UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
ESCOLA DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA SALINIDADE NA NITRIFICAÇÃO BIOLÓGICA

Dissertação de Mestrado

Alyne Moraes Costa

Rio de Janeiro
Agosto 2014

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA SALINIDADE NA NITRIFICAÇÃO BIOLÓGICA

Alyne Moraes Costa

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Orientadora:

Juacyara Carbonelli Campos, D.Sc.

Rio de Janeiro
Agosto 2014

Alyne Moraes Costa

Título: AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA SALINIDADE NA NITRIFICAÇÃO BIOLÓGICA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRJ, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Mestre em Ciências (M.Sc.).

Aprovada em 20 de agosto de 2014.

Examinada por:

_____
Juacyara Carbonelli Campos, D.Sc.
EQ/TPQB/UFRJ (Orientadora)

_____
Daniele Maia Bila, D.Sc.
UERJ

_____
Fabiana Valéria da Fonseca, D.Sc.
EQ/TPQB/UFRJ

_____
Ysrael Marrerro Vera, D.Sc.
CETEM

Costa, Alyne Moraes
C837a Avaliação da influência da salinidade na nitrificação biológica / Alyne Moraes Costa. -- Rio de Janeiro, 2014.
97 f.

Orientadora: Juacyara Carbonelli Campos.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2014.

1. Nitrificação de efluentes salinos. 2. Lodos ativados. 3. Respirometria. I. Campos, Juacyara Carbonelli , orient. II. Título.

Dedico esta dissertação primeiramente a Deus,
a minha família, ao meu noivo e de modo especial ao
meu avó Jorge (*in memorian*).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo dom da vida e por conseguir ultrapassar todos os obstáculos que me tornaram cada vez mais forte para continuar em minha caminhada.

Aos meus pais, por todo amor e dedicação dados a mim durante toda a minha vida, os quais sempre me apoiaram nos momentos difíceis e torceram verdadeiramente por esta realização.

A minha avó Maria Augusta e avô Jorge (*in memorian*), por serem meus exemplos e por estarem sempre rezando e torcendo pela minha vitória.

A minha família, por todo amor, confiança e incentivo que nunca me faltaram durante a vida.

Ao meu noivo Gabriel, por todo amor, paciência e companheirismo nesta etapa de minha vida.

A minha orientadora Dr. Juacyara Carbonelli Campos, pela oportunidade da realização desta pesquisa e por toda dedicação e amizade que confiou a mim.

Ao Engenheiro Nei Marcos Grimaldi (CEMPES/ PETROBRAS) pela realização da automação do sistema de respirometria, que foi de grande importância para o desenvolvimento desta pesquisa.

A todos os laços de amizade que eu criei durante o período do mestrado durante as disciplinas e a todos do Labtare, pelo acolhimento e amizade.

Enfim, agradeço a todos que diretamente ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

RESUMO

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA SALINIDADE NA NITRIFICAÇÃO BIOLÓGICA

Alyne Moraes Costa

A indústria do petróleo é responsável pela geração de grandes volumes de efluentes residuais salinos. A água de produção do petróleo, derivada do processo de extração, apresenta em sua composição compostos orgânicos e inorgânicos, e principalmente sais. O tratamento biológico para a remoção de compostos orgânicos apresenta-se como um método tradicional e de baixo custo, se comparado ao tratamento físico-químico. No entanto, devido à toxicidade que elevadas concentrações salinas geram aos micro-organismos, o tratamento biológico de efluentes residuais salinos, ainda é considerada por muitos, um desafio. A nitrificação biológica de efluentes salinos foi investigada operando em sistema contínuo, a partir de um efluente sintético, contendo 152,44 mg/L de NAT. A técnica de respirometria foi utilizada como uma ferramenta para avaliação da atividade da biomassa nitrificante, na presença de diferentes concentrações de íon cloreto. Os testes com a adição de íon cloreto foram realizados nas concentrações de 100, 250, 500, 1.000, 2.000, 4.000, 8.000, 10.000 e 15.000 mg Cl^-/L. A partir dos resultados dos testes de respirometria verificou-se que ambas as taxas de consumo de oxigênio (OUR) e de consumo especifico de oxigênio (SOUR), aumentaram significantemente até a concentração salina de 1.000 mg Cl^-/L, o que significa que até esta concentração, o íon cloreto não apresentou-se tóxico em relação a biomassa nitrificante. No entanto, com o aumento gradual da concentração salina, a partir da concentração 2.000 mg Cl^-/L até a concentração de 15.000 mg Cl^-/L, resultou na queda dos valores do consumo de oxigênio, ou seja, ocorrendo a redução da atividade metabólica da biomassa com a queda da atividade celular. A máxima eficiência de nitrificação em sistema contínuo foi de 65,18%, sendo verificada em aproximadamente 90 dias de experimento, no biorreator operando com 1.000 mg Cl^-/L. O aumento da concentração de cloreto após 1.000 mg Cl^-/L favoreceu a redução dos valores de eficiência, sendo que o menor valor obtido foi de 5,58%, quando a concentração encontrava-se em 15.000 mg Cl^-/L. No entanto, quando a concentração de 15.000 mg Cl^-/L foi reduzida para 8.000 mg Cl^-/L, que corresponde o 10° regime testado, foi verificado o aumento da taxa de consumo de oxigênio pela biomassa. Este aumento indica que a biomassa mesmo após sofrer uma forte redução da taxa metabólica, a redução da concentração salina favoreceu o aumento da atividade celular, ou seja, o efeito inibitório verificado com a concentração salina de 15.000 mg Cl^-/L, apresentou-se reversível. Estes resultados evidenciam que a técnica de respirometria apresentou-se uma ferramenta eficaz e segura para a avaliação da toxicidade da biomassa do lodo ativado. Sendo capaz de detectar a queda da atividade celular na presença de compostos tóxicos, como o íon cloreto.

ABSTRACT

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA SALINIDADE NA NITRIFICAÇÃO BIOLÓGICA

Alyne Moraes Costa

The oil industry is responsible for generating large volumes of saline wastewater effluents. The produced water of oil, derived from the extraction process, presents in its composition organic and inorganic compounds, especially salts. The biological treatment for removing organic compounds is presented as a traditional and inexpensive method, as compared to the physical-chemical treatment. However due to toxicity that high salt concentration generates to the micro-organisms, the biological treatment of saline wastewater is still considered a challenge. Biological nitrification of saline effluent was investigated in a continuous operating system from a synthetic effluent, containing 152,44 mg NAT/L. The technique of respirometry was used as a tool to evaluate the activity of nitrifying biomass in the presence of different concentrations of chloride. Tests with addition of chloride were carried out at concentrations of 100, 250, 500, 1.000, 2.000, 4.000, 8.000, 10.000 and 15.000 mg Cl^-/L. From the results of respirometry tests was verified that both the rates of oxygen consumption (OUR) and specific oxygen consumption (SOUR), increased significantly until the salt concentration of 1.000 mg Cl^-/L, which means that even this concentration, the chloride did not show up as toxic in relation to the nitrifying biomass. However, with the gradual increase of saline concentration, from the concentration of 2.000 mg Cl^-/L till 15.000 mg Cl^-/L, resulted in the decrease in the values of oxygen consumption, consequently occurring the reduction of metabolic activity of biomass with decreased cellular activity. The maximum efficiency of nitrification in the continuous system was 65,18 %, which occurred in about 90 days of the experiment, in the bioreactor operating at 1.000 mg Cl^-/L. The increase of chloride concentration after the concentration of 1.000 mg Cl^-/L, favored the reduction of the efficiency values, and the lowest value was 5,58 % when the concentration was in 15.000 mg Cl^-/L. However, when the concentration of 15.000 mg Cl^-/L was reduced to 8.000 mg Cl^-/L, which corresponds to the 10th cycle was found to increase the rate of consumption of oxygen by the biomass. This increase indicates that the biomass even after suffering a sharp reduction of the metabolic rate, the reduction of the salt concentration favored the increase of cellular activity and the inhibitory effect observed at the salt concentration of 15.000 mg Cl^-/L, presented reversible. These results show that the respirometry technique has presented a safe and effective tool for evaluating the toxicity of the biomass of activated sludge. Being able to detect the decrease of cellular activity in the presence of toxic compounds, such as chloride.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produção mundial de água de produção do petróleo..... 18
Figura 2. Representação do funcionamento do processo de lodo ativado..... 23
Figura 3. Representação do processo metabólico oxidativo..... 25
Figura 4. Etapas do crescimento microbiano.....26
Figura 5. Composição do floco biológico em sistemas de lodos ativados.....27
Figura 6. Microscopia do lodo ativado..... 28
Figura 7. Curva da atividade biológica em efeito a presença de sais.....31
Figura 8. Reações do ciclo biológico do nitrogênio.....33
Figura 9. *Nitrossomonas sp*..... 36
Figura 10. *Nitrobacter sp*..... 37
Figura 11. Esquema de inibição da nitrificação com o acúmulo de nitrito..... 40
Figura 12. Montagem de um ensaio de respirometria.....48
Figura 13. Representação gráfica da taxa de consumo de oxigênio (OUR)..... 49
Figura 14. Dimensões do reator..... 54
Figura 15. Componentes do sistema contínuo..... 55
Figura 16. Aparelho de medição de OD acoplado ao computador..... 59
Figura 17. Sistema de microscopia com câmera acoplada ao computador..... 61
Figura 18. Concentração de nitrogênio amoniacal (NAT) e nitrato ($N\text{-}NO_3^-$) de saída do reator durante o período de aclimatação em sistema em batelada..... 64
Figura 19. Concentração de nitrogênio amoniacal (NAT) e nitrato ($N\text{-}NO_3^-$) de saída do reator durante o período de aclimatação em biorreator contínuo.....66
Figura 20. Concentração de saída de NAT para cada regime salino operando em sistema contínuo.....67
Figura 21. Concentração de saída de $N\text{-}NO_3^-$ para cada regime salino operando em sistema contínuo.....68
Figura 22. Eficiência da oxidação de nitrogênio amoniacal durante o período de operação dos regimes salinos.....70
Figura 23. Concentração de sólidos presentes durante o período experimental.....73
Figura 24. Microscopia do lodo ativado na concentração salina de 1.000 mg/L.....75
Figura 25. Protozoários encontrados durante os regimes salinos.....76
Figura 26- Protozoário do gênero *Thuricola* (aumento 200x)..... 77
Figura 27. Espécie de Rotífero (aumento 200x), regime 1.000 mg Cl^-/L..... 78
Figura 28. Alga *Spirulina sp.* (aumento 100x), regime 250 mg Cl^-/L..... 78
Figura 29. Taxa de consumo específico de oxigênio (SOUR) durante os regimes salinos.....81
Figura 30. Resultados da Taxa de consumo específico de oxigênio (SOUR) em relação à concentração de íon cloreto presente no biorreator.....83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização da água de produção proveniente da extração do petróleo em diferentes países.....19

Tabela 2. Avaliação da toxicidade de águas residuais e a sua comparação com a concentração de allylthiourea.....41

Tabela 3. Compostos inibitórios do processo de nitrificação (CI_{50}) em sistemas de lodos ativados..... 42

Tabela 4. Composição do meio sintético.....52

Tabela 5. Composição da solução nutriente.....52

Tabela 6. Concentrações de íon cloreto adicionado ao sistema contínuo..... 57

Tabela 7. Métodos analíticos utilizados no monitoramento do reator biológico..... 58

Tabela 8. Resultados da Correlação de Pearson entre a adição salina e valores de NAT e NO_3^- 71

Tabela 9. Resultados das microscopias realizadas durante os regimes salinos.....74

Tabela 10. Valores da taxa de consumo de oxigênio (OUR) e de consumo específico de oxigênio (SOUR), para cada concentração salina testada.....79

Tabela 11. Valores de concentração de biomassa nitrificante (X_n), taxa de nitrificação (r_n) e taxa de crescimento máximo das nitrificante (μ_m) para cada regime salino testado..... 80

Tabela 12. Resultados da Correlação de Pearson entre a adição salina e valores de SOUR..... 82

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

μ: Taxa de crescimento da biomassa (d^{-1})

A/M: Relação alimento/micro-organismo

AMO: Enzima amônia monooxigenase

AOB: Bactérias oxidantes de amônia

ATCC: *American Type of Culture Colletion*

ATU: Allylthiourea

Bq/L: unidade de radioatividade (Becquerel/L)

CETESB: Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CI_{50}: Concentração de inibição responsável pelo efeito de 50%

Cl^-: Cloreto

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente.

DBO: Demanda bioquímica de oxigênio (mg/L)

DBO_5: Demanda bioquímica de oxigênio obtida em 5 dias de teste

DDGE: *Denaturing Gradient gel electrophoresis* (Eletroforese em gel com gradiente de desnaturantes)

DQO: Demanda química de oxigênio (mg/L)

FISH: *Fluorencence in situ hybridization* (Hibridização fluorescente in situ)

NaCl: Cloreto de sódio

NOB: Bactérias oxidantes de nitrito

NH_3: Amônia livre (mg/L)

NAT: Concentração de nitrogênio amoniacal total (mg/L)

NO_2^-: Concentração de nitrito (mg/L)

NO_3^-: Concentração de nitrato (mg/L)

O&G: Óleos e graxas (mg/L)

OD: Oxigênio dissolvido (mg/L)

OGP: *Oil & Gas Producers*

OUR: Oxygen Uptake Rate (mg $O_2.L^{-1}.\ d^{-1}$)

pH: Potencial hidrogênionico

RBS: Reator em batelada sequenciais

SOUR: Specific Oxygen Uptake Rate (mg $O_2.\ d^{-1}$.mg SSV^{-1})

SST: Sólidos suspensos totais (mg SST/L)

SSV: Sólidos suspensos voláteis (mg SSV/L)

TRH: Tempo de retenção hidráulica (h)

Xn: Concentração de bactérias autotróficas (mg/L)

R_n: Taxa de nitrificação (mg/L/d)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 13
2 OBJETIVOS..... 15
2.1 Objetivo Geral..... 15
2.2 Objetivos Específicos..... 15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 16
3.1 EFLUENTES SALINOS..... 16
3.1.1. Água de produção de petróleo..... 17
3.2 TRATAMENTO BIOLÓGICO..... 22
3.2.1 Lodos ativados..... 22
3.2.1.1 Metabolismo e cinética de crescimento dos micro-organismos.....25
3.2.1.2 Micro-organismos presentes no lodo ativado..... 27
3.2.1.3 Influência das variáveis ambientais sobre os micro-organismos.....30
3.2.2 Efeito da salinidade em sistemas de lodos ativados..... 31
3.3 REMOÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO..... 33
3.3.1 Nitrificação biológica.....35
3.3.2 Fatores que influenciam na nitrificação.....37
3.3.3 Fatores tóxicos ou inibitórios do processo de nitrificação..... 39
3.3.4. Estudos sobre nitrificação de efluentes salinos.....43
3.4. A UTILIZAÇÃO DA RESPIROMETRIA PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA BIOMASSA NITRIFICANTE..... 47
4 MATERIAIS E MÉTODOS..... 51
4.1 SELEÇÃO E CULTIVO DA BIOMASSA NITRIFICANTE..... 51
4.1.1 Etapa preliminar: sistema em batelada..... 51
4.1.2 Biorreator em sistema contínuo..... 53
4.2 ADIÇÃO DE ÍON CLORETO (Cl^-) AO SISTEMA PARA A VERIFICAÇÃO DA NITRIFICAÇÃO..... 56
4.3 METODOLOGIA ANALÍTICA..... 57
4.3.1 Teste de respirometria para a avaliação da toxicidade.....59
4.3.2 Microscopia ótica da biomassa.....60
4.4 PROCEDIMENTOS DE CÁLCULOS..... 61
4.4.1 Eficiência de oxidação de nitrogênio amoniacal.....61

4.4.2 Balanço de Nitrogênio.....62
4.4.3 Coeficientes cinéticos.....62
4.4.4 Testes estatísticos.....63
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 64
5.1 TESTES DE SELEÇÃO E CULTIVO DA BIOMASSA NITRIFICANTE..... 64
5.1.1 Sistema em batelada.....64
5.1.2 Biorreator em sistema contínuo.....65
5.2 TESTES COM ADIÇÃO DE CLORETO AO SISTEMA PARA A AVALIAÇÃO DA NITRIFICAÇÃO..... 66
5.3 AVALIAÇÃO DA BIOMASSA..... 72
5.3.1 Concentração de sólidos.....72
5.3.2 Microscopia ótica da biomassa.....73
5.4 TESTES DE RESPIROMETRIA PARA A VERIFICAÇÃO DA TOXICIDADE DE ÍON CLORETO..... 79
5.4.1 Aplicação de modelo estatístico para a determinação da inibição total da atividade celular utilizando dados de respirometria.....83
6 CONCLUSÃO..... 85
7 REFERÊNCIAS..... 87

1. INTRODUÇÃO

A água é um componente vital para todas as formas de vida. A sua escassez e contaminação, tornou-se um dos maiores desafios enfrentados nos dias atuais. Com o aumento das atividades industriais, grandes quantidades de água são utilizadas em diferentes processos, e consequentemente, grandes volumes de efluentes residuais são gerados mundialmente. Devido a sua alta complexidade, os efluentes residuais são capazes de ocasionar danos irreversíveis a biodiversidade aquática. Logo, o tratamento de águas residuais tornou-se uma tarefa indispensável, como forma de minimizar impactos ao meio ambiente, além de possibilitar o reúso de efluentes.

Os efluentes residuais contendo altas concentrações de sais são produzidos em diferentes ramos industriais, como: no processamento de alimentos, na produção de químicos, no curtume e na indústria do petróleo (LEFEBVRE; MOLETTA, 2006). No entanto, a indústria do petróleo destaca-se como a maior produtora de efluentes residuais salinos, possuindo concentrações de sais que ultrapassam a concentração da água do mar.

A alta salinidade de efluentes residuais da indústria do petróleo é proveniente da etapa de extração, onde grande quantidade de água de produção, contendo uma mistura de compostos orgânicos e inorgânicos, e principalmente sais, é retirada juntamente com o petróleo em seu estado bruto. Devido a sua composição complexa, diferentes tratamentos são aplicados a água de produção, como: métodos físicos, físico-químicos e/ou biológicos.

O tratamento biológico destaca-se como um tratamento tradicional e de baixo custo para a remoção de nutrientes, em relação aos métodos físico-químicos. No entanto, o tratamento biológico de efluentes residuais salinos é considerado por muitos um desafio, devido à alta sensibilidade dos micro-organismos a elevadas concentrações de sais.

Os compostos nitrogenados estão entre os maiores poluentes encontrados em águas residuais. A sua remoção é necessária, a fim de evitar danos ao ambiente aquático, como: depleção de oxigênio dissolvido e eutrofização (GERARDI, 2002). No Brasil, a resolução CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) n° 430 de 13 de maio de 2011, determina que a concentração máxima de nitrogênio amoniacal seja de 20 mg N/L, para o lançamento de efluentes residuais em corpos receptores (BRASIL, 2007).

A remoção biológica convencional de nitrogênio amoniacal é realizada em duas etapas, denominadas de nitrificação e desnitrificação. A nitrificação biológica é um processo caracterizado pela oxidação de nitrogênio amoniacal a nitrato, por ação de micro-organismos. Altos valores de eficiência são obtidos no processo de nitrificação biológica, entretanto, como

se trata de um processo que envolve a participação de micro-organismos, estes valores são diretamente influenciados pelas variáveis ambientais e pela presença de compostos tóxicos.

A presença de sais, como por exemplo, o íon cloreto, possui a capacidade de reduzir o metabolismo celular das bactérias nitrificantes, consequentemente, reduzindo a eficiência da oxidação de nitrogênio. Logo, a utilização de ferramentas para a verificação da toxicidade da biomassa nitrificante é de extrema importância, pois o decréscimo da eficiência de nitrificação pode ser rapidamente verificado pelo baixo consumo de oxigênio pela biomassa. A técnica de respirometria caracteriza-se pela sua simplicidade e pela rapidez de obtenção de resultados de toxicidade, sendo utilizada com grande frequência em sistemas de lodos ativados.

Esta dissertação de mestrado trata-se de um estudo experimental que teve como objetivo principal avaliar a atividade da biomassa nitrificante em diferentes concentrações salinas, operando em biorreator contínuo. E como objetivos específicos, verificar o desempenho do reator em batelada e do reator contínuo na seleção da biomassa nitrificante, avaliar o efeito da salinidade na eficiência da nitrificação biológica, caracterizar o consórcio microbiano do lodo ativado atuante durante os regimes salinos e investigar as respostas da técnica de respirometria como forma de identificar efeitos tóxicos à biomassa nitrificante.

Esta dissertação é constituída de 7 capítulos. O capítulo 2 refere-se aos objetivos desta pesquisa. O capítulo 3 refere-se a revisão bibliográfica, no qual são apresentados alguns conceitos teóricos e citações sobre a temática de nitrificação biológica, a influência da salinidade no processo de oxidação de nitrogênio amoniacal a nitrato e a utilização da respirometria para a avaliação da toxicidade na biomassa nitrificante.

No capítulo 4 são apresentados os materiais e métodos, onde são descritos como foram realizados os experimentos de seleção e a aclimatação da biomassa nitrificante, as configurações do reator e os valores de variáveis utilizadas, os experimentos com a adição de diferentes concentrações de íon cloreto e os testes de avaliação da biomassa com o uso da respirometria e da microscopia ótica.

Os resultados e a discussão são apresentados em forma de Tabela e de Figuras, no capítulo 5. A conclusão dos resultados obtidos nesta dissertação é apresentada no capítulo 6. E as referências bibliográficas citadas neste trabalho são apresentadas no capítulo 7.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade da biomassa nitrificante em diferentes concentrações salinas, operando em biorreator contínuo.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar o desempenho do reator em batelada e do reator contínuo na seleção da biomassa nitrificante;
- Avaliar o efeito da salinidade na eficiência da nitrificação biológica;
- Caracterizar a consórcio microbiano do lodo ativado atuante durante os regimes salinos;
- Investigar as respostas da técnica de respirometria como forma de identificar efeitos tóxicos à biomassa nitrificante.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 EFLUENTES SALINOS

Com o crescimento das atividades industriais, o interesse sobre efluentes salinos vem aumentando desde as últimas décadas. Devido às exigências cada vez mais rígidas dos órgãos regulamentadores ambientais para o descarte de águas residuais, o tratamento de efluentes salinos tornou-se indispensável. Diversas técnicas de tratamento vêm sendo estudadas, mas a remoção de nutrientes, através de tratamento biológico em efluentes com alta concentração de sais, ainda é considerada por muitos, um desafio.

A produção de efluentes salinos é realizada por diferentes ramos industriais, tais como: o processamento de alimentos, a produção de químicos e fármacos (SHI et al., 2014), o curtume e a extração de petróleo (LEFEBVRE; MOLETTA, 2006). Estes efluentes além de apresentar alto teor de sais, também possuem um alto teor de matéria orgânica e de nutrientes (como o nitrogênio) em sua composição (SUDARNO; WINTER; GALLERT, 2011). Sendo capazes de gerar grandes danos ambientais, caso não tratados, como a contaminação do solo, da água superficial e subterrânea (LEFEBVRE; MOLETTA, 2006).

Os efluentes residuais nas indústrias de alimentos são gerados em grandes volumes, pois comparadas aos outros setores industriais, são as que mais utilizam água em seus processos. No setor de laticínios, o volume de água residual gerado é cinco vezes maior do que o volume de leite processado (STEHLIK, 2008). Segundo Stehlik (2008), os efluentes residuais de laticínios são grandes fontes poluidoras, devido apresentarem alta concentração de matéria orgânica, nitrogênio, fósforo e sais.

O sal é um dos aditivos utilizados com maior frequência nas indústrias alimentícias, devido ao seu baixo custo e suas propriedades de conservação e de intensificação de sabor (DESMOND, 2006). O cloreto de sódio (NaCl) é o sal destinado ao consumo humano, sendo utilizado em grandes quantidades para a conservação de carnes e vegetais, em laticínios e no processamento de frutos do mar (LEFEBVRE; MOLETTA, 2006).

O processamento de frutos do mar é responsável pela geração de grandes volumes de águas residuais, em seus diferentes processos, tais como: descongelamento, cozimento e conserva (VEIGA; MÉNDEZ; LEMA, 1994). Os efluentes residuais gerados são ricos em matéria orgânica, nitrogênio e sais (ANTILEO et al., 1997). Segundo Gharsallah et al. (2002) a concentração de íons cloreto nestes efluentes é superior a 30.000 mg/L.

No setor de fármacos são gerados efluentes residuais complexos, contendo componentes orgânicos e inorgânicos, apresentando alta concentração de matéria orgânica, sólidos suspensos e sais (SHI et al., 2014). Estudos de Shi et al. (2014) verificaram que a concentração do íon cloreto é de aproximadamente 13.500 mg/L em águas residuais provenientes da produção de antibióticos.

Nas indústrias de processamento do couro, os efluentes salinos são gerados devido à imersão dos couros e peles em água fresca para a remoção do excesso de sal (SIVAPRAKASAN et al., 2008). Os efluentes residuais gerados no processo contêm alto teor de matéria orgânica, sólidos suspensos e principalmente alta salinidade com concentrações que variam de 15.000 a 30.000 mg/L de cloreto (SUNDARAPANDIYAN et al., 2010).

Nas indústrias de petróleo, os efluentes salinos são provenientes da etapa de extração do petróleo. A água de produção representa o maior volume de efluente residual da indústria de petróleo e gás, sendo produzida juntamente ao petróleo bruto em plataformas *onshore* e *offshore* (TELLEZ; NIRMALAKHANDAN; GARDEA-TORRESDEY, 2002). A quantidade de água extraída é variável, pois dependerá das características dos reservatórios e do tempo de exploração (*Oil & Gas Producers* - OGP, 2005). Segundo Flynn, Butler e Vance (1996), a água de produção do petróleo é conhecida por apresentar uma alta salinidade, podendo ser três vezes maior que a concentração encontrada na água do mar. Estudos de Campos et al. (2002a) verificaram que a água de produção de petróleo é um efluente hipersalino, contendo entre 40.000 a 55.000 mg/L de íon cloreto.

Visto que a indústria do petróleo é a maior produtora de águas residuais altamente salinas, será caracterizado melhor este efluente, desde a sua origem até a aplicação de tratamentos biológicos necessários para o seu descarte final ou reúso industrial.

3.1.1 Água de produção de petróleo

As atividades de extração de petróleo e gás são acompanhadas de um volume significativo de água, que tende aumentar com o passar dos anos. O volume global da água de produção é estimado em torno de 250 milhões de barris diariamente, para a obtenção de 80 milhões de barris de óleo por dia (FAKHRU´L-RAZI et al., 2009). Resultando na proporção de 3:1, ou seja, o volume de água produzida é três vezes maior que o volume obtido de óleo.

As propriedades físicas e químicas, assim como o volume de água podem variar consideravelmente, com a localização geográfica do campo, a formação geológica, o tipo de hidrocarboneto produzido e o tempo de vida do reservatório (CLARK; VEIL, 2009).

Segundo Clark e Veil (2009), no início das atividades de exploração o reservatório é jovem, logo, a produção de petróleo tende a ser alta e a produção de água é baixa. No entanto, com o passar do tempo e o avanço da idade de produção, a extração do petróleo tende a diminuir e a quantidade de água aumentar, nesta etapa o custo do gerenciamento da água de produção pode exceder o lucro obtido com o petróleo e com isso a produção deverá ser encerrada, levando ao fechamento do poço (CLARK; VEIL, 2009).

Na Figura 1 pode-se visualizar o montante mundial de água de produção em atividades *onshore* e *offshore* obtidas na extração do petróleo e o seu aumento desde a década de 90 até os dias atuais.

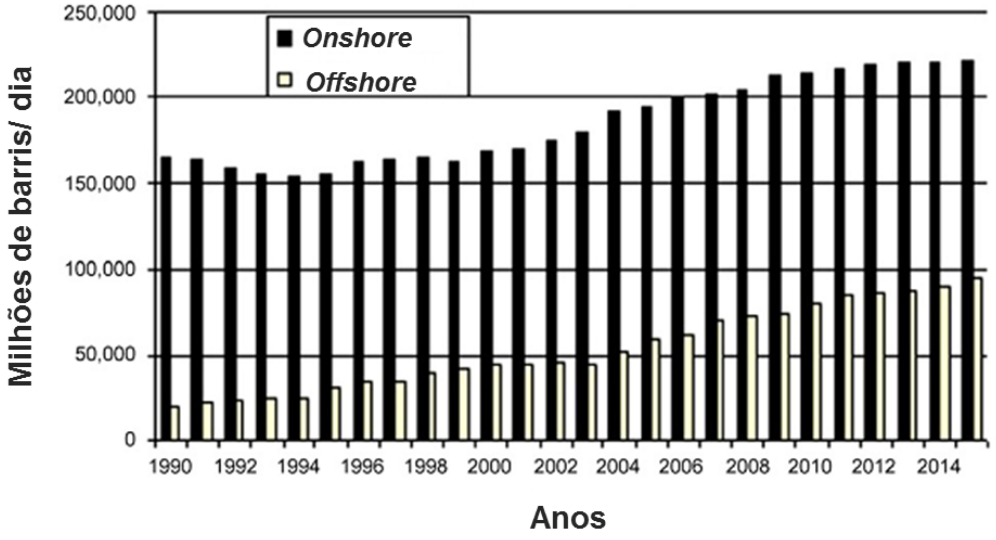

Figura 1- Produção mundial de água de produção do petróleo. Fonte: DAL FERRO; SMITH, (2007).

A água derivada da extração do petróleo possui várias denominações, tais como: água de formação, água de produção, água associada ao petróleo ou salmoura (WOODALL et al., 2001).

As águas de formação são originadas naturalmente em rochas, em formações subterrâneas, associadas à extração de petróleo e gás (FAKHRU´L-RAZI et al., 2009). A denominação de água de produção é dada a toda água associada à extração, englobando as que são naturalmente encontradas nos poços e as águas que são injetadas dentro dos reservatórios, para a manutenção da pressão e da taxa de extração do óleo (HENDERSON et al., 1999).

A água de produção é caracterizada como uma mistura de compostos orgânicos e inorgânicos, contendo basicamente óleos dissolvidos e dispersos, graxas, metais pesados,

compostos químicos derivados dos aditivos da água de injeção, materiais naturalmente radioativos, gases dissolvidos, sólidos dissolvidos e principalmente sais (IGUNNU; CHEN, 2012; CLARK; VEIL, 2009). Na Tabela 1 pode-se visualizar a composição química da água de produção de diferentes reservatórios.

Tabela 1- Caracterização da água de produção proveniente da extração do petróleo em diferentes países

Parâmetros	**Concentrações**		
	Turquia (1)	**Brasil** (2)	**China** (3)
pH	7,85-7,87	6,3-7,2	6,5
O&G (mg/L)	472	200-240	-
DBO (mg/L)	7.000	695	4.590
DQO (mg/L)	24.500	1.300-2.900	5.800
NAT (mg/L)	2,4	-	6,5
Fenol (mg/L)	10,0	4,1-4,5	-
Na^+ (mg/L)	3.165	-	11.800
Cl^- (mg/L)	3.199	40.000-55.000	15.400
SO_4^{-2} (mg/L)	355	-	450
Cromo (mg/L)	1,75	<0,2	-
Ferro (mg/L)	30	-	7,6
Zinco (mg/L)	2,22	0,4	-
Cálcio (mg/L)	-	769	2.250
Sólidos Dissolvidos Totais (mg/L)	-	77.800-81.700	34.030
Sólidos Suspensos Totais (mg/L)	-	120-220	210

Fonte: Adaptado de ÇAKMAKCE; KAYAALP; KOYUNCU (2008) (1), CAMPOS et al. (2002a) (2) e MA; WANG (2006) (3).

Segundo Fakhru´l-Razi et al. (2009) em águas de produção, os óleos dissolvidos e dispersos constituem uma mistura de hidrocarbonetos, contendo benzeno, tolueno, etilbenzeno, xileno (BTEX), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) e fenóis. Sendo, os mais abundantes os compostos BTEX, encontrados em concentrações de até 600 mg/L (NEFF; LEE; DE BLOIS, 2011). A concentração de hidrocarbonetos policíclicos encontram-se na faixa de 0,040 a 3 mg/L (NEFF; LEE; DE BLOIS, 2011) e os fenóis são encontrados na concentração de 0,009 a 23 mg/L (FAKHRU´L-RAZI et al., 2009).

Os óleos e graxas são encontrados em abundância em águas de produção. Segundo Çakmakce, Kayaalp e Koyuncu (2008), as concentrações de óleos e graxas podem ser até 100 vezes superior à concentração permitida de 10 mg/L para o despejo em corpos hídricos na Turquia. A alta concentração de hidrocarbonetos presentes na água de produção é capaz de afetar diretamente o ecossistema marinho, caso não tenha sido realizado nenhum tipo de tratamento. No Brasil, as exigências determinadas pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) estabelece na Resolução n° 393, de 08 de agosto de 2007 (BRASIL, 2007), que

o limite para o descarte de óleos e graxas de águas produzidas, deve compreender uma média mensal de 29 mg/L e o máximo diário de 42 mg/L.

Os metais encontrados na água de produção estão presentes dissolvidos ou na forma de micropartículas. Os metais comumente encontrados em altas concentrações são: bário, ferro, manganês, mercúrio e zinco (NEFF; RABALAIS; BOECH, 1987). Azetsu-Scott e colaboradores (2007) estudaram a presença de metais pesados em águas de produção da província de Nova Escócia no Canadá, no período de agosto de 1998 a junho de 1999. E verificaram em seus experimentos que a concentração de metais encontrada nas amostras foi bastante elevada, sendo até 50.000 vezes maior do que a concentração encontrada nas águas do mar. As concentrações de metais seguiram a seguinte ordem: Zinco (Zn)> Ferro (Fe)> Cobre (Cu)> Manganês (Mn)> Chumbo (Pb). Em comparação, com estudos de Dórea et al. (2007) realizados com a água de produção do petróleo do Estado de Sergipe, Brasil, detectaram que o Fe foi o único metal encontrado em alta concentração (média de 4.540 mg/L). Enquanto, os outros metais como, por exemplo: Zn, Cu e Pb foram encontrados em concentrações próximas a água do mar (DÓREA et al., 2007).

A adição de químicos é comumente realizada durante a produção de petróleo, alguns aditivos são injetados no reservatório em operações *offshore*, com o objetivo de prevenir ou tratar problemas operacionais (HENDERSON et al., 1999). A maioria das plataformas utiliza mais de um tipo de aditivo químico, com diferentes propósitos, como: inibir a corrosão, evitar a formação de espuma, auxiliar no processo de separação de água e óleo, inibir o crescimento bacteriano (*fouling*), entre outros (KELLAND, 2009). De acordo com Veil et al. (2004), a presença de aditivos químicos na água de produção é baixa, em torno de 0,1 mg/L.

Segundo Kraemer e Reid (1984), a presença de materiais naturalmente radioativos é encontrada comumente em águas de produção em várias partes do mundo. Os radioisótopos são encontrados em pequenas concentrações, principalmente nas formas de Rádio-226 (Ra^{226}) e de Rádio-228 (Ra^{228}) (KRAEMER; REID, 1984). Estes membros são provenientes do decaimento do Urânio e do Tório, que são encontrados naturalmente associados aos minerais de argila e areias de quartzo presentes nos reservatórios (NEFF; RABALAIS; BOECH, 1987). Estudos de Vegueira, Godoi e Miekeley (2002) analisaram a presença de radioisótopos em águas de produção provenientes da Bacia de Campos, localizada no Estado do Rio de Janeiro. Em seus resultados, os elementos como o Ra^{226} e Ra^{228} foram encontrados na faixa de 0,012-6,0 Bq/L e <0,05-12,0 Bq/L, respectivamente.

Os gases dissolvidos são encontrados naturalmente em águas de produção do petróleo, seja por atividade bacteriana, ou devido às reações químicas (IGUNNU; CHEN, 2012). Os

gases geralmente encontrados são: gás natural (metano, etano, propano e butano), sulfeto de hidrogênio, dióxido de carbono e oxigênio (STEWART; ARNOLD, 2011).

De acordo com Stewart e Arnold (2011), os sólidos são encontrados em grandes quantidades na água de produção, seja na sua forma dissolvida ou suspensa. A presença de sólidos suspensos consiste em pequenas partículas de areia, argila, sais precipitados e produtos de corrosão, como o óxido de ferro e carbonato de ferro (STEWART; ARNOLD, 2011). A maioria dos compostos inorgânicos solúveis são os sais inorgânicos, como o cloreto de sódio (NaCl) (STEWART; ARNOLD, 2011).

A predominância de sais dissolvidos na água de produção muitas vezes excede a concentração de sais presentes na água do mar (LEFEBVRE; MOLETTA, 2006). Logo, a mesma é considerada uma salmoura, com concentrações de sais que variam de 100 mg/L até a faixa de 300.000 mg/L (TELLEZ; NIRMALAKHANDAN; GARDEA-TORRESDEY, 2002).

Segundo Tellez (1991), a concentração de sólidos dissolvidos na água de produção em grande parte (aproximadamente 80%) é constituída de NaCl. O íon cloreto é naturalmente encontrado em rochas, solos e com abundância em áreas costeiras, onde ocorre intrusão de água salgada (METCALF; EDDY, 2003). Em estudos realizados por *Oil & Gas Producers* (OGP, 1994) foi verificado que na água de produção mundial encontra-se a predominância do íon cloreto em relação aos outros componentes inorgânicos, sendo encontrado na concentração média de 60.874 mg/L.

Na grande maioria, as concentrações de compostos orgânicos e inorgânicos (principalmente os sais) presentes na água de produção, excedem o padrão permitido pela legislação ambiental para o descarte. Segundo Çakmakce, Kayaalp e Koyuncu (2008) toda a água produzida que não for destinada a reinjeção no poço (em torno de 5% do total extraído), deverá passar por um sistema de tratamento para atender os padrões de descarte em águas superficiais.

No tratamento da água de produção várias técnicas são aplicadas, pois não existe uma técnica universal que seja capaz de remover todos os compostos poluentes presentes na mesma. Segundo Lefebvre e Moleta (2006), o tratamento da água de produção é usualmente realizado através de métodos físicos, físico-químicos e biológicos.

A remoção de compostos orgânicos pode ser realizada através de tratamentos físico-químicos. Entretanto, este método consome muita energia e possui um alto custo (JANG et al., 2013). Em comparação, o tratamento biológico é um método tradicional e de baixo custo para a remoção de nutrientes (FAKHRU´L-RAZI et al., 2009). No entanto, efluentes salinos ainda representam um desafio para este tipo de tratamento.

3.2 TRATAMENTO BIOLÓGICO

O tratamento biológico é caracterizado pela ação de micro-organismos aeróbios e anaeróbios no processo de oxidação de matéria biodegradável e na remoção de nutrientes, como o nitrogênio e o fósforo (METCALF; EDDY, 2003). Um dos seus principais atributos é a capacidade de adaptação da biomassa diante das variáveis ambientais, como: temperatura, pH, níveis de oxigênio dissolvido e nutrientes (micro e macronutrientes) (SHAMMAS, LIU, WANG, 2009). Segundo Sant'anna Junior (2010), o monitoramento dos parâmetros ambientais é de extrema importância para garantir a eficiência deste sistema de tratamento.

Segundo Sharghi et al. (2013), a água de produção do petróleo possui a presença de diferentes compostos poluentes que são capazes de gerar toxicidade aos micro-organismos presentes nos sistemas biológicos, caso não estejam adaptados a tais condições. Os hidrocarbonetos, fenóis e cloreto são alguns exemplos dos compostos tóxicos encontrados neste efluente. Altas concentrações do íon cloreto são capazes de diminuir a atividade celular ou até mesmo reduzir drasticamente a biomassa, prejudicando a eficiência do tratamento biológico (KARGI; DINCER, 1996).

Em sistemas de tratamento biológicos aeróbicos são geralmente aplicadas técnicas como: lodos ativados, filtros biológicos e lagoas de oxidação (SELL, 1992). O sistema de lodos ativados é um dos tratamentos mais tradicionais e difundidos no mundo, devido a sua boa eficiência em tratar grandes volumes de efluentes, apresentando grandes vantagens, como: a elevada eficiência na remoção de DBO, a possibilidade de remoção biológica de nitrogênio e fósforo e a sua flexibilidade operacional (VON SPERLING, 1997). Segundo Metcalf e Eddy (2003), conhecer as características do afluente a ser tratado, assim como definir o objetivo do tratamento, como: a remoção de matéria orgânica, nitrogênio ou fósforo, é fundamental para determinar o design do sistema de lodos ativados, a fim de garantir a eficiência do processo.

3.2.1 Lodos ativados

No início do século XX, surgiu a necessidade de aumentar a eficiência do sistema de tratamento de águas residuais. Logo, nas primeiras décadas foi desenvolvido o tratamento biológico, com o objetivo de remover com maior eficiência o material orgânico (VAN HAANDEL; MARAIS, 1999). Em 1914, os pesquisadores Lockett e Arden descobriram que a aeração das águas do esgoto municipal levava a remoção de material orgânico e também

formavam flocos microbianos que podiam ser separados do efluente através de decantação simples, obtendo-se assim o lodo biológico (VAN HAANDEL; MARAIS, 1999).

No início de sua descoberta, o sistema era operado em regime de bateladas e com o passar do tempo, vários estudos sobre o assunto foram se multiplicando e com isso, surgiu a ideia de converter o original regime em bateladas em um regime contínuo, utilizando o tanque de aeração, o tanque de sedimentação e o sistema de reciclagem do lodo biológico (HENZE et al., 2008). E é assim atualmente, que o sistema de tratamento com lodos ativados ainda é operado, em sua grande maioria.

Na Figura 2 pode-se visualizar a esquemática do funcionamento do sistema de lodos ativados.

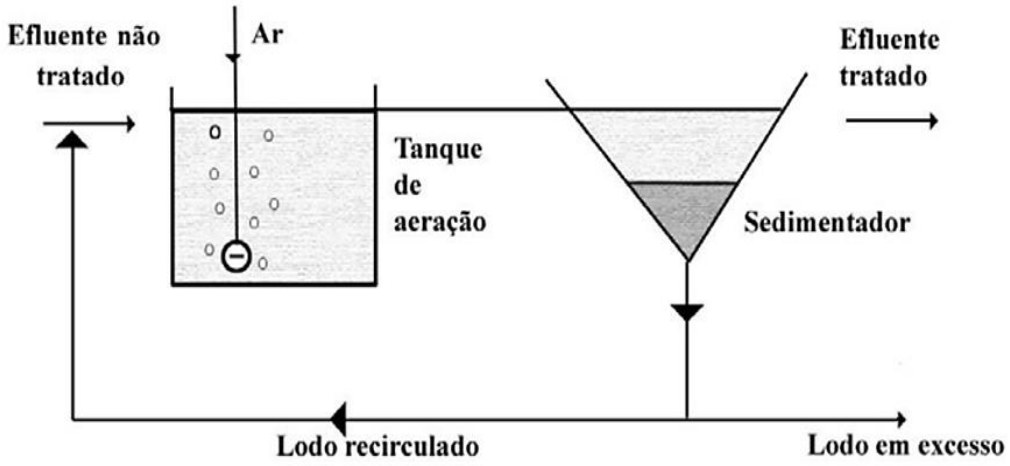

Figura 2-Representação do funcionamento do processo de lodos ativados. Fonte: CAMPOS, (2000).

No tanque de aeração ocorre a entrada contínua do afluente, contendo grandes fontes de nutrientes (orgânicos ou inorgânicos) que são necessários para o desenvolvimento da biomassa (HENZE et al., 2008). Nesse mesmo tanque é onde se encontram os micro-organismos que são mantidos em suspensão através da aeração, promovendo a degradação dos poluentes (SANT'ANNA JUNIOR, 2010). No processo de lodos ativados, a demanda de oxigênio é fundamental para os processos de síntese e de respiração da biomassa. Segundo Wang, Wu e Shammas (2009), o suplemento de oxigênio no tanque deverá ser mantido na concentração mínima de 1 a 2 mg/L de oxigênio dissolvido.

No sedimentador, ocorre a separação do efluente tratado e do lodo biológico. Como a biomassa possui características de formação de flocos, esta pode ser facilmente separada do efluente (VON SPERLING, 1997). O lodo separado no sedimentador pode ser reciclado e

enviado novamente para o tanque de aeração, permanecendo no sistema por mais tempo. Este tempo de retenção de sólidos é também conhecido, como: idade do lodo (VON SPERLING, 1997). A idade do lodo é um dos parâmetros vitais para a manutenção do bom funcionamento do sistema de lodo ativado. Segundo Von Sperling (1997), a idade do lodo deve variar entre 4 a 10 dias para os sistemas convencionais e de 18 a 30 dias para os sistemas de aeração prolongada.

O retorno do lodo sedimentado tem como propósito manter uma concentração suficiente de lodo no tanque de aeração, este período de residência é denominado de tempo de retenção hidráulica. Segundo Metcalf e Eddy (2003), o retorno do lodo pode ser calculado considerando os fatores, como: a sedimentabilidade, balanço de massa no sedimentador e no tanque de aeração.

A relação *A/M* (alimento/micro-organismo) constitui um dos parâmetros importantes que medem a razão entre o alimento proveniente do afluente e os micro-organismos presentes no tanque de aeração (JORDÃO; PESSÔA, 1995). Quando a carga de entrada de alimento no sistema for maior que o consumo realizado pela biomassa, a assimilação pelo substrato será menor e reduzida será a eficiência da remoção de matéria orgânica. Mas, se a carga de alimento que for introduzida no reator for menor, a assimilação será maior pelos micro-organismos e consequentemente mais eficiente será o sistema (VAN HAANDEL; MARAIS, 1999). A relação A/M assume valores de 70.000 a 150.000 $mgDBO_5/mgSSV.d$ para o sistema de lodos ativados de aeração prolongada (VON SPERLING, 1997).

Com a recirculação de sólidos ocorrerá o aumento da população microbiana dentro do reator. Logo, mais compostos serão oxidados e mais eficácia terá o sistema de tratamento (SANT'ANNA JUNIOR, 2010). No entanto, a concentração de sólidos no sistema deve ser estudada, evitando que exceda a um determinado valor máximo, a fim de garantir o funcionamento adequado do decantador de lodo, como separador de fases (VAN HAANDEL; MARAIS, 1999). O retorno do lodo será determinado através do balanço de massa, analisando a concentração de lodo presente no sedimentador e no tanque de aeração. Segundo Wang, Wu e Shammas (2009), em sistemas de lodos ativados convencionais a concentração ideal de sólidos suspensos no licor misto deverá está entre 1500-3000 mg/L.

A descarga do lodo em excesso ocorre quando o seu valor máximo de concentração for atingido. Com isso, o lodo de descarte passará por um processo de tratamento de estabilização e remoção de água, obtendo um produto sólido ou semi-sólido, que poderá ser utilizado na agricultura, ou então ser incinerado (VAN HAANDEL; MARAIS, 1999).

3.2.1.1 Metabolismo e cinética de crescimento dos micro-organismos

O lodo ativado é formado por um ecossistema complexo de micro-organismos. Estes são classificados de maneira geral em: seres autotróficos e heterotróficos. Segundo Henze et al. (2008), os organismos autotróficos são capazes de utilizar como fonte de carbono, o dióxido de carbono (CO_2), obtendo energia através da oxidação de compostos inorgânicos (quimiolitotróficos), ou pela captação de energia luminosa (fototróficos). Os organismos heterotróficos utilizam como fonte de carbono, o carbono orgânico, proveniente da degradação de moléculas orgânicas (HENZE et al., 2008).

As reações que compreendem a oxidação e a síntese do carbono (orgânico ou inorgânico) são denominadas de reações metabólicas. O processo metabólico é constituído basicamente de duas etapas, o catabolismo e o anabolismo. Segundo Van Haandel e Marais (1999), o catabolismo tem como objetivo oxidar o material orgânico e gerar energia para a reação anabólica e o anabolismo é responsável pela síntese de componentes estruturais celulares envolvidos no crescimento, construção e manutenção celular, obtendo a maior fração do metabolismo. O processo metabólico pode ser visualizado na Figura 3.

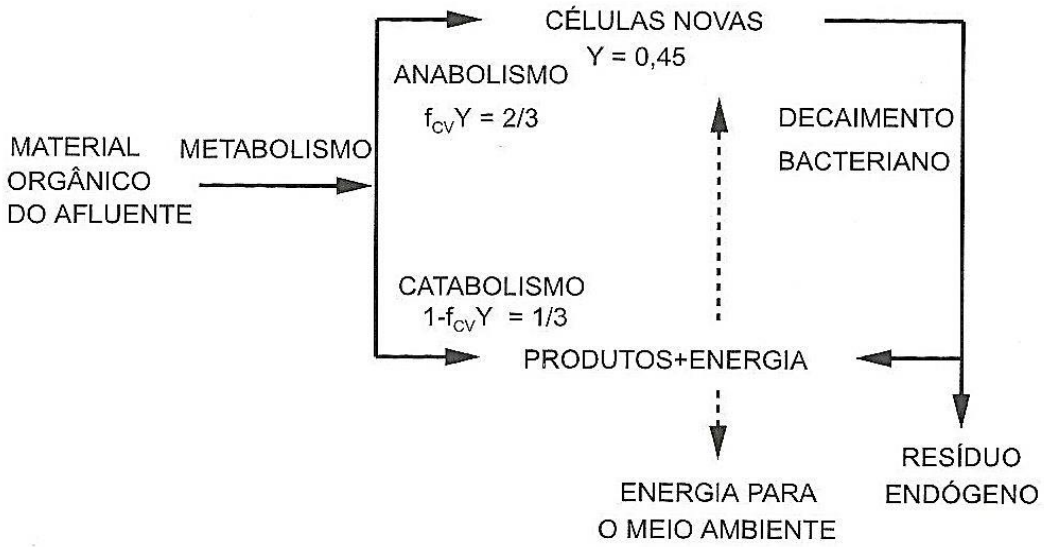

Figura 3- Representação do processo metabólico oxidativo realizado por micro-organismos. Fonte: VAN HAANDEL; MARAIS, (1999).

Legenda: $\mathbf{f_{cv}}$= representa a razão entre SSV/DQO (mgSSV/mgDQO) e **Y**= coeficiente de crescimento da biomassa (gSSV/gDQO).

A velocidade de crescimento varia de acordo com as espécies de micro-organismos presentes no lodo ativado, sendo influenciadas por diversas variáveis ambientais, além da

presença de substâncias inibidoras (VAN HAANDEL; VAN DER LUBBE, 2012). Somente em condições ambientais ótimas, a taxa de crescimento da biomassa atinge o seu valor máximo (VON SPERLING, 2007).

O crescimento microbiano passa por diferentes etapas ou fases como pode ser visualizado na Figura 4.

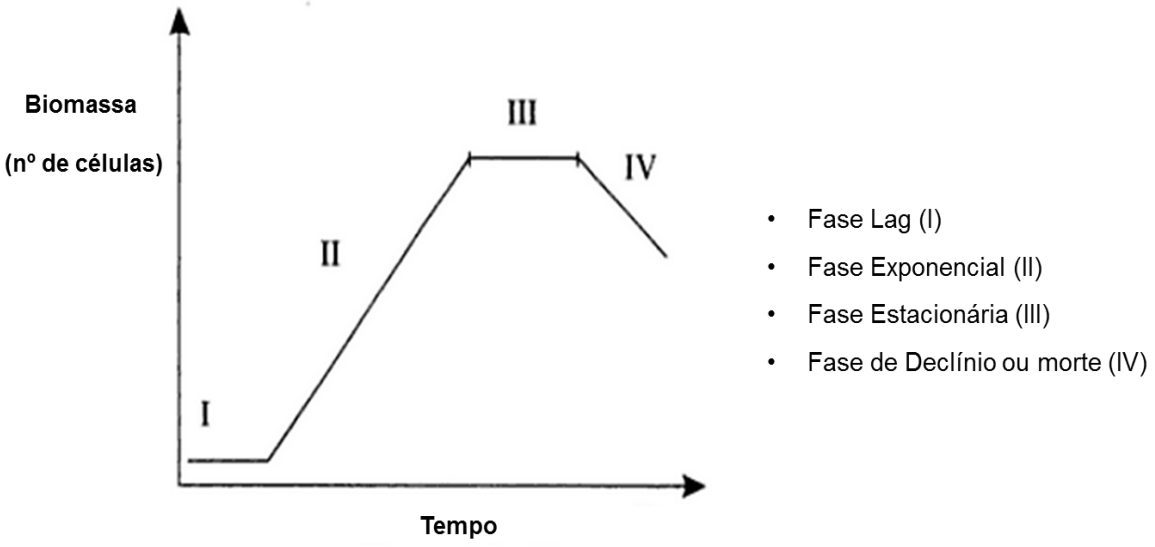

Figura 4- Etapas do crescimento microbiano. Fonte: Adaptado de INAMDAR, (2009).

Segundo Maier (2009), o crescimento microbiano compreende quatro fases, tais como:

- Fase Lag ou Fase de Adaptação (I): representa o início da adaptação dos micro-organismos às novas condições ambientais, não ocorrendo aumento na população microbiana. Logo, a velocidade de crescimento neste instante apresenta-se nula. Esta fase poderá ser estendida dependendo da idade e do tipo de inóculo.
- Fase Exponencial (II): inicia-se a fase de crescimento dos micro-organismos a uma velocidade máxima, devido à utilização do substrato que se apresenta abundante no meio. A taxa de crescimento exponencial irá variar de acordo com os parâmetros ambientais, assim como, a genética dos micro-organismos.
- Fase Estacionária (III): nesta fase, a velocidade de crescimento dos micro-organismos se reduz ao mínimo e a população permanece estagnada, devido ao esgotamento dos substratos necessários para o seu crescimento.
- E por fim, a Fase de declínio ou morte (IV), que é marcada pela diminuição da população, com a morte dos micro-organismos. Com isso, a velocidade de crescimento torna-se negativa.

3.2.1.2 Micro-organismos presentes no lodo ativado

Em processos de lodos ativados encontramos uma grande biodiversidade, incluindo: bactérias filamentosas e formadoras de flocos, fungos, protozoários, metazoários e algas (MESQUITA; AMARAL; FERREIRA, 2013).

A comunidade microbiana do lodo ativado pode ser dividida em: decompositores (bactérias e fungos) que se alimentam de matéria orgânica, e os consumidores (protozoários e metazoários) que se alimentam de bactérias dispersas e de outros micro-organismos (MADONI, 1994).

As bactérias constituem o grupo de micro-organismos fundamentais para o funcionamento do sistema de lodo ativado, pois são as responsáveis pela remoção de matéria orgânica e pela formação de aglomerados, denominados de flocos biológicos (BENTO et al., 2005).

Segundo Pujol e Canler (1992), os flocos biológicos são formados principalmente por bactérias formadoras de flocos e por bactérias filamentosas. As bactérias formadoras de flocos são responsáveis pela a formação da matriz gelatinosa e as bactérias filamentosas pela a estruturação do floco biológico. A matriz gelatinosa é formada através da excreção de polissacarídeos pelas bactérias, possuindo a função de adesão, o que permite a formação de grandes agregados microbianos (VON SPERLING, 2007). Na Figura 5 pode-se visualizar a estrutura típica de um floco biológico.

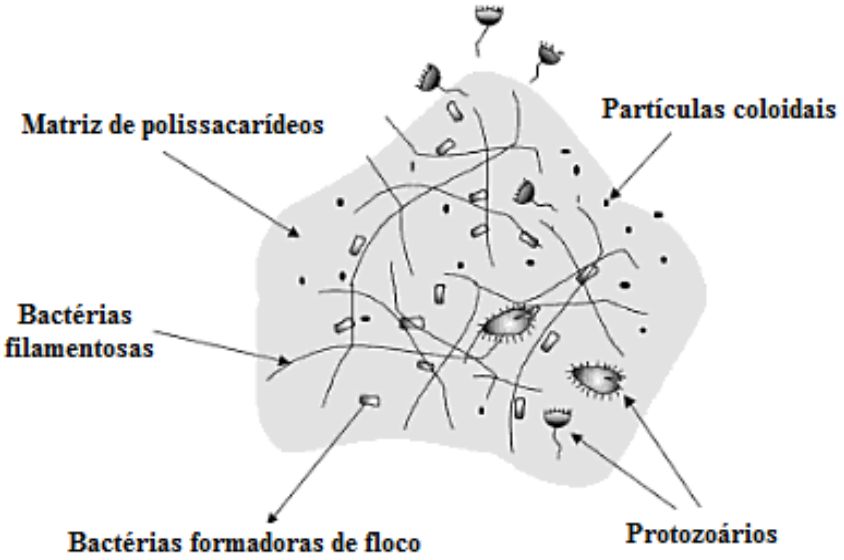

Figura 5- Composição do floco biológico em sistemas de lodos ativados. Fonte: VON SPERLING, (1997).

A comunidade microbiana em sistemas de lodo ativado é altamente diversificada, vários gêneros bacterianos são comumente observados, tais como: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Citromonas* e *Zoogloea* (formadoras de flocos) e *Spaerotilus*, *Thiothrix*, *Beggiatoa*, *Microthirix* e *Nocardia* (filamentosas) (JENKINS; RICHARD; DAIGGER, 1993).

O equilíbrio entre as bactérias formadoras de flocos e as filamentosas é fundamental para o bom funcionamento do sistema (MOTTA et al., 2001). Pois, a presença de flocos com poucos filamentos possui baixa resistência e se quebra facilmente. No entanto, um floco com muita quantidade de filamentos produz uma camada de agregados que tendem a flutuar ao invés de sedimentar, levando ao fenômeno conhecido como: intumescimento do lodo (*bulking*) (SANT'ANNA JUNIOR, 2010). Na Figura 6 pode-se observar a comparação entre as imagens microscópicas do lodo, em seu aspecto normal e com o *bulking*.

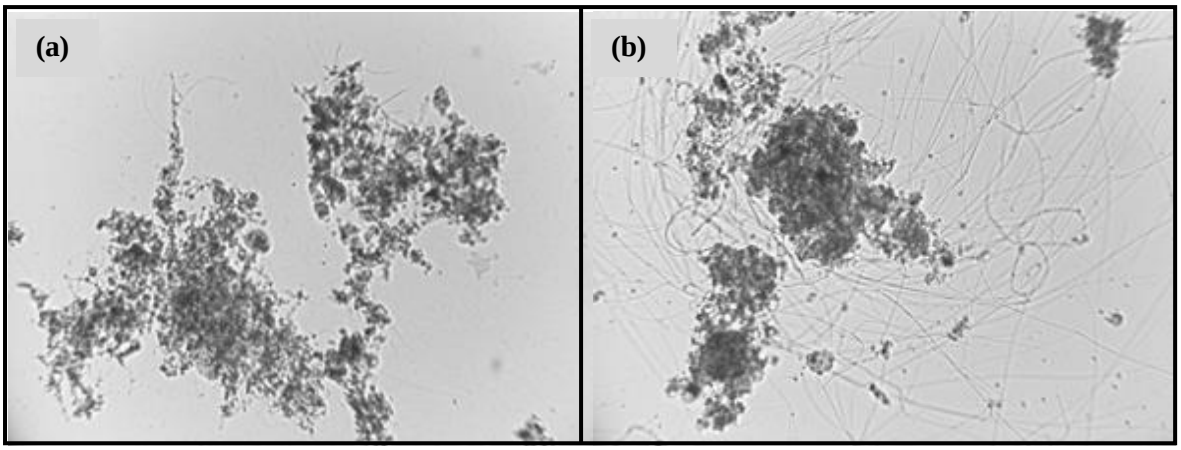

Figura 6- Microscopia do lodo ativado (aumento de 100X). Lodo normal (a) e bulking filamentoso (b). Fonte: Adaptado de MOTTA et al. (2001).

Segundo Wilén et al. (2008), a eficiência do sistema de lodo ativado dependerá da propriedade de separação sólido-líquido. E essa eficiência só será obtida com o controle constante do crescimento dos organismos filamentosos (bactérias e fungos), caso contrário, o excesso dos mesmos levará a perda dos sólidos do sistema, danificando o processo de tratamento (CETESB, 1985).

Dentre os micro-organismos encontrados em sistemas de tratamento de águas residuais, os fungos se fazem presentes, embora em menor número. Entre suas particularidades, destacam-se a resistência a baixas faixas de pH, ao baixo teor de oxigênio e a baixas temperaturas (MORE et al., 2010). A aplicação dos fungos no tratamento de efluentes está cada vez mais sendo estudada, devido a sua eficiência em remover compostos de difícil degradação (xenobióticos e de longas cadeias moleculares) (SANTAELLA et al., 2009), na

remoção biológica de nitrogênio, onde alcançam taxas de desnitrificação superiores as bactérias (GUEST; SMITH, 2002) e na remoção de metais e corantes de efluentes (COULIBALY; GOURENE; AGATHOS, 2003).

Ao contrário dos fungos, os protozoários são micro-organismos abundantes em sistema de tratamento biológico de efluentes. Segundo Madoni (1994), os protozoários ciliados são bastante numerosos em sistemas aeróbios, sendo encontrados em densidade de 10.000 células/mL de licor misto, constituindo cerca de 5% de matéria seca em peso de sólidos em suspensão.

A eficiência do sistema com lodos ativados pode ser classificada de acordo com a densidade de protozoários encontrados no tanque de aeração, em três categorias: (1) Sistemas ineficientes: presença de cerca de 10 espécimes/mL; (2) Sistemas pouco eficientes: apresentam de $10\text{-}10^3$ espécimes/mL e (3) Sistemas eficientes: apresentam mais de 10^3 espécimes/mL (MADONI, 1991).

De modo geral, os protozoários são ótimos indicadores do andamento do sistema. A presença dos gêneros: *Opercularia*, *Trachelophyllum* e *Vorticella* estão relacionados à baixa qualidade do efluente tratado. No entanto, quando o efluente é de alta qualidade, encontram-se gêneros como: *Arcella*, *Carchesium*, *Euglypha* e *Euplotes* (GINORIS et al., 2007).

Assim como os protozoários, os metazoários também são considerados importantes biodicadores do funcionamento do sistema de tratamento de efluentes. Segundo Gerardi (2006), os metazoários são encontrados em pequenas quantidades em sistemas de lodo ativado e somente quando a idade do lodo já está avançada (maior que 28 dias). Os mais comuns representantes deste grupo são: rotíferos, nematódeos e tardígrados (GLYMPH, 2005).

Segundo Foladori, Andreottola e Ziglio (2010), uma grande atenção vem sendo dada aos metazoários, quando o assunto se refere à redução do volume do lodo do sistema de tratamento. Os metazoários são capazes de se alimentarem de partículas com 0,2 a 10 µm de diâmetro provenientes de flocos bacterianos, além de se alimentarem de protozoários e algas, contribuindo significantemente para a redução do lodo (FOLADORI, ANDREOTOLLA, ZIGLIO, 2010). Entretanto, os metazoários são organismos sensíveis à presença de componentes tóxicos nos efluentes, a sua população é drasticamente reduzida, podendo levar ao seu desaparecimento, principalmente os rotíferos (SANT'ANNA JUNIOR, 2010).

As algas são organismos que também podem ser encontrados em sistemas de tratamento biológico. Entretanto, a sua presença é considerada rara em sistemas de lodos ativados, pois o seu crescimento é limitado, devido à deficiência de luz no tanque de aeração (JENKINS; RICHARD; DAIGGER, 1993).

3.2.1.3 Influência das variáveis ambientais sobre os micro-organismos

Segundo Sant'anna Junior (2010), a diversidade das espécies microbianas dependerá da composição do efluente e das principais variáveis, como: a presença de macro e micronutrientes, temperatura, pH e o nível de oxigênio dissolvido.

Os micro-organismos do lodo ativado necessitam além do material orgânico, alguns elementos de fonte inorgânica para o seu desenvolvimento e reprodução, tais como: nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, ferro, e de outros elementos traços (cromo, cobalto, manganês, níquel, selênio, zinco, entre outros), denominados de micronutrientes (VON SPERLING, 1997). A deficiência de nutrientes de forma geral pode acarretar na mudança da biomassa, favorecendo a predominância de alguns micro-organismos, neste caso: os filamentosos (SANT'ANNA JUNIOR, 2010).

A temperatura possui a capacidade de influenciar nas taxas de oxidação da matéria orgânica. Em processos biológicos, a temperatura tende aumentar até conseguir chegar ao seu ótimo e posteriormente decresce, devido à desnaturação enzimática ocorrida em temperaturas elevadas (VON SPERLING, 1997). O processo biológico geralmente é conduzido em uma ampla faixa de temperatura. No entanto, o máximo da atividade microbiana é atingindo na faixa entre 35° a 40°C (JENKINS; RICHARD; DAIGGER, 1993). Segundo Sant'anna Junior (2010), as temperaturas abaixo de 5°C remetem na queda do metabolismo microbiano.

O pH é uma variável de grande influência sobre os micro-organismos. Segundo Metcalf e Eddy, (2003) a maioria das bactérias não toleram o pH abaixo de 4,0 e nem maior do que 9,5, sendo a faixa de pH ótimo está entre 6,5 e 7,5.

O oxigênio tem como objetivo de satisfazer as necessidades do metabolismo dos micro-organismos e manter a agitação completa no tanque de aeração (JORDÃO; PESSÔA, 1995). De acordo com Henze et al. (2008), a necessidade de oxigênio dissolvido varia para cada tipo de micro-organismo. Os organismos aeróbios obrigatórios necessitam de fontes de oxigênio para o seu desenvolvimento, os anaeróbios não utilizam o oxigênio, mas alguns são capazes de tolerar a sua presença como: os aerotolerantes e outros organismos vivem em total ausência de oxigênio, denominados de: anaeróbios obrigatórios (HENZE et al., 2008).

Segundo Jenkins, Richard e Daigger (1993), em sistemas de lodos ativados, baixas concentrações de oxigênio dissolvido na faixa de 0,1 a 0,5 mg/L, favorece o crescimento de micro-organismos filamentosos e, consequentemente, favorecendo o *bulking*. Em sistemas de tratamento biológico a necessidade de oxigênio dissolvido deve variar entre 1,5 a 2,0 mg/L, com o objetivo de garantir a eficiência da remoção de nutrientes (JORDÃO; PESSÔA, 1995).

3.2.2 Efeito da salinidade em sistemas de lodos ativados

A salinidade consiste em sua maioria de íons de sódio, cloreto, potássio e magnésio (GERARDI, 2006). A presença destes sais possui o papel de influenciar na osmorregulação celular, ou seja, influência na habilidade da célula em importar e excretar materiais (GERARDI, 2006).

Em sistemas de lodos ativados, a elevada concentração de sais influência diretamente na comunidade microbiana, reduzindo a atividade celular e afetando significantemente a capacidade de floculação e de sedimentação do lodo (REID; LIU; JUDD, 2006).

A presença de sais nem sempre funciona como um fator tóxico ou inibitório em sistemas de tratamento biológico. Segundo Mc Carty (1964), baixas concentrações de sais podem funcionar como um estimulador para a atividade biológica, até atingir um ponto máximo do metabolismo microbiano. Entretanto, com o progressivo aumento da concentração de sais, a taxa metabólica tende a diminuir e os efeitos tóxicos são aparentes sobre a biomassa. Na Figura 7, podem-se observar os efeitos do estímulo e da toxicidade da biomassa, conforme o aumento da concentração salina.

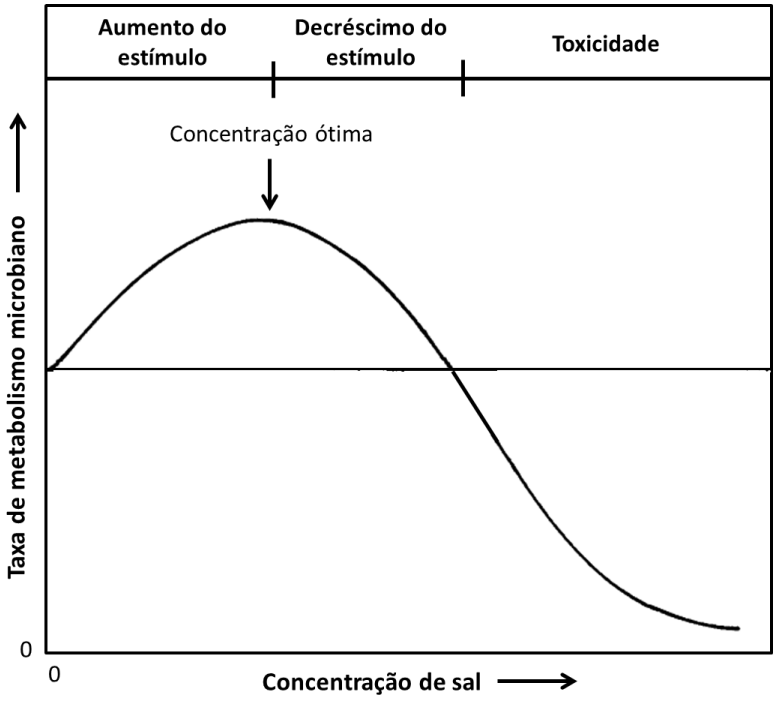

Figura 7- Curva da atividade biológica em efeito a presença de sais. Fonte: Adaptado de MC CARTY (1964).

Estudos de González et al. (2004), verificaram a influência de diferentes concentrações de NaCl no processo de nitrificação biológica. O reator contínuo operou com valor de pH de 7 e com diferentes concentrações do íon cloreto: 0, 3.000, 6.000, 10.000, 12.000 mg Cl^-/L sendo operados por 7 dias e concentrações de 25.000 e 30.000 mg Cl^-/L foram operadas por 22 dias. Os testes respirométricos foram utilizados para a avaliação da atividade da biomassa diante da presença do sal. Quando a concentração de 3.000 mg Cl^-/L foi adicionado ao reator, ocorreu um efeito estimulatório na biomassa, em comparação a condição inicial de 0 mg Cl^-/L, aumentando a conversão da amônia a nitrito em 30%. Com o aumento da concentração do sal, ocorreu o decréscimo contínuo da atividade da biomassa nitrificante, sendo que na concentração de 30.000 mg Cl^-/L a atividade nitrificante foi totalmente inibida.

Estudos de Kargi e Dincer (1996), verificaram que as concentrações maiores que 6.000 mg Cl^-/L são capazes de reduzir a atividade da biomassa, podendo levar até a morte celular. Entre as maiores dificuldades encontradas no sistema de tratamento biológico de águas salinas, podemos citar: o extenso período para a adaptação da biomassa, a alta sensibilidade às rápidas mudanças de carga iônica, a redução da cinética de degradação de componentes orgânicos com o aumento da concentração salina e a redução da população de protozoários e de micro-organismos filamentosos, resultando na baixa eficiência de sedimentação do lodo (KARGI; DINCER, 1996).

Em estudos de Salvadó et al. (2001), foram avaliadas as respostas dos protozoários do lodo ativado em efluente sintético com diferentes concentrações salinas. Os resultados demostraram que os protozoários suportaram a concentração de aproximadamente, 3.000 mg Cl^-/L, o decréscimo das espécies foi observado em torno de 6.000 mg Cl^-/L, o acentuado desaparecimento ocorreu em 12.000 mg Cl^-/L, e em 24.000 mg Cl^-/L de nenhum micro-organismo foi encontrado. De forma geral, a maioria de espécies de protozoários encontrados em lodos ativados são tolerantes a presença de 3.000-6.000 mg Cl^-/L de acima desta faixa poucas espécies conseguem sobreviver, o que limita o funcionamento do sistema biológico (SALVADÓ et al., 2001).

Segundo Moussa et al. (2006), o lodo ativado possui alta sensibilidade a presença de íon cloreto na faixa de 5.000 mg/L a 20.000 mg/L, reduzindo a cinética de degradação de nutrientes. Em estudos Uygur e Kargi (2004), verificaram a eficiência de remoção de nutrientes (matéria orgânica, nitrogênio e fósforo) utilizando o sistema de reator em batelada sequencial (RBS), com a utilização de uma cultura mista, na presença de diferentes concentrações de NaCl. Os resultados demostraram que o aumento da concentração do íon cloreto de 0 mg/L para aproximadamente 36.410 mg/L, resultou no decréscimo na eficiência

de remoção de 96 para 32% de matéria orgânica, de 96 para 39% na remoção de nitrogênio e de 84 para 22% na remoção de fósforo.

Em estudos posteriores, Uygur (2006) verificou a eficiência da remoção de nutrientes diante da presença de NaCl, mas com a adição de organismos tolerantes a alta concentração de sais a cultura. Os resultados demostraram que a adição de organismos tolerantes aumentou a eficiência de remoção, se comparados a uma cultura sem a adição dos mesmos.

3.3 REMOÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

O nitrogênio ocorre em diversas formas e estados de oxidação, originando compostos orgânicos e inorgânicos, catalisados principalmente pela ação de micro-organismos (ZEHR; WARD, 2002). Um dos componentes principais envolvido no metabolismo energético de bactérias, o nitrogênio apresenta um papel de vital importância para a vida na Terra (HULT et al., 2005).

Em águas residuais, o nitrogênio (N) é encontrado principalmente nas formas de nitrogênio inorgânico (amônia na forma livre NH_3 e íon amônio NH_4^+), nitrogênio orgânico (ureia, aminoácidos, e outras substâncias com o grupamento amino), oxidada (nitrito NO_2^- e nitrato NO_3^-), gasosa (N_2), óxido nítrico (NO) e óxido nitroso (N_2O) (VAN HAANDEL; VAN DER LUBBE, 2012). A Figura 8 mostra as possíveis conversões dos compostos nitrogenados na natureza.

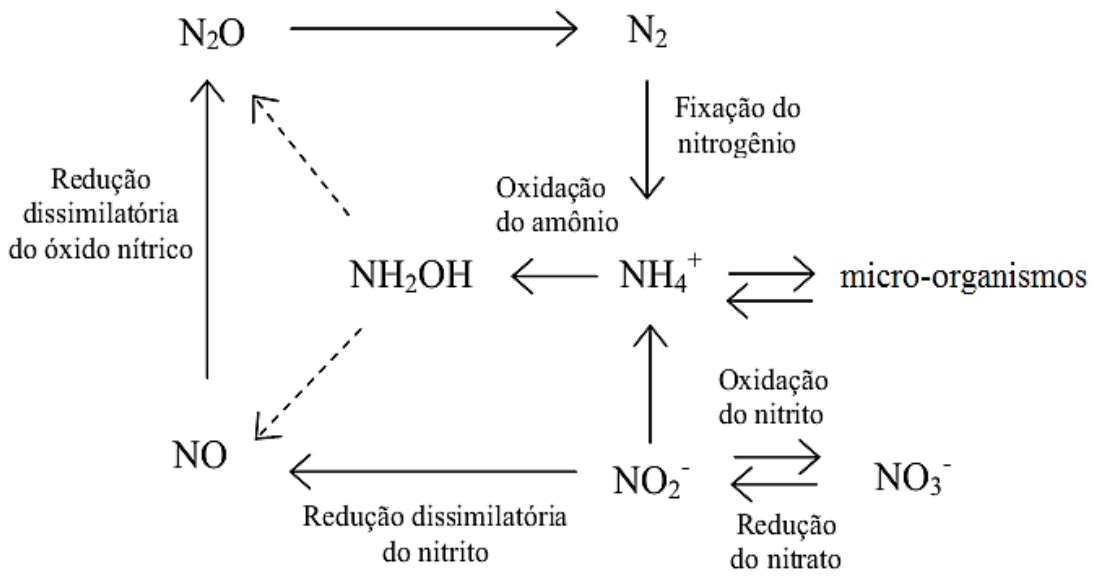

Figura 8- Reações do ciclo biológico do nitrogênio. Fonte: YE; THOMAS, (2001).

Segundo Von Sperling (1997), o nitrogênio inorgânico é encontrado em águas residuais na sua forma livre (NH_3), como na sua forma ionizada (NH_4^+). O equilíbrio entre ambas as formas é representado na Equação 1.

$$NH_4^+ \longleftrightarrow NH_3 + H^+ \quad (1)$$

O equilíbrio nesta equação é deslocado de acordo com os valores de pH. Para a faixa de pH menores que 8,0, o equilíbrio é deslocado para a esquerda e a amônia se apresenta na forma ionizada, mas para valores de pH acima de 11,0, o equilíbrio desloca-se para direita e a amônia se apresenta na sua forma livre (VON SPERLING, 1997). No entanto, independente da forma que se apresenta, o nitrogênio inorgânico é altamente tóxico para ecossistemas aquáticos.

Os compostos nitrogenados estão entre os maiores poluentes encontrados em águas residuais de diferentes ramos industriais, como: refinarias de petróleo, laticínios, produção de químicos, entre outros (WIESMANN, 1994). E devido a sua toxicidade, no Brasil, a resolução CONAMA n° 430 de 13 de maio de 2011 (BRASIL, 2011), determina que a concentração máxima de nitrogênio amoniacal seja de 20 mg N/L, para o lançamento de efluentes em corpos receptores. Sendo assim, a remoção de nitrogênio amoniacal antes do seu descarte final é de extrema importância, a fim de evitar danos ao ambiente aquático, como: depleção de oxigênio dissolvido, toxicidade e eutrofização (GERARDI, 2002).

O processo de remoção biológica de nitrogênio consiste de reações de oxidação-redução, conhecidas como: nitrificação e desnitrificação (VON SPERLING, 1997). Segundo Van Haandel e Marais (1999), a nitrificação consiste na oxidação biológica da amônia a nitrato, com a formação intermediária de nitritos. Ocorrendo naturalmente sob condições aeróbias e por ação de bactérias autotróficas especializadas. Segundo Campos et al. (1999), em sistemas de lodos ativados, a eficiência da nitrificação é relativamente alta, variando de acordo com os parâmetros e a configuração do sistema.

A desnitrificação constitui a etapa de redução biológica do nitrato a nitrogênio gasoso, tendo como intermediários: o óxido nítrico e óxido nitroso (METCALF; EDDY, 2003). Sendo realizada por uma ampla variedade de bactérias heterotróficas, principalmente as do gênero *Pseudomonas sp.*, ocorrendo somente em condições anóxicas (VON SPERLING, 1997).

Segundo Ferreira (2000), o crescimento da aplicação do tratamento biológico na remoção de nitrogênio, se dá devido a sua simplicidade, eficiência e menores custos operacionais, se comparados a métodos físico-químicos.

3.3.1 Nitrificação biológica

A nitrificação biológica é definida como a conversão do nitrogênio amoniacal a nitrato, pela ação de micro-organismos especializados, sob condições aeróbicas (PAINTER, 1970).

As bactérias nitrificantes são organismos quimiotróficos, ou seja, necessitam de fonte de carbono inorgânico para o seu desenvolvimento e reprodução. A fonte de carbono inorgânico utilizada é o dióxido de carbono (CO_2) que dissolvido em água, forma o ácido carbônico (H_2CO_3). O ácido carbônico se dissocia na forma alcalina de bicarbonato (HCO_3^-) e assim, é consumido pelas bactérias (GERARDI, 2006).

De acordo com Gerardi (2002), a eficiência das bactérias nitrificantes na oxidação de compostos nitrogenados, deve-se ao sistema de enzimas especiais e a presença de citomembranas. As citomembranas realizam o aumento da área da superfície da membrana celular, e com isso, a capacidade de nitrificação também aumenta (GERARDI, 2002).

As reações realizadas pelas bactérias nitrificantes geram pouca energia e com isso o seu crescimento é lento (MASSONE et al., 1996). De acordo com Gerardi (2006), em sistemas de lodos ativados, considerando condições ótimas, o tempo de geração para novos organismos nitrificantes é em torno de 2 a 3 dias. Logo, o tempo de residência do lodo no sistema é relativamente longo para a estabilização da população bacteriana, a fim de obter eficiência na nitrificação (GERARDI, 2006). O tempo de retenção celular é uma variável importante no processo de nitrificação, o seu controle é essencial, evitando que os micro-organismos nitrificantes sejam expulsos do sistema (PROSSER, 1989).

Segundo Horan (2003), a temperatura influencia diretamente na taxa de crescimento dos micro-organismos. Em sistemas de lodos ativados, operando sob uma faixa de 20°C, o tempo de retenção celular é de aproximadamente 4 a 7 dias. No entanto, em sistemas que operam em baixas temperaturas, a idade do lodo deverá ser em média de 10 a 16 dias (WIESMANN, 1994).

A nitrificação biológica consiste no processo de duas etapas, denominadas de: nitritação e nitratação (SANT'ANNA JUNIOR, 2010). A nitritação é a etapa que realiza a oxidação do nitrogênio amoniacal a nitrito. As bactérias responsáveis por esta reação pertencem aos gêneros: *Nitrossomonas* (Figura 9), *Nitrosospira* e *Nitrosococcus* conhecidas como bactérias oxidantes de amônia (AOB) (PROSSER, 1989).

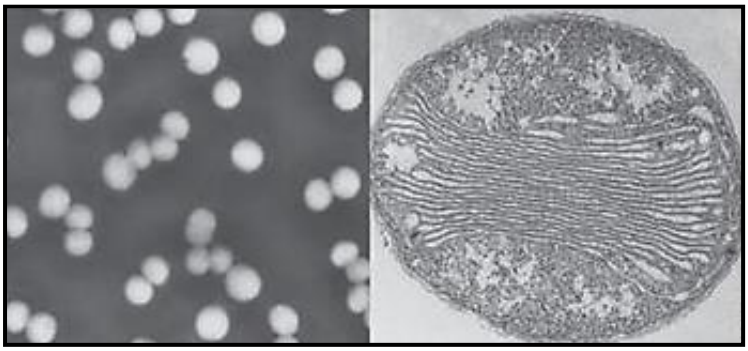

Figura 9- *Nitrossomonas sp*. Fonte: MADIGAN et al. (2011).

A oxidação da amônia (Equação 2) é iniciada pela ação da enzima amônia monooxigenase (AMO), que é capaz de oxidar a amônia (NH_3) em hidroxilamina (NH_2OH) (SCHMIDT et al., 2003).

$$NH_3 + O_2 + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow NH_2OH + H_2O \quad (2)$$

Com a formação da hidroxilamina, a enzima hidroxilamina oxidase (HAO) entra em ação, formando o nitrito (NO_2^-) (SCHMIDT et al., 2003). Como se pode visualizar na Equação 3.

$$NH_2OH + H_2O \longrightarrow HNO_2 + 4H^+ + 4e^- \quad (3)$$

O processo global da etapa de nitritação pode ser visualizada na Equação 4.

$$NH_4^+ + 3/2\ O_2 \longrightarrow NO_2^- + H_2O + 2H^+ \quad (4)$$

Segundo Ferreira (2000), a energia livre liberada na reação de oxidação da amônia a nitrito é estimada entre 58 a 84 kcal/mol. Enquanto, na reação de oxidação de nitrito a nitrato a energia livre liberada é de 15,4 a 20,9 kcal/mol. Logo, a reação de oxidação da amônia a nitrito é capaz de gerar maior quantidade de energia para os processos de síntese celular.

Na etapa de nitratação, utiliza-se o nitrito formado na etapa anterior e o oxida a nitrato, por ação de bactérias dos gêneros: *Nitrobacter* (Figura 10), *Nitrococcus* e *Nitrospira*, conhecidas como bactérias oxidantes de nitrito (NOB) (GERARDI, 2006).

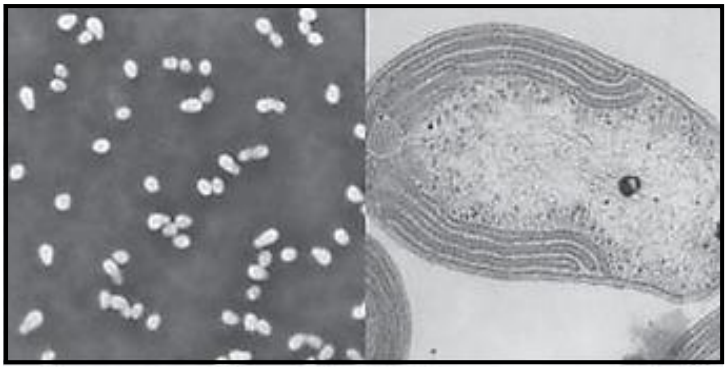

Figura 10- *Nitrobacter sp*. Fonte: MADIGAN et al., (2011).

A oxidação do nitrito (NO_2^-) é realizada pela ação da enzima nitrito óxido redutase. Esta reação é um processo reversível, pois esta mesma enzima pode reduzir o nitrato a nitrito na ausência de oxigênio (SCHMIDT et al., 2003). O processo de nitratação pode ser visualizado na Equação 5.

$$NO_2^- + 1/5\ O_2 \longrightarrow NO_3^- \qquad (5)$$

As bactérias oxidantes de nitrito são mais sensíveis à limitação de oxigênio, do que as bactérias oxidantes de amônia (SCHMIDT et al., 2003). Em concentrações de oxigênio dissolvido menores ou iguais a 0,5 mg/L a oxidação do nitrito é inibida (SCHMIDT et al., 2003).

A nitrificação pode ser realizada em sistemas de bateladas ou em sistemas contínuos. Sendo o sistema contínuo o mais indicado, devido à capacidade do sistema em se assemelhar as condições naturais de fisiologia e ecologia dos micro-organismos, do que os sistemas de bateladas (BOLMANN; FRENCH; LAANBROCK, 2011).

Segundo Anthonisen et al. (1976), para que o sistema de nitrificação tenha um bom desempenho é fundamental a aclimatação dos micro-organismos, o monitoramento das variáveis ambientais, assim como a verificação da influência de compostos inibitórios.

3.3.2 Fatores que influenciam a nitrificação

Diversos fatores são capazes de influenciar na atividade da biomassa nitrificante, atuando diretamente na eficiência do sistema de tratamento. Entre os principais fatores, destacam-se: a temperatura, pH, oxigênio dissolvido e a relação C/N (VON SPERLING, 1997).

Segundo Gerardi (2006), o crescimento dos micro-organismos nitrificantes é altamente influenciado pela temperatura. Quando ocorre o aumento da temperatura, até uma certa faixa, a taxa de difusão de nutrientes para dentro da célula microbiana e a taxa de atividade enzimática também aumentam, a cada aumento de 10°C na temperatura, a atividade enzimática tende a dobrar (GERARDI, 2006).

A temperatura ótima para o cultivo de nitrificantes está na faixa entre 28°C a 36°C (SHARMA; AHLERT, 1977). Com a queda da temperatura, o processo de nitrificação diminui significantemente. Em temperaturas de 15°C, a nitrificação sofre uma queda de 50%, em 10°C a nitrificação corresponde a apenas 20% e em 5°C a nitrificação cessa (SANT'ANNA JUNIOR, 2010). Entretanto, estudos de Charley, Hooper e McLee (1980) observaram em seus experimentos que a atividade metabólica das bactérias oxidantes de amônia foi maior na temperatura de 15°C, em relação a faixa estudada de 10° a 35°C.

Segundo Van Haandel e Marais (1999), a influência da temperatura na taxa de crescimento das nitrificantes é dada pela Equação 6.

$$\mu_{max\,(T)} = \mu_{max\,(20°C)} \cdot \Theta^{(T-20°C)} \qquad (6)$$

Onde: μmax (T)= taxa de crescimento máximo a uma temperatura T (d^{-1}), Θ = coeficiente de dependência de Arrhenius e T= temperatura (°C).

Segundo Painter (1970), a taxa de crescimento máximo (μmax) é de 0,46-1,86 d^{-1} para as oxidantes de amônia em temperaturas ótimas de 28°C a 36°C e de 1,39 d^{-1} para as oxidantes de nitrito em temperaturas de 28°C a 30°C.

O valor de pH é muito importante para o crescimento das nitrificantes. O próprio processo de nitrificação é responsável pela queda do pH, devido a liberação de íons H^+ no meio (VON SPERLING, 1997). Segundo Gerardi (2002), aproximadamente 7,4 mg $CaCO_3$/L em termos de alcalinidade são consumidos pela oxidação de cada mg NAT/L. Logo, a alcalinidade deve ser frequentemente suprida pela adição de álcalis no sistema, como por exemplo, o carbonato de cálcio ($CaCO_3$), pois quando o pH decresce a taxa de nitrificação também decresce (VON SPERLING, 1997).

Os micro-organismos nitrificantes são ativos em valores de pH de 5,0 a 8,5 (VON SPERLING, 1997). Entretanto, o pH ótimo é estabelecido na faixa alcalina entre 8 e 9 (SHAMMAS, 1986). Para as *Nitrossomonas* a faixa de pH ideal é de 7,8 a 9,2 e para as *Nitrobacter* a faixa é de 8,5 a 9,2 (GERARDI, 2006). Segundo Ruiz, Jeison e Chamy (2003),

a nitrificação completa sem a ocorrência de acúmulos de intermediários é obtida na faixa de 6,45-8,95.

O oxigênio dissolvido (OD) é essencial para a ocorrência da nitrificação, visto que, os micro-organismos responsáveis pelo processo, são aeróbios. No processo de nitritação são gastos 3,43 mg OD/ mg N-NH_3, enquanto no processo de nitratação são gastos 1,14 mg OD/ mg N-NO_2, ou seja, o processo de nitritação é o responsável pelo maior gasto de oxigênio dissolvido no sistema, aproximadamente o triplo do que é gasto na nitratação (SHARMA; AHLERT, 1977).

A demanda de oxigênio dissolvido mínima para a nitrificação é de 2,0 mg/L, pois em valores abaixo de 0,5 mg/L o processo pode ser prejudicado ou até mesmo cessar (VON SPERLING, 1996). Entretanto, estudos de Stenstrom e Poduska (1980) verificaram que a nitrificação foi possível em valores extremos, com 0,3 mg/L de OD, assim como em 4,0 mg/L de OD. Mas, a eficiência do processo de nitrificação foi obtida na faixa 0,5-1,0 mg/L de OD.

Em estudos de Campos e colaboradores (2007), foi verificado que a melhor concentração de OD para a oxidação da amônia a nitrato em sistemas de lodo ativado foi de 1,0 mg/L, e em concentrações de 0,6 mg/L ocorreu o acúmulo de amônia e em 0,4 mg/L de OD, o nitrito foi acumulado no sistema.

A relação carbono/nitrogênio (C/N) é um fator de grande importância para a eficiência do sistema de nitrificação (SANT'ANNA JUNIOR, 2010). A presença de matéria orgânica favorece o crescimento de micro-organismos heterotróficos, que além de possuir um crescimento rápido em relação às autotróficos nitrificantes, tendem a dominar os flocos biológicos e disputarem por oxigênio e nutrientes do sistema (CAMPOS et al., 1999). Segundo Campos et al. (2007), as maiores taxas de nitrificação foram obtidas quando a matéria orgânica apresentou-se em baixas concentrações no sistema, pois a nitrificação ocorre de forma mais lenta e possui maior sensibilidade às condições ambientais do que a oxidação do carbono orgânico. O crescimento simultâneo de micro-organismos heterotróficos e autotróficos no mesmo reator, podem atuar em mudanças de pH, temperatura e de oxigênio dissolvido, o que pode desestabilizar o processo de nitrificação (PROSSER, 1989).

3.3.3 Fatores tóxicos ou inibitórios do processo de nitrificação

A nitrificação é considerada a mais sensível etapa do processo de remoção biológica de nutrientes de águas residuais, os organismos autotróficos possuem uma sensibilidade dez

vezes superior à presença de inibidores, se comparados aos organismos heterotróficos (JULIASTUTI; BAEYENS; CREEMERS, 2003).

As formas de nitrogênio que participam da etapa de nitrificação, desde que em pequenas concentrações são capazes de realizarem a oxidação completa dos compostos. Entretanto, em altas concentrações são capazes de exercer um efeito inibitório e a nitrificação pode não ocorrer de forma completa (KIN et al., 2008).

Anthonisen e colaboradores (1976) verificaram a influência das concentrações de amônia livre sobre o processo de nitrificação. Os resultados demostraram que a amônia livre em concentrações de 10 a 150 mg/L são capazes de inibir as bactérias *Nitrossomonas* e em pequenas concentrações de 0,1 a 1,0 mg/L são capazes de inibir as bactérias *Nitrobacter*, devido a sua grande sensibilidade na presença de altas concentrações de ambas as formas de amônia, seja a livre ou a ionizada. Logo, ocorrerá o acúmulo de nitrito no sistema e a nitrificação não se torna completa, pois o nitrato não pode ser formado. Esta condição pode ser visualizada na Figura 11.

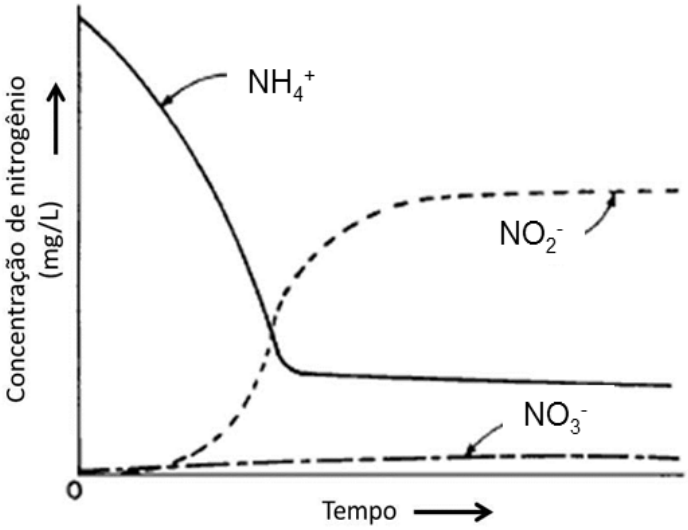

Figura 11- Esquema de inibição da nitrificação com o acúmulo de nitrito. Fonte: Adaptado de ANTHONISEN et al. (1976).

Apesar disso, estudos de Campos et al., (2002b) verificaram que operando um sistema de lodos ativados em reator contínuo, foi possível a obtenção de elevados níveis de eficiência, mesmo operando com altas concentrações de nitrogênio amoniacal. Na concentração testada de aproximadamente, 3.300 mg NAT/L, a eficiência de oxidação de amônia a nitrito foi de 99,5%. Demostrando assim, que o processo de nitrificação biológica não foi prejudicado pela presença da alta concentração de nitrogênio amoniacal no efluente.

Konig, Riedel e Metzger (1998), avaliaram amostras de águas residuais de diferentes processos industriais e a toxicidade das mesmas no processo de nitrificação. O experimento foi realizado com micro-organismos nitrificantes imobilizados. Os resultados obtidos com o nível de toxidade das amostras foram comparados à concentração de allylthiourea (ATU) (devido ser o composto padrão utilizado em testes de inibição de nitrificação). Os resultados são demostrados na Tabela 2.

Tabela 2- Avaliação da toxicidade de águas residuais e a sua comparação com a concentração de allylthiourea

Amostras	**CI_{50} (mg/L)**	**Equivalente de ATU (mg/L)**	**Procedência**
Petróleo	0,1	12.000	Qualidade comercial
Água residual da refinaria	21	57	Planta piloto tratamento (ISWA)
Água residual do processo de fermentação	0,9	1300	Indústria de alimentos
Água residual de lavagem enzimática	137	8,8	Indústria têxtil

*Planta de ISWA- Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte–und Abfallwirtschaft, Alemanha.

Fonte: Adaptado de KONIG; RIEDEL; METZGER, (1998).

A partir dos resultados da Tabela 2 foi possível verificar que o petróleo comercial é o que apresentou maior toxicidade de acordo com os valores de CI_{50} e que uma mínima concentração de 0,1 mg/L de petróleo é tóxico para 50% da população nitrificante. Esta alta toxicidade é provavelmente causada devido à alta concentração de compostos aromáticos, como o benzeno. Segundo Konig, Riedel e Metzger (1998), a toxicidade do benzeno às nitrificantes é extremamente intensa e pequena são as chances do processo ser reversível.

Estudos de Kong e colaboradores (1996) avaliaram a cinética de inibição para sistemas mistos de lodos ativados operando com a oxidação do carbono e nitrificação. Foram utilizados três inibidores como cianeto (CN^-), cobre (Cu^{+2}) e 3,5 diclorofenol (DCP). Os resultados demonstraram que o CN^- não se mostrou inibidor para a oxidação de carbono, mas foi inibidor da nitrificação. O Cu^{+2} em baixas concentrações foi capaz de inibir a nitrificação e somente em altas concentrações inibiu a oxidação de carbono. Mas, o 3,5 diclorofenol demostrou-se um tóxico em potencial, inibindo tanto a oxidação de carbono quanto a nitrificação biológica.

Visto que uma grande variedade de compostos orgânicos e inorgânicos são inibidores do processo de nitrificação, atuando diretamente no metabolismo celular. Alguns exemplos destes compostos tóxicos e suas concentrações são listados na Tabela 3.

Tabela 3- Compostos inibitórios do processo de nitrificação (CI_{50}) em sistemas de lodos ativados*

Compostos	Concentração (mg/L)	Inibição (50%)	Referências
NH_3	30,0-46,0	AOB	BUDAY et al. (1999)
	16,0-20,0	NOB	
$N\text{-}NO_2^-$	198,0	NOB	
$N\text{-}NO_3^-$	205,0	NOB	
HNO_2	0,0105-0,0109	AOB	
HNO_3	6×10^{-6}	AOB	
Zn^{+2}	0,35	Nitrificação	JULIASTUTI et al. (2003)
Cu^{+2}	0,08	Nitrificação	
Clorobenzeno	0,25	Nitrificação	
Etilbenzeno	8,0	Nitrificação	
Fenol	3,0	Nitrificação	
	3,7	Nitrificação	TOMLINSON; BOON; TROTMAN, (1966)
Acetona	1.300	Nitrificação	
	8.100	Nitrificação	HOPPER;TERRY,(1973)
Clorofórmio	12	Nitrificação	TOMLINSON; BOON; TROTMAN, (1966)
Etanol	1.600	Nitrificação	
	4.100	AOB	HOPPER; TERRY, (1973)
N- butanol	8.200	AOB	
Metanol	160	AOB	
Tolueno	20,0	Nitrificação	DALZELL et al. (2002)
3,5- diclorofenol	3,0	Nitrificação	
N- allylthiourea	1,2	AOB	KONIG et al. (1998)
Azida	0,75	Nitrificação	GINESTET et al. (1998)

* As concentrações dos tóxicos irão variar de acordo com: período de exposição, temperatura, pH, oxigênio dissolvido, utilização de culturas puras de nitrificantes ou mistas, entre outros fatores.

3.3.4 Estudos sobre a nitrificação de efluentes salinos

A biomassa nitrificante apresenta uma alta sensibilidade à presença de sais, como o íon cloreto. No sistema de nitrificação, o cloreto tende a funcionar como um inibidor do processo, decrescendo a atividade das bactérias nitrificantes (CAMPOS et al., 2002b). Segundo Oren (2001), as bactérias nitrificantes não se encontram naturalmente em ambientes com altas concentrações salinas, somente um linhagem de cultura pura de *Nitrosococcus halophilus* conseguem crescer em concentrações de 24.000 mg Cl^-/L a 57.000 mg Cl^-/L.

As bactérias oxidantes de amônia e as bactérias oxidantes de nitrito podem responder de formas diferentes a presença de sais, pois as oxidantes de amônia apresentam maior sensibilidade a mudanças de cargas salinas, quando comparadas as oxidantes de nitrito (MOUSSA et al. 2006). De acordo com Ludzack e Noran (1965), em culturas convencionais, os micro-organismos são muito vulneráveis as mudanças nas concentrações salinas. Uma pequena mudança em um curto intervalo de tempo pode resultar em um grande efeito sobre a biomassa. A adaptação dos micro-organismos a nova carga salina e o retorno da atividade de nitrificação necessitam de um longo período, ou seja, um elevado período de residência celular (LUDZACK; NORAN, 1965).

Diversos estudos foram realizados sobre a nitrificação de efluentes salinos. Entretanto, por apresentarem contradições nas configurações dos processos, como: temperatura, pH, presença ou não de inibidores, adição de sal de forma gradual ou pulsada, uso de culturas de nitrificantes puras ou mistas, adaptadas ou não a altas concentrações salinas, acabam por dificultar a comparação entre os resultados (MOUSSA et al., 2006).

Estudos sobre a nitrificação em efluentes salinos são apresentados a seguir, sob diferentes focos, como: a aclimatação de culturas mistas (CAMPOS et al., 2002b), a aclimatação de culturas puras (DINÇER; KARGI, 2001), o aumento da concentração salina de forma gradual ou pulsada (MOUSSA et al., 2006 e CHEN et al., 2003) e a utilização de micro-organismos tolerantes ao sal (UYGUR, 2006).

Campos e colaboradores (2002b), verificaram a eficiência da nitrificação em sistemas de lodos ativados sob condições de alta salinidade e com o aumento gradual da concentração de nitrogênio amoniacal. O inóculo utilizado foi proveniente de uma cultura mista proveniente de uma unidade de tratamento de água residual. O cultivo da biomassa ocorreu em sistema contínuo para um período de aclimatação, sob a temperatura de 20°C e com valor de pH de 7,8. E posteriormente, para os testes com os sais (Na_2SO_4, $NaNO_3$ e NaCl) o experimento foi realizado em sistema de batelada e fixado a temperatura de 20°C e com o valor de pH de 7,6,

com a duração de 150 dias. Inicialmente, o sistema começou a operar com a concentração de de 1.000 mg NAT /L e após 46 dias, a concentração foi aumentada até atingir 4.000 mg NAT/L. Ao mesmo tempo, os sais foram sendo adicionados ao sistema aumentando progressivamente durante todo o período experimental. Os experimentos foram analisados através de testes de respirometria da biomassa nitrificante, juntamente com a medição da concentração de sólidos no sistema.

Os resultados obtidos por Campos et al. (2002b), revelaram que a atividade nitrificante foi obtida com a concentração de sais, sendo: 13.700 mg NaCl/L, 19.900 mg $NaNO_3$/L e 8.300 mg Na_2SO_4/L, e com aumento da concentração de sais após esta faixa ocorreu o acúmulo em torno de 10% de nitrogênio amoniacal e entre 16-20% de nitrito. Elevadas concentrações de sais durante um longo período de tempo não afetaram as propriedades físicas do lodo e no final do experimento verificou-se o aumento da concentração de sólidos de 3,4 g SSV/L para a 20g SSV/L. Concluindo, que para os diferentes tipos de sais utilizados, a aclimatação da biomassa foi fundamental para a obtenção de melhores resultados em altas concentrações salinas.

Dinçer e Kargi (2001), verificaram a de nitrificação em sistemas de lodos ativados utilizando um efluente sintético salino, contendo aproximadamente 100 mg/L de fonte de nitrogênio amoniacal total (NAT) e uma cultura pura de micro-organismos nitrificantes, obtida pela Universidade de Clemson nos EUA. Os experimentos foram realizados em sistemas de batelada, com valores de temperatura de 25°C, pH=8,0 ± 0,5 e de oxigênio dissolvido na faixa de 2,5 ± 0,5 mg/L. As análises de nitrogênio amoniacal, nitrito, nitrato e oxigênio dissolvido foram realizados durante todo o experimento.

Ainda segundo Dincer e Kargi (2001), os resultados obtidos para as amostras livres de sal (amostras controle- 0% sal), demostraram que a idade ideal do lodo para a nitrificação foi de 12 dias, com o tempo de detenção hidráulica de 15 horas, resultando na eficiência de 100% do processo. Com a adição de aproximadamente 18.000 mg Cl^-/L no sistema, foi verificado que a idade do lodo ideal seria de 25 dias, ou seja, mais que o dobro do período verificado para a amostra sem a presença de sal. Nesta concentração a eficiência da nitrificação decresceu para 96%. Com o aumento da concentração de sal para 5%, a eficiência caiu ainda mais, representando 80%. Logo, concluiu-se que quanto maior a concentração de sais, menor será a resposta da atividade da biomassa e maior deverá ser a idade do lodo para a aclimatação dos micro-organismos.

Moussa e colaboradores (2006) avaliaram o efeito da salinidade na atividade de nitrificação. Foram comparadas dois tipos de culturas, uma adaptada a 10.000 mg Cl^-/L

durante o período de um ano e a outra não adaptada a esta condição. Os experimentos foram realizados em reatores batelada sequencial (RBS), mantidos sob condições de temperatura a 30°C e valores de pH= 7,5 ± 0,5. A idade do lodo foi de 30 dias e o tempo de retenção hidráulica de 10 horas. O primeiro reator (R1) não houve a adição de sal e serviu como fonte de biomassa para os outros reatores. Na primeira fase do experimento, o segundo reator (R2) foi operado com a concentração de 10.000 mg Cl^-/L durante o período de um ano para a aclimatação, antes de iniciarem os experimentos e o terceiro reator (R3) que não possuía aclimatação, recebeu o sal em duas etapas, com ao aumento da salinidade na primeira etapa de 0mg para 5.000 mg Cl^-/L e na segunda etapa de 5.000 mg para 10.000 mg Cl^-/L. Na segunda fase do experimento, nos reatores (R2 e R3) foram realizados aumentos nas concentrações de sais de 5.000 mg Cl^-/L a cada duas semanas, até os reatores alcançarem a inibição da nitrificação em 95%. Na terceira fase, com o alcance deste nível de inibição, a concentração de sal foi ajustada para a fase inicial, ou seja, o R2 retornou a 10.000 mg Cl^-/L e o R3 para 0 mg Cl^-/L. A toxicidade ao sal foi avaliada através da técnica molecular de *Fluorescent in situ hybridization* (FISH).

Os resultados de Moussa e colaboradores (2006), demostraram que na primeira fase do experimento ocorreu o acúmulo de 40 mg/L de nitrito em reatores sem a presença de sais (R1 e R3) e com o aumento de 10.000 mg Cl^-/L no R3 o acúmulo nitrito foi menor, aproximadamente 25 mg/L. Em 10.000 mg Cl^-/L foi verificado que tanto em culturas adaptadas ou não, a sensibilidade das oxidantes de amônia é maior em relação às oxidantes de nitrito e em 40.000 mg Cl^-/L ocorreu a inibição completa de ambas. Concluindo, que para a cultura não adaptada ao sal (R3) e mesmo para a adaptada ao sal como a (R2), a atividade das oxidantes de amônia e das oxidantes de nitrito foram maiores quando o aumento da carga de sal ocorreu de maneira gradual.

Assim como Moussa e colaboradores (2006), Chen et al. (2003) também avaliaram a eficiência da nitrificação na presença de altas concentrações de sais, comparando as formas da adição de sal (gradual ou em pulsos).

Chen et al. (2003), analisaram a eficiência do processo de nitrificação com o aumento da concentração de íon cloreto no sistema. O estudo foi realizado com o lodo obtido de uma estação de tratamento de esgoto e operado em sistemas de bateladas, utilizando um efluente sintético, sem a presença de carbono. Primeiramente, a cultura foi incrementada gradualmente com concentrações de nitrogênio amoniacal de 30-100 mg N/L durante o período de dois meses. Após este período, os testes em bateladas com a adição de cloreto (2.000- 30.000 mg Cl^-/L) foram iniciados sob a temperatura 20°C e valor de pH de 7,7-8,2. Foram realizadas

duas culturas salinas para a verificação da melhor resposta da adição de cloreto de forma gradual ou pulsada. No aumento gradual, o cloreto iniciou com a concentração de 2.000 mg Cl^-/L até no chegar ao máximo de 30.000 mg Cl^-/L. No aumento em pulsos, o cloreto foi adicionado na primeira etapa em 10.000 mg Cl^-/L, na segunda etapa em 20.000 mg Cl^-/L e na terceira e última etapa em 30.000 mg Cl^-/L. Para a mudança de cada etapa foi aguardado um tempo de aproximadamente 70 dias para a adaptação da biomassa ao choque de sal.

Os resultados de Chen et al. (2003) demostraram que o aumento gradual resultou em maior taxa de oxidação de nitrogênio amoniacal se comparados ao aumento em pulsos, o que pode ser visualizado na concentração de nitrito formado no sistema. A concentração de 5.000 mg Cl^-/L levou ao estímulo na atividade de nitrificação em ambas as culturas e decresceu após esta concentração. O nível crítico de cloreto no sistema de bateladas foi de 10.000 mg/L, onde somente as bactérias do gênero *Nitrobacter* estavam presentes, cessando a nitrificação, devido ao desaparecimento das *Nitrossomonas*. Concluindo, que no aumento gradual, a atividade da biomassa nitrificante foi maior em relação ao aumento em pulsos e que a concentração de 6.500 mg CL^-/L foi o máximo da concentração salina para que o sistema de nitrificação tolerou.

Em estudos de Uygur (2006), foi avaliada a eficiência da nitrificação em elevadas concentrações salinas, mas com adição de micro-organismos tolerantes a estas condições. O sistema de nitrificação foi operado em um reator batelada sequencial (RBS), utilizando um meio sintético, contendo inicialmente (60,0 ± 3,0 mg/L) de fonte de nitrogênio amoniacal. A temperatura e o valor de pH dos experimentos foram fixados em 25°C e (7,0 ± 0,5), respectivamente. Os micro-organismos nitrificantes foram obtidos através da Universidade de Clemson nos EUA e organismos do gênero *Halobacter* foram obtidos da *American Type of Culture Colletion* (ATCC) nos EUA, sendo também adicionados ao sistema na proporção (1/1, v/v). A concentração de sal testado foi de 0 a 36.390 mg Cl^-/L.

Os resultados de Ugur (2006) demostraram que a remoção de NAT decresceu conforme ocorria o aumento da concentração salina. Na cultura de nitrificantes sem a presença de *Halobacter*, a eficiência de remoção decresceu de 3,0 mg NAT g/biomassa/h com o meio livre de sal, para 0,80 mg NAT g /biomassa/h, quando o meio continha 6% de sal. Mas, com a adição de *Halobacter* a eficiência de remoção foi de 3,04 mg NAT g/biomassa/h na ausência de sal e de 1,45 mg NAT g/biomassa/h na presença de 6% de sal. A conclusão obtida pelo autor foi que a adição de bactérias tolerantes ao sal aumentou a performance do sistema e a eficiência da remoção de amônia foi alcançada em níveis maiores, mesmo com elevadas concentrações de sais.

Como visto anteriormente, os diferentes estudos sobre a nitrificação biológica possuem como objetivo o entendimento dos fenômenos que ocorrem com a biomassa na presença de altas concentrações salinas, a fim de garantir a eficiência do sistema de tratamento.

O aprimoramento do processo de nitrificação biológica vem sendo realizado, com a utilização de micro-organismos aclimatados e até mesmo com a utilização de culturas de organismos halotolerantes. Além de contar com auxílio de técnicas, desde as mais simples para a avaliação de toxicidade da biomassa, como a respirometria, até o uso de técnicas mais avançadas com o uso de biologia molecular, como FISH e DDGE, avaliando a dinâmica populacional no reator biológico e permitindo a identificação de espécies de micro-organismos nitrificantes.

3.4. A UTILIZAÇÃO DA RESPIROMETRIA PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA BIOMASSA NITRIFICANTE

Nos tratamentos de águas residuais, como no caso da nitrificação, o oxigênio possui um papel fundamental para a manutenção do metabolismo microbiano, e consequentemente, na oxidação da amônia (BUENO; PIVELI; CAMPOS, 2012). Entretanto, quando compostos tóxicos ou inibitórios estão presentes nos efluentes são capazes de gerar impactos negativos sobre a biomassa, reduzindo a sua capacidade metabólica para a oxidação de compostos (RICCO et al., 2004). Logo, a utilização de técnicas para a avaliação da toxicidade torna-se uma importante ferramenta para a obtenção de informações sobre o desempenho do sistema de tratamento (KIN; KIM; JANG, 2001).

Diferentes técnicas para a avaliação da toxicidade em águas residuais são utilizadas, tais como: respirometria, ATP luminescência, inibição enzimática (L-alanine-aminopeptidase) e ensaio com *Vibrio ficheri* (Microtox) (DALZELL et al., 2002). Entre estas técnicas, a respirometria destaca-se, devido a sua simplicidade, rapidez de resultados e a sua boa reprodutividade, tornando-a altamente aplicável em sistemas de lodos ativados, como forma de compreender os fenômenos biológicos que ocorrem no reator (RICCO et al., 2004).

Segundo Vanrolleghem (2002), a técnica de respirometria baseia-se na medição e na interpretação do consumo de oxigênio pelos micro-organismos para a degradação dos substratos, sob condições experimentais definidas. Sendo uma importante ferramenta para a obtenção de informações sobre a instabilidade e o desempenho do sistema de lodos ativados (SPANJERS, 1998).

A taxa de consumo de oxigênio, OUR (*Oxygen Uptake Rate*) é determinada pela velocidade que o oxigênio é consumido (por unidade de tempo) pelos micro-organismos, sendo o primeiro parâmetro a ser utilizado para a avaliação da atividade biológica e da verificação de toxicidade do efluente (SUESCUN et al., 1998).

Segundo Rezende et al. (2000), a razão entre a OUR e o volume de biomassa, determina uma nova taxa, denominada de: taxa de consumo específico de oxigênio, SOUR (*Specific Oxygen Uptake Rate*). A SOUR é um parâmetro mais consistente na avaliação da toxicidade sobre os micro-organismos, pois considera a concentração de sólidos suspensos voláteis (SSV) presente no reator biológico (REZENDE et al., 2000).

Como a nitrificação biológica ocorre sob condições aeróbias, altas taxas de oxigênio são consumidas pelos micro-organismos nas reações de oxidação de compostos nitrogenados (KIM; KIM; JANG, 2001). A aplicação da respirometria é fundamental para o monitoramento do sistema de nitrificação, pois o decréscimo de sua eficiência pode ser observado pela baixa atividade microbiana, sendo expressa pela baixa taxa de consumo de oxigênio pela biomassa nitrificante (KIM; KIM; JANG, 2001).

Segundo Spanjers (1998), a taxa de consumo de oxigênio é determinada pela utilização aparelhos, denominado de respirômetros. Estes são responsáveis pela medição da taxa com que a biomassa consome o oxigênio dissolvido (OD) no líquido. Na Figura 12 pode-se visualizar um teste de respirometria sendo realizado em um frasco de DBO_5, apresentando um sensor de oxigênio dissolvido acoplado a um sistema que realiza a coleta e o armazenamento dos dados em um *software* específico (BUENO; PIVELLI; CAMPOS, 2012).

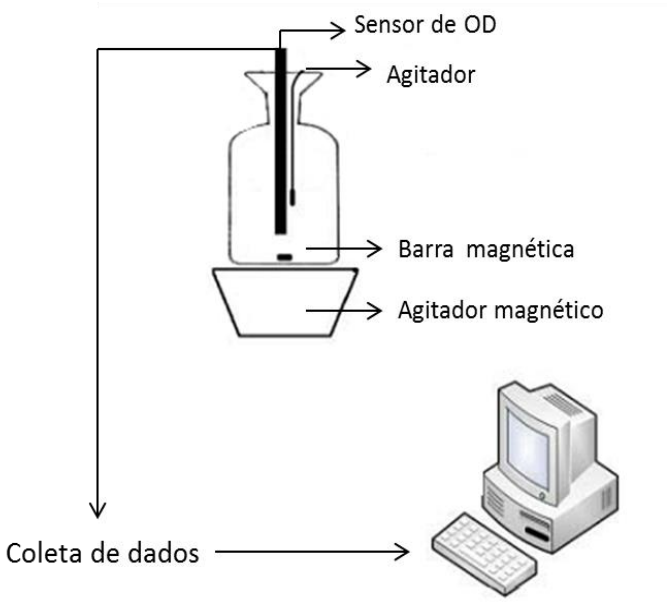

Figura 12- Montagem de um ensaio de respirometria. Fonte: Adaptado de: Rezende et al. (2012).

Nos ensaios respirométricos, o consumo de oxigênio ocorre distintamente em duas fases, denominadas de: respiração endógena e respiração exógena. A respiração endógena consiste na etapa que o consumo de oxigênio mantem-se constante, como forma de suprir as necessidades de manutenção celular (ANDREOTTOLA et al., 2005). Na respiração exógena, o consumo de oxigênio ocorre a uma elevada velocidade para a realização da degradação de substratos presentes no líquido (ANDREOTTOLA et al., 2005). Na Figura 13 pode-se visualizar a representação gráfica da taxa de consumo de oxigênio.

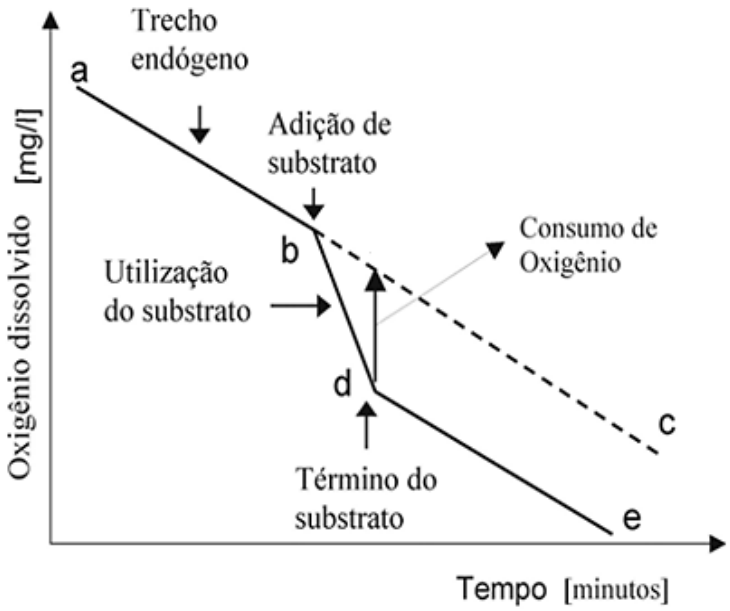

Figura 13- Representação gráfica da taxa de consumo de oxigênio (OUR). Fonte: ANDREOTTOLA et al, (2002).

Legenda: O trecho endógeno é representado pela inclinação da reta do ponto (a e b), supondo que não ocorra a adição de substrato no teste, a linha pontilhada representa a continuação do trecho endógeno no ponto (c). Com a adição de substrato, a fase exógena inicia-se e o consumo de oxigênio torna-se maior, o que pode ser observado na inclinação da reta no ponto (d). Quando todo o substrato é degradado, a respiração retorna a fase endógena, representada pelo ponto (e).

A aplicação da técnica de respirometria pode ser vista em estudos de Moussa et al. (2003), que utilizou esta técnica para avaliar individualmente a atividade das bactérias nitrificantes, na ausência de tóxicos. Em seus experimentos a obtenção da taxa de consumo de oxigênio pelas bactérias oxidantes de amônia e das bactérias oxidantes de nitrito foram determinadas separadamente, através de injeções de $NaNO_2$ e NH_4Cl. A adição de $NaNO_2$ ativa as bactérias oxidantes de nitrito, enquanto a adição de NH_4Cl ativa ambas as bactérias responsáveis pelo processo de nitrificação. As atividades das bactérias foram medidas através da subtração das OURs. A respiração endógena foi representada como (OUR 1), a adição de

$NaNO_2$, corresponde a (OUR 2) e a adição de NH_4Cl, corresponde a (OUR 3). A atividade das bactérias oxidantes de nitrito foi obtida pela subtração de (OUR_2 – OUR_1) e a atividade das oxidantes de amônia foi obtida pela subtração de (OUR_3 – OUR_2). Moussa e colaboradores (2003) concluíram que este método é simples e confiável para a avaliação da atividade da biomassa nitrificante, sendo de grande utilidade para a determinação de parâmetros cinéticos.

Em contraste ao trabalho de Moussa et al. (2003), Kim e colaboradores, (2008) utilizaram a técnica de respirometria na presença de um componente tóxico, como forma de avaliar a toxicidade da amônia livre nas bactérias oxidantes de nitrito (NOB).

O experimento de Kim et al. (2008) foi operado apenas com culturas de nitrificantes em um reator do tipo *airlift.* Para a estimação da toxicidade da NOB foi realizado a medição de oxigênio dissolvido, para a determinação da taxa de consumo de oxigênio. Os testes foram realizados a temperatura de 21,1°C. Primeiramente, ocorreu a adição de 9,1 mg/L de acetato de sódio para a verificação da presença de bactérias heterotróficas no sistema. O baixo consumo de oxigênio foi verificado após a adição de acetato, indicando que existe baixa atividade da biomassa heterotrófica, assim como era esperado. Posteriormente, foi realizado a respirometria para as diferentes concentrações de amônia livre ($N\text{-}NH_3$), fixadas em: 0, 1.0, 4.1, 9.7, e 22.9 mg/L para a verificação da inibição das bactérias oxidantes de nitrito.

Os resultados de Kim et al. (2008) demostraram que as adições de amônia livre resultaram na inibição das bactérias oxidantes de nitrito em: 0, 18, 29, 31 e 43%, respectivamente. Concluindo, que o aumento da concentração de amônia livre possui um efeito inibitório significativo sobre as oxidantes de nitrito. E a utilização da respirometria apresentou-se como uma técnica simples e eficiente para detectar a inibição por compostos tóxicos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos o modo de seleção e o cultivo da biomassa nitrificante em meio sintético produzido especialmente para as mesmas, bem como o modo de operação dos reatores biológicos para a sua aclimatação. Serão apresentados os métodos analíticos utilizados para a realização do monitoramento do tratamento biológico e os procedimentos para a realização dos testes respirométricos.

4.1 SELEÇÃO E CULTIVO DA BIOMASSA NITRIFICANTE

O lodo biológico utilizado neste estudo foi fornecido por uma estação de tratamento de água e esgoto (Companhia Estadual de Águas e Esgotos- CEDAE-RJ), coletado no dia 03 de junho de 2013, do sistema de tratamento de lodos ativados. A biomassa consistia de uma cultura mista de micro-organismos, entre estes, os organismos heterotróficos e autotróficos.

Como já visto anteriormente, as bactérias nitrificantes são organismos quimiotróficos, ou seja, são seres que necessitam apenas de carbono inorgânico para seu desenvolvimento (GERARDI, 2006). Sendo organismos especializados na oxidação de nitrogênio amoniacal a nitrato (VAN HAANDEL; MARAIS, 1999).

Neste estudo, as bactérias nitrificantes foram selecionadas através da aclimatação da biomassa em um meio com alta concentração de nitrogênio amoniacal e a ausência de carbono orgânico, de modo favorecer o crescimento das autotróficas nitrificantes e o desaparecimento de outras espécies, como as heterotróficas. A seleção da biomassa nitrificante foi realizada em duas etapas, consistindo de uma etapa preliminar em sistema em bateladas e a etapa principal em biorreator contínuo. Esta etapa de seleção da biomassa foi fundamental para o desenvolvimento desta pesquisa, como será discutido a seguir.

4.1.1 Etapa preliminar: Sistema em bateladas

Para a realização do sistema em bateladas, foram utilizados dois reatores em provetas volumétricas de 1 litro cada, contendo 200 mL de lodo biológico e completados com 800 mL de meio sintético específico para as bactérias nitrificantes. A Tabela 4 apresenta os compostos químicos e suas devidas concentrações para a produção do meio sintético. A Tabela 5 apresenta a composição da solução nutriente, realizada à parte e adicionada ao meio sintético.

Tabela 4- Composição do meio sintético

Componentes	Concentração
NH_4Cl	107 mg/L
NaH_2PO_4 . 2 H_2O	75,5 mg/L
$MgSO_4$. 7 H_2O	90 mg/L
KCl	36 mg/L
$CaCl_2$. 2 H_2O	14 mg/L
Extrato de levedura	1 mg/L
$(NH_4)_2CO_3$	426,67 mg/L
Solução Nutriente	0,3 mL/L

Fonte: Adaptado de Smolders; Van Loosdrecht; Heijen (1994).

Tabela 5- Composição da solução nutriente

Componentes	Concentração (mg/L)
$FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$	1.500
H_3BO_3	150
$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$	30
KI	180
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$	120
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$	60
ZnSO4 . 7 H_2O	120
$CoCl_2$. 6 H_2O	150
EDTA	10.000

Fonte: Smolders; Van Loosdrecht; Heijen (1994)

Para a produção do meio sintético e da solução nutriente foi realizada a medição de cada composto químico em uma balança analítica de alta precisão (SHIMADZU- modelo AW220). Como o meio utilizado foi sintético, a concentração inicial de nitrogênio amoniacal permaneceu sempre a mesma, equivalendo a 152,44 mg NAT/L.

O processo foi realizado em condições aeróbicas, onde cada reator contou com a utilização de um compressor de ar, conectado a uma mangueira de silicone e com uma pedra porosa na ponta, permitindo a distribuição de oxigênio e a circulação da biomassa no reator. A aeração foi monitorada para que o oxigênio dissolvido dentro do reator fosse entre 1,5-2,0

mg/L, pois segundo Von Sperling (1996), esta faixa é considerada a ideal para o processo de nitrificação biológica. Os valores de pH e de temperatura foram fixados em 7,5 e 25°-30° C, respectivamente.

A batelada foi realizada no período determinado de 48 horas, onde a aeração foi interrompida por aproximadamente 30 a 60 minutos para a sedimentação do lodo. Após este período, o sobrenadante foi retirado e um novo meio de cultura foi adicionado até completar o volume de 1 litro das provetas.

O valor de *stripping* ou arraste da amônia foi verificado utilizando um reator em proveta volumétrica de 1 litro, apresentando meio de cultura, mas sem a adição da biomassa. O reator foi aerado utilizando um compressor de ar conectado a uma mangueira de silicone e com uma pedra porosa na ponta. Este reator operou com os mesmos valores de OD, temperatura e pH do reator operado em batelada. As concentrações de nitrogênio amoniacal total do efluente foram monitoradas durante o período de 24, 48 e 72 horas. O valor de *stripping* foi obtido pela subtração da concentração de nitrogênio amoniacal total do afluente da concentração de nitrogênio amoniacal total do efluente.

Os valores de pH, temperatura, oxigênio dissolvido, volume do lodo, concentrações de amônia e nitrato no reator e características microscópicas do lodo foram monitoradas diariamente durante todo o experimento, que foi operado durante 133 dias (junho de 2013 a outubro de 2013).

4.1.2 Biorreator em sistema contínuo

A nitrificação consiste de um processo sensível, pois mudanças ou interferências em suas variáveis ambientais podem levar o sistema microbiano ao desequilíbrio, gerando uma baixa eficiência do sistema (ANTHONISEN et al., 1976; JULIASTUTI, BAEYENS, CREEMERS, 2003). Segundo Bolmann, French, Laanbrock (2011), o sistema contínuo é o mais indicado em sistemas de nitrificação, devido à sua capacidade em se assemelhar as condições naturais de fisiologia e ecologia dos micro-organismos, contrastando com o sistema em batelada. Sendo assim, o experimento passou a ser conduzido em um reator contínuo em escala de bancada, a fim de verificar uma melhor aclimatação, convertendo-se em maiores taxas de crescimento e nitrificação.

O biorreator contínuo utilizado era de material de acrílico transparente, baseado no modelo de Eckenfelder (1989). Contendo dois compartimentos, sendo um tanque de aeração com um volume de 4,7 litros, onde ocorria à entrada do afluente e o segundo compartimento

consistia de um decantador de volume de 1 litro, onde se encontrava a saída do efluente tratado.

Na Figura 14 (a, b e c) pode-se visualizar o reator contínuo utilizado no experimento e suas dimensões.

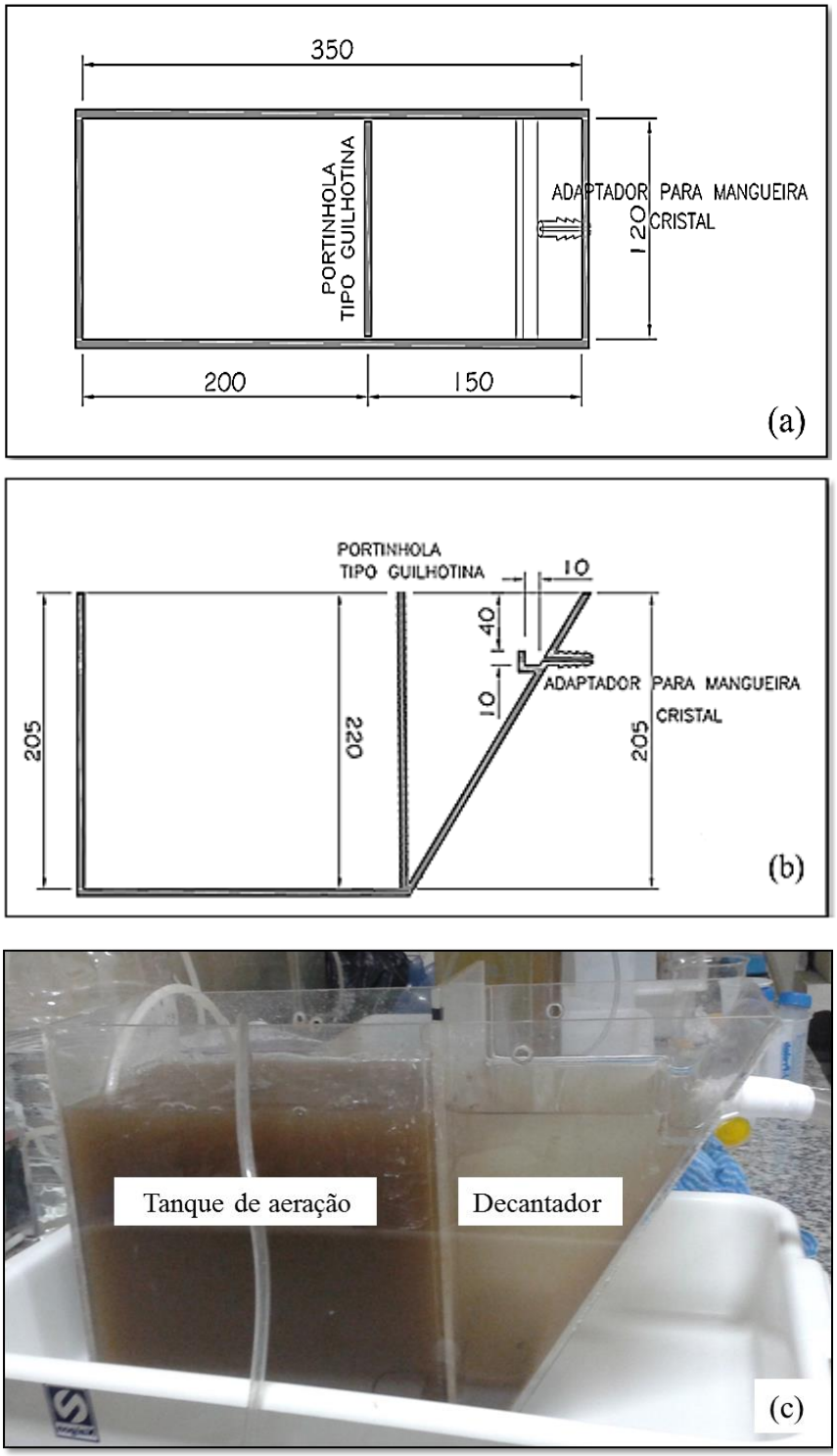

Figura 14- Dimensões do reator (a)-Vista superior e (b)- Vista lateral (Fonte: NASCENTES, 2013) e (c) Reator em funcionamento.

No biorreator contínuo foi adicionada a biomassa selecionada na etapa preliminar (sistemas em batelada), contendo um volume de aproximadamente 100 mL e com a adição de mais 900 mL de um lodo de cultura mista proveniente da Companhia da CEDAE, coletado no dia do início da operação do sistema contínuo (12/10/2013).

O volume do tanque de aeração foi completado com o meio sintético para o cultivo de nitrificantes, como descrito anteriormente. A alimentação do biorreator foi realizada com a utilização de uma bomba dosadora peristáltica, que enviava o meio de cultura (descrito nas Tabelas 4 e 5) a uma vazão determinada para o reator. A vazão do reator foi diariamente medida, com o uso de uma proveta volumétrica e um cronômetro.

Para a aeração do tanque foi utilizado um compressor de ar, conectado a uma mangueira de silicone e com uma pedra porosa na ponta, permitindo que a biomassa ficasse em permanente suspensão. A biomassa presente no decantador foi diariamente retornada para o tanque de aeração, a fim de aumentar a concentração de biomassa no reator. Os detalhes do funcionamento do reator e seus componentes podem ser visualizados na Figura 15.

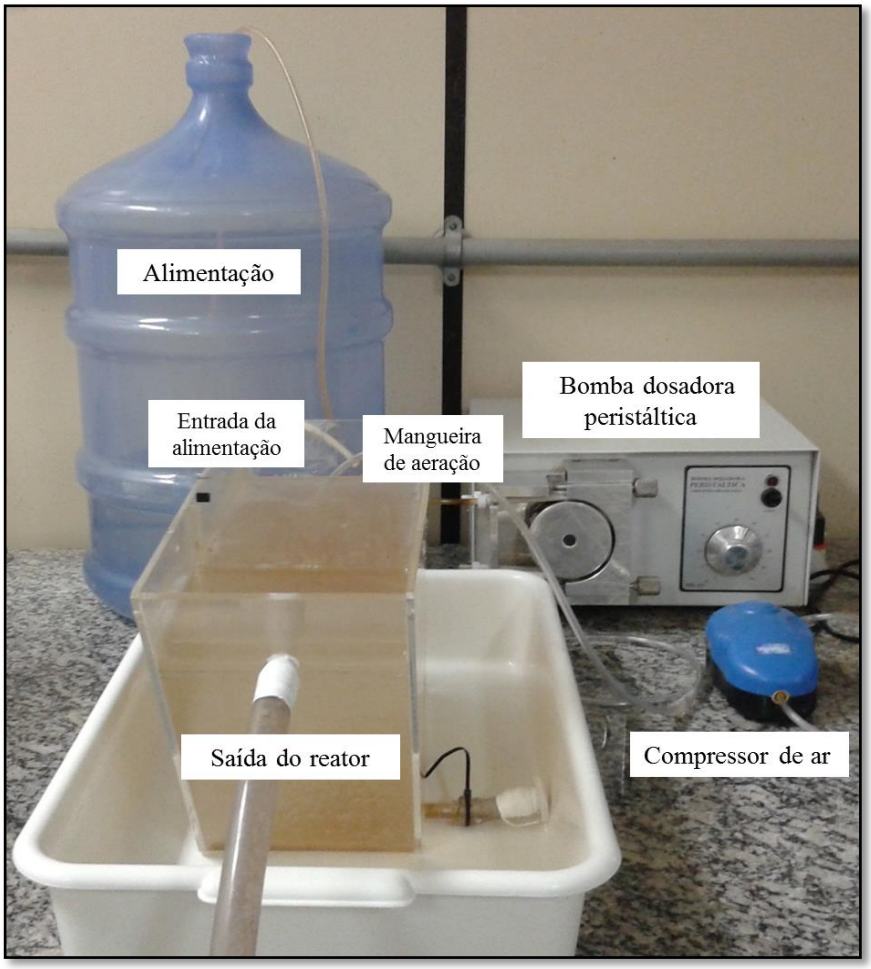

Figura 15- Componentes do sistema contínuo

O reator foi operado com o tempo de retenção hidráulica de 48 horas (sendo o máximo permitido pela bomba peristáltica utilizada), durante o período de 45 dias para a aclimatação da biomassa. Com valores de OD, pH e temperatura fixados em valores de 4,0-5,0 mg/L, 7,5 e 25°-30°C, respectivamente.

O valor de *stripping* ou arraste da amônia foi verificado no biorreator contínuo com a mesma configuração utilizada nos experimentos, apresentando somente meio de cultura. O biorreator foi mantido sob aeração com a utilização de um compressor de ar conectado a uma mangueira de silicone e com uma pedra porosa na ponta. Este reator foi operado com os mesmos valores de OD, temperatura e pH do biorreator experimental que continha a presença da biomassa. Os efluentes foram monitorados durante o período de 24, 48 e 72 horas. O valor de *stripping* foi obtido pela subtração da concentração de nitrogênio amoniacal total do afluente da concentração de nitrogênio amoniacal total do efluente.

Durante todo o período de aclimatação foi realizado o monitoramento diário dos parâmetros, tais como: pH, temperatura, concentração de sólidos suspensos voláteis, oxigênio dissolvido, concentração de amônia e nitrato no reator, além da observação microscópica da biomassa, avaliando a formação de flocos biológicos e as espécies envolvidas no processo.

4.2 ADIÇÃO ÍON CLORETO (Cl^-) AO SISTEMA PARA A AVALIAÇÃO DA NITRIFICAÇÃO

Após o período de aclimatação da biomassa, os testes com a adição de cloreto foram iniciados. O íon cloreto é conhecido por gerar efeitos negativos sobre a biomassa nitrificante, agindo diretamente na diminuição de seu metabolismo e na redução da capacidade da oxidação das formas de nitrogênio (KARGI; DINCER, 1996).

Considerando que o meio de cultura utilizado fornecia a concentração 100 mg/L de íon cloreto. A avaliação da toxicidade gerada pelo íon cloreto sobre a biomassa nitrificante foi verificada ao longo de 10 regimes com diferentes concentrações salinas e com período de tempo distinto para a aclimatação à determinada concentração salina, como pode ser visualizada na Tabela 6.

Tabela 6- Concentrações de íon cloreto adicionado ao sistema contínuo TRH=48 horas.

Regimes	Concentração de Cl^- (mg/l)	TRH (h)	Tempo de operação (dias)
1°	100	48	45
2°	250	48	14
3°	500	48	14
4°	1.000	48	14
5°	2.000	48	20
6°	4.000	48	25
7°	8.000	48	30
8°	10.000	48	35
9°	15.000	48	45
10°	8.000	48	35

O 10° regime salino (8.000 mg Cl^-/L) foi aplicado como forma de verificar se a biomassa nitrificante, após passar por um estresse osmótico até a maior concentração testada (15.000 mg Cl^-/L), seria capaz de retornar a sua atividade celular obtida no 6° regime, onde a mesma concentração salina foi testada.

O período de retenção hidráulica em todos os regimes foi de 48 horas. Durante cada regime, os parâmetros de pH, temperatura, concentração de nitrogênio amoniacal total e nitrato, concentração de sólidos suspensos, oxigênio dissolvido e características microscópicas da biomassa foram monitorados.

Em cada regime foi avaliado a toxicidade pelo íon cloreto, com a utilização da técnica de respirometria. A escolha pela técnica de respirometria dentre outras técnicas para a verificação da toxicidade, deve-se a simplicidade de sua aplicação e rapidez de seus resultados (RICCO et al., 2004), que será descrita detalhadamente no item 4.3.1.

4.3 METODOLOGIA ANALÍTICA

Os métodos analíticos utilizados durante o período experimental podem ser visualizados na Tabela 7.

Tabela 7- Métodos analíticos utilizados no monitoramento do reator biológico

Parâmetros	Amostras	Periodicidade	Métodos (APHA, 2005)
pH	Afluente e licor	5 vezes/semana	4500-B (pHmetro Quimis)
Temperatura	Licor	5 vezes/semana	4500-E (Orion 4 star Thermo pH Ise portable)
Nitrogênio amoniacal total (NAT/L)	Afluente e licor	3 vezes/semana	4500-E (Orion 4 star Thermo pH Ise portable)
Nitrato (NO_3^-)	Afluente e licor	3 vezes/semana	4500-B Absorvância (220 e 275 nm) (Shimadzu UV mini 1240)
Cloreto	Afluente	3 vezes/semana	4500-B (Thermo Orion)
Sólidos Suspensos Totais (SST)	Licor	3 vezes/ regime salino	2540-C (Estufa de esterilização e secagem Gehaka G4023D e forno mufla Quimis)
Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)	Licor	3 vezes/regime salino	2540-D (Estufa de esterilização e secagem Gehaka G4023D e forno mufla Quimis)
Oxigênio dissolvido	Licor	5 vezes/semana	Oxímetro (WTW OXI 7310)
Respirometria	Licor	3 vezes/ regime salino	Descrito no item 4.3.1
Microscopia ótica	Licor	3 vezes/semana	Descrito no item 4.3.2

O valor de nitrito não foi mensurado durante o período experimental, pois segundo Campos et al. (2002b), em concentrações maiores que 2,0 mg/L de oxigênio dissolvido não ocorre o acúmulo de nitrito, este rapidamente se converte a nitrato.

4.3.1 Testes de respirometria para a avaliação da toxicidade

Os testes de respirometria para cada regime salino foram realizados em triplicatas. O teste foi conduzido retirando o volume de aproximadamente 280 mL do licor do tanque de aeração do reator contínuo para o preenchimento de uma garrafa de DBO_5.

Primeiramente, o licor presente na garrafa de DBO_5 foi aerado durante alguns minutos, até a concentração de oxigênio dissolvido alcançar a 5,0 mg/L, a aeração foi realizada com a utilização de um compressor de ar conectado a uma mangueira de silicone e com uma pedra porosa na ponta. Após obter esta concentração de oxigênio dissolvido na amostra, o eletrodo de oxigênio foi adicionado à garrafa de DBO_5, de tal forma que o licor transbordasse da garrafa.

Para a realização do teste foram necessários uma placa agitadora e um agitador magnético, para manter a biomassa em suspensão durante o período de teste. O aparelho de OD (WTW OXI 7310) enviava dados de leitura para o software criado especificamente para este aparelho (MULTIPAR), que capturava todos os valores de OD durante um determinado período de tempo e criava automaticamente um arquivo em um banco de dados com os valores de oxigênio dissolvido do teste. O sistema de respirometria utilizado neste estudo pode ser visualizado na Figura 16.

Figura 16- Aparelho de medição de OD acoplado ao computador para o envio de leituras.

Com a obtenção dos dados das leituras, a taxa de consumo de oxigênio (OUR) foi calculada pela a equação 7:

$$OUR = \frac{\Delta OD\ (mg/L)}{\Delta t\ (min)} \tag{7}$$

O gráfico de OD *versus* tempo foi plotado e a taxa de respiração foi obtida com o valor de inclinação da reta (coeficiente linear), determinado a OUR.

A taxa específica de consumo de oxigênio (SOUR) foi obtida pela razão entre o coeficiente linear (OUR) obtido anteriormente e a concentração de sólidos suspensos voláteis (SSV). Calculada pela equação 8:

$$SOUR = \frac{OUR\ (mg/L)/min}{SSV\ (mg/l)}\ x\ \frac{60min}{h} \tag{8}$$

4.3.2 Microscopia ótica da biomassa

A microscopia ótica foi utilizada como uma ferramenta complementar aos testes de respirometria, como forma de avaliar a resposta da biomassa a adição de cloreto no reator.

O monitoramento da biomassa com a utilização da microscopia ótica foi realizado utilizando lâminas e lamínulas de vidro com preparação simples a fresco. A visualização das amostras pelo microscópio (Trinocular Plan Quimis, modelo C7885K) foram capturadas com a utilização da câmera acoplada ao microscópio (Moticam Quimis, modelo 2300 de 3.0 MPixel USB 2.0) e as micrografias foram enviadas para o computador também acoplado ao sistema. O sistema de microscopia pode ser visualizado na Figura 17.

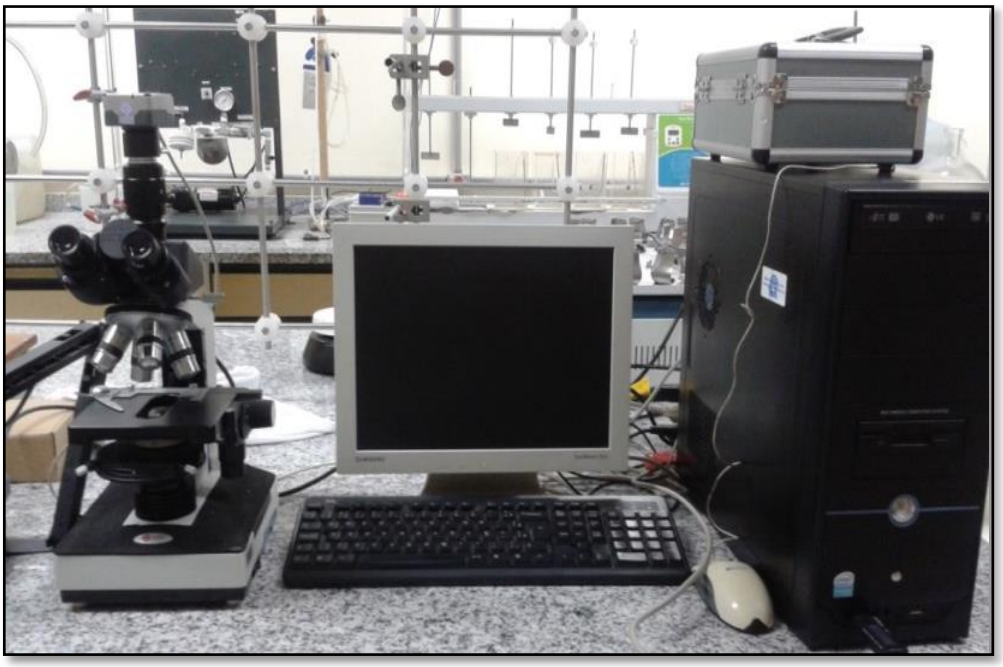

Figura 17- Sistema de microscopia com câmera acoplada ao computador

Segundo Jenkins et al. (1993), a utilização da microscopia em processos de lodo ativado é fundamental para a avaliação da natureza da formação de flocos microbianos e verificar a abundância de organismos filamentosos, que podem comprometer o funcionamento do sistema.

As análises qualitativas foram realizadas com a utilização de pranchas de microscopias de Jenkins, Richard e Daigger (1993). E as análises quantitativas foram realizadas utilizando a ficha de avaliação microbiológica, adaptado de Jenkins, Richard e Daigger (1993). A escala de abundância dos micro-organismos foi determinada com numerações que variam de 0 a 5, sendo: (0) nenhum, (1) poucos, (2) comum, (3) muito comum, (4) abundante e (5) excessivo.

4.4 PROCEDIMENTOS DE CÁLCULOS

4.4.1 Eficiência de oxidação de nitrogênio amoniacal

A eficiência de remoção de NAT foi calculada conforme a Equação 9.

$$n = \frac{Ci - Cf}{Ci} x\ 100 \tag{9}$$

Onde: Ci= concentração inicial de nitrogênio amoniacal total (mg/L);

Cf= Concentração final de nitrogênio amoniacal total (mg/L);

No experimento, Ci= representa a concentração de alimentação proveniente do meio de cultura e Cf= concentração final no TRH= 48 horas.

4.4.2 Balanço de Nitrogênio

O balanço de nitrogênio foi realizado considerando as formas de nitrogênio formadas durante o processo, a fração de nitrogênio destinada à biomassa celular e a fração oxidada por arraste. O balanço foi calculado segundo a Equação 10.

$$[NAT]_{E} = [NAT]\ s + [N\text{-}NO_2^-]\ s + [N\text{-}NO_3^-]\ s + [NAT]_{C5H7O2N} + [NAT]_{arraste} \quad (10)$$

Onde: [NAT] E = corresponde a concentração de nitrogênio amoniacal total de entrada no reator (mg/L);

[NAT] s , [N-NO2-] s , [N-NO3-] s= correspondem as concentrações de nitrogênio amoniacal total, nitrito e nitrato, respectivamente, na saída do reator (mg/L);

[NAT] C5H7O2N= corresponde a concentração de nitrogênio amoniacal total que será destinado a biomassa (mg/L);

[NAT] arraste= corresponde a concentração de nitrogênio amoniacal total que foi oxidado (mg/L), durante o TRH= 48 horas.

4.4.3 Coeficientes cinéticos

Os coeficientes cinéticos de concentração da biomassa autotrófica (X_n), taxa de nitrificação (r_n) e a taxa de crescimento da biomassa nitrificante (μ) foram calculados segundo (VAN HAANDEL E MARAIS, 1999).

- A concentração da biomassa autotrófica (X_n) foi obtida através da Equação 11.

$$Xn = \frac{Yn\ Rs\ Nc}{(1+bn\ Rs)Rh} \quad (11)$$

Onde: Xn= concentração de bactérias autotróficas (mg/L);

Yn = coeficiente de rendimento das bactérias nitrificantes (0,10 mgN/L) (VAN HAANDEL E MARAIS, 1999);

Rs= idade do lodo (d);

Nc= concentração de amônia nitrificada (mgN/L);
bn= constante de decaimento (b_n= 0,04 (1,03) $^{(t-20)}$) (VAN HAANDEL E MARAIS, 1999);
t= temperatura (°C);
$Rh_=$ tempo de retenção (d)

- A taxa de nitrificação (r_n) foi obtida através da Equação 12.

$$rn = \frac{\text{OUR}}{4{,}57} \tag{12}$$

Onde: r_n= taxa de nitrificação (mg/L/d);
OUR= taxa de consumo de oxigênio (mgO_2/L/h).

- A taxa de crescimento da biomassa nitrificante (μ) foi obtida a partir da Equação 13.

$$\mu = \frac{Yn\ rn}{Xn} \tag{13}$$

Onde: μ= taxa de crescimento da biomassa nitrificante (d^{-1}),Y_n = coeficiente de rendimento das bactérias nitrificantes (0,10 mgN/L) e Xn= concentração de bactérias autotróficas (mg/L) (VAN HAANDEL E MARAIS, 1999).

4.4.4 Testes estatísticos

O teste de correlação de Pearson e a obtenção do modelo estatístico foram realizados pelo programa STATISTICA 12 (licenciado pela Stat Soft). Os testes estatísticos foram realizados, a fim de verificar a correlação entre a adição do íon cloreto com as concentrações de nitrogênio amoniacal, nitrato e com a taxa específica de consumo de oxigênio pela biomassa.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão apresentados os resultados obtidos na avaliação do sistema para a realização da aclimatação da biomassa nitrificante, sendo esta a etapa fundamental para a continuidade dos ensaios. Serão também apresentados os resultados dos ensaios para a avaliação da atividade da biomassa nitrificante na presença da crescente adição de íon cloreto ao sistema.

5.1 TESTES DE SELEÇÃO E CULTIVO DA BIOMASSA NITRIFICANTE

5.1.1 Sistema em batelada

A etapa de seleção da biomassa nitrificante a partir de uma cultura mista de micro-organismos foi realizada inicialmente no sistema em batelada, a fim de verificar a dinâmica da aclimatação das bactérias nitrificantes. Durante esta etapa preliminar, foi verificada uma baixa eficiência de nitrificação, o que pode ser observado a partir dos resultados da conversão de nitrogênio amoniacal a nitrato.

A Figura 18 ilustra os resultados obtidos no sistema em batelada. Neste sistema foi verificada a presença de altas concentrações de nitrogênio amoniacal (142,85 mg/L- 145,87 mg/L), representando a eficiência de remoção de NAT entre 1,48% a 3,52% e baixas concentrações de nitrato, variando na faixa de 2,1-5,12 mg/L.

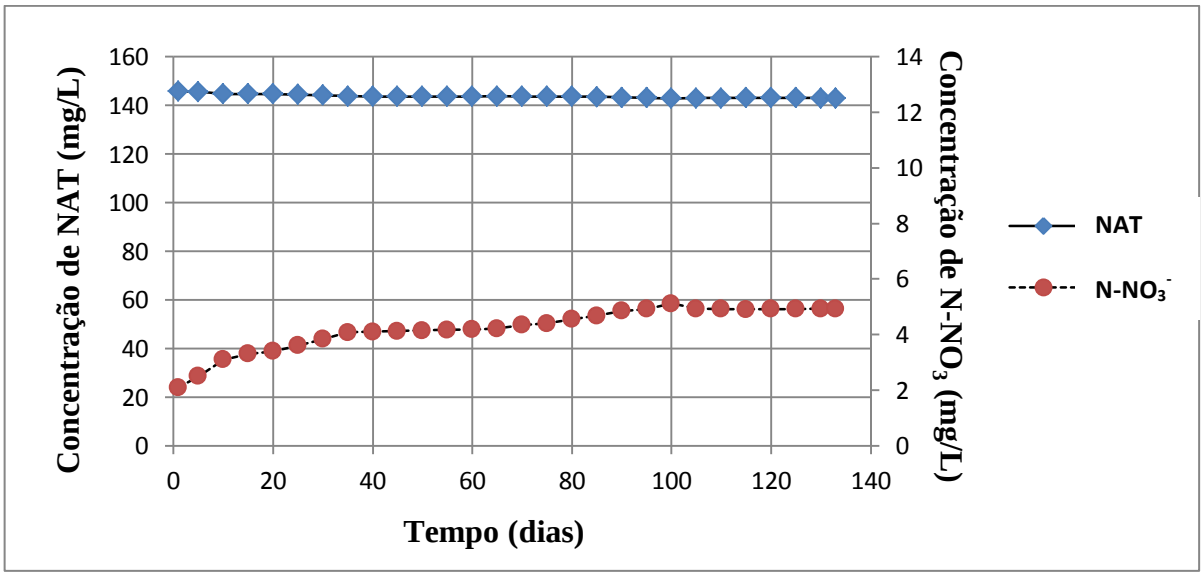

Figura 18- Concentração de nitrogênio amoniacal total (NAT) e nitrato ($N\text{-}NO_3^-$) do efluente durante o período de aclimatação em sistema em batelada. Concentração inicial= 152,44 mg N- NAT/L, TRH= 48 h e período experimental=133 dias.

Os valores de nitrito não foram mensurados, conforme descrito anteriormente no item 4.3.

Nestes experimentos o *stripping* ou arraste da amônia, resultou em média de 4,37 mg/L de nitrogênio amoniacal total durante o período de 48 horas, ou seja uma batelada, sendo este valor descontado dos resultados de eficiência de remoção de NAT.

A eficiência de nitrificação aumentou, mesmo que minimamente durante todo o período de operação do sistema em batelada, atingindo seu máximo no 100° dia, onde foi possível obter o máximo na produção de nitrato (5,12 mg/L).

A baixa eficiência de nitrificação neste sistema pode ser explicada de acordo com os estudos de Anthonisen et al. (1976) e Kin et al. (2008), que verificaram que a presença de altas concentrações de amônia no reator tornam-se tóxicas às bactérias nitrificantes, diminuindo a eficiência de oxidação das formas de nitrogênio. Em sistemas de batelada, como este, uma grande carga de nitrogênio amoniacal é despejada de uma única vez no reator, o que por sua vez, fazem que as bactérias nitrificantes não consigam atingir seu máximo de eficiência, pois ocorre um aumento na concentração de NAT. Segundo Anthonisen et al. (1976), a presença de amônia seja em seu estado livre ou ionizada, na concentração mínima de 0,1-10 mg/L é capaz de inibir as bactérias oxidantes de nitrito, logo, com esta inibição não ocorrerá a formação de nitrato e a nitrificação torna-se ineficiente.

5.1.2 Biorreator em sistema contínuo

Após a tentativa de aclimatação realizada em sistema em batelada, a biomassa restante deste sistema foi transferida para um biorreator em sistema contínuo, onde se juntou a uma nova biomassa mista. O biorreator contínuo foi operado, como forma de avaliar se a eficiência da nitrificação aumentaria, já que neste, não ocorrem aumentos nas concentrações de NAT no reator, pois o meio se renova aos poucos, evitando à geração de toxicidade a biomassa nitrificante. Segundo Bolmann, French e Laanbrock, (2011), o sistema contínuo é o mais indicado para a realização de tratamentos biológicos, como no caso da nitrificação, pois sua semelhança com as condições naturais favorecem a aclimatação dos micro-organismos, contrastando com o sistema em batelada.

A Figura 19 apresenta os resultados obtidos durante a etapa da aclimatação da nova biomassa em sistema contínuo, durante o período de 45 dias de operação. Neste sistema, os resultados obtidos de nitrogênio amoniacal total do efluente variaram entre 95,12 mg/L a 123,54 mg/L e a concentração de nitrato variou entre 5,47 mg/L-33,87 mg/L.

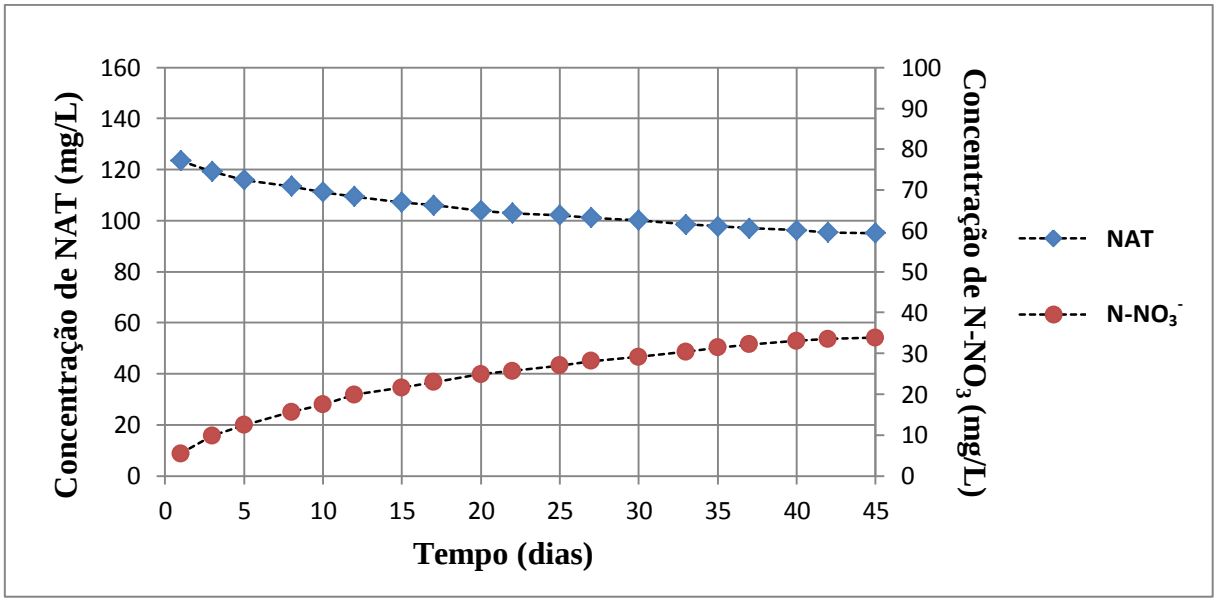

Figura 19- Concentração de nitrogênio amoniacal total (NAT) e nitrato ($N\text{-}NO_3^-$) do efluente durante o período de aclimatação em biorreator contínuo. Concentração inicial= 152,44 mg NAT/L, TRH =48 h e período experimental= 45 dias.

Nesta conformação de reator foi possível observar que a concentração de nitrogênio amoniacal total diminuiu continuamente para a formação de nitrato, que aumentou durante todo o período. A perda de amônia por arraste neste experimento foi, em média, 23,1 mg/L de nitrogênio amoniacal total, durante o período de retenção de 48 horas, sendo este valor descontado dos resultados.

A eficiência da oxidação de nitrogênio amoniacal total foi calculada e resultou na variação de 4,48% a 26,45%, durante o período de aclimatação. O que representa que o valor máximo de eficiência da oxidação de NAT neste sistema, se comparado ao sistema anterior operado em batelada foi 7,5 vezes maior, durante o período de tempo de aproximadamente 3 vezes menor. Confirmando, como citado anteriormente por Bolmann, French e Laanbrock (2011), que o sistema contínuo favoreceu a eficiência da nitrificação. Logo, este sistema foi escolhido para a continuação dos ensaios, pois em menor período de tempo, este conseguiu obter os maiores valores de conversão de nitrogênio amoniacal a nitrato.

5.2 TESTES COM A ADIÇÃO DE CLORETO AO SISTEMA PARA A AVALIAÇÃO DA NITRIFICAÇÃO

A adição de cloreto ao sistema ocorreu conforme descrito na Tabela 6. Para cada regime salino, as concentrações de nitrogênio amoniacal e nitrato foram monitoradas, a fim de avaliar a oxidação de nitrogênio amoniacal a nitrato, ou seja, a atividade da biomassa nitrificante.

A Figura 20 ilustra os resultados da concentração de nitrogênio amoniacal total do afluente e efluente no biorreator, durante os regimes salinos. A concentração de nitrogênio amoniacal total do efluente variou entre 41,25 mg/L a 117,06 mg/L.

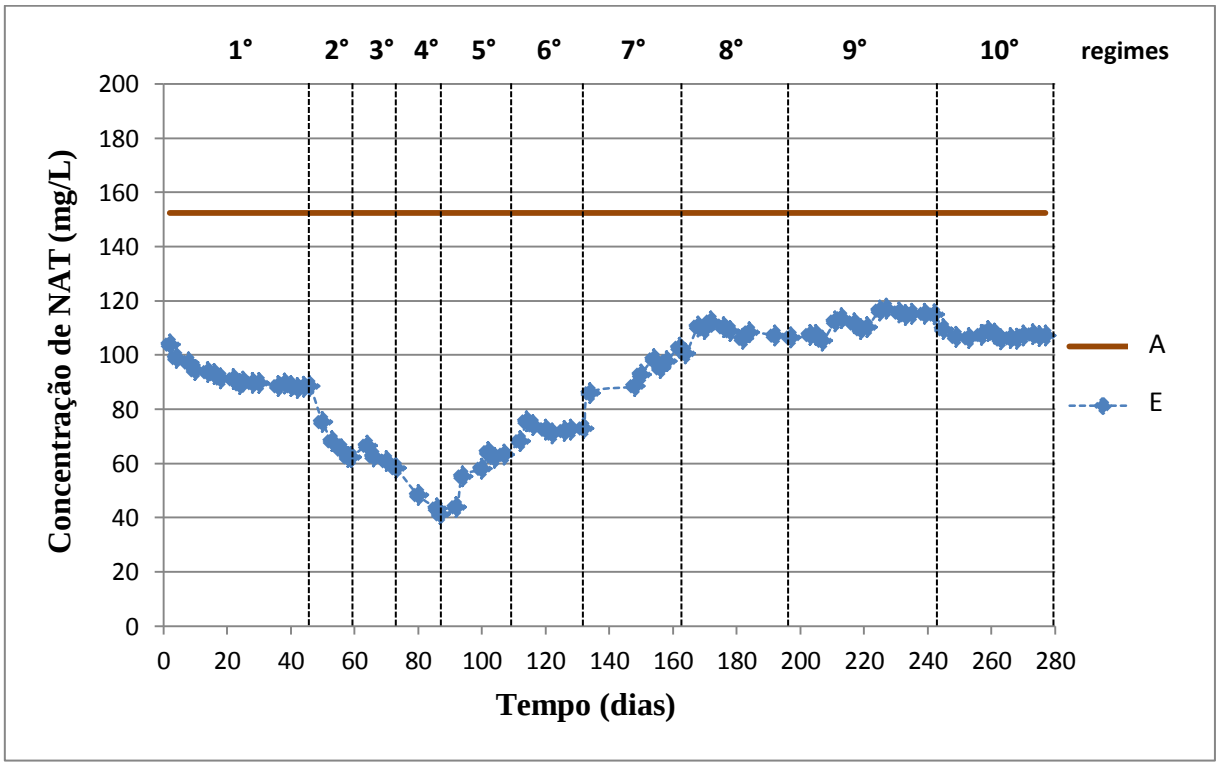

Figura 20- Concentração de NAT do efluente em cada regime salino, operando em sistema contínuo. Concentração inicial= 152,44 mg NAT/L, TRH= 48 h, período experimental= 277 dias.

Legenda: A= Afluente e E= efluente. Regimes (mg Cl^-/L):1°=100, 2°= 250, 3°=500, 4°= 1.000, 5°= 2.000, 6°= 4.000, 7°= 8.000, 8°= 10.000, 9° = 15.000 e 10°= 8.000.

Os valores de eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal total foram calculados conforme o (item 4.4.1). A eficiência de remoção de NAT na presença de íon cloreto variou entre 9,49% a 68,11%.

Em estudos de Rosa e colaboradores (1998), a eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal foi investigada na presença de alta concentração salina, utilizando biomassa fixa em um biofiltro aerado submerso. A eficiência da oxidação de NAT com concentração inicial de 66 mg Cl^-/L e com o período de retenção de 15 horas foi de 94% em 16 dias de operação. E com a adição salina de 30.000 mg Cl^-/L foi verificado que a eficiência reduziu, representando 48%, para o mesmo período de operação. Este valor de eficiência diante de uma elevada concentração salina só foi possível devido à formação do biofilme, que permitiu a aderência e favoreceu o crescimento das bactérias nitrificantes, ou seja, aumentando a eficiência da nitrificação. Pois, em um sistema de biomassa suspensa como utilizado neste

experimento, no regime de 15.000 mg Cl^-/L, a eficiência de oxidação de amônia representou a metade do que foi obtido por Rosa e colaboradores (1998), com a adição de 30.000 mg Cl^-/L.

A Figura 21 ilustra os resultados de saída do biorreator da concentração de nitrato. A concentração de nitrato de saída variou entre 7,22 mg/L a 84,31 mg/L, durante o período de operacional de 277 dias.

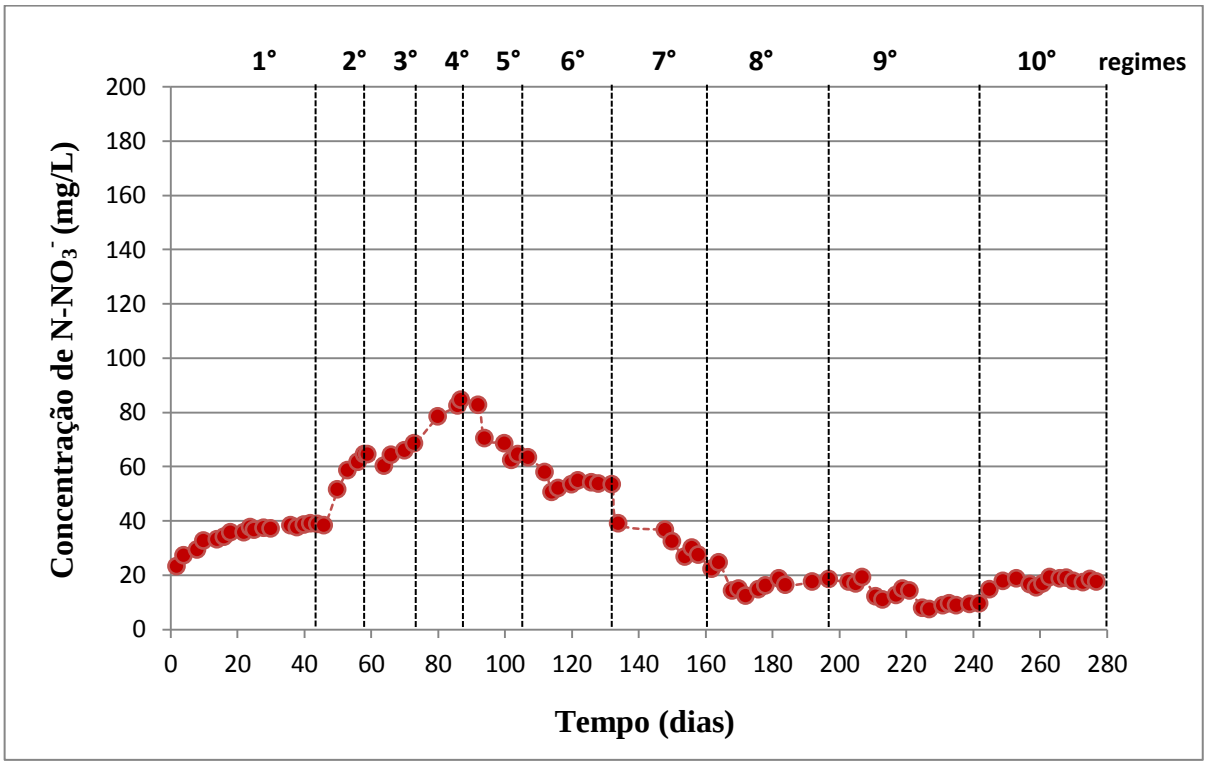

Figura 21- Concentração de saída de $N\text{-}NO_3^-$ para cada regime salino operando em sistema contínuo. Concentração inicial= 152,44 mg NH_4^+/L, TRH= 48 h, período experimental= 277 dias.

Legenda: Regimes (mg Cl^-/L):1°=100, 2°= 250, 3°=500, 4°= 1.000, 5°= 2.000, 6°= 4.000, 7°= 8.000, 8°= 10.000, 9° = 15.000 e 10°= 8.000.

Durante o 1° ao 4° regime compreendendo a faixa de (100 mg Cl^-/L a 1.000 mg Cl^-/L), foi possível observar que a adição de cloreto ao sistema favoreceu a oxidação de nitrogênio amoniacal, e consequentemente na formação de maiores concentrações de nitrato. Ou seja, durante estes regimes salinos ocorreu um estímulo nas atividades das bactérias oxidantes de amônia e das bactérias oxidantes de nitrito, podendo ser observado nas altas concentrações de nitrato formado durante este período. No 4° regime salino (1.000 mg Cl^-/L) foram encontradas as maiores concentrações de nitrato, de todos os regimes estudados. A média de nitrato neste regime foi de 45,76 mg/L, sendo que a maior concentração de 84,31 $N\text{-}NO_3^-$ mg/L, foi obtida com 87 dias de operação.

Quando a adição de cloreto alcançou o 5° regime salino, a concentração de nitrogênio amoniacal no efluente tratado aumentou significantemente até o final dos dias de operação, logo, proporcionalmente a concentração de nitrato diminuiu. Ou seja, a concentração salina a partir de 2.000 mg/L a 15.000 mg/L, apresentou-se tóxica a ambos os grupos bacterianos de oxidantes de amônia e de nitrito, podendo ser observado nas baixas concentrações de nitrato.

O 10° regime foi adicionado ao experimento, como forma de avaliar se a biomassa após uma concentração salina de 15.000 mg/L, conseguiria retornar a sua atividade nitrificante como era anteriormente e atingir os mesmos níveis de formação de nitrato. Foi observado que a redução da concentração de cloreto adicionado ao reator no 10° regime, favoreceu na oxidação de NAT, reduzindo a concentração do mesmo no efluente tratado. E mesmo após a biomassa ter passado por uma baixa atividade metabólica resultante da toxicidade a altas concentrações de cloreto, esta mesma concentração de 8.000 mg Cl^-/L, aproximou-se dos valores na formação de nitrato, de quando testada anteriormente. A concentração de nitrato obtida para esta mesma concentração de cloreto obtida no 7° regime (em 158 dias de operação) foi de 27,23 mg/L e no 10° regime (em 263 dias de operação) foi de 18,97 mg/L, ou seja, a produção de nitrato neste último regime salino alcançou cerca de 70% do valor obtido no 7° regime.

O balanço de massa foi realizado durante todo o período experimental e foi verificado que a concentração de nitrogênio amoniacal oxidado é muito próximo ao somatório da concentração de $N\text{-}NO_3^-$ formado mais a concentração de nitrogênio destinado a biomassa. Supondo que a concentração de nitrito tenha apresentado pequenas concentrações durante os regimes que variaram entre 0-2 mg/L.

O estímulo verificado do 1° ao 4° regime (250 mg Cl^-/L a 1.000 mg Cl^-/L) pode ser explicado, segundo Mc Carty (1964), que descreve que baixas concentrações salinas podem estimular o metabolismo celular, até alcançar um ponto máximo de atividade celular. O que poderia ser visto, como o prosseguimento da aclimatação da biomassa à presença do sal. E que com o aumento da concentração salina, após este estágio de estímulo, como verificado a partir do 5° regime (2.000 mg Cl^-/L) a taxa metabólica decresceu, pois as concentrações passaram a apresentar-se tóxicas à biomassa.

A Figura 22 ilustra de forma detalhada a condição de estímulo e de toxicidade verificada em valores de eficiência de nitrificação.

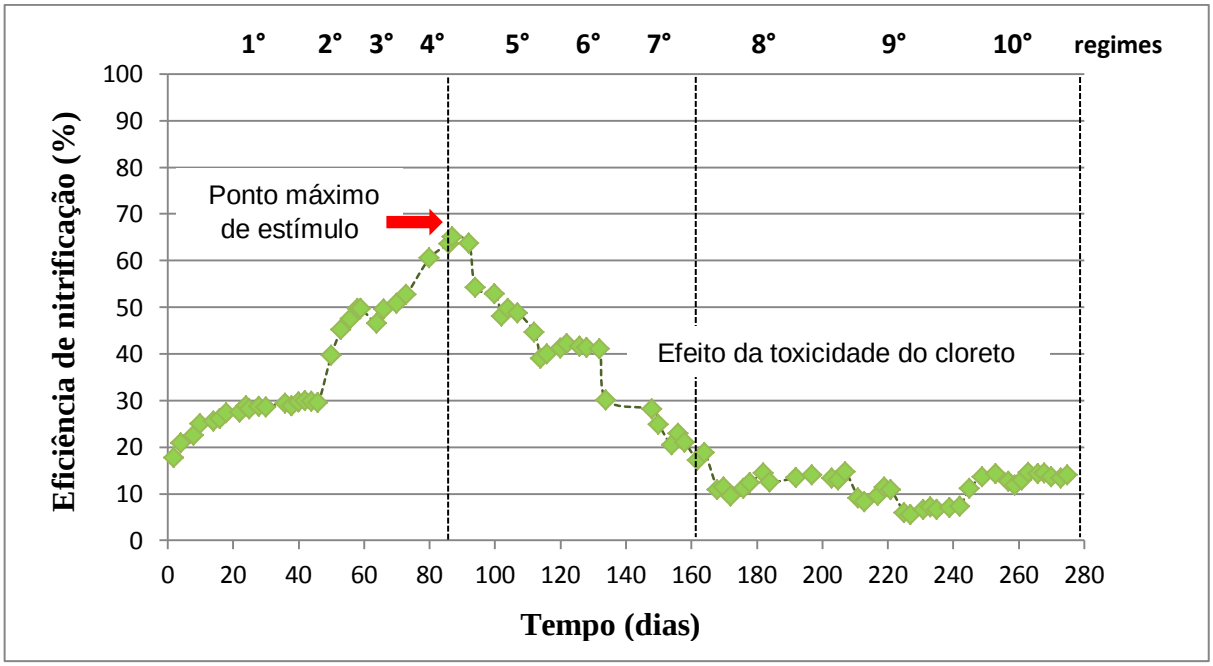

Figura 22- Eficiência da oxidação de nitrogênio amoniacal durante o período de operação dos regimes salinos. Concentração inicial= 152,44 mg NAT/L, TRH= 48 h, período experimental= 277 dias.

Legenda: Regimes (mg Cl^-/L) 1°= 100, 2°=250, 3°= 500, 4°= 1.000, 5°= 2.000, 6°= 4.000, 7°= 8.000, 8°= 10.000, 9° = 15.000 e 10°= 8.000.

A partir dos dados obtidos foi verificado que a eficiência de nitrificação variou na faixa de 5,58 % a 65,18 %, sendo que o seu maior valor foi obtido com 87 dias de operação, durante o 4° regime salino. A eficiência de nitrificação do 1° ao 4° regime salino aumentou em 35,15%. E com o aumento da concentração salina, menores níveis de eficiência foram obtidos, sendo o menor obtido em 227 dias de operação, durante o 9° regime salino (15.000 mg Cl^-/L).

Este estímulo do aumento da eficiência de nitrificação, verificado até o 4° regime salino, confirma o que foi relatado por González e colaboradores (2004). Que em seu estudo operando em sistema contínuo, verificaram que o aumento da concentração de cloreto de 0 mg/L para 3.000 mg/L, favoreceu o aumento da eficiência de nitrificação em 30%, e após este estágio, o aumento da concentração salina para 6.000 mg Cl^-/L provocou o decréscimo na atividade biológica da bactérias oxidantes de amônia. Verificando que o descrescimo ocorreu acentuadamente com o aumento da concentração salina, até a sua completa inibição obtida na concentração de 18.000 mg Cl^-/L.

Entretanto, não há como definir uma concentração de íon cloreto ideal que seja capaz de estimular a biomassa de uma maneira geral. Pois, segundo Moussa et al. (2006), a comparação de resultados sobre a nitrificação biológica de efluentes salinos é uma tarefa difícil, pois, cada estudo utiliza diferentes configurações de reatores e de variáveis, como:

temperatura, pH, adição de sal de forma gradual ou pulsada, uso de culturas de nitrificantes puras ou mistas, entre outras.

A fim de verificar a existência de uma correlação estatística entre a adição de cloreto e os resultados obtidos de nitrogênio amoniacal e nitrato foi realizado o teste de correlação de Pearson (conforme o item 4.4.4), ilustrado na Tabela 8.

Tabela 8- Resultados da Correlação de Pearson entre a adição salina e valores de NAT e NO_3^-. Intervalo de Confiança de 95% (p valor= 0,05%).

Concentração de íon cloreto (mg/L)	**NAT**		**NO_3^-**	
	Concentração média de NAT oxidado (mg/L)	**Correlação de Pearson**	**Média dos resultados de NO_3^- do efluente (mg/L)**	**Correlação de Pearson**
100 -250	60,36	+1	34,63	+1
250-500	82,16	+1	64,61	+1
500-1.000	108,48	+1	82,59	+1
1.000-2.000	91,81	-1	65,65	-1
2.000-4.000	80,05	-1	53,57	-1
4.000- 8.000	57,98	-1	30,46	-1
8.000-10.000	44,42	-1	16,55	-1
10.000-15.000	40,65	-1	12,5	-1
15.000-8.000	45,24	-1	17,37	-1

A partir dos resultados obtidos com o teste de correlação de Pearson, pode-se afirmar que a adição de íon cloreto até a concentração de 1.000 mg/L favoreceu a oxidação da amônia e a produção de nitrato, visto que para ambas, a correlação foi positiva. No entanto, quando a concentração no reator passou a ser 2.000 mg Cl^-/L e até a concentração de 15.000 mg Cl^-/L, a correlação apresentou-se negativa, ou seja, quanto maior for a concentração salina a partir do 5° regime (2.000 mg Cl^-/L), menor serão as concentrações de amônia oxidada e de nitrito, logo, menor será a eficiência de nitrificação no sistema.

A correlação negativa no 10° regime é explicada, devido à concentração salina ter reduzido para 8.000 mg Cl^-/L, refletindo no aumento dos valores de oxidação de NAT e NO_3^-, ou seja, afirmando que a redução da concentração de íon cloreto no reator, favoreceu a nitrificação.

O período de adaptação da biomassa inicialmente foi realizado em torno de 14 dias de operação, do 1° ao 4° regime salino. Este período de tempo foi adotado segundo a metodologia proposta por Moussa et al. (2006), sendo considerado o período de tempo ideal, para a realização da mudança da concentração salina. No entanto, como a concentração salina apresentou-se em menores concentrações durante os regimes 1° ao 4°, acredita-se que pode ter ocorrido durante este período, a continuação da aclimatação da biomassa nitrificante.

No entanto, a partir do 5° regime, o período pré-estabelecido de operação de cada regime foi aumentado, pois com o aumento das concentrações de íon cloreto no biorreator foi verificado que o período estabelecido anteriormente de 14 dias era mínimo para avaliação da atividade nitrificante, pois a mesma necessitaria um período maior para que os valores de nitrificação fossem constantes a tal condição salina. Esta situação confirma o que foi relatado por Ye et al. (2009), que quanto maior for a concentração salina, maior será o período de tempo para a recuperação da biomassa e o retorno da sua atividade metabólica.

Segundo Dincer e Kargi (1996), a determinação do período de adaptação da biomassa é uma das grandes dificuldades encontradas no sistema de tratamento biológico de efluentes salinos. A alta sensibilidade da biomassa as rápidas mudanças de carga iônica refletem diretamente na cinética de degradação de nutrientes (DINCER; KARGI, 1996).

O balanço de massa do material nitrogenado foi realizado como descrito no (item 4.4.2). Segundo Sant'anna Junior (2010), estima-se que 2% do nitrogênio amoniacal do afluente são convertidos em constituinte celular, ou seja, em biomassa nitrificante. Neste caso, esta fração consistiu de 3,05 mg N/L (2%), considerando a concentração de nitrito desprezível no sistema.

5.3 AVALIAÇÃO DA BIOMASSA

5.3.1 Concentração de sólidos

O monitoramento do volume da biomassa foi realizado durante todos os regimes salinos. O volume inicial de biomassa na concentração de 100 mg/L de cloreto (fornecido pelo meio de cultura) foi em média de 1.300 mg/L de SST e de 760 mg/L de SSV. Sendo, que quando ocorreu o aumento da concentração salina, atingindo o máximo da concentração testada (15.000 mg/L), obteve-se a menor concentração de sólidos, variando em média de 360 mg/L de SST e de 120 mg/L de SSV, ou seja, o volume de SST reduziu em 72,31% e o volume de SSV reduziu em 84,21% da condição inicial.

Na Figura 23 pode-se observar a variação média da concentração de sólidos durante cada regime salino testado.

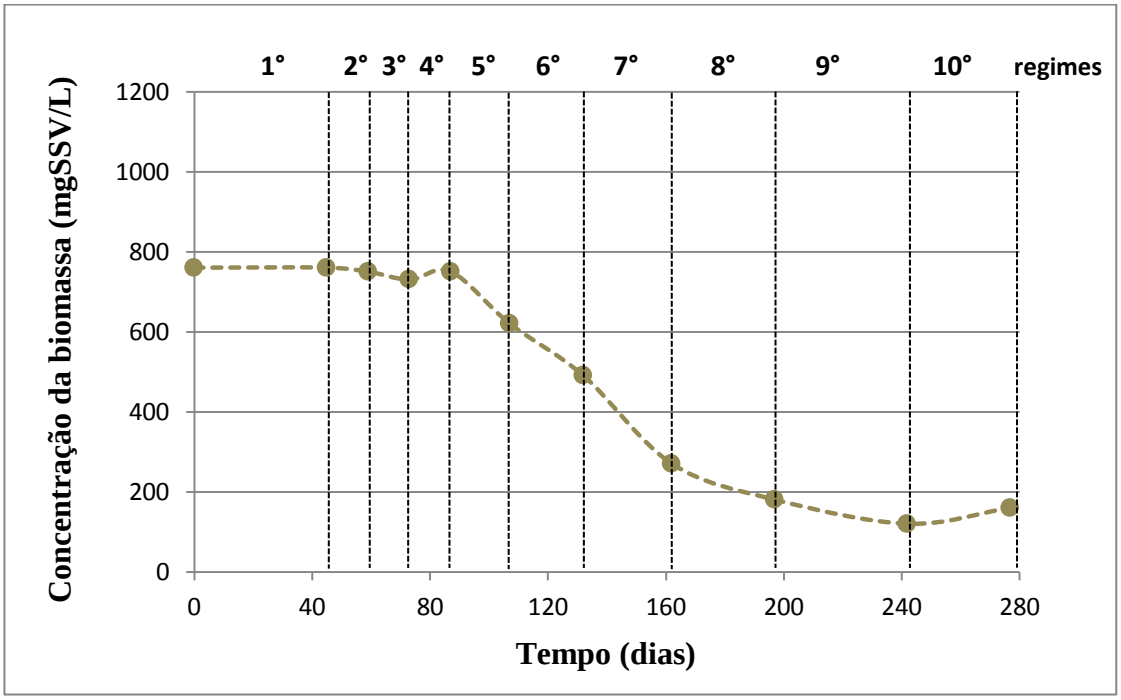

Figura 23- Concentração de sólidos presentes durante o período experimental.

Com o auxílio da Figura 23, pode-se observar que o volume de SSV se manteve em concentrações próximas a concentração inicial até o 4° regime salino e quando a adição de 2.000 mg Cl^-/L foi realizada no 5° regime, houve uma queda progressiva do volume de sólidos até a concentração de 15.000 mg Cl^-/L. No entanto, quando foi testado o 10° regime com a redução para 8.000 mg Cl^-/L foi verificado que a concentração de sólidos teve uma pequena elevação em sua concentração, que representou cerca de 33% de aumento na concentração de SSV em relação ao 9° regime salino.

5.3.1 Microscopia ótica da biomassa

A microscopia da biomassa foi realizada durante todo o período experimental, como forma de analisar os flocos bacterianos, a variedade e a abundância dos micro-organismos diante da toxicidade produzida pelo cloreto. Segundo Jenkins, Richard e Daigger (1993), a microscopia constitui uma ferramenta indispensável no monitoramento das características da biomassa do lodo ativado, a fim de evitar problemas operacionais, como o *bulking* filamentoso.

A Tabela 9 apresenta os resultados das observações realizadas durante o período experimental, baseando-se na ficha de avaliação microbiológica para lodos ativados, desenvolvida por Jenkins, Richard e Daigger (1993), que utiliza valores numéricos para representar a abundância dos micro-organismos (descrito detalhadamente no item 4.6).

Tabela 9- Resultados das microscopias realizadas durante os regimes salinos

Micro-organismos	**Abundância**									
	Concentração (mg CL^-/L)									
	100	**250**	**500**	**1.000**	**2.000**	**4.000**	**8.000**	**10.000**	**15.000**	**8.000**
Bactérias Livres	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1
Bactérias Filamentosas	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Protozoários Ameboides	3	2	2	2	2	1	1	1	1	1
Protozoários Ciliados Livres	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1
Protozoários Ciliados Fixos	3	3	3	3	3	1	1	1	1	2
Fungos	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Metazoários	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
Algas	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0

Legenda: (0) ausente, (1) poucos, (2) comuns, (3) muito comuns, (4) abundantes, (5) excessivos.

Em relação às bactérias presentes no sistema foi verificado que as bactérias livres foram comuns da concentração salina de 100 mg/L até 1.000 mg/L, após esta concentração foi observado que poucos destes organismos foram encontrados no sistema. Já, as bactérias filamentosas estavam presentes durante todos os regimes salinos. Segundo Motta et al. (2001), existe a necessidade do equilíbrio entre as bactérias formadoras de flocos e as filamentosas, pois a presença de poucos filamentos, pode levar à baixa resistência do lodo e a quebra dos flocos biológicos. A Figura 24 ilustra o aspecto do lodo biológico na concentração salina de 1.000 mg Cl^-/L, sendo o período mais favorável a atividade biológica no presente estudo.

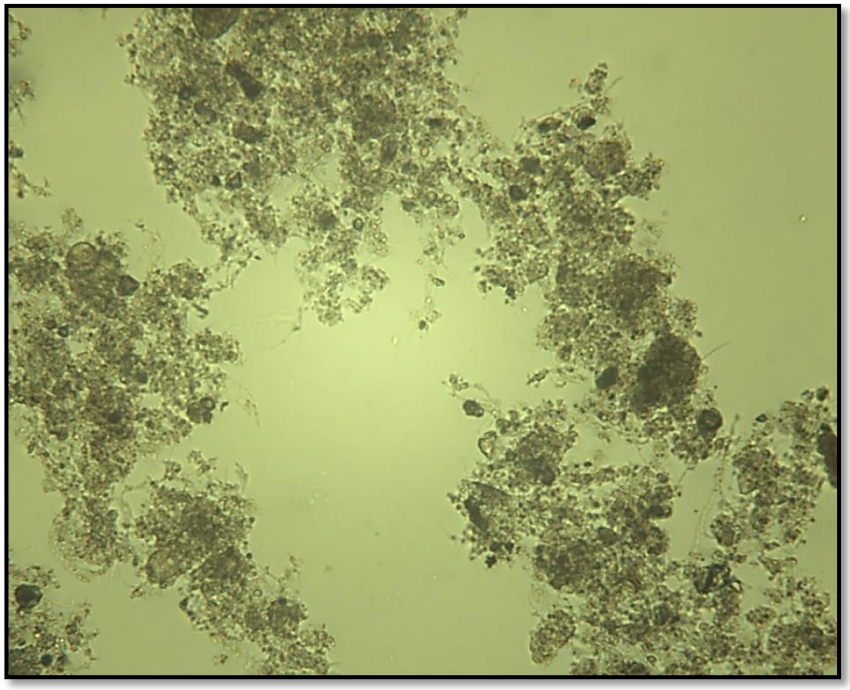

Figura 24- Microscopia do lodo ativado na concentração salina de 1.000 mg/L (aumento de 100x).

O aspecto do lodo ativado na concentração de 1.000 mg Cl^-/L apresentou-se de maneira ideal, de acordo com Jenkins, Richard e Daigger (1993). Apresentando flocos densos, equilíbrio entre as bactérias formadoras de flocos e as bactérias filamentosas e não verificado o excesso de filamentos, que poderia levar ao fenômeno de intumescimento do lodo. Entretanto, com o aumento da concentração salina após a 1.000 mg Cl^-/L, os flocos microbianos apresentaram maior desagregação, ou seja, os flocos foram visualizados apresentando menores diâmetros. Este efeito está relacionado intimamente com o aumento da concentração salina no reator, sendo já observado em estudos de Deorsola (2006).

Os protozoários de maneira geral foi o grupo de micro-organismos mais encontrados na biomassa de lodo ativado estudada. Os protozoários ameboides foram muito comuns encontrados na concentração de 100 mg Cl^-/L, após esta concentração estes organismos reduziram sua população até o final dos regimes. Confirmando, o observado em estudo de Figueiredo e Domingues (1997), que a abundância de amebas refere-se a um lodo jovem, como característica de início de operação.

A redução dos micro-organismos com o aumento da concentração salina, também ocorreu com os protozoários ciliados livres e fixos. Entretanto, foi observado que quando a concentração salina foi retornada de 8.000 mg Cl^-/L, o número de ciliados fixos aumentou, sendo o único grupo de micro-organismo que apresentou aumento, com retorno da concentração salina.

Em estudo Salvadó e colaboradores (2001), verificaram o efeito da adição de cloreto nas comunidades de protozoários do lodo ativado. Operando em regime em batelada, o sal foi testado em concentrações de 1.820, 3.000, 6.000, 12.000 e 24.000 mg Cl^-/L. Os resultados demostraram que os protozoários suportaram a concentração de 3.000 mg Cl^-/L sem reduzir sua população, no entanto, o decréscimo foi observado em 6.000 mg Cl^-/L, sendo um acentuado decréscimo em 12.000 mg Cl^-/L, até o seu desaparecimento observado em 24.000 mg Cl^-/L.

Comparando os resultados obtidos no experimento com os de Salvadó et al. (2001), até a concentração de 2.000 mg Cl^-/L não ocorreu redução da população, sendo esta iniciada em 4.000 mg Cl^-/L, a sua acentuada redução foi observada até o último regime estudado, ou seja, 15.000 mg Cl^-/L. Logo, conclui-se que os protozoários de maneira geral são resistentes a uma ampla concentração salina, estando presentes até em 15.000 mg Cl^-/L. A Figura 25 e a Figura 26 ilustram as imagens capturadas por microscopia dos protozoários encontrados no sistema.

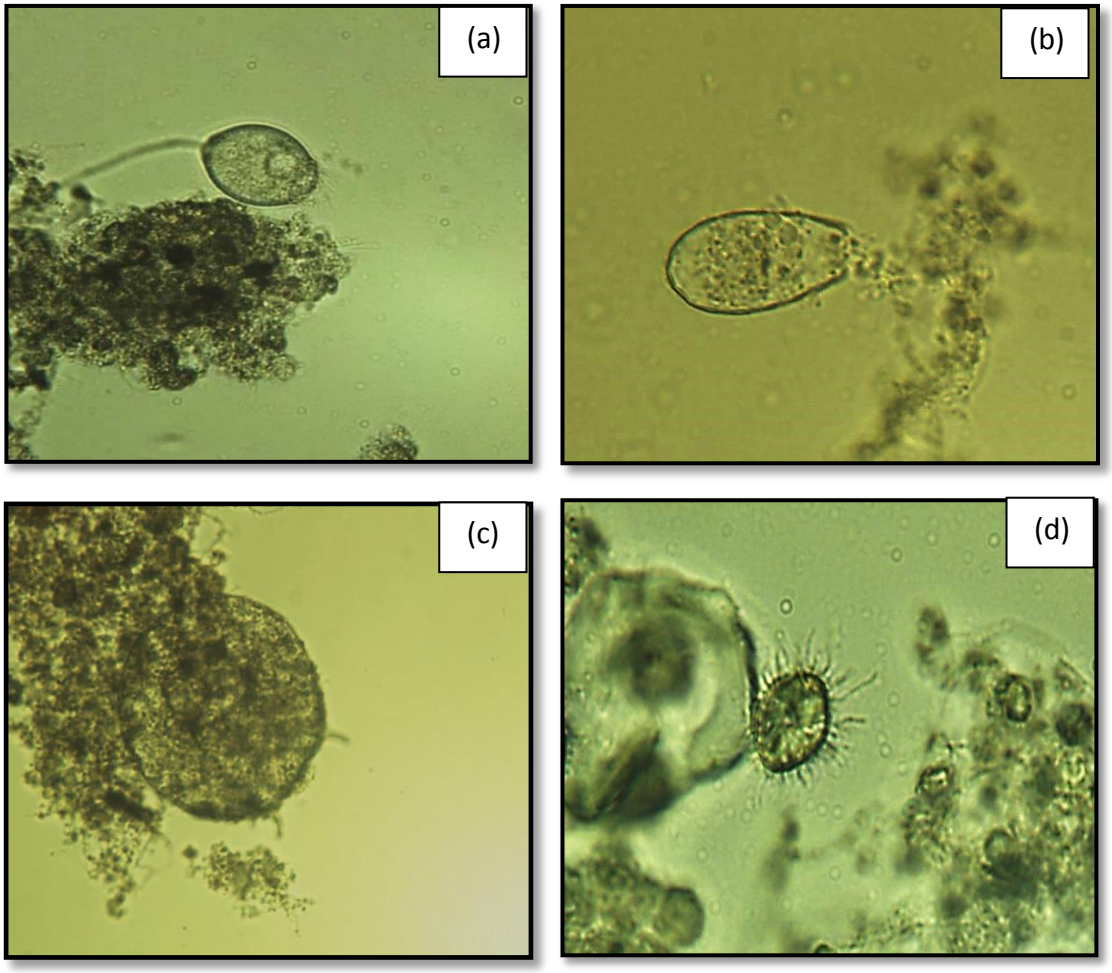

Figura 25- Protozoários encontrados durante os regimes salinos. (a) *Vorticella sp.*(aumento 200x)- presente do 1° ao 8° regime salino, (b) *Euglypha sp.*(aumento 200x)- presente do 1° ao 4° regime salino, (c) *Centropyxis sp.*(aumento 400x)- presente do 1° ao 4° regime salino, (d) *Euplotes sp.* (aumento 200x)- presente somente no 4° regime salino

Figura 26- Protozoário do gênero *Thuricola*. (aumento 200x)- presente em todos os regimes salinos estudados.

Os fungos apresentaram-se ausentes durante quase todos os regimes salinos estudados, somente na concentração de 100 mg Cl^-/L, ou seja no período de aclimatação, foi observado poucos indivíduos. Confirmando, o que foi observado por More e colaboradores (2010), que os fungos são encontrados em sistemas biológicos de tratamento, entretanto, sua presença sempre é em menor número comparado aos outros grupos de organismos encontrados no lodo ativado.

Os metazoários foram encontrados durante o experimento, somente poucos indivíduos foram visualizados nas concentrações de 500 mg Cl^-/L e de 1000 mg Cl^-/L. A partir da concentração salina de 2.000 mg Cl^-/L, os mesmos apresentaram-se ausentes. Confirmando que foi relatado, segundo Jenkins, Richard e Daigger (1993), que os metazoários são os primeiros impactados com a presença de substância tóxicas no processo de lodo ativado, além de estarem associados a alta idade do lodo.

Na Figura 27 pode-se visualizar o metazoário encontrado no sistema na concentração de 1.000 mg Cl^-/L, com idade do lodo variando na faixa de 73 a 87 dias de operação.

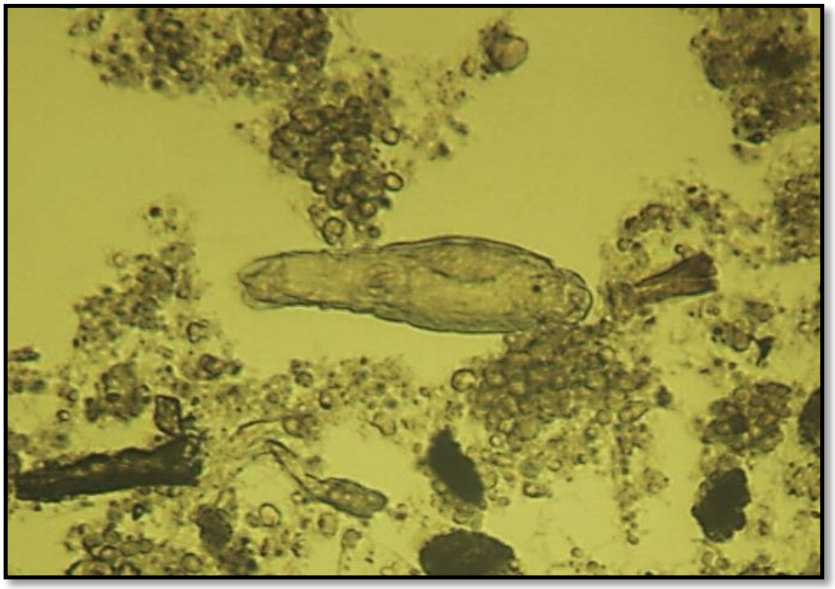

Figura 27- Espécie de Rotífero (aumento 200x), regime 1.000 mg Cl^-/L.

A presença de rotífero em sistema de nitrificação com idade do lodo avançada também foi verificada em estudos de Cybis e Horan (1997) que realizou o processo de nitrificação em sistema em batelada, verificando a presença de rotíferos, somente quando alcançou 80 dias de operação.

A presença de algas no lodo ativado apresentou-se pouca durante os regimes iniciais e rapidamente tornou-se ausente no sistema. Confirmando que segundo Jenkins, Richard e Daigger (1993), a presença de algas é considerada rara em sistemas de lodos ativados, pois seu crescimento é limitado, devido à deficiência de luz solar no reator. A Figura 28 ilustra a microscopia do gênero de alga encontrada no lodo ativado.

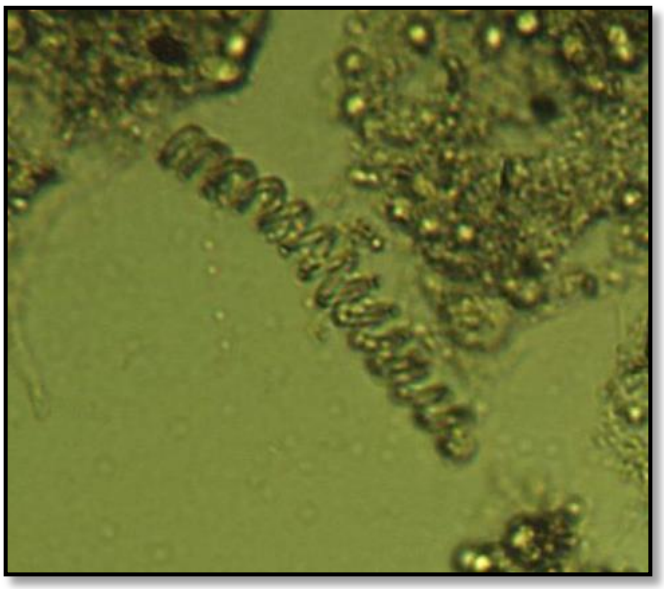

Figura 28- Alga *Spirulina sp.* (aumento 100x)- Regime 250 mg Cl^-/L.

As algas do gênero *Spirulina sp.* foram comumente encontradas no período de aclimatação, o que acredita-se que o lodo obtido da estação de tratamento teria contato com a luz solar. Durante o longo período experimental na ausência de luz solar, as algas permaneceram no sistema até 70 dias de operação do biorreator.

5.4 TESTES DE RESPIROMETRIA PARA A VERIFICAÇÃO DA TOXICIDADE DO ÍON CLORETO

Os testes de respirometria foram conduzidos em cada regime salino, com o objetivo de avaliar a atividade biológica dos micro-organismos oxidantes de amônia e nitrito, em relação à adição de tóxico, neste caso, o íon cloreto. Segundo Ricco e colaboradores (2004), a presença de compostos tóxicos em efluentes é capaz de gerar impactos negativos sobre a biomassa, como a redução do metabolismo microbiano em oxidar nutrientes.

Os testes de toxicidade são importantes aliados para a avaliação do desempenho do sistema de tratamento. O teste de respirometria destaca-se entre outros testes de toxicidade, devido a sua simplicidade e rapidez de seus resultados (RICCO et al., 2004).

A taxa de consumo de oxigênio (OUR) e a taxa de consumo específico de oxigênio (SOUR) foram medidas para todos os regimes salinos. Os resultados dos testes respirométricos podem ser visualizados na Tabela 10.

Tabela 10- Valores da taxa de consumo de oxigênio (OUR) e de consumo específico de oxigênio (SOUR), para cada concentração salina testada.

Regime salino	**SSV média** ($mg.L^{-1}$)	**OUR média** ($mg\ O_2.L^{-1}.\ d^{-1}$)	**SOUR média** ($mg\ O_2.\ d^{-1}.mg\ SSV^{-1}$)
1° (100 mg Cl^-/L)	760	416,02	0,55
2° (250 mg Cl^-/L)	750	611,76	0,81
3° (500 mg Cl^-/L)	730	777,06	1,06
4° (1.000 mg Cl^-/L)	750	1.265,14	1,68
5° (2.000 mg Cl^-/L)	620	834,43	1,34
6° (4.000 mg Cl^-/L)	490	563,47	1,15
7° (8.000 mg Cl^-/L)	270	223,82	0,83
8° (10.000 mg Cl^-/L)	180	108,86	0,60
9° (15.000 mg Cl^-/L)	120	54,29	0,45
10° (8.000 mg Cl^-/L)	160	96,06	0,61

Os resultados obtidos da taxa de consumo de oxigênio podem ser comparados aos resultados alcançados por Moussa e colaboradores (2003), devido a utilização da mesma metodologia para a aclimatação da biomassa e a operação do reator apresentando os mesmos valores de temperatura de 30°C e de pH 7,5, entretanto, operando em sistema em batelada. A eficiência da atividade de respiração da biomassa nitrificante, foi calculada baseada na comparação de valores de OUR sem a adição de íon cloreto e com a adição de íon cloreto, nas concentrações de 10.000 e 15.000 mg Cl^-/L. Os valores de eficiência obtido por Moussa e colaboradores (2003) foram de 60% para a concentração de 10.000 mg Cl^-/L e 50% para a concentração de 15.000 mg Cl^-/L. Estes valores de eficiência apresentaram-se superiores quando comparamos com os valores obtidos neste experimento com as mesmas concentrações salinas. Para a concentração de 10.000 mg Cl^-/L a eficiência foi de 26,17% e para 15.000 mg Cl^-/L foi de 13,05%. O que pode ser explicado, verificando o período de aclimatação da biomassa utilizado por Moussa et al. (2003), que foi realizado no período de 4 anos. Confirmando, novamente que um longo período de aclimatação dos organismos nitrificantes, sem a presença de tóxicos é fundamental para alcançar altos valores de eficiência.

Com a obtenção da taxa de consumo de oxigênio (OUR) para cada regime salino foi possível a obtenção de alguns parâmetros cinéticos, que são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11- Valores de concentração de biomassa nitrificante (X_n), taxa de nitrificação (r_n) e taxa de crescimento máximo das nitrificante (μ) para cada regime salino testado.

Regime salino	**X_n (mg X_n/L)**	**r_n (mg/L/d)**	**μ (d^{-1})**
1° (100 mg Cl^-/L)	25,38	91,03	0,36
2° (250 mg Cl^-/L)	45,56	133,86	0,29
3° (500 mg Cl^-/L)	50,66	170,05	0,34
4° (1.000 mg Cl^-/L)	64,66	276,86	0,43
5° (2.000 mg Cl^-/L)	50,08	181,71	0,36
6° (4.000 mg Cl^-/L)	43,37	123,31	0,28
7° (8.000 mg Cl^-/L)	18,52	48,98	0,26
8° (10.000 mg Cl^-/L)	15,49	23,82	0,15
9° (15.000 mg Cl^-/L)	8,13	11,85	0,15
10° (8.000 mg Cl^-/L)	15,19	21,05	0,14

Na Tabela 11 pode-se analisar que a concentração de biomassa nitrificante (X_n) aumentou até o regime de 1.000 mg Cl^-/L, entretanto foi evidenciado que o aumento da concentração salina após esta concentração resultou na redução da biomassa. Foi verificado que a concentração de nitrificantes aumentou, com o decréscimo da concentração salina de 15.000 mg Cl^-/L para 8.000 mg Cl^-/L, atingindo um valor próximo ao anterior para esta concentração. Acredita-se, que o valor de concentração de biomassa de 18,52 mg/X_n/L que foi obtido no 7° regime, seria facilmente atingindo com o aumento do período de adaptação da biomassa no 10° regime.

A maior taxa de nitrificação (r_n) foi de 276,86 mg/L/d, obtida no 4° regime salino. As taxas de crescimento (μ) das bactérias nitrificantes variaram na faixa de (0,14-0,43 d^{-1}), sendo que as menores taxas foram obtidas com as maiores concentrações salinas testadas. Segundo Sant'anna Junior (2010), as taxas de crescimento da biomassa nitrificantes variam em média de 0,33-0,65 d^{-1}. A partir deste valor pode-se dizer que a biomassa teve um crescimento dentro da faixa esperada até o 8° regime salino, após este regime com o aumento da concentração salina foi evidente a toxicidade sobre a biomassa nitrificante.

Os valores obtidos para a taxa de consumo específico de oxigênio (SOUR) foram plotados em um gráfico, representado na Figura 29

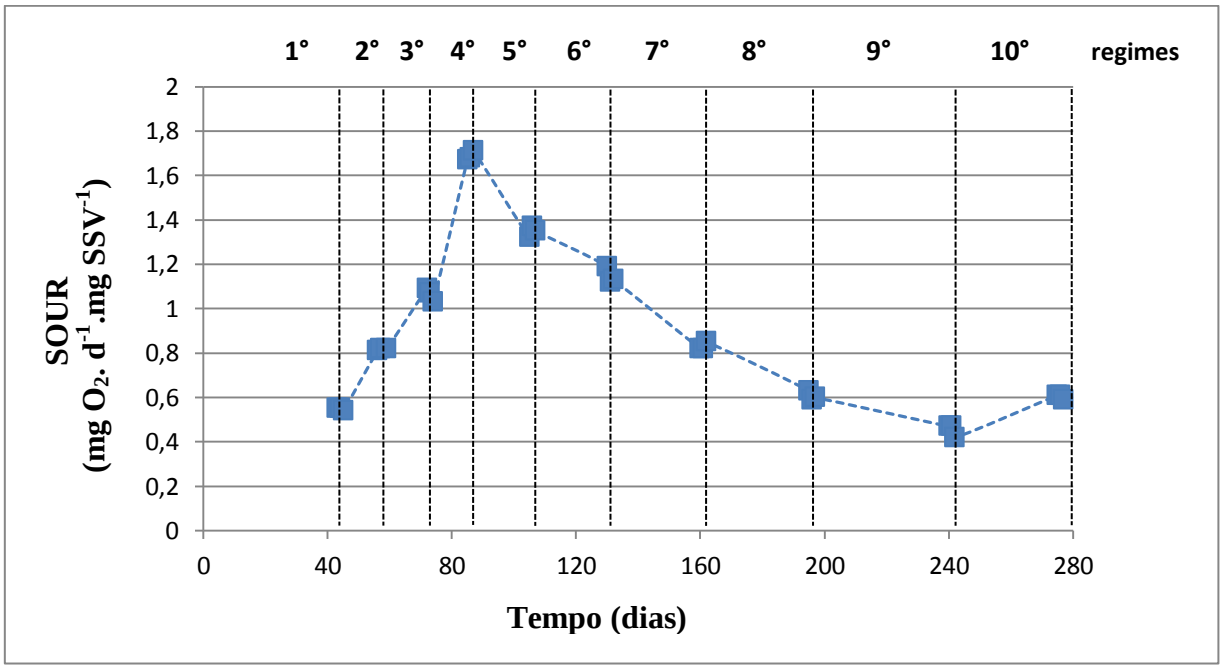

Figura 29- Taxa de consumo específico de oxigênio (SOUR) durante os regimes salinos.

Legenda: Regimes (mg Cl/L) 1° =100, 2°= 250, 3°=500, 4°= 1.000, 5°= 2.000, 6°= 4.000, 7°= 8.000, 8°= 10.000, 9° = 15.000 e 10°= 8.000.

Na Figura 29 pode-se visualizar que a concentração salina de 1.000 mg Cl^-/L, favoreceu a atividade celular da biomassa, que é verificada pelo aumento da taxa específica de consumo de oxigênio Este dado confirma os resultados apresentados anteriormente para a mesma concentração de cloreto, onde se obteve os maiores níveis de oxidação de amônia e formação de nitrato. O decréscimo da atividade de respiração da biomassa foi verificado a partir do 5° regime, quando a concentração alcançou 2.000 mg Cl^-/L e continuou reduzindo com o acréscimo da concentração de íon cloreto ao sistema.

Em estudos Costa e colaboradores (2003), analisaram um efluente proveniente de uma indústria química, com concentração de íon cloreto que variava entre 12.000-23.000 mg/L. O sistema foi operado em reator contínuo, com o tempo de retenção hidráulica de 20 horas, em uma temperatura de 35° C. O valor de SOUR médio obtido em uma biomassa mista foi de 0,14 mg O_2. d^{-1}.mg SSV^{-1}. Comparando os valores de SOUR obtido por Costa et al (2003), com os valores de SOUR obtidos neste experimento, pode-se afirmar que a taxa de consumo específico de oxigênio da biomassa nitrificante (0,45 mg O_2. d^{-1}.mg SSV^{-1}) foi superior a biomassa mista, quando a concentração salina foi de 15.000 mg Cl^-/L.

A fim de verificar uma relação estatística entre a adição de cloreto e a taxa de consumo específico de oxigênio da biomassa nitrificante, foi realizada a análise de correlação de Pearson para estas variáveis. A Tabela 12 ilustra os valores de correlação de Pearson entre os valores de cloreto e os valores de SOUR.

Tabela 12- Resultados da Correlação de Pearson entre a adição salina e valores de SOUR. Intervalo de Confiança de 95% (p valor= 0,05%).

Concentração de íon cloreto (mg/L)	**SOUR** (mg O_2. d^{-1}.mg SSV^{-1})	**Correlação de Pearson**
100-250	0,68	+1
250-500	0,93	+1
500-1.000	1,37	+1
1.000-2.000	1,51	-1
2.000-4.000	1,24	-1
4.000-8.000	0,99	-1
8.000-10.000	0,72	-1
10.000-15.000	0,52	-1
15.000-8.000	0,53	-1

A partir dos resultados obtidos com o teste de correlação de Pearson, pode-se confirmar que a adição de íon cloreto no biorreator foi favorável até a concentração de 1.000 mg/L. Quando o valor de Pearson se apresenta positivo, demonstra que a correlação foi positiva, ou seja, o aumento na concentração de cloreto favoreceu o aumento da atividade celular, observado através dos resultados de respirometria. No entanto, quando a adição de cloreto ultrapassa a concentração de 1.000 mg/L, a correlação apresentou-se negativa, ou seja, conforme ocorreu o aumento da concentração salina no reator, a atividade celular reduziu e a biomassa nitrificante apresentou dificuldades em sua respiração. Quando a concentração de íon cloreto foi reduzida de 15.000 mg/L para 8.000 mg/L no 9° regime, a correlação de Pearson apresentou-se negativa, pois a redução da concentração de cloreto favoreceu a atividade celular, ou seja, representando que com a redução de cloreto níveis maiores de atividade celular podem ser retomados.

5.4.1 Aplicação de modelo estatístico para a determinação da inibição total da atividade celular utilizando dados de respirometria

Na Figura 30 pode-se visualizar a distribuição dos valores de SOUR durante os regimes salinos na faixa de 1.000 a 15.000 mg/L . Os valores de SOUR apresentaram-se lineares, o que justifica o valor de r próximo a 1.

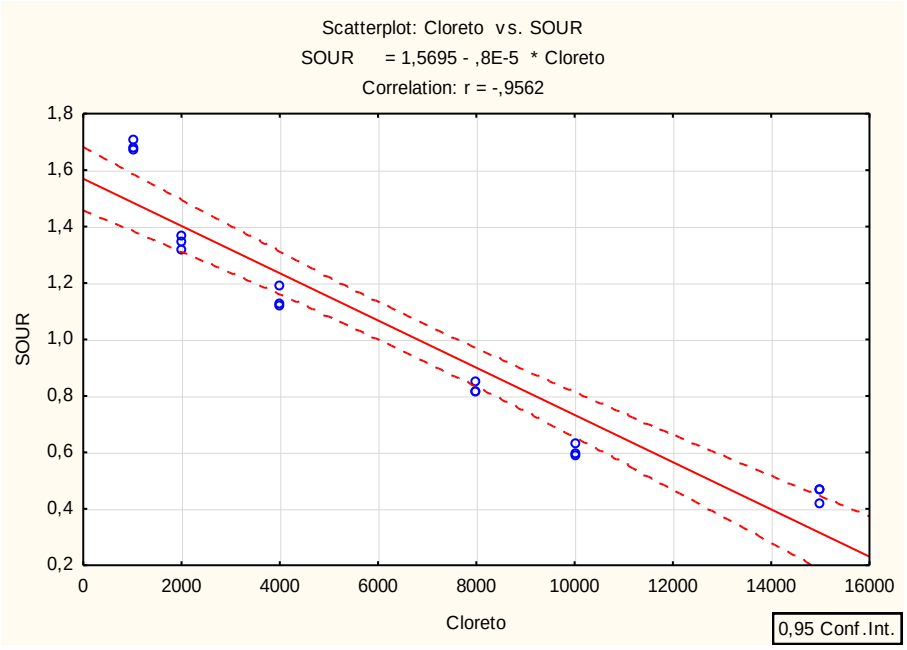

Figura 30- Resultados da Taxa de consumo específico de oxigênio (SOUR) em relação à concentração de íon cloreto presente no biorreator.

A equação da reta foi realizada com os valores de SOUR resultando em:

$$SOUR = 1{,}5695 - 8 \cdot 10^{-5} \cdot [\text{concentração de cloreto (mg/L)}]$$

A partir da equação da reta calculada para os valores de SOUR foi possível verificar quanto seria a concentração de cloreto necessária para que ocorresse a inibição total da respiração da biomassa, ou seja, a taxa de consumo específica de oxigênio fosse 0. O valor da concentração obtido pela equação foi de, aproximadamente, 19.620 mg Cl^-/L.

Diante dos resultados obtidos, verificou-se que a salinidade dependendo de sua concentração, poderá funcionar como um fator de estímulo ou de toxicidade a biomassa nitrificante do lodo ativado. Em concentrações estudadas acima de 1.000 mg Cl^-/L foi possível verificar a toxicidade do íon cloreto, quando observa-se a redução da taxa de consumo de oxigênio pela biomassa, acarretando em baixos níveis de remoção de nitrogênio amoniacal e na formação de nitrato.

6. CONCLUSÃO

Em relação à etapa de aclimatação da biomassa nitrificante, o sistema operado em biorreator contínuo apresentou maiores valores de eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal total e na formação de nitrato em um menor período de tempo, se comparado ao sistema em batelada.

A adição de íon cloreto até a concentração de 1.000 mg/L no sistema, não apresentou toxicidade a biomassa nitrificante, no entanto, o estímulo da atividade celular verificado até esta concentração, pode está relacionado com a continuação do período de aclimatação da biomassa ao sistema.

A máxima eficiência de nitrificação em sistema contínuo foi de 65,18%, sendo verificada em aproximadamente 90 dias de experimento, no biorreator operando com 1.000 mg Cl^-/L. Com o aumento gradual da concentração de cloreto após a concentração de 1.000 mg/L, os valores de eficiência reduziram, sendo que o menor valor de eficiência de nitrificação foi 5,58%, obtido no 9° regime salino, quando a concentração de íon cloreto encontrava-se em 15.000 mg/L.

Na avaliação da biomassa foi verificado que a concentração de sólidos suspensos voláteis apresentou valores bem próximos, até a concentração de 1.000 mg Cl^-/L. E com o aumento da concentração salina, foi verificado uma queda nos valores de SSV. Em relação à concentração da biomassa nitrificante, expressa por valores de (X_n), foi verificado o aumento de sua concentração até o 4° regime salino, onde se obteve a maior taxa de crescimento da biomassa (μ) de 0,43 d^{-1}. E a partir do 5° regime salino a sua concentração foi reduzida até a maior concentração salina testada.

O aspecto do lodo ativado até a concentração de 1.000 mg Cl^-/L apresentou-se de maneira ideal. Apresentando flocos densos, o equilíbrio entre as bactérias formadoras de flocos e as bactérias filamentosas e não foi verificado o excesso de filamentos. Entretanto, com o aumento da concentração salina após a 1.000 mg Cl^-/L, os flocos microbianos apresentaram maior desagregação, ou seja, os flocos apresentaram menores diâmetros. Este efeito nos flocos biológicos está relacionado intimamente com o aumento da concentração salina no reator, sendo já observados na literatura.

Os micro-organismos também se apresentaram abundantes até a concentração salina de 1.000 mg Cl^-/L. A presença de rotíferos, invertebrados superiores foi encontrada nas concentrações de cloreto de 500 mg/L e 1.000 mg/L. E sua ausência ocorreu após o aumento na concentração salina no reator. Os rotíferos são micro-organismos que apresentam uma alta

sensibilidade, sendo considerados bioindicadores, a sua ausência em sistemas de lodo ativado é verificado pela presença de compostos tóxicos.

A partir dos testes de respirometria, foi verificado que ambas as taxas de consumo de oxigênio (OUR) e de consumo especifico de oxigênio (SOUR), aumentaram significantemente até a concentração salina de 1.000 mg Cl^-/L. E com o aumento da concentração salina para 2.000 mg CL^-/L até a concentração 15.000 mg Cl^-/L, resultou na queda dos valores do consumo de oxigênio, ou seja, ocorrendo a redução da atividade metabólica da biomassa. No entanto, quando a concentração de 15.000 mg Cl^-/L foi reduzida para 8.000 mg Cl^-/L, que corresponde o 10° regime, foi verificado o aumento da taxa de consumo de oxigênio pela biomassa. Este aumento indica que a biomassa mesmo após sofrer uma forte redução da taxa metabólica, a redução da concentração salina favoreceu o aumento da atividade celular, ou seja, o efeito inibitório verificado com a concentração salina de 15.000 mg Cl-/L apresentou-se reversível.

A técnica de respirometria apresentou-se como uma ferramenta eficaz para a avaliação da toxicidade da biomassa do lodo ativado. Sendo capaz de detectar a queda da atividade celular na presença de compostos tóxicos, como o íon cloreto.

Por fim, justifica-se que as concentrações de íon cloreto testadas não atingiram os níveis encontrados em água de produção do petróleo, como proposto inicialmente. Pois, como observado nos resultados, o período de aclimatação da biomassa nitrificante para cada regime salino foi longo, devido à alta sensibilidade da mesma ao íon cloreto. Logo, o período de tempo foi um fator limitante para esta pesquisa. Sugerindo que para a realização de pesquisas futuras, um maior período de tempo será necessário para a aclimatação da biomassa nitrificante em concentrações de íon cloreto que alcancem a água de produção de petróleo.

7. REFERÊNCIAS

ANDREOTTOLA, G.; DE OLIVEIRA, E.L.; FOLADORI, P.; DALLAGO, L.; PETERLINI, R.; CADONNA, M. Método respirométrico para o monitoramento de processos biológicos. **Eng. Sant. Ambient**., v.10 , n.1, p. 14-23, 2005.

ANTHONISEN, A.C.; LOEHR, R.C.; PRAKASAN, T.B.S.; SRINATH, E.G. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. **Journal Water Pollution Control Federation,** v.48, n.5, p. 835-852, 1976.

ANTILEO, C.; ASPÉ, E.; ZAROR, C.; URRUTIA, H.; MARTÍ, M. C.; ROECKEL, M. Differential bacterial growth kinetic and nitrification of fisheries wastewaters containing high ammonium and organic matter concentration by using pure oxygen. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 3, p. 241-244, 1997.

APHA. **Standard Methods for the examination of water and wastewater**. 19 ed. American Public Health Association/American Water Works Association, Washington, 1995.

AZETSU-SCOTT, K.; YEATS, P.; WOHLGESCHAFFEN, G.; DALZIEL, J.;NIVEN. S.; LEE, K. Precipitation of heavy metals in produced water: Influence on contaminant transport and toxicity. **Marine Environmental Research**, v.63, n.2, p. 146-167, 2007.

BENTO, A.P.; SEZERINO, P.H.; PHILIPPI, L.S.; REGINATTO, V.; LAPOLLI, F.R. Caracterização da microfauna em estação de tratamento de esgotos do tipo lodos ativados: um instrumento de avaliação e controle do processo. **Eng. Sanit. Ambient.**, v. 10, n. 4, p. 329-338, 2005.

BOLLMANN, A.; FRENCH, E.; LAANBROCK, H.J. Isolation, cultivation and characterization of ammonia oxidizing bacteria and archaea adapted to low ammonium concentrations. In: KLOTZ, M.G. (Ed). **Methods in enzymology**, Research on nitrification and related process, part A. California, Academic Press, 2011. v. 486.

BRASIL. Resolução CONAMA n° 393, de 08 de agosto de 2007. Dispõe sobre o descarte contínuo de água de processo ou de produção em plataformas marítimas de petróleo e gás natural. **Diário Oficial da União**. Brasil, 2007. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/ legiabre.cfm?codlegi=541>. Acesso em: 12 jan. 2014.

BRASIL. Resolução CONAMA n° 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamentos de efluentes, complementa e altera a Resolução CONAMA n° 357, de 17 de março de 2005. **Diário Oficial da União**. Brasil, 2011. Disponível em: <http://www. mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>. Acesso em: 14 mar. 2014.

BUDAY, J.; DRTIL, M.; HUTNAN, M.; DERCO, J. Substrate and products inhibition of nitrification. **Chem. Papers**, v. 53, n.6, p. 379-383, 1999.

BUENO, R.F.; PIVELI, R.P.; CAMPOS, F. Monitoramento da atividade bacteriana heterotrófica em um sistema de lodos ativados com aeração prolongada por meio de respirometria. In: Congresso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. 33., 2012. **Saneamento Ambiental: a excelência da gestão como estratégia de sustentabilidade.** Salvador: AIDIS, 2012.

ÇAKMAKCE, M.; KAYAALP, N.; KOYUNCU, I. Desalination of produced water from oil production fields by membrane process. **Desalination**, v.222, n. 1-3, p. 176-186, 2008.

CAMPOS, J.C. **Processos combinados aplicados ao tratamento de água de produção de petróleo**. Rio de Janeiro, 2000.Tese (Doutorado em Engenharia Química)- Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2000.

CAMPOS, J.C.; BORGES, R.M.H.; OLIVEIRA FILHO, A.M.; NOBREGA, R.; SANT'ANNA JR, G.L. Oilfield wastewater treatment by combined microfiltration and biological processes. **Water Research**, v. 36, p. 95-104, 2002a.

CAMPOS, J.L.; GARRIDO, J.M.; MOSQUERA-CORRAL, A.; MÉNDEZ, R. Stability of a nitrifying activated sludge reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v.35, n.1, p. 87-92, 2007.

CAMPOS, J.L.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, J.M.; MÉNDEZ, R.; LEMA, J.M. Nitrification at high ammonia loading rates in an activated sludge unit. **Bioresource Technology**, v.68, p. 141-148, 1999.

CAMPOS, J.L.; MOSQUERA-CORRAL, A.; SÁNCHEZ, M.; LEMA, J.M. Nitrification in saline wastewater with high ammonia concentration in an activated sludge unit. **Water Research**, v. 36, p. 2555-2560, 2002b.

CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Microbiologia para sistemas de lodos ativados operando em esgotos domésticos.** Norma Técnica L1-025, 1985.

CHARLEY, R.C.; HOOPER, D.G.; MCLEE, A.G. Nitrification kinetics in activated sludge at various temperature and dissolved oxygen concentration. **Water Research**, v. 14, n. 10, p. 1387-1396, 1980.

CHEN, G-H.; WONG, M-T.; OKABE, S.; WATANABE, Y. Dynamic response of nitrifying activated sludge batch culture to increased chlorite concentration. **Water Research**, v. 37, p. 3125-3135, 2003.

CLARK, C.E.; VEIL, J.A. Argonne National Laboratory. Produced water volumes and management practices in the United States. In: **U.S Departament Energy.** ANL/EVS/R-09/1, 2009.

COSTA, F.C.; RODRIGUES, F.A.M.; FONTOURA, G.A.T.; CAMPOS, J.C.; SANT'ANNA JUNIOR, G.L.; DEZOTTI, M. Tratamento do efluente de uma indústria química pelo processo de lodos ativados convencional e combinado com carvão ativado. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 8, n° 4, p. 274-284, 2003.

COULIBALY, L.; GOURENE, G.; AGATHOS, N.S. Utilization of fungi for biotreatment of raw wastewater. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 12, p. 620-630, 2003.

CYBIS, L.F. DE A.; HORAN, N.J. Protozoan and Metazoan populations in sequencing batch reactors operated for nitrification and/or denitrification. **Water Science and Technology**, v. 35, n.1, p. 81-86, 1997.

DAL FERRO, B.; SMITH, M. Global onshore and offshore water production. **Oil & Gas Review**, 2007.il.

DALZELL, D.J.B.; ALTE, S.; ASPICHUETA, E.; DE LA SOTA, A.; ETXEBARRIA, J.; GUTIERREZ, M.; HOFFMANN, C.C.; SALES, D.; OBST, O.; CRISTOFI, N. A comparison of five rapid direct toxicity assessment methods to determine toxicity of pollutants to activated sludge. **Chemosphere**, v. 47, p. 535-545, 2002.

DEORSOLA, A.B. **Influência dos cátions (sódio, potássio, cálcio e magnésio) no tratamento biológico de efluentes**. Rio de Janeiro, 2006, Tese (D.Sc. Engenharia Química), COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006.

DESMOND, E. Reducing salts: A challenge for the meat industry. **Meat Science**, v. 74, p. 188-196, 2006.

DINCER, A. R.; KARGI, F. Salt inhibition kinetics in nitrification of synthetic saline wastewater. **Enzyme and Microbial Techonology**, v.28, p. 661-665, 2001.

DÓREA, H.S.; BISPO, J.R.L.; ARAGÃO, K.A.S.; CUNHA, B.B.; NAVICKIENE, S.; ALVES, J.P.H.; ROMÃO, L.P.C; GARCIA, C.A.B. Analysis of BTEX, PAHs and metals in the oilfield produced water in the state of Sergipe, Brazil. **Microchemical Journal**, v.85, p. 234-238, 2007.

ECKENFELDER, W.W. **Industrial Water Pollution Control**. Singapore: McGraw Hill, 1989.

FAKHRU´L-RAZI, A.; PENDASHTEH, A.; ABDULLAH, L.C.; BIAK, D.R.A.; MADAENI, S.S.; ABIDIN, Z.Z. Review of technologies for oil and gas produced water treatment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 170, p. 530-551, 2009.

FERREIRA, E. S. Cinética química e fundamentos dos processos de nitrificação e desnitrificação biológica. In: Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental, 17, 2000. **Las Américas y la acción por el médio ambiente em el milenio**. Rio Grande do Sul: AIDIS, 2000.

FIGUEIREDO, M.G.; DOMINGUES, V.B. **Microbiologia dos lodos ativados**. CETESB, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. São Paulo, CETESB, 1997.

FLYNN, S.; BUTTLER, J.; VANCER, I. Produced water composition, toxicity and fate. In: REED, M.; JOHNSEN, S. (Ed.). **Produced water 2**: Environmental issues and mitigation technologies. 1. Ed. Nova York, Plenun Press, 1996.

FOLADORI, P.; ANDREOTOLLA, G.; ZIGLIO, G. **Sludge reduction Technologies in wastewater tretament plants**. London, IWA Publishing, 2010.

GERARDI, M. **Nitrification and denitrification in the activated sludge process**. New York, Wiley, 2002.

GERARDI, M. **Wastewater bacteria**. Wastewater microbiology series. New Jersey, Wiley, 2006.

GHARSALLAH, N.; KLANNOUS, L.; SAISSI, N.; NASRI, M. Biological treatment of saline wastewater from marine-products processing factories by a fixed-bed reactor. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 77, p. 865-870, 2002.

GINESTET, P.; AUDIC, J-M.; URBAIN, V.; BLOCK, J-C. Estimation of nitrifying bacterial activities by measuring oxygen uptake in the presence of the metabolic inhibitors allylthiourea and azide. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 6, p. 2266-2268, 1998.

GINORIS, Y.P.; AMARAL,A.L.; NICOLAU, A.; COELHO, M.A.Z.; FERREIRA, E.C. Development of an image analysis procedure for identifying protozoa and metazoa typical of activated sludge system. **Water Research,** v. 41, n.12, p. 2581-2589, 2007.

GLYMPH, T. **Wastewater microbiology**: A handbook for operators. American Water Works Association, EUA, 2005.

GONZÁLEZ, F.; MOSQUERA-CORRAL, A.; CAMPOS, J.L.; MÉNDEZ, R. Effect of salt in a partial nitrification reactor. In: European Symposium on Environmental Biotechnology, **Enviromental Biotechonology**. London: ESEB, 2004.

GUEST, R.K.; SMITH, D.W. A potencial new role for fungi in a wastewater MBR biological nitrogen reduction system. **Journal of Environmental Engineering and Science**, v.1, n.6, p. 433-437, 2002.

HENDERSON, S.B.; GRIGSON, S.J.W.; JOHNSON, P.; RODDIE, B.D. Potential impact of production chemicals on the toxicity of produced water discharges from North Sea oil platforms. **Marine Pollution Bulletin**, v. 38, n.12, p. 1141-1151, 1999.

HENZE, M.; VAN LOOSDRECHT, M.; EKAMA, G.; BRDJANOVIC, D. (Ed.). **Fundamentals of Biological wastewater treatment**. Cambridge, IWA Publishing, 2008.

HOPPER, A. B.; TERRY, K.R. Specific inhibitors of ammonia oxidation in *Nitrosomonas*. **Journal of Bacteriology**, v. 115, n.2, p. 480-485, 1973.

HORAN, N. Microbiology of wastewater treatment. MARA, D.; HORAN, N. (Ed.). **The handbook of water and wastewater microbiology**. California, Academic press, 2003.

HULT, S.; ALLER, R.C.; CANFIED, D.E.; DALSGAARD, T; ENGSTROM, P.; GILBERT, F.; SUNDBACK, K; THAMDRUP, B. Nitrogen removal in marine environments: recent findings and future research challenges. **Marine Chemistry**, v.94, p. 125-145, 2005.

IGUNNU, E.T.; CHEN, G.Z. Produced water treatment technologies. **International Journal of Low-Carbon Technologies**, p.1-21, 2012.

INAMDAR, S.T.A. **Biochemical Engineering**: Principles and concepts. 2 ed. New Delphi, PHI Learning, 2008, il.

JANG, D.; HWANG, Y.; SHIN, H.; LEE, W. Effects of salinity on the characteristics of biomass and membrane fouling in membrane bioreactors. **Bioresource Technology**, v.141, p. 50-56, 2013.

JENKINS, D.; RICHARD, M.G.; DAIGGER, G.T. **Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming**. 2 ed. Michigan, Lewis publishers, 1993.

JORDÃO, E.P.; PESSÔA, C.A. Processo e grau de tratamento. In:_____. **Tratamento de esgotos domésticos**. 3 ed. Rio de Janeiro, ABES, 1995, p. 47-55.

JULIASTUTI, S.R.; BAEYENS, J.; CREEMERS, C. Inhibition of nitrification by heavy metals and organic compounds: the ISO 9509 test. **Environmental Engineering Science**, v. 20, n.2, p. 79-90, 2003.

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

KELLAND, M.A. Introduction and environmental issues. In:_____. **Production chemical for the oil and gas industry**. USA, CRC Press, 2009, p. 1-16.

KIM, D-J.; LEE, D-I.; CHA, G-C.; KELLER, J. Analysis of free ammonia inhibition of nitrite oxidizing bacteria using a dissolved oxygen respirometer. **Environ. Eng. Res**., v. 13, n. 3, p. 125-130, 2008.

KIM, I.S.; KIM, S.; JANG, A. Activity monitoring for nitrifying bacteria by fluorescence in situ hybridization and respirometry. **Environmental Monitoring and Assessment,** v. 70, p. 223-231, 2001.

KONG, Z.; VANROLLRGHEM, P.; WILLEMS, P.; VERSTRAETE, W. Simultaneous determination of inhibition kinetics of carbon oxidation and nitrification with a respirometer. **Water Research**, v.30, n.4, p. 825-836, 1996.

KONIG, A.; RIEDEL, K.; METZGER, J.W. A microbial sensor for detecting inhibitors of nitrification in wastewater. **Biosensors and Bioeletronics**, v.13, p. 869-874, 1998.

KRAEMER, T.F.; REID, D.F. The occurrence and behavior of radium in saline formation water of the U.S Gulf Coast region. **Isotope Geoscience**, v. 2, p. 153-174, 1984.

LEFEBVRE, O.; MOLETTA, R. Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: A literature review. **Water Research**, v. 40, p. 3671-3682, 2006.

LUDZACK, F.J.; NORAN, D.K. Tolerance of high salinities by conventional wastewater treatment process. **Journal Water Pollution Control Federation**, v.37, n.10, p. 1404-1416, 1965.

MA, H.; WANG, B. Electrochemical pilot-scale plant for oil field produced wastewater by M/C/Fe electrodes for injection. **Journal of Hazardous Material**, v.132, p. 237-243, 2006.

MADONI, P. A sludge biotic index (SBI) for the evaluation of the biological performance of activated sludge plants based on the microfauna analysis. **Water Research**, v. 28, n. 1, p. 67-75, 1994.

MADONI, P. **Biological approach to sewage treatment process**: current status and perspectives. Department of Territorial and Environmental Studies. Itália, Luigi Bazzucchi Center, 1991.

MAIER, R.M. Bacterial growth. In: MAIER, R.M.; PEPPER, I.L.; GERBA, C.P. **Environmental microbiology**. 2ed. California, Academic Press, 2009.

MASSONE, A.G.; GERNAY, K., BOGAERT, H. VANDERHASSELT, A.; ROZZI, A.; VERSTRAETE, W. Biosensors for nitrogen control in wastewaters. **Water Science Technologies**, v. 34, p. 213-220, 1996.

MCCARTY, P.L. Anaerobic waste treatment fundamentals. **Public Words**, v.95, 1964.

MESQUITA, D.P.; AMARAL, A.L.; FERREIRA, E.C. Activated sludge characterization through microscopy: a review on quantitative image analysis and chemometric techniques. **Analytica Chimica Acta**, v.802, p. 14-28, 2013.

METCALLF, EDDY. **Wastewater Engineering**: treatment and reuse. TCHOBANOGLOUS, G.; BURTON, F.L.; STENSEL, D.H. (Ed.). USA, MC Gray Hill Companies Inc., 2003.

MORE, T.T.; YAN, S.; TYAGI, R.D.; SURAMPALLI, R.Y. Potencial use of filamentous fungi for wastewater sludge treatment. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7691-7700, 2010.

MOTTA, M.; PONS, M.N.; ROCHE, N.; VIVIER, H. Characterisation of activated sludge by automated image analysis. **Biochemical Enginnering Journal**, v. 9, p. 165-173, 2001.

MOUSSA, M.S.; LUBBERDING, H.J.; HOOIJMANS, C.M.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; GIJZEN, H.J. Improved method for determination of ammonia and nitrite oxidation activities in mixed bacterial cultures. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 63, p. 217-221, 2003.

MOUSSA, M.S.; SUMANASEKERA, D.U.; IBRAHIM, S.H.; LUBBERDING, H.J.; HOOIJMANS, C.M.; GIJZEN, H.J.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M. Long term effects of salt on activity, population structure and floc characteristics in enriched bacterial cultures of nitrifies. **Water Research**, v. 40, p. 1377-1388, 2006.

NASCENTES, A.L. **Tratamento combinado de lixiviado de aterro sanitário e esgoto doméstico**. Rio de Janeiro, 2013. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos)- Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013.

NEFF, J.; LEE, K.; DEBLOIS, E.M. Produced water: Overview of composition, fates and effects. In: LEE, K.; NEFF, J. (Ed.). **Produced water**: environmental ricks and advanced in mitigation technologies. Nova York, Springer, 2011.

NEFF, J.M.; RABALAIS, N.N.; BOECH, D.F. Offshore oil and gas development activities potentially causing long-term environmental effects. In: BOECH, D.F.; RABALAIS, N.N. (Ed.). **Long-term environmental effects of offshore oil and gas development**. New York, Elsevier Applied science publishers Ltd, 1987, p. 149-174.

OGP. Fate and effects of naturally occurring substances in produced water on the marine environment. **International Association of oil & gas producers**. Report n. 364, 2005. Disponível em: < http://www.ogp.org.uk/pubs/364>. Acesso em: 10 jan. 2014.

OGP. Production water treatment: current and emerging technologies. **International Association of oil & gas producers**. Reports, n. 211, 1994.

OREN, A. The bioenergetic basis for the decrease in metabolic diversity at increasing salt concentration: implications for the functioning of salt lake ecosystems. In: MELACK, J.M.; JELLISON, R.; HERBST, D.B. (Ed.). **Saline lakes**. Netherland, Kluwer Academic Publishers, 2001, p. 61-72.

PAINTER, H.A. A review of literature on inorganic nitrogen metabolism in microorganisms. **Water Research**, v.4, p. 393-450, 1970.

PROSSER, J.I. Autotrophic nitrification in bacteria. In: ROSE, A.H.; TEMPEST, D.W. (Ed.). **Advances in microbial physiology**. California, Academic press, 1989, v.30.

PUJOL, R.; CANLER, J.P. Biosorption and dynamics of bacterial population in activated sludge. **Water Research**, v. 26, n. 2, p. 209-212, 1992.

REID, E.; LIU, X.; JUDD, S.J. Effects of high salinity on activated sludge characteristics and membrane permeability in an immersed membrane bioreactor. **Journal of membrane science**, v. 283, n.1-2, p. 164-171, 2006.

REZENDE, C.L.; BEAL, L.L.; GIUSTINA, S.V.D.; AVRELLA, M.; LOVATEL, E.R. Respirometria aeróbia como ferramenta para avaliação de toxicidade- Estudo de caso nitrogênio. In: Congresso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. 33., 2012. **Saneamento Ambiental: a excelência da gestão como estratégia de sustentabilidade.** Salvador: AIDIS, 2012.

RICCO, G.; TOMEI, M. C.; RAMADORI, R.; LAERA, G. Toxicity assessment of common xenobiotic compounds on municipal activated sludge: comparison between respirometry and Microtox. **Water Research**, v. 38, p. 2103-2110, 2004.

ROSA, M.F.; FURTADO, A.A.L.; ALBURQUERQUE, R.T.; LEITE, S.G.F.; MEDRONHO, R.A. Biofilm development and ammonia removal in the nitrification of a saline wastewater. **Bioresource**, v. 65, p. 135-138, 1998.

ROZICH, A.F; GAUDY JR, A.F**. Design and operation of activated sludge processes using respirometry**. Michigan, Lewis Publishers, INC., 1992.

ROZICH, A.F; GAUDY JR, A.F. Process technology for the biological treatment of toxic organic wastes. In: LOREZEN, D (Ed.). **Hazardous and industrial solid waste testing and disposal**. 6 ed., USA ,1986.

ROZICH, A.F; GAUDY JR, A.F.; D'ADAMO, P.C. Selection of growth rate model for activated sludge treating phenol. **Water Research**, v.19, n. 4, p. 481-490, 1985.

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

SALVADÓ, H.; MAS, M.; MENÉNDEZ, S.; GRACIA, M.P. Effects of shock load of salt on protozoan communities of activated sludge. **Acta Protozoologica**, v.40, p. 177-185, 2001.

SANT'ANNA JUNIOR, G.L. **Tratamento biológico de efluentes**: fundamentos e aplicações. Rio de Janeiro, Interciência, 2010.

SANTAELLA, S.T.; SILVA JÚNIOR, F.C.G.; GADELHA, D.A.C.; COSTA, K.O.; AGUIAR, R. ARTHAUD, I.D.B.; LEITÃO, R.C. Tratamento de efluentes de refinaria de petróleo em reatores com *Aspergillus niger*. **Eng. Sanit. Ambient**., v. 14, n. 1, p. 139-148, 2009.

SCHMITD, I.; SLIEKERS, O.; SCHMID, M.; BOCK, E.; FUERST, J.; KUENEN, J.G.; JETTEN, M.S.M.; STROUS, M. New concepts of microbial treatment process for the nitrogen removal in wastewater. **FEMS microbiology reviews**, v.27, p. 481-492, 2003.

SELL, N. J. Methods for water pollution control. In:_____. **Industrial pollution control**: Issues and techniques. 2 ed. USA, WILEY, 1992, 405 p.

SHAMMAS, N.K.; LIU, Y.; WANG, L.K. Principles and kinetics of biological process. In: WANG, L.K.; SHAMMAS, N.K.; HUNG, Y-T (Ed.). **Advanced biological treatment process**. Handbook of environmental engineering. New York, Humana Press, 2009, v.9, p. 1-54.

SHAMMAS, N.K.H. Interaction of temperature, pH and biomass on the nitrification process. **Journal Water Pollution Control Federation**, v. 58, n.1, p. 52-59, 1986.

SHARGHI, E.A.; BONAKDARPOUR, B.; ROUSTAZADE, P.; AMOOZEGAR, M.A.; RABBANI, A.R. The biological treatment of high salinity synthetic oilfield produced water in a submerged membrane bioreactor using a halophilic bacterial consortium. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v.88, p. 2016-2026, 2013.

SHARMA, B.; AHLERT, R.C. Nitrification and nitrogen removal. **Water Research**, v.11, p. 897-925, 1977.

SHI, X.; LEFEBVRE, O.; NG, K.K.; NG, H.Y. Sequential anaerobic-aerobic treatment of pharmaceutical wastewater with high salinity. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 79-86, 2014.

SIVAPRAKASAN, S.; MAHADEVAN, S.; SEKAR, S.; RAJAKUMAR, S. Biological treatment of tannery wastewater by using salt-tolerant bacterial strains. **Microbial Cell Factories**, v. 17, n. 15, p. 1-7, 2008. Disponível em: <http://www.microbialcell factories.com/content/7/1/15>. Acesso em: 07 jan. 2014.

SMOLDERS, G.J.F.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; HEIJEN, J.J. Stoichiometric model of the aerobic metabolism of the biological phosphorus removal process. **Biotechnol. Bioeng**., v. 44, p. 837-848, 1994.

SPANJERS, H. Respirometry in modeling and control of wastewater treatment. In: BARNETT, M.W.; STENSTROM, M.K.; ANDREWS, J.F. (edit.) Dynamics and control of wastewater systems. v. 6, 2 ed., Technomic Publish Company Inc., Pensilvania, EUA, 1998.

STEHLIK, P. Towards a complex approach to waste treatment in food processing. In: KLEMES, J.; SMITH, R.; KIN, J-K. (Ed.). **Handbook of water and energy management in food processing**. USA, CRC Press LLC, 2008.

STENSTROM, M.K.; PODUSKA, R.A. The effects of dissolved oxygen concentration on nitrification. **Water Research**, v. 14, p. 643-649, 1980.

STEWART, M.; ARNOLD, K.E. Produced water treatment system. In:_____. **Produced water: treatment field manual**. USA, Gult Professional Publish, 2011.

SUDARNO, U.; WINTER, J.; GALLERT, C. Effect of varying salinity, temperature, ammonia and nitrous acid concentrations on nitrification of saline wastewater in fixed-bed reactors**. Bioresource Technology**, v. 102, p. 5665-5673, 2011.

SUESCUN, J.; IRIZAR, I.; OSTOLAZA, X.; AYESA, E. Dissolved oxygen control and simultaneous estimation of oxygen uptake rate in activated-sludge plants. **Water Environment Research,** v. 70, n.3, p. 316-322, 1998.

SUNDARAPANDYAN, S.; CHANDRASEKAR, R.; RAMANAIAH, B.; KRISHNAN, S.; SARAVANAN, P. Electrochemical oxidation and reuse of tannery saline wastewater. **Journal of Hazardous Materials**, v. 180, p. 197-203, 2010.

TELLEZ, G.T. **Bioreclamation of New Mexico Oilfield Produced Wastewaters**: Characterization and Feasibility Study. Masters Thesis (Environmental engineering)- Civil Engineering Department, New Mexico State University,1991.

TELLEZ, G.T.; NIRMALAKHANDAN, N.; GARDEA-TORRESDEY, J.L. Performance evaluation of an activated sludge system for removing petroleum hydrocarbons from oilfield produced water. **Advanced in Environmental Research**, v. 6, p. 455-470, 2002.

TOMLINSON, T.G.; BOOM, A.G.; TROTMAN, C.N.A. Inhibition of nitrification in the activated sludge process of sewage disposal. **Journal Applied Bacteriology**, v.29, n.2, p. 266-291, 1966.

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

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

VAN HAANDEL, A; MARAIS, G. **O comportamento do sistema de lodo ativado**: teoria e aplicações para projetos e operação. Campina Grande, Epgraf, 1999, 488p.

VANROLLEGHEM P.A. Principles of respirometry in activated sludge wastewater treatment. **Biomath**, p. 1-19, 2002.

VAN HAANDEL, A.; VAN DER LUBBE, J.G.M. **Handbook of biological wastewater treatment**. Design and optimization of activated sludge systems. 2 ed. London, IWA Publishing, 2012.

VEGUEIRA, S.F.J.; GODOY, J.M.; MIEKELEY, N. Environmental impacts studies of barium and radium discharges by produced waters from the "Bacia de Campos" oil-field offshore platforms, Brazil. **Journal Environmental Radioactivity**, v.62, p.29-38, 2002.

VEIGA, M.C.; MÉNDEZ, R.; LEMA, J.M. Wastewater treatment for fisheries operation. In: MARTIN, A.M. (Ed.). **Fisheries Processing**: biotechnological applications. USA, Chapman & Hall, 1994, p. 344-369.

VEIL, J.; PUDER, M.G.; ELCOCK, D.; REDWEIK JR, R.J. A White paper describing produced water from production of crude oil, natural gas and coal bed methane. **U.S. Department of Energy.** Disponível em: <http://www.netl.doe.gov/publications/ oil_pubs/prodwaterpaper.pdf> 2004. Acesso em: 10 jan. 2014.

VON SPERLING, M. Basic principles of wastewater treatment. In:_____. **Biological wastewater treatment**. London: IWA Publishing, 2007, v.2.

VON SPERLING, M. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias**: Lodos ativados. 2. ed. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais- UFMG, 1997, v.4, 428 p.

WANG, L.K.; WU, Z.; SHAMMAS, N.K. Activated sludge process. In: WANG, L.K.; PEREIRA, N.C.; HUNG, Y-T (Ed.). **Handbook of environmental engineering**: biological treatment process, Nova York, Humana Press, 2009, v.8.

WIESMANN, U. Biological nitrogen removal from wastewater. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v.51, p. 113-154, 1994.

WILÉN, B.M.; ONUKI, M.; HERMANSSON, M.; LUMLEY, D.; MINO, T. Microbial community structure in activated sludge floc analysed by florescence in situ hybridization and its relation to floc stability. **Water Research**, v. 42, n. 8-9, p. 2300-2308, 2008.

WOODALL, D.W.; GAMBRELL, R.P.; RABALAIS, N.N.; DELAUNE, R.D. Developing a method of track oil and gas produced water discharges in estuarine systems using salinity as a conservative tracer. **Marine Pollution**, v. 42, n.11, p. 1118-1127, 2001.

YE, R.W.; THOMAS, S.M. Microbial nitrogen cycles: physiology, genomics and applications. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, n.3, p. 307-312, 2001.

ZEHN, J.P.; WARD, B.B. Nitrogen cycling in the ocean: new perspectives on processes and paradigms. **Applied and Environmental microbiology**, v.68, n.3, p. 1015-1024, 2002.