



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

JEFFERSON SANTOS DE AMORIM

**AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS PROCESSOS METABÓLICOS DE GRUPOS
BACTERIANOS EM SISTEMAS DE TRATAMENTO CONJUGADO DE RESÍDUOS
LÍQUIDOS**

CAMPINA GRANDE – PB

2021

JEFFERSON SANTOS DE AMORIM

**AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS PROCESSOS METABÓLICOS DE GRUPOS
BACTERIANOS EM SISTEMAS DE TRATAMENTO CONJUGADO DE RESÍDUOS
LÍQUIDOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental (PPGCTA), da Universidade Estadual da Paraíba - UEPB, em cumprimento aos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Valderi Duarte Leite

CAMPINA GRANDE - PB

2021

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

A524a Amorim, Jefferson Santos de.
Avaliação do desempenho dos processos metabólicos de grupos bacterianos em Sistemas de tratamento conjugado de resíduos líquidos [manuscrito] / Jefferson Santos de Amorim. - 2021.
86 p. : il. colorido.
Digitado.
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências e Tecnologia, 2021.
"Orientação : Prof. Dr. Valderi Duarte Leite, Coordenação do Curso de Engenharia Sanitária e Ambiental - CCT."
1. Bactérias nitrificantes. 2. Lixiviado de aterro sanitário. 3. Esgoto doméstico. 4. Tratamento conjugado. I. Título
21. ed. CDD 628.3

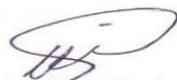
JEFFERSON SANTOS DE AMORIM

AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS PROCESSOS METABÓLICOS DE
GRUPOS BACTERIANOS EM SISTEMAS DE TRATAMENTO CONJUGADO DE
RESÍDUOS LÍQUIDOS

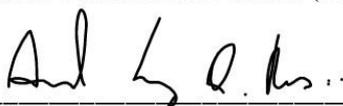
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Estadual da Paraíba - UEPB, em cumprimento aos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Aprovada em: 13/02/2021.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Valderi Duarte Leite (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. André Luiz Queiroga Reis
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)



Profa. Dra. Beatriz Susana O. de Ceballos
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Profa. Dra. Aline Carolina da Silva
Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos (UNICEPAC)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado forças nos momentos mais difíceis.

À minha mãe Neide, pelo amor incondicional, confiança e por ter me apoiado em todos os momentos.

Aos meus filhos Kaio e Kaleb, pela compreensão por minha ausência nas reuniões familiares.

A minha esposa Suênia, pela paciência, pelo amor e por sempre me apoiar em todos os momentos.

Ao meu orientador Professor Valderi Duarte Leite, pela paciência, pelos ensinamentos e oportunidade.

Ao professor Madson Tavares, pelos ensinamentos e incentivo.

A todos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental (PPGCTA), que contribuíram ao longo desse período com minha formação.

A Gabrielly e a Professora Catarina por toda colaboração na realização desse trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), pelo apoio financeiro.

RESUMO

A biodecomposição de resíduos sólidos em lixões a céu aberto ou em aterros sanitários, produz o lixiviado, resíduo líquido altamente poluidor. Devido a elevada concentração de nitrogênio amoniacal presente no lixiviado de aterro sanitário, o tratamento conjugado deste efluente com esgoto doméstico, se apresenta como alternativa tecnológica eficiente para obtenção de um efluente passivo de tratamento biológico. Nesse contexto, utilizam-se processos biológicos para a remoção de compostos nitrogenados presentes em efluentes de origem antrópica, que se lançados no ambiente ocasionam a eutrofização das águas naturais, o que dificulta seu uso para consumo humano. O tratamento biológico do conjugado do lixiviado com esgoto doméstico, pode ser realizado em reatores em série onde se favorecem as condições necessárias para a ocorrência das etapas naturais do ciclo do nitrogênio de amonificação, nitrificação (em duas etapas: nitrificação e nitratação) e desnitrificação. O presente trabalho teve como objetivo realizar a caracterização qualitativa e quantitativa dos grupos bacterianos responsáveis pelo processo de oxidação (nitrificação) e redução (desnitrificação), aplicando-se a técnica do Número Mais Provável (NMP) em um sistema experimental constituído por um reator UASB seguido de um Filtro Biológico Percolador (FBP) e um Reator Anóxico. Os reatores foram instalados e monitorados de forma sequenciada ao longo do processo de tratamento do conjugado do lixiviado de aterro sanitário com o esgoto doméstico. A eficiência da etapa de amonificação no reator UASB avaliada durante a transformação do nitrogênio orgânico a inorgânico foi de 6,4%, o que representou um acréscimo de 9,8 mg/L de nitrogênio amoniacal no efluente do reator. O Número Mais Provável (NMP) das bactérias nitrificantes foi estimado nas amostras coletadas no efluente do FBP. O NMP das bactérias oxidantes de amônia (BOA) variou de $0,8 \times 10^2$ a $1,4 \times 10^5$ NMP/100ml. Já o NMP das Oxidantes de nitrito (BON), variou de $0,8 \times 10^2$ a $2,2 \times 10^4$ NMP/100ml. As bactérias desnitrificantes, foram quantificadas nas amostras coletadas no efluente do reator anóxico. O NMP das bactérias desnitrificantes variou de $7,0 \times 10^3$ a $2,6 \times 10^4$ NMP/100ml. A eficiência de remoção biológica de nitrogênio no FBP, apresentou eficiência média de 16,42%, gerando um efluente com concentração média de $136,4 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ no FBP. Os resultados obtidos durante o monitoramento do sistema experimental, comprovaram sua capacidade de realizar os processos globais de transformação do nitrogênio. Porém, destaca-se a necessidade do controle rigoroso dos parâmetros operacionais, para atingir maiores eficiências de remoção do nitrogênio em sistemas de tratamento.

Palavras chave: Bactérias nitrificantes e desnitrificantes. Lixiviado de aterro sanitário. Esgoto doméstico. Tratamento conjugado.

ABSTRACT

The biodecomposition of solid waste in open dumps or in landfills, produces leachate, a highly polluting liquid residue. Due to the high concentration of ammoniacal nitrogen present in the landfill leachate, the combined treatment of this effluent with domestic sewage, presents itself as an efficient technological alternative to obtain a passive biological treatment effluent. In this context, biological processes are used to remove nitrogenous compounds present in effluents of anthropic origin, which, if released into the environment, cause the eutrophication of natural waters, which hinders their use for human consumption. The biological treatment of the leachate conjugate with domestic sewage can be carried out in series reactors where the necessary conditions for the occurrence of the natural stages of the nitrogen cycle of ammonification, nitrification (in two stages: nitritation and nitration) and denitrification. The present work aimed to carry out the qualitative and quantitative characterization of the bacterial groups responsible for the oxidation (nitrification) and reduction (denitrification) process, applying the Most Probable Number (MPN) technique in an experimental system consisting of a UASB reactor followed by a Percolating Biological Filter (PBF) and an anoxic reactor. The reactors were installed and monitored sequentially throughout the process of treating the conjugate of the landfill leachate with domestic sewage. The efficiency of the ammonification step in the UASB reactor evaluated during the transformation from organic to inorganic nitrogen was 6.4%, which represents an increase of 9.8 mg/L of ammoniacal nitrogen in the effluent of the reactor. The Most Probable Number (MPN) of the nitrifying bacteria was estimated in those collected in the FBP effluent. The MPN of ammonia oxidizing bacteria (AOB) varied from $0,8 \times 10^2$ a $1,4 \times 10^5$ MPN/100ml. The MPN of nitrite oxidizers (NOB), varied from $0,8 \times 10^2$ a $2,2 \times 10^4$ MPN/100ml. The denitrifying bacteria were quantified in the samples collected in the effluent of the anoxic reactor. The MPN of denitrifying bacteria varied from $7,0 \times 10^3$ a $2,6 \times 10^4$ MPN/100ml. The efficiency of biological nitrogen removal in the FBP showed an average efficiency of 16.42%, generating an effluent with an average concentration of 136.4 mg N-NH₄⁺.L⁻¹ in the FBP. The results obtained during the monitoring of the experimental system, proved its capacity to carry out the global processes of transformation of nitrogen. However, the need for strict control of operational parameters is highlighted, in order to achieve greater nitrogen removal efficiencies in treatment systems.

Keywords: Nitrifying and denitrifying bacteria. Landfill leachate. Domestic sewage. Conjugated treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo redox do nitrogênio..	20
Figura 2. Etapas da desnitrificação.....	36
Figura 3. Diagrama da formação do biofilme.	39
Figura 4. Reatores utilizados no experimento: (1) Reator UASB; (2) Filtro Biológico Percolador; (3) Reator Anóxico.....	46
Figura 5. Fluxograma de quantificação das bactérias nitrificantes e desnitrificantes... ..	50
Figura 6. Fluxograma das etapas para identificação das bactérias desnitrificantes.	51
Figura 7. Fluxograma do teste qualitativo quanto a produção de nitrito nos tubos.....	54
Figura 8. Fluxograma do teste qualitativo quanto a produção de nitrato nos tubos.....	56
Figura 9. Eficiência da etapa de amonificação apresentada no reator UASB.	58
Figura 10. Comportamento da variação temporal do pH do substrato e dos efluentes do reator UASB, FBP e Reator Anóxico.	59
Figura 11. Concentração de alcalinidade total quantificada no substrato e efluente de cada reator.....	61
Figura 12. Variação temporal das concentrações de nitrito (NO ₂ -) e do nitrato (NO ₃ -) no efluente do filtro biológico percolador (FBP).....	62
Figura 13. NMP dos grupos bacterianos identificados no 1º ensaio.	64
Figura 14. Comportamento da variação temporal da concentração de nitrogênio amoniacal na série de reatores	67
Figura 15. NMP dos grupos bacterianos presentes no 2º ensaio.	69
Figura 16. NMP dos grupos bacterianos identificados no 3º ensaio.	72
Figura 17. NMP dos grupos bacterianos identificados no 4º ensaio.	73
Figura 18. NMP dos grupos bacterianos identificados no 5º ensaio.	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Meio de cultura para bactérias oxidantes de amônia.....	52
Tabela 2- Meio de cultura para bactérias oxidantes de nitrito.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ART: Água Residuária Tratada
- BON: Bactérias Oxidante de Nitrito
- BOA: Bactéria Oxidantes de Amônia
- DQO: Demanda Química de Oxigênio
- DBO: Demanda Bioquímica de Oxigênio
- EDTA: Ácido Etilenodiaminotetracético
- EXTRABES: Estação Experimental de Tratamentos Biológicos de Esgotos Sanitários
- FBP: Filtro Biológico Percolador
- GEE: Gases Efeito Estufa
- LAS: Lixiviado de Aterro Sanitário
- MOA: Amônia Monoxigenase
- N-NH₄⁺: Nitrogênio Amoniacal
- N-NH₃: Amônia gasosa
- N-NO₃⁻: Nitrato
- N-NO₂⁻: Nitrito
- N: Nitrogênio
- Nr: Nitrogênio Reativo
- NMP: Número Mais Provável
- OD: oxigênio dissolvido
- OHR: Oxidoreductase da Hidroxilamina
- pH: Potencial Hidrogeniônico
- RBS: Reator Batelada Sequencial
- SNIS: Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento
- TRC: Tempo de Retenção Celular
- TRH: Tempo de Retenção Hidráulica
- UASB: Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente e Manta de Lodo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
3.1 Águas Residuárias	15
3.2 Lixiviado de Aterro Sanitário (LAS).....	17
3.3 Nitrogênio na natureza.....	19
3.4 Importância da Eliminação do Nitrogênio nas Águas Naturais	22
3.5 Metabolismo Bacteriano Quimiolitotrófico.....	24
3.6 Etapas da Remoção Biológica de Nitrogênio	26
3.6.1 Amonificação.....	26
3.6.2 Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN).....	28
3.6.3 Nitrificação.....	31
3.6.4 Oxidação anóxica da amônia (<i>Anamox</i>).....	33
3.6.5 Desnitrificação.....	35
3.7 Influencia dos Biofilmes Microbianos nos Processos de Remoção de Nitrogênio ..	37
4 PRINCIPAIS PARÂMETROS OPERACIONAIS QUE INTERFEREM NO PROCESSO DE REMOÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO	40
4.1 Oxigênio Dissolvido (OD).....	40
4.2 pH	42
4.3 Alcalinidade.....	43
4.4 Temperatura.....	43
4.5 Relação Carbono/Nitrogênio	44
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	46
5.1 Local de Realização da Pesquisa	46
5.2 Sistema Experimental	46

5.3 Lixiviado de Aterro Sanitário	47
5.4 Esgoto Doméstico	47
5.5 Substrato	48
5.6 Análises Microbiológicas: Quantificação de Bactérias	
Nitrificantes e Desnitrificantes	48
5.7 Coleta das Amostras	49
5.8 Quantificação de Bactérias Desnitrificantes – Técnica dos Tubos Múltiplos	50
5.8.1 NMP de bactérias nitrificantes.....	52
5.8.2 Quantificação de bactérias oxidantes de amônia (BOA).....	52
5.8.3 Quantificação de bactérias oxidantes de nitrito (BON).....	55
5.9 Procedimentos Analíticos	56
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
6.1 Eficiência da Amonificação no reator UASB.....	57
6.2 pH	58
6.3 Alcalinidade Total (AT)	60
6.4 Nitrito e Nitrato	62
6.5 Quantificação das Bactérias Nitrificantes e Desnitrificantes pela	
Técnica de Número Mais Provável (NMP)	64
7 CONCLUSÕES	76
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

1 INTRODUÇÃO

A crescente produção de resíduos sólidos observada desde o período pós revolução industrial, configura-se como um dos principais fatores que ocasionam à degradação dos recursos naturais. Todo processo de produção e de consumo, gera resíduos que exemplificam as atividades com potencial para provocar mudanças físicas, químicas e biológicas no ambiente e sobretudo, nos ecossistemas aquáticos.

A disposição inadequada de resíduos sólidos representa um problema de má gestão dos municípios na maioria dos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Segundo dados do Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento – (SNIS), em 2018, no Brasil, o percentual médio de tratamento de esgotos era 46,3%, que representava 4,30 bilhões de m³ de todo esgoto gerado nesse ano. Esses dados remetem a um cenário de preocupação no âmbito ambiental, no que tange a proteção dos corpos aquáticos. O esgoto bruto, tem em sua composição elevada concentração de matéria orgânica, compostos nitrogenados e fósforo, que podem desencadear sérios desequilíbrios ecossistêmicos quando despejados nos corpos d'águas sem tratamento.

Um dos principais efeitos de sua descarga nos corpos aquáticos é a eutrofização, devido à alta carga orgânica de compostos ricos em nitrogênio e fósforo, que são liberados durante a decomposição da matéria orgânica.

A decomposição física, química e biológica dos Resíduos Sólidos Urbanos (RSU) seja em lixões, aterros sanitários ou a céu aberto, produz um efluente altamente poluidor com composição química variável e complexa, denominado de lixiviado, percolado ou chorume (SUZUKI; BATISTA; KURODA, 2013). Esse efluente apresenta elevada concentração de nitrogênio amoniacal, compostos tóxicos, metais pesados, elevada Demanda Química de Oxigênio (DQO) e Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) (CHRISTENSEN et al., 2001). Devido à importância ambiental desse efluente, diversas configurações de tratamento e tecnologias sustentáveis foram desenvolvidas nos últimos anos, com a finalidade de atender os padrões de lançamento propostos pelas resoluções Conama 357/2005 e 430/2011.

A crescente demanda por água observada no século atual, associada ao crescimento populacional, remete a um cenário de proteção dos corpos aquáticos no que tange à mitigação dos impactos ocasionados aos recursos hídricos, em consequência da

descarga desses efluentes nos corpos receptores. A crescente exigência por novos processos de tratamento, caracteriza-se pela composição destes efluentes apresentarem grandes aportes de matéria orgânica e elevadas concentrações de macronutrientes como o nitrogênio e fósforo, que são os principais responsáveis pela eutrofização dos corpos aquáticos.

Os principais processos empregados para tratamento de efluentes são os processos físicos, químicos e biológicos. Porém, a combinação dos mesmos, proporciona maiores eficiências de tratamento. Devido a elevada concentração de nitrogênio amoniacal presente no lixiviado de aterro sanitário, o tratamento conjugado deste efluente com esgoto doméstico, se apresenta como alternativa eficiente para obtenção de um efluente passivo de tratamento biológico.

Os processos biológicos empregados para remoção de compostos nitrogenados presentes em efluentes, ocorrem a partir das etapas de amonificação, nitrificação e desnitrificação. As bactérias responsáveis pela etapa de nitrificação, possuem metabolismo aeróbio, onde o oxigênio molecular é o aceptor final de elétrons na cadeia respiratória, durante a oxidação da amônia em nitrito e do nitrito a nitrato, ou seja, nitrificação em duas etapas. Já os microrganismos desnitrificantes, necessitam de um ambiente anaeróbio (ausência de oxigênio molecular), e da presença dos aceptores de elétrons nitrito e nitrato, e uma fonte de carbono biodegradável. Deste modo, por apresentarem metabolismos distintos, cada grupo necessita de condições ambientais específicas para seu sucesso ecológico. Sendo assim, as estações de tratamento de efluentes convencionais utilizam dois estágios para remoção biológica do nitrogênio, nos quais a nitrificação e a desnitrificação são atingidas por separação física (reatores) e temporal (BARBOSA et al., 2016).

O uso do reator anaeróbio de fluxo ascendente com manta de lodo (UASB) se apresenta como uma técnica apropriada para o tratamento secundário de esgotos, uma vez que esse reator remove DQO e DBO_5 com eficiências superiores a 60 ou 70% (SOUZA et al., 2005). Porém, esse sistema é considerado ineficiente na remoção de nutrientes, necessitando de sua associação com outras tecnologias para remover esses compostos.

A remoção biológica do nitrogênio presente em efluentes líquidos, torna-se possível através de uma série de reatores, sejam sistemas compostos por reatores em série ou não, propiciando os processos de nitrificação e desnitrificação (FLECK; TAVARES; EYNG, 2015). O tratamento conjugado de lixiviado de aterro sanitário mais esgoto doméstico vem sendo realizado na Estação Experimental de Tratamento Biológico de

Águas e Esgotos Sanitários – EXTRABES, vinculada a Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). Esses sistemas, permitem a remoção nitrogênio em duas etapas: uma aeróbia (p. ex., filtro biológico percolador), seguido por uma etapa anaeróbia (p. ex., reator anóxico), para tratamento do efluente advindo do reator UASB, sendo visto como uma alternativa eficiente para tratamento desse tipo de efluente.

Dessa forma, o presente trabalho objetivou avaliar a eficiência dos grupos bacterianos responsáveis pelos processos de remoção de nitrogênio em um sistema experimental composto por Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente (UASB), Filtro Biológico Percolador (FBP) e Reator Anóxico (RA), dispostos em série, no tratamento biológico do conjugado de lixiviado de aterro sanitário e esgoto doméstico, avaliando-se ao longo do sistema e em cada efluente dos reatores FBP e RA, as densidades populacionais das bactérias nitrificantes e desnitrificantes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar qualitativa e quantitativamente os grupos bacterianos responsáveis pelo processo de oxidação e redução de nitrogênio em sistemas de tratamento de águas residuárias em reatores anaeróbios, aeróbio e anóxico em série, tratando resíduos líquidos conjugados (Esgotos domésticos e Lixiviado de Aterro Sanitário).

2.2 Objetivos específicos

- Quantificar as populações das bactérias nitrificantes e desnitrificantes nos efluentes dos reatores Filtro Biológico Percolador e Reator Anóxico trabalhando em série;
- Avaliar o desempenho do reator UASB no processo de amonificação do nitrogênio orgânico presente no substrato;
- Verificar a eficiência do processo de oxidação da amônia a nitrito e deste a nitrato (nitrificação) e a redução de nitrato a nitrogênio molecular (desnitrificação), ou seja, confirmar se o funcionamento do sistema em serie dos três reatores propiciou as condições necessárias para o desenvolvimento das etapas esperadas do ciclo do nitrogênio.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Águas Residuárias

Á água apresenta-se como recurso essencial e renovável com disponibilidade variável em virtude principalmente da sazonalidade climática. O uso demasiado desse recurso, contribuiu para a degradação dos corpos aquáticos ao longo do processo de urbanização nos centros urbanos. A produção de efluentes líquidos oriundo das atividades antrópicas representa um problema ambiental grave, pois ocasiona poluição em rios e águas represadas, e em consequência interfere na qualidade das águas para abastecimento das populações, dessedentação animal e irrigação de culturas (SILVA et al., 2016).

Moura et al. (2011), conceituam as águas residuárias domésticas como aquelas que provém, principalmente, de residências, estabelecimentos comerciais, instituições ou quaisquer edificações que dispõem de instalações com banheiros, lavanderias e cozinhas. Batista, Queiroz e Oliveira (2014), caracterizam as águas residuárias todas aquelas que tenham origem no pós-uso nas mais diversas atividades, sejam industriais ou domésticas, tendo como provável destino estações de tratamento, sejam tanques sépticos, reatores de digestão aeróbia e/ou anaeróbia e lagoas de estabilização.

Diante da variedade de poluentes presentes nesses efluentes, e da gravidade dos impactos gerados por estes, diversos países desenvolveram políticas públicas voltadas para redução dos impactos derivados do lançamento inadequado nos corpos hídricos. Os métodos de tratamento de esgotos foram inicialmente desenvolvidos com enfoque na saúde pública relacionado com as condições adversas causadas pela descarga de efluentes líquidos no meio ambiente (METCALF; EDDY, 2016). No Brasil, a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA nº 430/2011 define no seu Art. 1º, sobre as condições, padrões e diretrizes para gestão de lançamento de efluentes em corpos de água receptores, alterando parcialmente e complementando a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do CONAMA, estabelecendo padrões da qualidade da água para compostos nitrogenados presentes em efluentes sanitários e industriais, determina que a concentração de nitrogênio amoniacal total, atinja o limite de referência de 20 mgN.L^{-1} (BRASIL, 2011).

A resolução CONAMA nº 357/2005 em consonância com a resolução nº 430/2011, definem para águas doces de classes 1 e 2 que apresentarem o nitrogênio como fator limitante do processo de eutrofização, o valor de nitrogênio total deverá ser igual ou

inferior a 1,27 mg/L em ambientes lênticos e ser igual ou inferior a 2,18 mg/L em ambientes lóticos.

O desenvolvimento de novas tecnologias e o aperfeiçoamento dos métodos existentes no tratamento de águas residuárias, remetem a necessidade de buscar relacionar melhor custo-benefício com a maior eficiência no tratamento, garantindo que o efluente gerado neste processo, esteja dentro dos padrões fixados pela legislação ambiental vigente. Entre as principais tecnologias de tratamento desenvolvidas, destacam-se: filtros biológicos, lagoas anaeróbias, lagoas facultativas, lagoas aeróbias, lodos ativados e suas variações, Reator de Bateladas Sequenciais (RBS), biorreator de membrana, tratamento anaeróbio UASB - (Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente), seguida de lodos ativados, lodo ativado com remoção de nitrogênio e fósforo, como caracterizados por Folgosi, (2014) e Oliveira et al. (2013).

As utilizações de novos processos de tratamento, por si só, não representam o sucesso no tratamento de águas residuárias. É necessário entender a dinâmica dos processos microbiológicos que ocorrem, haja vista serem eles os responsáveis pela síntese de novas células a partir da metabolização de diversos substratos. Dessa forma, é fundamental compreender o elemento chave do tratamento é biológico, e que bactérias e outros microrganismos (protozoários e fungos) são responsáveis pela degradação da matéria orgânica e da remoção dos denominados macronutrientes: fósforo e nitrogênio (SHOMAR; DARWISH e VICENT, 2020).

Caracterizando a necessidade de preservação dos recursos naturais, as águas residuárias passaram a ser consideradas um recurso renovável com possibilidade de recuperação da água ali presente para irrigação, e para gerar energia com a produção biológica de metano, entre outras aplicações. Esses processos são possíveis pela ação dos microrganismos que participam da decomposição da matéria orgânica biodegradável, gerando o biogás como uma forma de energia, entre outros exemplos. Esse objetivo tem estimulado o desenvolvimento e avanço de novos processos de tratamento capazes de otimizar a obtenção de energia e a recuperação da água de maneira eficiente (METCALF; EDDY, 2016). O reaproveitamento desse recurso pode ser visto como uma maneira reducionista e mitigadora dos impactos ocasionados aos corpos d'água, podendo ser uma alternativa ecologicamente sustentável capaz de suprir a demanda crescente por água em vários países com déficit hídrico.

Shomar e Dare (2014), afirmam que vários fatores como pobreza, alimentação em quantidade e qualidade, escassez de água, migração, catástrofes, doenças e mortalidade, fazem parte do contexto do planejamento e gerenciamento de reutilização de águas residuárias.

Nessa perspectiva, a reutilização de águas residuárias após seu tratamento, surge como necessidade crescente e já observada em vários países em decorrência da indisponibilidade dos recursos hídricos, tornando esse recurso viável há várias décadas em vários países desenvolvidos da Europa, EUA e Japão, entre outros (SHOMAR; DARE, 2014).

3.2 Lixiviado de Aterro Sanitário (LAS)

Os impactos ambientais gerados pela disposição inadequada de resíduos sólidos em solos e em lixões a céu aberto, estão diretamente relacionados aos produtos gerados durante a biodecomposição desses resíduos. Desde a implementação da Política Nacional dos Resíduos Sólidos – (PNRS), através da lei 12.305/2010, os municípios brasileiros vêm buscando alternativas sustentáveis e tecnológicas, que garantam a proteção dos recursos naturais e, conseqüentemente, maiores eficiências no tratamento dos resíduos sólidos a longo prazo.

A implementação de aterros sanitários como proposto pela lei 12.305/2010, remete a preocupação da manutenção do equilíbrio ecológico e da sustentabilidade ambiental, além do papel social, no que se refere à inclusão social dos catadores. Dessa forma, o aterro sanitário pode ser visto como uma tecnologia viável para disposição final de resíduos sólidos, constituída de mecanismos de controle ambiental responsáveis por minimizar os impactos ambientais ocasionados pelos poluentes gerados durante a decomposição dos resíduos sólidos.

A grande preocupação evidenciada na disposição de resíduos sólidos, seja em lixões ou em aterros sanitários, está no líquido provindo da decomposição anaeróbia desses resíduos. Os efeitos ecossistêmicos decorrentes da descarga dos lixiviados no solo e em águas subterrâneas, sumarizam a importância do controle sanitário e tratamento antes do seu descarte, e revelam a magnitude dos desequilíbrios ecológicos que são devastadores nas comunidades biológicas. No que tange a contaminação dos corpos aquáticos pelo lixiviado, em especial pela presença de compostos nitrogenados, observam-se efeitos adversos como, a depleção do oxigênio em virtude da elevada

demanda bioquímica de oxigênio (DBO), perda de padrões estéticos dos corpos aquáticos, elevados gastos no tratamento pelo poder público e crescimento excessivos de plantas aquáticas (macrófitas), culminando na eutrofização dos corpos aquáticos.

As características físico-químicas dos lixiviados de aterro sanitário e seus constituintes, podem ser categorizados em diversos componentes, como por exemplo, matéria orgânica dissolvida quantificada como Demanda Química de Oxigênio (DQO) ou Carbono Orgânico Total (COT) e ácidos graxos voláteis, e ainda os macrocomponentes inorgânicos, como: cálcio (Ca^{2+}), magnésio (Mg^{2+}), sódio (Na^+), potássio (K^+), amônio (NH_4^+), ferro (Fe^{2+}), manganês (Mn^{2+}), cloreto (Cl^-), sulfato (SO_4^{2-}) e hidrogenocarbonatos (HCO_3^-). Compostos orgânicos xenobióticos originários de produtos químicos domésticos ou industriais e metais pesados (cádmio (Cd^{2+}), cromo (Cr^{3+}), cobre (Cu^{2+}), chumbo (Pb^{2+}), níquel (Ni^{2+}) e zinco (Zn^{2+}) (ADHIKARI; DAHAL; KHANAL, 2014; KJELDSEN et al., 2002; AL SABAHI et al., 2009).

As características de formação do lixiviado (como a composição, quantidade e poluentes potenciais) são afetadas por muitos fatores, como a qualidade dos resíduos sólidos, o grau de compactação do aterro, a idade dos resíduos, condições climáticas do aterro, condições hidrogeológicas, pH e os processos químicos e biológicos que ocorrem durante a degradação dos resíduos (ADHIKARI; DAHAL; KHANAL, 2014). O enfoque no tratamento do lixiviado apresentam demandas fundamentais, principalmente no que concerne a presença de matéria orgânica recalcitrante de baixa biodegradabilidade e elevada concentração de nitrogênio, que pode atingir concentrações superiores a 2000 mg N-NH₃/L, variando em decorrência do tempo de operação do aterro.

O cenário brasileiro atual do saneamento básico, requer tecnologias de baixo custo e elevada eficiência no tratamento desse efluente, visando atender os parâmetros legais e ambientais. A incompatibilidade de recursos (financeiros e técnicos) observadas na maioria das cidades brasileiras, demonstram o real cenário de dificuldades para implementação de aterros sanitários no país. Entretanto, é notório o empenho de diversos pesquisadores no desenvolvimento de sistemas tecnológicos para tratamento do lixiviado com máxima eficiência dentro dos parâmetros legais normativos e aspectos metodológicos universais que sejam capazes de garantir a minimização dos seus impactos a biosfera.

3.3 Nitrogênio na natureza

O Nitrogênio é o elemento químico mais abundante da atmosfera, cerca de 79% dos gases atmosféricos é N_2 , a forma molecular biatômica. Em efluentes líquidos, o nitrogênio pode ser encontrado em uma variedade de estados de oxidação, desde o nitrato NO_3^- ($n_{ox} = +5$) e o íon amônio NH_4^+ ($n_{ox} = -3$). Ao contrário dos demais nutrientes, o nitrogênio tem grande mobilidade no sistema solo-planta-atmosfera em função dos processos que alteram sua valência química, e conseqüentemente sua estrutura molecular (SILVA et al., 2018).

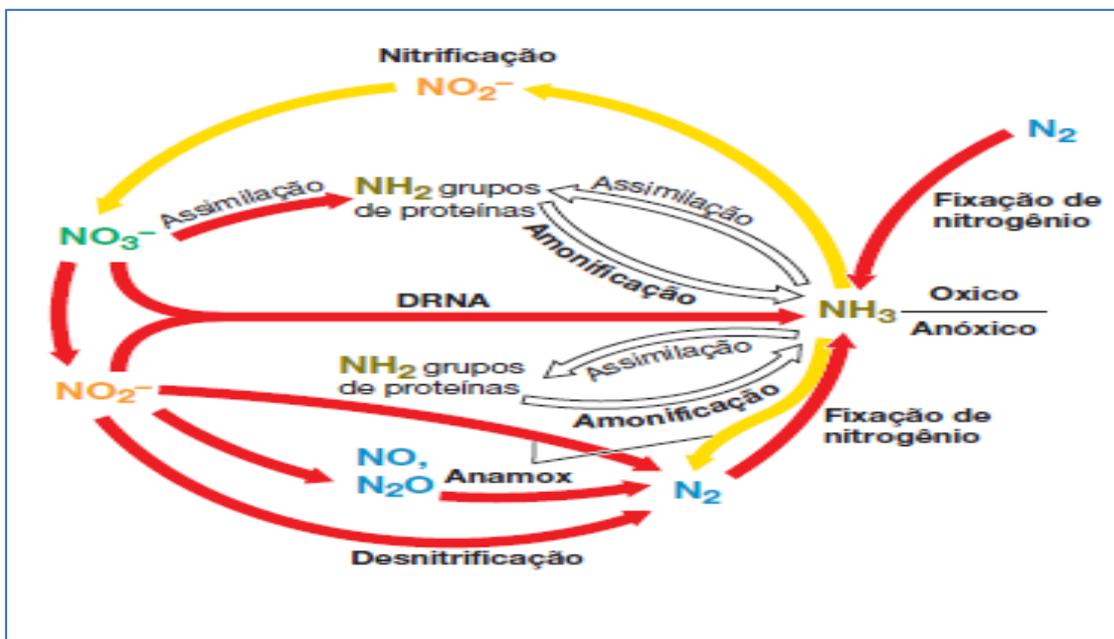
O nitrogênio presente no solo pode ser encontrado sob a forma orgânica e inorgânica. As formas orgânicas no solo são componentes da matéria orgânica, sendo este elemento encontrado em grandes quantidades principalmente na fração proteica, a qual é passível de mineralização rápida (CARDOSO; TSAI; NEVES, 1992). Na forma inorgânica, o nitrogênio pode ser encontrado no solo e na água como íon amônio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-), óxido nitroso (N_2O) (MADIGAN et al, 2016).

Sabe-se que o nitrogênio é um nutriente fundamental para os seres vivos, principalmente por ser constituinte das moléculas de RNA, DNA e proteínas (GARCIA; CARDOSO; SANTOS, 2013). Para a espécie humana, a obtenção do nitrogênio ocorre com os alimentos, que quando ingeridos, são metabolizados e incorporadas as proteínas celulares.

O ciclo do nitrogênio apresentado na Figura 1, sumariza as rotas metabólicas utilizadas pelos microrganismos responsáveis pelas transformações desse elemento na natureza. Essas transformações, permitem a circulação desse macronutriente entre os seres vivos mantendo a homeostase da biosfera. As etapas representadas no ciclo, indicam que o processo ocorre de forma organizada e sequencial, através dos metabolismos dos diversos microrganismos envolvidos, tendo como resultado, os processos de: 1) fixação biológica do nitrogênio gasoso por bactérias específicas e cianobactérias; 2) amonificação pelas bactérias heterótrofas e por fungos degradadores da matéria orgânica; 3) nitrificação por bactérias quimiolitotróficas aeróbias, realizado em duas etapas por gêneros bacterianos diferentes (nitritação – de amônia até nitrito, e nitratação – de nitrito até nitrato) e 4) desnitrificação por bactérias anaeróbias heterótrofas desnitrificantes).

Entretanto, o fluxo desse nutriente na biosfera, pode variar em decorrência da necessidade do ambiente e da disponibilidade das formas fixadas (NH_3) e das formas mais oxidadas NO_3^- e NO_2^- (MADIGAN et al., 2016).

Figura 1. Ciclo redox do nitrogênio.



Fonte: Madigan et al., (2016).

Em ecossistemas com baixa disponibilidade de nitrogênio na forma de NH_3 , um grupo de microrganismos denominados de fixadores de nitrogênio, capturam esse nutriente no ar atmosférico na forma molecular gasosa (N_2), e em um processo complexo que requer alta demanda energética e um sistema de enzimas (nitrogenases), atuam na transformação do N_2 em NH_3 .

A amônia também é obtida na decomposição de compostos orgânicos nitrogenados, através do processo de amonificação. Essa etapa é conduzida por um consórcio de microrganismos heterotróficos anaeróbios e aeróbios, estes incluem os fungos, bactérias e actinomicetos, que utilizam a matéria orgânica nitrogenada e liberam amônia como resultado do seu metabolismo. Outro processo que pode contribuir para a geração de NH_3 , é a redução respiratória do NO_3^- para NH_3 , denominado Redução Dissimilativa do Nitrato para Amônia (DRNA - Dissimilative Reduction of Nitrate to Ammonia) (MADIGAN et al., 2016). Neste processo, o nitrato é utilizado pelos microrganismos como receptor de elétrons quando a disponibilidade de O_2 é baixa e fontes de carbono (C) são utilizadas como doadores de elétrons (VIEIRA, 2017).

Com a amônia disponível, outro grupo de microrganismo atuará na oxidação desse composto a suas formas nitrito e nitrato. Esse processo é denominado nitrificação, e ocorre em duas etapas sequenciais, catalisadas por organismos distintos metabolicamente. Na etapa de nitrificação, as bactérias nitrificantes realizam a oxidação da amônia a nitrito e posteriormente do nitrito a nitrato. Essa etapa, necessita de um ambiente propício para atividade bacteriana, que requerem prioritariamente condições favoráveis para eficiência metabólica, como por exemplo, pH neutro e disponibilidade de amônia.

O ciclo global do nitrogênio apresenta duas rotas metabólicas principais em que ocorre a liberação do N_2 na atmosfera. Na desnitrificação, o NO_3^- é reduzido bioquimicamente através dos metabolismos de vários grupos desnitrificantes a N_2 que retorna à atmosfera. Essa reação, contribui significativamente com a redução dos impactos ecossistêmicos ocasionados pelo acúmulo NO_3^- nos corpos aquáticos. Durante essa etapa, observa-se a geração compostos intermediários tóxicos ao meio ambiente, óxido nítrico (NO) e o óxido nitroso (N_2O).

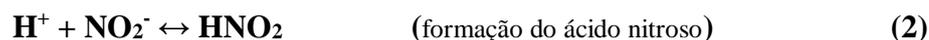
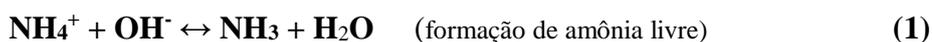
O processo Anamox (oxidação anaeróbia de amônia) é outra rota metabólica complexa do ciclo do nitrogênio e integrada ao ciclo dos processos de desnitrificação. Os microrganismos anamox, realizam a oxidação da amônia em ambiente anaeróbio, utilizando NH_3 e o NO_2^- formado no processo, como receptor final de elétrons doados pela amônia, liberando N_2 para a atmosfera. Assim, juntamente com a desnitrificação clássica, o metabolismo anamox surge como uma nova alternativa tecnológica de conversão da amônia a nitrogênio gasoso, podendo essas bactérias serem utilizadas em estações de tratamento de águas residuárias de diferentes origens para remoção rápida e eficiente de nitritos e de amônia em efluentes.

Apesar de sua grande disponibilidade na atmosfera e da complexidade do seu ciclo, grande parte dos seres vivos eucarióticos, como plantas e os animais, não assimilam diretamente esse nutriente diretamente do ar, necessitando do nutriente nas suas formas iônicas: íons amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-) (SILVA et al., 2018). No solo, as plantas absorvem pelas raízes, as formas nitrogenadas inorgânicas liberadas pelos microrganismos degradadores heterótrofos aeróbios e anaeróbios do solo, e as transformam em proteínas que formam parte da biomassa vegetal, sendo responsáveis pela produção primária no ambiente terrestre. No ambiente aquático as algas e as cianobactérias realizam a fotossíntese para produção da biomassa, disponibilizando o

oxigênio dissolvido no meio aquático e no ar. Plantas, algas e cianobactérias assimilam as formas de nitrogênio como amônia e nitratos liberados pelos decompositores heterótrofos, como foi citado e, ainda, algumas cianobactérias fixam nitrogênio gasoso.

São os microrganismos que atuam na mineralização da matéria orgânica liberando as formas inorgânicas dissolvidas do nitrogênio e permitem a assimilação pelos produtores primários, tornando esses microrganismos da amonificação e os fixadores de N_2 , fundamentais no ciclo do nitrogênio, e conseqüentemente, na rede trófica do ecossistema.

Entretanto, é importante destacar que nos ecossistemas aquáticos, o comportamento do nitrogênio amoniacal pode variar de acordo com a variação do pH do ambiente, determinando qual espécie nitrogenada predominará no meio. Ferreira (2000), destaca que as concentrações tanto do ácido nitroso livre como da amônia livre são diretamente dependentes do pH, da temperatura, e das concentrações respectivas, tanto da parcela livre como da ionizada, de amônia e nitrito, conforme os seguintes equilíbrios químicos:



3.4 Importância da Eliminação do Nitrogênio nas Águas Naturais

Por ser um contaminante presente em grandes quantidades em águas residuárias, o nitrogênio é responsável por grande parte do desequilíbrio ecológico nos sistemas naturais, devido a descarga de efluentes sem tratamento nos corpos aquáticos.

Entre os grandes problemas ambientais causados pelo excesso de nitrogênio em suas formas reduzidas (amônia) e oxidadas (nitrito, nitrato), está a degradação da qualidade da água e a conseqüente perda de biodiversidade aquática (TONG et al., 2017). Além disso, observa-se o desequilíbrio do balanço do oxigênio no corpo aquático, proliferação de algas, cianobactérias e macrófitas (eutrofização), mortandade de peixes e outros organismos.

O nitrogênio juntamente com o fósforo, aceleram o crescimento de macrófitas e fitoplâncton, com destaque para a proliferação excessiva de cianobactérias

potencialmente produtoras de toxinas. Estas podem atingir a biota aquática, e suas concentrações podem ser aumentadas por bioacumulação e biomagnificação nas cadeias alimentares sendo possível chegar até o homem, como ocorreu em Caruaru em 1996, quando morreram mais de 55 pacientes de uma clínica de hemodiálises contaminada com hepatoxinas (AZEVEDO et al., 2002).

Nesse contexto, a mensuração das formas nitrogenadas presentes nos corpos aquáticos, podem revelar o grau de eutrofização ou de instabilidade do ecossistema.

O esgoto de origem doméstica apresenta, prioritariamente, duas formas de nitrogênio: amoniacal e incorporados em compostos orgânicos proteicos. A concentração de nitrogênio presente em águas residuárias, está em torno de $35\text{mgN-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$. Essa concentração é infimamente reduzida quando comparada as concentrações referências de efluentes de origens distintas, como os industriais, os de abatedouros e do lixiviado de aterro sanitário.

A magnitude das atividades antrópicas sobre os fluxos de nitrogênio, alterou substancialmente o seu ciclo na natureza, acarretando grandes impactos negativos sobre os recursos hídricos (por exemplo, eutrofização), a litosfera (saturação do solo com nitrogênio e os impactos na biodiversidade), a atmosfera (N_2O gás do efeito estufa) (SOUZA et al., 2019). A degradação ambiental dos corpos aquáticos, em decorrência de descargas de efluentes de origem antrópica com elevadas concentrações de nitrogênio, outros macronutrientes e matéria orgânica, direcionou a atenção de pesquisadores para o desenvolvimento de tecnologias aplicadas a novos processos, que garantam maiores eficiências na remoção desses compostos em diferentes efluentes.

Destacam-se os processos ANAMOX (Oxidação Anaeróbia de Amônio - Anaerobic Ammonium Oxidation), processo SHARON (Remoção de Amônia de Alta Atividade de Reator Único Sobre Nitrito - Single Reactor High Activity Ammonia Removal Over Nitrite), processo combinado SHARON-ANAMMOX, process CANON (Completa Remoção Autotrófica do Nitrogênio por Nitrito - Completely Autotrophic Nitrogen Removal Over Nitrite), processo OLAND (Nitrificação e Desnitrificação Autotrófica Limitada por Oxigênio - Oxygen Limited Autotrophic Nitrification and Denitrification) Nitrificação e Desnitrificação Convencional, processo DEAMOX (Denitrifying Ammonium Oxidation) e

Nitrificação e Desnitrificação Simultânea (SND) (METCALF; EDDY, 2016; SCHEEREN et al., 2011; DU et al., 2017; ZOPPAS; BERNADES; MENEGUZZI, 2016).

A produção e o consumo de alimentos têm sido relatados como os principais contribuintes de nitrogênio reativo (Nr), sendo responsáveis por grande parte da poluição atmosférica e dos corpos aquáticos (MARTINEZ et al., 2019). O Nitrogênio reativo, refere-se a toda forma biológica, fotoquímica e radioativamente ativa de compostos de N presentes na ecosfera, incluindo as formas oxidadas inorgânicas, como óxido nitroso, nitrato, nitrito e compostos orgânicos como ureia, amins, proteínas e ácidos nucleicos (GALLOWAY et al., 2004).

Problemas ambientais ocasionados pela liberação de gases do efeito estufa também é motivo de preocupação ambiental. O N_2O produzido durante o processo de nitrificação-desnitrificação é um importante gás do efeito estufa, e seu potencial de aquecimento global (GWP) é de 298 vezes maior que o do gás de referência, CO_2 (XIAO et al., 2019).

Desde a descoberta do processo Haber-Bosch desenvolvido pelos cientistas Fritz Haber (1868 – 1934) e William Carl Bosch (1874 – 1940) (combinando nitrogênio e hidrogênio, formando amônia e outros compostos como ureia), e a partir do uso de N mineral em fertilizantes, houve uma contribuição considerável para o aumento da produção agrícola e segurança alimentar, garantindo suporte para o crescimento populacional (WANG; MEYER, 2019; TRAVIS, 2018). Todavia, o uso de fertilizantes traz consequências ambientais significativas. Pois, as espécies nitrogenadas utilizadas nos fertilizantes (amônio, nitrato e ureia), são muito solúveis em água e isto facilita sua dispersão no meio ambiente tais como: ar atmosférico, recursos hídricos e no solo (GARCIA; CARDOSO; SANTOS, 2013).

Outro problema, deve-se a ingestão de água com altas concentrações de nitratos e nitritos, que pode ter relação com a incidência de câncer do estômago e do esôfago, além da morte por asfixia de recém-nascidos, chamada “síndrome do bebê azul” quando ocorre a transformação da hemoglobina em metahemoglobina, condição em que a ligação e o transporte do oxigênio não acontece em decorrência da oxidação do grupo heme da hemoglobina (COSTA; KEMPKA; SKORONSKI, 2017).

3.5 Metabolismo Bacteriano Quimiolitotrófico

Os pesquisadores Sergei Winogradsky (1856–1953) e Martinus Beijerinck (1851-1931), desenvolveram os primeiros estudos de microbiologia ambiental. Sergei Winogradsky desenvolveu os conceitos de quimiolitotrofia, oxidação microbiológica de compostos inorgânicos com liberação de energia, e de fixação de CO₂ atmosférico como fonte de carbono (MADIGAN et al., 2016).

A quimiolitotrofia refere-se ao processo metabólico de produção de energia, a partir da oxidação de compostos inorgânicos. A diversidade metabólica observada em bactéria e Archaea, permite que esses organismos possam ocupar uma grande variedade de nichos ecológicos. As bactérias quimiolitotróficas como as bactérias do fósforo, bactérias do hidrogênio, bactérias do enxofre, bactérias do ferro, bactérias nitrificantes, entre outras, oxidam um substrato inorgânico reduzido e transferem os elétrons liberados para uma cadeia respiratória ou cadeia transportadora de elétrons, que tem em geral o O₂ comoceptor final, produzindo ATP através da fosforilação oxidativa (SCHIMIDELL et al., 2007).

A diversidade metabólica observada nos grupos bacterianos quimiolitotróficos, permitem que alguns microrganismos possam utilizar alternativamente compostos orgânicos e inorgânicos, sendo definidos como os mixotróficos ou quimiolitotróficos facultativos (SCHIMIDELL et al., 2007). As bactérias do hidrogênio, como as bactérias do gênero *Ralstonia*, apresenta essa característica metabólica sendo fortemente influenciadas pela disponibilidade do tipo de substrato no ambiente. Dessa forma, quando estão presentes compostos orgânicos facilmente utilizáveis, como a glicose, a síntese do ciclo de Calvin e das enzimas hidrogenases são reprimidas nas bactérias do H₂, predominando o metabolismo quimiorganotrófico ou heterótrofico (MADIGAN et al., 2016).

A existência de uma grande variedade de doadores inorgânicos de elétrons que são requeridas pelos organismos quimiolitotróficos, possuem origens distintas. Podendo ser biológicas, como resultado do metabolismo quimiorganotrófico (heterotrófico), eliminando os compostos H₂S, H₂, Fe²⁺ e NH₃, geológicas como resultado das atividades vulcânicas que são as fontes principais de compostos sulfurados reduzidos, principalmente H₂S, ou de origem antropogênica, associada as formas inorgânicas das atividades agrícolas, de mineração, queimas de combustíveis fósseis, além das grandes quantidades de compostos contendo nitrogênio e ferro reduzidos no meio ambiente (MADIGAN et al., 2016).

Martinus Beijerinck desenvolveu a técnica da cultura do enriquecimento para seleção e isolamento de bactérias quimiolitotróficas a partir de amostras naturais, utilizando nutrientes e condições de incubação altamente seletivas para favorecer um grupo metabólico particular. O desenvolvimento de uma metodologia de cultivo, e a definição das composições e formulação dos meios de cultura para grupos bacterianos diferentes (bactérias de enxofre e do nitrogênio, principalmente), possibilitou obter as primeiras culturas puras desses microrganismos e isolar os mesmos para estudos experimentais. Assim, foram estudadas e identificadas as bactérias do ciclo do nitrogênio, tais como as bactérias fixadoras do gênero *Azotobacter*, os grupos de bactérias oxidantes e redutoras do nitrogênio, do hidrogênio como *Ralstonia eutropha*, do ferro como a bactéria *Thiobacillus denitrificans* e do enxofre como as bactérias do gênero *Beggiatoa* (MADIGAN et al., 2016).

Desde o desenvolvimento da técnica da cultura de enriquecimento seletivo descrita por Martinus Beijerinck, a metodologia foi aplicada em numerosos trabalhos de pesquisas executadas ao longo dos anos com bactérias quimiolitotróficas. Esses trabalhos permitiram a seleção de culturas bacterianas específicas a partir de amostras complexas como efluentes domésticos e industriais, e o lixiviado de aterro sanitário (LAS). Entre eles pode-se citar os trabalhos desenvolvidos por Cruvellier et al., (2016); Khozin-Goldberg et al., (2002); Chapman et al., (2006); Oliveira et al., (2013).

3.6 Etapas da Remoção Biológica de Nitrogênio

3.6.1 Amonificação

Entre as várias transformações que ocorrem com o nitrogênio no seu ciclo biogeoquímico, o processo de amonificação destaca-se como a etapa na qual o nitrogênio orgânico retorna ao ambiente nas formas inorgânicas e disponíveis para outros seres vivos. Nos efluentes líquidos provenientes de atividades antrópicas (industriais e doméstico), o nitrogênio está presente principalmente na forma orgânica (ureia, aminoácidos e proteínas) e como amônia. A amonificação é realizada (ou catalisada) por uma grande diversidade de microrganismos aeróbios e anaeróbios que podem ocorrer em diversos sistemas naturais. Na amonificação, bactérias heterotróficas e fungos degradam e transformam os compostos nitrogenados orgânicos, principalmente proteínas e aminoácidos nas formas inorgânicas reduzidas (amônia, íon amônio), permitindo que essa

fração possa ser assimilada e incorporada na biomassa dos próprios microrganismos que realizam essa etapa e de outros microrganismos, como diferentes tipos de bactérias, actinomicetos, fungos e pelos produtores primários (plantas, algas, cianobactérias) (BITTON, 2005).

Nesse contexto, a amonificação pode ser caracterizada como a última etapa do ciclo do nitrogênio que envolve compostos orgânicos, e a etapa intermediária entre a despolimerização das grandes moléculas proteicas e aminoácidos, e a etapa aeróbia da nitrificação (ROMILLAC et al., 2019).

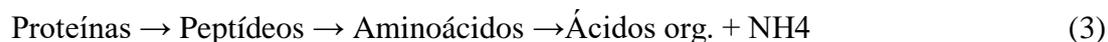
Segundo Bitton (2005), as proteínas dos resíduos orgânicos são convertidas em peptídeos e em aminoácidos por diversas enzimas proteolíticas extracelulares produzidas e secretadas pelas bactérias presentes nos próprios resíduos e, posteriormente, essas moléculas são biodegradadas e desaminadas (perda dos grupos aminos dos aminoácidos), a qual pode ser uma desaminação oxidativa ou redutiva.

Romillac et al. (2019), relatam que a amonificação pode ser extracelular ou intracelular com a participação uma ampla gama de microrganismos heterotróficos, aeróbios e anaeróbios que produzem várias enzimas. Entre as enzimas que atuam processo, se destacam as hidrolases, oxidases, proteases, uréases, desaminases e liases. Essas enzimas podem ser também de origem animal e vegetal além das microbianas. Por sua vez, todas as enzimas participantes nos processos de transformação e absorção de nitrogênio são moléculas proteicas que requerem carbono, nitrogênio e energia para sua síntese e expressão (GEISSELER et al., 2010).

A despolimerização de grandes moléculas em moléculas orgânicas em pequenas e solúveis, propiciam a absorção direta na biomassa microbiana no processo de imobilização, ou podendo ser mineralizados para a forma amoniacal (NH_3 , amônia - forma gasosa) e NH_4^+ , íon amônio, forma ionizada solúvel (VIEIRA, 2017). Em pH neutro ou ligeiramente ácido, a associação da amônia com a água, produz o íon amônio (NH_4^+) e libera íons hidroxilas (OH^-). Essa forma ionizada não possui efeito toxico no ambiente, ao contrário da forma não ionizada, que em pH acima de 8, se desprende em forma de gás (NH_3), podendo causar toxicidade a biota.

A qualidade da matéria orgânica disponível, ou seja, se é lábil (fácil de ser degradada) ou refratária (de difícil degradação) para utilização pelos microrganismos decompositores, determinam a rapidez com que o substrato é mineralizado e, por

consequência, a taxa de amonificação (SANTORO e ENRICH-PRAST, 2011). Portanto, a amonificação das macromoléculas poliméricas nitrogenadas pode ser sumarizada conforme apresentada na Equação 3.



3.6.2 Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN)

A redução biológica do nitrogênio gasoso a amônia é um processo que requer muita energia, e esse metabolismo é restrito apenas as espécies dos domínios Bactéria e Archaea que são capazes de realizar essa transformação (BITTON, 2005). Essa etapa ocorre constantemente nos ecossistemas aquáticos e terrestre, em virtude da grande diversidade de microrganismos fixadores. Estes organismos podem ser aeróbios, anaeróbios, anaeróbios facultativo ou fototróficos.

No ambiente terrestre, os organismos fixadores podem ser de vida livre ou viver em relação simbiótica nas raízes de diversas plantas. Essa relação mutualística, geralmente ocorre entre bactérias e os vegetais superiores, e tem como resultado a formação de nódulos nas raízes, que promove a fixação dessa macromolécula. Nos ecossistemas aquáticos, as cianobactérias pertencentes ao domínio Bactéria, apresentam alta capacidade de fixação de N_2 , é são responsáveis por grande parte da fixação biológica do nitrogênio nesses ambientes.

A etapa de fixação do N_2 é catalisada por um sistema de enzimas denominado sistema nitrogenase, que em sua composição apresenta duas proteínas fundamentais, a dinitrogenase e a dinitrogenase redutase, que mesmo em ambiente aeróbio, podem permanecer ativas (MADIGAN et al., 2016). Essa última enzima é fundamental na quebra da ligação tripla do nitrogênio $\text{N}_2(\text{N}\equiv\text{N})$, permitindo que a molécula agora instável, possa ser assimilada pelos microrganismos fixadores (VIEIRA, 2017). Estimasse que a fixação global do nitrogênio seja de aproximadamente 2×10^8 toneladas métricas de N_2/Ano (BITTON, 2005).

Segundo Nunes, Raimond e Niedwieski (2003), independente do organismo fixador as nitrogenases estão compostas pelas duas metaloproteínas citadas, que

apresentam propriedades e requerimentos similares para sua atividade, como a ausência de oxigênio, uma fonte de redutores com baixo potencial redox e a hidrólise de MgATP (ATP = adenosina 5'-trifosfato). A enzima nitrogenase apresenta em sua composição duas unidades básicas: a primeira, a nitrogenase de molibdênio que consiste de uma ferro-proteína que coleta a força redutora e energia, e outra molibdênio-ferro-proteína (MoFe-proteína), responsável pela coleta e redução do substrato (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Deste modo, a Fe-proteína funciona como doadora de elétrons para a MoFe-proteína (que contém o cofator da enzima, FeMoco), num processo dependente de hidrólise de MgATP (NUNES; RAIMOND; NIEDWIEKI, 2003).

Estudando à variedade de nichos ocupados pelos diversos microrganismos fixadores de N₂, observou-se que em condições de baixa disponibilidade de molibdênio, estes organismos são capazes de fixar N₂ utilizando nitrogenases alternativas que substituem o molibdênio. Essas nitrogenases utilizam sistemas enzimáticos alternativos como a nitrogenase de vanádio e ferro (nitrogenase-VFe) ou outra que contenha apenas ferro como metal de transição (nitrogenase Fe) (NUNES; RAIMOND; NIEDWIEKI, 2003). Esses tipos de nitrogenases alternativas, foram observadas em espécies bacterianas dos gêneros: *Clostridium*, *Rhodobacter*, *Anabaena*, *Rhodospirillum*, *Heliobacterium* e *Azospirillum* (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Os organismos fixadores de nitrogênio apresentam grande variedade fisiológica, morfológica e filogenética. Por exemplo, em relação a sua fisiologia, podem ser anaeróbios, aeróbios e anaeróbios facultativos, entre eles, destacam-se as cianobactérias fotossintetizantes produtoras de O₂, e as bactérias esporuladas anaeróbias de vida livre do gênero *Clostridium*. Os microrganismos fixadores de nitrogênio mais frequentes são classificados em dois grandes grupos denominados “diazotróficos simbiotes” e “diazotróficos de vida livre”. O primeiro grupo apresenta microrganismos de relações de simbiose com outros organismos vivos, por exemplo plantas leguminosas e não leguminosas como a Casuarina, *Myrica*, e algumas gramíneas como o Capim mimoso (BRASIL et al., 2005).

Os simbiotes se localizam nas raízes dos vegetais terrestres ou aquáticos, e penetram formando uma estrutura semelhante a uma rede densa ou novelo denominada nódulo, onde as bactérias ficam hospedadas. Trata-se de uma infecção positiva para a fixação de N₂. Os rizóbios formados, necessitam de um ambiente que disponibilize fontes

de carbono e de energia, que são fornecidas pelo hospedeiro. Nos rizóbios, os microrganismos fixam o N_2 e o reduzem até NH_3 que é a forma utilizável pela planta (ou produtor primário) que o transforma em proteínas para sua biomassa.

São numerosos os gêneros de microrganismos diazotróficos fixadores de N_2 , e entre os representantes fotoautótrofos se destacam cianobactérias e bactérias fotossintetizantes anoxigênicas verdes e vermelhas. Entretanto, a maioria são quimioheterotróficos aeróbios onde se inclui os gêneros *Azotobacter* sp (*A. agilis*, *A. chroococcum*, *A. vinelandii*), *Agrobacterium* sp e bactérias gram negativas como *Klebsiella* sp (BITTON, 2005; MADIGAN et al, 2016).

O processo de evolução observado nos organismos fixadores de N_2 , selecionou esses organismos com capacidade de crescerem em diversos ambientes com oxigênio molecular disponível. Isso só foi possível devido ao desenvolvimento de processos e mecanismos metabólicos que protegem o sistema enzimático nitrogenase, criando microambientes anaeróbios para protegê-lo da presença do O_2 , já que o contato do oxigênio com a enzima nitrogenase, causa sua inativação e em consequência impede a fixação do N_2 .

Esses mecanismos podem ser observados em bactérias do gênero *Klebsiella*, fixadores aeróbios facultativos, nas quais a fixação do nitrogênio ocorre somente quando o oxigênio está ausente ou em baixas concentrações, ou nos fixadores aeróbios microaerófilos, que fixam nitrogênio somente em ambientes com baixas concentrações de oxigênio (geralmente abaixo de 2%) (MADIGAN et al., 2016). Mecanismos mais complexos, podem envolver a produção de compostos limosos externos formando camadas de proteção por bactérias do gênero *Azotobacter* ou a formação de heterocistos pelas cianobactérias do gênero *Anabaena*, onde ambos mecanismos atuam na proteção da nitrogenase da presença do O_2 (MADIGAN et al., 2016).

Deste modo, os diazotróficos de vida livre podem ser anaeróbios como os organismos presentes no filo *Firmicutes* do gênero *Clostridium*, e aeróbios incluindo os gêneros *Azotobacter*, *Azospirillum* e *Beijerinckia*, que mesmo crescendo na presença de O_2 , apresentam mecanismos de proteção da nitrogenase (MADIGAN et al., 2016).

3.6.3 Nitrificação

A transformação da amônia em suas formas mais oxidadas nitrito e nitrato, é um processo biológico em duas etapas governado por diversos microrganismos sendo definida como nitrificação. Durante a nitrificação, um grupo de bactérias autotróficas oxidam a amônia a nitrito (N-NO_2^-) e um segundo grupo também de bactérias autotróficas oxidam o nitrito a nitrato (N-NO_3^-) (METCALF; EDDY, 2016). Em sistemas de tratamento de águas residuárias, as bactérias nitrificantes oxidam parte do nitrogênio disponível nos efluentes para crescimento celular e geração de energia. Em contrapartida, parte do nitrogênio amoniacal é incorporado a biomassa heterotrófica durante o processo.

Existe uma grande diversidade de microrganismos responsáveis por cada uma dessas etapas, destacando-se os pertencentes ao domínio ARCHAEA, as archaeas oxidantes de amônia (AOA), e os pertencentes ao domínio BACTÉRIA, as bactérias oxidantes de amônia (BOA) e bactérias oxidantes de nitrito (BON) (ZHANG, et al., 2011). As bactérias oxidantes de amônia pertencem a duas classes taxonômicas: Betaproteobacterias (p. ex., os gêneros *Nitrosomonas*, *Nitrospira*,) e Gammaproteobacteria (gênero *Nitrosococcus*), e no filo Thaumarchaeota do domínio Archaea, são encontrados mais três gêneros (*Nitrosopumilus*, *Nitrosocaldus*, *Nitrosoarchaeum*). (MADIGAN et al., 2016).

Já os grupos de bactérias oxidantes de nitrito (BON), pertencem às classes Alpha- (*Nitrobacter*), Beta- (*Nitrotoga*), Gamma- (*Nitrococcus*) e Deltaproteobacteria (*Nitrospina*), bem como no filo Nitrospirae (MADIGAN et al., 2016).

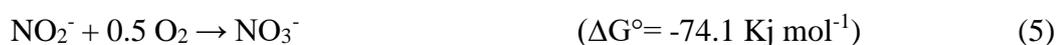
A etapa de nitrificação sempre foi descrita como uma etapa metabolizada por organismos que atuam sequencialmente na oxidação de amônia a nitrito, e do nitrito a nitrato. Porém, estudos recentes com base no sequenciamento do genoma dos grupos de microrganismos que realizam essa etapa, identificaram um organismo que é capaz de oxidar a amônia até o nitrato em uma única via, indicando uma nova rota metabólica no ciclo do nitrogênio.

O termo Comammox (Complete Ammonia Oxidizer) descritos por Kessel et al. (2015) e Daims et al. (2015), foi atribuído as espécies de bactérias do gênero *Nitrospira* que possuem uma ecofisiologia distinta das demais espécies nitrificantes. Os autores afirmam que as espécies do gênero *Nitrospira*, podem ser capazes de sintetizar todas as enzimas responsáveis pela nitrificação completa, além de possuir a enzima *Amônia monoxigenase* (*amoA*), filogeneticamente distinta das enzimas (*amoA*), já conhecidas. Os autores atribuem essa capacidade metabólica a uma forma de conservação de energia

com maior rendimento energético ($\Delta G^\circ = -349 \text{ kJ mol}^{-1}$) quando comparado a qualquer uma das duas etapas do processo convencional de nitrificação, o que torna essa rota metabólica bastante interessante e viável em estações de tratamento de esgotos e efluentes para remoção do nitrogênio.

Como mencionado anteriormente, essas bactérias são autótrofas pois dependem da utilização do carbono inorgânico (CO_2) como fonte de carbono para síntese da biomassa celular, via ciclo de Calvin, e são também quimiolitotróficas, por oxidarem compostos inorgânicos como fonte de energia (MADIGAN et al., 2016). Essas bactérias possuem crescimento lento, o que traz consequências na velocidade da transformação das moléculas (SCHIMIDELL et al., 2007). A estimativa do tempo de duplicação de bactérias heterotróficas é de aproximadamente uma hora, para bactérias nitrificantes esse tempo pode variar entre 7 e 10 horas em laboratório, podendo chegar a semanas em ambientes naturais (SANTORO; ENRICH-PRAST, 2009).

No processo de nitrificação biológica, a oxidação aeróbia de amônia em nitrato ocorre em duas reações sequenciais: oxidação de amônio para nitrito (equação 4) e oxidação de nitrito em nitrato (equação 5), etapas realizadas por dois grupos distintos de bactérias nitrificantes (VAN KESSEL et al., 2015).



Esses processos são catalisados por 3 enzimas chaves. As oxidantes de amônia, representadas por diversos gêneros de bactérias, como *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* e *Nitrospira*, realizam a conversão de NH_3 para a hidroxilamina (NH_2OH), etapa catalisada pela enzima *amônia monoxigenase* (amoA), que é uma proteína integral da membrana bacteriana. Posteriormente, a transformação da NH_2OH para NO_2^- ocorre pela ação da enzima *oxidoreductase da hidroxilamina* (OHR), que está presente no periplasma das bactérias oxidantes de amônia, removendo 4 elétrons neste processo. Logo em seguida, as oxidantes de nitrito, representadas pelos gêneros bacterianos: *Nitrospira*, *Nitrobacter*, *Nitrospina* e *Nitrococcus*, principais gêneros estudados, realizam a

conversão do NO_2^- a NO_3^- , pela ação da enzima *nitrito oxidoreductase*, que está ligada à membrana bacteriana (VIEIRA, 2017; MADIGAN et al., 2016).

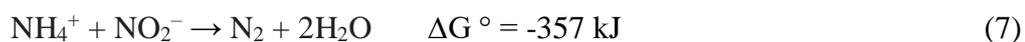
Com base na oxidação total da amônia (equação 6), a quantidade necessária de oxigênio requerido para oxidação completa da amônia equivale a 4,57g de $\text{O}_2/\text{gN-NH}_4$ oxidado, 3,43g $\text{O}_2/\text{g N-NH}_4$ para oxidação de N-NH_4 a N-NO_2^- e 1,14 g de $\text{O}_2/\text{gN-NO}_2^-$ para oxidação de N-NO_2^- a N-NO_3^- (METCALF; EDDY, 2016). O processo de nitrificação é favorecido pela presença de O_2 e alcalinidade suficiente para neutralizar os íons hidrogênio produzidos durante o processo de oxidação (BITTON, 2005).



Vieira (2017) destaca que na etapa de oxidação do nitrito a nitrato, são necessários 100 mols de nitrito para fixar 1 mol de CO_2 , enquanto que na etapa de oxidação da amônia a nitrito são requeridos 35 mols de amônia para alcançar o mesmo objetivo. Deste modo, durante a etapa de oxidação do nitrito para nitrato, as bactérias nitrificantes obtêm baixo ganho energético, além de necessitarem processar maiores quantidades de substrato.

3.6.4 Oxidação anóxica da amônia (*Anamox*)

O termo *anamox* (do inglês *anoxic ammonia oxidation*) é utilizado para definir o processo em que a amônia é oxidada sob condições anóxicas. Esse processo é altamente exergônico, catalisado por um grupo distinto de bactérias anaeróbias obrigatórias, que oxidam a amônia utilizando o nitrito como aceptor de final de elétrons na cadeia respiratória, tendo como produto final o nitrogênio gasoso e os intermediários óxido nítrico e a hidrazina (N_2H_2) (MADIGAN et al., 2016). A equação (7) apresenta a estequiometria do processo *anamox*:



Essas bactérias podem habitar os mais variados ecossistemas, podendo coexistir com outros organismos nitrificantes em ambientes terrestres, marinhos e em ambientes ricos em amônia, como os efluentes de origem antrópica. O processo *anamox* pode ser visto como uma alternativa viável em estações de tratamento de águas de esgotos e diversos efluentes para remoção de compostos nitrogenados, devido ao metabolismo

bacteriano anamox, requerer menos energia para crescimento e síntese celular durante a oxidação dos substratos. Porém, essas bactérias apresentam crescimento lento, sendo necessário maior tempo de retenção celular nos reatores biológicos, além do controle rigoroso nos parâmetros físico-químicos para criação de condições específicas e um ambiente propício para o sucesso ecológico desse grupo bacteriano.

As bactérias anamox que pertencem ao filo Planctomycetes, possuem uma organela ligada à membrana que é desprovida de peptidoglicano, onde ocorre a transformação da amônia e do nitrito em gás nitrogênio (KARTAL; KUENEN; VAN LOOSDRECHT, 2010). Essa organela é denominada de anamoxossomo. A membrana do anamoxossomo, é constituída por ácidos graxos contendo múltiplos anéis de quatro membros (ciclobutano), que são conectados ao glicerol por ligações tanto éster quanto éter (MADIGAN et al., 2016). A formação dessa estrutura membranosa densa torna a organela resistente ao processo de difusão, impedindo que ocorra dano a célula durante o metabolismo dessas bactérias pela formação de produtos intermediários tóxicos durante as reações anamox (MADIGAN et al., 2016). Estudos realizados por De Almeida et al. (2015), identificaram no genoma da bactéria *Kuenenia stuttgartiensis*, bactéria do grupo anamox, os genes que codificam as cinco enzimas responsáveis pela oxidação da amônia, localizadas no anamoxossomo.

Essas bactérias são autotróficas e fixam CO₂ por uma via autotrófica de acetil-CoA, amplamente distribuída em algumas bactérias e arqueias autotróficas anaeróbias (MADIGAN et al., 2016). Por serem quimiolitotróficas, essas bactérias conservam a energia através do metabolismo quimiosmótico, que através de um sistema de membrana semipermeável, em conjunto com as reações redox, geram a força próton motriz necessária para a síntese de ATP, através da enzima ATP-sintase ligada à membrana bacteriana, sendo esta a mesma enzima que catalisa a formação de ATP nos organismos heterótrofos e em todos os tipos metabólicos (KARTAL et al., 2013).

Na reação anamox, inicialmente ocorre a redução do nitrito a óxido nítrico (NO) pela ação da enzima *nitrito redutase*, e o NO reage com a amônia produzindo o composto hidrazina (N₂H₂), um redutor forte, pela ação da enzima *hidrazina hidroxilase* (MADIGAN et al., 2016). A hidrazina produzida, é então oxidada até N₂ pelo efeito catalítico da enzima *hidrazina desidrogenase*, responsável pela emissão de cerca de 50% do N₂ na atmosfera (MAALCKE et al., 2016).

3.6.5 Desnitrificação

A desnitrificação biológica é uma etapa do ciclo do nitrogênio, utilizada nos processos convencionais de remoção do nitrogênio em águas residuárias. Nesse processo, ocorre a redução do NO_3^- a N_2 sob condições anóxicas, (ambiente em que oxigênio disponível, não está como (O_2) oxigênio livre ou oxigênio molecular), está em formas combinadas de moléculas oxidadas, como os nitritos (NO_2^-) e os nitratos (NO_3^-). As bactérias responsáveis por essa etapa requerem quantidades suficientes de NO_3^- e ausência ou baixa concentração de O_2 (oxigênio molecular) no meio.

A desnitrificação pode ser limitada diretamente pela etapa de nitrificação, que quando não ocorre, ou se mantém estabilizada, compromete a formação de nitrato, impossibilitando sua utilização pelas bactérias desnitrificantes, reduzindo a eficiência do processo. Na redução do nitrato a nitrogênio molecular, ocorre à transferência de cinco elétrons por átomo de nitrogênio, dos oito elétrons liberados pelo nitrogênio amoniacal na sua oxidação para nitrato, apenas cinco são recuperados quando o nitrato é reduzido para nitrogênio molecular (ZOPPAS; BERNADES; MENEGUZZI, 2016).

Durante a redução do nitrato a nitrogênio gasoso, ocorre a formação de compostos intermediários, que podem ser tóxicos ao meio. A equação (8), mostra a redução completa do nitrato e seus compostos intermediários.

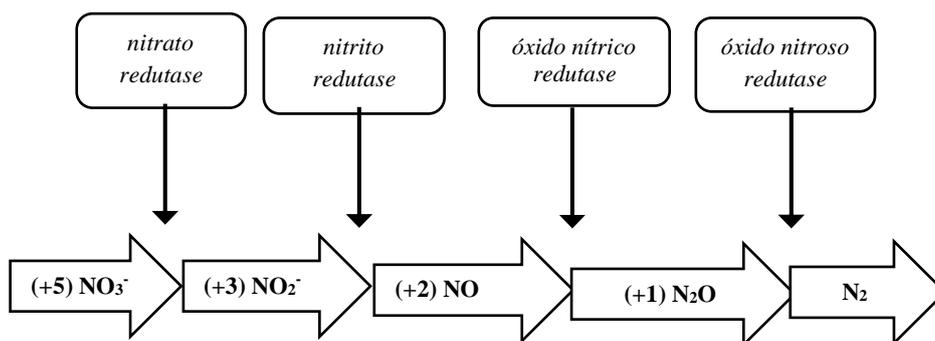


Na conversão do nitrato em nitrogênio gasoso, participam uma grande diversidade de bactérias, destacando-se o gênero *Pseudomonas* e outros como: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Halobacterium*, *Hypomicrobium*, *Methanomonas*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Paracoccus*, *Rhizobium*, *Spirillum* e *Vibrio* (METCALF; EDDY, 2016; MADIGAN et al., 2016).

As etapas da desnitrificação ocorrem numa sequência catalisada por enzimas chaves, assim como ocorre na nitrificação, e são partes integrantes do ciclo do nitrogênio na natureza. A primeira etapa, em que ocorre a redução do nitrato para nitrito, pode ser realizada por *Escherichia coli*, que possui a enzima *nitrato redutase*, integral da membrana bacteriana, responsável por realizar uma etapa parcial do processo, em que ocorre a redução de NO_3^- para NO_2^- com produção de energia (MADIGAN et al., 2016).

Na segunda etapa, a enzima *nitrito redutase* catalisa a conversão de nitrito para óxido nítrico, e após essa etapa, a *óxido nítrico redutase*, catalisa a conversão do óxido nítrico (NO) para óxido nitroso (N₂O), e por fim, a *óxido nitroso redutase*, converte óxido nitroso para N₂ (VIEIRA, 2017). Diferente de *Escherichia coli*, que realiza a redução parcial de nitrato para nitrito, as bactérias *Paracoccus denitrificans* e *Pseudomonas stutzeri*, realizam o processo completo de desnitrificação, de NO₃⁻ até N₂ (MADIGAN et al., 2016). A Figura 2, representa um resumo das etapas de desnitrificação.

Figura 2. Etapas da desnitrificação.



Fonte: Vieira (2017).

Para a remoção de nitrato das águas residuárias os métodos mais aplicados são: osmose reversa, troca iônica, redução de metais ativos, catálise e desnitrificação biológica (DING et al., 2019).

Em sistemas de tratamento de esgotos, a desnitrificação é benéfica uma vez que converte NO₃⁻ a N₂ que retorna a atmosfera, reduzindo a carga de nitrogênio fixado dos efluentes da ETE (Estação de Tratamento de Esgoto), que se descarregados no ambiente, estimulam a eutrofização das águas receptoras em decorrência do crescimento de algas e cianobactérias (MADIGAN et al., 2016).

A desnitrificação biológica requer condições ambientais satisfatórias para o sucesso ecológico dos microrganismos envolvidos. Nesse processo, existe a necessidade de suplementação de carbono orgânico, devido a matéria orgânica presente, está sendo consumida durante o processo de oxidação. A alimentação de sistemas com carbono orgânico pode ocorrer de diversas maneiras, sendo possíveis fontes de carbono a introdução de esgotos doméstico e/ou industrial e lixiviado de aterro sanitário, por exemplo. Também é viável a adição de metanol (CH₃OH) e glicose (C₆H₁₂O₆), que são

fonte de carbono e de energia para bactérias que realizam a redução do nitrogênio oxidado até N_2 (OLIVEIRA et al., 2013).

3.7 Influencia dos Biofilmes Microbianos nos Processos de Remoção de Nitrogênio

As comunidades de microrganismos presentes nos biorreatores, permitem a remoção de contaminantes, toxinas e nutrientes orgânicos, e evitam a descarga de patógenos no meio ambiente (NAZ et al., 2016).

O biofilme é resultado do crescimento de microrganismos em superfícies sólidas bióticas ou abióticas, podendo se desenvolver tanto em ambientes naturais ou patogênicos. A biocenose de microrganismos observada nesses ecossistemas, é bastante complexa, isso em virtude da diversidade metabólica dos organismos presentes no biofilme e da capacidade de adaptação destes ao meio.

As bactérias que compõe o biofilme apresentam dois nichos ecológicos distintos: podem ser de vida livre (planctônicos) ou podem ser organismos sésseis. O primeiro grupo representa as bactérias que possuem um maior potencial metabólico e podem ser observados dispersos na coluna d'água. Já os organismos sésseis, se desenvolvem sob uma superfície sólida é são responsáveis pela formação do biofilme. Esses organismos de vida livre têm característica de rápida proliferação e disseminação para outros ambientes, enquanto que os organismos sésseis crescem aderidos a uma superfície sólida gerando o biofilme (MADIGAN et al., 2016).

A formação dos biofilmes ocorre em estágios sequenciais em decorrência das funções metabólicas dos diversos microrganismos que irão constituir-los, gerando relações simbióticas. Inicialmente, ocorre a adesão das bactérias presentes no ambiente sobre uma superfície sólida onde se multiplicam e secretam várias substâncias. Nesses estágios iniciais, a adesão das primeiras bactérias à superfície, desencadeiam a expressão de genes específicos para a formação de biofilmes que codificam proteínas com atividade enzimática, catalisando a produção de polissacarídeos da superfície celular (EPS – Exopolissacarídeos) que são transcritos e aumentam a camada limosa facilitando a adesão celular (MADIGAN et al., 2016).

Durante a etapa de adesão microbiana, ocorre a formação de colônias que são favorecidas pelo aumento da síntese de EPS. Essa etapa de adesão, envolve diversos fatores ambientais e microrganismos, podendo ocorrer por colonizadores primários ou

secundários, que pelo aumento da produção de EPS, utilizam esse composto para o crescimento e a adesão celular.

As estruturas móveis das bactérias, responsáveis pela locomoção, são fundamentais na colonização de novos nichos, fuga de predadores, busca de alimentos, reprodução e são responsáveis pelo estabelecimento inicial do biofilme e sua maturação. Os flagelos das bactérias de vida livre, facilitam a colonização inicial do biofilme devido à sua dispersão na coluna d'água. Os pilli e as fimbrias, também exercem papel importante na locomoção na fase de colonização do biofilme. O movimento celular observado ocorre em virtude da adesão dessas estruturas aos exopolissacarídeos, permitindo o movimento ou retração celular que auxilia na colonização do novo ambiente e no desenvolvimento do biofilme (MADIGAN et al., 2016).

O desprendimento de fragmentos maduros da biomassa do biofilme no meio aquoso, ocorre constantemente, e pode ser por dois mecanismos distintos: podem ocorrer por erosão (perda de células individuais) ou por perda de agregados maiores (XAVIER et al., 2005). Embora ocorra essa dispersão do biofilme, os microrganismos remanescentes continuam a se multiplicar e desenvolver o biofilme na superfície que se encontra fixado e o ciclo de formação e desprendimento se repete.

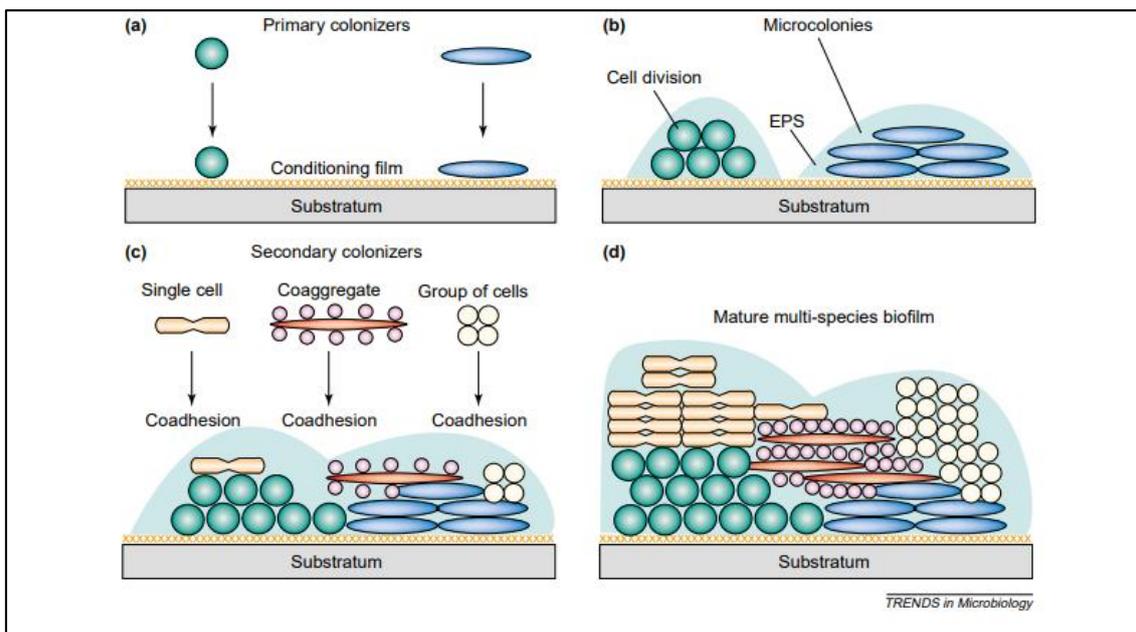
Com o aumento da densidade bacteriana, ocorre o aumento na expressão de genes específicos que induzem ou regulam várias funções celulares. Essas funções envolve a motilidade, fatores de virulência, produção de polissacarídeos e a formação do biofilme.

A formação do biofilme na superfície de um material suporte, propicia a formação de camadas anaeróbias seguidas de aeróbias, o que favorece o desenvolvimento dos organismos autotróficos aeróbios em camadas superiores em contato com o ar e os anaeróbios nas inferiores com menores teores de OD sem a presença do OD (JACOBS; CORREA; PRATES, 2015). Além disso, a presença de um meio de suporte promove um aumento da área de contato e o aumento do tempo de retenção de células (TRC), mesmo em um curto tempo de retenção hidráulica (TRH), favorecendo a crescimento de microrganismos nitrificantes sob condições favoráveis (MOURA; DAMIANOVIC; FORESTI, 2012).

Na figura 3, observa-se o diagrama de formação do biofilme. Na etapa (a), observa-se a colonização primária dos microrganismos sobre o meio de suporte. Sequencialmente, em (b), o crescimento e divisão celular e a produção de EPS. Na etapa (c), ocorre o processo de co-adesão de células individuais e/ou células coagregadas nas

colônias desenvolvidas no material de suporte, e por fim, a maturação e formação de mosaicos clonais dentro do biofilme (d).

Figura 3. Diagrama da formação do biofilme.



Fonte: Rickard et al., (2003).

Moura, Damianovic e Foresti (2012), utilizando um meio de suporte composto por espuma de poliuretano, apresentaram resultados satisfatórios operando um reator de leito estruturado sob aeração intermitente em três fases sequenciais. O sistema apresentou uma eficiência na remoção de nitrogênio total com valor médio de 82,6%, o que indicou que os processos de nitrificação e desnitrificação podem ocorrer simultaneamente em sistemas que atuam com intermitência de aeração. Além disso, o uso do material suporte certamente contribuiu para a eficiência dessas etapas, pois forneceu condições favoráveis de simbiose entre os grupos bacterianos.

4 PRINCIPAIS PARÂMETROS OPERACIONAIS QUE INTERFEREM NO PROCESSO DE REMOÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO

As bactérias do ciclo do nitrogênio são as principais reguladoras das etapas de transformação desse macronutriente na natureza, sendo responsáveis por garantir a interação desta molécula com os organismos vivos. Porém, para que esses processos biológicos ocorram harmonicamente, são necessárias condições ambientais específicas para favorecer o desenvolvimento da grande diversidade dos microrganismos envolvidos (FLECK; TAVARES; EYNG, 2015).

Vários fatores como pH, temperatura, presença de inibidores, alcalinidade e oxigênio dissolvido podem interferir diretamente no crescimento, estabelecimento e na eficiência dessas comunidades bacterianas (MORAIS et al., 2019). Outros fatores também podem ser citados, tais como: deficiência de alguns nutrientes essenciais, presença de compostos tóxicos, aminas, taninos, compostos fenólicos, álcoois, cianetos, éteres, carbamatos e benzeno, além de metais pesados e das formas de nitrogênio em amônia livre (NH_3) e ácido nitroso não ionizado (HNO_2) (MAGRI et al., 2013).

4.1 Oxigênio Dissolvido (OD)

A velocidade da taxa de nitrificação é influenciada diretamente pela concentração de oxigênio dissolvido. A concentração de OD interfere diretamente no metabolismo dessas bactérias aeróbias, por ser o oxigênio molecular o aceptor final de elétrons nessa etapa de oxidação. Taxas e velocidades ótimas podem ser obtidas com níveis de O.D. da ordem de 4,0 mg O_2 /L, desde que exista uma população ótima de bactérias nitrificantes (FERREIRA, 2000). Por outro lado, elevadas concentrações de O_2 podem inibir o desenvolvimento de bactérias desnitrificantes, que são anaeróbias, portanto suas enzimas são sensíveis a presença de (OD) (ZOPPPAS; BERNADES; MENEGUZZI, 2016).

Ma et al. (2017) utilizando Reator de Biofilme de Bateladas Sequenciais (SBBR) demonstraram que a eficiência dos processos de nitrificação e desnitrificação simultânea (SND) aumentou gradualmente com a concentração de oxigênio dissolvido (OD) reduzida de 4,5 mg / L para 0,35 mg / L. Concentrações de O.D inferiores a 0,2 mg/L podem inibir completamente a desnitrificação para culturas puras, já em sistemas de lodos ativados, esse processo pode ser inibido para concentrações de 0,3 a 1,5 mg/L, devido ao crescimento aglomerado das células em formas de flocos (SCHIMIDELL et al., 2007).

Bitton (2005) cita que para a nitrificação prosseguir em um sistema de lodos ativados, a fase de aeração, o oxigênio deve estar bem distribuído no tanque e sua concentração não deve ser inferior a 2 mg / L. Cao et al. (2017) utilizando um reator em bateladas de sequenciais de leito móvel (MBSBR), com variação nas concentrações de OD (1,5, 2,5, 3,5, 4,5 e 5,5 mg/L) apresentaram a eficiência do reator sob influência dessas concentrações nas etapas de remoção de nitrogênio. Os resultados obtidos indicaram que a remoção do nitrogênio total foi de 83,73%, quando o reator funcionou com concentrações de OD de 2,5 mg/L. Do mesmo modo que, a oxidação da amônia a nitrato sob essas condições favoreceu a nitrificação, atingindo eficiência de 93%.

Os resultados apresentados por Hu et al. (2019), demonstraram a influência do OD nos processos de remoção de nitrogênio utilizando filtro biológico. Utilizando diferentes concentrações de OD no reator, observaram que quando a concentração de OD foi de 2,5 mg/L, a taxa de remoção de nitrogênio amoniacal foi de 66,9%, resultando em baixa eficiência nos microrganismos aeróbios nitrificantes. Com o aumento da concentração do (OD) para 3,0 mg/ L⁻¹ e 3,5 mg/L⁻¹, os resultados obtidos indicaram uma melhor eficiência na remoção do nitrogênio amoniacal com 81,9% e 82,7% respectivamente. Esses resultados indicam que com o aumento na concentração de OD no filtro, houve melhora na eficiência no metabolismo aeróbio nitrificante.

As enzimas presentes nas bactérias desnitrificantes são sensíveis a presença de OD, porém alguns grupos de bactérias desnitrificantes são capazes de realizar a desnitrificação sob condições aeróbias. Segundo Ji et al. (2015), a presença do gene *NapA* pode ser o responsável por esse metabolismo aeróbio, e que as análises filogenéticas demonstraram que esse gene está presente no filo *proteobactéria* α , β e γ . Os autores ainda destacam que a espécie bacteriana *Paracoccus denitrificans*, apresenta capacidade de realizar a redução de NO₃⁻ em condições aeróbias, o qual se deve à possibilidade da presença de uma enzima *nitrato redutase* periplasmática que pode ser expressa em condições anaeróbias e/ou aeróbias.

Na ausência de OD, ou sob concentrações limitadas, as enzimas nitrato-redutase e nitrito-redutase da cadeia respiratória de transporte de elétrons são induzidas, resultando na transferência de hidrogênio e de elétrons para nitrito ou para o nitrato (METCALF; EDDY, 2016).

4.2 pH

O pH é um parâmetro fundamental no desempenho dos processos de nitrificação e desnitrificação sendo necessário seu controle. As variações observadas do pH no meio, são devidas ao metabolismo dos grupos bacterianos envolvidos e condições de substrato. A nitrificação apresenta faixa ótima em valores de pH entre 7,2 a 8,0, e em pH inferior a 6,0 ocorre sua redução. Enquanto que a desnitrificação necessita de pH próximo à neutralidade, evitando valores inferiores a 6,0 e superiores a 8,0 (FLECK; TAVARES; EYNG, 2015).

Em sistemas de tratamento a formação do ácido nitroso (HNO_2) ocorre em pH abaixo de 7,0, ocasionando a redução da atividade das bactérias do gênero *Nitrobacter*, um dos gêneros responsáveis pela segunda etapa da nitrificação. Em contrapartida em pH acima de 8,5, a quantidade de amônia livre causará a inibição das bactérias do gênero *Nitrossomonas*, responsáveis pela primeira etapa da nitrificação (FERREIRA, 2000). Nesses sistemas, bactérias nitrificantes podem aclimatar-se nos reatores com valores de pH mais ácidos, porém esse processo leva tempo para adaptação bacteriana ao meio, podendo ocorrer ciclos aonde predominem altas taxas de nitrificação e baixas taxas de remoção da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) (MAGRI et al., 2013).

As variações das espécies nitrogenadas em sistemas de tratamento, ocorre em virtude da atividade metabólica dos microrganismos responsáveis pela oxidação e redução do nitrogênio. Deste modo, pode ocorrer elevação da alcalinidade ou consumo no meio, resultando em oscilações no pH. No sistema de tamponamento carbonato/gás carbônico cada 2 moles de H^+ , consome 1 mol de alcalinidade na forma de carbonato de cálcio (100 g), Equação 9, portanto, cada 1 mol de amônia oxidada (18 g) promove o consumo de 1 mol de carbonato (100 g) (MAGRI et al., 2013). Já no processo de desnitrificação ocorre o aumento da alcalinidade e do pH, teoricamente, esse processo produz 3,6 mg de alcalinidade como CaCO_3 por mg de nitrato reduzido à N_2 (BITTON, 2005).



Como as reações de nitrificação consomem alcalinidade, NaOH e/ou Ca(OH)_2 devem ser adicionados para neutralizar o pH, pois sua redução interfere na atividade metabólica das bactérias nitrificantes (MODIN et al., 2011). Portanto, deve haver

alcalinidade suficiente nas águas residuárias para equilibrar a acidez produzida pela nitrificação, a queda de pH que resulta da nitrificação pode ser minimizada através da aeração para remoção do CO₂ (BITTON, 2005).

Wang et al. (2018), avaliaram o desempenho de comunidades bacterianas no processo de desnitrificação autotrófica usando um sistema bioeletroquímico para remoção simultânea de cromo. Observaram que nesse processo, uma maior eficiência na remoção de nitrato e de cromo quando o pH estava em 7,0, apresentando taxas de 97,21% e 72,26% respectivamente. Schimidell et al. (2007), destacam a importância do processo de desnitrificação ocorrer com pH elevado acima de 7, pois em meio ácido, pH abaixo de 7, propicia a formação de ácido nitroso que é altamente tóxico.

4.3 Alcalinidade

A alcalinidade pode ser definida como o potencial de reação de um determinado sistema aquoso em neutralizar ácidos fortes, definindo o valor de pH no meio. Os processos globais de transformação do nitrogênio, são mediados pela produção e consumo da alcalinidade durante a atividade bacteriana. Observa-se que, numa faixa de pH de 5 a 8, em um reator biológico aquoso, o equilíbrio do pH deste reator será conduzido pela quantidade de CO₂ e alcalinidade do meio (FERREIRA, 2000).

Ferreira (2000), destaca que em sistemas fechados, onde não ocorre a saída do CO₂, a alcalinidade do efluente deve ser dez vezes maior do que a quantidade de amônia nitrificada, de modo a manter o pH acima de 6,0. O autor ressalta que teoricamente a taxa de consumo da alcalinidade é de 7,1 mg CaCO₃ por mg de amônia oxidada, e o consumo observado é geralmente igual ou menor do que a teórica.

Se o pH é alcalino (>8,0), o equilíbrio se desloca até a formação de amônia, favorecendo a atividade das BOA. Em contrapartida, sabe-se que a atividade das bactérias oxidantes de nitrito é fortemente dependente da concentração de amônia no meio (ZOPPAS; BERNARDES; MENEGUZZI, 2016).

4.4 Temperatura

Os efeitos da temperatura sobre os processos microbiológicos nos sistemas naturais, têm recebido considerável interesse científico devido à sua importância no ciclo

do carbono e do nitrogênio e os possíveis feedbacks para as mudanças climáticas (BONNETT et al., 2013). A temperatura influencia diretamente o metabolismo das bactérias responsáveis pela remoção de nitrogênio. Variações muito bruscas de temperatura podem aumentar ou reduzir significativamente as atividades bacterianas em reatores e nos corpos aquáticos. Kim, Lee e Keller (2006) relatam que as atividades das bactérias nitrificantes aumentam com a elevação da temperatura e, torna-se limitante quando a temperatura está abaixo 10 °C.

Para garantir eficiência metabólica das bactérias envolvidas nos processos de nitrificação e desnitrificação, o controle do equilíbrio térmico é essencial, devido ao efeito direto no metabolismo bacteriano. A necessidade de manutenção da homeostase térmica nas estações de tratamento, reflete no interesse de garantir maiores eficiências nos processos de remoção biológica do nitrogênio. A temperatura exerce interferência direta no equilíbrio químico de amônia livre e ácido nitroso livre, que em elevadas concentrações reduzem a atividade metabólica das oxidantes de amônia e das oxidantes de nitrito (VAN HULLE et al., 2007; GABARRO et al., 2012).

Em sistemas naturais e em estações de tratamento (ETES), as bactérias nitrificantes e desnitrificantes, estão sujeitas as alterações recorrentes de temperaturas devido as variações sazonais ou condições adversas. De modo que, essas bactérias apresentam respostas metabólicas distintas em casos de alternâncias significativas de temperatura, podendo reduzir significativamente o tamanho populacional e/ou reduzir a eficiência na degradação e incorporação de substratos. Duan, He e Liu (2011), observaram que em 16°C, os processos de nitrificação e desnitrificação reduziram consideravelmente. Por outro lado, temperaturas em torno de 32,1°C aumentaram a remoção de N-NH₃. Em consequência disso, os autores atribuíram à influência da temperatura na eficiência das etapas de nitrificação e desnitrificação.

4.5 Relação Carbono/Nitrogênio

Um parâmetro importante na etapa de remoção biológica de nitrogênio, é a relação carbono/nitrogênio, caracterizada pela equação DQO:N (demanda química de oxigênio: nitrogênio) (ZOPPPAS; BERNADES; MENEGUZZI, 2016). A etapa de desnitrificação é altamente dependente dessa relação, que se for elevada, favorece a redução desassimilativa do nitrato para amônia (RDNA), já que em condições de limitação de

receptores de elétrons, é favorecida a via que permite a eliminação de um número maior de elétrons (PEREIRA-RAMIREZ et al., 2003).

Na etapa de nitrificação, a relação DQO:N interfere diretamente no metabolismo das bactérias nitrificantes. À medida que esta relação aumenta, pode ser observada a redução na densidade populacional de bactérias nitrificantes, devido ao estabelecimento de bactérias heterotróficas e nitrificantes, competindo diretamente por substrato e O_2 .

Correa et al. (2016), utilizando o processo de nitrificação e desnitrificação simultânea (SND), demonstraram que os reatores operados com baixa relação C/N, favoreceram o desenvolvimento das bactérias nitrificantes, contribuindo para um processo de nitrificação mais acentuado. Entretanto, na etapa de desnitrificação, observou-se que foi possível obter eficiência próxima a obtida na etapa de nitrificação, mesmo com a baixa relação C/N do sistema. Os autores atribuíram esse efeito, a coexistência de bactérias nitrificantes e desnitrificantes no reator, principalmente aderidos ao material suporte.

5 MATERIAL E MÉTODOS

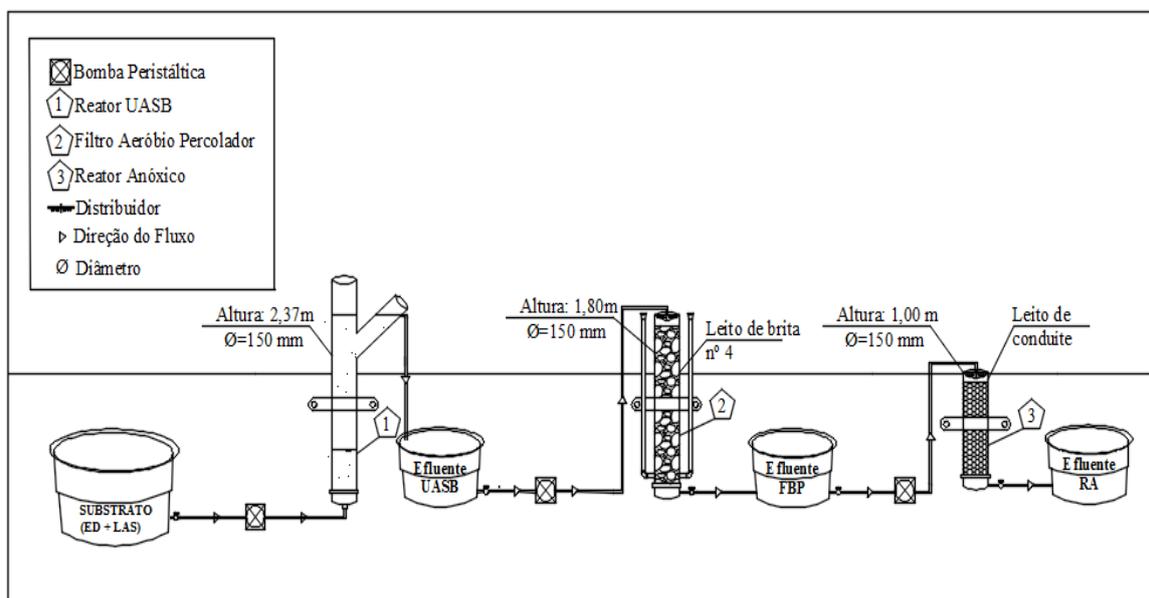
5.1 Local de Realização da Pesquisa

O trabalho foi realizado na Estação Experimental de Tratamentos Biológicos de Esgotos Sanitários (EXTRABES), pertencente à Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), com localização no Bairro do Tambor na Cidade de Campina Grande, PB, Brasil.

5.2 Sistema Experimental

O sistema experimental é constituído por um reator anaeróbio de fluxo ascendente com manta de lodo (UASB), seguido de filtro biológico percolador (FBP) e um reator anóxico, dispostos sequencialmente, como apresentado na Figura 4.

Figura 4. Reatores utilizados no experimento: (1) Reator UASB; (2) Filtro Biológico Percolador; (3) Reator Anóxico.



O reator UASB foi construído em tubo de PVC rígido, com capacidade volumétrica de 42 litros, e cerca de 2,37 m de altura com diâmetro de 150 mm. A carga orgânica volumétrica aplicada (COV) foi de 2,7 kgDQO/m³.dia, carga hidráulica volumétrica de 3 m³.m⁻³.d⁻¹ e tempo de detenção hidráulica (TDH) de 8 horas.

O FBP foi construído em tubo de PVC, com volume total de 35 L, sendo 17 L preenchidos com brita nº 4, representando índice de espaços vazios de 49%. Possui altura de 1,80 m, carga orgânica volumétrica aplicada de 1,2 kgDQO/m³.dia, carga hidráulica volumétrica de 4,0 m³/m³.dia, taxa de aplicação superficial de 2,7 m³/m².dia e vazão do afluente de 48 L.d⁻¹.

O reator anóxico foi construído em tubo de PVC, com volume total de 17,5 L, altura de 1,0 m, vazão efluente de 17 L.d⁻¹ e tempo de detenção hidráulica de 24 horas.

O filtro biológico percolador foi alimentado em fluxo intermitente e o tempo de duração de cada ciclo é de 06 horas, totalizando quatro ciclos diários. Os ciclos foram divididos nas fases de alimentação, descarga e repouso. O tempo de alimentação do FBP, foi calculado para ser coincidente com tempo em que o efluente do reator UASB era bombeado para este filtro, conseqüentemente, a etapa de alimentação do FBP ocorria durante o período de 40 minutos. Após esta etapa, o efluente do FBP era descarregado por 20 minutos até que fosse totalmente esvaziado e, em seguida, permanecia em repouso por 5 horas.

A alimentação do reator anóxico ocorreu com o efluente proveniente do FBP, sendo bombeado através de fluxo descendente até o reator anóxico.

5.3 Lixiviado de Aterro Sanitário

O lixiviado usado na preparação do substrato para alimentar o sistema de reatores em série (item 5.2), foi coletado no aterro sanitário localizado no engenho Mussuré, no distrito industrial, situado na região metropolitana da cidade de João Pessoa, PB, a cerca de 5 km da BR-101. O aterro sanitário foi projetado e construído por um consórcio de desenvolvimento intermunicipal responsável pela integração das cidades de Bayeux, Santa Rita, Lucena, Conde, João Pessoa, Cabedelo e Cruz do Espírito Santo, com propósito de permitir que cidades de pequeno porte atuem de forma integrada e sustentável na eliminação dos lixões.

O lixiviado coletado no aterro, foi armazenado em reservatório de polietileno e transportados em caminhão tanque até o laboratório da EXTRABES. Após sua chegada no laboratório, o lixiviado foi utilizado para preparação do substrato com frequência diária, fornecendo um efluente com volume necessário para alimentação dos reatores.

5.4 Esgoto Doméstico

O esgoto doméstico utilizado foi proveniente do sistema de esgotamento sanitário da cidade de Campina Grande, PB, coletado no emissário leste e aduzido para um reservatório de polietileno, onde foi armazenado a temperatura ambiente até o momento de preparação do substrato.

5.5 Substrato

Para o preparo do substrato, adotou-se o percentual de 3% de lixiviado de aterro sanitário mais 97% de esgoto doméstico (percentagem em volume). A mistura forneceu a concentração média de nitrogênio amoniacal de 150 mg.L^{-1} . A alimentação do próximo reator da série, o FBP, ocorria com o efluente advindo do reator UASB, que através de uma bomba direcionava o efluente ao FBP, e o efluente do FBP era bombeado para a última unidade, o reator anóxico. A preparação do substrato ocorria diariamente, para cada evento de alimentação do UASB.

5.6 Análises Microbiológicas: Quantificação de Bactérias Nitrificantes e Desnitrificantes

As análises microbiológicas foram realizadas no laboratório de microbiologia da EXTRABES. Foram quantificadas bactérias nitrificantes e desnitrificantes. O Número Mais Provável (NMP) de bactérias nitrificantes foi quantificado nas amostras do efluente FBP. Já o NMP das bactérias desnitrificantes, foi estimado nas amostras do efluente do reator anóxico.

A estimativa populacional dos grupos bacterianos citados, foram realizadas com a técnica dos tubos múltiplos que fornece os resultados na unidade de NMP/100 ml. Esse método é baseado no princípio da diluição da amostra com os microrganismos de interesse até sua extinção e, seguidamente, uma alíquota de cada uma dessas diluições das amostras são inoculadas em tubos com os meios de cultura específicos que favorecem o crescimento das bactérias sob estudo.

Esse processo é realizado em duas etapas: a primeira consiste na diluição da amostra (substrato a ser avaliado) em séries decimais em tubos de ensaio contendo o líquido de diluição esterilizados, tamponado e pH 7,00. Podem ser usados vários volumes para diluição da amostra, mas sempre múltiplos de 9, por exemplo, 18 ml. A seguir e, em condições de assepsia, se inocula 2 ml da amostra no tubo contendo a água de diluição (18 ml), obtendo a diluição 10^{-1} . Após a homogeneização do tubo, retira-se 2 ml de amostra da diluição 10^{-1} , e adiciona-se a outro tubo com água de diluição para obter a diluição 10^{-2} . Realiza-se essa etapa, até obter-se todas as diluições desejadas.

O método foi desenvolvido inicialmente para quantificação de bactérias coliformes em água potável a fim de garantir a qualidade sanitária da água destinada ao consumo humano, nas quais os coliformes, e em particular *Escherichia coli*, devem estar

ausentes. Na quantificação de coliformes em água potável, os volumes testados são bem maiores que as alíquotas de amostras sob estudo (lixiviado de aterro sanitário mais esgoto doméstico) com volumes de 10 mL, 1 mL e 0,1 mL. Esses volumes são inoculados em 5 tubos originando uma série decimal das diluições das amostras inoculadas de 15 tubos: 5x10 ml, 5x1ml e 5x0,1m.

Partindo dos princípios dessa técnica, foram feitas adaptações para outros tipos de amostras, como para o solo, e atualmente é bastante utilizada para águas residuárias, utilizando diluições decimais da amostra original. Essas adaptações propiciam bons resultados, permitindo as estimativas das concentrações dos microrganismos de interesse em uma certa unidade de volume.

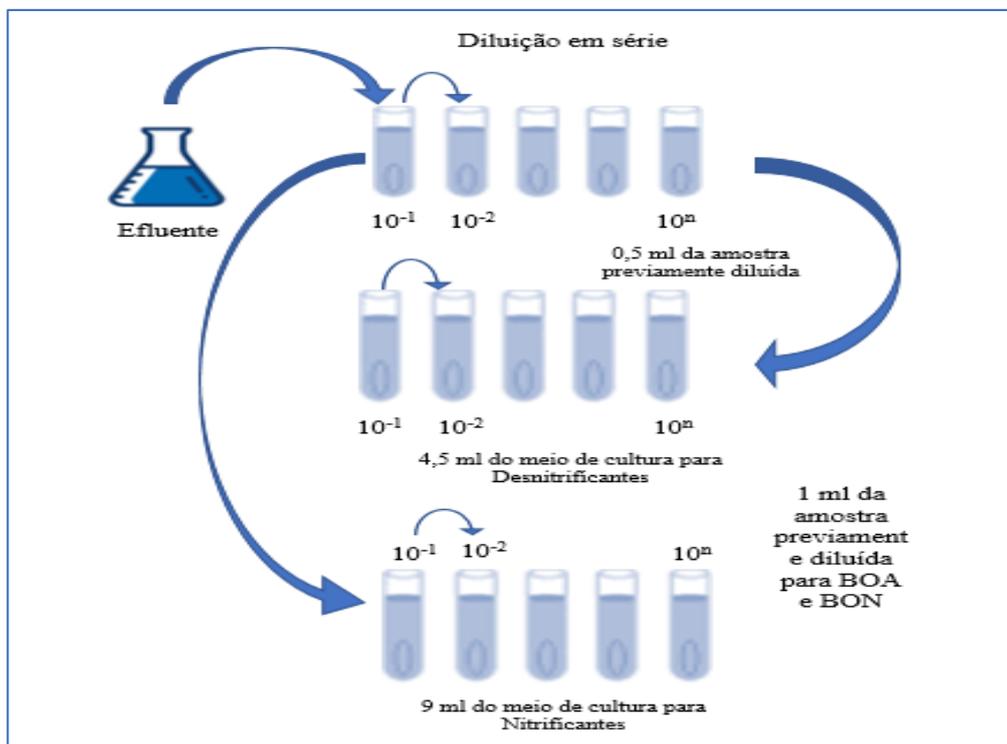
Esse método é baseado na distribuição probabilística da presença e ausência dos microrganismos em crescimento. A leitura é feita pela quantificação dos números de tubos positivos (com crescimento) e negativos (sem crescimento) para cada uma das três diluições. Em tabelas específicas se procura as combinações das três séries de diluições decimais. Os resultados do NMP representam um valor com índice de confiança de 95%, tendo em vista que o método não determina a concentração exata e sim o número mais provável.

5.7 Coleta das Amostras

As amostras para as quantificações dos grupos bacterianos foram coletadas nos efluentes dos reatores FBP e Reator anóxico, no período da manhã e, em seguida, foram levadas para o laboratório da EXTRABES para diluição das amostras e incubação de acordo com os tempos de crescimento de cada grupo bacteriano, que são de 30 dias para as nitrificantes (BOA e BON) e cerca de 15 dias para as bactérias desnitrificantes.

Na Figura 5, apresenta-se o fluxograma das etapas de diluição das amostras e inoculação em meio de cultura seletivo para bactérias nitrificantes e desnitrificantes.

Figura 5. Fluxograma de quantificação das bactérias nitrificantes e desnitrificantes.



5.8 Quantificação de Bactérias Desnitrificantes – Técnica dos Tubos Múltiplos

A técnica de diluições decimais seriadas, foi utilizada para quantificar as bactérias desnitrificantes, e foi aplicada de acordo com a metodologia utilizada por Mendonça (2002).

Procedimento analítico:

- I. Preparação do meio de cultura – Em um becker foram adicionados 2g do caldo nutriente (NUTRIENT BROTH – ACUMEDIA) em pó, e 0,107 g de NaNO₃, e ambos foram transferidos para um em balão e o volume completado até 250 mL, com água Milli-Q;
- II. A seguir, 4,5 mL do meio de cultura foram distribuídos em cada um dos tubos de ensaios (5 tubos para cada diluição);
- III. Esses tubos foram tampados com tampão de algodão envoltos em gaze e esterilizados em autoclave, por 20 minutos sob pressão de 1atm e temperatura de 120°C;
- IV. Foram realizadas as diluições seriadas decimais das amostras para inoculação no meio de cultura. Primeiro, foi preparado o liquido de diluição (ou água de diluição) com

adição de 2ml da solução de K_2HPO_4 e 0,5 ml da solução de KH_2PO_4 , em um balão completando o volume para 500ml com água Milli-Q. Todo o procedimento ocorreu em ambiente de assepsia e próximo ao bico de Bunsen;

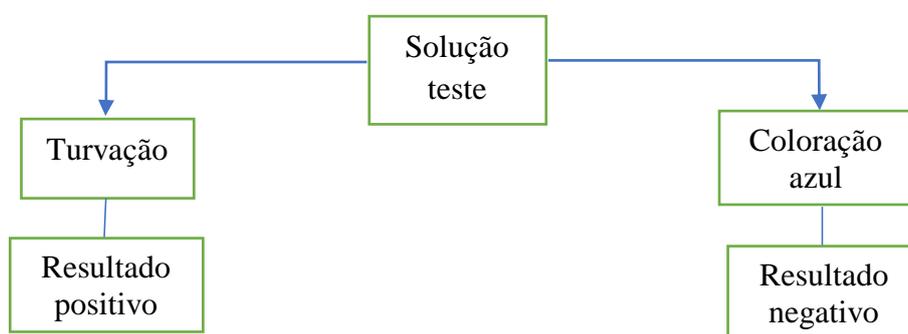
- V. Em tubos de ensaio limpos, adicionou-se 18ml da água de diluição em cada um dos tubos que foram tampados com rolhas de algodão envolvidos com gaze e autoclavados por 20 minutos sob pressão de 1atm e temperatura de $120^\circ C$;
- VI. A seguir, realizou-se as diluições seriadas inoculando-se no primeiro tubo da série de 8, 18 ml de água de diluição estéril com 2 ml do substrato, obtendo se a primeira diluição, de 10^{-1} . Foi agitada a primeira diluição e com nova pipeta limpa e esterilizada, retirou-se 2 ml dessa primeira transferindo para o segundo tubo, obtendo-se a diluição 10^{-2} . Estes passos foram repetidos até atingir a diluição 10^{-8} ;
- VII. Os tubos foram vedados com rolhas de borrachas e envolto por gaze, sendo incubados a $30^\circ C$ por 15 dias.

- **Preparação da Solução-teste:** Preparou-se a solução teste para leitura do resultado de crescimento ou não das bactérias sob estudo. Foram pesados 0,2g de difenilamina [$(C_6H_5)_2NH$] e diluído em 100 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4). A solução foi armazenada em ambiente livre de luminosidade e sob refrigeração.

- **Determinação do nitrato após incubação:**

Após o período de incubação, se procedeu a leitura do consumo de nitrato. O ambiente de trabalho foi limpo e desinfetado, sendo todo o processo realizado sob condições de assepsia. Os tubos foram retirados da estufa e de cada um daqueles com a mesma diluição, retirou-se uma alíquota de 0,5 ml da cultura que foram transferidos para um tubo limpo, adicionando-se 2 ou 3 gotas da solução teste. Os resultados são expressos como presença ou ausência de turbidez e presença ou não de coloração azul. A cor azul indica ausência de crescimento (presença de nitrato não consumido). Já a presença da coloração turva, indica consumo de nitrato, indicando possível atividade das bactérias desnitrificantes (Figura 6).

Figura 6. Fluxograma das etapas para identificação das bactérias desnitrificantes.



NMP:

O resultado quantitativo (NMP) das bactérias desnitrificantes, foi definido pela combinação dos tubos positivos e negativos das três séries de 5 tubos de diluições decimais, através da consulta da tabela padrão de probabilidade (APHA, 2012).

5.8.1 NMP de bactérias nitrificantes

A técnica do Número Mais Provável empregada foi a metodologia utilizada por Mendonça (2002). A estimativa do NMP é realizada com base na combinação dos resultados dos tubos positivos e negativos, o que fornece um código de 3 números (um para cada uma das 3 séries de 5 tubos) consultando-se a tabela padrão de probabilidade (APHA, 2012).

5.8.2 Quantificação de bactérias oxidantes de amônia (BOA)

Para quantificação das bactérias nitrificantes, foi utilizada a mesma técnica dos Tubos Múltiplos.

O meio de cultura para crescimento das Bactérias Oxidadoras de Amônia (BOA), foi preparado seguindo a formulação apresentada na tabela 1. Os integrantes foram colocados em um bequer, completando o volume com água Milli-Q. A seguir, realizou-se a correção do pH para próximo a 7,8, com gotas do sobrenadante da solução Na_2CO_3 .

Tabela 1- Meio de cultura para bactérias oxidantes de amônia. Concentração da solução estoque (g/100ml)		Vol. Solução estoque p/ 500 ml de meio (mL)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5,00 g	0,094/ mgL^{-1} de N-NH ₄
KNO_2 ou (NaNO_2)	0,85 g	0,5
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,34 g	0,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,00 g	0,5
Azul de bromotimol	0,04 g	0,5
KH_2PO_4 (0,2M)	2,72 g	3,75
Ferro quelante:		0,5
EDTA.2NA	0,331 g	
$\text{FeSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,246 g	
Elementos traço	0,0422 g	0,5

Fonte: Mendonça (2002) apud Schmidt & Belser (1984).

- **Procedimento analítico:**

- I. Para preparo do meio de cultura, adicionou-se as soluções apresentadas na tabela 1, em um becker, completando o volume para 500mL com água Milli-Q;
- II. Procedeu-se a correção do pH para 7,5, com a adição de gotas do sobrenadante da solução de Na_2CO_3 ;
- III. Em cada tubo de ensaio, adicionou-se 9 mL do meio de cultura, sendo 5 tubos para cada diluição utilizada;
- IV. Adicionaram-se, em cada tubo, 5 unidades de espumas cúbicas de poliuretano de 0,5cm, para servirem de área de fixação do biofilme microbiano;
- V. Os tubos foram tampados com algodão e envoltos com gaze;
- VI. Os tubos foram esterilizados em autoclave por 20 minutos sob pressão de 1 atm e temperatura de 120°C ;
- VII. Realizaram-se as diluições decimais seriadas das amostras para inoculação no meio de cultura. Para realizar essas diluições, preparou-se o líquido de diluição da mesma forma que citado no item Quantificação de Bactérias Desnitrificantes - Procedimento analítico- no item IV: adicionaram-se 2ml da solução de K_2HPO_4 e 0,5 ml de solução de KH_2PO_4 , completando o volume para 500ml com água Milli-Q. Todo o procedimento ocorreu sob ambiente de assepsia, próximo ao bico de Bunsen;
- VIII. Adicionou-se 18ml da água de diluição em cada tubo de ensaio, logo em seguida os tubos foram tampados com rolhas de algodão e envoltos com gaze, seguindo para autoclave.
- IX. Logo após essa etapa, adicionou-se 2mL da amostra ao tubo contendo a água de diluição, obtendo a diluição 10^{-1} . Após a homogeneização do tubo contendo a diluição 10^{-1} , retirou 2 mL, e adicionou a outro tubo contendo a água de diluição, obtendo a diluição 10^{-2} . Essa etapa procedeu até obter a diluição 10^{-8} . Cada diluição é feita em quintuplicata.
- X. Os tubos foram incubados por 30 dias e temperatura de 30°C ;

- **Preparo dos reagentes**

Nessa etapa, para caracterização das bactérias nitrificantes presentes no ensaio após o período de incubação de 30 dias, preparou-se duas soluções que permitiram identificar os tubos onde ocorreram o crescimento das células bacterianas.

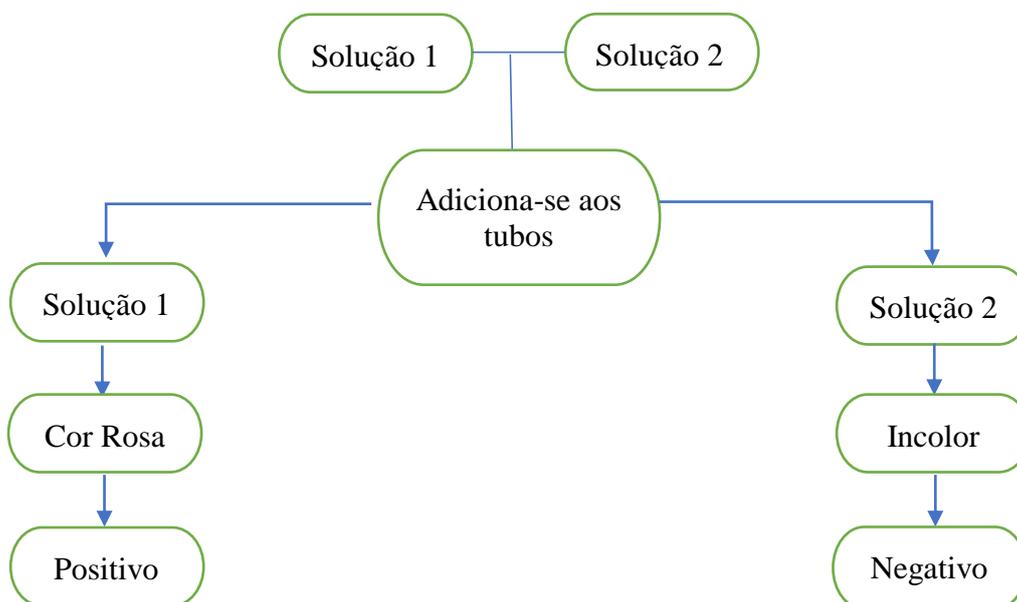
Para a Solução 1, adicionou-se 0,5g de sulfanilamida em 100 mL de ácido clorídrico (HCl) 2,4N. Logo após, a solução foi armazenada sob refrigeração e livre de luminosidade. Para o preparo da solução 2, dissolveu-se 0,3g de N-naftil-etilenodiamina hidrocloreto em 100 mL de ácido clorídrico (HCl) 0,12N, seguindo o mesmo critério de armazenamento da solução 1.

- **Determinação do nitrito após incubação e interpretação da leitura das amostras**

Após o período de incubação, realizou-se a leitura do consumo de nitrato nas amostras. Durante essa etapa, o ambiente de trabalho foi preparado (limpo e desinfetado), sendo todo o processo realizado sob condições de assepsia. Os tubos foram retirados da estufa e de cada um dos tubos com mesma diluição, retirou-se uma alíquota de 0,5 ml da cultura, e adicionou-se em um tubo limpo, nesse momento, adicionou-se 2 ou 3 gotas da solução teste 1 e 2, podendo ser observada a alternância de cores nas amostras, podendo apresentar a coloração rosa avermelhada ou podendo ser incolor.

A mudança da coloração para rosa avermelhada, indica presença de nitrito e, conseqüentemente, crescimento celular das oxidantes de amônia (resultado positivo), por outro lado, ausência de cor indica que não houve crescimento celular dessas bactérias (resultado negativo) Figura 7.

Figura 7. Fluxograma do teste qualitativo quanto a produção de nitrito nos tubos.



5.8.3 Quantificação de bactérias oxidantes de nitrito (BON)

Foi utilizada a mesma técnica, dos tubos múltiplos, de acordo com a metodologia utilizada por Mendonça (2002). O meio de cultura foi preparado de acordo com os compostos químicos listados na tabela 2, tendo seu volume completado com água Milli-Q.

Tabela 2- Meio de cultura para bactérias oxidantes de nitrito. Concentração da solução estoque (g/100ml)		Vol. Solução estoque p/ 500 ml de meio (mL)
NaNO ₂	0,69 g	0,5
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,34 g	0,5
MgSO ₄ . 2H ₂ O	4,00 g	2,5
K ₂ HPO ₄ (0,2M)	3,48 g	2,0
KH ₂ PO ₄ (0,2M)	2,72 g	0,5
Ferro Quelante		0,5
EDTA.2NA	0,331 g	
FeSO ₄ .2H ₂ O	0,246 g	
Elementos traço	0,0422 g	0,5

Fonte: Mendonça (2002) apud Schmidt & Belser (1984).

- **Procedimento analítico**

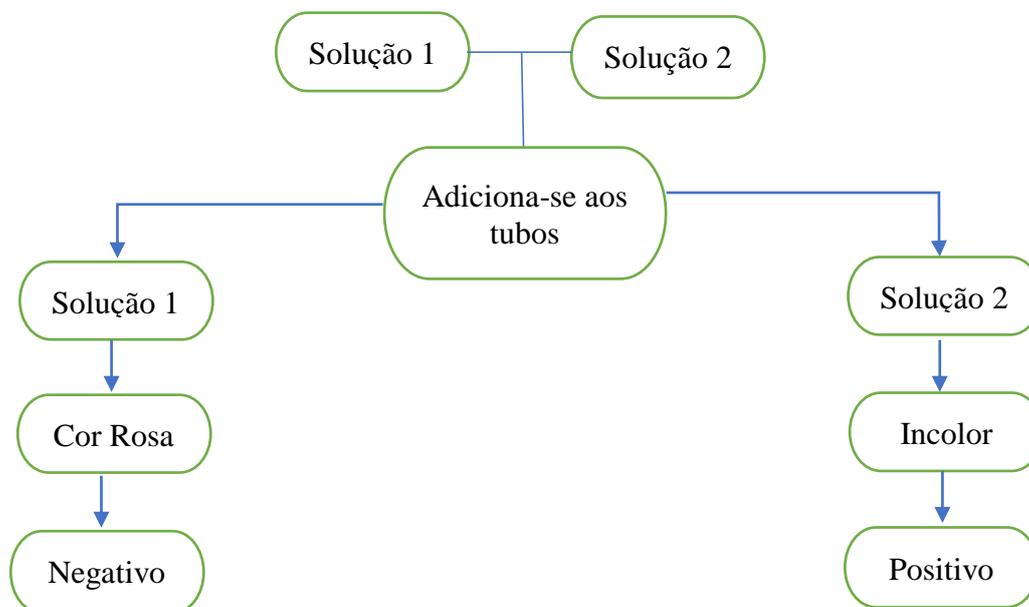
- I. Para preparo do meio de cultura, adicionou-se a um becker as soluções apresentadas na tabela 2, com a complementação do volume para 500mL, com água Milli-Q.
- II. Adicionou-se gotas do sobrenadante da solução de Na₂CO₃, corrigindo o pH para os valores entre 7,2 e 7,5.
- III. Todos os demais passos e soluções testes, foram as mesmas das etapas descritas para BOA, apresentadas no tópico anterior.

- **Resultado:**

A leitura do consumo de nitrito ocorreu após a adição das soluções-teste nas alíquotas retiradas das amostras após o período de incubação. A variação no padrão de cores das amostras em decorrência do contato desta com o reagente, pode indicar o crescimento celular dessas bactérias no meio de cultura. A ausência de coloração, indica que o nitrito foi consumido, indicando positivamente a presença de bactérias oxidantes

de nitrito (resultado positivo), e a coloração de rosa a vermelho, indica presença de nitrito, (resultado negativo) Figura 8.

Figura 8. Fluxograma do teste qualitativo quanto a produção de nitrato nos tubos.



5.9 Procedimentos Analíticos

As análises físico-químicas foram realizadas na Estação Experimental de Tratamentos Biológicos de Esgotos Sanitários (EXTRABES), pertencente à Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). As análises químicas do substrato e dos efluentes dos reatores, seguiram as normas estabelecidas pelo Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2012). Deste modo, durante o monitoramento do sistema experimental, foram avaliados os seguintes parâmetros: pH, alcalinidade total, nitrogênio amoniacal (N-NH_4^+), nitrito (N-NO_2^-) e nitrato (N-NO_3^-).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados advindos do processo de monitoração dos reatores, no que concerne aos parâmetros bacteriológicos e de alguns parâmetros químicos que apresentaram influência direta no processo de amonificação, nitrificação e desnitrificação.

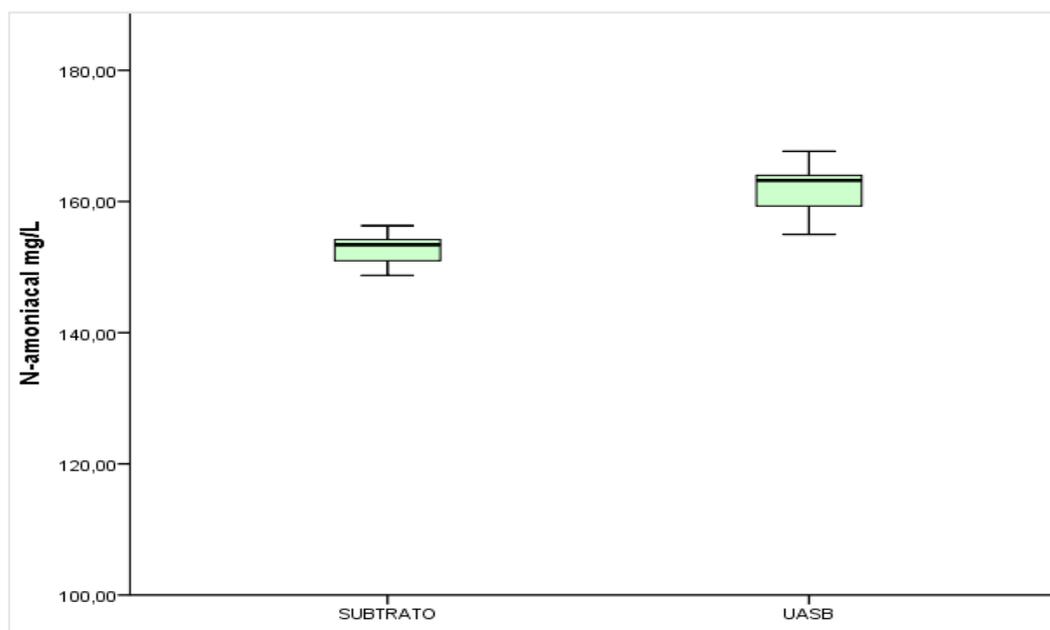
6.1 Eficiência da Amonificação no reator UASB

A carga orgânica aplicada ao reator UASB durante o experimento foi de 2,7 kgDQO/m³.dia. A variação da concentração média de nitrogênio amoniacal observada durante essa fase, foi de 153,4 mgN/L no afluente e 163,2 mgN/L no efluente. Nessa etapa, observou-se que ocorreu acréscimo de 9,8 mgN/L na concentração de nitrogênio amoniacal em virtude da etapa de amonificação, durante a digestão anaeróbia.

A percentagem de nitrogênio orgânico observada no substrato foi de 17,32% e cerca de 82,68% era de nitrogênio amoniacal. Durante o monitoramento do reator UASB, observou-se que uma fração do nitrogênio orgânico foi convertida em nitrogênio amoniacal (amonificação). Esse valor representa uma eficiência média de cerca 6,38%, em função da atividade microbiana atuante na transformação do nitrogênio orgânico durante esta etapa. Essa fração orgânica é constituída principalmente por proteínas e aminoácidos, que sofrem hidrólise e, posteriormente, na etapa de desaminação, são convertidas em nitrogênio amoniacal.

A Figura 9, apresenta a concentração de nitrogênio amoniacal presente no substrato e a concentração nitrogênio amoniacal observada no efluente do reator UASB, após a etapa de amonificação.

Figura 9. Eficiência da etapa de amonificação apresentada no reator UASB.



Monteiro et al. (2019), apresentaram resultados semelhantes operando um reator UASB seguido por filtro biológico percolador, tratando lixiviado e esgoto doméstico. Os autores identificaram que durante a fase experimental, houve acréscimo na concentração de nitrogênio amoniaco no efluente do reator do reator UASB, em virtude da etapa de amonificação. Os autores afirmam que esse aumento é uma característica típica dos tratamentos anaeróbios, onde parte do nitrogênio orgânico é convertida para nitrogênio amoniaco.

6.2 pH

O pH é um dos parâmetros preponderantes em sistemas de tratamento, pois interfere diretamente no metabolismo bacteriano. Na etapa de digestão anaeróbia, a manutenção do equilíbrio do pH em faixas próximas a neutralidade, garante maior eficiência das metanogênicas na estabilização da matéria orgânica, tendo como produto desse metabolismo, a formação do gás metano (CH_4).

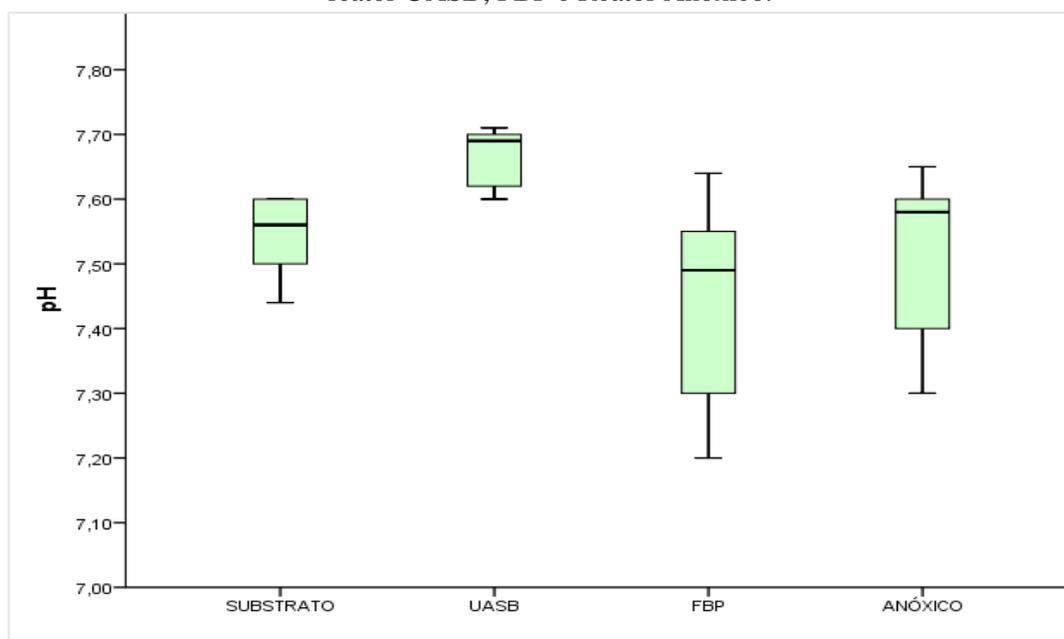
Para a grande maioria das bactérias presentes nestes processos, o pH ótimo de crescimento situa-se na faixa entre 6,5 e 7,5, e suas respectivas variações máximas e mínimas, para a maior parte delas, estão abaixo de pH 4 e acima de 9 (PEREIRA; CAMPOS; MOTERANI, 2009). A oscilação dos valores de pH na etapa da digestão

anaeróbia, está diretamente relacionada com a produção de ácidos voláteis durante a transformação da matéria orgânica.

Nesse processo, a atividade metabólica das bactérias metanogênicas, pode ser diretamente influenciada em decorrência da elevação da concentração dos ácidos voláteis no meio. Em elevadas concentrações e quando não há alcalinidade suficiente no sistema, ocorre a redução do pH, resultando em consequências significativas na quantidade da microbiota do reator. A maior atividade de bactérias acidogênicas, são as causantes da queda do pH e causam sérios desequilíbrios no processo de tratamento. O substrato utilizado na alimentação do sistema, apresentou variação de pH entre 7,4 e 7,6, com valor médio de 7,5. Diante da complexidade do substrato, observou-se que os valores de pH do substrato, não interferiram nos processos metabólicos subsequentes à inoculação no reator UASB.

A Figura 10, apresenta a variação temporal do pH no substrato e nos efluentes dos reatores UASB, FBP e reator anóxico, durante o monitoramento do sistema experimental.

Figura 10. Comportamento da variação temporal do pH do substrato e dos efluentes do reator UASB, FBP e Reator Anóxico.



No reator UASB, observou-se variações na faixa de pH entre 7,6 e 7,7. Esses valores indicam que o pH observado no reator UASB, não interferiu na dinâmica dos microrganismos metanogênicos decompositores, que em decorrência da degradação da matéria orgânica, produzem alcalinidade e amônia. Pereira, Campos e Moterani (2009)

afirmam que quando os valores de pH em um sistema de tratamento anaeróbio está entre 6,7 e 8,0, a concentração de ácidos orgânicos está em seu valor mais elevado (>99%) em sua forma ionizada (não tóxica), não interferindo no metabolismo das bactérias metanogênicas.

O valor de pH observado no FBP foi de 7,5. O que indica que o processo de nitrificação não sofreu interferência desse parâmetro durante a fase experimental. Além disso, observa-se que houve redução nos valores do pH do efluente advindo do UASB em comparação com o pH do FBP, que foi de 7,7 para 7,5, respectivamente. Esse fato pode ser explicado devido ao metabolismo das bactérias nitrificantes, que durante a fase de oxidação da amônia, produzem ácidos (H^+) e consomem alcalinidade. Monteiro et al (2019), utilizaram em seus experimentos, um sistema composto por reator UASB seguido por um FBP. Durante a fase experimental, os autores não observaram variações significativas do pH entre o afluente e o efluente do FBP, correlacionando a esse fato, a inexistência de interferência no processo de nitrificação.

Na etapa de desnitrificação, as bactérias desnitrificantes podem reduzir sua eficiência metabólica em decorrência das variações de pH no meio. Em pH ácido, as enzimas que atuam transformação da molécula do nitrogênio, podem ser inativadas. Já em pH elevado, as bactérias desnitrificantes reduzem sua eficiência metabólica, e necessitam de mais tempo de adaptação no reator, até atingir a fase lag novamente. No entanto, observou-se no reator anóxico o aumento do pH em comparação com a etapa de nitrificação, com pH 7,58. Esse valor de pH observado no efluente do reator anóxico, indica a existência do processo de desnitrificação, devido à produção de alcalinidade que ocorre durante essa etapa.

6.3 Alcalinidade Total (AT)

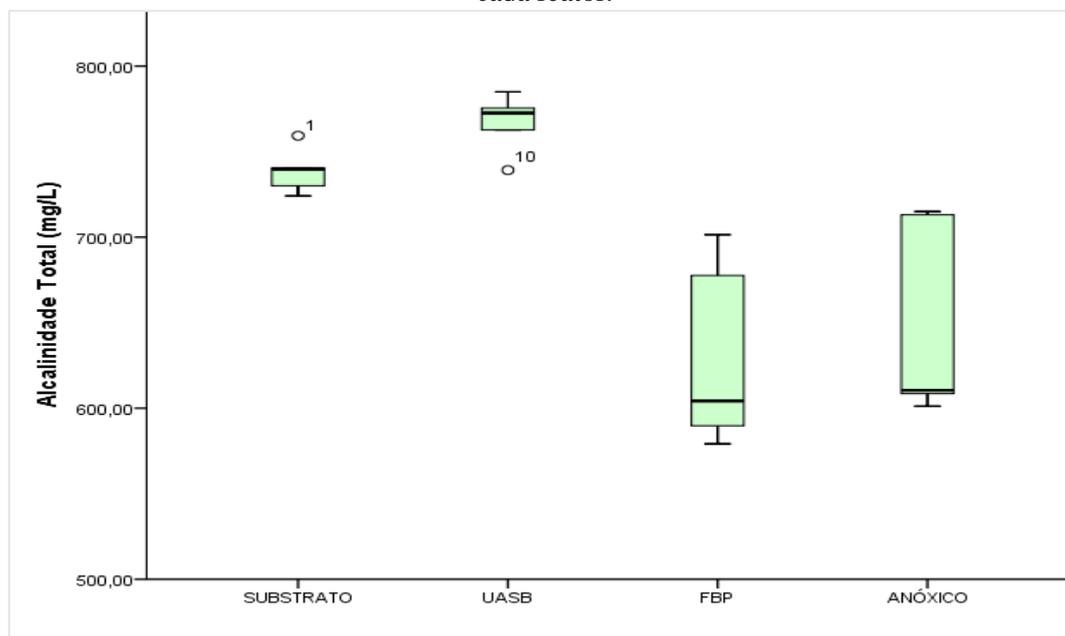
A alcalinidade é um parâmetro fundamental em sistemas de tratamento de efluentes. Seu monitoramento e controle, torna-se indispensável, sendo responsável por tamponar meios aquosos, impedindo alterações do pH no meio. A alcalinidade indica a quantidade de íons na água capazes de neutralizar ácidos, sendo constituídos principalmente por bicarbonatos (HCO_3^-), carbonatos (CO_3^{2-}) e hidróxidos (OH^-) e a concentração de cada um deles é função do pH (COELHO et al., 2015).

Em consonância com a redução do pH, o consumo e produção de alcalinidade foi apresentado na Figura 11. Os resultados, corroboram com a dinâmica dos processos globais de transformação do nitrogênio, indicando que as etapas de amonificação, nitrificação e desnitrificação ocorreram adequadamente durante o experimento.

A alcalinidade total do substrato, apresentou variação de 724,1 mgCaCO₃.L⁻¹ a 759,3 mgCaCO₃.L⁻¹, com concentração média de 739,8 mgCaCO₃.L⁻¹. Observou-se no efluente do reator UASB, aumento na concentração média da alcalinidade total de 772,6 mgCaCO₃.L⁻¹, que representa um aumento de 32,8 mgCaCO₃.L⁻¹ na concentração total. Esses resultados indicam que o reator UASB apresentou boa capacidade de tamponamento. Campos et al. (2006), apresentaram resultados satisfatórios utilizando um reator UASB para tratamento de efluentes de suinocultura, com valores médios de alcalinidade no afluente do reator UASB de 811 mgCaCO₃.L⁻¹ e no efluente 815 mgCaCO₃.L⁻¹, atribuindo o aumento da alcalinidade a capacidade de tamponamento do reator.

Na fase de acidogênese da digestão anaeróbia, os ácidos graxos voláteis, álcoois e compostos minerais são formados, como produtos intermediários durante a degradação dos carboidratos, proteínas e lipídeos (CAMPOS et al., 2006). Além disso, sabe-se que durante a etapa de amonificação, a degradação de compostos orgânicos nitrogenados por microrganismos heterótrofos, contribui com a disponibilização de amônia e de alcalinidade no meio.

Figura 11. Concentração de alcalinidade total quantificada no substrato e efluente de cada reator.



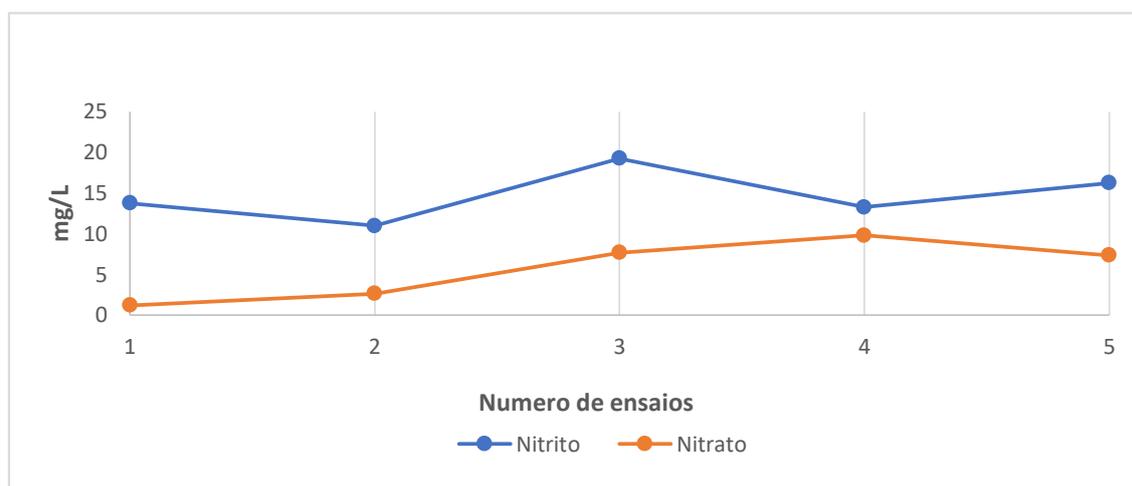
Os valores de alcalinidade apresentaram redução em relação ao efluente advindo do reator UASB com valores de $772,6 \text{ mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$, para $604,2 \text{ mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ do efluente do FBP. O consumo de alcalinidade nessa etapa, relaciona-se com os processos de oxidação do nitrogênio amoniacal a nitrito e nitrato. Antileo et al. (2013) destacam que a redução do pH, ocorre principalmente em virtude da liberação de prótons durante a fase de nitrificação.

O reator anóxico, apresentou incremento na concentração de alcalinidade total no efluente durante o experimento. Em relação ao efluente do FBP, houve acréscimo da alcalinidade no efluente do reator anóxico de $6,2 \text{ mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$, apresentando valor médio em sua concentração total de $610,4 \text{ mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$. Esses valores indicam que o aumento da alcalinidade, foi em virtude da etapa de desnitrificação que ocorre durante a redução biológica das formas mais oxidadas do nitrogênio amoniacal (nitrito e nitrato) a nitrogênio gasoso. Com isso, pode haver aumento nos valores de pH no meio, em virtude da liberação de (OH^-) elevando a alcalinidade do efluente.

6.4 Nitrito e Nitrato

Durante o monitoramento do sistema experimental, as concentrações de nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-), variaram em decorrência da atividade bacteriana nitrificante no FBP. Observou-se que no FBP, as concentrações médias de nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) foi de $14,68 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e $5,71 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. A Figura 12, apresenta o comportamento do nitrito e do nitrato observado no efluente do FBP.

Figura 12. Variação temporal das concentrações de nitrito (NO_2^-) e do nitrato (NO_3^-) no efluente do filtro biológico percolador (FBP).



A elevada concentração de nitrito no FBP, demonstra que o sistema não favoreceu a atividade das oxidantes de nitrito durante o monitoramento do FBP. Acredita-se que essa condição ocorreu em virtude da disponibilidade de OD disponível no meio, ter sido insuficiente para promover uma nitrificação completa. He, Zhou e Zhao (2007) destacam que o OD desempenha um papel importante no acúmulo de nitrito no reator, porém ressalta-se que além dos níveis de OD, outros fatores como as características do efluente, condições operacionais e tecnologias utilizadas, são cruciais para o desempenho das oxidantes de nitrito.

Em sistemas de tratamento que utilizam reatores com biofilmes, a disponibilidade de OD no efluente do reator e sua difusão no biofilme, tem que ser suficiente para promover a etapa de nitrificação. Observou-se que no FBP, a etapa de nitrificação foi influenciada pela disponibilidade de OD, ocasionando o acúmulo de nitrito e possível inibição de BON por substrato. A concentração de nitrato aumentou com o tempo de operação do reator, em virtude da adaptabilidade de BON no FBP, pois esses microrganismos requerem maior tempo de crescimento na fase lag cerca de $1,08 \text{ d}^{-1}$, em comparação a BOA $0,77 \text{ d}^{-1}$. Além disso, sabe-se que as BOA tendem a viver dispersas no efluente, em contrapartida, BON tende a se aderir em biofilmes e, metabolicamente, atingem melhores eficiências quando estão em simbiose com as BOA, de onde podem obter diretamente o nitrito.

Ruiz, Jeison e Chamy (2003) apresentaram a influência do OD na etapa de conversão da amônia a nitrito e do nitrito a nitrato. Os autores observaram que em níveis de OD de 1,7 mg/L a 5,7 mg/L, não houve interferência do OD na etapa de nitrificação. Porém, em concentrações de 1,4 mg/L, houve acúmulo de nitrito em decorrência da redução da concentração de OD. He, Zhou e Zhao (2007) identificaram que níveis de OD entre 0,2-0,6 mg/L, são responsáveis pelo acúmulo de nitrito em sistemas de tratamento, interferindo na etapa de nitrificação.

Desse modo, os resultados apresentados na Figura 12, corroboram com a interferência do OD na etapa de nitrificação, tendo em vista que esse parâmetro é tido como um co-substrato nessa etapa, e a eficiência bacteriana na oxidação da amônia e do nitrito, está diretamente relacionada com a disponibilidade de oxigênio dissolvido no meio.

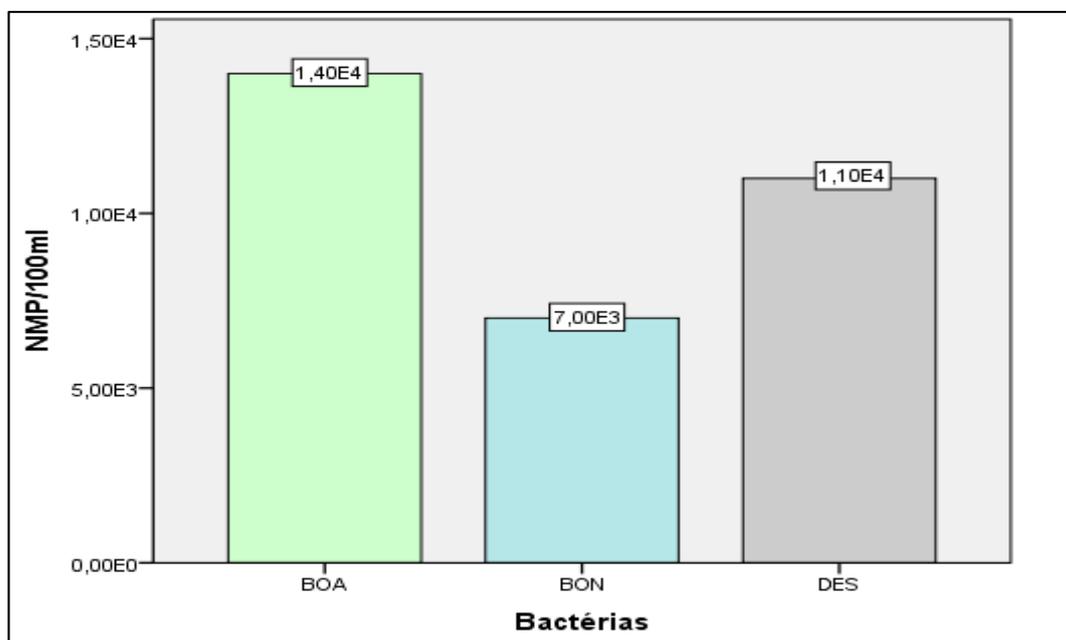
6.5 Quantificação das Bactérias Nitrificantes e Desnitrificantes pela Técnica de Número Mais Provável (NMP)

Durante a fase experimental, foram realizados 5 ensaios. De cada reator (FBP e reator anóxico) foram coletadas 5 amostras do efluente. Com os valores do NMP obtido nessas análises, foi possível apresentar a dinâmica populacional dos grupos bacterianos envolvidos nos processos de oxidação e redução do nitrogênio.

No primeiro ensaio (Figura 13), observa-se a variação populacional entre as oxidantes de amônia (BOA) e as oxidantes de nitrito (BON) com $1,4 \times 10^4$ NMP/100 ml e $0,7 \times 10^3$ NMP/100 ml, respectivamente. A maior população de oxidantes de amônia pode estar relacionada ao processo de aeração no FBP no início do experimento, tendo em vista que a concentração de OD é um fator limitante para o metabolismo bacteriano nitrificante. Nestes estágios iniciais, o oxigênio foi obtido de forma natural através de aberturas nas laterais do FBP com aproximadamente 20 mm de diâmetro, no entanto, essa forma de aeração não foi suficiente para promover a etapa de nitrificação completa.

De acordo com Ferreira (2000) a taxa de crescimento das bactérias nitrificantes do gênero *Nitrosomonas*, responsável pela primeira etapa da nitrificação, não está limitada em níveis de OD acima de 1,0 mg/L, mas na prática, é requerido um OD maior que 2,0 mg/L, sendo recomendado que o nível mínimo de OD seja de 2,0 mg/L em todo tempo e através do reator biológico, para se prever picos de carga de amônia no sistema experimental.

Figura 13. NMP dos grupos bacterianos identificados no 1º ensaio.



Além disso, a vantagem relativa da população inicial de BOA pode levar ao acúmulo de nitrito no sistema, o que reflete diretamente no desenvolvimento de BON, conforme apresentado na Figura 13. Ferreira (2000) destaca que o nitrito pode-se acumular durante as reações de conversão do nitrogênio amoniacal quando a taxa de formação dos nitratos é superada pela taxa de geração dos nitritos. Essa condição pode ocorrer quando as bactérias nitrificantes estão em fase de aclimatação ou durante sua inoculação. Além do mais, o acúmulo do nitrito geralmente está associado com a baixa eficiência de aeração, refletindo diretamente na eficiência metabólica de BON.

A densidade populacional de bactérias desnitrificantes observada nesta análise é $1,1 \times 10^4$ NMP/100ml. O resultado observado nesta análise preliminar, pode ser associado a taxa de crescimento específico das bactérias heterotróficas que é superior à das bactérias nitrificantes. Além disso, acredita-se que a dinâmica populacional dessas bactérias, pode ter sido influenciada pela disponibilidade de carbono orgânico no substrato, devido ao baixo teor de matéria orgânica biodegradável no lixiviado. Souza et al. (2005) enfatizam que a baixa disponibilidade de elétrons em compostos orgânicos (fontes de carbono) limitará o processo de desnitrificação e interferirá diretamente na dinâmica populacional dessas bactérias.

A quantidade de nitrogênio amoniacal disponível no sistema juntamente com o OD, irá fornecer condições para as bactérias oxidantes de amônia converter o N-NH_4 em NO_2^- e NO_3^- . Diante disso, as suas respectivas concentrações no meio, poderão definir a velocidade do processo. Os resultados apresentados por Kim, Lee e Keller (2005), indicam que a baixa eficiência da nitrificação pode ocorrer pela carga N-NH_4^+ elevada no meio, podendo ocasionar o acúmulo de N-NH_3 no reator e a possível inibição do substrato por amônia livre. Além disso, a amônia livre pode atuar como inibidor de BON e, conseqüentemente, ser responsável pelo acúmulo de nitrito no reator.

Segundo Vadivelu, Keller e Yuan (2007) essa inibição pode ocorrer através da ação direta da amônia sobre a enzima *nitrito oxidoreductase* ou sobre alguma outra enzima envolvida no transporte de elétrons, ou pela inibição do NH_3 na produção de ATP, que pode representar um efeito semelhante na inibição. De fato, a concentração de amônia livre está associada aos valores de pH do meio. Entretanto, deve-se salientar que em reatores que utilizam biofilme, o valor de pH na fase líquida pode ser diferente do pH dentro do biofilme (NOCKO, 2008).

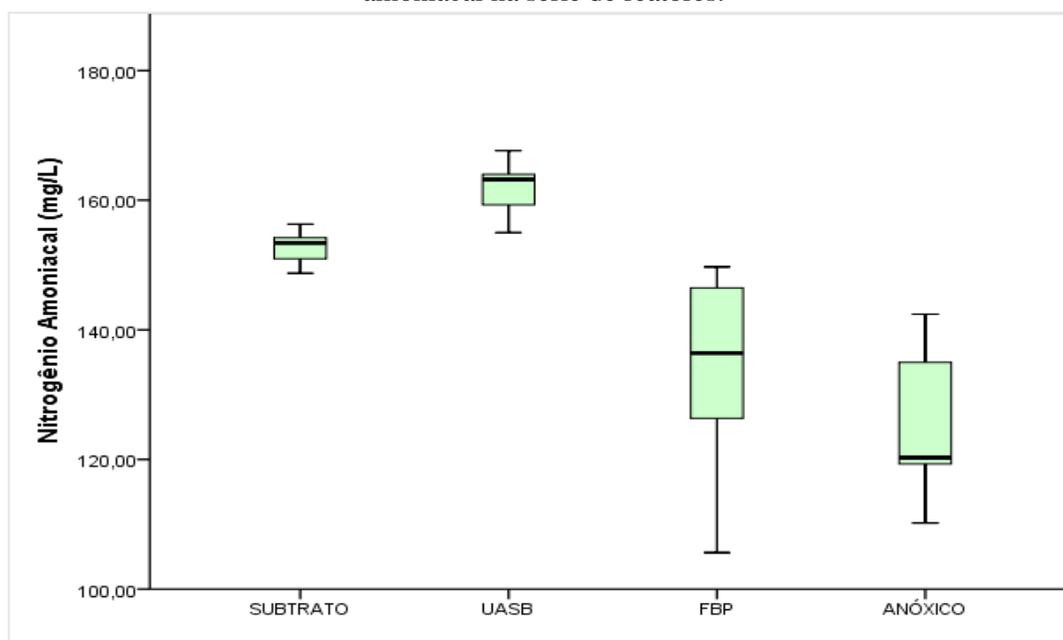
Anthonisen et al. (1976) consideram que a concentração de amônia livre necessária para inibir BOA é de cerca de 10 a 150 mgN/L, e que a inibição de BOD pode ocorrer com valores próximos a 10 mgN/L. Os autores relatam que o ácido nitroso (HNO_2), pode apresentar papel inibitório de BOD em concentrações entre 0,22 e 2,8 mgN/L. Entretanto, esses valores podem apresentar variações de acordo com o sistema utilizado e o tempo de operação. Wu et al. (2008) observaram a inibição da etapa de nitrificação, quando a concentração da amônia livre foi de 160 mgN/L, ocasionando o acúmulo de 97% de nitrito no sistema, impossibilitando a atividade das bactérias nitrificantes.

Wei et al. (2014) estudaram a influência do tempo de operação nas etapas de remoção do N-amoniaco, em um reator de bateladas sequenciais (RBS) e identificaram que após um período entre 45 e 90 dias de operação, o sistema favoreceu a adaptação das bactérias nitrificantes. Foi verificado que o aumento da carga de N-NH_4^+ de 200 mg/L para 300 mg/L, não interferiu na eficiência do processo apresentando 94,8% de remoção de N-amoniaco, em virtude das bactérias estarem aclimatadas no reator.

De fato, os resultados apresentados nos ensaios iniciais, podem ser atribuídos ao tempo de aclimação das bactérias nitrificantes no FBP. Como o sistema experimental neste momento está em estágio inicial de operação, acredita-se que a elevada concentração de N-amoniaco possa ser explicada pela falta de adaptabilidade das populações bacterianas.

A eficiência do processo de oxidação biológica do nitrogênio apresentada pelo FBP, pode ser observada na Figura 14, que representa a quantidade de N-amoniaco no início de operação do reator e a quantidade final obtida no efluente. A eficiência média de remoção foi de aproximadamente 16,42% no FBP, com concentração de 136,4 mg N-NH₄⁺.L⁻¹. Esses valores indicam que o acúmulo de nitrogênio amoniacal foi devido à baixa eficiência da etapa de nitrificação no FBP.

Figura 14. Comportamento da variação temporal da concentração de nitrogênio amoniacal na série de reatores.



A elevada concentração de N-amoniaco pode ser atribuída a baixa concentração de OD durante as etapas iniciais do experimento, já que o oxigênio é requerido pelas bactérias nitrificantes durante a oxidação da amônia e do nitrito. Todavia, a baixa concentração de OD foi relacionada a forma de aeração do FBP nessas etapas iniciais, já que oxigênio era obtido de forma natural, por espaços nas laterais do FPB. Torres et al. (2009) destacam que o excesso de nitrogênio amoniacal pode provocar efeito inibitório nos processos biológicos em sistemas de tratamento de efluentes.

Veronese et al. (2013) atribuíram a interferência do O.D à baixa eficiência das bactérias nitrificantes. Os autores observaram que no estágio inicial, utilizando um biorreator de membranas (MBR), a baixa disponibilidade de oxigênio dissolvido, reduziu a eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal em mais de 25%. Além disso, a ausência

de OD no reator aeróbio provocou a diminuição do valor do potencial de oxido-redução, indicando a ocorrência da inibição do processo de nitrificação.

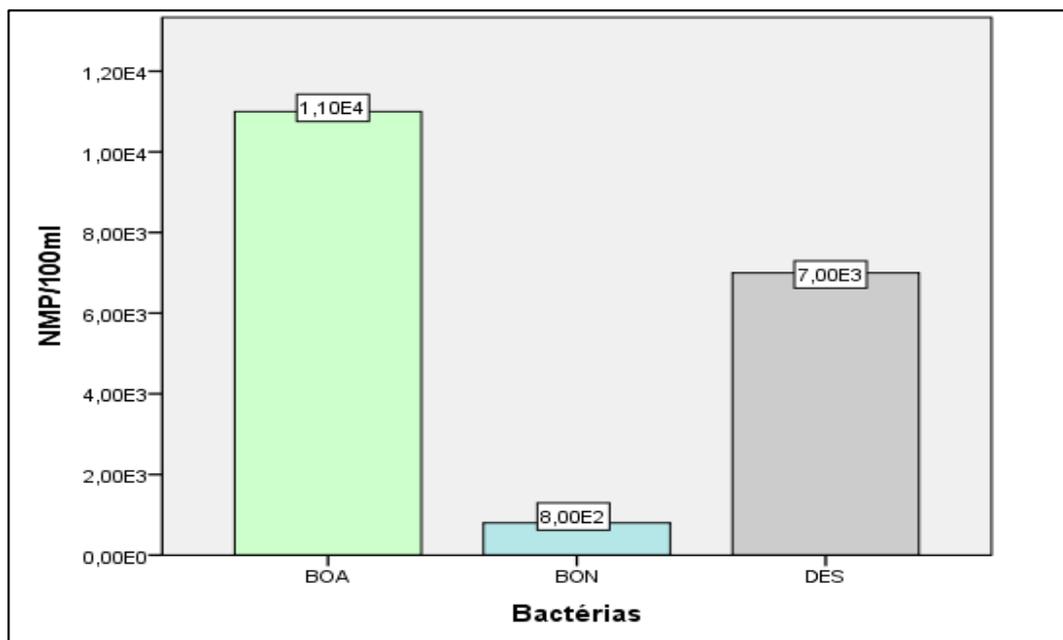
Por outro lado, acredita-se que a baixa aeração no FBP, possa ter propiciado o estabelecimento de zonas anóxicas nos biofilmes aderidos ao material de suporte do FBP, podendo ter favorecido o metabolismo das bactérias desnitrificantes no biofilme. Esse efeito da baixa aeração foi confirmado por Monteiro et al. (2019). Os autores utilizando um sistema composto por reator UASB seguido por FBP, identificaram que a baixa transferência de oxigênio no FBP, propiciou um sistema anóxico ou anaeróbio, acarretando uma eficiência de tratamento reduzida, em função da adaptação da biomassa presente.

Na análise seguinte, observou-se a variação de BOA e BON em relação ao primeiro ensaio. As BON apresentaram redução populacional significativa, como apresentado na Figura 15, diminuindo de $0,7 \times 10^4$ NMP/100ml para $0,8 \times 10^2$ NMP/100ml. Essa queda foi atribuída a grande quantidade de nitrito no meio em virtude da elevada atividade de BOA, e da baixa estabilidade do biofilme. Observou-se que durante essa fase, quando era realizada a alimentação do reator com o substrato, ocorria o arraste da biomassa aderida e, conseqüentemente, o desprendimento do biofilme. Dessa forma, o NMP de BON pode ser explicado, devido a ecologia das oxidantes de nitrito ser favorecida quando estão em simbiose no biofilme com as oxidantes de amônia.

Ferreira (2000), destaca que essa variação populacional pode ser atribuída a concentração dos substratos dentro do biofilme, e sua difusão desde a superfície do biofilme e através dele. As respectivas concentrações de OD como para o nitrogênio amoniacal, podem resultar em baixas taxas de nitrificação, ocasionando variações populacionais entre BOA e BON. Os resultados apresentados por Liu et al. (2017)

demonstraram que a inibição da atividade metabólica de BON, ocorre em virtude da baixa disponibilidade de OD, favorecendo o acúmulo de nitrito no reator.

Figura15. NMP dos grupos bacterianos presentes no 2º ensaio.



Em regiões de clima mais quente, como no nordeste do Brasil, as taxas de nitrificação em sistemas de tratamento podem ser reduzidas em virtude da atividade dessas bactérias, serem inibidas em temperaturas mais elevadas. Essa diferença populacional entre BOA e BON, pode ser explicada pelo fato de que em altas temperaturas, as bactérias do gênero *Nitrobacter*, responsáveis pela nitratação, apresentam uma taxa de crescimento significativamente menor que as bactérias do gênero *Nitrosomonas*, que atuam na primeira etapa da nitrificação (VERSTRAETE; PHILIPS, 1998). Essas bactérias apresentam ecofisiologia distintas, divergindo na taxa de crescimento celular. Zoppas, Bernardes e Meneguzzi (2016) destacam que o coeficiente de crescimento celular das oxidantes de nitrito, é relativamente menor, cerca de 0,042 células / mg N-NO₂⁻ em comparação com as oxidantes de amônia 0,147 células / mg N-NH₄⁺.

Os resultados obtidos nos ensaios iniciais, conforme apresentado nas Figuras 13 e 15, demonstraram maior atividade de BOA em relação a BON. Esse fenômeno pode ser explicado pelos altos valores de OD requeridos pelas bactérias nitrificantes durante a fase de oxidação do nitrogênio amoniacal. Os valores estequiométricos da quantidade

oxigênio requerido pelas bactérias nitrificantes na oxidação de um mol de amônia equivale a 4,57 mg/O₂. Na oxidação da amônia a nitrito, o oxigênio requerido pelas oxidantes de amônia é cerca de 3,43 mg/O₂, quando comparado ao necessário para a oxidação do nitrito a nitrato 1,14 mg/O₂, refletindo em um alto consumo de OD durante a primeira etapa da nitrificação (METCALF; EDDY, 2016). Esse consumo de oxigênio na primeira etapa, aliado à sua baixa disponibilidade no FBP, refletiram diretamente no crescimento populacional de BON, haja visto a oxigenação do FBP ter sido insuficiente para promover uma etapa de nitrificação completa.

Ferreira (2000) ressalta que durante a oxidação da amônia, o processo requer quantidades significativas de oxigênio e produz pouca quantidade de biomassa, resultando em um substancial consumo da alcalinidade, através da produção de íons hidrogênio. Além disso, o autor destaca que durante a síntese e oxidação de 50 mg/L de N-NH₄, ocorre o consumo de 216,0 mg/L de oxigênio, com produção cerca 6,50 mg/L de biomassa dos organismos nitrificantes e consumo de 353,5 mg de alcalinidade na forma de CaCO₃. Como observado, o consumo de oxigênio é elevado durante a etapa de nitrificação. Porém, em virtude da menor taxa de crescimento específico das bactérias do gênero *Nitrosomonas* (BOA) de 0,77 d⁻¹ em comparação com o gênero *Nitrobacter* (BON) que é 1,08 d⁻¹, o maior consumo de oxigênio pelas bactérias nitrificantes, está relacionado com a velocidade de crescimento das bactérias responsáveis pela primeira etapa da nitrificação, proporcionando um maior NMP das oxidantes de amônia nessas etapas.

Além disso, acredita-se que a alimentação do FBP pode ter influenciado na instabilidade dos grupos bacterianos durante esta fase no reator, ocasionando variações nas populações de BOA e BON. Isso pode ter ocorrido em virtude da descarga do substrato utilizado na alimentação do FBP, não ter percolado como proposto pela configuração do reator, causando o desprendimento do biofilme e o arraste da biomassa aderida durante essa fase.

As bactérias heterotróficas desnitrificantes também apresentaram variações populacionais nesse estágio inicial. Conforme apresentado nas Figuras 13 e 15, foi observado o declínio populacional dessas bactérias de 1,1x10⁴ NMP/100 ml para 0,7 X10³ NMP/100 ml. A variação populacional observada nesta etapa pode ser explicada pelo fato de que, devido à diminuição da população de BON, a quantidade de nitrato utilizada por

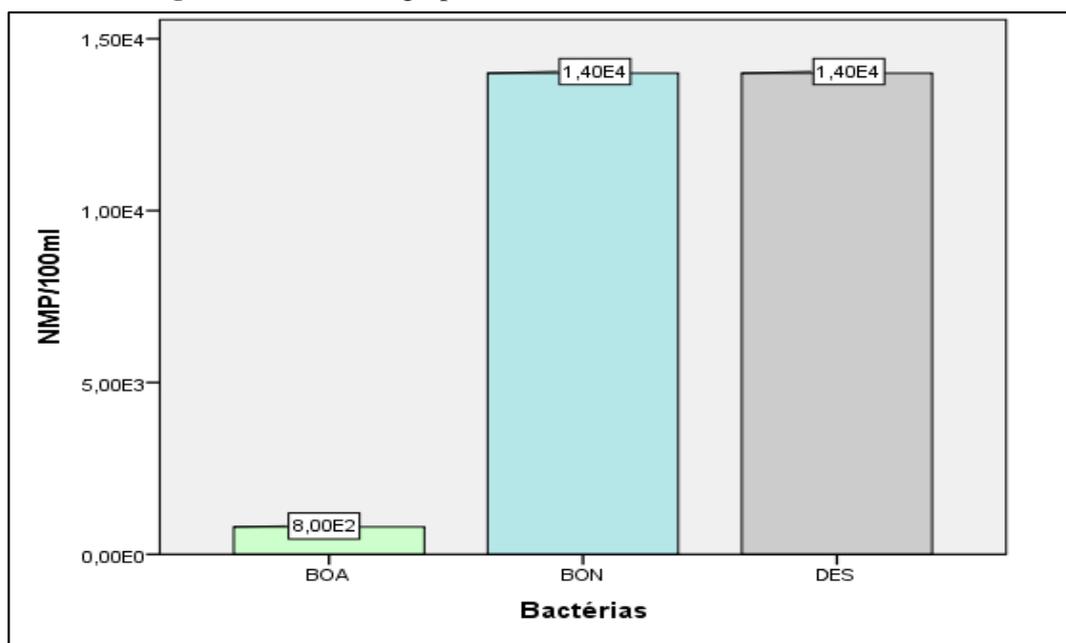
essas bactérias também foi reduzida. Ou seja, a quantidade de matéria orgânica degradável e os receptores de elétrons, produzidos pela oxidação da amônia na etapa de nitrificação (NO_3^- ; NO_2^-), refletiram no crescimento dessas bactérias. Mangili et al. (2010), observaram a variação populacional das bactérias desnitrificantes, utilizando um sistema experimental composto por dois reatores (anóxico e aeróbio). Os autores identificaram que quando NMP das bactérias desnitrificantes eram inferiores ao das bactérias nitrificantes, ocorria baixa concentração dos receptores de elétrons (NO_3^- e NO_2^- , presente no meio), em função do metabolismo quimiolitotrófico nitrificante apresentar velocidade de crescimento menor que as heterotróficas.

No terceiro ensaio, observou-se o declínio populacional de BOA em relação a população BON. As variações populacionais apresentadas nesta etapa, podem ser relacionadas com as alterações realizadas na etapa de aeração do FBP, indicando a maior adaptabilidade de BON no FBP. Como a maturação do biofilme ocorre com a extensão do tempo de operação do sistema, esta fase de operação pode ter sido benéfica para o sucesso ecológico das populações de BON, pois essas bactérias tendem a crescer e se multiplicarem aderidas aos biofilmes.

Com o declínio populacional de BOA nesta fase, conseqüentemente a quantidade de nitrito foi reduzida no meio. Uma vez que o acúmulo de nitrito levará à inibição das populações de BON, o ensaio mostra que em comparação com os testes 1 e 2, a densidade populacional BON foi significativamente maior. Oliveira et al. (2013) obtiveram resultados semelhantes, operando um reator aeróbio seguido por reator anóxico, tratando lixiviado de aterro sanitário. Os autores citam um tempo de monitoramento do sistema experimental semelhante ao apresentado neste estudo, e atribuíram o aumento do NMP de BON à redução da concentração de nitrito e, conseqüentemente, o decréscimo no NMP de BOA, caracterizando a maior atividade de BON no FBP nesta etapa.

As bactérias desnitrificantes no terceiro ensaio, como observado na Figura 16, apresentaram densidade populacional de $1,4 \times 10^4$ NMP/100ml. Alves et al. (2018) atribuíram esse crescimento a alta velocidade de crescimento específico desse grupo ($\mu_{max} = 7,2d^{-1}$), que apresentam valores maiores quando comparados com as bactérias nitrificantes. Além disso, o crescimento populacional observado pode ter sido favorecido pela maior atividade de BON no reator, que contribuiu diretamente com o aumento da concentração de nitrato no meio, que é o principal acceptor de elétrons na cadeia respiratória.

Figura 16. NMP dos grupos bacterianos identificados no 3º ensaio.

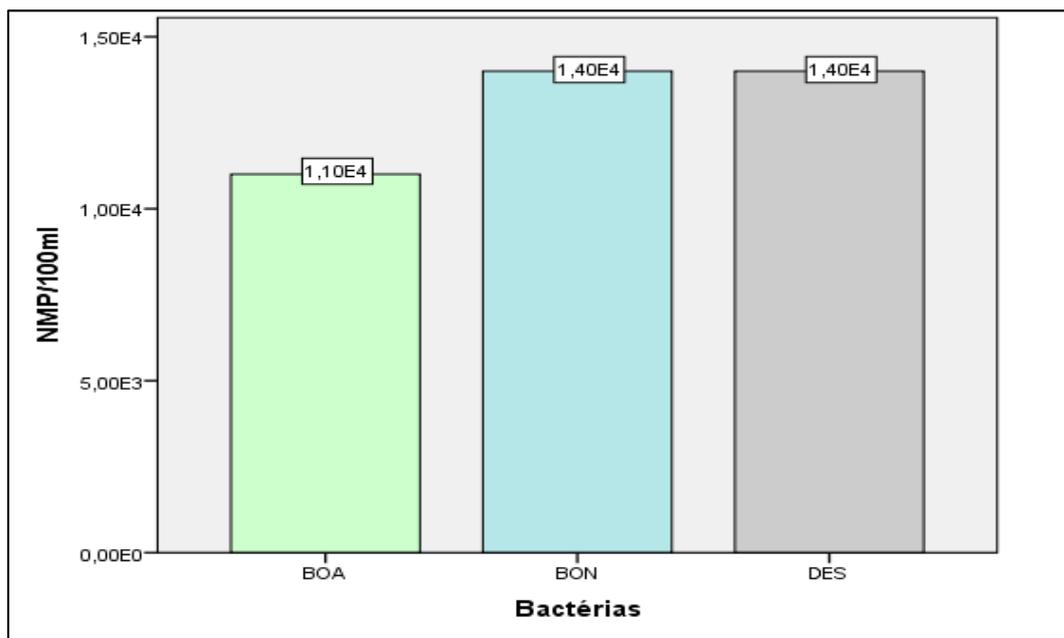


O ensaio 4, demonstrou outro pico de crescimento de BOA no FBP, como mostra a Figura 17. Isso pode ser explicado pela redução da carga nitrogenada introduzida no FBP, e pelo tempo de operação do sistema, devido a maior adaptabilidade bacteriana ao FBP. As BON, também apresentaram maior pico de densidade populacional com NMP de $1,4 \times 10^4$ NMP/100ml. O crescimento de BOA e BON nessa análise, pode ser atribuída ao grau de maturidade do biofilme e a redução no desprendimento do biofilme na fase de alimentação e do arraste da biomassa. Esse comportamento foi atribuído a adição de uma camada de 10 cm de areia no FBP, reduzindo o impacto no biofilme observado no início das análises.

As populações das bactérias desnitrificantes não apresentaram variações durante essa fase. O NMP das bactérias desnitrificantes foi de $1,4 \times 10^4$ NMP/100ml. A manutenção da densidade populacional desse grupo, foi relacionada ao equilíbrio populacional de BON, que mantiveram as concentrações de nitrato estáveis no sistema. Os equilíbrios populacionais observados nessas etapas, destacam que a eficiência da desnitrificação, podem ser consideradas baixas quando comparadas aos resultados de Oliveira et al. (2013). Os autores obtiveram valores de $3,3 \times 10^5$ NMP/100ml para $2,4 \times 10^{10}$ NMP/100ml, quando utilizaram uma fonte de carbono externa no sistema. Deste modo, o uso da fonte externa de carbono é necessário para promover uma desnitrificação eficiente, principalmente quando se trata de um substrato de alta complexidade como o lixiviado.

Sundberg, Tonderski e Lindgren (2007), observaram limitação no crescimento das bactérias desnitrificantes, quando promoveram a desnitrificação utilizando lixiviado como substrato. Os autores atribuem essa limitação no crescimento bacteriano, a influência direta da biodegradabilidade da matéria orgânica, disponibilidade de oxigênio e a concentração de nitrato.

Figura 17. NMP dos grupos bacterianos identificados no 4º ensaio.



Kim, Ahh e Lee (2005) utilizando um reator de biofilme, identificaram que as oxidantes de amônia e oxidantes de nitrito puderam crescer em equilíbrio sem limitação de oxigênio e inibição de amônia livre até alcançar o equilíbrio em suas atividades e

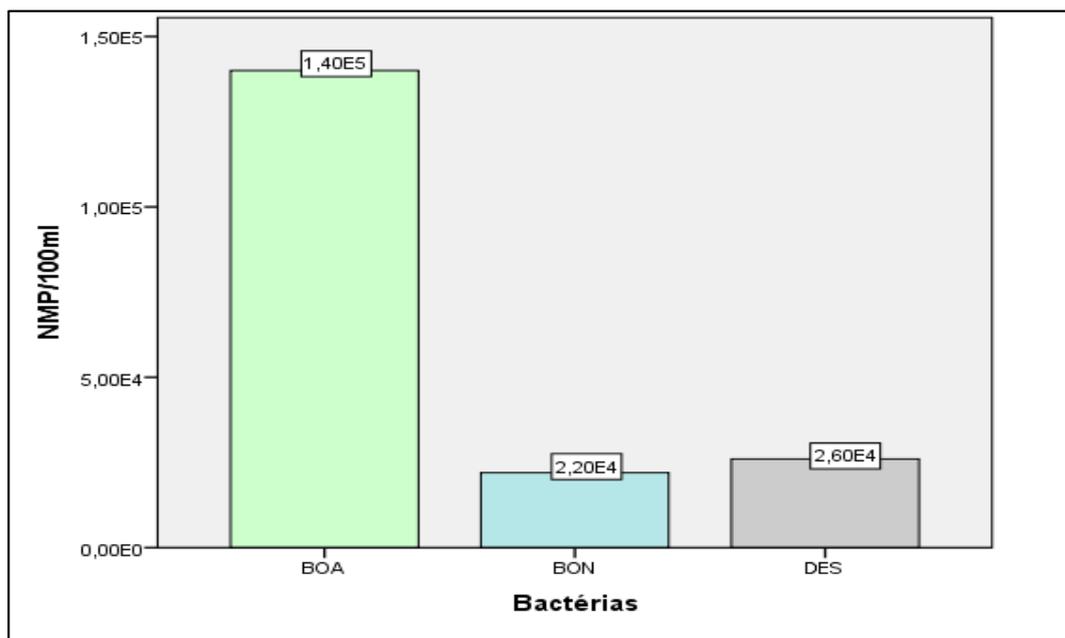
números populacionais. Os autores atribuíram esse equilíbrio populacional ao tempo de operação do sistema além do controle da carga aplicada do N-amoniaco. Esses resultados, coincidem com os resultados demonstrados neste ensaio, como apresentado na Figura 17.

Dessa forma, após o sistema experimental passar por adaptações como, reduções na carga de N-amoniaco, alterações no processo de aeração, tempo de operação e, conseqüentemente, maior estabilidade do biofilme, as bactérias nitrificantes apresentaram crescimento populacional adequado, indicando a importância dos ajustes realizados nos parâmetros operacionais e no tempo de operação do sistema.

O quinto ensaio demonstrou que a adaptabilidade das bactérias nitrificantes foi crescente no decorrer do monitoramento do sistema experimental. Isso demonstra que o FBP, após as alterações nos parâmetros operacionais, favoreceu a dinâmica populacional das bactérias nitrificantes. As populações de BOA e BON apresentaram densidades populacionais superiores, com $1,4 \times 10^5$ NMP/100ml e $2,2 \times 10^4$ NMP/100ml, respectivamente. Nesse estágio do experimento, a adaptação contínua da biomassa foi favorável para manutenção do equilíbrio das populações das oxidantes de nitrito e do nitrato. A inserção da aeração mecânica, possibilitou um melhor desempenho das bactérias nitrificantes na oxidação dos seus respectivos substratos, amônia e nitrito. A Figura 18 apresenta o NMP dos grupos bacterianos nitrificantes e desnitrificantes.

A densidade populacional das bactérias desnitrificantes também apresentou crescimento durante essa fase. Esses resultados corroboram com os resultados apresentados por Oliveira et al. (2013). Os autores destacam que mesmo as características do lixiviado apresentarem baixa concentração de matéria orgânica de fácil biodegradação, observaram crescimento das populações desnitrificantes durante as fases iniciais do experimento, quando não houve adição de fonte externa de carbono. Esse crescimento das bactérias desnitrificantes, pode ser relacionado ao crescimento das bactérias oxidantes de nitrito, já que o produto da oxidação dessas bactérias, é utilizado como aceptor de elétrons na cadeia respiratória.

Figura 18. NMP dos grupos bacterianos identificados no 5º ensaio.



Trois et al. (2010) destacam que a composição do substrato, natureza, razão carbono/nitrogênio (C/N) e o grau de maturidade e estabilidade do biofilme, desempenham um papel fundamental no processo de desnitrificação, impactando diretamente no desenvolvimento das populações bacterianas, e na eficiência de remoção de nitrato a longo prazo.

7 CONCLUSÕES

Analisando os resultados deste trabalho, pode ser constatado que o NMP dos grupos bacterianos demonstrou que o sistema experimental tem capacidade para realizar os processos de nitrificação e desnitrificação. O NMP das bactérias oxidantes de amônia (BOA) variou de $0,8 \times 10^2$ a $1,4 \times 10^5$ NMP/100ml. Já o NMP das Oxidantes de nitrito (BON), variou de $0,8 \times 10^2$ a $2,2 \times 10^4$ NMP/100ml.

As densidades populacionais observadas dos grupos bacterianos nitrificantes, foram fortemente influenciadas pelos parâmetros operacionais durante o funcionamento do sistema experimental, refletindo diretamente na etapa de oxidação do nitrogênio (nitrificação). Observou-se a interferência direta do OD, N-amoniaco e do tempo de maturação do biofilme na concentração das populações das bactérias nitrificantes, sendo o principal fator limitante, a concentração de OD, que interferiu nas etapas de oxidação do nitrogênio amoniacal e do nitrito.

Com a extensão do tempo de operação do sistema experimental, maturação do biofilme no FBP e inserção da aeração mecânica, foi possível observar aumento das concentrações das populações bacterianas nos ensaios 4 e 5, evidenciando que os ajustes realizados certamente favoreceram a ecologia das bactérias nitrificantes.

O NMP das bactérias desnitrificantes foi dependente da etapa de nitrificação, tendo em vista que o nitrato é utilizado pelas bactérias desnitrificantes, como aceptor final de elétrons durante a respiração anóxica. A estimativa populacional das bactérias desnitrificantes obtida, variou de $7,0 \times 10^3$ a $2,6 \times 10^4$ NMP/100ml. Deste modo, os resultados sugerem fortemente que a etapa de desnitrificação foi influenciada pela disponibilidade de nitrato e de carbono orgânico presente no substrato, e indicando que o sistema necessita de melhorias na aeração para favorecer as bactérias nitrificantes, além da adição de uma fonte externa de carbono orgânico, para garantir maiores eficiências na redução do NO_3^- a N_2 , etapa final para o retorno do nitrogênio a atmosfera.

Os resultados permitem concluir que o tratamento conjugado de lixiviado de aterro sanitário e esgoto doméstico, utilizando reatores em série, possuem boa capacidade de tratamento de efluentes de composição complexa. A eficiência do reator UASB no processo de conversão do nitrogênio orgânico a nitrogênio amoniacal (amonificação), foi

de 6,4%. Esse valor representou um acréscimo de 9,8 mgN/L de nitrogênio amoniacal no efluente do UASB, durante esta etapa.

Em suma, o processo de remoção biológica de nitrogênio observado no FBP durante a nitrificação, apresentou eficiência média de 16,4%, gerando um efluente com concentração média de 136,4 mg N-NH₄⁺.L⁻¹ no FBP. Esses valores explicam a baixa eficiência da nitrificação, quando ocorre a oxidação do nitrogênio amoniacal a nitrito e, seguidamente, do nitrito até nitrato. A baixa disponibilidade de OD foi atribuída ao processo de aeração que foi de forma natural no FBP, proporcionando baixas taxas de remoção de nitrogênio durante o monitoramento do sistema experimental.

Esses resultados indicam que no modelo experimental utilizado, o FBP necessita de aeração mecânica para fornecer quantidades de OD suficientes para suprir as necessidades do metabolismo aeróbio das bactérias nitrificantes.

8 - REFERÊNCIAS

ADHIKARI, B; DAHAL, K. R; KHANAL, S. N. A review of factors affecting the composition of municipal solid waste landfill leachate. **Int. J. Eng. Sci. Innov. Tech**, v. 3, n. 5, p. 272-281, 2014.

ALVES, C. F., et al. Remoção biológica de nitrogênio em águas residuárias: uma revisão dos processos convencionais aos processos modernos. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 9, n. 3, p. 174-187, 2018.

AL SABAHI, E. et al. Leachate composition and groundwater pollution at municipal solid waste landfill of Ibb city, Yemen. **Sains Malaysiana**, v. 38, n. 3, p. 295-304, 2009.

ANTHONISEN, A. C. et al. "Inhibition of Nitrification by Ammonia and Nitric Acid." **J.WPCF**, 48, 835 (1976).

ANTILEO, C. et al. Actuators monitoring system for real-time control of nitrification-denitrification via nitrite on long term operation. **Chemical Engineering Journal**, v. 223, p. 467-478, 2013.

APHA - American Public Health Association Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 19. WASHINGTON: APHA, AWWA, WPCF, 2012.

ARAÚJO, J. C. et al. Comparação de métodos para quantificação de bactérias nitrificantes. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 23, n.2, p. 299-305, 2018.

AZEVEDO, S. MFO. et al. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru—Brazil. **Toxicology**, v. 181, p. 441-446, 2002.

BARBOSA, I. M., et al. Remoção de matéria orgânica e nitrogênio em biorreator com membranas submersas operando em condição de nitrificação e desnitrificação simultânea. **Revista Ambiente & Água**, v. 11, n. 2, p. 304-315, 2016.

BATISTA, F. G. A.; QUEIROZ, F. R. P.; OLIVEIRA, D. S. Percepção socioambiental do reuso das águas residuárias em condomínios verticais da cidade de Campina Grande-PB. **HOLOS**, v. 6, p. 70-82, 2014.

BITTON, G. Wasterwater microbiology. John Wiley & Sons, 2005.

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

BONNETT, S. et al. Resposta da temperatura da taxa de desnitrificação e produção de gases de efeito estufa em solos de zonas úmidas marginais de rios agrícolas. **Geobiology**, v. 11, n. 3, p. 252-267, 2013.

- BRASIL, M.S.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas forrageiras do Pantanal Sul-matogrossense. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, p.179-190, 2005.
- BRASIL. Resolução nº 430/ 2011 do CONAMA. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente–CONAMA. Brasília –DF: CONAMA, 13 de maio de 2011.
- BRASIL. Resolução CONAMA 357 de 17 de março de 2005. Brasília, DF, 2005.
- BRASIL. Sistema Nacional de Informação sobre Saneamento. Diagnóstico dos serviços de Água e Esgoto. Brasília: SNIS, 2018.
- BRASIL. Política Nacional de Resíduos Sólidos. Lei no 12.305, de 2 de agosto de 2010. Presidência da República, Departamento da Casa Civil. Brasília, 2010.
- CADONÁ, E. A. et al. Contaminação por nitrogênio e fósforo de águas destinadas ao consumo humano em região com intensa atividade suinícola. **Geociências**, v. 37, n. 4, p. 883-891, 2018.
- CAMPOS, C. M. M. et al. Development and operation of an upflow anaerobic sludge blanket reactor (UASB) treating liquid effluent from swine manure in laboratory scale. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, p. 140-147, 2006.
- CAPODAGLIO, A. G.; HLAVÍNEK, P; RABONI, M. Advances in wastewater nitrogen removal by biological processes: state of the art review. **Revista ambiente & água**, v. 11, n. 2, p. 250-267, 2016.
- CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. Microbiologia do solo. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992.
- CASTILHOS JUNIOR, A.B.; DALSSASSO, R.L.; ROHERS, F. Pré-tratamento de lixiviados de aterros sanitários por filtração direta ascendente e coluna de carvão ativado. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 15, p. 385-392, 2010.
- CHAPMAN, S. K. et al. Plants actively control nitrogen cycling: uncorking the microbial bottleneck. **New Phytologist**, v. 169, n. 1, p. 27-34, 2006.
- CHRISTENSEN, T. H. et al. Biogeochemistry of landfill leachate plumes. **Applied Geochemistry**. v.16, p. 659-718, 2001.
- COELHO, A. D. et al. Análise da alcalinidade total e concentração de carbono inorgânico em trechos urbanos de rios: o exemplo do rio santa rita, região sudoeste da Bahia. In: **Anais do VI congresso Brasileiro de Gestão Ambiental**. Porto Alegre, RS. IBEAS, 2015.
- CONTRERA, R. C; ZAIAT, M; SCHALCH, V. Tratamento biológico de lixiviados de aterros sanitários utilizando reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF). **Minerva**, v. 2, n. 1, p. 65-74, 2006.

- CORREA, C. Z. et al. Comportamento da remoção de matéria orgânica (DQO) e nitrogênio amoniacal em um reator de leito estruturado operado sob aeração intermitente. **Scientia Plena**, v. 12, n. 3, 2016.
- COSTA, D. D; KEMPKA, A. P; SKORONSKI, E. A contaminação de mananciais de abastecimento pelo nitrato: O panorama do problema no Brasil, suas consequências e as soluções potenciais. **REDE - Revista Eletrônica do PRODEMA**, v. 10, n. 2, 2017.
- CRUVELLIER, N. et al. Growth modelling of *Nitrosomonas europaea* ATCC® 19718 and *Nitrobacter winogradskyi* ATCC® 25391: A new online indicator of the partial nitrification. **Bioresource technology**, v. 220, p. 369-377, 2016.
- DAIMS, H. et al. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. **Nature**, v. 528, n 7583, p. 504-509, 2015.
- DE ALMEIDA, N. M. et al. Immunogold localization of key metabolic enzymes in the anammoxosome and on the tubule-like structures of *Kuenenia stuttgartiensis*. **J. Bacteriol.** 197, 2432–2441 (2015).
- DING, X. et al. Biological denitrification in an anoxic sequencing batch biofilm reactor: Performance evaluation, nitrous oxide emission and microbial community. **Bioresource technology**, v. 285, p. 121359, 2019.
- DODDS, W.K. et al. Eutrophication of U.S. freshwaters: analysis of potential economic damages. **Environmental Science & Technology**, 2009, 43(1), 12-19.
- DONG-JIN K, LEE D., JÜRGE KELLER, J. Effect of temperature and free ammonia on nitrification and nitrite accumulation in landfill leachate and analysis of its nitrifying bacterial community by FISH. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 459-468, 2005.
- DUAN, X. J; HE, Q; LIU, Y. L. Research on Removal Performance of Integrated Biological Aerated Filter to Sewage Treatment. In: **Advanced Materials Research**. Trans Tech Publications Ltd, 2011. p. 357-362.
- DU, R. et al. Performance and microbial community analysis of a novel DEAMOX based on partial-denitrification and anammox treating ammonia and nitrate wastewaters, **Water Research** v. 108, p. 46-56, 2017.
- FLECK, L; EYNG, E; TAVARES, M. H. F. Remoção biológica de nitrogênio em efluentes líquidos: uma revisão. Revista **EIXO**, Brasília-DF, v. 4, n. 2. 2015.
- FERREIRA, E. Cinética química e fundamentos dos processos de nitrificação e desnitrificação biológica. In: CONGRESSO INTERAMERICANO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 27., 2000, Porto Alegre. *Anais...* Rio de Janeiro: ABES, 2000.
- FOLGOSI, V.A. Tecnologia disponível e Evolução do Saneamento Básico no Brasil. São Paulo: FGV, 2014.

GABARRÓ, J. et al. Effect of temperature on AOB activity of a partial nitrification SBR treating landfill leachate with extremely high nitrogen concentration. **Bioresource technology**, v. 126, p. 283-289, 2012.

GARCIA, G.; CARDOSO, A. A.; SANTOS, O. A. M. Da escassez ao estresse do planeta: um século de mudanças no ciclo do nitrogênio. **Química Nova**, p. 1468-1476, 2013.

GALLOWAY, J. N. et al. Ciclos do nitrogênio: passado, presente e futuro. **Biogeochemistry**, v. 70, n. 2, pág. 153-226, 2004.

GEISSELER, D. et al. Pathways of nitrogen utilization by soil microorganisms: a review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 12, p. 2058-2067, 2010.

HE, Y; ZHOU, G; ZHAO, Y. Nitrification with high nitrite accumulation for the treatment of "Old" landfill leachates. **Environmental engineering science**, v. 24, n. 8, p. 1084-1094, 2007.

HU, Z. et al. Highly-efficient nitrogen removal from domestic wastewater based on enriched aerobic/anoxic biological filters and functional microbial community characteristics. **Journal of Cleaner Production**, v. 238, p. 117867, 2019.

JACOBS, A. C. P; CORREA, C. Z; PRATES, K. V. M. Formação de biofilme em diferentes materiais suporte no tratamento biológico de esgoto sanitário. **Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 11, n. 8, 2015.

Jl, 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, 2015.

KARTAL, B.; KUENEN, J.G; VAN LOOSDRECHT, MCM. Sewage Treatment with Anammox. **Science**. v. 328, n. 5979, pág. 702-703, 2010

KARTAL, B., et al. How to make a living from anaerobic ammonium oxidation. **FEMS microbiology reviews**, v. 37, n. 3, p. 428-461, 2013.

KHOZIN-GOLDBERG, I. et al. Nitrogen starvation induces the accumulation of arachidonic acid in the freshwater green alga *Parietochloris incisa* (Trebuxiophyceae) 1. **Journal of Phycology**, v. 38, n. 5, p. 991-994, 2002

KJELDSEN, P. et al. Present and Long-Term Composition of MSW Landfill Leachate: A Review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, 297-336, 2002.

KIM, DJ; AHN, D. H; LEE, D. I. Effects of free ammonia and dissolved oxygen on nitrification and nitrite accumulation in a biofilm air transport reactor. **Revista Coreana de Engenharia Química**, v. 22, n. 1, p. 85-90, 2005.

KIM, D.J.; LEE, D.I.; KELLER, J. Effect of temperature and free ammonia on nitrification and nitrite accumulation in landfill leachate and analysis of its nitrifying bacterial community by FISH. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 3, p. 459-468, 2006.

- KROEGER, K.D; COLE, M.L.; VALIELA, I. Ground water transported dissolved organic nitrogen exports from coastal watersheds. **Limnology and Oceanography**,51(5), 2248-2261. 2006.
- LIU, J. et al. Enhanced nitrogen and phosphorus removal from municipal wastewater in an anaerobic-aerobic-anoxic sequencing batch reactor with sludge fermentation products as carbon source. **Bioresour Technol**, 244(Pt 1), 1158-1165, 2017.
- MARTINEZ, S. et al. How do dietary choices affect the environment? The nitrogen footprint of the European Union and other dietary options. **Environmental Science & Policy**, v. 101, p. 204-210, 2019.
- MAALCKE, W. J. et al. Characterization of anammox hydrazine dehydrogenase, a key N₂-producing enzyme in the global nitrogen cycle. **J. Biol. Chem.** 291, 17077–17092 (2016).
- 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, 2017.
- MAGRI, M. E. et al. Otimização do processo de nitrificação com o uso de conchas de ostras como material suporte em reatores aeróbios com biomassa fixa. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 18, n. 2, p. 123-130, 2013.
- MANGILI, F. B. et al. Caracterização e quantificação de microrganismos em sistema de remoção biológica de nitrogênio de lixiviado de aterro. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. 26.,2010, Porto Alegre. *Anais...*Porto alegre, ABES, 2010.
- MADIGAN, T. M. et al. A. Brock biology of microorganisms.14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.
- METCALF e EDDY. Tratamento de Efluentes e Recuperação de Recursos. Tradução: Ivanildo Hespanhol, José Carlos Mierzwa. 5ed. – Porto Alegre, AMGH, 2016.
- MENDONÇA, L.C. Microbiologia e cinética de sistemas de lodos ativados como pós-tratamento de efluente de reator anaeróbio de leito expandido. 2002, 184F. Tese (Doutorado) Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.
- MODIN, O. et al. Redistribution of wastewater alkalinity with a microbial fuel cell to support nitrification of reject water. **Water research**, v. 45, n. 8, p. 2691-2699, 2011
- MOREIRA, F.M.S. E.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e bioquímica do solo (2^a Edição), 729pp. UFLA, Lavras, Brasil, 2006.
- 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, 2012.

- MORAIS, A. P. M. et al. Effect of aeration intensity on the biofilm nitrification process during the production of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in Biofloc and clear water systems. **Aquaculture**, v. 514, p. 734516, 2019
- MOURA, F. N. et al. Desempenho de sistema para tratamento e aproveitamento de esgoto doméstico em áreas rurais do semiárido brasileiro. **Engenharia Ambiental: Pesquisa e Tecnologia**, v. 8, n. 3, 2011.
- MONTEIRO, M. M. et al. Avaliação de sistema reator UASB seguido de filtro biológico percolador aplicado na codisposição de lixiviado de aterro sanitário com esgoto doméstico. In: **Anais do 30º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**. Rio de Janeiro: ABES, 2019.
- NASCENTES, A. L. et al. Tratamento combinado de lixiviado de aterro sanitário e esgoto doméstico-Aspectos operacionais e microbiológicos. **Revista Eletrônica TECCEN**, v. 8, n. 1, p. 05-12, 2015.
- NAZ, I. et al. Efeito da composição química de meios filtrantes na comunidade microbiana em biofilmes de águas residuais em diferentes temperaturas. **Avanços do RSC**, v. 6, n. 106, p. 104345-104353, 2016.
- NOCKO, L.M. Remoção de carbono e nitrogênio em reator de leito móvel submetido à aeração intermitente. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.
- NUNES, F. S; RAIMONDI, A. C; NIEDWIESKI, A. C. Fixação de nitrogênio: estrutura, função e modelagem bioinorgânica das nitrogenases. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 872-879, 2003.
- OLIVEIRA, A. C. D. G. et al. NMP de bactérias nitrificantes e desnitrificantes e sua relação com os parâmetros físico-químicos em lodo ativado para remoção biológica de nitrogênio de lixiviado de aterro sanitário. **Revista DAE**, v. 61, p. 60-9, 2013.
- PEREIRA-RAMIREZ et al. Influência da carga orgânica aplicada no pós-tratamento de águas residuárias de suinocultura por contactores biológicos rotatórios e reator anóxico. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 9, n. 4, 2003.
- PEREIRA, E. L.; CAMPOS, C. M. M.; MOTERANI, F. Efeitos do pH, acidez e alcalinidade na microbiota de um reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) tratando efluentes de suinocultura. **Ambi-Agua**, Taubaté, v. 4, n. 3, p. 157-168, 2009.
- QUEIROZ, L. M. et al. Aplicação de processos físico-químicos como alternativa de pré e pós-tratamento de lixiviados de aterros sanitários. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 16, n. 4, p. 403-410, 2011.
- RICKARD, A, H. et al. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. **Trends in Microbiology**, 11 (2), 94–10. (2003).
- ROMILLAC, N. et al. Effects of organic inputs derived from pea and wheat root functional traits on soil protease activities. **Pedobiologia**, v. 77, p. 150576, 2019.

RUIZ, G.; JEISON, D.; CHAMY, R. Nitrification with high nitrite accumulation for the treatment of wastewater with high ammonia concentration. **Water research**, v. 37, n. 6, p. 1371-1377, 2003.

SANTORO, A. L.; ENRICH-PRAST, A. Regulação microbiológica da disponibilidade de nitrogênio em ecossistemas aquáticos continentais. **Oecol. Aust.**, 15(2): 213-235, 2011.

SANTORO, A. L.; ENRICH-PRAST, A. Salinity control of nitrification in saline shallow coastal lagoons. **Acta Limnologica Brasiliensi**, 21: 6, 2009.

SILVA, R. F. et al. Identificação e quantificação de contaminantes emergentes em estações de tratamento de esgoto. Embrapa Semiárido-Artigo em periódico indexado (**ALICE**), 2016.

SILVA, J. J. N. et al. Ciclagem de nitrogênio em florestas tropicais e plantações de eucalipto no Brasil no Antropoceno. Embrapa, (**ALICE**), 2018.

SCHEEREN, M. B. et al. O processo ANAMMOX como alternativa para tratamento de águas residuárias, contendo alta concentração de nitrogênio. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental-Agriambi**, v. 15, n. 12, 2011.

SCHMIDELL, W. et al. **Tratamento biológico de águas residuárias**. 2007.

SHOMAR, B; DARE, A. Dez questões-chave de pesquisa para reutilização integrada e sustentável de águas residuais no Oriente Médio. **Pesquisa em ciências ambientais e poluição**, v. 22, n. 8, p. 5699-5710, 2015.

SHOMAR, B; AL-DARWISH, K; VINCENT, A. Optimization of wastewater treatment processes using molecular bacteriology. **Journal of Water Process Engineering**, v. 33, p. 101030, 2020.

SOUSA, J. T. et al. Avaliação do desempenho do reator uasb na desnitrificação de águas residuárias domésticas. In: **Congresso brasileiro de engenharia sanitária e ambiental**, 23., 2005. Campo Grande. *Anais...* Campo Grande: ABES, 2005.

SOUZA, M. B., et al. Soil application of microalgae for nitrogen recovery: A life-cycle approach. **Journal of cleaner production**, v. 211, p. 342-349, 2019.

SUÁREZ, W.A.B.; OLIVEIRA, R. A. Remoção biológica de nitrogênio em reator em batelada sequencial alimentado com águas residuárias de café pré-tratadas. **Ciência & Tecnologia**. Fatec-JB, v. 8, 2016.

SUZUKI, L.Y; BATISTA, A. D; KURODA, E. K. Estudos ecotoxicológicos de lixiviado de aterro sanitário antes e após várias etapas do tratamento. **Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 9, n. 11, 2013.

SUNDBERG, C; TONDESKI, K; LINDGREN, P.-E. Potential nitrification and denitrification and the corresponding composition of the bacterial communities in a

- compact constructed wetland treating landfill leachates. **Water Science and Technology**, v. 56, n. 3, p. 159-166, 2007.
- TRAVIS, A. S. The direct synthesis of ammonia. In: Captura de nitrogênio. **Springer, Cham**, p. 93-127, 2018.
- TONG, Y. et al. Impacts of sanitation improvement on reduction of nitrogen discharges entering the environment from human excreta in China. **Science of the Total Environment**, v. 593, p. 439-448, 2017.
- TROIS, C., et al. Effect of pine bark and compost on the biological denitrification process of non-hazardous landfill leachate: focus on the microbiology. **Journal of hazardous materials**, v. 181, n. 1-3, p. 1163-1169, 2010.
- TONETTI, A. L. et al. Desnitrificação em um sistema simplificado de tratamento de esgoto. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, 2013.
- TORRES, P. et al. Combined treatment of leachate from sanitary landfill and municipal wastewater by UASB reactors. **Water Science and Technology**. v.60, n.2, p.491-495. 2009.
- TYAGI et al. Strategies for Nitrate removal from aqueous environment using Nanotechnology: A Review. **Journal of Water Process Engineering**. V. 21, p. 84–95, 2018.
- VAN KESSEL, M. et al. Complete nitrification by a single microorganism. **Nature**, v. 528, n. 7583, p. 555, 2015.
- VAN HULLE, S.W.H. et al. Influence of temperature and pH on the kinetics of the Sharon nitrification process. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. 82 (5), 471–480, 2007.
- VADIVELU, V.M.; KELLER, J.; YUAN, Z. Effect of free ammonia on the respiration and growth processes of an enriched Nitrobacter culture. **Water Research**, Oxford, v.41, n.4, p.826-834, 2007.
- VERONOSE et al. Efeito da ausência de oxigênio dissolvido na remoção de DQO e nitrogênio amoniacal em SMBR do tipo Ludkack-Ettinger Modificado (MLE) no tratamento de efluente de refinaria de petróleo. In: **Congresso brasileiro de engenharia sanitária e ambiental**, 27., 2013, Goiânia. Anais... Goiânia: ABES, 2013.
- VERSTRAETE, W.; PHILIPS, S. Nitrification-denitrification processes and technologies in new contexts. **Environ. Pollut.**, 102 (1), 717-726, 1998.
- VIEIRA, R. F. Ciclo do nitrogênio em sistemas agrícolas. **Embrapa Meio Ambiente-Livro científico (ALICE)**, 2017.
- WANG, Y.; MEYER, T. J. A route to renewable energy triggered by the Haber-Bosch process. **Chem**, v. 5, n. 3, p. 496-497, 2019.

WANG, H. et al. Comparison of performance and microbial communities in a bioelectrochemical system for simultaneous denitrification and chromium removal: Effects of pH. **Process biochemistry**, v. 73, p. 154-161, 2018.

WU, L. N. et al. Effect of free ammonia on the short-cut nitrification of the municipal landfill leachate. **Huan jing ke xue= Huanjing kexue**, v. 29, n. 12, p. 3428-3432, 2008.

WEI, D. et al. Effect of influent ammonium concentration on the shift of full nitrification to partial nitrification in a sequencing batch reactor at ambient temperature. **Chemical engineering journal**, v. 235, p. 19-26, 2014.

XIAO, Y. et al. Effect of bag-controlled release fertilizer on nitrogen loss, greenhouse gas emissions, and nitrogen applied amount in peach production. **Journal of Cleaner Production**, 2019.

XAVIER, J.B. et al. Monitorização e modelação da estrutura de biofilme. **Boletim de Biotecnologia**, São Paulo, 2005.

ZHANG, T. et al. Ammonia-oxidizing archaea and ammonia-oxidizing bacteria in six full-scale wastewater treatment bioreactors. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 91, n. 4, p. 1215-1225, 2011.

ZOPPAS, F. M.; BERNARDES, A. M.; MENEGUZZI, A. Parâmetros operacionais na remoção biológica de nitrogênio de águas por nitrificação e desnitrificação simultânea. **Engenharia sanitária e ambiental**. Vol. 21, n. 1. 2016, p. 29-42, 2016.