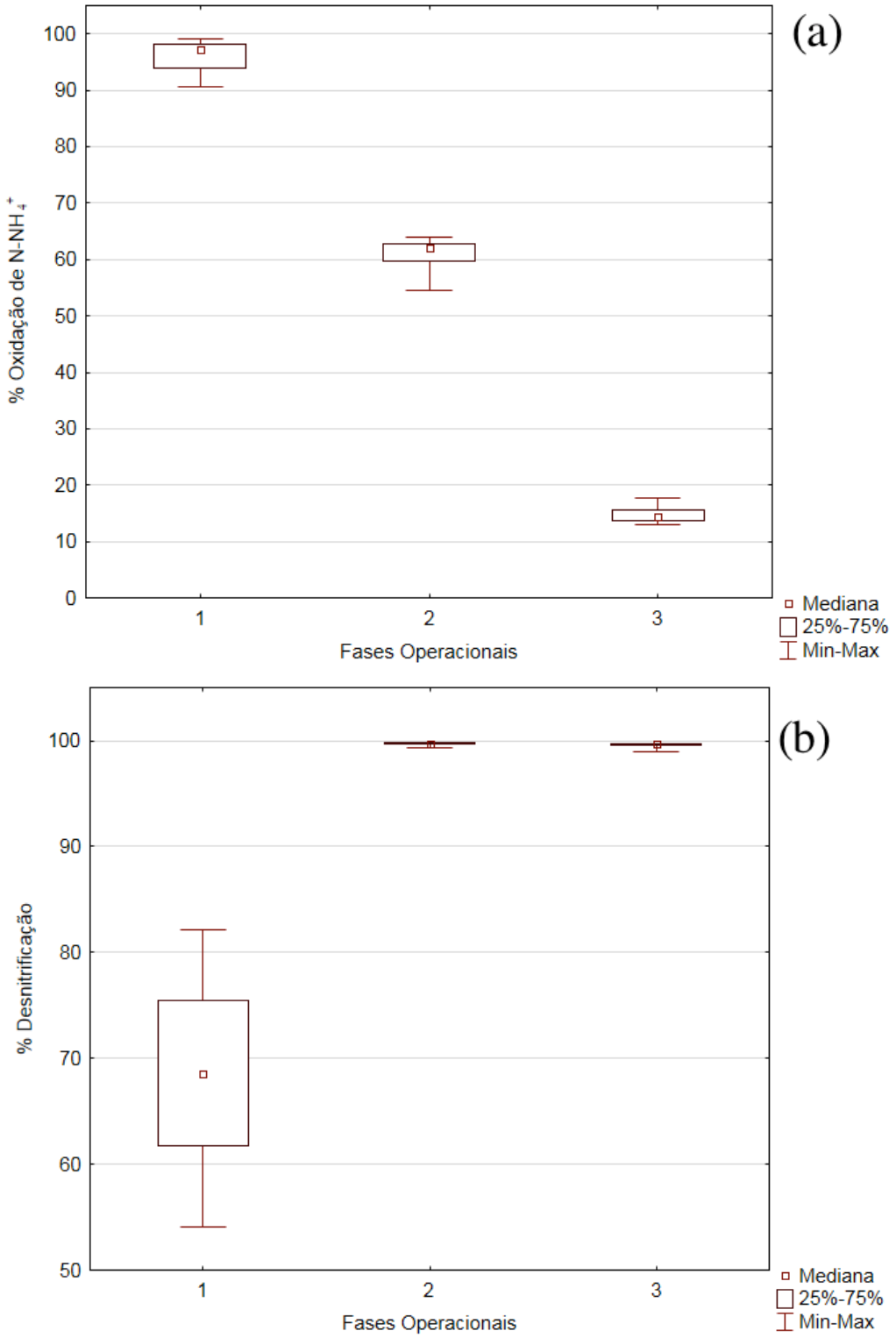
para aproximadamente 40%. Finalmente, Wang et al. (2015) avaliaram a influência da salinidade semelhante à da água do mar em um sistema também de batelada sequencial. Os autores consideraram em maior parte para a composição da água residuária o NaCl e pequenas concentrações de íons como Mg^{2+}, Ca^{2+}, K^{+}, SO_4^{2-} e CO_3^{2-}. As eficiências de oxidação do amônio mantiveram-se superiores a 70% em salinidade de até 4 wt% (22,8 atm) caindo gradualmente para 21% quando a salinidade atingiu 8 wt%.

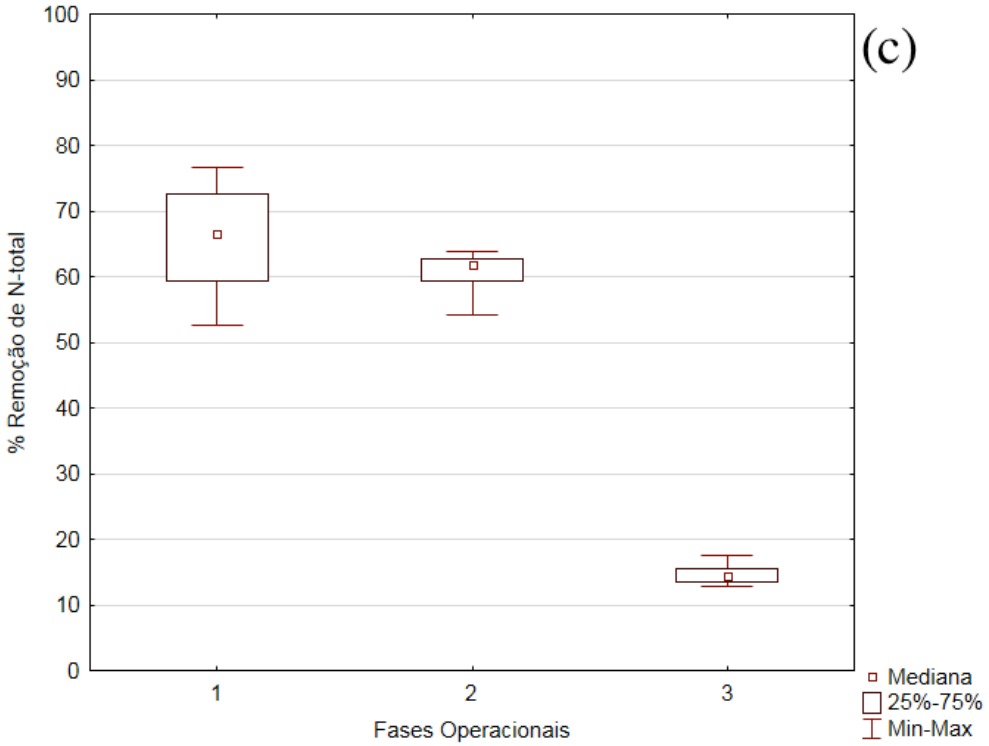
Os resultados apresentados pelos autores citados, ao avaliar o efeito da salinidade em sistemas biológicos contínuos, foram superiores ou semelhantes ao exposto neste trabalho. A heterogeneidade dos resultados está possivelmente relacionada à composição do meio reacional e à comunidade microbiana inoculada em cada processo. As proporções dos sais estudados e suas respectivas relações antagônicas e sinérgicas influenciam o desempenho da atividade microbiana como visto neste trabalho, evidenciando novamente os diferentes comportamentos quando são avaliados eletrólitos mistos ou apenas um sal.

O aumento da PO impactou negativamente a comunidade microbiana devido ao fato de que cada um dos sais estudados exerce diferentes efeitos tóxicos específicos nas populações microbianas presente no RS e que esta toxicidade está também associada à capacidade de regulação osmótica por solutos compatíveis, como discutido anteriormente, e aos efeitos das interações entre os íons.

Para a comparação da distribuição dos resultados das eficiências de oxidação do $N\text{-}NH_4^{+}$, de desnitrificação e de remoção de N-total no RS, as Figuras 43 (a), (b) e (c) apresentam os gráficos *Box-plot* referentes aos dados destas eficiências em cada fase operacional. Os gráficos foram gerados por meio do software Statistica® 13.0 e possibilitam a visualização da distribuição dos pontos amostrados, evidenciando a variação dos dados a partir da altura do *box*. Os gráficos também trazem os valores referentes à mediana e aos dados compreendidos entre o primeiro (25%) e segundo quartil (75%). Externamente ao *box* estão expressos também os valores máximos e mínimos da distribuição.

Figura 43 - Gráficos *Box-plot* da distribuição das eficiências de oxidação de N-NH_4^+ (a), de desnitrificação (b) e de remoção de nitrogênio total (c) nas três fases operacionais do reator salino. No eixo de x, (1) refere-se à fase 1, (2) à fase 2 e (3) à fase 3.





Fonte: Autoria própria.

A partir das Figuras 43(a), (b) e (c) observa-se que houve estabilidade nos processos de remoção de nitrogênio para todas as fases operacionais, principalmente nas Fases 2 (F2) e 3 (F3). A maior variabilidade na Fase 1 (F1) pode estar associada à adaptação da biomassa e desenvolvimento de populações resistentes às condições salinas a partir do inóculo inserido. Destaca-se nesta análise o processo de desnitrificação, com eficiências praticamente invariáveis nas fases F2 e F3 em decorrência do declínio da nitrificação e consequente maior disponibilidade de MO por massa de composto nitrogenado oxidado. Na fase F1, o mesmo processo apresenta a maior variabilidade possivelmente em decorrência do aumento da nitrificação e novamente da MO disponível para ser utilizada pelas desnitrificantes heterotróficas.

O software Past® foi utilizado para verificar se a distribuição dos valores das eficiências dos processos seguia uma distribuição normal e se havia diferença estatística entre os respectivos valores médios para cada fase operacional. A distribuição normal para todos os processos, exceto o de desnitrificação, foi verificada por meio do teste de

normalidade de Shapiro-Wilk e os valores do p-normal estão dispostos da Tabela 23. A normalidade da distribuição é verificada para valores de $p > 0,05$.

Tabela 23 - Teste de normalidade aplicado às eficiências de oxidação de amônio e de remoção de nitrogênio total nas fases operacionais 1, 2 e 3.

		Fase 1	Fase 2	Fase 3
Oxidação do $N\text{-}NH_4^+$	Shapiro-Wilk	0,8904	0,8814	0,9315
	p-normal	0,1191	0,1084	0,4624
Remoção de N-total	Shapiro-Wilk	0,9461	0,8815	0,934
	p-normal	0,5802	0,1087	0,4886

Fonte: Autoria própria.

Para a desnitrificação, as eficiências medidas nas fases 2 e 3 são próximas a 100%, sendo o próprio erro experimental responsável possivelmente pelas pequenas variações. Com isso, optou-se pela não aplicação de testes não-paramétricos para avaliar a diferença estatística dos valores médios de cada fase.

A Tabela 24 ilustra a diferença estatística entre os valores médios das eficiências das fases operacionais 1, 2 e 3 nos processos de oxidação de amônio e remoção de nitrogênio total qualificados pelo Teste de Tukey ($p=0,05$), uma vez que estes processos apresentaram distribuição normal. As condições sinalizadas com o mesmo símbolo não apresentam diferença estatística entre sí.

Tabela 24 - Diferença estatística entre as eficiências alcançadas em cada fase operacional para a oxidação de nitrogênio amoniacal e remoção de nitrogênio total.

Processos	Fase 1	Fase 2	Fase 3
Oxidação de $N\text{-}NH_4^+$	A	B	C
Remoção de N-total	D	D	E

Fonte: Autoria própria.

A partir destas análises estatísticas comparativas, observa-se que a variação na PO influenciou a atividade nitrificante, uma vez que a eficiência de oxidação de $N\text{-}NH_4^+$ é significativamente diferente para as três condições. Para a remoção de nitrogênio total, as fases 1 e 2 não foram significativamente diferentes possivelmente devido à limitação da desnitrificação na fase 1, sendo reduzidos apenas parte dos compostos nitrogenados oxidados. Já as diferenças estatisticamente significativas observadas entre as condições 1 e 3 e 2 e 3 devem-se à inibição causada pelo aumento da pressão osmótica, o que comprometeu a oxidação de nitrogênio amoniacal.

5.3.3 Remoção de demanda química de oxigênio (DQO) nos reatores biológicos controle e salino

Os reatores RC e RS apresentaram elevada eficiência de remoção de matéria orgânica, mostrando que a presença dos sais também influênciou positivamente a comunidade microbiana heterotrófica e que o aumento da PO exerceu pouca inibição em relação ao que foi observado para a remoção de matéria nitrogenada. A Tabela 25 apresenta os resultados médios da DQO afluente e efluente e as eficiências de remoção.

Tabela 25 - Valores médios de remoção de DQO nos reatores controle e salino para cada fase operacional.

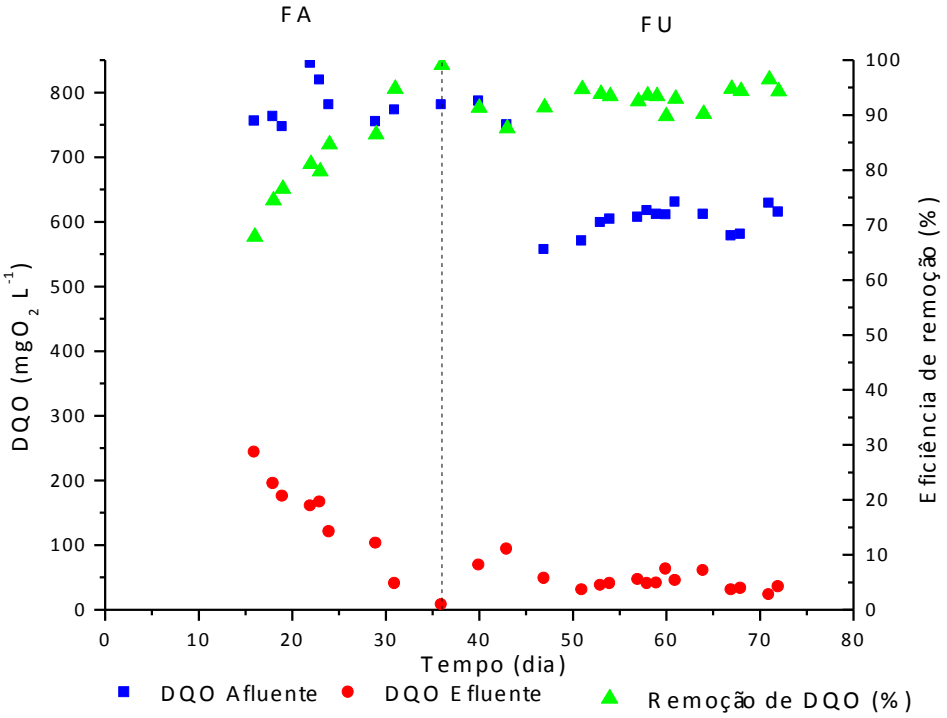
	Condição experimental	**DQO afluente ($mgO_2\ L^{-1}$)**	**DQO efluente ($mgO_2\ L^{-1}$)**	**Eficiência de remoção (%)**
Reator Controle	Fase Única	608,3 ± 16,4	41,1 ± 11,9	93,3 ± 1,92
Reator Salino	Fase I	593,3 ± 32,3	16,8 ± 9,7	97,2 ± 1,61
	Fase II	632,8 ± 16,7	137,6 ± 32,3	78,5 ± 4,6
	Fase III	607,7 ± 9,9	83,8 ± 4,1	86,2 ± 0,7

Fonte: Autoria própria.

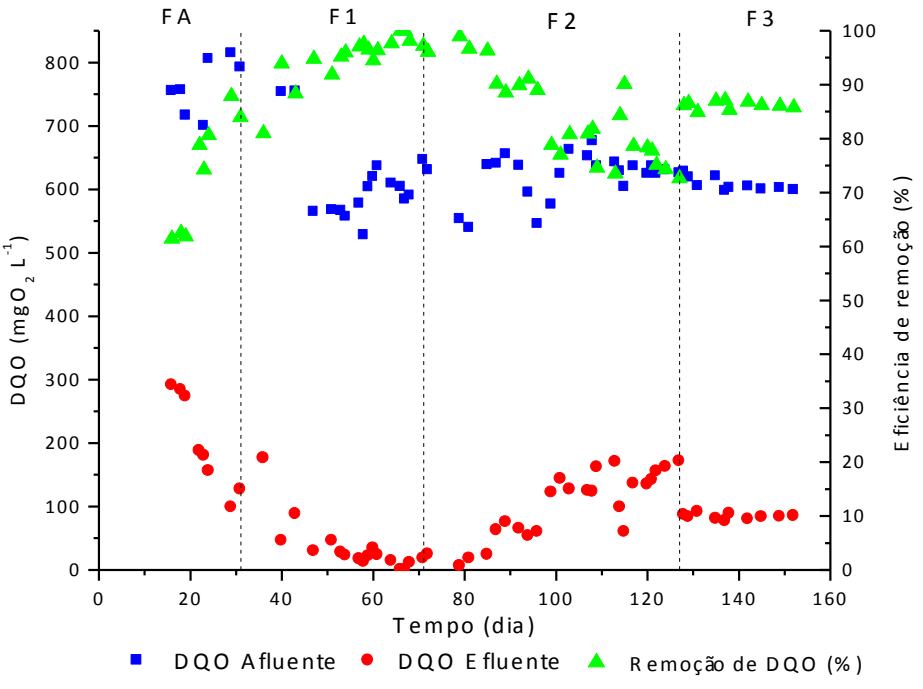
As eficiências alcançadas na Fase Única do RC e na Fase 1 do RS foram elevadas e próximas, mostrando que a pressão osmótica de 1,7 atm não afetou negativamente a comunidade microbiana inicial dos processos, porém, possivelmente, selecionou diferentes populações capazes de desempenhar o mesmo processo. Para o RS, observa-se que houve uma redução na eficiência da Fase 2, mostrando que o aumento da PO para 5,25 atm possivelmente selecionou comunidades halotolerantes. Uma recuperação na eficiência da remoção de MO foi observada com o aumento da PO para 9 atm. Esta recuperação do sistema deve-se possivelmente ao favorecimento de populações halofílicas presentes no inóculo, mas que não foram beneficiadas por POs amenas e que se desenvolveram com o aumento da concentração dos sais.

As Figuras 44 (a) e (b) mostram a variação da DQO afluente e efluente no RC e no RS, respectivamente, bem como as eficiências de remoção ao longo do período operacional.

Figura - 44 - Variação da DQO afluente e efluente e eficiência de remoção nos reatores controle (a) e salino (b) ao longo do período operacional. FA: fase de adaptação; FU: fase única; F1: fase 1; F2: fase 2; F3: fase 3.



(A)



(B)

Fonte: Autoria própria.

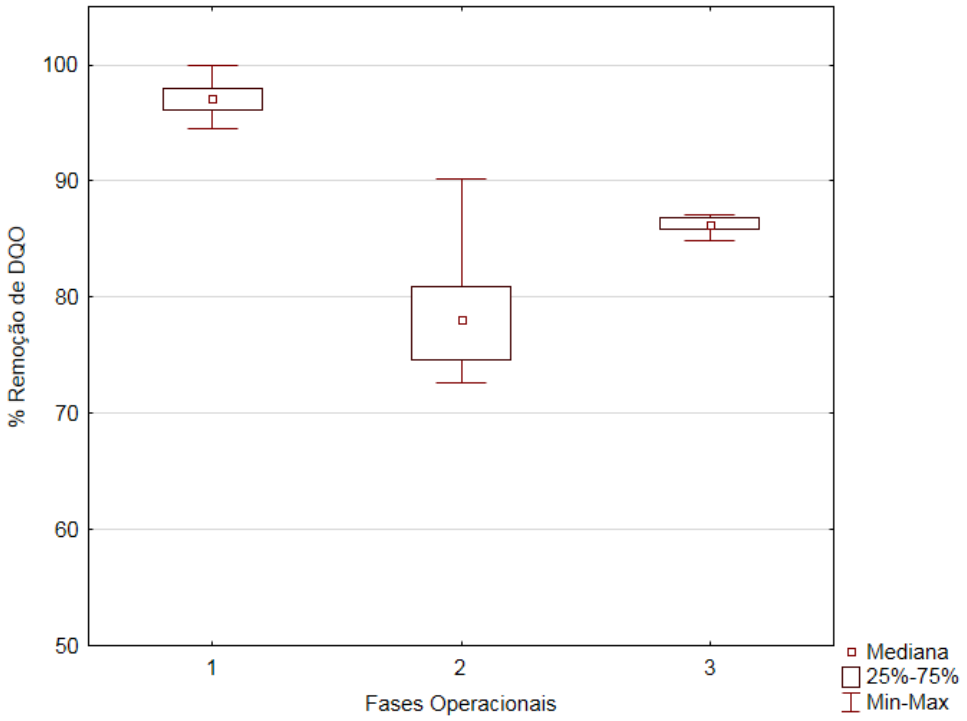
A carga orgânica média aplicada nos reatores durante as fases operacionais, com exceção da fase de adaptação, foi de 1,2 kg DQO m^{-3} dia^{-1} e as cargas removidas foram de, em média, 1,12 kg DQO m^{-3} dia^{-1} para o RC e 1,16; 0,92 e 1,03 kg DQO m^{-3} dia^{-1} para o RS nas fases 1, 2 e 3, respectivamente.

Os resultados referentes à remoção de MO confirmam os apresentados na literatura, como nos trabalhos desenvolvidos por Moura et al. (2012) e Santos et al. (2016), os quais utilizaram a mesma configuração de reator com o objetivo de remover conjuntamente matéria orgânica e nitrogenada. Estes trabalhos foram desenvolvidos em TDH de 12 horas e aplicaram DQO afluente pouco inferior à deste trabalho (364 a 529 $mgO_2\ L^{-1}$).

Quando comparado a trabalhos que investigaram o efeito da salinidade na eficiência de remoção de DQO, os resultados do presente trabalho também estão de acordo ao encontrado na literatura. Em um sistema de batelada sequencial, Uygur e Kargi (2003) avaliaram o desempenho de um reator contínuo operado sob o aumento gradual de salinidade (wt% NaCl). Para os autores, a remoção de DQO foi afetada pelo aumento da concentração de sais, reduzindo de 90 a 60% quando a salinidade foi de 0 a 3,5 wt% (20 atm). Para Wang et al. (2015) e Zhao et al. (2016), também em reatores de batelada sequencial, a remoção de DQO manteve-se acima de 90% até uma salinidade também em NaCl de 2 wt% (12,1 atm). Para os autores supracitados, o aumento da salinidade causou redução da eficiência de remoção de DQO em aproximadamente 50% quando a salinidade atingiu 6 wt% (33,1 atm) (WANG et al., 2015) e 80% quando a salinidade atingiu 3 wt% (17,6 atm) (ZHAO et al., 2016).

Análises estatísticas das eficiências de remoção de DQO no RS foram realizadas. A Figura 45 apresenta o gráfico *Box-plot*, com a distribuição dos dados amostrados, valores referentes à mediana, a amplitude do *box* que compreende de 25 a 75% dos valores amostrados, como também os máximos e mínimos da distribuição.

Figure 45 - Gráfico *Box-plot* da distribuição das eficiências de oxidação de remoção de DQO nas três fases operacionais do reator salino. 1 - Fase 1; 2 - Fase 2; 3 - Fase 3.



Fonte: Autoria própria.

O software Past® foi utilizado para verificar a distribuição das eficiências de remoção DQO pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk. A normalidade da distribuição foi comprovada e os valores de p-normal estão apresentados na Tabela 26.

Tabela 26 - Teste de normalidade aplicado aos valores referentes as eficiências de remoção de DQO obtidas em cada fase operacional.

	Fase 1	Fase 2	Fase 3
Shapiro-Wilk	0,9516	0,9257	0,9492
p-normal	0,6599	0,2652	0,6593

Fonte: Autoria própria.

Assim, foi realizado o Teste de Tukey (p = 0,05) para identificar se havia diferença estatística entre os valores médios das eficiências para cada fase operacional. Este teste permitiu identificar que as médias das eficiências obtida nas fases operacionais 1, 2 e 3 são todas estatisticamente diferentes entre si.

5.3.4 pH, condutividade elétrica, alcalinidade e a série de sólidos suspensos

A condutividade elétrica (CE) foi medida a fim de se verificar inespecificamente se os sais afluente permaneceram em solução no meio reacional ou se parte deles foi removida por precipitação ou adsorção na matriz orgânica e/ou no material suporte. Essas medidas não foram realizadas na primeira fase operacional por indisponibilidade do equipamento. As condutividades elétricas médias no afluente e efluente do RS em cada fase estão apresentadas na Tabela 27.

Tabela 27 - Condutividade elétrica afluente e efluente nas fases operacionais do reator salino.

	Condutividade elétrica afluente ($mS\ cm^{-1}$)	**Condutividade elétrica efluente ($mS\ cm^{-1}$)**
Fase 1	-	-
Fase 2	12,39 ±0,5	12,62±0,81
Fase 3	17,32±0,63	17,73±0,75

Fonte: Autoria própria.

A partir das medições correspondentes à CE das soluções afluente e efluente, sugere-se que não houve alteração na disponibilidade reacional dos compostos inorgânicos. A CE efluente foi sempre maior que a afluente possivelmente devido a íons de hidrogenocarbonato formados a partir da aeração contínua em pH próximo. Os valores médios do pH e alcalinidade afluentes e efluentes para cada fase operacional nos RC e RS estão apresentados na Tabela 28.

Tabela 28 - Valores médios do pH e alcalinidade afluente e efluente em cada fase para o reator controle e salino.

		Afluente		**Efluente**	
		pH	Alcalinidade total ($mgCaCO_3\ L^{-1}$)	pH	Alcalinidade total ($mgCaCO_3\ L^{-1}$)
Reator Controle	Fase Única	7,96±0,1	244±13,4	7,96±0,18	141,2±31,2
Reator Salino	Fase I	7,54±0,35	238,7±7,2	7,3±0,6	54,3±14,5
	Fase II	7,77±0,1	255,6±7,8	8,08±0,06	167,1±20,5
	Fase III	7,8±0,17	267,1±4,3	7,95±0,03	182±9,1

Fonte: Autoria própria.

Foi observada pouca variação nos valores médios do pH afluente e efluente, os quais estiveram próximos a neutralidade em todas as fases. Estes valores médios estão contidos na faixa indicada para o bom desempenho da nitrificação e desnitrificação heterotrófica (AHN, 2006; METCALF; EDDY, 2003) e semelhante às médias obtidas por Moura (2014) e Santos et al. (2016).

Como descrito nas equações 04 e 06 (página 18), os processos de nitrificação e desnitrificação completa (via nitrato) influenciam diretamente na alcalinidade do meio reacional, uma vez que 7,14 mg de $CaCO_3$ são consumidos para cada 1 mg de $N\text{-}NH_4^+$ oxidado e 3,57 mg de $CaCO_3$ é gerado para cada 1mg de $N\text{-}NO_3^-$ reduzido a N_2. Para que uma concentração de 60 mg $N\text{-}NH_4^+$ L^{-1} (concentração afluente teórica) fosse oxidada, seriam necessários 428,4 mg de $CaCO_3$ L^{-1}. Para tanto, esta alcalinidade deveria ser fornecida ao sistema. Considerando-se que a solubilidade dos compostos $CaCO_3$ e $MgCO_3$ é muito baixa, apenas 500 mg de $NaHCO_3$ foi adicionado para cada litro de afluente, fornecendo uma alcalinidade teórica de 297 mg$CaCO_3$ L^{-1}. Esta medida foi adotada para que concentrações elevadas de HCO_3^- no pH do meio reacional não pudessem deslocar o equilíbrio químico das formas inorgânicas de carbono propiciando a formação de CO_3^{2-}, o que poderia precipitar os cátions Mg^{2+} e Ca^{2+}, comprometendo a salinidade do meio.

Desta forma, trabalhou-se com concentrações inferiores de alcalinidade e a partir dos resultados apresentados (Tabela 28), observou-se que este parâmetro não foi limitante para o processo, uma vez que uma elevada eficiência de oxidação do $N\text{-}NH_4^+$ foi alcançada na Fase 1 com a presença de alcalinidade residual no efluente. A Tabela 29 apresenta o balanço de massa que relaciona as alcalinidades afluente e efluente teóricas e medidas, a alcalinidade teórica consumida (necessária para oxidar a concentração média de $N\text{-}NH_4^+$ que foi oxidado) e a alcalinidade teórica gerada (produzida pela redução da concentração de $N\text{-}NO_3$ que foi reduzido).

Tabela 29 - Balanço de massa referente a alcalinidade gerada e consumida no meio reacional em cada fase.

		Nitrogênio nitrificado (mgN L^{-1})	Nitrogênio desnitrificado (mgN L^{-1})	Alcalinidade consumida (mg$CaCO_3$ L^{-1})	Alcalinida de gerada (mg$CaCO_3$ L^{-1})	Alcalinidade Afluente (mg$CaCO_3$ L^{-1})		Alcalinidade Efluente (mg$CaCO_3$ L^{-1})	
						Teórica	Real	Teórica	Real
Reator Controle	Fase única	38,5	36,1	274,6	128,7	297	244,1	98,2	141,5
Reator Salino	Fase I	59,7	40,8	426,1	145,7	297	238,7	-41,7	54,3
	Fase II	39,2	39,1	279,6	139,4	297	255,6	115,4	167,1
	Fase III	9,5	9,4	67,5	33,6	297	267,2	233,3	182

Fonte: Autoria própria.

Com este balanço, observa-se um déficit teórico de alcalinidade na Fase 1 do reator salino considerando-se a nitrificação a nitrato, o que não foi observado nos valores reais quantificados. Além disso, observa-se que as alcalinidades efluentes reais foram sempre maiores que as teóricas, indicando novamente uma outra fonte de alcalinidade

presente no sistema. Isto se deve possivelmente à ocorrência conjunta de outros processos, como a desnitrificação por via curta com a redução do NO_2^- a N_2 antes de formar NO_3^- (equação 05) (página 18), consumindo menos alcalinidade, ou ainda a geração de HCO_3^- pela constante aeração do meio reacional a qual insere CO_2 no sistema, podendo propiciar a formação de HCO_3^- a partir do deslocamento do equilíbrio químico das formas inorgânicas de carbono mediante ao elevado pH do meio reacional.

Os autores Moura (2011; 2014) e Santos (2014) não observaram fenômeno semelhante uma vez que trabalharam com excesso de alcalinidade fornecida para que não houvesse limitação do sistema.

A série de sólidos suspensos foi determinada ao longo do período operacional a cada duas semanas para se verificar a capacidade de rentenção celular nos reatores de leito fixo estruturado. Os resultados apresentam-se na Tabela 30.

Tabela 30 - Concentração média dos sólidos suspensos voláteis (SSV), sólidos suspensos fixos (SSF) e sólidos suspensos totais (SST) no efluente dos reatores RC e RS.

	Reator Controle	Reator Salino		
	Fase Única	Fase I	Fase II	Fase III
SSV (mg L^{-1})	47,5±9,94	74±7,35	79,38±11,75	153,38±8,32
SSF (mg L^{-1})	3,5±2,4	65,39±17,86	116,61±23,11	182±10,59
SST (mg L^{-1})	51±10,3	68,67±26,14	136,57±26,29	205,24±42,83

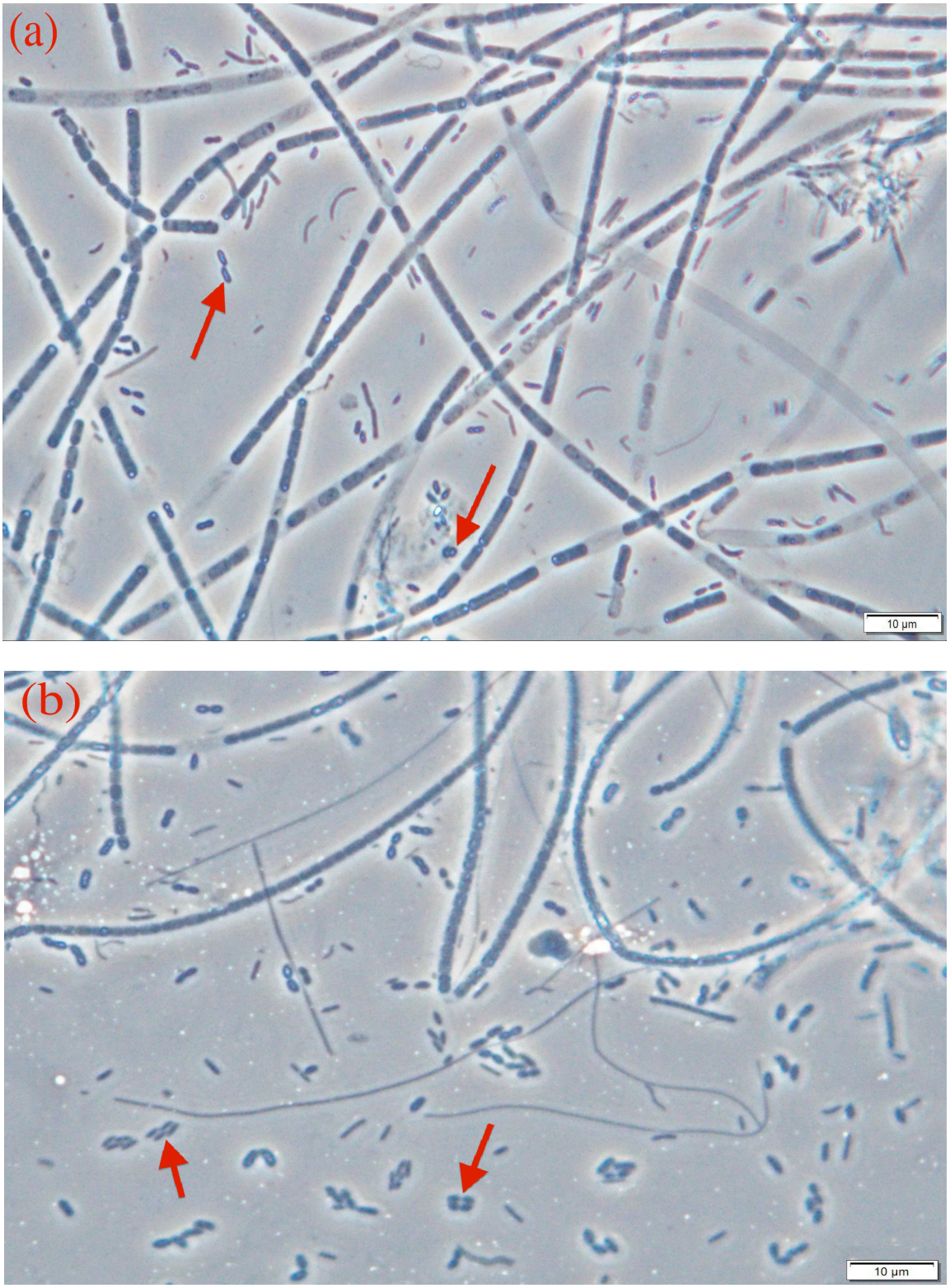
Fonte: Autoria própria.

A partir dos resultados observa-se que esta configuração de reator permite elevada retenção celular, uma vez que os valores médios referentes aos SSV foram baixos e corroboram a faixa de valores relatados por Moura (2011; 2014) e Santos (2014).

5.3.5 Microscopia óptica de contraste de fase

Amostras do material biológico de aparência polimérica apresentado na Figura 39 coletados no 36° e 47° dias operacionais do RC e RS, respectivamente, foram analisados por microscopia de contraste de fase e as imagens estão apresentadas nas Figuras 46 (a) e (b). Observa-se que este material é composto por uma possível EPS e bactérias de diversas morfologias.

Figura 46 - Microscopia de contraste de fase do material biológico coletado no RC (a) e no RS (b) com observação em escala de 10μm indicada nas figuras. As setas indicam morfologias bacterianas como bacilos e cocos.



Fonte: Autoria própria.

As imagens permitem concluir que as estruturas morfológicas do material biológico viscoso nos reatores RC e RS são semelhantes. Também, pela morfologia, observa-se que na EPS estão principalmente bactérias filamentosas, bacilos e cocos, corroborando o descrito por Tay et al. (2001), cuja análise de uma amostra de um sistema de lodos ativados mostrou dominância dessas bactérias.

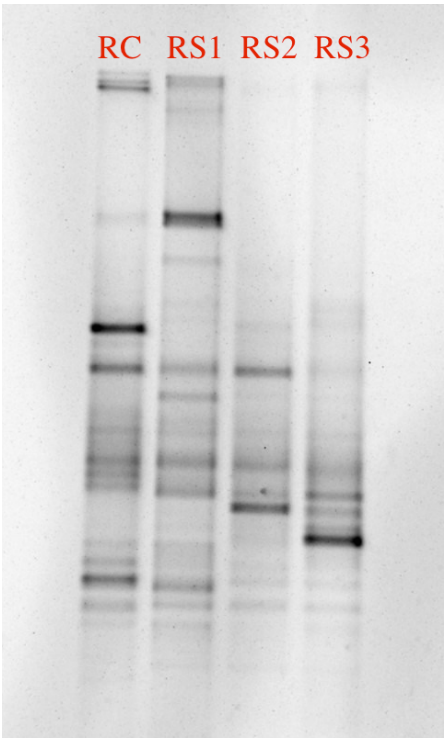
Estruturas morfológicas semelhantes a deste trabalho também foram descritas por Mesquita et al. (2016) em um sistema de lodos ativados. Semelhante material biológico também foi relatado por Moura (2011; 2014) e Santos (2014) ao longo da operação de reatores de leito fixo estruturado utilizados para a remoção de matéria orgânica e nitrogenada.

Como indicado pelas setas nas Figuras 46 (a) e (b), observa-se a presença de bacilos e cocos, podendo compreender organismos heterotróficos desnitrificantes e autotróficos nitrificantes, respectivamente (BRENNER et al., 2005; SICH; VAN RIJN, 1997). Segundo Verbaendert et al. (2011), bactérias desnitrificantes são compreendidas em maioria na Gênero *Bacillus*. A presença ao longo de todo período operacional da EPS pode estar relacionada à presença de populações bacterianas do gênero *Paenibacillus* identificado por sequenciamento genético da biomassa aderida às hastes de espuma que está discutido no item 5.3.6 deste trabalho.

5.3.6 Análises de biologia molecular

Amostras da biomassa aderida ao material suporte foram coletadas ao fim das fases operacionais 1, 2 e 3 do RS e ao fim da fase única do RC para análises de biologia molecular. As populações bacterianas das quatro amostras foram comparadas por PCR/DGGE. A Figura 47 apresenta o gel de DGGE referente às amostras do reator controle (RC), da fase 1 do RS (RS1), da fase 2 do RS (RS2) e da fase 3 do RS (RS3). Observa-se que a estrutura das comunidades microbianas foi afetada pelas diferentes salinidades aplicadas quando comparadas entre si e à comunidade estabelecida do RC.

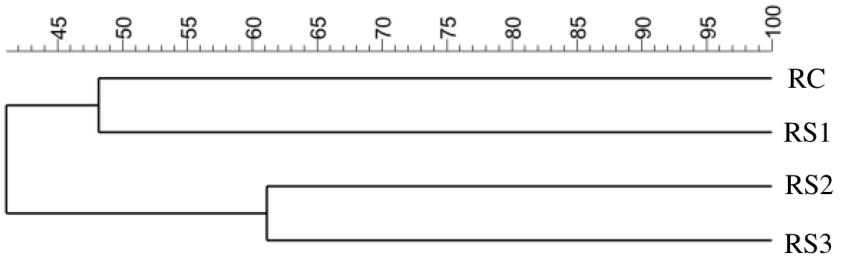
Figura 47 - DGGE das amostras de biomassa coletadas no reator controle (RC) e nas três fases operacionais do reator salino (RS1, RS2 e RS3).



Fonte: Autoria própria.

O dendograma apresentado na Figura 48 foi gerado a partir do perfil de bandas do DGGE da Figura 47 e foi utilizado para comparar a similaridade das populações de bactérias entre as condições.

Figura - 48 - Dendograma das amostras referentes às fases operacionais dos reatores controle e salino. RC: reator controle; RS1: reator salino fase 1; RS2: reator salino fase 2; RS3: reator salino fase 3.



Fonte: Autoria própria.

Para melhor relacionar os resultados apresentados nas figuras 47 e 48, a Tabela 31 apresenta as principais características de cada fase operacional quanto à composição da salinidade do afluente.

Tabela 31 - Composição da salinidade afluente nos reatores contínuos RC e RS em cada fase operacional.

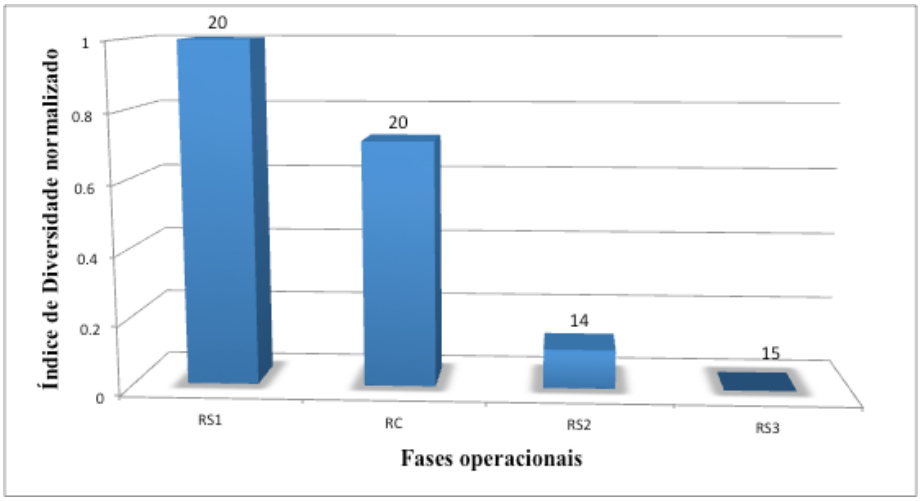
	Fase operacional	Pressão Osmótica (atm)	Salinidade (wt%)	NaCl (g L^{-1})	$MgCl_2$ (g L^{-1})	$CaCl_2$ (g L^{-1})
Reator Controle	FA e FU	-	-	Macronutrientes		
Reator Salino	FA e F1	1,7	0,3	1,78	0,87	0,24
	F2	5,25	1	6,22	2,62	0,80
	F3	9	1,7	11,2	4,71	1,44

Fonte: Autoria própria.

As fases operacionais do reator salino possuem baixa similaridade com a comunidade microbiana do reator controle, sendo de 48% para a Fase 1 e 42% para as Fases 2 e 3 comparadas ao RC, respectivamente. A Fase 1 também possui apenas 42% de similaridade com as duas seguintes fases operacionais e as Fases 2 e 3 possuem 62% de similaridade entre si, evidenciando que o aumento da PO modifica a comunidade microbiana no sistema.

Os Índices de diversidade (Shannon) e riqueza (Chao) foram calculados a partir da intensidade das bandas do DGGE por meio do software Past®. Os índices de Shannon e Chao variaram de 2,03 a 2,6 e de 20 a 14, respectivamente. Os índices de diversidade foram normalizados de 0 a 1, onde 0 corresponde ao menor índice encontrado e 1 ao maior. No gráfico da Figura 49, as condições experimentais estão dispostas da que continha maior índice de diversidade para a de menor. A riqueza relativa de Chao, que representa o número de bandas da amostra, está disposto para cada condição na extremidade superior da representação gráfica.

Figura - 49 - Índice de diversidade Shannon normalizado para cada fase operacional dos reatores controle e salino e seus respectivos Índices Chao (número de bandas), dispostos acima de cada coluna.

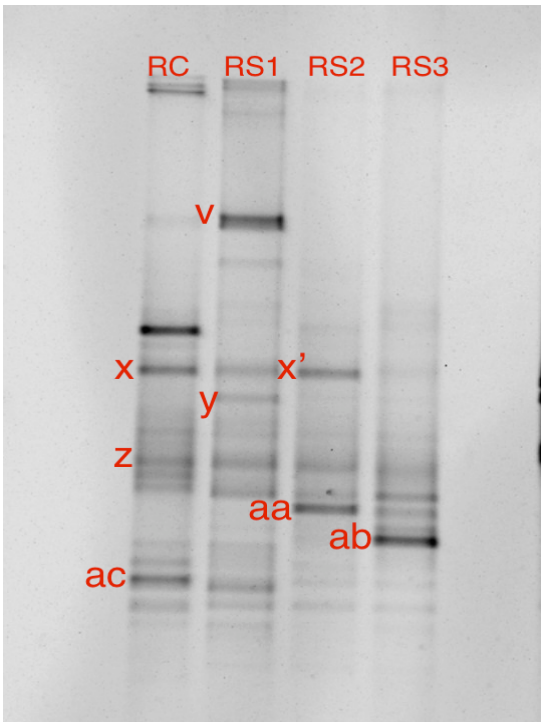


Fonte: Autoria própria.

A presença de sais que compuseram uma PO de 1,7 atm aumentou a diversidade microbiana quando comparadas às condições RS1 e RC. Estes resultados são similares ao descrito por outros autores a respeito da redução insignificante na riqueza taxonômica com o aumento da salinidade e do indicativo de que a flora bacteriana dos ambientes salinos seja tão diversa quanto a flora de ambientes de água doce (BEN-DOV et al., 2008; GALINSKI; TRUPER, 1994; HERLEMANN et al., 2011; WANG et al., 2011; ZAHRAN, 1996).

Afim de identificar as população de bactérias que permaneceram ou se intensificaram nas condições operacionais aplicadas, foi feito o recorte das bandas (indicadas na figura por letras) de interesse do gel de DGGE em duplicatas, para o sequenciamento genético (Figura 50).

Figura 50 - Bandas que foram recortadas para a identificação das populações do domínio *Bacteria* por sequenciamento proveniente da biomassa dos reatores controle e salino nas fases estudadas.



Fonte: Autoria própria.

O sequenciamento resultou na identificação das populações de maior interesse para compreensão do processo de NDS. A Tabela 32 apresenta as bandas sequenciadas e suas respectivas similaridades com as sequências de microrganismos do domínio

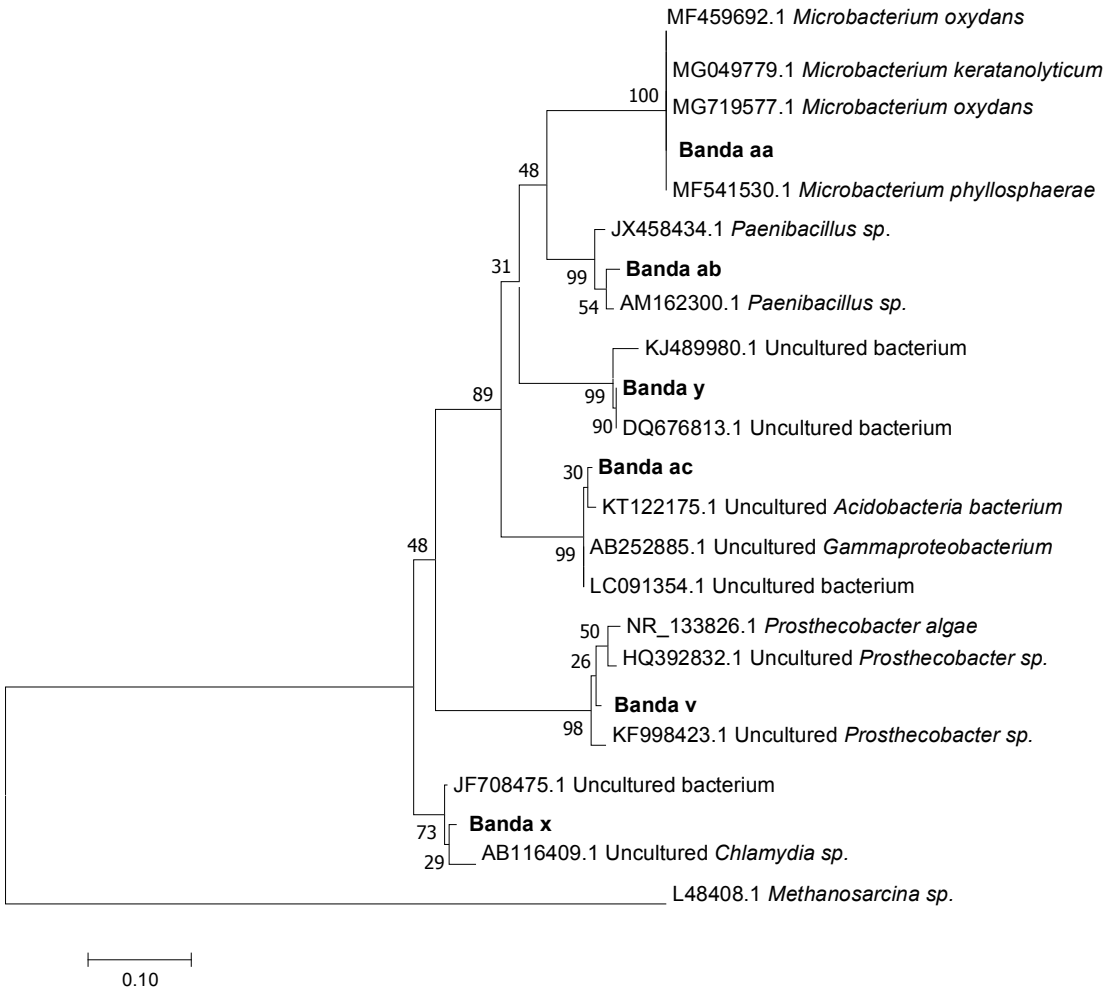
Bacteria relatadas no banco genético Blast NCBI. As populações identificadas são apresentadas na árvore filogenética da Figura 51.

Tabela 32 - Identificação das populações do domínio *Bacteria* das bandas recortadas do gel de DGGE das amostras dos reatores contínuos.

Banda	Microrganismo	Número de acesso	Similaridade (%)	Classificação taxonomica
v	*Prosthecobacter sp.*	HQ392832.1	98	*Bacteria; Verrucomicrobia; Verrucomicrobiae; Verrucomicrobiales; Verrucomicrobiaceae; Prosthecobacter.*
x	Uncultured *Chlamydia sp.*	AB116409.1	99	*Bacteria; Chlamydiae; Chlamydiales; Chlamydiae; Chlamydiaceae; Chlamydia.*
y	Uncultured bacterium	DQ676813.1	100	*Bacteria;* environmental samples.
aa	*Microbacterium oxydans*	MG719577.1	100	*Bacteria; Actinobacteria; Micrococcales; Microbacteriaceae; Microbacterium.*
ab	*Paenibacillus sp.*	JX458434.1	97	*Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Paenibacillaceae; Paenibacillus.*
ac	Uncultured *Gamma proteobacterium*	AB252885.1	99	*Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria.*

Fonte: Autoria própria.

Figure 51 - Árvore filogenética dos microrganismos sequenciados referentes aos reatores contínuos (Grupo externo: *Methanosarcina sp*.).



Fonte: Autoria própria.

O DNA da banda ***z*** identificada por no gel da Figura 49 não foi recuperado. A banda ***x***, por sua vez, possui 99% de similaridade com bactérias do gênero *Chlamydia*. Este gênero bacteriano já foi discutido e relacionado ao processo de nitrificação e desnitrificação em sistemas de tratamento nos resultados deste trabalho (5.1.5 Sequenciamento genético).

A banda ***v*** possui 98% de similaridade com bactérias do gênero *Prosthecobacter* o qual está associado à remoção de matéria orgânica e nitrogenada em sistemas de tratamento de águas residuárias. Esta população microbiana se intensificou na condição

RS1, o que indica que são beneficiadas pela presença de sais em concentrações amenas. Os trabalhos de Liu et al. (2005) e Zielińska et al. (2016) relataram a identificação deste gênero em sistemas de lodos ativados associados ao processo de desnitrificação. Sun et al. (2018) relacionaram esse gênero bacteriano à remoção de nitrogênio em sistema de bateladas sequencial sob baixas concentrações de oxigênio dissolvido em aeração intermitente.

A banda ***aa*** possui 100% de similaridade com bactérias *Microbacterium oxydans* e esteve presente nas condições RS2 e RS3, mostrando que são beneficiadas pela presença de sais em concentrações mais elevadas. O gênero *Microbacteirum* tem sido amplamente relatado na literatura em trabalhos relacionados à remoção de nitrogênio, em processos de desnitrificação heterotrófica (NTOUGIAS et al., 2015; QIN et al., 2017; ZHOU et al., 2015) e nitrificação heterotrófica aeróbia com a conversão de nitrogênio amoniacal a dinitrogênio (MUTHUKRISHNAN et al., 2012; ZHANG et al., 2013, 2015). O gênero *Microbacterium* também está relacionado à tolerância a elevada salinidade no tratamento de águas residuárias industriais (CALHEIROS et al., 2010; LI et al., 2013) e em ambientes aquáticos naturais (LI et al., 2005; MANDACOVIK et al., 2015).

A banda ***ab*** esteve presente em todas as condições operacionais, sendo intensificada na condição RS3, a qual possuia maior salinidade. Esta banda apresenta similaridade a um gênero bacteriano pertencente à classe *Bacilli* a qual enquadra o maior número de populações capazes de desempenhar a desnitrificação (VERBAENDERT et al., 2011). Esta banda possui 97% de similaridade com bactérias do gênero *Paenibacillus* associadas a processos de tratamento de águas residuárias para a remoção de nitrato (HEYLEN et al., 2006; SHAO et al., 2013; VERBAENDERT et al., 2011). Este gênero bacteriano possui ampla versatilidade em processos relacionados ao ciclo do nitrogênio, tendo capacidade de atuar em processos de nitrificação heterotrófica e amonificação, além da desnitrificação via $N\text{-}NO_3^-$ (BEHRENDT et al., 2010). *Paenibacillus sp.* foram isolados de ambientes marinhos para a inoculação de um sistema de aquicultura a fim de remover matéria nitrogenada, sendo identificadas populações pertencentes a este gênero capazes de nitrificar autotroficamente e desnitrificar heterotroficamente (KUMAR et al., 2013). Este resultado corrobora o encontrado neste trabalho, já que a banda ***ab*** foi

intensificada com o aumento da pressão osmótica (Fase 3), indicando ser beneficiada por ambientes com elevada salinidade.

Bactérias do gênero *Paenibacillus* também são relacionadas na literatura por produzir uma EPS que desempenha atividade biofloculante e bioemulsificante (GUDIÑA et al., 2015; LI et al., 2013). Esta EPS é composta por glicose, ácido glucurônico, manose e xilose e foi testada para o tratamento de águas residuárias na remoção de metais tóxicos (como Cu) e corantes, podendo ser aplicada também na biorremediação ambiental. Ainda, a produção desta EPS não foi afetada pela salinidade do meio, sendo produzida sob salinidades tão altas quanto 30 wt% NaCl (GUDIÑA et al., 2015; LI et al., 2013). No presente trabalho, esta bactéria pode ser responsável pelo material de aparência polimérica descrito anteriormente que crescia aderido às hastes de espuma. A banda ***ab*** esteve presente em todas as condições apresentadas no gel de DGGE, intensificada na condição RS3, assim como o EPS descrito.

Finalmente, a banda ***ac*** possui 100% de similaridade com bactérias do filo *Acidobacteria*, o qual tem sido identificado em trabalhos que avaliaram a remoção de matéria nitrogenada em sistemas de lodos ativados (HU et al., 2012; JURETSCHKO et al., 2002). Esta banda esteve presente apenas nas condições RC e RS1, o que indica que esta população possivelmente não é halotolerante.

5.4 Discussão geral dos resultados das Partes I, II e III deste trabalho

Três diferentes seções (Partes I, II e III) foram utilizadas para a apresentação e discussão dos dados obtidos neste trabalho para a melhor compreensão dos objetivos e resultados de cada etapa. Neste item será feita uma breve discussão de todos os resultados, relacionando-os.

Por meio da ferramenta estatística utilizada, foi possível observar que nos níveis estudados, os quais são relacionados às águas residuárias reais, os sais cloreto de sódio, de magnésio e de cálcio inibem diferentemente a atividade microbiana nitrificante, sendo o cloreto de sódio o mais inibidor, seguido dos cloretos de magnésio e cálcio. Também, para esta comunidade, o efeito de segunda maior magnitude foi o efeito positivo da interação dos sais NaCl e $MgCl_2$. Para a comunidade desnitrificante, submetida a experimento similar, apesar da ordem de inibição dos sais seguir a mesma identificada para a comunidade nitrificante, o efeito positivo da interação entre os sais foi menor. No reator contínuo, as diferentes influências dos sais de estudo não seriam possíveis de serem identificadas, uma vez que o reator foi operado com uma solução de eletrólitos mistos.

Os ensaios em batelada, tanto para a comunidade nitrificante quanto para a desnitrificante, mostraram que o efeito específico da toxicidade de um sal foi maior que o efeito inespecífico da pressão osmótica, já que nenhum padrão foi identificado mediante as soluções isotônicas compostas por diferentes constituintes. Verificou-se que para a comunidade microbiana nitrificante, a PO de 5 atm não foi prejudicial à atividade metabólica, já que valores superiores ao ensaio controle foram encontrados, tanto para soluções de eletrólitos mistos quanto individuais, com exceção do cloreto de cálcio isolado. Isto não foi observado para a comunidade desnitrificante, a qual se mostrou afetada negativamente pela adição dos sais nas concentrações estudadas independentemente da composição do meio reacional. Para o sistema contínuo, um sistema dinâmico, a aplicação de uma pressão osmótica de 5 atm de eletrólitos mistos foi prejudicial ao sistema, reduzindo a eficiência de oxidação de $N\text{-}NH_4^+$ de 95,9 para 60,8%.

Os resultados dos reatores em bateladas permitiram identificar que a inibição causada pelos sais nas atividades nitrificantes e desnitrificantes foi determinada pela

influência da natureza dos sais e pela interação entre eles, independentemente da pressão osmótica da solução, evidenciando a importância de considerar efeitos antagônicos, sinérgicos e estimulantes (KULGEMAN; McCARTY, 1965; McCARTY; McKINNEY, 1961). No sistema contínuo, apenas o efeito conjunto destes sais foi avaliado, podendo-se inferir a partir das bateladas, que possivelmente a pressão osmótica não foi determinante no processo, apesar de influenciá-lo, mas sim a toxicidade específica dos sais em mistura.

A partir das análises de biologia molecular de PCR/DGGE dos sistemas descontínuos, a comunidade microbiana em ambientes salinos mostrou-se tão ou mais diversa que sua contraparte de ambientes de água doce, corroborando o disposto na literatura. Para as soluções de eletrólitos mistos, foi observado que o $CaCl_2$ afetou a atividade metabólica da comunidade desnitrificante, apesar de não modificar a estrutura microbiana desenvolvida nas bateladas, uma vez que a similaridade microbiana entre condições com concentrações distintas deste sal foi elevada (superior à 90%). O mesmo foi observado para o $MgCl_2$ em relação a comunidade microbiana nitrificante.

Com isso, pode-se inferir que quando em mistura, apesar destes sais influenciarem a atividade metabólica dos organismos desnitrificantes e nitrificantes, as populações sofrem de maneira mais evidente um processo de seleção que de adaptabilidade aos sais. Ou seja, os compostos inorgânicos são capazes de reduzir a cinética microbiana, apesar de permitir que as populações permaneçam no meio, multiplicando-se. Uma vez que a capacidade de multiplicação é evidenciada pelo crescimento de determinadas populações em relação a outras, mais uma vez o efeito tóxico específico destaca-se quando comparado ao efeito da PO em sistemas de tratamento. A inibição da atividade metabólica ocorre, possivelmente, por meio da regulação osmótica por solutos compatíveis, permitindo que as populações possam crescer, o que indica que a PO aplicada não foi o limitante.

De modo geral, para POs semelhantes ou superiores, os sistemas descontínuos obtiveram melhor desempenho que o sistema contínuo, já que o RS não suportou uma PO de 9 atm, ao passo que elevada cinética foi alcançada para condições de PO superior, tanto neste trabalho como também nos descritos na literatura (UYGUR, 2006; WANG et al., 2015). Este fato pode estar relacionado à estratégia de inoculação adotada para o RS. Atrelado a isso, foi observado que as populações microbianas identificadas por

sequenciamento genético indicam que o inóculo de origem bentônica foi favorecido nos experimentos descontínuos, já que a maioria dos gêneros identificados estão associados a ambientes marinhos ou solos. Já para o sistema contínuo, o inóculo beneficiado foi possivelmente o proveniente do sistema de lodos ativados da Fábrica da Volksvagem - São Carlos - SP. Esta hipótese pode explicar os diferentes comportamentos observados nos sistemas descontínuos e contínuo, uma vez que diferentes comunidades microbianas se desenvolveram mediante cada condição. Nos reatores contínuos, a estratégia operacional de aumentar gradualmente a pressão osmótica aplicada, possivelmente ocasionou a lavagem do sistema de populações halotolerantes e selecionou as capazes de adaptar-se apenas a concentrações iniciais de sal.

6. Conclusão

Os resultados do presente trabalho permitiram concluir que nas condições estudadas os sistemas biológicos de tratamento de águas residuárias são severamente impactados pela alta concentração dos sais NaCl, $MgCl_2$ e $CaCl_2$, em mistura ou individualmente, mas também que a presença em concentrações moderadas pode ser benéfica. Além disto, conclui-se que a ferramenta estatística utilizada de planejamento experimental fatorial foi eficiente e adequada para se avaliar as diferentes magnitudes dos efeitos de inibição dos sais e identificar a interação entre eles, apesar de não ter sido possível o desenvolvimento de um modelo estatístico preditivo, já que o planejamento executado foi tão somente preliminar.

Observou-se que a toxicidade específica dos íons causa maior inibição da atividade metabólica microbiana que a toxicidade inespecífica da pressão osmótica exercida nas células. Por este motivo, nos processos estudados, apesar de acreditar-se que a capacidade bacteriana de osmoregularização está relacionada ao acúmulo de solutos compatíveis específicos para cada grupo microbiano e a composição da membrana celular destes organismos, a toxicidade dos íons é diferente para cada população bacteriana e decisiva para o desempenho dos processos avaliados.

As maiores constantes cinéticas obtidas foram de $1{,}1\times10^{-1}$ mgN $gSSV^{-1}$ min^{-1} para a nitrificação via $N\text{-}NH_4^+$ a 5 atm em solução de eletrólitos mistos e de $6{,}5\times10^{-2}$ mgN $gSSV^{-1}$ min^{-1} para a desnitrificação, na condição controle na qual não houve adição de sais. Em soluções com apenas um dos sais de estudo, o $MgCl_2$ foi o sal causador de menor inibição para a comunidade nitrificante, com taxa máxima de oxidação de amônio de $6{,}3\times10^{-2}$ mgN $gSSV^{-1}$ min^{-1} a 5 atm, e o NaCl para as desnitrificantes, com taxa máxima de desnitrificação de $4{,}3\times10^{-2}$ mgN $gSSV^{-1}$ min^{-1}. Para ambas as comunidades microbianas, o $CaCl_2$ foi o maior inibidor quando em solução de apenas um sal e o menor inibidor quando em solução de eletrólitos mistos.

Para os reatores contínuos, foi comprovado o bom estabelecimento da NDS sob aeração contínua sem o controle da concentração de OD, mediante as condições experimentais utilizadas, com a espuma de poliuretano como material suporte em hastes de 3 cm de diâmetro e TDH de 12 horas. A presença de sais em concentrações que

conferiam uma PO de 1,7 atm propiciou o melhor desempenho da NDS. As melhores eficiências de remoção de matéria orgânica e nitrogenada nos sitemas contínuos foram alcançadas para o RS na PO de 1,7 atm com cargas orgânicas carbonácea e nitrogenada removidas de 1,16 kgDQO m^{-3} dia^{-1} e 0,08 kgN m^{-3} dia^{-1}. Mediante as proporções aplicadas dos sais NaCl, $MgCl_2$ e $CaCl_2$, a comunidade microbiana não apresentou desempenho satisfatório quando submetido à PO de 9 atm. Quanto à remoção de matéria orgânica, as bactérias heterotróficas responsáveis pelo consumo de DQO foram pouco afetadas pelo aumento da PO, já que a eficiência de remoção caiu de 97,2 para 86,2% quando a PO foi aumentada de 1,7 para 9 atm.

Foi possível concluir ao se comparar este trabalho com relatados na literatura que o sistema de adaptação gradual às elevadas concentrações de sais não é necessariamente benéfico aos sistemas biológicos de tratamento nas condições estudadas, uma vez que as eficiências de remoção de matéria nitrogenada para cada condição experimental estão associadas à seleção das populações microbianas específicas. Desta forma, o sedimento bentônico de um ambiente salino utilizado como inóculo mostrou-se determinante para a inserção de populações capazes de atuar no ciclo do nitrogênio sob condições de elevada pressão osmótica, destacando-se os gêneros *Aeromonas*, *Rheinhemera*, *Azospirillum*, *Thioalkalivibrio* e *Pseudoalteromonas.* Além disso, os resultados da presente pesquisa corroboram os citados na literatura, a partir dos quais conclui-se que a diversidade microbiana de ambientes salinos é tão grande ou até mesmo maior que sua contraparte de ambientes de água doce.

O bom desempenho da NDS e elevadas eficiências de desnitrificação nos dois reatores, controle e salino, possivelmente esteve relacionado à estratificação do biofilme formado, abrigando as bactérias anóxicas desnitrificantes no interior da espuma e também ao desenvolvimento de populações microbianas capazes de desnitrificar em meio aeróbio, destacando-se a classe *Bacillus*. Ainda, o desenvolvimento da EPS formada nos dois reatores contínuos está provavelmente associado a bactérias do gênero *Paenibacillus* identificados por sequenciamento genético e à presença de bactérias filamentosas.

Referências

ABEDIN, M. A.; HABIBA, U.; SHAW, R. Community perception and adaptation to safe drinking water scarcity: salinity, arsenic, and drought risks in coastal bangladesh. **International Journal of Disaster Risk Science**, v. 5, n. 2, p. 110–124, June 2014.

ABEYTA, C.; WEKELL, M. M. Potential sources of aeromonas hydrophila. **Journal of Food Safety**, v. 9, n. 1, p. 11–22, abr. 1988.

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

ADAMS, S. et al. Hydrochemical characteristics of aquifers near Sutherland in the Western Karoo, South Africa. **Journal of Hydrology**, v. 241, n. 1–2, p. 91–103, Jan. 2001.

AHN, Y.-H. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: a review. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 8, p. 1709–1721, Aug. 2006.

ALOUI, F. et al. Performances of an activated sludge process for the treatment of fish processing saline wastewater. **Desalination**, v. 246, n. 1–3, p. 389–396, Sept. 2009.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21st ed. Washington, DC: APHA, 2005.

AMINZADEH, B. et al. Salt inhibition effects on simultaneous heterotrophic/autotrophic denitrification of high nitrate wastewater. **International Journal of Environmental Research**, v. 4, n. 2, p. 255-262. 2010.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. Biochemical engineering fundamentals. **Chemical Engineering Education**, v. 10, n. 4, p. 162-165, 1976.

BARANA, A. C. et al. Nitrogen and organic matter removal in an intermittently aerated fixed-bed reactor for post-treatment of anaerobic effluent from a slaughterhouse wastewater treatment plant. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 1, n. 3, p. 453–459, Sept. 2013.

BATES, R. G.; STAPLES, B. R.; ROBINSON, R. A. Ionic hydration and single ion activities in unassociated chlorides at high ionic strengths. **Analytical Chemistry**, v. 42, n. 8, p. 867–871, July 1970.

BEHRENDT, U. et al. Characterization of heterotrophic nitrifying bacteria with respiratory ammonification and denitrification activity – Description of Paenibacillus uliginis sp. nov., an inhabitant of fen peat soil and Paenibacillus purispatii sp. nov., isolated from a spacecraft assembly clean room. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 33, n. 6, p. 328–336, Oct. 2010.

BEN-DOV, E. et al. Changes in microbial diversity in industrial wastewater evaporation ponds following artificial salination: Bacterial diversity in wastewater following salination. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 66, n. 2, p. 437–446, Nov. 2008.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Programa água doce** – documento base. Brasília (DF), 2012. Acesso em:<www.mma.gov.br>. Acesso em: 10 ago. 2017.

BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed. New York: Springer, 2005. v.2.

BRETTAR, I.; MOORE, E. R. B.; HÖFLE, M. G. Phylogeny and abundance of novel denitrifying bacteria isolated from the Water Column of the Central Baltic Sea. **Microbial Ecology**, v. 42, n. 3, p. 295–305, 2001.

BUENO, R. F. **Nitrificação e desnitrificação simultânea em reator com biomassa em suspensão e fluxo contínuo de esgoto**. 2011. 115p. Dissertação [Mestrato] - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

BUENO, R. F. et al. Simultaneous nitrification and denitrification in the activated sludge systems of continuous flow. **Environmental Technology**, v. 39, n. 20, p. 2641–2652, Oct. 2018.

BOWMAN, J. P. Pseudoalteromonas prydzensis sp. nov., a psychrotrophic, halotolerant bacterium from Antarctic sea ice. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 1037-1041, 1998.

CABRAL, J. J. et al. Groundwater management in Recife. **Water International**, v. 33, n. 1, p. 86–99, 2 Apr. 2008.

CALHEIROS, C. S. C. et al. Bacterial community dynamics in horizontal flow constructed wetlands with different plants for high salinity industrial wastewater polishing. **Water Research**, v. 44, n. 17, p. 5032–5038, Sept. 2010.

CAO, Y. et al. The Effect of dissolved oxygen concentration (DO) on oxygen diffusion and bacterial community structure in moving bed sequencing batch reactor (MBSBR). **Water Research**, v. 108, p. 86–94, Jan. 2017.

CAPPELLO, S. et al. Oil-degrading bacteria from a membrane bioreactor (BF-MBR) system for treatment of saline oily waste: Isolation, identification and characterization of the biotechnological potential. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 110, p. 235–244, May 2016.

CARDONA, A. et al. Salinization in coastal aquifers of arid zones: an example from Santo Domingo, Baja California Sur, Mexico. **Environmental Geology**, v. 45, n. 3, p. 350–366, Jan. 2004.

CARTER, J. P. Soil and sediment bacteria capable of aerobic nitrate respiration. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 8, p. 2852-2858, Aug. 1995.

CARY, L. et al. Origins and processes of groundwater salinization in the urban coastal aquifers of Recife (Pernambuco, Brazil): a multi-isotope approach. **Science of The Total Environment**, v. 530–531, p. 411–429, Oct. 2015.

CASTIGNETTII, D.; HOLLOCHER, T. C. Heterotrophic nitrification among denitrifiers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 4, p.620-623, Apr. 1984.

CHEN, M. et al. Impact resistance of different factors on ammonia removal by heterotrophic nitrification–aerobic denitrification bacterium aeromonas sp. HN-02. **Bioresource Technology**, v. 167, p. 456–461, Sept. 2014.

CHEN, Y.; CHENG, J. J.; CREAMER, K. S. Inhibition of anaerobic digestion process: a review. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 4044–4064, July 2008.

CORSINO, S. F. et al. Simultaneous nitritation–denitritation for the treatment of high-strength nitrogen in hypersaline wastewater by aerobic granular sludge. **Water Research**, v. 88, p. 329–336, Jan. 2016.

CUI, Y. W. et al. The effects of salinity on nitrification using halophilic nitrifiers in a sequencing batch reactor treating hypersaline wastewater. **Scientific Reports**, v. 6, article number 24825, 2016.

CYDZIK-KWIATKOWSKA, A.; ZIELIŃSKA, M. Bacterial communities in full-scale wastewater treatment systems. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 4, Apr. 2016. DOI: 10.1007/s11274-016-2012-9.

DAMIANOVIC, M. H. R. Z. et al. Specific activity bioassays as tools to evaluate combined nitrogen and organic matter removal in SND systems. **Environmental Engineering Science**, v. 35, n. 9, p. 961–970, Sept. 2018.

DASSARMA, S.; DASSARMA, P. Halophiles. In: ENCYCLOPEDIA of life science. New York: John Wiley, 2006.

DAVIES, C. W. The Extent of dissociation of salts in water. Part VIII. An equation for the mean ionic activity coefficient of an electrolyte in water, and a revision of the dissociation constants of some sulphates. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, Paper 397, p. 2093-2098, 1938. DOI: http://dx.doi.org/10.1039/JR9380002093.

DI BELLA, G.; TORREGROSSA, M. Simultaneous nitrogen and organic carbon removal in aerobic granular sludge reactors operated with high dissolved oxygen concentration. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 706–713, Aug. 2013.

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

DING, D. et al. Domestic sewage treatment in a sequencing batch biofilm reactor (SBBR) with an intelligent controlling system. **Desalination**, v. 276, n. 1–3, p. 260–265, Aug. 2011.

DUAN, J. et al. Characterization of a halophilic heterotrophic nitrification–aerobic denitrification bacterium and its application on treatment of saline wastewater. **Bioresource Technology**, v. 179, p. 421–428, Mar. 2015.

EBELING, J. M.; TIMMONS, M. B.; BISOGNI, J. J. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems. **Aquaculture**, v. 257, n. 1–4, p. 346–358, June 2006.

EL YAOUTI, F. et al. Salinization processes in the unconfined aquifer of Bou-Areg (NE Morocco): a geostatistical, geochemical, and tomographic study. **Applied Geochemistry**, v. 24, n. 1, p. 16–31, Jan. 2009.

FEIJOO, G. et al. Sodium inhibition in the anaerobic digestion process: antagonism and adaptation phenomena. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, n. 2, p. 180–188, Feb. 1995.

FENG, L. et al. Simultaneous nitrification–denitrification and microbial community profile in an oxygen-limiting intermittent aeration SBBR with biodegradable carriers. **Biodegradation**, v. 29, n. 5, p. 473–486, Oct. 2018.

FOSTER, S.; TUINHOF, A. **Brazil, Kenya**: subsurface dams to augment groundwater storage in basement terrain for human subsistence. Washington, DC: World Bank Sustainable Groundwater Management Lessons from Practice, 2004.

FOWLER, G. J. Some newly observed links in the nitrogen cycle. **Proceedings of the National Institute of Sciences of India**, v. 13, n. 1, p. 5-24, 1947.

FRITSCHE, W.; HOFRICHTER, M. Aerobic degradation of recalcitrant organic compounds by microorganisms. In: JÖRDENING, H.-J.; WINTER, J. (Ed.). **Environmental Biotechnology**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2005. p. 203–227.

FU, B. et al. Characterization of microbial community in an aerobic moving bed biofilm reactor applied for simultaneous nitrification and denitrification. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 11, p. 1981–1990, Nov. 2010.

FUKUCHI, S. et al. Unique amino acid composition of proteins in halophilic bacteria. **Journal of Molecular Biology**, v. 327, n. 2, p. 347–357, Mar. 2003.

GALINSKI, E. A.; TRUPPER, H. G. Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2–3, p. 95–108, Oct. 1994.

GAO, X. Y. et al. Bacterial diversity, community structure and function associated with biofilm development in a biological aerated filter in a recirculating marine aquaculture system. **Marine Biodiversity**, v. 42, n. 1, p. 1–11, Mar. 2012.

GARRELS, R. M.; CHRIST, C. L. **Minerals, solutions, and equilibria**. San Francisco: W.H.Freeman, 1965.

GARRELS, R. M.; THOMPSON, M. E. A Chemical model for sea water at 25 degrees C and one atmosphere total pressure. **American Journal of Science**, v. 260, n. 1, p. 57-66, 1962.

GASHEMI, Y. et al. Halotoleraiit amylase production by a novel bacterial strain, rheinheimera aquimaris. **Research Journal of Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 144-149. 2010.

GIESEKE, A. et al. Simultaneous P and N removal in a sequencing batch biofilm reactor: insights from reactor- and microscale investigations. **Water Research**, v. 36, n. 2, p. 501–509, Jan. 2002.

GREENBERGAND, J. P.; MOLLER, N. The Prediction of mineral solubilities in natural waters: a chemical equilibrium model for the Na-K-Ca-Cl-S04-Hz0 system to high concentration from 0 to 250°C. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 53, n. 10, p. 2503-2518, Oct. 1989.

GUDIÑA, E. J. et al. Novel bioemulsifier produced by a Paenibacillus strain isolated from crude oil. **Microbial Cell Factories**, v. 14, n. 1, p. 14, 2015.

GUEVARA, R. et al. Changes in sediment bacterial community in response to long-term nutrient enrichment in a subtropical seagrass-dominated estuary. **Microbial Ecology**, v. 68, n. 3, p. 427–440, Oct. 2014.

HAMDIA, M. A.; EL-KOMY, H. M. Effect of salinity, gibberellic acid and Azospirillum inoculation on growth and nitrogen uptake of Zea mays. **Biologia plantarum**, v. 40, n.1, p. 109-120, 1997.

HAMDIA, M. A. E.-S.; SHADDAD, M. A. K.; DOAA, M. M. Mechanisms of salt tolerance and interactive efects of Azospirillum brasilense inoculation on maize cultivars grown under salt stress conditions**. Plant Growth Regulation**, v. 44, n. 2, p. 165-174, 2004.

HAMER, W. J.; WU, Y. C. Osmotic coefficients and mean activity coefficients of uni-univalent electrolytes in water at 25°C. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, v. 1, n. 4, p. 1047–1100, Oct. 1972.

HARNED, H. S.; OWEN, B. B. **The Physical chemistry of electrolytic solutions**. 3rded. New York: Reinhold, 1958.

HARVIE, C. E.; WEARE, J. H. The Prediction of mineral solubilities in natural waters: the Na^+ K^+ Mg^{2+} Ca^{2+} Cl^- SO_4^{2-} H_2O system from zero to high concentration at 25° C. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 44, n. 7, p. 981-997, 1980.

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

HE, S.; XUE, G.; WANG, B. Factors affecting simultaneous nitrification and de-nitrification (SND) and its kinetics model in membrane bioreactor. **Journal of Hazardous Materials**, v. 168, n. 2–3, p. 704–710, Sept. 2009.

HERLEMANN, D. P. et al. Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. **The ISME Journal**, v. 5, n. 10, p. 1571–1579, Oct. 2011.

HERNANDEZ, D.; DIAS, F. M.; ROWE, J. J. Nitrate transport and its regulation by O2 in pseudomonas aeruginosa. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 286, n. 1, p.159-163, Nov. 1991.

HEYLEN, K. et al. Cultivation of denitrifying bacteria: optimization of isolation conditions and diversity study. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 2637–2643, Apr. 2006.

HOLAKOO, L. et al. Simultaneous nitrogen and phosphorus removal in a continuously fed and aerated membrane bioreactor. **Journal of Environmental Engineering**, v. 131, n. 10, p. 1469–1472, Oct. 2005.

HOLT, H. M.; GAHRN-HANSEN, B.; BRUUN, B. Shewanella algae and shewanella putrefaciens: clinical and microbiological characteristics. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, n. 5, p. 347–352, May 2005.

HOQUE, Md. R. **Access to safe drinking water in rural bangladesh**: water governance by DPHE. 2009. Tese [Doutorado] - Isntitute of Governance Studies, Brac University, Dhaka, 2009.

HU, M. et al. Microbial community structures in different wastewater treatment plants as revealed by 454-pyrosequencing analysis. **Bioresource Technology**, v. 117, p. 72–79, Aug. 2012.

IVANOVA, E. P. et al. Phenotypic diversity of pseudoalteromonas citrea from different marine habitats and emendation of the description. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, n. 1, p. 247–256, Jan. 1998.

JACOBS, J. et al. Influence of environmental gradients on the abundance and distribution of mycobacterium spp. in a Coastal Lagoon Estuary. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7378–7384, Dec. 2009.

JALALI, M. Salinization of groundwater in arid and semi-arid zones: an example from Tajarak, western Iran. **Environmental Geology**, v. 52, n. 6, p. 1133–1149, May 2007.

JI, B.; WANG, H.; YANG, K. Tolerance of an aerobic denitrifier (Pseudomonas stutzeri) to high O2 concentrations. **Biotechnology Letters**, v. 36, n. 4, p. 719–722, Apr. 2014.

JI, B. et al. Aerobic denitrification: a review of important advances of the last 30 years. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 20, n. 4, p. 643–651, Aug. 2015.

JIANG, Y. China's water scarcity. **Journal of Environmental Management**, v. 90, n. 11, p. 3185–3196, Aug. 2009.

JIN, R. C. et al. The Inhibition of the anammox process: a review. **Chemical Engineering Journal**, v. 197, p. 67–79, July 2012.

JU, F.; ZHANG, T. Bacterial assembly and temporal dynamics in activated sludge of a full-scale municipal wastewater treatment plant. **The ISME Journal**, v. 9, n. 3, p. 683–695, Mar. 2015.

JURETSCHKO, S. et al. The Microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analyzed by the full-cycle rRNA approach. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 84–99, Jan. 2002.

KARGI, F.; DINCER, A. R. Effect of salt concentration on biological treatment of saline wastewater by fed-batch operation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, n. 7, p. 529-537, 1996.

KARTAL, B. et al. Adaptation of a freshwater anammox population to high salinity wastewater. **Journal of Biotechnology**, v. 126, n. 4, p. 546–553, Dec. 2006.

KHASKA, M. et al. Origin of groundwater salinity (current seawater vs. saline deep water) in a coastal karst aquifer based on Sr and Cl isotopes. Case study of the La Clape massif (southern France). **Applied Geochemistry**, v. 37, p. 212–227, Oct. 2013.

KIM, S. J. et al. Chujaibacter soli gen. nov., sp. nov., isolated from soil. **Journal of Microbiology**, v. 53, n. 9, p. 592–597, Sept. 2015.

KUENEN, J. G.; ROBERTSON, L. A. Combined nitrification-denitrification processes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2–3, p. 109–117, Oct. 1994.

KUGELMAN, I. J.; MCCARTY, P. L. Cation toxicity and stimulation in anaerobic waste treatment. **Journal (Water Pollution Control Federation)**, v. 37, n. 1, p. 97–116, 1965.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, July 2016.

KUMAR, V. R. et al. Molecular characterization of the nitrifying bacterial consortia employed for the activation of bioreactors used in brackish and marine aquaculture systems. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 78, p. 74-81, Mar. 2013.

LEE, N. M.; WELANDER, T. The Effect of different carbon sources on respiratory denitrification in biological wastewater treatment. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 82, n. 3, p. 277–285, 1996.

LEFEBVRE, O.; MOLETTA, R. Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: a literature review. **Water Research**, v. 40, n. 20, p. 3671–3682, Dec. 2006.

LI, J. P. et al. Nutrient removal from slaughterhouse wastewater in an intermittently aerated sequencing batch reactor. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 16, p. 7644–7650, Nov. 2008.

LI, O. et al. Optimization and characterization of polysaccharide-based bioflocculant produced by Paenibacillus elgii B69 and its application in wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v. 134, p. 87–93, Apr. 2013.

LI, W. J. et al. Microbacterium halotolerans sp. nov., isolated from a saline soil in the west of China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 67–70, Jan. 2005.

LIM, J.-W.; LIM, P.-E.; SENG, C.-E. Enhancement of nitrogen removal in moving bed sequencing batch reactor with intermittent aeration during REACT period. **Chemical Engineering Journal**, v. 197, p. 199–203, July 2012.

LIMA, E. A. et al. Mapa de variação da concentração total de sais das águas subterrâneas da região nordeste do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ÁGUAS SUBTERRÂNEAS, 15., 2008, Natal. **Anais…** Revista Águas Subterrâneas, Suplemento, 2008.

LIPPERT, K.; GALINSKI, E. Enzyme stabilization be ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 1, p. 61-65, Apr. 1992.

LIU, C. et al. Denitrifying sulfide removal process on high-salinity wastewaters. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 15, p. 6463–6469, Aug. 2015.

_____. Denitrifying sulfide removal process on high-salinity wastewaters in the presence of Halomonas sp. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 3, p. 1421–1426, Feb. 2016.

LIU, Y.; ZHANG, T.; FANG, H. H. P. Microbial community analysis and performance of a phosphate-removing activated sludge. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 11, p. 1205–1214, July 2005.

LLOYD, D.; BODDY, L.; DAVIES, K. J. P. Persistence of bacterial denitrification capacity under aerobic conditions" the rule rather than the exception. **FEMS Microbiology Letters**, v. 45, n. 3, p. 185-190, 1987.

LU, X. et al. Biodegradation of naphthalene by enriched marine denitrifying bacteria. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 1, p. 204–211, Jan. 2011.

MA, W. et al. Enhanced nitrogen removal from coal gasification wastewater by simultaneous nitrification and denitrification (SND) in an oxygen-limited aeration sequencing batch biofilm reactor. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 84–91, Nov. 2017.

MACINNES, D. A. The Activities of the ions of strong electrolytes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 41, n. 7, p. 1086–1092, July 1919.

MAHLKNECHT, J. et al. Groundwater recharge in a sedimentary basin in semi-arid Mexico. **Hydrogeology Journal**, v. 12, n. 5, p. 511–530, Oct. 2004.

MANDAKOVIC, D. et al. Complete genome sequence of microbacterium sp. CGR1, bacterium tolerant to wide abiotic conditions isolated from the Atacama Desert. **Journal of Biotechnology**, v. 216, p. 149–150, Dec. 2015.

MARIN, J. C. A.; CARAVELLI, A. H.; ZARITZKY, N. E. Nitrification and aerobic denitrification in anoxic–aerobic sequencing batch reactor. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 380–387, Jan. 2016.

MCCARTY, P. L.; MCKINNEY, R. E. Salt toxicity in anaerobic digestion. **Journal (Water Pollution Control Federation)**, v. 33, n. 4, p. 399–415, 1961.

MCFARLANE, J. E. Cation antagonism and a model for the cell membrane. **Canadian Journal of Zoology**, v. 46, n. 5, p. 943–945, Sept. 1968.

MERCHANT, M. M.; WELSH, A. K.; MCLEAN, R. J. C. Rheinheimera texasensis sp. nov., a halointolerant freshwater oligotroph. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 10, p. 2376–2380, Oct. 2007.

MESQUITA, D. P.; AMARAL, A. L.; FERREIRA, E. C. Estimation of effluent quality parameters from an activated sludge system using quantitative image analysis. **Chemical Engineering Journal**, v. 285, p. 349–357, Feb. 2016.

METCALF & EDDY. **Wastewater engineering**: treatment and reuse. 4th ed. New York: McGraw-Hill, 2003.

MILLERO, F. J.; SCHREIBER, D. R. Use of the ion pairing model to estimate activity coefficients of the ionic components of natural waters. **American Journal of Science**, v. 282, n. 9, p. 1508–1540, Nov. 1982.

MOHAMED, N. M. et al. Diversity of aerobic and anaerobic ammonia-oxidizing bacteria in marine sponges. **The ISME Journal**, v. 4, n. 1, p. 38–48, Jan. 2010.

MONDAL, N. C. et al. Determining the interaction between groundwater and saline water through groundwater major ions chemistry. **Journal of Hydrology**, v. 388, n. 1–2, p. 100–111, June 2010.

MONTENEGRO, S. M. G. et al. Intensive exploitation and groundwater salinity in Recife coastal plain (Brazil): monitoring and management perspectives. In: SWIM-SWICA JOINT SALTWATER INTRUSION CONFERENCE, 2006, Cagliari-Chia Laguna. Proceedings… [S.l.:s.n.], 2006. Session3 – Human impacts causing seawaterintrusion, p.79-88.

MOSQUERA-CORRAL, A. et al. Effects of oxygen concentration on N-removal in an aerobic granular sludge reactor. **Water Research**, v. 39, n. 12, p. 2676–2686, July 2005.

MOURA, R. B.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; FORESTI, E. Nitrogen and carbon removal from synthetic wastewater in a vertical structured-bed reactor under intermittent aeration. **Journal of Environmental Management**, v. 98, p. 163–167, May 2012.

MOURA, R. B. **Desempenho de um reator vertical de fluxo contínuo e leito estruturado com recirculação do efluente, submetido à aeração intermitente, na remoção de carbono e nitrogênio de um efluente sintético**. 2011. 112p. Dissertação [Mestrado] - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

MOURA, R. B. **Remoção de matéria orgânica e nitrogênio de esgoto sanitário em reator de leito estruturado submetido à aeração intermitente e recirculação do efluente**. 2014. 132p. Tese [Doutorado] - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

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

MUTHUKRISHNAN, S.; SABARATNAM, V.; CHONG, V. C. Ammonical-nitrogen removal by an aerobic heterotrophic bacterium, microbacterium sp., VCM11. **Malaysian Journal of Science**, v. 31, n. 2, p. 76-82, 2012.

MUYZER, G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 695-700, 1993.

NATIV, R. et al. Water salinization in arid regions—observations from the Negev desert, Israel. **Journal of Hydrology**, v. 196, n. 1–4, p. 271–296, Sept. 1997.

NGUYEN, H. T.; JOSHI, C. P. Molecular genetic approaches to improving heat and drought stress tolerance in crop plants. In: CHERRY, J. H. **Biochemical and cellular mechanisms of stress tolerance in plants**. Berlin: Springer, 1994. p. 279-289.

NICHOLS, D. S. Effect of temperature and salinity stress on growth and lipid composition of shewanella gelidimarina. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2422–2429, June 2000.

NOBRE, R. C. M. et al. Groundwater vulnerability and risk mapping using GIS, modeling and a fuzzy logic tool. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 94, n. 3–4, p. 277–292, Dec. 2007.

NTOUGIAS, S. et al. Diversity and efficiency of anthracene-degrading bacteria isolated from a denitrifying activated sludge system treating municipal wastewater. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 97, p. 151–158, Jan. 2015.

NÜBEL, U. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in Paenibacillus polymyxa detected by temperature gradient gel electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 19, p. 5636–5643, Oct. 1996.

OSAKA, T. et al. Effects of carbon source on denitrification efficiency and microbial community structure in a saline wastewater treatment process. **Water Research**, v. 42, n. 14, p. 3709–3718, Aug. 2008.

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

PATRAUCHAN, M. A. Calcium influences cellular and extracellular product formation during biofilm-associated growth of a marine Pseudoalteromonas sp. **Microbiology**, v. 151, n. 9, p. 2885–2897, Sept. 2005.

PATUREAU, D. et al. Aerobic denitrifiers isolated from diverse natural and managed ecosystems. **Microbial Ecology**, v. 39, n. 2, p. 145–152, Feb. 2000.

PHILIPS, S.; LAANBROEK, H. J.; VERSTRAETE, W. Origin, causes and effects of increased nitrite concentrations in aquatic environments. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 1, n. 2, p. 115–141, June 2002.

PITZER, K. S.; KIM, J. J. Thermodynamics of electrolytes. IV. Activity and osmotic coefficients for mixed electrolytes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 96, n. 18, p. 5701 - 5707, Sept. 1974.

PITZER, K. S.; MAYORGA, G. Thermodynamics of electrolytes. II. Activity and osmotic coefficients for strong electrolytes with one or both ions univalent. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 77, n. 19, p. 2300-2308, Feb. 1973.

POCHANA, K. ; KELLER, J. Study of factors affecting simultaneous nitrification and denitrification (SND). **Water Science and Technology**, v. 39, n. 6, p. 61-68, 1999.

POPINAKO, A. et al. Structural adaptations of octaheme nitrite reductases from haloalkaliphilic thioalkalivibrio bacteria to alkaline pH and high salinity. **PLOS ONE**, v. 12, n. 5, p. e0177392, May 2017. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone0177392.

PYTKOWICZ, R. M.; KESTER, D. R. Harned's rule behavior of nacl-na 2 so 4 solutions explained by an ion association model. **American Journal of Science**, v. 267, n. 2, p. 217-229, 1969.

QIN, W. Biodegradation of benzo(a)pyrene by microbacterium sp. strain under denitrification: degradation pathway and effects of limiting electron acceptors or carbon source. **Biochemical Engineering Journal**, v. 121, p. 131–138, May 2017.

QIU, T. et al. Effects of solid-phase denitrification on the nitrate removal and bacterial community structure in recirculating aquaculture system. **Biodegradation**, v. 27, n. 2–3, p. 165–178, June 2016.

QUARTAROLI, L. et al. Ammonium removal from high-salinity oilfield-produced water: assessing the microbial community dynamics at increasing salt concentrations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 2, p. 859–870, Jan. 2017.

RAHIMI, Y. ET AL. Simultaneous nitrification–denitrification and phosphorus removal in a fixed bed sequencing batch reactor (FBSBR). **Journal of Hazardous Materials**, v. 185, n. 2–3, p. 852–857, jan. 2011.

REILLY, P. J.; WOOD, R. H.; ROBINSON, R. A. Prediction of osmotic and activity coefficients in mixed-electrolyte solutions. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 75, n. 9, p. 1305-1315, 1971.

RENGASAMY, P. World salinization with emphasis on Australia. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 5, p. 1017–1023, Mar. 2006.

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

ROBERTSON, L. A.; KUENEN, J. G. Aerobic denitrification: a controversy revived. **Archives of Microbiology**, v. 139, n. 4, p. 351–354, Nov. 1984.

ROBINSON, R. A.; STOKES, R. H. Tables of osmotic and activity coefficients of electrolytes in aqueous solution at 25° C. **Transactions of the Faraday Society**, v. 45, p. 612–624, 1949.

_____. **Electrolyte solutions**. 2nd ed. Mineola: Dover, 2002.

ROBINSON, R. A.; STOKES, R. H.; WILSON, J. M. A Thermodynamic study of bivalent metal halides in aqueous solution. **Transactions of the Faraday Society**, v. 36, p. 733-748, Feb. 1940.

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

SANTOS, C. E. D. **Influência da relação carbono/nitrogênio e da fonte de carbono no processo de nitrificação desnitrificação simultânea em reator de leito estruturado**. 2014. 144p. Dissertação [Mestrado] - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

SATOH, H. et al. Effect of oxygen concentration on nitrification and denitrification in single activated sludge flocs. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 83, n. 5, p. 604–607, Sept. 2003.

SCHAUER, R. et al. Bacterial diversity and biogeography in deep-sea surface sediments of the South Atlantic Ocean. **The ISME Journal**, v. 4, n. 2, p. 159–170, Feb. 2010.

SCHMIDT, M.; PRIEMÉ, A.; STOUGAARD, P. Bacterial diversity in permanently cold and alkaline ikaite columns from Greenland. **Extremophiles**, v. 10, n. 6, p. 551–562, Nov. 2006.

SERRANO, R. Yeast halotolerance genes: crucial ion transport and metabolic reactions in salt tolerance. In: CHERRY, J. H. (Ed.). **Biochemical and cellular mechanisms of stress tolerance in plants**. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 1994. p.371–380.

_____. Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. **International Review of Cytology**, v. 165, p. 1–52, 1996.

SHANNON, M. A. et al. Science and technology for water purification in the coming decades. **Nanoscience and Technology**, v. 452, p. 10, 2009.

SHAO, Y.; PEI, H.; HU, W. Nitrogen removal by bioaugmentation in constructed wetlands for rural domestic wastewater in autumn. **Desalination and Water Treatment**, v. 51, n. 34–36, p. 6624–6631, Oct. 2013.

SHE, Z. et al. Partial nitrification and denitrification in a sequencing batch reactor treating high-salinity wastewater. **Chemical Engineering Journal**, v. 288, p. 207–215, Mar. 2016.

SICH, H.; VAN RIJN, J. Scanning electron microscopy of biofilm formation in denitrifying, fluidised bed reactors. **Water Research**, v. 31, n. 4, p. 733–742, Apr. 1997.

SILVA, A. J. et al. Evaluation of support materials for the immobilization of sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea. **Anaerobe**, v. 12, n. 2, p. 93-98, 2006.

SILVA, B. G. **Efeitos do tempo de aeração no desempenho de reator de leito estruturado e aeração intermitente usado para remoção de matéria orgânica e nitrogênio de efluente de reator UASB**. 2016. 81p. Dissertação [Mestrado] - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

SINGH, A. Estimating long-term regional groundwater recharge for the evaluation of potential solution alternatives to waterlogging and salinisation. **Journal of Hydrology**, v. 406, n. 3–4, p. 245–255, Sept. 2011.

SISINTHY, S. et al. Emended description of the family chromatiaceae, phylogenetic analyses of the genera alishewanella, rheinheimera and arsukibacterium, transfer of rheinheimera longhuensis LH2-2T to the genus alishewanella and description of alishewanella alkalitolerans sp. nov. from Lonar Lake, India. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 110, n. 9, p. 1227–1241, Sept. 2017.

SLIEKERS, A. Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite in one single reactor. **Water Research**, v. 36, n. 10, p. 2475–2482, May 2002.

SOROKIN, D. Y. Thialkalivibrio nitratireducens sp. nov., a nitrate-reducing member of an autotrophic denitrifying consortium from a soda lake. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 6, p. 1779–1783, Nov. 2003.

SOROKIN, D. Y.; GIJS KUENEN, J.; JETTEN, M. S. M. Denitrification at extremely high pH values by the alkaliphilic, obligately chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium thioalkalivibrio denitrificans strain ALJD. **Archives of Microbiology**, v. 175, n. 2, p. 94–101, Mar. 2001.

SOROKIN, D. Y. et al. Thioalkalimicrobium aerophilum gen. nov., sp. nov. and Thioalkalimicrobium sibericum sp. nov., and Thioalkalivibrio versutus gen. nov., sp. nov., Thioalkalivibrio nitratis sp. nov. and Thioalkalivibrio denitrificans sp. nov., novel obligately alkaliphilic and obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria from soda lakes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 565-580, Mar. 2001. DOI: 10.1099/00207713-51-2-565.

STOKES, R. H. A thermodynamic study of bivalent metal halides in aqueous solution. Part XVII—revision of data for all 2 : 1 and 1 : 2 electrolytes at 25°, and discussion of results. **Transactions of the Faraday Society**, v. 44, p. 295–307, 1948.

SUHAIL, F. M.; MAHDI, I. A. Response of azospirillum brasilense bacteria to the types and concentrations of different salts. **Bulletin UASUM Agriculture**, v. 68, n.1 , p. 356-362, 2011.

SUN, Y. et al. Nitrogen removal, nitrous oxide emission and microbial community in sequencing batch and continuous-flow intermittent aeration processes. **Environmental Engineering Research**, v. 24, n.1 p. 107-116, 2019. DOI: https://doi.org/10.4491/eer.2018.141.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 10, n. 3, p. 512-526, 1993.

TAY, J.-H.; LIU, Q.-S.; LIU, Y. Microscopic observation of aerobic granulation in sequential aerobic sludge blanket reactor. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 1, p. 168–175, July 2001.

TEKERE, M. et al. Bacterial diversity in some south african thermal springs: a metagenomic analysis. In: WORLD GEOTHERMAL CONGRESS, 2015, Melbourne. **Proceedings...** Bochum: International Geothermal Association, 2015. p. 19-25.

TORRES, P. **Desempenho de um reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) de bancada no tratamento de substrato sintético simulando esgotos sanitários.** 1992. Dissertação [Mestrado] - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1992.

TRIMARCO, E. et al. In Situ enrichment of a diverse community of bacteria from a 4–5 km deep fault zone in South Africa. **Geomicrobiology Journal**, v. 23, n. 6, p. 463–473, Sept. 2006.

TRIPATHI, A. K.; MISHRA, B. M.; TRIPATHI, P. Salinity stress responses in the plant growth promoting rhizobacteria,Azospirillum spp. **Journal of Biosciences**, v. 23, n. 4, p. 463–471, Oct. 1998.

TRIPATHI, A. K. et al. Inhibition of biosynthesis and activity of nitrogenase in azospirillum brasilense Sp7 under salinity stress. **Current Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 363–367, May 2002.

TRUESDELL, A. H.; JONES, B. F. Ion association in natural brines. **Chemical Geology**, v. 4, n. 1–2, p. 51–62, Mar. 1969.

_____. WATEQ, a computer program for calculating chemical equilibria of natural waters. **Journal Research US of the Geological Survey**, v. 2, n. 2, p. 233-248, 1974.

TWEED, S. et al. Arid zone groundwater recharge and salinisation processes; an example from the Lake Eyre Basin, Australia. **Journal of Hydrology**, v. 408, n. 3–4, p. 257–275, Oct. 2011.

TZENG, J.-H.; CHEN, S.-C. Preliminary Silver Chloride Separation for Chemical Oxygen Demand Analysis in Saline Water Samples. **Journal of Chinese Institute of Environmental Engineering**, v. 3, n. 4, p. 237–240, 1993.

UYGUR, A. Specific nutrient removal rates in saline wastewater treatment using sequencing batch reactor. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 1, p. 61–66, Jan. 2006.

UYGUR, A.; KARGI, F. Salt inhibition on biological nutrient removal from saline wastewater in a sequencing batch reactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, n. 3–4, p. 313–318, Mar. 2004.

VAN DEN BRAND, T. P. H. et al. Long-term effect of seawater on sulfate reduction in wastewater treatment. **Environmental Engineering Science**, v. 32, n. 7, p. 622–630, July 2015.

VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; JETTEN, M. S. M. Microbiological conversions in nitrogen removal. **Water science and technology**, v. 38, n. 1, p. 1-7, 1998.

VAN LOOSDRECHT, M. C. M. et al. Population distribution in aerobic biofilms on small suspended particles. **Water Science and Technology**, v. 31, n. 1, p. 163-171, 1995.

VERBAENDERT, I. et al. Denitrification is a common feature among members of the genus bacillus. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 34, n. 5, p. 385–391, July 2011.

VIRDIS, B. et al. Biofilm stratification during simultaneous nitrification and denitrification (SND) at a biocathode. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 334–341, Jan. 2011.

XU, M. Shewanella decolorationis sp. nov., a dye-decolorizing bacterium isolated from activated sludge of a waste-water treatment plant. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 363–368, Jan. 2005.

WALTER, J. et al. The Influence of water/rock − water/clay interactions and mixing in the salinization processes of groundwater. **Journal of Hydrology**: regional studies, v. 13, p. 168–188, Oct. 2017.

WANG, J. et al. Do Patterns of bacterial diversity along salinity gradients differ from those observed for macroorganisms?. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, p. e27597, 2011.

WANG, J. L. et al. Effect of salinity variations on the performance of activated sludge system. **Biomedical and Environmental Science**, v. 18, n. 1, p. 5-8, Feb. 2005.

WANG, Z. et al. Effects of salinity on performance, extracellular polymeric substances and microbial community of an aerobic granular sequencing batch reactor. **Separation and Purification Technology**, v. 144, p. 223–231, Apr. 2015a.

_____. Effect of hydraulic retention time on performance of an anoxic–aerobic sequencing batch reactor treating saline wastewater. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 12, n. 6, p. 2043–2054, June 2015b.

WHITFIELD, M. A Chemical model for the major electrolyte component of seawater based on the brønsted-guggenheim hypothesis. **Marine Chemistry**, v. 1, n. 4, p. 251-266, 1973.

WISTROM, A. O.; SCHROEDER, E. D. Enhanced nutrient removal by limiting dissolved oxygen concentration in a continuously fed, intermittently decanted, activated sludge plant. **Environmental Technology**, v. 17, n. 4, p. 371–380, abr. 1996.

YAMAGIWA, K.; OOHIRA, Y.; OHKAWA, A. Simultaneous removal of carbonaceous and nitrogenous pollutants by a plunging liquid jet bioreactor with crossflow filtration operated under intermittent aeration. **Bioresource Technology**, v. 53, n. 1, p. 57–62, Jan. 1995.

YAN, L. et al. Simultaneous nitrification and denitrification by EPSs in aerobic granular sludge enhanced nitrogen removal of ammonium-nitrogen-rich wastewater. **Bioresource Technology**, v. 202, p. 101–106, Feb. 2016.

YE, L.; ZHANG, T. Bacterial communities in different sections of a municipal wastewater treatment plant revealed by 16S rDNA 454 pyrosequencing. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 6, p. 2681–2690, Mar. 2013.

YE, L. et al. Determination effect of influent salinity and inhibition time on partial nitrification in a sequencing batch reactor treating saline sewage. **Desalination**, v. 246, n. 1–3, p. 556–566, Sept. 2009.

YEATTS, L. B.; MARSHALL, W. L. Solubility of calcium sulfate dihydrate and association equilibriums in several aqueous mixed electrolyte salt systems at 25.deg. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 17, n. 2, p. 163–168, Apr. 1972.

YOON, J. H. et al. Rheinheimera aquimaris sp. nov., isolated from seawater of the East Sea in Korea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 7, p. 1386–1390, July 2007.

YOON, S. et al. Denitrification versus respiratory ammonification: environmental controls of two competing dissimilatory NO3−/NO2− reduction pathways in Shewanella loihica strain PV-4. **The ISME Journal**, v. 9, n. 5, p. 1093–1104, May 2015.

ZAGHMOURI, I. et al. Salinity shifts in marine sediment: importance of number of fluctuation rather than their intensities on bacterial denitrifying community. **Marine Pollution Bulletin**, v. 130, p. 76–83, May 2018.

ZAHRAN, H. H. Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in saline environments. **Biology and Fertility of Soils**, v. 25, n. 3, p. 211–223, Sept. 1997.

ZHANG, D. et al. Removal of ammonium in surface water at low temperature by a newly isolated Microbacterium sp. strain SFA13. **Bioresource Technology**, v. 137, p. 147–152, June 2013.

ZHANG, D. et al. Characteristics of heterotrophic nitrifying bacterium strain SFA13 isolated from the Songhua River. **Annals of Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 271–278, Mar. 2016.

ZHAO, Y. et al. Effect of different salinity adaptation on the performance and microbial community in a sequencing batch reactor. **Bioresource Technology**, v. 216, p. 808–816, Sept. 2016.

ZHOU, J. et al. Nitrate removal by nitrate-dependent Fe(II) oxidation in an upflow denitrifying biofilm reactor. **Water Science and Technology**, v. 72, n. 3, p. 377–383, Aug. 2015.

ZHUANG, X. et al. Progress in decontamination by halophilic microorganisms in saline wastewater and soil. **Environmental Pollution**, v. 158, n. 5, p. 1119–1126, May 2010.

ZIELIŃSKA, M. et al. Community dynamics of denitrifying bacteria in full-scale wastewater treatment plants. **Environmental Technology**, v. 37, n. 18, p. 2358–2367, Sept. 2016.

ANEXO I

Tabela 33 - Caracterização físico-química da água subterrânea destinada ao abastecimento domésticos em 18 municípios do estado de Alagoas.

Município	**Pariconha**	**São José da Tapera**	**Senador Rui Palmeira**	**Maravilha**	**Mata Grande**	**Olho D'água do Casado**
Alcalinidade Bicarbonato ($mgCaCO_3\ L^{-1}$)	66	442	284	360	400	320
Alcalinidade Carbonato ($mgCaCO_3\ L^{-1}$)	0	0	0	0	0	0
Alcalinidade Hidróxida ($mgCaCO_3\ L^{-1}$)	0	0	0	0	0	0
Alcalinidade Total ($mgCaCO_3\ L^{-1}$)	66	442	284	360	400	320
Cálcio ($mgCa\ L^{-1}$)	8,96	651,52	814,4	1058,72	488,64	122,16
Cloretos (ppmCl)	39,56	10042,56	3702,56	6948,64	2079,52	750,66
Condutividade ($uS\ cm^{-1}$)	269	29133	10893	20468	6490	2972
Salinidade (wt %)						
Dureza Total ($mgCaCO_3\ L^{-1}$)	52	3816	5600	15200	2500	760
Ferro Total ($mgFe\ L^{-1}$)	0,089	0,133	0,07	0,092	0,074	0,19
Magnésio ($mgMg\ L^{-1}$)	7,29	538,49	874,8	3061,8	315,9	111,78
Nitrito, em N ($mg\ L^{-1}$)	0.012	0,148	0,006	0,025	0,426	0,195
Nitrato, em N ($mg\ L^{-1}$)	3,89	22,52	21,88	<0,01	1,51	<0,01
Sílica ($mg\ L^{-1}$)	119,7	76,87	68,87	166,37	183,53	306,2
Sódio ($mgNa\ L^{-1}$)	33,4	4905,3	10,3	169	315,3	318,5
Sólidos Totais ($mg\ L^{-1}$)	201,8	21849,7	8170,1	15351,3	4867,5	2229
Potássio ($mgK\ L^{-1}$)	7,2	25	11,4	54	18	17,7
Sulfato ($mgSO_4^{2-}\ L^{-1}$)	70,76	416,55	168,89	565,15	227,77	568,89
Cor ($mg\ Pt\text{-}Co\ L^{-1}$)	0	10	2,5	5	0	100
Turbidez (NTU)	9,4	7,4	0,1	15,7	4,5	92,4
pH	7,15	7,78	8,05	7,12	7,53	6,93

Fonte: Programa Água Doce, Ministério do Meio Ambiente (2012).

Continuação:

Município	**Ouro Branco**	**Palmeira dos Índios**	**Pão de Açucar**	**Inhapi**	**Carneiros**	**Poços de Trincheiras**
Alcalinidade Bicarbonato ($mgCaCO_3\ L^{-1}$)	500	300	700	144	400	520
Alcalinidade Carbonato ($mgCaCO_3\ L^{-1}$)	0	0	0	0	0	0
Alcalinidade Hidróxida ($mgCaCO_3\ L^{-1}$)	0	0	0	0	0	0
Alcalinidade Total ($mgCaCO_3\ L^{-1}$)	500	300	700	144	400	520
Cálcio ($mgCa\ L^{-1}$)	244,32	773,68	244,32	41,53	105,87	146,59
Cloretos (ppmCl)	2738,88	2789,6	1065,12	256,64	1288,29	882,53
Condutividade ($uS\ cm^{-1}$)	8402	8325	3840	959	4133	3086
Salinidade (wt %)						
Dureza Total ($mgCaCO_3\ L^{-1}$)	2400	3900	1900	184	820	860
Ferro Total ($mgFe\ L^{-1}$)	0,039	0,047	0,055	0,087	0,061	0,07
Magnésio ($mgMg\ L^{-1}$)	437,4	486	315,9	19,93	136,08	121,5
Nitrito, em N ($mg\ L^{-1}$)	0,022	0,25	0,94	0,057	0,057	0,02
Nitrato, em N ($mg\ L^{-1}$)	3,64	21,08	10,22	22,52	18,16	12,28
Sílica ($mg\ L^{-1}$)	72,2	156,37	123,53	84,53	85,03	126,87
Sódio ($mgNa\ L^{-1}$)	810,2	63,58	78	132,1	560,2	305
Sólidos Totais ($mg\ L^{-1}$)	6301,7	6243,8	2879,7	719,5	3099,9	2314,4
Potássio ($mgK\ L^{-1}$)	5,6	52	198	4,5	13,6	5,9
Sulfato ($mgSO_4^{2-}\ L^{-1}$)	177,3	154,87	124,03	71,69	84,78	57,67
Cor ($mg\ Pt\text{-}Co\ L^{-1}$)	0	0	0	5	0	0
Turbidez (NTU)	2	0,5	0,3	25,1	1,2	0,1
pH	7,48	7,84	7,84	7,74	8,3	7,53

Fonte: Programa Água Doce, Ministério do Meio Ambiente (2012).

Continuação:

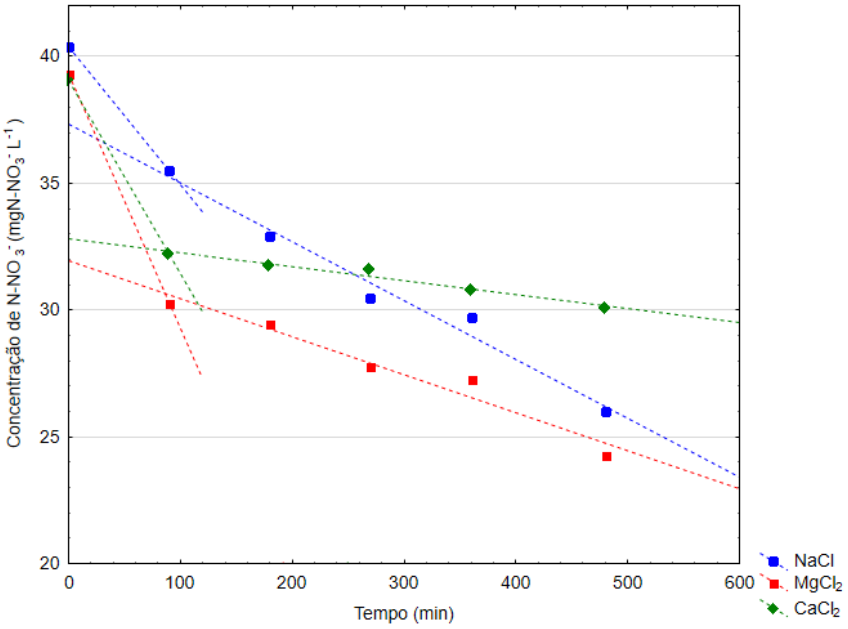
Município	**Santana do Ipanema**	**Major Isidorio**	**Estrela de Alagoas**	**Quebrangulo**	**Delmiro Gouveia**	**Piranhas**
Alcalinidade Bicarbonato ($mgCaCO_3\ L^{-1}$)	480	320	160	480	580	286
Alcalinidade Carbonato ($mgCaCO_3\ L^{-1}$)	0	0	0	0	0	0
Alcalinidade Hidróxida ($mgCaCO_3\ L^{-1}$)	0	0	0	0	0	0
Alcalinidade Total ($mgCaCO_3\ L^{-1}$)	480	320	160	480	580	286
Cálcio ($mgCa\ L^{-1}$)	659,66	309,47	602,66	138,45	423,49	1286,75
Cloretos (ppmCl)	2972,19	5112,58	5873,38	436,19	6492,16	23939,84
Condutividade ($uS\ cm^{-1}$)	9109	14830	18210	1781	19271	0
Salinidade (wt %)						68131
Dureza Total ($mgCaCO_3\ L^{-1}$)	2420	2520	3840	480	4280	9760
Ferro Total ($mgFe\ L^{-1}$)	0,052	0,091	0,579	0,077	0,077	0,057
Magnésio ($mgMg\ L^{-1}$)	194,4	427,68	573,48	34,02	787,32	1603,8
Nitrito, em N ($mg\ L^{-1}$)	0,167	0,014	0,762	0,033	1,241	<0,01
Nitrato, em N ($mg\ L^{-1}$)	11,44	19,53	15,49	6,63	14,51	31,74
Sílica ($mg\ L^{-1}$)	195,2	87,7	375,37	74,37	135,7	58,77
Sódio ($mgNa\ L^{-1}$)	958,8	2207,9	2374,9	180,6	2397,3	11117
Sólidos Totais ($mg\ L^{-1}$)	6831,7	11122,1	13657,3	1335,7	14453,3	51098,6
Potássio ($mgK\ L^{-1}$)	9,8	47	37	8,1	67	1,9
Sulfato ($mgSO_4^{2-}\ L^{-1}$)	254,87	88,51	1649,23	49,26	418,472	423,09
Cor ($mg\ Pt\text{-}Co\ L^{-1}$)	5	0	100	0	0	0
Turbidez (NTU)	41,3	2	1065	1,1	8,8	0,5
pH	7,96	8,21	7,97	8,2	8,05	7,9

Fonte: Programa Água Doce, Ministério do Meio Ambiente (2012).

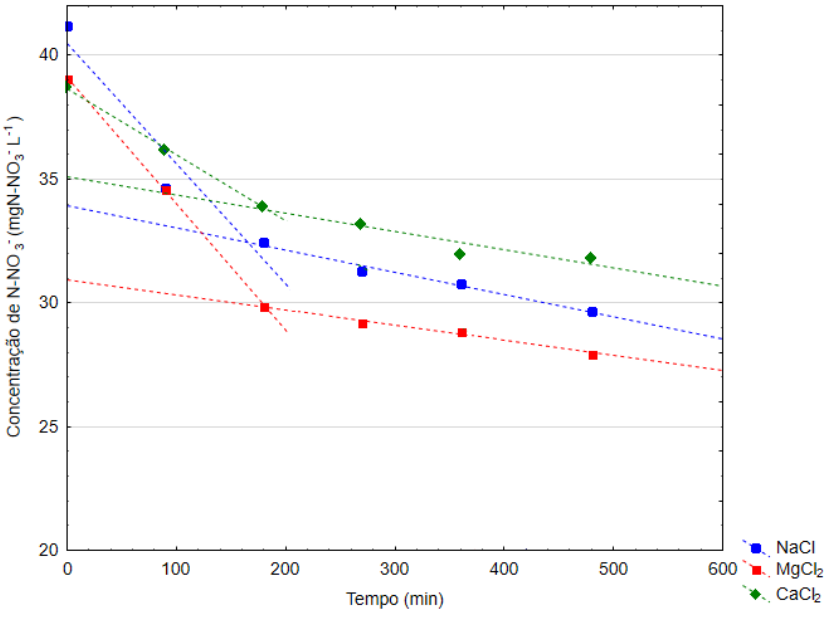
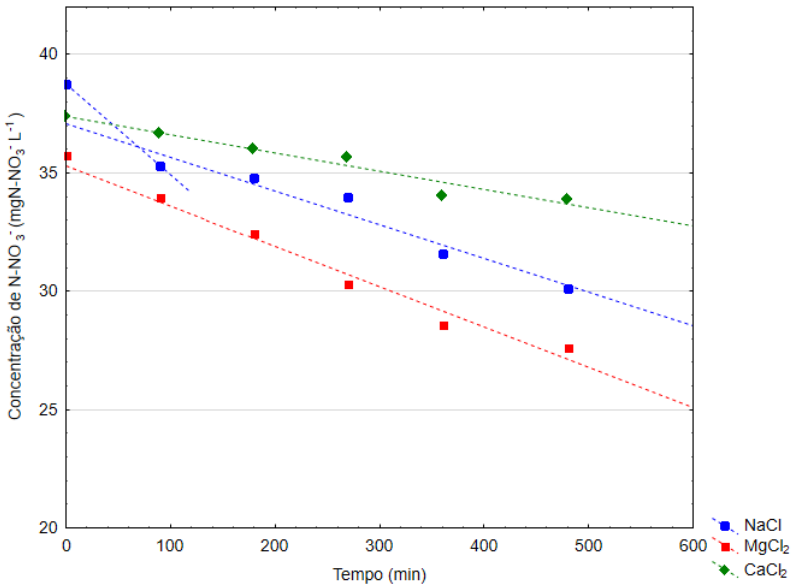
ANEXO II

Apresentação dos gráficos gerados para os ensaios complementares de desnitrificação, quando considerando duas cinéticas: a inicial, de 0 a 90 minutos, e a secundária, de 90 a 480 minutos.

Consumo de $N\text{-}NO_3^-$ na condição de pressão osmótica de 5 atm para os sais NaCl, $MgCl_2$ e $CaCl_2$.



Consumo de $N\text{-}NO_3^-$ na condição de pressão osmótica de 15 atm para os sais NaCl, $MgCl_2$ e $CaCl_2$.



Consumo de $N\text{-}NO_3^-$ na condição de pressão osmótica de 30 atm para os sais NaCl, $MgCl_2$ e $CaCl_2$.