

*Artículo original de investigación***Eliminação autotrófica de nitrogênio pela oxidação de tiosulfato através de uma cultura mista de microrganismos****Rafael S. Amim<sup>1</sup>, Fabrício B. Santana<sup>2</sup>, Willibaldo Schmidell<sup>1</sup> e Hugo M. Soares<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Engenharia Química Universidade Federal de Santa Catarina, Laboratório de Engenharia Bioquímica, Centro Tecnológico. Campus Universitário, C.P. 476 CEP: 88010-970 Florianópolis SC Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Química, Universidade Federal do Rio Grande Rua Eng. Alfredo Huch 475, Rio Grande RS Brazil

\* Autor de correspondência: soares@enq.ufsc.br

**Resumo**

Atualmente o principal impacto poluidor nos recursos hídricos é ocasionado pelo lançamento de efluentes industriais e esgotos domésticos sem tratamento. A matéria orgânica continua sendo aquela de maior impacto, devido às grandes quantidades envolvidas principalmente em países em desenvolvimento. No entanto, outros poluentes como metais pesados, nitrogênio, fósforo e enxofre, além de micro poluentes de difícil biodegradação, têm sido matéria de investigação. Uma nova tecnologia para remover alguns destes poluentes dos efluentes é a desnitrificação autotrófica pela oxidação de compostos de enxofre como tiosulfato ( $S_2O_3^{2-}$ ), sulfeto ( $S^{2-}$ ) e enxofre elementar ( $S^0$ ). Este processo é realizado pela bactéria *Thiobacillus denitrificans*. Neste trabalho foi enriquecida uma cultura mista de microrganismos, inicialmente inoculado com uma mistura de bactérias aeróbias e anaeróbias, provenientes de plantas de tratamento de efluentes domésticos e industriais, submetidas a um meio autotrófico, para remover nitrogênio na forma de nitrato ( $N-NO_3^-$ ) pela oxidação de compostos de enxofre na forma de tiosulfato ( $S-S_2O_3^{2-}$ ). Um reator de 10 L de volume útil foi alimentado diariamente durante 211 dias para adaptar a biomassa. Uma remoção de nitrogênio acima de 90% e uma conversão total do enxofre na forma de tiosulfato a sulfato foi obtida quando o processo apresentava-se estável. Um balanço de massa feito para o reator em condições de pseudo estado estacionário demonstrou que o processo tratava-se da desnitrificação autotrófica do nitrato, utilizando o tiosulfato como doador de elétrons, apresentando valores de relação entre a produção de sulfato e remoção de nitrogênio ( $Y_{N/S}$ ) similares ao estequiométrico ( $0,35 \text{ mgN-NO}_3^-/\text{mg S-SO}_4^{2-}$ ). Ensaio cinéticos em batelada, realizados com a cultura mista de microrganismos enriquecida, comprovaram os resultados do balanço de massa apresentando valores similares da relação  $Y_{N/S}$ . Concluiu-se que é possível estabelecer este processo a partir de uma cultura mista de microrganismos facilmente encontrados em sistemas de tratamento de efluentes convencionais, apresentando um grande potencial para sua aplicação em larga escala.

**Palavras chave:** *desnitrificação autotrófica, Thiobacillus denitrificans, remoção de nitrogênio, oxidação de enxofre.*

## Abstract

Nowadays, the main environmental impact is the pollution of the water resources caused by industrial and domestic wastewater without treatment. The organic matter is still the main pollutant that causes environmental impact on developing countries because of the large quantities it is generated. However, other pollutants such as heavy metals, nitrogen, phosphorous and sulfur, besides recalcitrant micro pollutants, have being a matter of investigation. A new technology used to remove some of these pollutants in wastewaters is the autotrophic denitrification by the oxidation of reduced sulfur compounds, such as thiosulfate ( $S_2O_3^{2-}$ ), sulfide ( $S^{2-}$ ), and elementary sulfur ( $S^0$ ). This process is performed by *Thiobacillus denitrificans*. In this work, it was enriched a mixed culture of microorganisms, inoculated with a mixture of aerobic and anaerobic bacteria cultures from industrial and domestic wastewater treatment plants, submitted to an autotrophic media, to remove nitrogen as nitrate ( $N-NO_3^-$ ) by sulfur oxidation as thiosulfate ( $S-S_2O_3^{2-}$ ). A 10 L net volume reactor was used to adapt the biomass during about 211 days of operation. Nitrogen removal above 90% and a complete conversion of the sulfur as thiosulfate to sulfate was reached when the process was stable. A reactor input and output mass balance on a pseudo steady state conditions demonstrated the main processes occurred was the nitrate autotrophic denitrification using thiosulfate as final electron acceptor, showing a nitrate removal and sulfate production yield ( $Y_{N/S}$ ) similar to the stoichiometric value ( $0,35 \text{ mgN-NO}_3^- / \text{mg S-SO}_4^{2-}$ ). Kinetic assays in batch reactors with the enriched microorganisms confirmed the results obtained in the mass balance, showing similar values for  $Y_{N/S}$ . It was concluded that it is possible to establish this process starting from a mixed culture of microorganisms easily found in conventional wastewater treatment systems, presenting a great potential for its application in full scale plants.

**Keywords:** *autotrophic denitrification, Thiobacillus denitrificans, nitrogen removal, sulfur oxidation.*

## 1. Introdução

Atualmente, o principal impacto poluidor é a degradação dos recursos hídricos, ocasionada pelo lançamento de efluentes industriais e esgotos domésticos sem tratamento. Estes efluentes contêm diversos poluentes como metais pesados, matéria orgânica, e substâncias como nitrogênio e enxofre.

Os impactos ocasionados pelo nitrogênio no meio ambiente são o fenômeno da eutrofização, toxicidade aos peixes (amônia), doença em recém nascidos (nitrato), além do fato da amônia gerar demanda química de oxigênio (Liu e Koenig, 2002; Kimura et al., 2002). Várias indústrias promovem a geração de efluentes contendo elevadas

concentrações de nitrogênio, podendo-se citar a químico-farmacêutica ( $340 \text{ mgN-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ ), abatedouros ( $200 \text{ mgN-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ ), curtume ( $200-500 \text{ mgN-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ ), usina de álcool e açúcar ( $450-1610 \text{ mgN} \cdot \text{L}^{-1}$ ), suinocultura ( $1000 \text{ mgN-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ ) entre outras (Ramos et al., 2007; Mittal, 2005; Carrera, 2003).

O impacto ambiental gerado pelo enxofre consiste principalmente pela formação da chuva ácida, odor ofensivo, corrosão de aço e concreto, demanda química de oxigênio, toxicidade aos microrganismos e ao homem (Gadekar et al., 2006; Vaiopoulou et al., 2005). Entre as empresas que possuem efluentes com essas características destacam-se a têxtil ( $1800-2000 \text{ mg SO}_4^{2-} \cdot \text{L}^{-1}$ ), curtume ( $1800 \text{ mgSO}_4^{2-} \cdot \text{L}^{-1}$ ), fermento (5000

mg  $\text{SO}_4^{-2} \cdot \text{L}^{-1}$ ); mineração (drenagens ácidas de minas, 350–550 mg  $\text{SO}_4^{-2} \cdot \text{L}^{-1}$ , ou até 1500 – 7200 mg  $\text{SO}_4^{-2} \cdot \text{L}^{-1}$ ), entre outras (Menert et al., 2004; da Silva, 2005; Roger et al., 2006; Boshoff et al., 2004). De acordo com a resolução do Conselho Nacional de Meio Ambiente Brasileiro (Conama 357/2005) para lançamento de efluentes nos corpos d'água, devem ser mantidos os limites de 20 mgN- $\text{NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$  e 1,0 mgS<sup>-2</sup>·L<sup>-1</sup>, além de preservar as características e padrões de cada classe de água (por exemplo águas doces, classe 1, 10 mgN- $\text{NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$  e 250 mg $\text{SO}_4^{-2} \cdot \text{L}^{-1}$ ).

Diante desta situação é necessário promover o tratamento de efluentes evitando-se a degradação do meio ambiente. Os processos de tratamento para remoção de nitrogênio estão amplamente difundidos na literatura, destacando-se o de nitrificação/desnitrificação, além dos novos processos, Sharon, Oland, Canon, Anammox e NOx (Schmidt et al., 2003; Verstraete e Philipps, 1998; Ahn, 2006). Os destinados à remoção de enxofre, até hoje desenvolvidos, consistem na redução de sulfato a sulfeto com posterior oxidação de sulfeto a enxofre elementar e no “stripping” do sulfeto (Sipma et al., 1999; Krishnakumar et al., 2004). A maior dificuldade destes processos é a de atender aos parâmetros da legislação, por isso a importância de desenvolvimento de novas tecnologias.

Outra questão importante a ser lembrada é que todos os processos mencionados promovem a remoção destes compostos separadamente, não associando outros metabolismos que ocorrem em um ambiente natural, quando se trata um efluente real, onde estão presentes vários substratos passíveis de metabolização havendo necessidade de se investigar estas interações. Mais recentemente, vem se desenvolvendo um processo que realiza a desnitrificação autotrófica do nitrogênio utilizando formas reduzidas de enxofre como doadores finais

de elétrons como tiosulfato, sulfeto e enxofre elementar, possibilitando a integração dos ciclos bioquímicos do nitrogênio e do enxofre. A desnitrificação autotrófica via enxofre ocorre principalmente pela atuação do microrganismo *Thiobacillus denitrificans*.

Estudos atuais caracterizam o *Thiobacillus denitrificans* como anaeróbio facultativo, quimioautotrófico obrigatório, membro do  $\beta$ -Proteobacteria (Wang et al., 2005; Beller et al., 2006). Possui a capacidade de crescer em condições aeróbias, além de, em condições anaeróbias, oxidar compostos de enxofre utilizando nitrato, nitrito e óxidos de nitrogênio como aceptores finais de elétrons. A versatilidade metabólica propicia grande aplicação em sistemas de tratamento biológico. As condições ótimas para crescimento são: temperatura entre 28 e 30 °C, faixa de pH entre 6 e 8 (Kelly & Wood, 2000; Wang et al., 2005).

Wang et al. (2005) investigaram a cinética de desnitrificação, com cultura pura de *Thiobacillus denitrificans*, em processos em batelada e contínuo, utilizando sulfeto de hidrogênio como doador de elétrons e nitrato comoceptor. Concluiu-se que os fatores determinantes para estabelecimento do processo são a razão  $\text{S}^{-2}/\text{NO}_3^-$  (5/3 a 5/2 sendo as ideais) e a concentração de sulfeto (< 300 mgS<sup>-2</sup>·L<sup>-1</sup>).

Moon et al. (2003), utilizando o mesmo microrganismo, estabeleceram o processo de desnitrificação autotrófica via oxidação de enxofre elementar, obtendo eficiência de remoção de nitrogênio de 90%. Constatou-se ainda o baixo acúmulo de nitrito durante a realização do processo.

Visando a operação de reatores em escala real, há necessidade de se verificar a obtenção de culturas de microrganismos mais facilmente disponíveis e abundantes, capazes de realizar o processo de desnitrificação autotrófica via oxidação de compostos reduzidos de enxofre. Assim, o

objetivo deste trabalho foi o de adaptar uma cultura mista de microrganismos, obtida de processos convencionais de tratamento biológico, a este processo, além de caracterizar os seus parâmetros cinéticos e compará-los aos apresentados na literatura para as culturas puras de *Thiobacillus denitrificans*.

## 2. Material e Métodos

### 2.1 Microrganismos

O inóculo utilizado para estabelecer o processo de desnitrificação e oxidação do enxofre foi coletado de duas fontes distintas. Realizou-se uma coleta de lodo na Estação de Tratamento de Esgoto, sistema de Lodos Ativados, da Companhia de Águas e Saneamento do Estado de Santa Catarina (Casan). Outra coleta foi realizada no sistema de tratamento anaeróbico de uma

indústria de bebidas, localizada em Santa Catarina.

Os referidos inóculos passaram por um tratamento preliminar, sendo o inóculo Casan submetido a um sistema de peneiramento, para remoção de partículas suspensas, e o inóculo anaeróbico foi drenado para reduzir o teor de água do mesmo. O inóculo inicial foi de 4g SSV.L<sup>-1</sup> e uma proporção de 50% (m/m) de cada lodo.

### 2.2 Meio de cultivo

O reator era alimentado diariamente com solução sintética contendo nitrato (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), como fonte de nitrogênio; Tiosulfato (S-S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>-2</sup>), como fonte de enxofre; bicarbonato (NaHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), como fonte de carbono e tampão; além de solução de meio nutriente, adaptado de Campos *et. al.* (1999), conforme apresentado na Tabela 1.

**Tabela 1:** Solução de nutrientes do meio estoque.

Composto	Concentração (g/L)
EDTA .2H <sub>2</sub> O	55,35
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	4,99
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	21,99
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	7,34
MnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	5,06
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	1,57
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> .MoO <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,10
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,61
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,25

Os reagentes eram adicionados ao meio sintético a partir de duas soluções estoques, uma de enxofre (10 g S-S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>-2</sup>.L<sup>-1</sup>) e outra de nitrogênio (10 g N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.L<sup>-1</sup>). O volume adicionado de cada solução estoque variou de acordo com cada fase de operação do reator contínuo. A partir de uma solução estoque de bicarbonato de sódio (40 g.L<sup>-1</sup>), era adicionada a fonte de carbono do meio, sendo utilizado 200 mL a cada 2L

alimentado, dosagem esta suficiente para manter o pH em torno de 8. Além disso, adicionava-se diariamente 1,4 mL da solução de nutrientes a cada 2 L alimentado.

A contribuição de S-SO<sub>4</sub><sup>-2</sup> adicionado ao meio de cultivo pela adição da solução de nutrientes foi de apenas 4,0 mg.L<sup>-1</sup>, sendo esta desprezada no computo dos resultados, uma vez que a faixa de concentração deste íon estudada foi de 100 a 500 mg.L<sup>-1</sup>.

### 2.3 Reator semi-contínuo

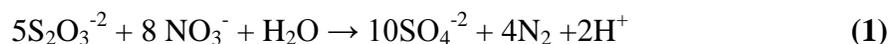
A adaptação da cultura mista de microrganismos foi feita em um reator sem mistura mecânica, com volume total de 20L, volume útil de 10L, medindo 22 cm de largura, 26 cm de comprimento e 36 cm de profundidade. O sistema era completamente vedado, evitando-se a introdução de oxigênio. Inicialmente o espaço da fase gasosa do reator foi lavada com argônio para garantir anaerobiose.

O reator anaeróbio foi operado durante 211 dias à temperatura ambiente, sendo alimentado com meio sintético. A alimentação era realizada uma vez ao dia, num regime semi-contínuo, mantendo um tempo de retenção hidráulica (TRH) de 5 dias. Durante a alimentação agitava-se o conteúdo do reator para promover a sua homogeneização. A retirada de líquido tratado era feita quando o reator estava em

repouso garantindo a sedimentação do lodo e retirada do sobrenadante.

A operação do reator dividiu-se em três fases, sendo cada fase correspondendo a progressões de carga de enxofre, conforme descrito na Tabela 2.

A progressão de carga aplicada tinha por finalidade permitir uma adaptação gradativa da biomassa. A composição de S-S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>-2</sup> e N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> variaram de acordo com a condição de operação aplicada ao reator, sendo mantida a relação estequiométrica de S/N, de acordo com a Equação 1 (Santana, 2006). Analisando-se a estequiometria proposta na Equação 1 observa-se uma relação de 5 moles de S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>-2</sup> para 8 moles de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, o que implica em uma relação mássica S/N de 2,857, ou N/S de 0,35.



**Tabela 2** - Condições de operação do reator contínuo.

Fases de operação do reator	Fase I	Fase II	Fase III
Carga mgS-S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>-2</sup> .(L.d) <sup>-1</sup>	20	60	100
Concentração mgS-S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>-2</sup> .L <sup>-1</sup>	100	300	500
Concentração mgN-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> .L <sup>-1</sup>	35	105	175
Tempo de retenção hidráulica TRH (d)	5	5	5

### 2.4 Ensaios cinéticos de desnitrificação autotrófica

Definidos os ensaios a serem realizados, o inóculo era coletado retirando-se a biomassa do reator juntamente com o efluente diário (2L). Para permitir uma homogeneidade do sistema inseria-se argônio (gás inerte) mantendo o efluente em constante agitação durante a coleta do lodo. Posteriormente

analisava-se o teor de sólidos e prosseguia-se com a lavagem do lodo, isto é, propiciava-se a decantação do lodo para, em seguida, extrair o sobrenadante. Este procedimento garantia a eliminação das substâncias contidas no efluente, contribuindo para eliminar possíveis interferências durante os experimentos com o inóculo. Baseado na análise de sólidos do efluente e na

concentração desejada para o ensaio preparava-se 2,5 L (mantendo-se a concentração celular de  $2\text{gSSV.L}^{-1}$ ) de meio sintético para a realização da cinética. O referido meio era submetido a 10 minutos de argônio para garantir a eliminação de oxigênio, que interfere no consumo de tiosulfato oxidando-o. Finalizado o tempo de inserção de argônio, eram transferidos 150 mL de amostra do meio para dezesseis frascos de soro. Para evitar a introdução de oxigênio de uma amostragem para outra, adicionava-se argônio em cada frasco, até a sua completa vedação. Na seqüência os frascos eram inseridos em um incubador rotativo a uma temperatura de  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 1^{\circ}\text{C}$ ). De acordo com a cinética em estudo coletam-se amostras de tempos em tempos, realizando-se as análises em questão.

### **2.5 Metodologias analíticas**

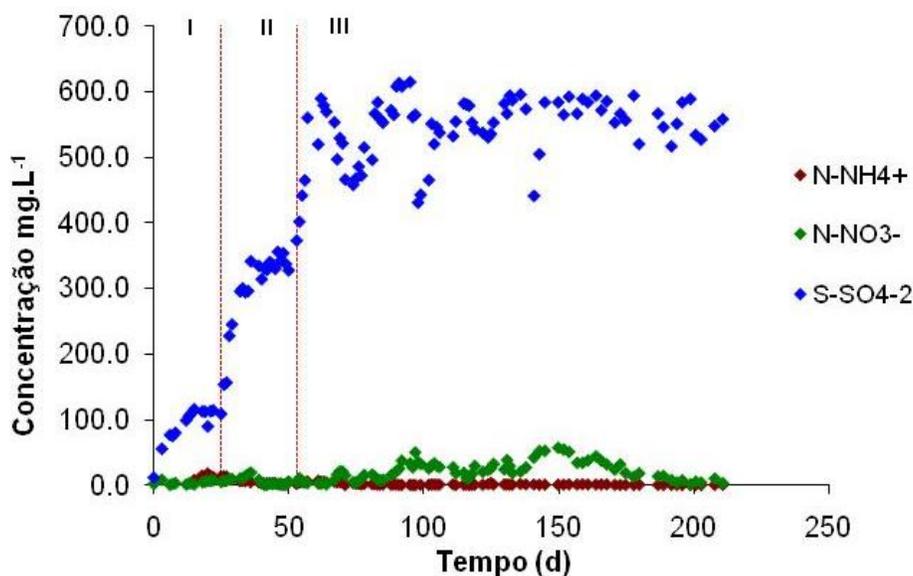
O método do ácido salicílico, descrito por Cataldo et al. (1975), foi adaptado e empregado para a determinação de nitrato. As determinações de sólidos suspensos voláteis e sulfato e tiosulfato, foram realizadas de acordo com o Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (APHA, 1995). O nitrogênio amoniacal ( $\text{N-NH}_4^+$ ) foi analisado pelo método colorimétrico de Nessler segundo Vogel (1981). A determinação de oxigênio dissolvido fez-se através de oxímetro WTW portátil, modelo OXI 340. A determinação do potencial de oxidação e redução fez-se através de uma sonda marca Digimed, utilizando-se de um analisador modelo TH-44.

## **3. Resultados e Discussão**

### **3.1 Operação do Reator Contínuo**

Na Figura 1 estão apresentados os valores das concentrações de nitrato, amônio e sulfato medidos no efluente do reator nas três fases do processo, durante os 211 dias de operação. O nitrogênio na forma amoniacal, apesar de não ter sido adicionado na alimentação, foi monitorado para verificar se este poderia estar sendo formado por algum outro metabolismo. Ensaio preliminares realizados por Amim (2008), para testar as metodologias analíticas de acompanhamento dos ensaios, demonstraram que há limitações nas determinações analíticas do tiosulfato, quando adicionado ao meio de cultivo, e do enxofre elementar. Assim, a verificação da oxidação do tiosulfato adicionado dá-se pela recuperação do enxofre na forma de sulfato. A operação do reator foi caracterizada por três fases distintas, conforme descrito na Tabela 2. Observa-se que as fases I e II foram mais curtas em decorrência do objetivo do estudo. Planejou-se atingir a concentração de  $500\text{ mgS-S}_2\text{O}_3^{-2}.\text{L}^{-1}$  para realizar ensaios cinéticos, garantindo-se assim uma atividade maior dos microrganismos e aproximando a concentração de enxofre a efluentes industriais. Destaca-se ainda a elevada conversão de substrato, permitindo o rápido aumento de carga, total conversão de tiosulfato a sulfato, com o concomitante consumo de nitrato, e a baixa formação de amônio.

Em termos de cargas aplicadas, observa-se que esta poderia ser aumentada, pois não foi atingido o limite do sistema. Não houve qualquer indicação de inibição do processo pelas elevadas concentrações de nitrato e de tiosulfato aplicados.



**Figura 1:** Monitoramento das concentrações dos íons durante a operação do reator contínuo, nas fases I, II e III.

Na Tabela 3 observam-se as eficiências do processo em cada etapa de operação. Nas fases I e II praticamente ocorreu desnitrificação total, e na fase III identificou-se um pequeno residual de nitrato, que promoveu a redução da eficiência. Nesta fase III houve uma oscilação maior da concentração de nitrato no efluente devido à remoção de biomassa do reator para a realização dos ensaios cinéticos,

caracterizando assim períodos com residual de nitrato e variação de sulfato, mas o processo foi capaz de se restabelecer com altas eficiências de remoção de ambos substratos. Estes estão coerentes com o estudo de Monn et al. (2003) e Wang et al. (2005) que apresentam conversões similares com o cultivo de *Thiobacillus denitrificans* em cultura pura.

**Tabela 3:** Eficiência média do processo em cada etapa de operação do reator contínuo.

Fase	Remoção de Nitrogênio	Conversão a sulfato
I	92%	100%
II	95%	100%
III	88%	100%

O controle do pH neste processo é de fundamental importância. Os estudos realizados por Santana (2006) direcionaram os procedimentos praticados neste trabalho. Na Figura 2 observa-se a variação do pH no reator. O pH permaneceu em uma faixa de 7,70 a 8,37 e, em média, no valor 8,00, que,

para microrganismos como *Thiobacillus denitrificans* em cultura pura, é considerado ideal (Kelly & Wood, 2000). A manutenção do pH foi somente devido a adição de bicarbonato no meio não havendo necessidade de se adicionar ácidos ou álcalis.

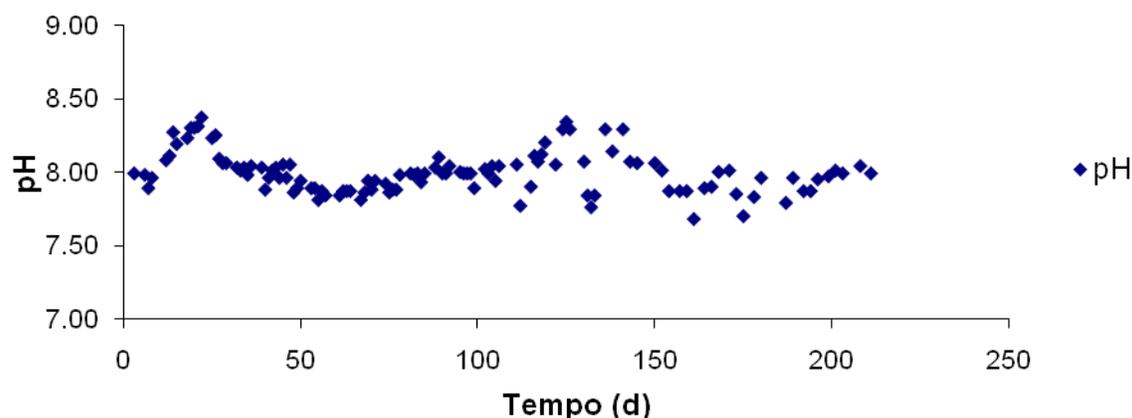


Figura 2: Variação do pH no reator contínuo

Para se chegar às velocidades de conversão dos substratos e formação de produtos faz-se necessário o balanço de massa do sistema, conforme descrito a seguir.

#### Nitrato consumido ( $N-NO_3^-$ )

$$\frac{d(N-NO_3^-)}{dt} = D \times (N-NO_3^-)_e - D \times (N-NO_3^-)_s - (\mu_{N^-} \times X) \quad (2)$$

Onde:

$N-NO_3^-_e$ : concentração de nitrogênio (nitrato) na alimentação do reator ( $\text{mg N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$ );

$N-NO_3^-_s$ : concentração de nitrogênio (nitrato) no efluente ou no reator ( $\text{mg N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$ );

$D$ : vazão específica ( $\text{d}^{-1}$ )

$\mu_{N^-}$ : velocidade específica de consumo de nitrato ( $\text{mg N-NO}_3^- \cdot (\text{gSSV} \cdot \text{d})^{-1}$ );

$X$ : concentração celular ( $\text{gSSV} \cdot \text{L}^{-1}$ ).

Considerando-se um estado pseudo-estacionário para determinados períodos do reator, pode-se escrever:

$$\frac{d(N-NO_3^-)}{dt} = 0 \quad (3)$$

Assim, rearranjando a Equação 4 temos a Equação 4:

$$\mu_{NO_3^-} = \frac{D \times (N-NO_3^-_e - N-NO_3^-_s)}{X} \quad (4)$$

Sendo  $D$  calculado pela Equação 5:

$$D = \frac{Q}{V} = \frac{2\text{L}/\text{d}}{10\text{L}} = 0,2 \text{ d}^{-1} \quad (5)$$

Onde:

$Q$ : vazão de alimentação ( $2 \text{ L} \cdot \text{d}^{-1}$ )

$V$ : volume do reator (10 L)

Através da Equação 4 pode-se calcular a velocidade específica de consumo de nitrato de cada fase de operação do reator. Para realização destas medidas definiu-se o período considerado em estado pseudo-

estacionário, além das concentrações médias de nitrato afluente e efluente, e a concentração celular média de cada fase, conforme apresentado na Tabela 4.

**Tabela 4:** Velocidades específicas de consumo de nitrato durante as três fases de operação do reator contínuo.

Fase	Período (dias)	N-NO <sub>3</sub> <sup>-e</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	N-NO <sub>3</sub> <sup>-s</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	X (g SSV.L <sup>-1</sup> )	μ <sub>N</sub> (mg N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> .(g SSV.d) <sup>-1</sup> )
I	12-25	41,30	3,73	3,41	2,20
II	32-50	114,35	6,12	3,08	7,03
III	57-211	182,57	21,11	2,83	11,41

Observando-se os resultados percebem-se os baixos valores de velocidades específicas de consumo de nitrato, isto se deve em parte ao TRH elevado, evidenciando assim a possibilidade de redução deste e conseqüentemente o aumento da atividade dos microrganismos. Entretanto, o reator tinha como principal função manter a flora bacteriana ativa e adaptar os microrganismos ao processo de desnitrificação autotrófica via oxidação do enxofre. Demonstra-se ainda que, à medida que houve um incremento na concentração de substrato, esta velocidade

também aumentou ratificando a adaptação dos mesmos ao processo.

#### **Sulfato produzido (S-SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>)**

Devido à ausência de uma metodologia capaz de quantificar a variação da concentração de tiosulfato em efluentes, o balanço de massa de enxofre limitou-se a formação de sulfato. O balanço de massa de sulfato foi calculado baseado na Equação 6.

$$\frac{d(S - SO_4^{-2})}{dt} = -D \times (S - SO_4^{-2}) - (\mu_s \times X) \quad (6)$$

Onde:

S-SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>: concentração de sulfato produzido no reator (mg S-SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>.L<sup>-1</sup>);

D: vazão específica (d<sup>-1</sup>)

μ<sub>s</sub>: velocidade específica de produção de sulfato (mg S-SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>.(gSSV.d)<sup>-1</sup>);

X: concentração celular (gSSV.L<sup>-1</sup>).

De forma similar ao desenvolvimento das equações para o nitrato, adotando-se as mesmas considerações para a vazão específica (D), o mesmo período de estado pseudo-estacionário e a concentração celular determinaram-se as velocidades de produção de sulfato, explicitadas na Tabela 5.

**Tabela 5:** Velocidades específicas de formação de sulfato durante as três fases de operação do reator contínuo.

Fase	Período (dias)	S-SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	X (g SSV.L <sup>-1</sup> )	μ <sub>s</sub> (mg S-SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> . (g SSV. d) <sup>-1</sup> )
I	12-25	107,38	3,41	6,30
II	32-50	326,34	3,08	21,19
III	57-211	548,62	2,83	38,77

Assim como para as velocidades específicas de consumo de nitrato, houve um incremento nas velocidades específicas de produção de sulfato à medida que foram aumentadas as concentrações dos substratos.

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

De acordo com a Equação 1, a relação entre nitrogênio removido (N-N<sub>2</sub>) e sulfato produzido (S-SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>) é de 0,35 mgN-N<sub>2</sub>.(mg S-SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>)<sup>-1</sup>. Para verificar se o processo de

desnitrificação via oxidação do tiosulfato de fato ocorreu segundo a Equação 1, determinou-se a relação Y<sub>N/S</sub> (fator de conversão do sulfato produzido em nitrogênio removido) através da Equação 7. Este cálculo baseou-se nas velocidades específicas de consumo de nitrato (ou formação de N<sub>2</sub>) e velocidades de produção de sulfato determinadas no item anterior. Na Tabela 6 estão apresentados estes valores.

$$Y_{N/S} = \frac{\mu_N}{\mu_S} \quad (7)$$

**Tabela 6:** Relação Y<sub>N/S</sub> em cada fase de operação do reator contínuo.

Fase	μ <sub>N</sub> (mg N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /g SSV. d)	μ <sub>S</sub> (mg S-SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> /g SSV. d)	Y <sub>N/S</sub> (mgN-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /mg S-SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> )
I	2,20	6,30	0,349
II	7,03	21,19	0,332
III	11,41	38,77	0,294

Os resultados indicam que o processo estabelecido no reator anaeróbio é a desnitrificação via oxidação do tiosulfato, ratificada pelos valores de Y<sub>N/S</sub> próximos ao estequiométrico (0,35 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/mg S-SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>). Salienta-se ainda que houve uma redução do fator à medida que a concentração de substratos foi elevada. Isto pode ter ocorrido pela oxidação de tiosulfato por outros processos metabólicos que a desnitrificação autotrófica, visto que aumentou a

disponibilidade de substratos e por tratar-se de uma cultura mista.

#### **3.2 Ensaios Cinéticos com a Cultura de Microrganismos**

Para caracterizar a cultura mista de microrganismos adaptada e enriquecida no reator foram realizados ensaios cinéticos para avaliar a atividade destes microrganismos. Estes ensaios foram realizados em cada fase de operação,

seguinto a metodologia descrita no item 2.4. As condições do ensaio foram: manutenção da temperatura em 30°C, a concentração celular de 2 gSSV.L<sup>-1</sup>, variação da concentração de substrato de acordo com

aquelas aplicadas nas fases de operação (utilizou-se a relação estequiométrica mássica S/N de 2,857). Nas Figuras 3, 4 e 5 pode-se observar o resultado destes ensaios.

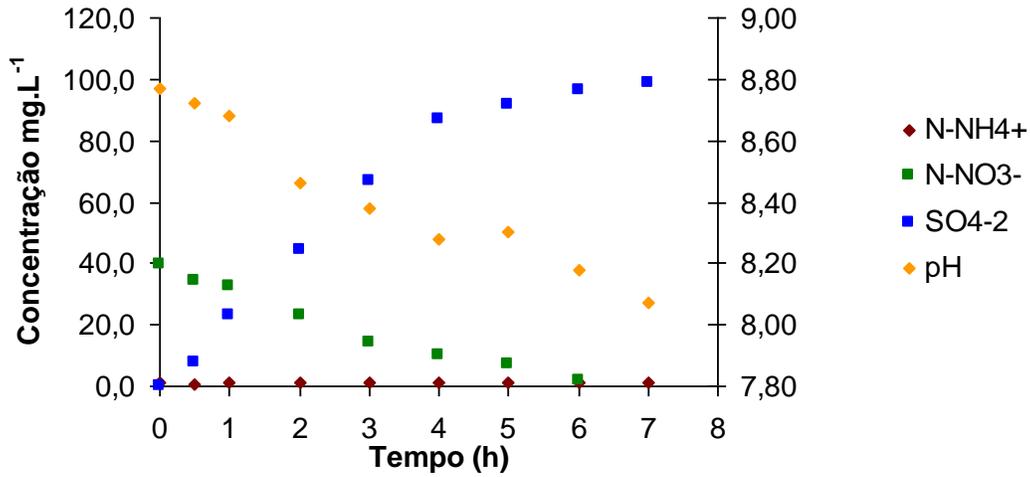


Figura 3 : Ensaio cinético de monitoramento da cultura de microrganismos na fase I – 100 mgS-S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>-2</sup>.L<sup>-1</sup>

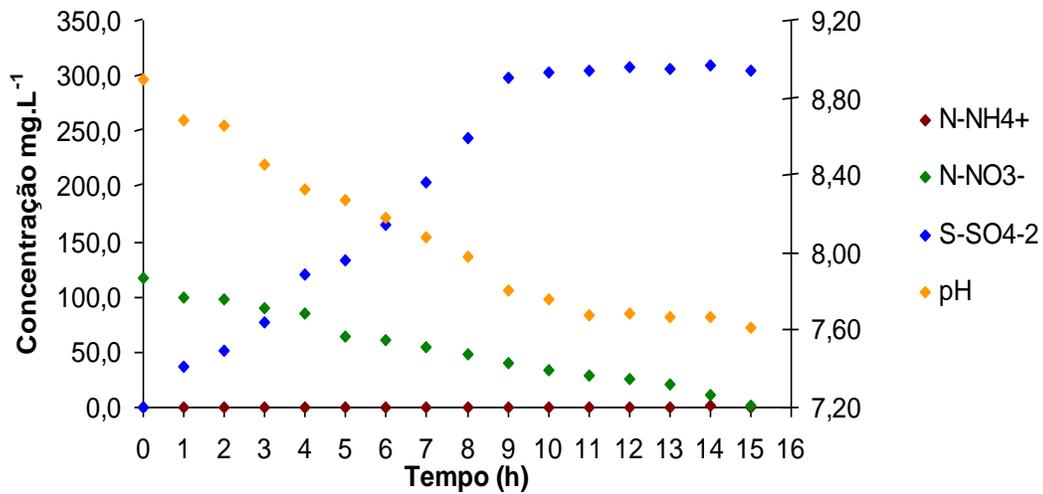
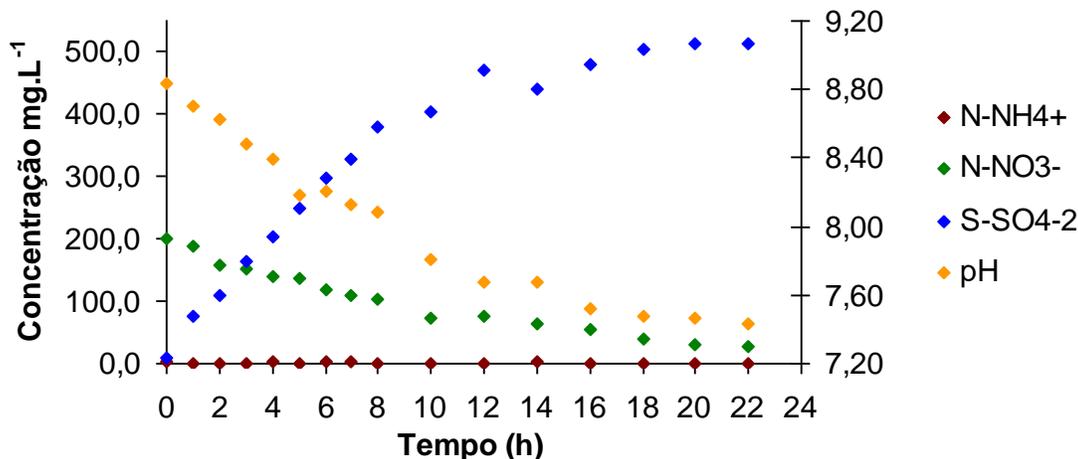


Figura 4: Ensaio cinético de monitoramento da cultura de microrganismos na fase II – 300 mgS-S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>-2</sup>.L<sup>-1</sup>



**Figura 5 :** Ensaio cinético de monitoramento da cultura de microrganismos na fase III – 500 mgS-S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>-2</sup>.L<sup>-1</sup>

Observa-se, pelos dados das figuras, que à medida que se aumentou a concentração de tiosulfato na alimentação mais tempo foi necessário para que os substratos fossem consumidos, porém, todos chegaram a sua conversão máxima no período de ensaio.

Através destas curvas podem ser calculadas as velocidades de consumo de substratos e, conseqüentemente, as velocidades específicas de consumo de substrato. Estas velocidades foram calculadas a partir dos valores de inclinação das tangentes das

respectivas curvas de concentração de substrato (nitrato) e produto (sulfato) com o tempo, observando-se que as variações das concentrações de sulfato e nitrato são praticamente lineares em função do tempo durante as primeiras 8 horas de experimento, o que permite o cálculo das respectivas velocidades. As velocidades de consumo de substrato ( $r_s$ ) e velocidades específicas de consumo de substrato ( $\mu_s$ ), foram calculadas de acordo com as Equações 8 e 9 respectivamente:

$$r_s = \frac{dS}{dT} \quad (8)$$

$S$ = concentração, mg.L<sup>-1</sup>  
 $T$ = tempo, h

Sendo:

$r_s$ = velocidade de consumo de substrato ou velocidade de formação de produto, mg.(L.h)<sup>-1</sup>

$$\mu_s = \frac{1}{x} * \frac{dS}{dT} \quad (9)$$

Onde:

$\mu_s$ = velocidade específica de consumo de substrato ou formação de produto, mg.(gSSV.h)<sup>-1</sup>

$x$ = concentração celular, mgSSV.L<sup>-1</sup>  
 $S$ = concentração, mg.L<sup>-1</sup>  
 $T$ = tempo, h

Na Tabela 7 estão representadas as velocidades específicas de consumo de nitrato e produção de sulfato, calculadas através das Equações 2 e 3 para cada uma

das fases. Calculou-se também o fator de conversão de sulfato produzido em nitrogênio removido ( $Y_{N/S}$ ) em cada fase de operação.

**Tabela 7:** Resultados dos ensaios cinéticos.

Fases	$\mu_N$ $\text{mgN-NO}_3^-$ $\cdot(\text{gSSV}\cdot\text{h})^{-1}$	$\mu_S$ $\text{mgS-SO}_4^{-2}$ $\cdot(\text{gSSV}\cdot\text{h})^{-1}$	$Y_{N/S}$ $\text{mgN-NO}_3^-$ $(\text{mg S-SO}_4^{-2})^{-1}$
Fase I	3,156	9,848	0,32
Fase II	3,616	15,619	0,23
Fase III	5,387	19,261	0,28

O incremento dos valores de  $\mu_N$  e  $\mu_S$  evidencia a adaptação e o aumento da atividade biológica com a maior concentração de substratos. Novamente, em concordância com o balanço de massa realizado para a operação do reator semi-contínuo, confirma-se que o processo realizado pela cultura mista de microrganismos desenvolvida é a desnitrificação via oxidação do tiosulfato, ratificada pelos valores de  $Y_{N/S}$  próximos ao estequiométrico ( $0,35 \text{ mgN-NO}_3^- \cdot (\text{mg S-SO}_4^{-2})^{-1}$ ), porém, um pouco inferiores aos encontrados na operação contínua do biorreator. As diferenças podem ser atribuídas ao crescimento celular, que não está computado na estequiometria apresentada e a algum outro metabolismo menos expressivo, realizado pelos microrganismos, por tratar-se de uma flora mista. Santana (2006) obteve resultados similares estudando a eliminação autotrófica de nitrogênio via integração do ciclo do enxofre, em reator SBR, operado em distintas condições, utilizando uma cultura mista. Para uma das condições, Santana (2006) obteve velocidades específicas de consumo dos substratos de 5,39 ( $\text{mgN-NO}_3^- \cdot (\text{gSST}\cdot\text{h})^{-1}$ ) e 24,61 ( $\text{mgS-SO}_4^{-2} \cdot (\text{gSST}\cdot\text{h})^{-1}$ ). Para sustentar a afirmação de que o processo tratava-se apenas da desnitrificação autotrófica utilizando o tiosulfato como

aceptor de elétrons, Amim (2008) realizou alguns ensaios complementares: o primeiro foi para verificar se a oxidação do tiosulfato poderia estar sendo promovida por alguma falha operacional com a introdução de oxigênio no sistema; o segundo foi para verificar a influência da adição da fonte de carbono autotrófica na forma de bicarbonato. Chegou-se a conclusão de que não ocorre nenhuma transformação abiótica na conversão do tiosulfato. Concluiu-se também que a ausência de bicarbonato inibe o processo, indicando que o bicarbonato deve atuar como fonte essencial de carbono e muito importante como corretivo de pH em processos de desnitrificação autotrófica e que o processo simultâneo de oxidação de tiosulfato e assimilação de carbono orgânico não ocorre.

#### 4. Conclusões

A principal conclusão deste trabalho foi de que é possível estabelecer o processo de desnitrificação autotrófica via oxidação de compostos reduzidos de enxofre, no caso o tiosulfato, partindo de um inóculo misto e de fácil disponibilidade, como reatores de lodos ativados e anaeróbios tratando efluentes industriais. A resposta da flora de microrganismos foi imediata, atingindo-se o equilíbrio do processo em poucos dias de

operação do sistema. A conversão do tiosulfato a sulfato foi de 100% e a do nitrato foi superior a 90%, exceto alguns períodos de instabilidade provocados por retirada de material celular do reator.

Através dos ensaios cinéticos com a cultura mista desenvolvida, observaram-se velocidades de consumo de nitrato e de produção de sulfato compatíveis com as reportadas na literatura para culturas puras de *Thiobacillus denitrificans*. Assim, foram obtidos valores para o fator de conversão de sulfato produzido em nitrogênio removido ( $Y_{N/S}$ ) próximos ao indicado pela estequiometria, indicando que o principal metabolismo ocorrido foi o da desnitrificação autotrófica utilizando o tiosulfato como aceptor final de elétrons.

Os resultados mostram o grande potencial de aplicação em larga escala deste processo, porém há muito que investigar na área. Uma das questões que devem ser abordadas, além da melhor caracterização e identificação da cultura mista de microrganismos, é o estabelecimento de condições do processo para que oxide as formas mais reduzidas de enxofre ( $S^{-2}$ ) em enxofre elementar, para que este possa ser removido do sistema e promover um processo de eliminação conjunta de nitrogênio e enxofre.

## 5. Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq e à FAPESC pelo financiamento desta pesquisa e a CAPES pela bolsa de mestrado.

## 6. Referências

- Ahn, Y.H. 2006. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. *Process Biochem* 41: 1709-1721.
- Amim, R. S. 2008. Avaliação de parâmetros cinéticos de uma cultura mista de microrganismos destinados à eliminação autotrófica de nitrogênio via oxidação de tiosulfato. Dissertação de Mestrado (Engenharia Química). Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC. 176 p.
- APHA, AWWA, WEF. 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater. 19th.edn. American Public Health Association. Washington, DC.
- Beller, H.R.; Chain, P.S.G.; Letain, T.E.; Chakichrla, A.; Larmier, F.W.; Richardson, P.M.; Coleman, M.A.; Wood, A.P.; Kelly, D.P. 2006. The genome sequence of the obligately chemolithoautotrophic, facultatively anaerobic bacterium *Thiobacillus denitrificans*. *J Bacteriol* 188, (4): 1473-1488.
- Boshoff, G.; Duncan, J.; Rose, P.D. 2004. Tannery effluent as a carbon source for biological sulphate reduction. *Water Res* 38: 2651-2658.
- Campos, J.L.; Garrido-Fernandes, J.M.; Mendez, R.; Lema, J.M. 1999. Nitrification at high ammonia loading rates in a activated sludge unit. *Bioresource Technol* 68: 141-148.
- Carrera, J.; Baeza, J.A.; Vicent, T.; Lafuente, J. 2003. Biological nitrogen removal of high-strength ammonium industrial wastewater with two-sludge system. *Water Res* 37: 4211-4221.
- Cataldo, D.A.; Haroon M; Schrader, L.E.; Youngs, V.L. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Comun Soil Sc. Plant Anal* 6: 71-80.
- Da Silva, A. J. 2005. Biodessulfatação com posterior oxidação parcial do sulfeto em reatores operados em bateladas seqüências. Tese de Doutorado (Engenharia Ambiental) Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, SP.
- Gadekar, S.; Nemati, M.; Hill, G.A. 2006. Batch and continuous biooxidation of sulphide by *Thiomicrospira sp.* CVO: reaction kinetics and stoichiometry. *Water Res* 40: 2436 -2446.
- Kelly, D. P. Wood, A. P. 2000. Confirmation of *Thiobacillus denitrificans* as a species of the

- genus *Thiobacillus*, in the subclass of the Proteobacteria, with strain NCIMB 9548 as the type strain. *Int J Syst Evol Microb* 50: 547-550.
- Kimura, A. K.; Nakamura, M.; Watanabe, Y. 2002. Nitrate removal by a combination of elemental sulfur-based denitrification and membrane filtration. *Water Res* 36: 1758-1766.
- Krishnakumar, B.; Madjumdar, S.; Manilal, V.B.; Haridas, A. 2005. Treatment of sulphide containing wastewater with sulphur recovery in a novel reverse fluidized loop reactor (RFLR). *Water Res* 39: 639-647.
- Liu, L.H.; Koenig. 2002. A. Use of limestone for pH control in autotrophic denitrification: batch experiments. *Process Biochem* 37: 885-893.
- Menert, A.; Paalme, V.; Juhkam, J.; Vilu, R.. 2004. Characterization of sulfate-reducing bacteria in yeast industry waste by microcalorimetry and PCR amplification. *Thermochim Acta* 420: 89-98.
- Mittal, G. S. 2006. Treatment of wastewater from abattoirs before land application - a review. *Bioresource Technol* 97: 1119-1135.
- Moon, H.S.; Ahn, K.-H.; Lee, S.; Nam, K.; Kim, J.Y. 2004. Use of autotrophic sulfur-oxidizers to remove nitrate from bank filtrate in a permeable reactive barrier system. *Env Pol* 129: 499-507.
- Ramos, A.F.; Gomes, M.A.; Hontoria, E.; López, J. G. 2007. Biological nitrogen and phenol removal from saline industrial wastewater by submerged fixed-film reactor. *J Hazard Mater* 142: 175-183.
- Roger, M. F.; Roca, J.A. M.; Aleixandre, M.V. G.; Pia, A. B.; Uribe, B. C.; Clar, A. I. 2007. Reuse of tannery wastewaters by combination of ultrafiltration and reverse osmosis after a conventional physical-chemical treatment. *Desalination* 204: 219-226.
- Santana, F. B. 2006. Eliminação autotrófica de nitrogênio via integração dos ciclos do nitrogênio e do enxofre em reator SBR. Tese de Doutorado (Engenharia Química). Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC. 157 p.
- Schmidt, I.; Sliemers, O.; Schmid, M.; Bock, E.; Fuerst, J.; Kuenen, J.G.; Jetten, Mike S.M.; Strous, M. 2003. New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. *FEMS Microb Rev* 27: 481-492.
- Sipma, J.; Lens, P.; Vieira, A.; Miron, Y.; Van Lier J.B.; Pol, L.W. H.; Lettinga, G. 1999. Thermophilic sulphate reduction in upflow anaerobic sludge bed reactors under acidifying conditions. *Process Biochem* 35: 509-522.
- Vaiopoulou, E.; Melidis, P.; Aivasidis, 2005. A. Sulfide removal in wastewater from petrochemical industries by autotrophic denitrification. *Water Res* 39: 4101-4109.
- Verstraete, W.; Philips, S. 1998. Nitrification-denitrification processes and technologies in new contexts. *Env Pol* 102: 717-726.
- Vogel, A. I. 1981. Análise Inorgânica Quantitativa. Quarta edição, Guanabara. Rio de Janeiro, Brazil.
- Wang, A.; Du, D.; Ren, N.; Van Groenestijn, J. W. 2005. An innovative process of simultaneous desulfurization and denitrification by *Thiobacillus denitrificans*. *J Environ Sci Heal A* 40 (10): 1939-1949.

**Lista e Símbolos**

$D$ : vazão específica ( $d^{-1}$ )

$N-NO_3^-$ : concentração de nitrogênio (nitrato) ( $mg\ N-NO_3^-.L^{-1}$ )

$N-NO_3^-_e$ : concentração de nitrogênio (nitrato) na alimentação do reator ( $mg\ N-NO_3^-.L^{-1}$ )

$N-NO_3^-_s$ : concentração de nitrogênio (nitrato) no efluente ou no reator ( $mg\ N-NO_3^-.L^{-1}$ )

$Q$ : vazão de alimentação ( $2L.d^{-1}$ )

$r_s$ : velocidade de consumo de substrato ou velocidade de formação de produto,  $mg.(L.h)^{-1}$

$S-S_2O_3^{-2}$ : concentração de enxofre (Tiosulfatotiosulfato) ( $mgS-S_2O_3^{-2}.L^{-1}$ )

$S-SO_4^{-2}$ : concentração de sulfato produzido no reator ( $mg\ S-SO_4^{-2}.L^{-1}$ )

$S$ : concentração,  $mg.L^{-1}$

$T$ : tempo (h)

$V$ : volume do reator (L)

$x$ : concentração celular, ( $mgSSV.L^{-1}$ )

$X$ : concentração celular ( $gSSV.L^{-1}$ ).

$Y_{NS}$ : relação entre a produção de sulfato e remoção de nitrogênio ( $mgN-NO_3^-/mg\ S-SO_4^{-2}$ )

$\mu_N$ : velocidade específica de consumo de nitrato ( $mg\ N-NO_3^-.(gSSV.d)^{-1}$ )

$\mu_s$ : velocidade específica de produção de sulfato ( $mg\ S-SO_4^{-2}.(gSSV.d)^{-1}$ )