



## Remoção de nitratos de águas em biorreatores com suporte de sabugo de milho e espuma de poliuretano

### *Nitrates removal from water in bioreactors with corn cob and polyurethane foam media*

Thais da Silva<sup>1</sup>, Michelle Lynn Soupir<sup>2</sup>, Jesiane Stefânia da Silva Batista<sup>1</sup>, Elaine Macedo Stolle<sup>1</sup>, Ana Cláudia Barana<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

<sup>2</sup> Iowa State University, Ames, Iowa, EUA

Contato: [acbarana@uepg.br](mailto:acbarana@uepg.br)

#### Palavras-Chave

desnitrificação  
Biobob®  
NMP  
eutrofização

#### RESUMO

A presença de nitrato em corpos d'água pode causar danos ambientais e, se consumido, ao ser humano. Estudos mostram que biorreatores preenchidos com suportes orgânicos são eficientes na remoção de nitratos de águas de drenagem agrícola, que são ricas em nutrientes. Este trabalho teve como objetivo avaliar a remoção de nitratos em biorreator de leito fixo preenchido com dois tipos de meio suporte: R1 (Reator 1), com pedaços de sabugo de milho, e R2 (Reator 2), com pedaços de sabugo de milho e Mini Biobobs®. Os reatores foram alimentados com água de drenagem agrícola enriquecida com 20 mg.L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub> e operados com tempos de detenção hidráulica (TDH) de 96, 48, 24 e 16 horas. Observou-se que, com exceção dos ensaios com TDH = 16 h, todos os demais apresentaram efluente com concentração de N-NO<sub>3</sub> abaixo de 10 mg.L<sup>-1</sup>, que atende aos padrões exigidos pela legislação brasileira para potabilidade de água para consumo humano. Através da técnica de NMP constatou-se a presença de bactérias desnitrificantes em ambos os reatores, comprovando a remoção do nitrato pelo processo de desnitrificação heterotrófica. Pode-se concluir que os reatores estudados são eficientes na remoção de nitratos de águas.

#### Keywords

denitrification  
Biobob®  
MPN  
eutrophication

#### ABSTRACT

Nitrates in water bodies can cause environmental damages and to human being if consumed. Studies show that organic matter bioreactors are efficient to remove nitrates from agricultural drainage water, that are rich in nutrients. This work aimed to evaluate nitrates in fixed-bed reactors filled with two types of media: R1 (Reactor 1), with pieces of corn cob, and R2 (Reactor 2), with pieces of corn cob and Mini Biobobs®. The reactors were fed with agricultural drainage water enriched with 20 mg.L<sup>-1</sup> of N-NO<sub>3</sub> and operated with different hydraulic retention times (HRT) of 96, 48, 24 and 16 hours. It was observed that, with the exception of the tests with 16 h HRT, all the others showed effluent with N-NO<sub>3</sub> concentration below 10 mg.L<sup>-1</sup>, which meets the standards required by Brazilian legislation to potable water for human consumption. Through the MPN technique, the presence of denitrifying bacteria was verified in the two reactors, confirming the occurrence of heterotrophic denitrification in nitrates removal. It can be concluded that the studied reactors can remove nitrate from water.

#### Informações do artigo

Recebido: 07 de novembro, 2022

Aceito: 29 de julho, 2023

Publicado: 23 de agosto, 2023

## Introdução

O aumento dos níveis de nitrato nas águas tem se tornado um problema em todo o mundo. Segundo Husk et al. (2017), cerca de 40% do nitrogênio aplicado nos solos para cultivo agrícola é perdido para o ambiente e o nitrato, por ser um composto solúvel, é rapidamente perdido no escoamento superficial e lixiviado ao longo do perfil do solo (WANG e CHU, 2016). Altas concentrações de nitratos em ambientes aquáticos pode causar eutrofização, provocando depleção na concentração de oxigênio dissolvido, proliferação de algas e plantas, perda de biodiversidade e degradação ambiental.

O nitrato, além de ser um indicador de poluição difusa de águas subterrâneas, pois sua origem está associada a atividades agrícolas e esgotos sanitários, é considerado um dos principais responsáveis pela degradação de águas costeiras de todo o mundo. Está associado a efeitos nocivos para a saúde humana como a metahemoglobinemia infantil (síndrome do bebê azul). Nessa síndrome, bactérias presentes no trato digestivo convertem o nitrato a nitrito, que reage com hemoglobina formando a metahemoglobina, que diminui a capacidade do sangue de transportar oxigênio até os órgãos e causa asfixia nos bebês, que ficam com o tom de pele azulado (DAMARAJU et al., 2015; WANG e CHU, 2016; HUSK et al., 2017). A ingestão de nitratos também está relacionada a alguns tipos de câncer, como de estômago e esôfago, devido a formação de N-nitrosaminas, agente carcinogênico proveniente da interação do nitrito com aminas secundárias (LOCKHART et al., 2013; DAMARAJU et al., 2015; WANG e CHU, 2016; HUSK et al., 2017). Tendo em vista o risco da presença de nitratos na água, a Portaria GM/MS N° 888 de 4 de maio de 2021, do Ministério da Saúde, apresenta na tabela de padrão de potabilidade para substâncias químicas que representam riscos à saúde, o valor máximo permissível de 10 mg L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> em águas para consumo humano (BRASIL, 2021).

O uso de biorreatores desnitrificantes, com suporte de material sólido orgânico como doador de elétrons, tem sido bastante estudado para remoção de nitratos de água de drenagem agrícola. Vários são os materiais que têm sido estudados como suporte e fonte de matéria orgânica, entre eles lascas de madeira, palha de trigo e de algodão e sabugo de milho (PLUER et al., 2016; WANG e CHU, 2016; HUSK et al., 2017; Si et al., 2018).

Bactérias desnitrificantes heterotróficas, como *Bacillus*, *Corynebacterium* e *Pseudomonas*, que são abundantes no ambiente natural, entram nos biorreatores desnitrificantes através da água de drenagem e colonizando-os e fixando-se nos suportes orgânicos. Os microrganismos desnitrificantes utilizam os compostos carbonáceos do meio suporte como fonte de alimento e de energia (doador de elétrons) e reduzem o nitrato (aceptor de elétrons) a nitrogênio gasoso, que é, então, liberado para a atmosfera (HOOVER et al., 2015; HANG et al., 2016; HUA et al., 2016; MARDANI et al., 2020).

Hoover et al. (2015), pesquisando biorreatores desnitrificantes em escala de bancada obtiveram remoção de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> de 52% utilizando como suporte lascas de madeira envelhecidas, carga de 21,0 g N m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> e TDH de 12 h.

Quando utilizaram como suporte lascas de madeira frescas, carga de 15,6 g N m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> e TDH de 10 h, obtiveram remoção de 39% de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Segundo os autores, o TDH foi o fator que mais influenciou na remoção de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

Também tem se estudado o uso de materiais inertes de elevada porosidade para aumentar a área de fixação de microrganismos, porém, neste caso, também é necessário o aporte de uma fonte de carbono. Ainda não se encontra em literatura o uso combinado de materiais de suporte inertes com materiais biodegradáveis.

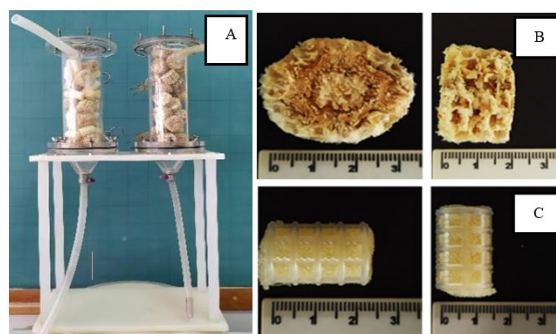
Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a remoção de nitratos em biorreatores com leito fixo de sabugo de milho e espuma de poliuretano, que servirão como doador de elétrons e suporte com maior capacidade para fixação da biomassa, respectivamente.

## Material e métodos

### Configuração dos reatores

Para realização do experimento foram utilizados dois reatores de leito fixo construídos em acrílico, em escala de bancada, semelhantes ao utilizado por Hoover et al. (2015): Reator 1 (R1), com suporte de sabugo de milho, e Reator 2 (R2) com suporte de sabugo de milho e Mini Biobob®. Os reatores tinham altura de 25 cm, diâmetro externo de 7,5 cm, interno de 6 cm e volume total de 700 mL. Após colocação do meio suporte o R1 apresentou volume útil de 330 mL e o R2 de 340 mL. Os reatores foram encapados com papel alumínio para evitar incidência de luz e crescimento de algas (Figura 1A).

Figura 1. (A) Reatores montados, (B) Suporte de sabugo de milho e (C) Mini Biobob®



Fonte: Autores (2022)

Os reatores operaram em fluxo ascendente e contínuo durante 192 dias sem interrupção, com o auxílio de uma bomba peristáltica (Marca Ismatec, modelo Ecoline ISM1089C) ligada a um temporizador, para se obter os diferentes TDHs utilizados (Tabela 1). O afluente, água de drenagem agrícola enriquecida com nitrato, entrava pela base dos reatores e saía pela parte superior dos mesmos. Ambos os reatores foram mantidos a temperatura ambiente, sem ser controlada.

Os valores de TDHs e cargas orgânicas deste experimento (Tabela 1) foram escolhidos baseando-se em estudos anteriores de Xu et al. (2009), Cameron & Schipper (2010) e Hoover et al. (2015), que empregaram

TDH com valores de 14, 44 e 12 h, respectivamente, e cargas orgânicas que variaram de 1,5 a 45 mg N-NO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Após se avaliar os 4 TDHs previamente estipulados, repetiram-se os TDHs de maior e o de menor tempo, pois havia a hipótese de que a colonização dos suportes poderia estar mais rica e numerosa em diversidade e, assim, exercer efeito positivo sobre a eficiência do processo.

Tabela 1. Ensaios realizados com respectivos TDHs

Ensaio	TDH(h)	Carga	Período	Duração(d)	T média (°C)	N
1	96	5	12/08/20-30/08/20	19	18	9
2	48	10	31/08/20-16/09/20	17	21	7
3	24	20	17/09/20-06/10/20	20	20	8
4	16	30	07/10/20-18/11/20	42	23	16
5	96	5	19/11/20-13/01/21	54	22	10
6	16	30	14/01/21-22/02/21	40	24	13

Legenda: Carga=mg N-NO<sub>3</sub>. L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>; Período=intervalo de datas; N=número de amostras analisadas. Fonte: Autores (2022)

### Meio suporte

Os materiais utilizados como meio suporte para crescimento dos microrganismos foram obtidos com fornecedores externos. Os sabugos, que tinham 3,0 cm de diâmetro, foram cortados em pedaços com 1,5 cm de altura (Figura 1B). Antes de serem usados foram lavados com água destilada para remoção de sujidades e partículas finas e secos ao ar antes do uso, conforme procedimento descrito por Hua et al. (2016) e Sun et al. (2019).

Os Mini Biobobs<sup>®</sup> foram doados pela empresa Bioproj Tecnologia Ambiental Ltda. São fabricados com uma armação externa de Polietileno de Alta Densidade (PEAD) de 1,5 cm de diâmetro e 2,0 cm de comprimento e parte interna em espuma de poliuretano (PU) (Figura 1C).

O R1 foi preenchido com 28 pedaços de sabugo com massa total de 56,8 g de suporte. O R2 foi preenchido com 14 pedaços de sabugo, com massa total de 30,81 g, e 30 Mini Biobobs<sup>®</sup>, com massa de 18,72 g.

### Substrato

O substrato utilizado para alimentar os reatores foi água de drenagem agrícola. Essa água era drenada do campo por um sistema de tubos coletores subterrâneos e conduzidos até a borda do campo de uma propriedade particular localizada no município de Carambeí, no Estado do Paraná, a 24° 55' 04'' S de latitude e 50° 05' 50'' W de longitude. A coleta era realizada manualmente no final do tubo coletor (Figura 2).

Figura 2. Extremidade do tubo coletor



Fonte: Autores (2022)

Foram realizadas 3 coletas de água, em março e agosto de 2020 e janeiro de 2021, com campo cultivado por soja, trigo e milho, respectivamente. A água era armazenada em recipientes de PEAD (polietileno de alta densidade) de 5 L e mantida a temperatura ambiente, de 15 a 25° C, até o momento do uso. Uma vez que em nenhuma das coletas se detectou a presença de nitratos, a água foi enriquecida com 20 mg N-NaNO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> imediatamente antes de ser utilizada. Para se obter esta concentração dissolveu-se 121,43 mg de NaNO<sub>3</sub> por litro de água coletada. Não se mediu teor de OD (Oxigênio Dissolvido) no afluente.

Antes do enriquecimento com nitrato, o afluente apresentou a composição média presente na Tabela 2.

Tabela 2. Características da água de drenagem agrícola

Parâmetros	Afluente
pH	5,01 ± 1,49
Alcalinidade (mg CaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )	13,45 ± 2,02
ST (mg L <sup>-1</sup> )	0,26 ± 0,12
N-NO <sub>3</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	n.d.
N-NO <sub>2</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	n.d.
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	n.d.
NTK (mg L <sup>-1</sup> )	n.d.
DQO (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	0

Fonte: Autores (2022)

### Inoculação e partida dos reatores

A partida dos reatores foi realizada com processo de autoinoculação, com os microrganismos presentes naturalmente na água de drenagem agrícola. Os reatores foram alimentados em uma única batelada com a água de drenagem coletada e enriquecida apenas com 20 mg.N-NaNO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>, adicionando-se 330 mL da água no R1 e 340 mL no R2 (quantidade equivalente ao volume útil de cada um). Não foi adicionado qualquer tipo de matéria orgânica, pois esperava-se que as bactérias desnitrificantes utilizassem os meios suporte como fonte de doador de elétrons. Durante a partida os reatores não foram alimentados, mas seu conteúdo apenas recirculado em fluxo fechado com auxílio de uma bomba peristáltica para favorecer sua mistura. O acompanhamento da partida foi realizado com análises diárias para determinação de nitratos e, portanto, presença de bactérias desnitrificantes. Já no segundo dia a concentração de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> no R1 foi de 2,27mg.L<sup>-1</sup> e não se detectou presença no R2. No sexto dia não se detectou nitrato em nenhum dos dois reatores e, assim, considerou-se que os mesmos estavam inoculados e a partida concluída.

### Monitoramento dos reatores

O monitoramento dos reatores foi realizado através de análises físico-químicas dos parâmetros: pH, alcalinidade e nitrato (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Todas as análises foram realizadas segundo metodologia descrita em APHA (1998).

Exceto a análise de alcalinidade a qual foi realizada segundo a metodologia de DiLallo e Albertson (1961).

### Determinação do número mais provável (NMP) de bactérias desnitrificantes heterotróficas

A quantificação dos microrganismos desnitrificantes foi realizada pelo método do número mais provável (NMP), onde é possível se obter a estimativa do número de bactérias a partir da combinação dos resultados de tubos positivos (APHA, 1998). Foi utilizada a metodologia proposta por Tiedje (1984) a qual foi adaptada para amostras líquidas, pois o método foi desenvolvido para amostras de solo.

### Preparo das amostras para determinação do NMP

Os materiais utilizados na análise foram o sabugo do R1, Mini Biobob® e sabugo do R2. Os materiais foram retirados de dentro dos reatores com o auxílio de uma pinça estéril. Foram retirados um pedaço de sabugo de cada reator e dois Mini Biobob®.

As amostras de sabugo foram cortadas em quatro pedaços com uma faca estéril. Nas amostras de Mini Biobob® as espumas foram removidas da capa de PEAD. As amostras foram inseridas em tubo Falcon de 50 mL junto com 30 mL de água destilada autoclavada e 10 g de pérolas de vidro autoclavadas. Na sequência o tubo Falcon foi levado ao Vortex (Ika Vortex 3 S032) por 5 minutos, quando houve total desprendimento da biomassa.

O resultado desta agitação foi considerado como a primeira diluição ( $10^{-1}$ ), este procedimento foi realizado separadamente para cada amostra. Depois cada solução sofreu uma diluição seriada em solução de NaCl 8,5% estéril, até diluição de  $10^{-5}$ .

### Quantificação de bactérias desnitrificantes

Para a quantificação do NMP para bactérias desnitrificantes foi utilizada metodologia proposta por Tiedje (1984), adaptada para amostras líquidas.

Utilizou-se o meio de cultura de caldo nutriente modificado com 0,62 g de extrato de levedura, 1,54 g de peptona, 1,54 g de Cloreto de Sódio (NaCl) e 0,685 g de Nitrato de Sódio ( $\text{NaNO}_3$ ) dissolvidos em 1L de água destilada. O meio foi distribuído em tubos Eppendorf®, autoclavado e adicionado de 0,1 mL das amostras nas diferentes diluições, de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ .

Foram utilizados 80 tubos no total (25 tubos para amostra do sabugo do R1, 25 tubos para amostra do Mini Biobob® e 25 tubos para amostra do sabugo do reator 2) e 5 tubos para o branco. Depois de 7 dias incubados a  $30^\circ\text{C}$ , adicionava-se 2 gotas de solução de 0,2 g de Difenilamina [ $(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{NH}$ ] em 100 mL de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) concentrado. Coloração azul indica presença de nitrato e, portanto, resultado negativo para desnitrificação.

## Análise estatística dos dados

Todos os resultados foram expressos como média seguida do desvio padrão. Para verificar a normalidade dos dados foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. Para dados normalmente distribuídos foram realizadas Análises de Variância (ANOVA) e Teste de Tukey ( $p=0,05$ ), para dados não normalmente distribuídos foi utilizado teste não paramétrico (Teste de Kruskal – Wallis). Todas as análises foram realizadas no software Statística® (v. 14.0).

## Resultados e discussões

### Resultados da eficiência de remoção de nitrato

Analisando-se os dados de concentração de  $\text{N-NO}_3$  no efluente dos reatores (Tabela 3) observa-se que, com exceção dos ensaios 4 e 6, com TDH de 16h, os demais não diferiram estatisticamente entre si e apresentaram efluente com concentração de  $\text{N-NO}_3$  abaixo de  $6 \text{ mg L}^{-1}$ . O limite máximo permitido para água potável estabelecido na Portaria GM/MS N° 888, de 4 de maio de 2021, do Ministério da Saúde é de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3$  (BRASIL, 2005,2008,2021).

Tabela 3. Concentrações médias de  $\text{N-NO}_3$  no afluente e efluente de ambos os reatores (em  $\text{mg.N-NO}_3 \text{ L}^{-1}$ ) nos diferentes ensaios.

Ensaio	TDH (h)	Afluente	Efluente	
			R1	R2
1	96	23,25± 1,95 A	5,87± 2,13 Aa	2,67 ± 1,95 Ab
2	48	21,65 ± 0,35 A	5,76 ± 2,30 Aa	1,66 ± 0,28 Ab
3	24	21,80 ± 0,54 A	3,95 ± 1,90 Aa	3,29 ± 1,31 Aa
4	16	22,82 ± 0,87 A	11,53 ± 3,77 Ba	10,00 ± 4,55 Ba
5	96	22,22 ± 0,50 A	3,10 ± 4,77 Aa	4,34 ± 4,81 Aa
6	16	21,64 ± 0,72 A	12,33 ± 2,59 Ba	11,03 ± 1,68 Bb

Legenda: médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (minúscula na linha e maiúscula na coluna) ( $p \leq 0,05$ ).

Fonte: Autores (2022)

Tabela 4. Eficiência de remoção de  $\text{N-NO}_3$  em ambos os reatores nos diferentes ensaios.

Ensaio	TDH (h)	Eficiência de remoção de $\text{N-NO}_3$ (%)	
		R1	R2
1	96	74,5 ± 9,6 Aa	87,6 ± 6,2 Ab
2	48	73,3 ± 10,7 Aa	92,3 ± 1,3 Ab
3	24	81,9 ± 8,6 Aa	86,8 ± 7,6 Aa
4	16	49,5 ± 16,7 Ba	56,1 ± 20,5 Ba
5	96	86,2 ± 20,9 Aa	80,6 ± 21,1 Aa
6	16	42,9 ± 12,0 Ba	48,9 ± 8,3 Bb

Legenda: médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (minúscula na linha e maiúscula na coluna) ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Autores (2022)

Soupir et al. (2018), em um estudo com biorreator preenchido com lascas de madeira, verificaram aumento da eficiência de remoção de nitrato de 67% para 96%, quando o TDH foi aumentado de 12 para 24 h.



Neste experimento, observa-se no R1 que a eficiência de remoção de nitrato aumentou de 49% (Ensaio 4) para 81% (Ensaio 3), quando TDH aumentou de 16 para 24 h. Já no R2 a eficiência aumentou de 56% (Ensaio 4) para 86% (Ensaio 3) quando TDH aumentou de 16 para 24 h. Não foi observada diferença estatística entre os ensaios 1, 2, 3 e 5, com TDH de 96, 48, 24 e 96 h, respectivamente.

Comparando-se as eficiências entre ensaios com mesmo TDH, ensaios 1 e 5 (TDH = 96 h), verifica-se que não houve diferença estatística entre eles. O mesmo aconteceu entre os ensaios com TDH = 16 h, ensaios 4 e 6, indicando que o maior tempo de funcionamento dos reatores não interferiu nos resultados. Schaefer et al. (2021), também não observaram diferença de eficiência de remoção de nitratos, após dois anos de operação de um biorreator de desnitrificação preenchido com lascas de madeira tratando água de drenagem agrícola.

Na Tabela 4 estão apresentados os resultados de teor de N-NO<sub>2</sub> nos efluentes de ambos os reatores. Apenas dois ensaios apresentaram concentração média acima de 1 mg L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>2</sub>, limite máximo estabelecido pela Portaria GM/MS N° 888, de 4 de maio de 2021 do Ministério da Saúde, para o atendimento aos padrões de potabilidade de água (BRASIL, 2021), ensaios 5 (R2) e 6 (R1), com teores de 2,00 ± 0,78 e 1,01 ± 0,98 mg N-NO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>, respectivamente. Estes resultados indicam que a fonte de carbono presente no sabugo de milho foi eficiente na remoção dos nitratos e nitritos.

O nitrito é uma espécie intermediária na cadeia de reação de desnitrificação e pode se acumular transitoriamente, dependendo das atividades das enzimas redutases de nitrato e nitrito. O tipo de fonte de carbono utilizado influencia o tipo de microrganismo que se tornam dominante em uma cultura mista podendo, em algumas cepas bacterianas, a redução do NO<sub>3</sub> competir com a redução do NO<sub>2</sub>, de forma que o NO<sub>2</sub> será reduzido somente após a maior parte do NO<sub>3</sub> ter sido reduzida (Fowdar et al., 2015).

Tabela 5. Concentrações médias de N-NO<sub>2</sub> nos efluentes dos diferentes ensaios de ambos os reatores.

Ensaio	TDH (h)	Efluente (mg N-NO <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	
		R1	R2
1	96	0,21 ± 0,10	0,13 ± 0,02
2	48	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,00
3	24	0,02 ± 0,01	0,04 ± 0,02
4	16	0,29 ± 0,54	0,57 ± 0,96
5	96	0,36 ± 0,47	1,01 ± 0,98
6	16	2,00 ± 0,78	0,28 ± 0,07

Fonte: Autores (2022)

Fowdar et al. (2015), utilizando algodão como substrato, obtiveram taxa de desnitrificação média de 72%, que foi atribuída a elevada área de superfície específica do algodão, que proporcionou fixação e colonização microbiana, facilitando o contato entre a fonte de carbono orgânico e nitrato e, também, a taxa de hidrólise de celulose.

Damaraju et al. (2015) obtiveram 99% de taxa de desnitrificação em um biorreator com TDH de 8 horas, ao final do ensaio avaliaram com microscópio a superfície das lascas de madeira e observaram a formação de cavidades onde se encontrava grande parte do biofilme formado. Gottschall et al. (2016) utilizaram lascas de madeira para remoção de nitrato e antibióticos e obtiveram taxas de remoção de nitrato que variaram de 33% a 74 % e eficiente remoção de antibióticos.

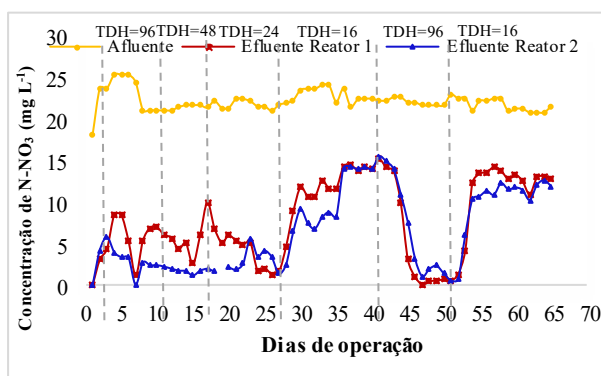
Sun et al. (2019), em um estudo utilizando sabugo de milho, obtiveram taxas de remoção de nitrato que variaram de 71% a 100%. Os autores concluíram que a estrutura escamosa da superfície dos sabugos tem impacto significativo na adesão e no crescimento de comunidades de bactérias funcionais, por facilitar a adesão dos microrganismos. Mesmo após 100 dias de operação verificaram que o sabugo de milho ainda manteve uma estrutura física estável, que pode estar relacionado com a composição da fibra bruta ou lignina, que não é facilmente biodegradada.

Cheikh et al. (2013), que utilizaram diferentes tipos de plásticos como meio suporte e metanol como doador de elétrons, obtiveram taxa de remoção de nitrato de 100%. Os autores verificaram que a rugosidade e porosidade dos suportes favoreceu a colonização da biomassa desnitrificante e o metanol foi um doador de elétrons adequado à redução do nitrato.

As taxas de desnitrificação obtidas no presente estudo estão dentro dos valores encontrados em literatura (Tabela 3). Os elevados valores de remoção de nitrato observados estão associados tanto à presença da espiga de milho, que serviu de doador de elétrons para a desnitrificação e suporte para a fixação da biomassa, quanto à presença da espiga com o Mini Biobob<sup>®</sup> que, por ser um suporte poroso, permitiu tanto a fixação de microrganismos desnitrificantes quanto retenção de matéria orgânica.

Na Figura 3 podem ser observadas as concentrações de nitrato afluente e efluente ao longo do tempo nos dois reatores. Observa-se que no R2, com sabugo e Mini Biobob<sup>®</sup>, as concentrações de N-NO<sub>3</sub> no efluente foram ligeiramente menores que no R1, apenas com suporte de sabugo. O que leva a supor que a metade da quantidade de sabugo utilizada no R1 já é suficiente para promover a quantidade de doadores de elétrons necessária para a desnitrificação quando associada ao suporte de espuma.

Figura 3. Concentrações de nitrato, afluente e efluente, de ambos reatores ao longo do tempo, nos diferentes ensaios, com diferentes TDH (dias)



Fonte: Autores (2022)

## pH e alcalinidade

A análise da alcalinidade pode ser útil para se avaliar se o processo predominante para a remoção do nitrato foi a desnitrificação heterotrófica. Nas Tabelas 6 e 7 estão apresentados os resultados de pH e alcalinidade do afluente e efluente de ambos os reatores.

Observando-se os valores médios de pH dos efluentes de R1 e R2 na Tabela 6, nota-se que todos se encontram dentro da faixa ótima para desenvolvimento das bactérias desnitrificantes descrita na literatura, a qual deve estar entre 6,5 e 8,0 (ZOPPAS et al., 2016; WANG e CHU, 2016). He et al. (2016) avaliaram o efeito do pH em reatores de desnitrificação com suporte de hidrolisado de casca de milho como fonte de carbono e não observaram diminuição da eficiência de desnitrificação com pH na faixa de 6,0 a 9,0.

Tabela 6. Médias dos valores de pH do afluente e efluente dos reatores R1 e R2

Ensaio	Afluente	Efluente R1	Efluente R2
1	5,29 ± 0,15 (9)	6,63 ± 0,40 (9)	6,86 ± 0,23 (9)
2	5,30 ± 0,23 (7)	5,96 ± 2,64 (7)	7,28 ± 0,20 (7)
3	5,84 ± 0,50 (8)	7,30 ± 0,16 (8)	7,13 ± 0,34 (8)
4	5,25 ± 0,17 (16)	6,70 ± 0,36 (16)	6,67 ± 0,39 (16)
5	5,35 ± 0,00 (10)	6,65 ± 0,37 (10)	6,70 ± 0,30 (10)
6	5,53 ± 0,28 (13)	6,15 ± 0,25 (13)	6,49 ± 0,36 (13)

Legenda: o número entre parênteses representa a quantidade de amostras utilizadas para cálculo da média. Fonte: Autores (2022)

Observa-se que os valores de pH no efluente foram superiores aos do afluente em todos os ensaios. Em reatores de desnitrificação, o aumento do pH ocorre devido à redução do  $\text{NO}_3^-$ , que libera  $\text{OH}^-$  para o meio, aumentando o valor de pH (FOWDAR et al., 2015).

Tabela 7. Médias dos valores de alcalinidade do afluente e efluente dos reatores R1 e R2.

Ensaio	Afluente	Efluente R1	Efluente R2
1	13,45 ± 1,89 (9)	50,71 ± 12,81 (9)	59,33 ± 10,34 (9)
2	5,17 ± 0,33 (7)	43,57 ± 22,40 (7)	72,00 ± 3,35 (7)
3	7,38 ± 1,94 (8)	67,71 ± 10,49 (8)	67,73 ± 6,24 (8)
4	9,78 ± 2,18 (16)	50,82 ± 11,59 (16)	50,16 ± 18,15 (16)
5	11,57 ± 0,00 (10)	97,66 ± 2,71 (10)	91,74 ± 6,49 (10)
6	22,71 ± 12,78 (13)	57,11 ± 14,88 (13)	71,01 ± 7,89 (13)

Legenda: o número entre parênteses representa a quantidade de amostras utilizadas para se obter a média. Fonte: Autores (2022)

Analisando-se os resultados da Tabela 7, se observa que a alcalinidade do efluente foi maior que do afluente. Esse fato se explica porque, durante o processo de desnitrificação, para cada 1 mg de  $\text{NO}_3^-$  reduzido a nitrogênio gasoso, gera-se 3,57 mg  $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$  de alcalinidade (ELEFSINOTIS e LI, 2006). Este fato corrobora com a ocorrência eficiente da desnitrificação.

Para verificar se diferentes cargas de nitrogênio afluente interferem na concentração de bactérias desnitrificantes no meio e se houve colonização das espumas, foi realizada a contagem dos microrganismos

desnitrificantes pelo método do NMP nos ensaios 5 e 6, com TDH de 96 e 16 h, respectivamente, ou seja, o maior e o menor TDH utilizados no experimento. Na Tabela 8 estão apresentados os resultados de NMP. Nota-se que tanto as espumas do Mini Biobobs® quanto os pedaços de sabugo serviram de suporte para o desenvolvimento de bactérias desnitrificantes. Porém, o NMP foi maior no Ensaio 6, com carga de nitrogênio maior, de 29 mg N  $\text{L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  e NMP de  $9,2 \times 10^5$  a  $2,4 \times 10^6$ . Já no Ensaio 5, com carga de 5 mg N  $\text{L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , o NMP variou de  $2 \times 10^4$  a  $6 \times 10^5$ . Porém, apesar de maior concentração de microrganismos no Ensaio 6, a eficiência de remoção de  $\text{N-NO}_3^-$  nesse ensaio foi bem menor que no Ensaio 5, isso pode ter ocorrido devido ao menor TDH do ensaio 6, de 16 h, que pode ter afetado o processo de desnitrificação.

Tabela 8. Resultados do NMP de bactérias desnitrificantes presentes nos suportes dos ensaios 5 e 6

Ensaio (TDH h)	Carga*	NMP ( $\text{mL}^{-1}$ )		
		R1	R2	R2
		Sabugo	Sabugo	Mini Biobobs®
5 (TDH=96 h)	5	$6 \times 10^5$	$2 \times 10^4$	$2 \times 10^5$
6 (TDH=16 h)	29	$2,2 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$9,2 \times 10^5$

\*Legenda: (mg  $\text{N-NO}_3 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ).

Fonte: Os Autores (2022)

## Conclusão

Conclui-se que os reatores utilizados são eficientes na remoção de nitratos.

Comparando-se os diferentes TDH estudados, não houve diferença estatística entre os resultados com TDHs de 96, 48 e 24 h, que apresentaram efluentes com teor de  $\text{N-NO}_3^-$  sempre abaixo de 6,0 mg  $\text{L}^{-1}$ . Já os ensaios com TDH de 16 h foram os que apresentaram os piores desempenhos, com efluente com teores de  $\text{N-NO}_3^-$  entre  $10,00 \pm 4,55 \text{ mg L}^{-1}$  e  $12,33 \pm 2,59 \text{ mg L}^{-1}$ .

Comparando-se os diferentes reatores observa-se diferença estatística entre eles apenas nos ensaios 1, 2 e 6, com TDH de 96, 48 e 16h.

A presença de bactérias desnitrificantes na biomassa de ambos os reatores foi comprovada pela análise de NMP.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES, pela concessão da bolsa, e à Bioproj Tecnologia Ambiental, pela doação dos Mini Biobobs®.

## Referências

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20 ed, Washington, 1998.

BRASIL. Portaria GM/MS Nº 888, de 4 de maio de 2021. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da União, Brasília, DF.

BRASIL. Conama- Conselho Nacional de Meio Ambiente. Resolução nº 357 de 17 de março de 2005. Diário Oficial da União, Brasília, DF.

- BRASIL. Conama- Conselho Nacional de Meio Ambiente. Resolução nº 396 de 3 de abril de 2008. Diário Oficial da União, Brasília, DF.
- CAMERON, S.C.; SCHIPPER, L.A. Nitrate removal and hydraulic performance of organic carbon for use in denitrification beds. **Ecological Engineering**, v. 36, n. 11, p. 1588-1595, 2010.
- CHEIKH, A.; YALA, A.; DROUICHE, N.; ABDIA, N.; LOUNICI, H.; MAMERIC, N. Denitrification of water in packed beds using bacterial biomass immobilized on waste plastics as supports. **Ecological Engineering**, v.53, p.329-334, abr.2013. DOI: doi.org/10.1016/j.ecoleng.2012.12.070
- DAMARAJU, S.; SINGH, U. K.; SREEKANTH, D.; BHANDARI, A. Denitrification in biofilm configured horizontal flow woodchip bioreactor: effect of hydraulic retention time and biomass growth. **Ecohydrology and Hydrobiology**, v. 15, n. 1, p. 39-48, dez.2015. DOI: 10.1016/j.ecohyd.2014.11.001
- DILALLO, R.; ALBERTSON, O. E. Volatile acids by direct titration. **Journal of Water Pollution Control Federation**, p. 356-365, 1961.
- ELEFSINIOTIS, P.; LI, D. The effect of temperature and carbon source on denitrification using volatile fatty acids. **Biochemical Engineering Journal**, v. 28, n. 2, p. 148-155, 2006.
- FOWDAR, H. S.; HATT, B. T.; BREEN, P.; COOK, P. LM.; DELETIC, A. Evaluation of sustainable electron donors for nitrate removal in different water media. **Water Research**, v. 85, p. 487- 496, nov. 2015. DOI: 10.1016/j.watres.2015.08.052
- GOTTSCHALLA, N.; EDWARDS, M.; CRAIOVAN, E.; FREY, S. K.; SUNOHARA, M.; BALL, B.; ZOSKI, E.; TOPP, E.; KHANAI, I.; CLARKF, I.D.; LAPEN, D.R. Amending woodchip bioreactors with water treatment plant residuals to treat nitrogen, phosphorus, and veterinary antibiotic compounds in tile drainage. **Ecological Engineering**, v. 95, p. 852-864, out. 2016. DOI: 10.1016/j.ecoleng.2016.06.011
- HANG, Q.; WANG, H.; CHU, Z.; YE, B.; LI, C.; HOU, Z. Application of plant carbon source for denitrification by constructed wetland and bioreactor: review of recent development. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 9, p. 8260-8274, mar.2016. DOI: doi.org/10.1007/s11356-016-6324-y
- HE, J.; ZHOU, S.; HUANG, S.; ZHANG, Y. Pretreated Corn Husk Hydrolysate as the Carbon Source for Aerobic Denitrification with Low Levels of N<sub>2</sub>O Emission by Thermophilic *Chelatococcus daeguensis* TAD1. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 227, n. 9, p. 1-12, 2016.
- HOOVER, N.; BHANDARI, A.; SOUPIR, M.; MOORMAN, T. Woodchip denitrification bioreactors: impact of temperature and hydraulic retention time on nitrate removal. **Journal of Environmental Quality**, v.45, p. 803-812, nov. 2015. DOI: 10.2134/jeq2015.03.0161
- HUA, G.; SALO, M. W.; SCHMIT, C. G.; HAY, C. H. Nitrate and phosphate removal from agricultural subsurface drainage using laboratory woodchip bioreactors and recycled steel byproduct filter. **Water Research**, v.102, p. 180-189, out. 2016. DOI: 10.1016/j.watres.2016.06.022
- HUSK B.R.; ANDERSON B.C.; WHALEN J.K.; SANCHEZ J.S. Reducing nitrogen contamination from agricultural subsurface drainage with denitrification bioreactors and controlled drainage. **Biosystems Engineering**, v.153, p. 52-62, 2017. DOI: 10.1016/j.biosystemseng.2016.10.021
- LOCKHART, K.M.; KING, A.M.; HARTER, T. Identifying sources of groundwater nitrate contamination in a large alluvial groundwater basin with highly diversified intensive agricultural production. **Journal of Contaminant Hydrology**, v.151, p. 140-154, 2013. DOI: 10.1016/j.jconhyd.2013.05.008
- MARDANI, S.; MCDANIEL, R.; BLEAKLEY, B. H.; HAMILTON, T. L.; SALAM, S.; AMEGBLETOR, L. The effect of woodchip bioreactors on microbial concentration in subsurface drainage water and the associated risk of antibiotic resistance dissemination. **Ecological Engineering**, v. 6, abr.2020. DOI: 10.1016/j.ecoena.2020.100017
- PLUER, W.T.; GEOHRING L.D.; STEENHUIS, T.S.; WALTER M.T. Controls Influencing the Treatment of Excess Agricultural Nitrate with Denitrifying Bioreactors. **Journal of Environmental Quality**, v.45, n.3, p. 772-775, 2016. DOI: 10.2134/jeq2015.06.0271
- SCHAEFER, A.; WERNING, K.; HOOVER, N.; TSCHIRNER, U.; FEYEREISEN, G.; MOORMAN, T.B.; HOWE, A.C.; SOUPIR, M.L. Impact of flow on woodchip properties and subsidence in denitrifying bioreactors. **Agrosystems, Geosciences & Environments**, v.4, e20149, 2021.
- SI, Z.; SONG, X.; WANG, Y.; CAO, X.; ZHAO, Y.; WANG, B.; CHEN, Y.; AREFE, A. Intensified heterotrophic denitrification in constructed wetlands using four solid carbon sources: Denitrification efficiency and bacterial community structure. **Bioresource Technology**, v. 267, p. 416-425, nov. 2018. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.07.029
- SOUPIR, M. L.; HOOVER, N. L.; MOORMAN, T. B.; LAW, J. Y.; BEARSON, B. L. Impact of temperature and hydraulic retention time on pathogen and nutrient removal in woodchip bioreactors. **Ecological Engineering**, v. 112, p. 153-157, mar.2018. DOI: 10.1016/j.ecoleng.2017.12.005
- SUN, G.; WAN, J.; SUN, Y.; LI, H.; CHANG, C.; WANG, Y. Enhanced removal of nitrate and refractory organic pollutants from bio-treated coking wastewater using corn cobs as carbon sources and biofilm carriers. **Chemosphere**, v. 237, p.1-8, 2019. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.124520
- TIEDJE, J. Denitrification, in: "Methods of Soil Analysis - Chemical and Microbiological Properties", Number 9, Part 2, 2a ed, p.1011-1026, Wisconsin, Estados Unidos, 1984.
- WANG J.; CHU L. Biological nitrate removal from water and wastewater by solid-phase denitrification process. **Biotechnology Advances**, v.34, n.6, p.1103-1112, 2016. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2016.07.001
- XU, Z.; SHAO, L.; YIN, H.; CHU, H.; YAO, Y. Biological denitrification using corn cobs as a carbon source and biofilm carrier. **Water Environment Research**, [s.l], v. 81, n. 3, p. 242-247, 2009.
- ZOPPAS, F. M.; BERNARDES, A. M.; MENEGUZZI, Á. Parâmetros operacionais na remoção biológica de nitrogênio de águas por nitrificação e desnitrificação simultânea. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 21, n. 1, p. 29-42, mar. 2016. DOI: 10.1590/S1413-41520201600100134682.