

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**ESTUDO DA REMOÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO A
PARTIR DE LODO NITRIFICANTE CULTIVADO EM MEIO
AUTOTRÓFICO SOB CONDIÇÕES ANÓXICAS**

DIRLEI DIEDRICH KIELING

ORIENTADOR: Prof. PhD. Hugo Moreira Soares
CO-ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Valéria Reginatto Spiller

Florianópolis,
Fevereiro de 2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

ESTUDO DA REMOÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO A PARTIR DE LODO NITRIFICANTE CULTIVADO EM MEIO AUTOTRÓFICO SOB CONDIÇÕES ANÓXICAS

DIRLEI DIEDRICH KIELING

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos.

ORIENTADOR: Prof. PhD. Hugo Moreira Soares
CO-ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. Valéria Reginatto Spiller

Florianópolis,
Fevereiro de 2004

“Felizes somos nós que colocamos alto o sonho de nossas vidas, porque Deus trabalha acima de nossos sonhos.”

Paulo Coelho

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Hugo Moreira Soares, pela orientação, amizade e apoio no desenvolvimento da dissertação.

A Prof^a. Valéria Reginatto, pela orientação e empenho na realização deste trabalho, pela amizade e atenção a mim dedicada.

Ao Prof. Willibaldo Schmidell, por partilhar seus conhecimentos e lições de vida.

A Prof^a. Regina Vasconcellos Antônio, pela amizade e paciência e por disponibilizar seu laboratório para o procedimento de fixação das amostras para FISH.

Aos pesquisadores do Uruguai, Lucia Muxi, Javier e Cláudia, participantes do projeto CNPq Pró-Sul, por viabilizarem as análises FISH.

A Heike Hoffmann, por disponibilizar seu laboratório para a análise de microscopia.

Aos queridos amigos, com os quais partilhei duras horas de estudo, descontraídos churrascos e festas, e muitos desabafos, Cristiane, Alexsandra, Marcelo, Débora, Isaura, Luciani, Rafael, Keli e Jaqueline.

Especialmente a Cristiane, pela amizade, e a Mariana, pelo carinho e por cuidar muito bem de seus afilhados em minha ausência.

A Sandra e ao Rodrigo, pelo auxílio no trabalho através da realização das análises de NMP.

Aos amigos e colegas de trabalho do Laboratório de Tratamento de Efluentes, Cristiane, Mariana, Franciny, Sandra, Fabrício, Alex, Angelina, João, Estela, Camila, Mônica e Rodrigo.

Aos professores e funcionários do departamento de Engenharia Química da UFSC, pelo apoio no trabalho e contribuição no aprendizado.

À secretaria da Pós-graduação, especialmente ao Edevilson, que se mostrou sempre prestativo, atencioso e paciente.

A minha família, em especial minha mãe e irmãs, que mesmo distantes se fizeram presentes através do carinho, força e incentivo.

Ao Gilberto, meu namorado, por se fazer presente a todo momento, com gestos de carinho, incentivo e paciência, reanimando-me diante das dificuldades e compartilhando as novas conquistas.

Aos anjos em minha vida (Cirilo, meu pai, e Igor Mateus, meu sobrinho) e às bênçãos que eles têm me presenteado.

A Deus, por iluminar meu caminho e abrir portas que possibilitam meu crescimento profissional e pessoal.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de mestrado.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE SÍMBOLOS.....	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
2.1 Objetivo Geral.....	4
2.2 Objetivos específicos.....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 Metabolismo Microbiano do Nitrogênio	5
3.2 Importância da Remoção Biológica de Nitrogênio.....	9
3.3 Processo de Nitrificação e Desnitrificação	12
3.3.1 Sistema de Lodos Ativados	15
3.4 Novos Processos de Remoção Biológica de Nitrogênio	17
3.4.1 Desnitrificação Aeróbia	17
3.4.2 Anammox.....	19
3.4.3 Processos Envolvendo Nitrificação Parcial e Oxidação Anaeróbia do Amônio..	24
3.4.2.1 SHARON.....	25
3.4.2.2 OLAND.....	26
3.4.2.3 CANON	27
3.4.2.4 Desamonificação em Sistemas de Biofilmes	29
3.4.4 Desnitrificação por Bactérias Nitrificantes	30
3.5 Técnicas Empregadas para o Estudo de Populações Microbianas	32
3.5.1 Número Mais Provável.....	32
3.5.2 Fluorescent In Situ Hybridisation	33
4. METODOLOGIA.....	35
4.1 Caracterização do Inóculo	35
4.1.1 Determinação dos Sólidos Suspensos Totais	36
4.1.2 Determinação da Atividade Nitrificante.....	36
4.1.3 Determinação do Número Mais Provável	38
4.1.3.1. Número mais Provável de <i>Nitrosomonas</i>	39
4.1.3.2. Número Mais Provável de <i>Nitrobacter</i>	40
4.1.4 Análise FISH.....	41
4.1.4.1 Fixação com paraformaldeído	41
4.2 Montagem e Operação dos Reatores.....	43
4.3 Análises para o Acompanhamento dos Reatores	47
4.3.1 Determinação de Amônio	48
4.3.2 Determinação de Nitrito	48
4.3.3 Determinação de Nitrato.....	49

4.3.4 Determinação de DQO	49
4.3.5 Determinação da alcalinidade.....	50
4.3.6 Determinação dos Sólidos em Suspensão Totais e Voláteis	50
4.3.7 Número Mais Provável.....	51
4.3.8 Fluorescent In Situ Hybridisation	51
4.4 Microscopia.....	51
4.5 Cinética de Consumo de Substrato	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1 Caracterização do Inóculo	53
5.1.1 Determinação da Atividade Nitrificante.....	53
5.1.2 NMP e FISH.....	54
5.2 Acompanhamento dos Reatores	55
5.2.1 Concentração Celular e Microscopia	55
5.2.2 Acompanhamento das Formas Nitrogenadas	60
5.2.3 Acompanhamento da DQO.....	70
5.2.4 Acompanhamento da Alcalinidade	71
5.2.3 Quantificação e Caracterização das Populações	74
5.2.4 Cinética de Consumo do Substrato	82
6. CONCLUSÕES.....	86
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	87
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS.....	88
ANEXOS E APÊNDICES.....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Transformações biológicas do nitrogênio	8
Tabela 4.1: Composição do meio nitrificante.....	35
Tabela 4.2: Composição da solução de micronutrientes.....	35
Tabela 4.3: Composição do meio anammox	44
Tabela 4.4: Composição das soluções de micronutrientes	44
Tabela 4.5: Frequência analítica para acompanhamento dos reatores RI e RII	47
Tabela 5.1: Resultados de NMP e FISH para o lodo nitrificante adaptado	54
Tabela 5.2: Resultados da determinação de SST durante acompanhamento dos reatores.	57
Tabela 5.3: Dados comparativos das análises de sólidos em suspensão	60
Tabela 5.4: Número mais provável de <i>Nitrosomonas</i> e <i>Nitrobacter</i> em RI	75
Tabela 5.5: Número mais provável de <i>Nitrosomonas</i> e <i>Nitrobacter</i> em RII	75
Tabela 5.6: Dados comparativos de NMP e FISH obtidos para RI	79
Tabela 5.7: Dados comparativos de NMP e FISH obtidos para RII	79
Tabela 5.8: Valores de velocidades de consumo de amônio e nitrito para RI.....	84
Tabela 5.9: Valores de velocidades de consumo de amônio e nitrito para RII.....	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.2: Curva de equilíbrio entre íon amônio e amônia em função do pH	10
Figura 3.3: Eficiência teórica em função da razão de reciclo para o sistema utilizado no experimento	11
Figura 3.4: Remoção de nitrogênio pelo sistema de lodos ativados	16
Figura 3.5: Possível rota metabólica para oxidação anaeróbia do amônio	21
Figura 3.6: Oxidação anaeróbia do amônio por <i>Planctomyces</i> a nível celular	23
Figura 3.7: Efeito da temperatura na máxima velocidade de crescimento de bactérias amônio e nitrito oxidantes	25
Figura 3.8: Processos de nitrificação parcial e desamonificação em biofilme.....	29
Figura 3.9: Representação esquemática da técnica empregada para análise FISH	33
Figura 4.1: Sistema operacional para o estudo da remoção biológica de nitrogênio	46
Figura 5.1: Velocidade específica de consumo de substrato em função da concentração de amônio e ajuste pelo modelo de Andrews	53
Figura 5.2: Variação da concentração de SST durante a lavagem do reator RI	55
Figura 5.3: Microscopia ótica mostrando a estrutura dos flocos do reator RI com aumento de 100X	58
Figura 5.4: Microscopia ótica mostrando a estrutura do floco do reator RI com aumento de 400X.....	58
Figura 5.5: Microscopia ótica mostrando a estrutura dos flocos do reator RII com aumento de 100X.....	59
Figura 5.6: Microscopia ótica mostrando a estrutura do floco do reator RII com aumento de 400X.....	59
Figura 5.7: Concentração das formas nitrogenadas na entrada (E) e saída (S) do reator RI	61

Figura 5.8: Concentração das formas nitrogenadas na entrada (E) e saída (S) do reator RII	61
Figura 5.9: Relações molares de consumo de substrato e formação de produto no reator RI em comparação a estequiometria do processo anammox.....	64
Figura 5.10: Relações molares de consumo de substrato e formação de produto no reator RII em comparação a estequiometria do processo anammox.....	65
Figura 5.11: Eficiência de remoção de nitrogênio com relação a carga de entrada e saída do reator RI	68
Figura 5.12: Eficiência de remoção de nitrogênio com relação a carga de entrada e saída do reator RII	68
Figura 5.13: Valores médios da remoção específica de nitrogênio a cada intervalo de 75dias	70
Figura 5.14: Valores de DQO em RI (a) e RII (b) durante o período de acompanhamento. ..	70
Figura 5.15: Valores de alcalinidade de entrada (E) e saída (S) do reator RI.....	72
Figura 5.16: Valores de alcalinidade de entrada (E) e saída (S) do reator RII.....	72
Figura 5.17: Relação molar de consumo de carbono e amônio	73
Figura 5.18: Desenvolvimento das populações de <i>Nitrosomonas</i> e <i>Nitrobacter</i> durante o acompanhamento do reator RI	77
Figura 5.19: Desenvolvimento das populações de <i>Nitrosomonas</i> e <i>Nitrobacter</i> durante o acompanhamento do reator RII	77
Figura 5.20: Resultados experimentais do ensaio cinético para o reator RI	82
Figura 5.21: Resultados experimentais do ensaio cinético para o reator RII	82

LISTA DE SÍMBOLOS

ΔG^0	variação da energia livre de Gibbs
μ	velocidade específica de crescimento
$\mu_{\text{máx}}$	velocidade específica máxima de crescimento
C_s	concentração de saturação
K_s	constante de afinidade pelo substrato
Q_{O_2}	velocidade específica de consumo de oxigênio
Q_{O_2X}	velocidade de consumo de oxigênio
r	velocidade de consumo de substrato
S	concentração de substrato
ADE	atividade desnitrificante específica
ATP	adenosina trifosfato
Anammox	<i>Anaerobic ammonium oxidation</i>
CANON	<i>Completely Autotrophic Nitrogen removal Over Nitrito</i>
DBO	demanda bioquímica de oxigênio
DNA	ácido desoxirribonucléico
DQO	demanda química de oxigênio
FISH	<i>Fluorescent In Situ Hybridisation</i>
NADH	hidrogênio dinucleotídeo adenina-nicotinamida
NMP	número mais provável
OD	oxigênio dissolvido
OLAND	<i>Oxygen Limited Autotrophic Nitrification Denitrification</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
RBC	<i>Rotating Biological Contactor</i>
RDNA	Redução Desassimilatória do Nitrato a Amônio
RDS	Redução Desassimilatória do Sulfato
RNA	ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossômico
SBR	<i>Sequencing Batch Reactor</i>
SHARON	<i>Single reactor system for High Ammonium Removal Over Nitrito</i>
SSV	sólidos suspensos voláteis
SST	sólidos suspensos totais
ST	sólidos totais
SV	sólidos voláteis
TRH	tempo de retenção hidráulico

RESUMO

O descarte de efluentes contendo concentrações elevadas de nitrogênio, pode comprometer o equilíbrio ambiental, causando prejuízos para a flora e a fauna aquática. A remoção deste poluente por processo de nitrificação e desnitrificação, requer eficiente aeração e fonte de carbono orgânico, além da eficiência de remoção ser função da razão de reciclo. A aplicação de novos processos biotecnológicos, nos quais amônio é convertido em nitrogênio gasoso sob condições anóxicas, com nitrito como aceptor de elétrons, permite uma economia de energia para a aeração, além de dispensar fonte de carbono orgânico. Dentre estes novos processos, a oxidação anaeróbica do íon amônio por bactérias da família *Planctomycetae* (Anammox) e a desnitrificação por bactérias nitrificantes (*Nitrosomonas*) têm sido amplamente citados. Neste contexto, o trabalho teve por objetivo estudar a remoção biológica de nitrogênio em reatores inoculados com lodo nitrificante cultivado em meio autotrófico, sob condições anóxicas, bem como acompanhar o desenvolvimento das populações microbianas. O lodo nitrificante proveniente de um sistema de lodos ativados para tratamento de esgoto doméstico foi adaptado em meio autotrófico, sob aeração, por 130 dias. Após este período, este lodo foi inoculado em dois reatores RBS (Reatores Sequencial em Batelada): RI e RII. O reator RI, após ser submetido a uma lavagem celular inicial, e o reator RII foram operados com retenção de células, sendo aplicado um TRH de 5dias. Ambos os reatores foram alimentados com meio autotrófico contendo amônio e nitrito mantidos sob condições anóxicas, a 35°C e pH em torno de 7,5 e acompanhados por um período de 225dias. A remoção biológica de nitrogênio no período de estabilidade (150 a 225dias) foi de 30-40% para RI e em torno de 20% para RII. Apesar do RI possuir menor concentração celular, apresentou uma eficiência de remoção específica média de $25\text{mgN} \cdot (\text{gSST})^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ a partir de 150dias, muito superior ao RII ($5\text{mgN} \cdot \text{gSST}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) no mesmo período. A lavagem inicial de células pode ter favorecido o desempenho do reator RI, no qual desenvolveu-se uma população mais especializada do que em RII, justificando sua maior eficiência de remoção de nitrogênio. Tanto o NMP quanto a análise por FISH revelaram um enriquecimento de *Nitrosomonas* em relação as *Nitrobacter* nos reatores RI e RII, ao longo do período de acompanhamento, comparado ao inóculo. A análise FISH identificou a presença de bactérias anammox no reator RI, submetido a lavagem celular, evidenciando um enriquecimento do lodo em biomassa anaeróbia amônio-oxidante a partir do lodo nitrificante de um sistema de lodos ativados.

ABSTRACT

Effluent discharge with high nitrogen content can damage the environmental equilibrium and cause problems to aquatic organisms. This pollutant removal by nitrification and denitrification process demands efficient aeration and biodegradable carbon source. In addition, nitrogen removal efficiency is a function of the recycle ratio. The application of new biological processes, where ammonium is converted to nitrogen gas under anoxic conditions using nitrite as electron acceptor, promotes an energy economy used for aeration and no necessity of external carbon source addition. Among the new processes the anaerobic ammonium oxidation by *Planctomyces* (Anammox) and the denitrification by nitrifiers (*Nitrosomonas*) have been mostly cited. In this context, the aim of this work was to investigate the biological nitrogen removal in reactors seeded with a nitrificant sludge maintained under anoxic and autotrophic conditions as well as the development of microbial populations monitoring. Sludge from an activated sludge system treating domestic wastewater was adapted to an autotrophic medium with constant aeration during 130 days. After this period the sludge was seeded in two ASBR reactors (anaerobic sequential batch reactor), RI and RII. The reactor RI, after a cell washout at the beginning of the process, and reactor RII were operated with cells retention. Both reactors were fed with autotrophic medium containing ammonium and nitrite, maintained in anoxic conditions and they were operated with 5 days HRT at 35°C and pH around 7.5. The reactors were monitored for 225 days. Nitrogen elimination in the steady-state, (150 – 225 operation days) was 30 - 40% for reactor RI and about 20% for RII. Besides the RI low biomass concentration its specific nitrogen removal efficiency average was $25\text{mgN} \cdot (\text{gSST})^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ after 150 days, higher than the one obtained in RII ($5\text{mgN} \cdot (\text{gSST})^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) in the same period. The initial cells washout could be favored the RI reactor performance, where developed a more specialized microbial population than in the reactor RII, responsible for the higher nitrogen elimination. Methods like MPN and FISH revealed an enrichment of *Nitrosomonas* regarding *Nitrobacter* in reactors RI and RII, when compared with the inoculum. FISH analysis identified the anammox bacteria in the reactor RI (with initial cell washout) showing an enrichment of anaerobic ammonium oxidizers from a nitrifying sludge originated in an activated sludge system treating domestic wastewater.

1. INTRODUÇÃO

O aporte de nitrogênio pelo organismo humano provém da ingestão de proteínas, sendo o nitrogênio excedente do metabolismo excretado na forma de uréia. Outras fontes de nitrogênio orgânico são os dejetos de animais e efluentes industriais ricos em proteína. O nitrogênio orgânico presente no esgoto, é hidrolisado liberando íon amônio. Devido aos riscos inerentes ao lançamento de efluentes com elevada concentração deste componente, a legislação brasileira limita a concentração de amônio em $5\text{mg N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$, para efluentes de qualquer natureza.

Dentre as implicações ecológicas da inserção de elevadas cargas de amônio no ambiente está o consumo do oxigênio dissolvido no meio, devido a nitrificação, uma vez que para oxidar 1mg de NH_4^+ são necessários cerca de $4,3\text{mg}$ de O_2 , podendo ocasionar a morte dos organismos aquáticos. Além disso, o nitrogênio residual descartado nos cursos d'água estimula a atividade autotrófica, ocasionando a eutrofização devido a produção de uma grande quantidade de biomassa na forma de algas. Com relação ao nitrato, formado a partir da reação de nitrificação no próprio ambiente, os padrões de potabilidade do Ministério da Saúde (portaria 1469/2000) sugerem níveis abaixo de $10\text{mgN-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$ para água potável, pois, embora não cause danos diretos à saúde, o nitrato se reduz facilmente a nitrito no trato digestivo, tornando-se nocivo devido ao seu efeito cancerígeno.

O tratamento de efluentes por processos de nitrificação e desnitrificação, envolve uma primeira fase aeróbia de nitrificação, na qual bactérias nitrificantes oxidam amônio a nitrito e nitrato. Num segundo passo, o nitrato formado na primeira etapa é convertido em nitrogênio gasoso, por bactérias quimorganotróficas que requerem uma fonte de carbono para a desnitrificação. Assim, há necessidade de um eficiente sistema de aeração, para adequado desenvolvimento das nitrificantes, e a adição de um substrato apropriado pode se fazer necessária para completar a desnitrificação. A eficiência de remoção de nitrogênio do sistema depende da razão de reciclo empregada no processo. Ainda, devido a elevada quantidade de biomassa gerada, há uma preocupação com o tratamento e descarte do lodo excedente.

Tendo em vista a importância da remoção de nitrogênio, frente aos rigorosos padrões ambientais, bem como as desvantagens oferecidas pelos processos de

nitrificação e desnitrificação, as pesquisas mais recentes em tratamento biológico de efluentes estão voltadas para melhorar a eficiência da remoção de nitrogênio e reduzir custos, otimizando as estratégias de tratamento usuais ou buscando implementar novos processos com microrganismos capazes de converter nitrogênio na forma amoniacal e nitrito em nitrogênio gasoso. O processo ou sistema de tratamento biológico a ser escolhido estará intrinsecamente relacionado ao tipo específico de microrganismo que se pretende selecionar, uma vez que a oxidação dos compostos nitrogenados pode ocorrer por diferentes vias do metabolismo bacteriano, possibilitando o desenvolvimento de processos aeróbios e anaeróbios.

Até a década de 90, apenas processos aeróbios vinham sendo discutidos para oxidação do amônio. No entanto, elevadas perdas de nitrogênio foram observadas em plantas de tratamento de efluentes, bem como em reatores com baixa concentração de oxigênio dissolvido e baixa quantidade de matéria orgânica presente no efluente, indicando que um processo de oxidação anaeróbia do amônio poderia estar ocorrendo. Estudos posteriores demonstraram que em um novo processo biológico autotrófico, amônio poderia ser convertido em nitrogênio gasoso sob condições anóxicas com nitrito como acceptor de elétrons, o qual foi nomeado “Anaerobic Ammonium Oxidation” (Anammox).

As vantagens do processo Anammox sobre a tradicional combinação de nitrificação e desnitrificação para tratamento de efluentes são a economia da energia que seria gasta com aeração e nenhum requerimento de fonte externa de carbono orgânico, uma vez que o processo é autotrófico. Entretanto, o “start-up” do processo poderia ser muito prolongado pela relativamente baixa velocidade de crescimento das bactérias Anammox. Por outro lado, esta característica tem como vantagem a pequena quantidade de lodo gerada.

Tendo em vista que os organismos anammox identificados até o momento (*Candidatus Brocadia anammoxidans* e *Kuenenia stuttgartiensis*) têm sido extremamente difíceis de cultivar em cultura pura, torna-se de grande importância identificar outras bactérias capazes de oxidar amônio em anaerobiose, de modo que o processo possa ser amplamente difundido em plantas de tratamento de efluentes. Bactérias amônio oxidantes do gênero *Nitrosomonas* têm despertado interesse, pois são capazes de nitrificação e simultânea desnitrificação a baixas concentrações de oxigênio, com amônio servindo como doador e nitrito como acceptor de elétrons.

De maneira geral, com o emprego de processos anaeróbios ou anóxicos, além da economia com oxigênio, tem-se a vantagem de que a quantidade de biomassa gerada é muito menor do que em aerobiose, devido à baixa velocidade de crescimento, dispensando a etapa de tratamento do excesso de lodo. Em face disso, o desenvolvimento adequado de um sistema para tratamento de efluentes com baixa relação C/N, fazendo uso de microrganismos capazes de oxidar amônio a nitrogênio gasoso sob condições anóxicas, promete ser uma alternativa promissora à remoção de nitrogênio por processos de nitrificação e desnitrificação, oferecendo melhor eficiência com menores custos.

Neste contexto, o foco de estudo deste trabalho é a remoção biológica de nitrogênio de efluente sintético pelo processo de oxidação anaeróbia do amônio, englobando a atividade autotrófica de bactérias do gênero *Nitrosomonas* e, possivelmente, bactérias anammox, resultante do cultivo de um lodo nitrificante de um sistema de lodos ativados da Companhia de Saneamento do Estado de Santa Catarina (CASAN), em condições específicas para o desenvolvimento da reação de interesse.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar a capacidade de remoção de nitrogênio de um lodo nitrificante alimentado com meio autotrófico contendo amônio e nitrito mantido sob condições anóxicas.

2.2 Objetivos específicos

Testar duas estratégias de partida de reatores do tipo Reator Sequencial em Batelada (RBS) para enriquecimento da cultura em oxidadoras de amônio, utilizando lavagem celular inicial e retenção total de células.

Verificar o desempenho dos reatores em função da remoção de nitrogênio.

Avaliar o enriquecimento de um lodo nitrificante em microrganismos capazes de realizar a oxidação anaeróbia do íon amônio, utilizando as técnicas de determinação do Número Mais Provável (NMP) e “Fluorescent In Situ Hybridisation” (FISH).

Determinar a cinética de consumo de substrato do lodo enriquecido.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Metabolismo Microbiano do Nitrogênio

A maior parte do nitrogênio global existe sob a forma de nitrogênio gasoso, não prontamente disponível para a biota terrestre. O suprimento, bem como a ciclagem ambiental das formas disponíveis deste elemento, são largamente dependentes da decomposição biológica do nitrogênio, presente nos componentes acumulados dentro da biota (MCELDOWNEY *et al.**, apud PRATES, 1997).

As vias metabólicas envolvidas no ciclo do nitrogênio inorgânico têm sido conduzidas tanto por microrganismos amplamente descritos na literatura, bem como por alguns ainda pouco conhecidos. Os possíveis caminhos para obtenção de energia e as enzimas envolvidas, estão relacionadas com a adaptação e sobrevivência destes microrganismos sob uma variedade de condições ambientais (YE & THOMAS, 2001).

Na Figura 3.1 estão representadas as transformações dos compostos nitrogenados no ciclo do nitrogênio, resultantes do metabolismo microbiano nos processos de fixação, nitrificação, desnitrificação, oxidação anaeróbia do amônio via nitrito e redução desassimilatória do nitrato.

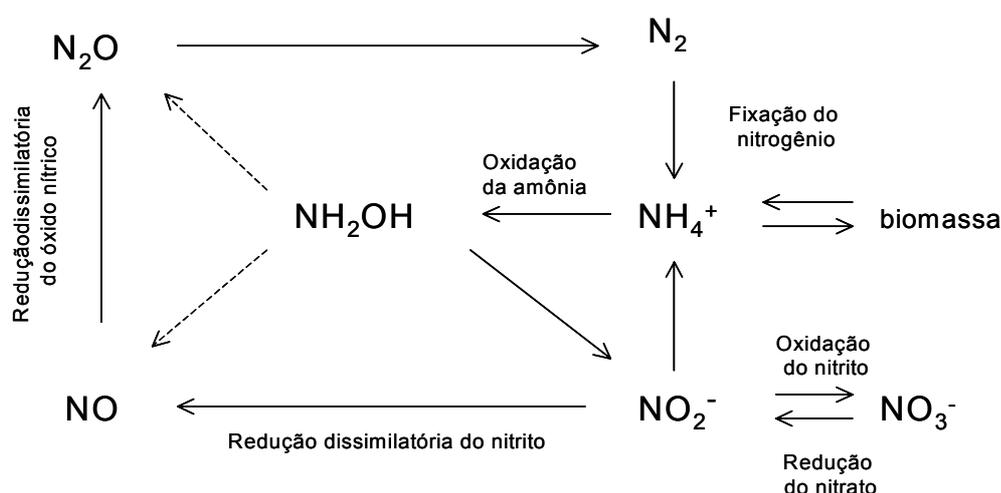


Figura 3.1: Representação esquemática das reações envolvidas no ciclo do nitrogênio (Fonte: YE & THOMAS, 2001).

* MCELDOWNEY, S.; HARDMAN, D. J.; WAITE, S. "Pollution ecology and biotreatment". London, Longman Scientific & Technical. 1993.

Na biosfera, o nitrogênio encontra-se, principalmente como um gás altamente estável, que pode ser utilizado pelas “bactérias fixadoras de nitrogênio”, tais como *Rhizobium*, *Azobacter* e *Cianobactérias*. O processo metabólico de fixação biológica de nitrogênio molecular atmosférico, que corresponde a uma redução do nitrogênio gasoso a íon amônio, é bastante importante para as plantas e animais, uma vez que fornece um composto nitrogenado assimilável pelos seres vivos (VIEIRA *et al.*, 1991; BROCK, 1994).

A fixação bacteriana do nitrogênio é um processo metabólico que necessita de energia para quebrar a ligação do nitrogênio ($N\equiv N$). Tal processo pode também ocorrer quimicamente na atmosfera, via descargas elétricas (relâmpagos), através da fixação industrial (indústria de fertilizantes) ou por processos de queima de combustíveis fósseis. Contudo, cerca de 85% da fixação de nitrogênio na Terra são de origem biológica (BROCK, 1994).

O íon amônio produzido pela fixação bacteriana do nitrogênio ou pela amonificação de compostos nitrogenados orgânicos pode ser assimilado para síntese celular ou oxidado a nitrato pela atividade de bactérias nitrificantes abundantes no solo. O nitrato formado é convertido, através do processo de desnitrificação, a óxido nitroso e nitrogênio gasoso, que é liberado para a atmosfera (BROCK, 1994; VIEIRA *et al.*, 1991).

O nitrato pode, ainda, ser assimilado (redução assimilatória do nitrato) ou desassimilado, através da redução desassimilatória do nitrato a íon amônio.

A redução assimilatória do nitrato leva à formação do íon amônio, que será utilizado para a biossíntese celular. Este processo ocorre sob condições aeróbias e anaeróbias, não resultando em rendimento energético, e o produto, íon amônio, não é excretado para o meio. A quantidade de nitrogênio reduzido é proporcional aos requerimentos celulares para a produção de biomassa. Quando existe grande concentração do íon amônio, o processo é inibido ou torna-se insignificante (TIEDJE, 1988).

A redução desassimilatória do nitrato a íon amônio (RDNA) ocorre sob condições de oxigênio limitante e serve para dissipar o excesso de potencial redutor ou gerar amônia para assimilação e crescimento celular anaeróbio (YE & THOMAS, 2001). Esse processo é regulado pelo oxigênio, mas não é afetado pelo íon amônio e o nitrogênio reduzido não é utilizado pela célula. Este processo tem sido verificado em bactérias de metabolismo fermentativo (PRATES, 1997).

A primeira reação da via da RDNA é a redução do nitrato a nitrito, denominada respiração do nitrato. Esse passo é acoplado à produção de energia na maioria dos organismos. Apesar de necessário, não é passo limitante. Além do mais, o nitrito formado poderia prontamente ser convertido em gás pelas desnitrificantes presentes na comunidade. Portanto, o passo crítico é a conversão do nitrito em íon amônio. A RDNA seria benéfica para a célula bacteriana, pois constituiria um mecanismo de retirada do nitrito acumulado no meio, uma reserva de elétrons que permitiria a reoxidação do NADH, e a produção de energia através do transporte de elétrons por fosforilação oxidativa, como ocorre na redução do nitrito pelas desnitrificantes. Dentre os benefícios citados, o mais postulado é o da reserva de elétrons (TIEDJE, 1988).

Outro processo possível de ocorrer é a redução desassimilatória do sulfato (RDS), citada por POLANCO *et al.* (2001) como uma alternativa para remoção simultânea de nitrogênio e enxofre, sob condições anaeróbias. Segundo estes autores, bactérias redutoras de sulfato usam sulfato como acceptor final de elétrons para a degradação de componentes orgânicos e hidrogênio. A rota de degradação de nitrogênio e enxofre pode interagir a vários níveis. Sulfito pode ser o doador de elétrons, sendo reoxidado a S⁰ ou sulfato por *Thiobacillus denitrificans* usando nitrato como acceptor de elétrons. Apesar de a RDS ser considerada uma rota de desnitrificação alternativa, há uma conversão de nitrato a amônio. Nenhuma referência sobre o papel do sulfato como acceptor de elétrons produzidos na oxidação do amônio a nitrito ou a nitrogênio gasoso tem sido encontrada.

Em relação ao ciclo do nitrogênio, a reação mais recentemente descoberta é a oxidação anaeróbia do íon amônio, via nitrito, possibilidade encontrada pelo metabolismo microbiano para converter amônio em nitrogênio gasoso na ausência de oxigênio e de matéria orgânica. As atividades microbianas de oxidação anaeróbia do amônio e desnitrificação são os mecanismos majoritários na conversão de nitrogênio combinado a nitrogênio gasoso, completando o ciclo do nitrogênio (YE & THOMAS, 2001).

As reações das quais participam as espécies inorgânicas de nitrogênio envolvem um sistema enzimático bastante variado, que em algumas vias é bem elucidado, embora em outras seja, ainda, pouco conhecido. Entre estas enzimas estão a nitrogenase, que leva à formação do íon amônio, a amônia monoxigenase, que produz hidroxilamina e nitrito redutase e óxido redutase, que formam óxido nitroso e nitrogênio gasoso, respectivamente (YE & THOMAS, 2001).

Na tabela 3.1 estão representadas a estequiometria de cada processo de transformação biológica do nitrogênio (reações e produtos), bem como a variação de energia livre envolvida. Como pode ser observado, constam tanto as equações químicas fundamentais quanto conjuntos de equações sugeridas por vários autores para os processos de remoção de nitrogênio, tais como: Anammox, SHARON e OLAND, que serão descritos ao longo deste capítulo.

Tabela 3.1: Transformações biológicas do nitrogênio

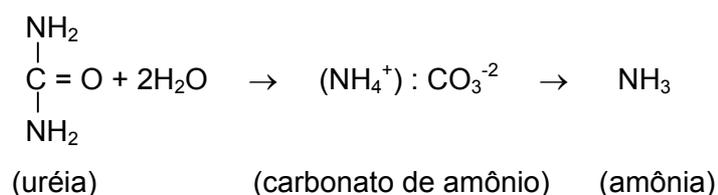
Processos, Reações e Produtos	ΔG^0 (kJ.mol ⁻¹)
Fixação do Nitrogênio	
1) $0,5N_2 + 1,5H_2 + H^+ \rightarrow NH_4^+$	-39,4
Nitrificação e Desnitrificação convencional	
2) $NH_4^+ + 1,5O_2 \rightarrow NO_2^- + 2H^+ + H_2O$	-290,4
3) $NO_2^- + 0,5O_2 \rightarrow NO_3^-$	-72,1
4) $NO_3^- + 1,25\{CH_2O\} + H^+ \rightarrow 0,5N_2 + 1,75H_2O + 1,25CO_2$	-594,6
Desnitrificação Autotrófica	
5) $3NO_3^- + 5NH_4^+ \rightarrow 4N_2 + 9H_2O + 2H^+$	-297
Anammox	
6) $NO_2^- + NH_4^+ \rightarrow N_2 + H_2O$	-358
7) $NH_4^+ + 1,32NO_2^- + 0,066HCO_3^- + 0,13H^+ \rightarrow 1,02N_2 + 0,26NO_3^- + 0,066CH_2O_{0,5}N_{0,15} + 2,03H_2O$	
SHARON	
8) $NH_4^+ + 1,5O_2 \rightarrow NO_2^- + H_2O + 2H^+$	-290,4
OLAND	
9) $0,5NH_4^+ + 0,75O_2 \rightarrow 0,5NO_2^- + 0,5H_2O + H^+$	-271
10) $0,5NH_4^+ + 0,5NO_2^- \rightarrow 0,5N_2 + H_2O$	
CANON	
11) $NH_4^+ + 1,5O_2 \rightarrow NO_2^- + H_2O + 2H^+$	-290,4
12) $NH_4^+ + 1,32NO_2^- + H^+ \rightarrow 1,02N_2 + 0,26NO_3^- + 2H_2O$	
RDNA	
13) $NO_3^- + 2\{CH_2O\} + 2H^+ \rightarrow NH_4^+ + 2CO_2 + H_2O$	-655

Fonte: STUMM, 1996; JETTEN *et al.*, 1999; SLIEKERS *et al.*, 2001; JETTEN *et al.*, 2002.

3.2 Importância da Remoção Biológica de Nitrogênio

A atividade microbiana combinada, conforme anteriormente descrito, completa o ciclo do nitrogênio na natureza. No entanto a entrada de altas cargas de nitrogênio devido à atividade humana, seja na forma de esgoto doméstico ou efluentes industriais, causa um grande desequilíbrio no sistema. Neste contexto, conhecer o metabolismo microbiano do nitrogênio é de grande importância para o tratamento e biorremediação destes compostos.

As principais fontes de nitrogênio orgânico lançados na naturezas são o esgoto doméstico, os dejetos de animais e os efluentes altamente protéicos de certos processos industriais. Na forma de esgoto, tanto doméstico quanto industrial, o nitrogênio orgânico é rapidamente desaminado e uréia que é hidrolisada pela enzima urease para liberar amônia (GRAY, 1992), conforme a reação a seguir.



Até o esgoto doméstico entrar na planta de tratamento, 90% do nitrogênio está presente como amônia ou componentes orgânicos instáveis que são rapidamente transformados em amônia, devido a reação de amonificação, que em pH neutro encontra-se em meio aquoso como íon amônio (NH_4^+). Esgoto doméstico, com uma concentração de nitrogênio amoniacal de $35\text{mgN-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$, é extremamente diluído comparado com outros efluentes ricos em nitrogênio, tais como efluentes de indústria frigorífica com concentração média de $170\text{mgN-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ (GRAY, 1992; MIRANDA *et al.*, 2000).

A concentração de nitrogênio presente no esgoto doméstico excede o requerimento microbiano para oxidar a quantidade de carbono presente, então somente parte do nitrogênio é removida por atividade heterotrófica convencional, sendo incorporado na biomassa microbiana. O nitrogênio residual estimula a atividade autotrófica, que, se descartado nos cursos d'água, ocasionará a eutroficação devido à atividade fotoautotrófica. A utilização do nitrogênio por fotoautotróficos produz uma grande quantidade de biomassa na forma de algas (GRAY, 1992).

Além disso, elevadas concentrações do íon amônio podem ter implicações ecológicas, como influenciar fortemente a dinâmica do oxigênio dissolvido no meio, uma vez que, para oxidar 1,0mg de amônio são necessários cerca de 4,3mg de oxigênio. Portanto, o lançamento de um efluente contendo um elevado valor de DBO nitrogenada (devido aos compostos de nitrogênio), poderá resultar em consumo de oxigênio, devido a nitrificação, o que pode interferir, de forma bastante negativa na comunidade aquática. Por outro lado, em pH básico o íon amônio se transforma em amônia conforme apresentado na Figura 3.2, que, dependendo de sua concentração, pode ser tóxica para estes organismos (PRATES, 1997).

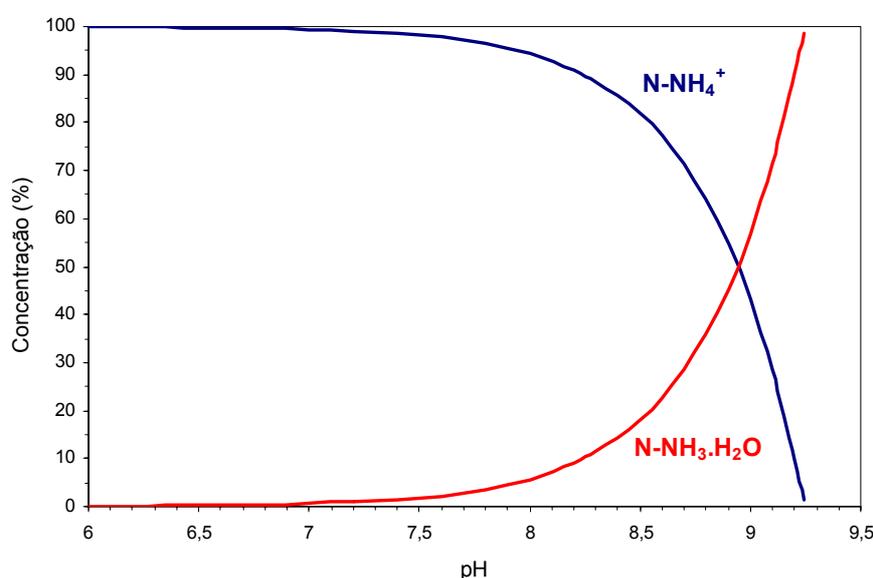


Figura 3.2: Curva de equilíbrio entre íon amônio e amônia em função do pH

No caso de tratamento de efluentes que apresentam uma baixa relação C/N, utilizando um sistema de nitrificação e desnitrificação, o conteúdo de carbono orgânico biodisponível pode ser insuficiente para uma completa desnitrificação, fazendo-se necessária a adição de uma fonte externa de carbono orgânico. Além disso, a eficiência de remoção de nitrogênio nestes sistemas é função da razão de reciclo. TEIXEIRA *et al.* (2002) determinaram a eficiência teórica de remoção de nitrogênio, em função da vazão de reciclo entre os reatores de nitrificação e desnitrificação por eles estudados. Conforme pode ser observado na Figura 3.3, para a razão de reciclo experimental utilizada ($R=1,8$), a máxima eficiência de remoção teórica é de 64,3%, podendo ser alcançada uma eficiência de remoção de 100% apenas para uma razão de reciclo infinitamente elevada.

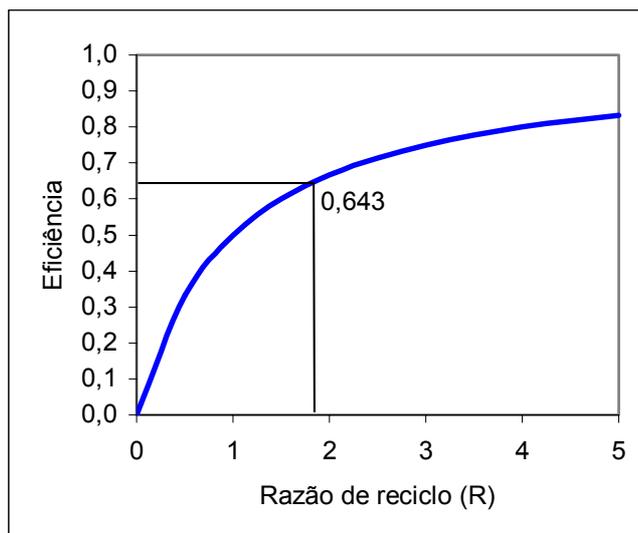


Figura 3.3: Eficiência teórica em função da razão de reciclo para o sistema utilizado no experimento (Fonte: TEIXEIRA *et al.*, 2002)

Frente aos riscos ambientais, os efluentes industriais ou municipais necessitam atender a rigorosos padrões de concentração de nitrogênio para serem descartados, ao final do tratamento. A Resolução N° 20 do CONAMA (Conselho Nacional de Meio Ambiente) estipula como máximo valor permissível $5\text{mg N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$, para efluente de qualquer fonte poluidora, sendo esta a única menção com relação a compostos nitrogenados (Legislação Federal, 1993).

As pesquisas recentes em remoção de nitrogênio estão voltadas para melhorar a eficiência e reduzir custos, otimizando as estratégias de tratamento disponíveis ou buscando implementar novos processos e, possivelmente, novos microrganismos capazes de converter nitrogênio amoniacal em nitrogênio gasoso, sua forma inerte (POLLICE, A. *et al.*, 2001). A eliminação química de amônio por precipitação com amônio-fosfato de magnésio ou por “stripping” é viável, mas gera custos mais elevados que os processos de tratamento biológicos (FUX *et al.*, 2002).

O processo ou sistema de tratamento biológico a ser escolhido está intrinsecamente relacionado ao tipo de microrganismo que se pretende favorecer. Os biorreatores que operam sob condições de aeração possibilitam o desenvolvimento de microrganismos aeróbios, que através da respiração aeróbia oxidam as moléculas orgânicas e/ou inorgânicas. Nos biorreatores anaeróbios, por sua vez, são selecionados microrganismos capazes de utilizar o metabolismo fermentativo ou respiração anaeróbia. Portanto, a oxidação dos compostos pode ocorrer por diferentes vias do metabolismo

microbiano, possibilitando o desenvolvimento de vários aspectos da engenharia dos biorreatores e resultando em variantes dos processos aeróbios e anaeróbios usuais (VAZOLLER, 1988).

3.3 Processo de Nitrificação e Desnitrificação

Amônio, a forma reduzida de nitrogênio, é oxidado por bactérias autotróficas nitrificantes a nitrato, via nitrito, por um processo conhecido como nitrificação. Somente uma pequena proporção de nitrogênio amoniacal é assimilada pela biomassa heterotrófica durante o tratamento de efluentes e o remanescente é oxidado por bactérias quimio-autotróficas. Bactérias autotróficas são hábeis em utilizar o nitrogênio em uma via não assimilativa, como fonte de energia, então somente uma pequena quantidade de biomassa é produzida (GRAY, 1992).

A oxidação microbiana do íon amônio ocorre em dois distintos estágios, envolvendo diferentes bactérias nitrificantes quimio-autotróficas, que utilizam amônio ou nitrito como uma fonte de energia, oxigênio como acceptor final de elétrons, amônio como fonte de nitrogênio e carbonato como fonte de carbono (GRAY, 1992).

O primeiro estágio do processo é a oxidação do íon amônio a nitrito:



Esta reação é geralmente considerada ser catalisada pelo gênero *Nitrosomonas* e duas espécies, *N. europaea* e *N. monocella*, são freqüentemente isoladas. Entretanto, outros gêneros têm também sido identificados como *Nitrospira*, *Nitrosococcus*, *Nitrosocytis* e *Nitrosogloba*. O íon hidrogênio liberado na oxidação da amônia a nitrito ocasiona uma queda no pH do efluente, o que pode ser um problema em sistemas fechados, ou com longo tempo de retenção, pois a redução do pH poderá inibir ou mesmo parar a nitrificação (GRAY, 1992).

Em um segundo estágio, nitrito é oxidado a nitrato:



O gênero *Nitrobacter* é considerado ser responsável pela segunda reação nitrificante, mas *Nitrocystis*, *Nitrococcus* e *Nitrospina* também têm sido citadas. A reação global da nitrificação de amônio para nitrato requer o fornecimento de uma alta quantidade de oxigênio, em torno de 4,5gO₂ para cada 1gN-NH₄ oxidado (GRAY, 1992).

Desnitrificação é um processo biológico aplicado para remover NO₃ ou NO₂ de efluentes pela redução a N₂. Muitas variedades de bactérias heterotróficas são hábeis em desnitrificar efluentes em condições anóxicas (*Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Alcaligenes*, *Thiobacillus*, *Bacillus*). Este processo ocorre na presença de uma fonte de carbono que funciona como doador de elétrons, enquanto NO₃ age como acceptor de elétrons na cadeia respiratória (SÁNCHEZ *et al.*, 2000).

A Portaria 1469 do Ministério da Saúde (2000), que define os padrões de potabilidade da água, sugere níveis de nitrato abaixo de 10mgN-NO₃⁻.L⁻¹ para a água potável, já que o NO₃ se reduz facilmente a NO₂ no trato digestivo humano, tornando-se nocivo para a saúde devido ao seu efeito cancerígeno.

Quando o efluente a ser tratado apresenta altas concentrações de nitrogênio amoniacal e baixas concentrações de compostos orgânicos biodegradáveis, uma fonte suplementar de carbono é requerida para propiciar a adequada desnitrificação. Metanol é comprovadamente uma excelente fonte de carbono (ILIES & MAVINIC, 2000). No entanto, existe uma gama de compostos naturais que podem ser usados como substrato pelas bactérias desnitrificantes, como detergentes não iônicos, compostos aromáticos e sintéticos e solventes clorados (MUXÍ, 1994).

A determinação da atividade desnitrificante específica (ADE) possibilita calcular a máxima carga de nitrogênio que pode ser tratada por um sistema. Baseados nisso, SÁNCHEZ *et al.* (2000) estudaram os efeitos da relação C/N, concentração de SSV (sólidos suspensos voláteis) e agitação na determinação da ADE e estes parâmetros foram avaliados para estabelecer as condições operacionais ótimas. A máxima ADE obtida foi com 1,5g SSV.L⁻¹, uma relação C/N de 1,3 e frascos agitados a 180rpm, sendo observada, neste caso, uma completa desnitrificação a N₂ (98-99% de N₂ na composição do gás).

Segundo ILIES & MAVINIC (2000), a temperatura afeta ambos os processos, nitrificação e desnitrificação. Estes autores investigaram a capacidade de remoção de nitrogênio de um sistema 4-estágio "Bardenpho" (caracterizado por um pré e pós-

processo de desnitrificação), para tratar líquidos percolados de aterros contendo acima de $2200\text{mgN-NH}_4^+.\text{L}^{-1}$, sob progressivo decréscimo da temperatura ambiente (de 20°C para 10°C), ao longo de 311 dias. Durante 260 dias, a 20°C , o sistema manteve-se estável, gerando efluente livre de amônia e com baixa concentração de NO_x . Quando a temperatura foi diminuída para 17°C , a concentração de NO_x do sistema aumentou enquanto a concentração de amônia no efluente permaneceu zero, evidenciando uma inibição apenas da etapa de desnitrificação. O processo de nitrificação pareceu não ser afetado pela diminuição da temperatura até 14°C . Entretanto, quando a temperatura alcançou 10°C , o percentual de remoção de amônia passou de 100% para menos de 50% e a remoção de nitrogênio por desnitrificação diminuiu para menos de 5% do seu potencial, resultando num progressivo acúmulo de NO_x no efluente. Mesmo elevando novamente a temperatura, não houve qualquer sinal de recuperação da nitrificação ou desnitrificação.

A temperatura ótima para o crescimento de bactérias nitrificantes está na faixa entre 28 e 36°C , esperando-se pouco ou escasso crescimento abaixo de 4°C (MUXÍ, 1994).

Os valores de pH ótimo para a nitrificação estão ao redor de 7,5. O pH tem acentuado efeito inibitório para *Nitrobacter*, além de governar a dissociação do íon amônio. O amônio e o ácido nitroso não dissociado são tóxicos para as bactérias da nitrificação, sendo que valores de 10-150mg/L são inibitórios para *Nitrosomonas* e 0,1-1mg/L inibem *Nitrobacter* (MUXÍ, 1994).

HUNIK *et al.* (1993) determinaram a cinética de *Nitrobacter agilis* sob extremas concentrações de substrato (NO_2^-) e produto (NO_3^-) a vários valores de pH. Os parâmetros de afinidade pelo substrato e inibição pelo produto, combinados com efeitos do pH, foram derivadas da equação de Michaelis-Menten para cinética enzimática. A constante de afinidade pelo substrato (K_s) apresentou uma diminuição em função do pH num intervalo de 8,5 a 6,5 (de 1,11 a 0,29mM NO_2^-), demonstrando que a atividade de *N. agilis* decresce com o valor de pH. Este efeito é realçado pela concentração elevada de NO_2^- que inibe ambos microrganismos, *Nitrobacter* e *Nitrosomonas*. Foi observada, ainda, uma severa inibição de *N. agilis* pelo NO_3^- , o que se torna um inconveniente no tratamento de efluentes concentrados, pois não há um como evitar o acúmulo deste produto da nitrificação. No entanto, a combinação com processos de desnitrificação simultânea parece uma alternativa promissora. Os presentes autores propõem a

utilização de biofilme imobilizado em material suporte, formando uma dupla camada com microrganismos nitrificantes na parte externa e desnitrificantes na parte interna.

Estudos microscópicos tem revelado que sob condições de boa nitrificação, microrganismos amônio-oxidantes e nitrito-oxidantes estão em perfeita simbiose formando o floco. Então, em condições ótimas, não é esperado um acúmulo de nitrito no lodo ativado aeróbio. Na prática, em um ótimo processo de desnitrificação, a velocidade de redução de nitrito é maior que a velocidade de redução de nitrato, não sendo usual um acúmulo de nitrito também durante a desnitrificação. Fatores que podem induzir o acúmulo de nitrito são alta concentração de amônia livre, baixo pH, baixa concentração de oxigênio dissolvido, baixa temperatura e aumento da carga volumétrica (PHILIPS & VERSTRAETE, 2001).

LAANBROEK & GERARDS (1992) verificaram que a redução da tensão de oxigênio em uma cultura mista de *Nitrosomonas europaea* e *Nitrobacter winogradskyi* inibiu a oxidação de nitrito em maior proporção que a oxidação de amônio, ocorrendo um acúmulo de nitrito no reator. Os valores de K_m encontrados foram na faixa de 1-15 e 22-166 μMO_2 para as células de amônio e nitrito-oxidantes, respectivamente. A concentrações de oxigênio de 16kPa, 90 a 97% do amônio adicionado foi convertido a nitrato pelas células. A concentração de amônio, mas não de nitrito, aumentou a 2kPa e a concentração de nitrato diminuiu. Quando a tensão de oxigênio diminuiu para 0kPa, foi verificado acúmulo de amônio e nitrito, com fraca produção de nitrato.

No entanto, em alguns processos, tais como SHARON, OLAND e CANON, os quais são descritos adiante, ocorre uma nitrificação parcial até nitrito e desnitrificação de nitrito para nitrogênio gasoso, o que implica em altas concentrações de nitrito no meio. Nestes casos, precauções especiais devem ser tomadas devido ao risco de perdas de nitrito para o ambiente via efluente, pois, devido a sua toxicidade, pode trazer prejuízos para as plantas, fauna aquática, microrganismos nitrificantes e até mesmo para saúde humana (PHILIPS & VERSTRAETE, 2001).

3.3.1 Sistema de Lodos Ativados

O sistema de lodos ativados é amplamente utilizado, a nível mundial, para o tratamento de despejos domésticos e industriais, em situações em que uma elevada qualidade do efluente e reduzidos requisitos de área são necessários. No entanto, inclui

um elevado índice de mecanização, implicando em alto consumo de energia elétrica. Basicamente, compreende um tanque de aeração, tanque de decantação e recirculação de lodo. A biomassa consegue ser facilmente separada no decantador devido à formação de floco, no qual estão presentes bactérias heterotróficas aeróbias, autotróficas nitrificantes, heterotróficas desnitrificantes, filamentosas e protozoários, envolvidos em uma matriz de polissacarídeos (VON SPERLING, 2002).

A medida do diâmetro do floco, realizada através da análise microscópica, informa a respeito das condições gerais do lodo e pode ser correlacionada com a eficiência do processo. De modo geral, um floco que apresente um pequeno diâmetro ($<50\mu\text{m}$) caracteriza um lodo disperso e de difícil sedimentação; um diâmetro de floco médio a grande (>100 a $300\mu\text{m}$) é encontrado em lodos com boas condições de sedimentabilidade (VAZOLLER, 1988).

No tanque aerado ocorre a nitrificação, conversão de amônio a nitrato, mas não há remoção de nitrogênio. A desnitrificação é alcançada em ausência de oxigênio, pela respiração bacteriana do nitrato para oxidação da matéria orgânica, formando nitrogênio gasoso que é liberado para atmosfera (VON SPERLING, 2002). O esquema da Figura 3.4 mostra um sistema de lodos ativados modificado, comumente empregado para nitrificação-desnitrificação. Primeiramente, tem-se uma fase anóxica onde a matéria orgânica (DQO) presente no efluente bruto é removida juntamente com o nitrato, pelo processo de desnitrificação; a amônia presente no efluente bruto é levada a nitrato na fase aerada, através da nitrificação; o nitrato formado recircula para o primeiro tanque, bem como parte da biomassa separada no decantador secundário.

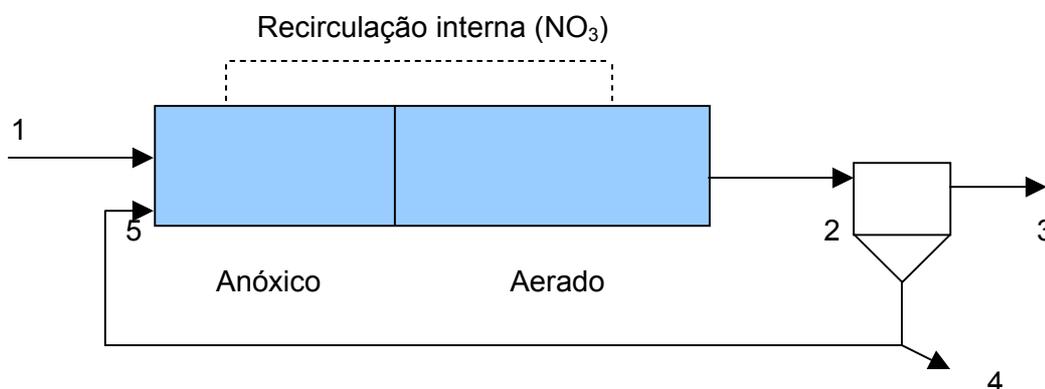


Figura 3.4: Remoção de nitrogênio pelo sistema de lodos ativados

1-Efluente bruto (NH_4 , DQO); 2 - Suspensão de lodo; 3 – Efluente tratado;

4 – Excesso de lodo; 5 – Recirculação de lodo. (Fonte: VON SPERLING, 2002)

Em um sistema de lodos ativados como o apresentado anteriormente, mesmo considerando 100% de conversão nas etapas de nitrificação e desnitrificação, a eficiência de remoção de nitrogênio depende fortemente da razão de reciclo, sendo este um limitante do processo (TEIXEIRA *et al.*, 2002). Para melhorar esta eficiência, algumas variações do sistema são propostas, como o processo “Bardenpho”, que emprega dois tanques anóxicos, para uma pré e pós desnitrificação, e dois tanques aerados, conforme descrito por ILIES & MAVINIC (2001).

As espécies microbianas presentes no floco reagem aos fatores de seleção do meio (tróficos ou físico-químicos), individualmente, segundo as suas características próprias. A microfauna é indicadora, portanto, do conjunto de parâmetros de funcionamento do processo de lodos ativados, uma vez que sua natureza varia com o nível de depuração, com a concentração de oxigênio dissolvido e com a presença de substâncias tóxicas dentro do tanque (VAZOLLER, 1988).

3.4 Novos Processos de Remoção Biológica de Nitrogênio

Recentemente, novos processos relacionados com a eliminação biológica de nitrogênio que podem ocorrer em plantas de tratamento de efluentes, tais como a desnitrificação aeróbia, a oxidação anaeróbia do amônio e a desnitrificação por bactérias nitrificantes litoautotróficas, têm sido descritos como alternativas promissoras frente as tecnologias usuais, tendo em vista o aumento da eficiência e redução de custos.

3.4.1 Desnitrificação Aeróbia

A remoção de nitrogênio e fosfato de efluentes tem se tornado um problema municipal e industrial, frente aos padrões de qualidade exigidos. Na Europa, uma diretiva de 21 de maio de 1991 definiu como máximo para concentração de nitrogênio e fósforo no efluente final de 10-15 e 1-2mg.L⁻¹, respectivamente, o que implica uma eficiência de remoção de 70 a 80% para o caso do tratamento de esgoto doméstico. No entanto, a média atual dos tratamentos utilizados para remoção de nitrogênio e fósforo deste resíduo está ao redor de 40% (PATUREAU *et al.*, 2001).

Até pouco tempo, para estabelecer um balanço de nitrogênio em plantas de tratamento de efluentes, eram considerados apenas os processos de nitrificação e desnitrificação, sem atentar para a existência atípica de bactérias fixadoras de nitrogênio, nitrificantes heterotróficas, amonificantes e desnitrificantes aeróbias. A atividade inesperada destas bactérias explicaria a dificuldade em fechar os balanços de massa em muitas plantas de tratamento e em solos (PATUREAU *et al.*, 2000).

Estas reações têm possibilitado o desenvolvimento de novos sistemas, frente às plantas convencionais que utilizam a combinação de nitrificação e desnitrificação em duas fases separadas. KSHIRSAGAR *et al.*^{*}, apud PATUREAU *et al.* (2000), demonstrou a viabilidade de combinar nitrificação e desnitrificação em um único reator aeróbio, inoculando lodo ativado nitrificante com *Thiosphaera pantotropha*, de conhecida atividade desnitrificante aeróbia.

ROBERTSON & KUENEN^{**}, apud GUPTA (1997), isolaram a bactéria *Thiosphaera pantotropha*, anaeróbia e autotrófica facultativa, capaz de crescer em ambiente mixotrófico e heterotrófico, podendo oxidar compostos de enxofre (como fonte de energia para o crescimento), nitrificar amônio a nitrito heterotroficamente e reduzir nitrato ou nitrito a N₂ independente da concentração de oxigênio dissolvido. Devido ao seu peculiar sistema enzimático, permite uma grande aplicabilidade em relação a estratégias de tratamento convencionais, seja para tratar efluentes ricos em matéria orgânica ou em nitrogênio.

T. pantotropha tem um metabolismo respiratório capaz de utilizar O₂, NO₂, NO₃ ou NO como acceptor final de elétrons. Pode usar hidroxilamina oxireductase para formar NO₂, bem como para combinar NO₂ e hidroxilamina a N₂O, como reportado para bactérias autotróficas amônio-oxidantes. Para algumas bactérias, como o *Paracoccus denitrificans*, que utilizam NO₃ como acceptor final de elétrons, a atividade desnitrificante é inibida pela presença de O₂. No entanto, a *T. Pantotropha* possui um sistema de nitrato redutase que a torna apta a desnitrificar tanto em condições anaeróbias quanto aeróbias (GUPTA, 1997).

^{*} KSHIRSAGAR, M.; GUPTA, A.B.; GUPTA, S.K.. "Aerobic denitrification studies on activated sludge mixed with *Thiosphaera pantotropha*". Environmental Technology. 16:35-43. 1995.

^{**} ROBERTSON, L. A.; KUENEN, J. G.. "*Thiosphaera pantotropha*, a facultatively anaerobic, facultatively autotrophic sulphur bacterium". Archives in Microbiology. 129, 2847-2855. 1983.

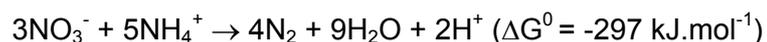
PATUREAU *et al.* (2000) compuseram um “mix” com amostras de ecossistema natural e de lodo ativado, o qual foi progressivamente adaptado alternando fases aeróbia/anóxica na presença de NO_3^- , visando enriquecer a microflora de desnitrificantes aeróbias. A influência do oxigênio dissolvido (OD) e da carga C/N na cinética de redução aeróbia do NO_3^- foi estudada em cultura contínua. Um ensaio foi conduzido em paralelo, nas mesmas condições, contendo, porém, cultura de *Microvirgula aerodenitrificans*. Os resultados mostraram não haver influência do OD na performance desnitrificante aeróbia, acima de um valor mínimo de 0,35mg/L para o consórcio e 4,5mg/L para *M. aerodenitrificans*. A uma carga de 160mg $\text{NO}_3^- \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, a velocidade de desnitrificação do consórcio e da cultura de *M. aerodenitrificans* foi de 122 e 66mg $\text{NO}_3^- \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, respectivamente. O aumento da carga aumentou a atividade de *M. aerodenitrificans* em maior proporção, comparada ao consórcio.

Segundo PATUREAU *et al.* (2000), isto mostra que o sistema enzimático desnitrificante e sistema de respiração de oxigênio funcionam em paralelo, ou seja, o oxigênio não é inibidor direto da atividade e síntese de enzimas desnitrificantes. No entanto, ao diminuir a concentração de oxigênio, além do valor mínimo, as enzimas desnitrificantes têm sua atividade aumentada.

3.4.2 Anammox

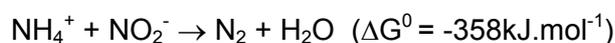
Até a década de 90, apenas processos aeróbios vinham sendo discutidos para oxidação do amônio. No entanto, MULDER *et al.* (1995) observaram uma perda de amônio em um reator desnitrificante de leito fluidizado, aplicado ao tratamento de efluente de um reator metanogênico que foi operado para degradação de resíduos de uma planta de produção de fermento, em Delft (Holanda). Neste mesmo reator foi verificado um elevado consumo de amônio e nitrato com concomitante produção de gás. Experimentos em fluxo contínuo demonstraram a estequiometria do processo como sendo de 5mol de NH_4^+ para cada 3mol de NO_3^- , resultando em 4mol de N_2 . Ficou, então, comprovada a descoberta de um novo processo de oxidação anaeróbia do amônio, em que amônio era oxidado a nitrogênio gasoso sob condições anóxicas, com nitrato servindo como aceptor de elétrons. Este processo foi denominado “Anaerobic ammonium oxidation” – Anammox.

Em teoria, já se sabia que amônio poderia ser usado como um doador inorgânico de elétrons para a desnitrificação conforme a equação a seguir.



A energia livre (ΔG^0) para esta reação está na mesma ordem de grandeza que a energia livre do processo de nitrificação aeróbia (para o qual $\Delta G^0 = -362\text{kJ.mol}^{-1}$), demonstrando que o processo de oxidação anaeróbia do amônio é quase tão favorável quanto o processo de nitrificação aeróbia. Em 1977, BRODA, baseado em cálculos termodinâmicos, já previa a existência de bactérias quimiolitotróficas capazes de oxidar amônio a nitrogênio gasoso com NO_3^- , CO_2 ou O_2 como oxidante (MULDER *et al.*, 1995).

Alguns anos mais tarde, foi verificado que nitrito também poderia servir como acceptor de elétrons, tendo, inclusive, ΔG^0 mais favorável de acordo com a reação:



Para uma melhor compreensão do processo, a biomassa proveniente do reator descrito por MULDER *et al.* (1995) foi enriquecida em um meio mineral autotrófico para o desenvolvimento de microrganismos anaeróbios amônio-oxidantes. O meio continha amônio e nitrito como único doador e acceptor de elétrons, respectivamente, e carbonato como única fonte de carbono. A concentração de oxigênio foi mantida abaixo dos níveis de detecção ($<1\mu\text{M}$) para prevenir efeitos inibitórios. Após enriquecimento da cultura com meio sintético, em reator de leito fluidizado, a velocidade de remoção de nitrogênio aumentou de $0,4\text{kgN.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ no lodo original para $2,4\text{kgN.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ (van de GRAAF *et al.* 1996).

O tipo de microrganismo dominante na cultura de enriquecimento foram células Gram-negativas com uma morfologia não usual apresentando uma coloração avermelhada. O método de NMP mostrou que nitrificantes aeróbias estiveram presentes no lodo, mas o número permaneceu constante e em torno de $(9\pm 5) \times 10^3 \text{ células.(mgSV)}^{-1}$ de amônio oxidantes e $(1\pm 0,9) \times 10^3 \text{ células.(mgSV)}^{-1}$ de nitrito oxidantes. Comparado a uma cultura pura de *Nitrosomonas europaea* com $9 \times 10^9 \text{ células.(mgSV)}^{-1}$, o número de nitrificantes foi considerado muito pequeno para ter alguma influência representativa no processo (van de GRAAF *et al.*, 1996).

Buscando esclarecer o metabolismo do processo, van de GRAAF *et al.* (1997) procederam um estudo da oxidação aneróbica do amônio utilizando ^{15}N radioativamente marcado. Partindo da cultura anteriormente citada, as etapas do processo foram

definidas e hidroxilamina e hidrazina foram identificados como importantes compostos intermediários. A rota metabólica apresentada na Figura 3.5 indica que em uma primeira etapa amônio é oxidado pela hidroxilamina para formar hidrazina. Então, os equivalentes de redução derivados de N_2H_4 reduzem o nitrito para regenerar a hidroxilamina e formar N_2 . Parte do NO_2 é levado a NO_3^- , o que geraria equivalentes de redução para fixação do CO_2 e conseqüente crescimento da biomassa.

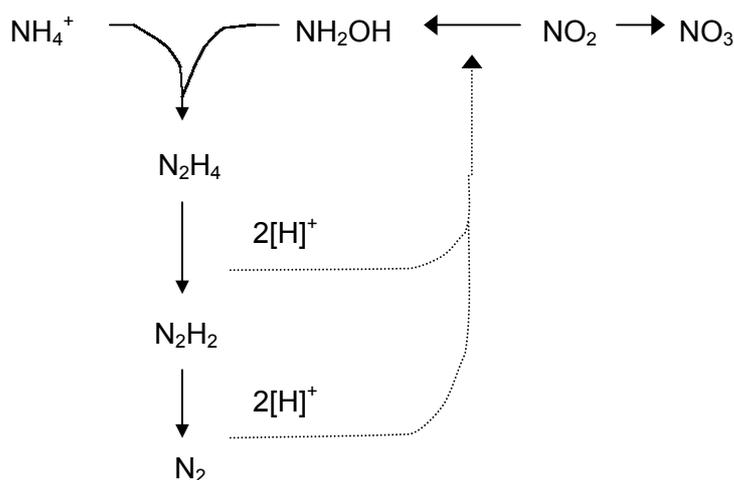
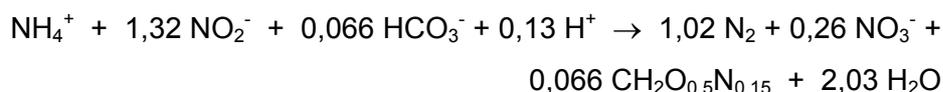


Figura 3.5: Possível rota metabólica para oxidação anaeróbica do amônio
(Fonte: van de GRAAF *et al.*, 1997)

A partir da rota metabólica proposta para a oxidação anaeróbica do íon amônio, alguns estudos com esta biomassa foram realizados, visando a determinação de parâmetros estequiométricos da reação. Neste sentido, um reator RBS com uma eficiente retenção da biomassa (>90%) foi otimizado para o estudo da comunidade anammox. Importantes parâmetros tais como rendimento da biomassa ($0,066 \pm 0,01 \text{ molC.}(\text{mol } NH_4^+)^{-1}$), máxima velocidade específica de consumo de amônio ($45 \pm 5 \text{ nmol.min}^{-1} \cdot (\text{mg proteína})^{-1}$) e a máxima velocidade específica de crescimento ($0,0027\text{h}^{-1}$, tempo de duplicação de 11dias), puderam ser determinados (STROUS *et al.*, 1998). Com base nestes dados e de estudos anteriores (van de GRAAF *et al.*, 1996) foi proposta a estequiometria da oxidação anaeróbica do amônio, conforme a reação:



As condições ambientais para o anammox foram temperatura entre 20 e 43°C (com ótimo a 40°C) e pH de 6,7-8,3 (com ótimo a pH 8). O processo foi inibido por

concentrações de nitrito acima de 20mM, embora concentrações maiores que 10mM já foram desfavoráveis. Quando a concentração de nitrito permaneceu acima de 5mM ($70\text{mgN-NO}_2^-\cdot\text{m}^{-3}$) por um longo período (12h), atividade anammox foi completamente inibida, sendo recuperada pela adição de quantidades traço de intermediários do processo (hidrazina e hidroxilamina). A constante de afinidade pelo substrato amônio e nitrito foi bastante elevada ($K_S \leq 5\mu\text{M}$) e a biomassa revelou-se estritamente anóxica, evidenciando perda completa de atividade, mas de forma reversível, mesmo em concentrações muito baixas de oxigênio, menores que $2\mu\text{M}$ (STROUS *et al.*, 1999).

A comunidade na biomassa foi dominada por mais de 70% de um tipo morfológico de microrganismo, o qual foi fisicamente purificado da cultura de enriquecimento por gradiente de densidade (centrifugação). O extrato de DNA das células purificadas foi usado como molde para amplificação por PCR com um primer 16SrDNA, obtendo-se uma seqüência dominante de *Planctomyces*. O microrganismo anaeróbio amônio-oxidante da ordem *Planctomyces* foi denominado *Candidatus Brocadia anammoxidans* (STROUS *et al.*, 1999).

Mais recentemente foi identificado um novo gênero de bactéria com atividade Anammox, encontrado no biofilme formado em reatores tipo biodiscos rotatórios, em Stuttgart (Alemanha), tendo sido denominado *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* (SCHMID *et al.*, 2000). A aplicação da técnica de biologia molecular FISH demonstrou a predominância desta bactéria em ecossistemas com altas perdas de nitrogênio (SCHMIDT *et al.*, 2002).

A Figura 3.6 mostra uma representação esquemática da oxidação anaeróbia do amônio por *Planctomyces*, a nível celular. A seqüência de reações e o sistema enzimático envolvido ainda não estão totalmente elucidados. O mecanismo para formação de hidroxilamina inclui a incompleta redução de nitrito a hidroxilamina por uma citocromo-c nitrito redutase (de todos os compostos de nitrogênio, a hidroxilamina é o mais rapidamente metabolizado pelo Anammox). Amônia e hidroxilamina são convertidos a hidrazina por uma enzima encontrada na membrana celular. A hidrazina é, então, oxidada a N_2 no periplasma. O mecanismo de transferência de elétrons para a redução do nitrito não é totalmente conhecido, indicando a presença de um novo tipo de enzima capaz de combinar dois átomos de nitrogênio, originando N_2 . Foram propostos dois possíveis sistemas: primeiro, uma única enzima seria responsável pela oxidação da hidrazina e redução do NO_2^- ; segundo, uma enzima nitrito-redutora mediaría a formação

de hidroxilamina enquanto enzimas de uma cadeia de transporte se encarregaria dos elétrons (van de GRAAF *et al.*, 1997; JETTEN *et al.*, 1999 ; YE & THOMAS, 2001).

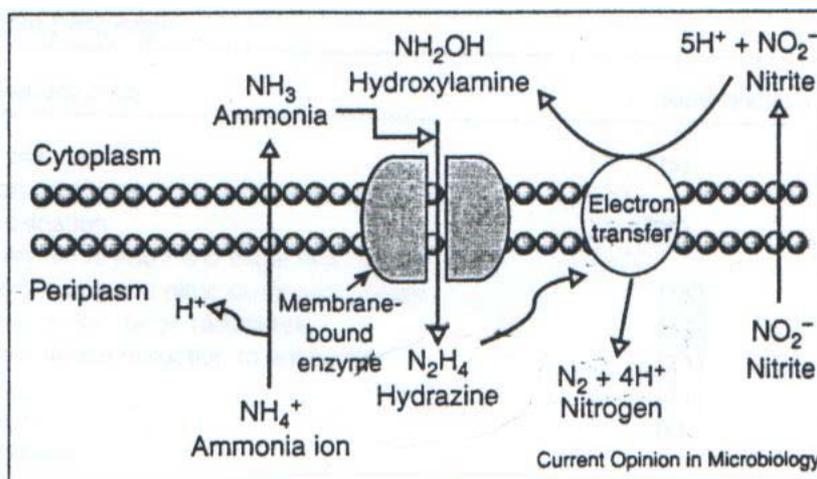


Figura 3.6: Oxidação anaeróbica do amônio por *Planctomyces* a nível celular (Fonte: YE & THOMAS, 2001)

Na literatura especializada atual é crescente o número de publicações revelando elevadas perdas de nitrogênio em plantas de tratamento de efluentes, indicando que a oxidação anaeróbica do amônio pode ser mais freqüente do que previamente assumido. Para compreender o processo e sua importância, seja em ambientes naturais ou em plantas de tratamento, é desejável identificar outras bactérias com esta capacidade, uma vez que os organismos anammox já conhecidos têm sido extremamente difíceis de cultivar em cultura pura (EGLI *et al.*, 2001).

As vantagens do processo Anammox sobre a tradicional combinação de nitrificação e desnitrificação para tratamento de efluentes são a menor demanda de oxigênio, utilizada pelas nitrificantes para oxidação parcial do amônio a nitrito, e nenhum requerimento de fonte externa de carbono, pois o processo é autotrófico. A desvantagem estaria relacionada a baixa velocidade de crescimento das bactérias anammox, o que prolongaria o “start-up” do processo (EGLI *et al.*, 2001). Por outro lado, esta mesma característica seria responsável pela pequena produção de lodo, uma vez que o tempo estimado de duplicação é de 11 dias (JETTEN *et al.*, 2001). Tendo em vista que o aumento do número de bactérias é muito lento, a utilização de reatores com um sistema de retenção de biomassa eficiente é necessária para o enriquecimento (SCHMIDT *et al.*, 2002).

A implementação do processo Anammox como uma tecnologia viável de tratamento de efluentes manuseável, requer uma melhor compreensão das faixas de permissibilidade para nitrito e amônio, das cargas de carbono orgânico e níveis de oxigênio admissíveis e do pH do meio (EGLI *et al.*, 2001).

Diferentes configurações de reatores têm sido aplicadas na conversão de amônio no processo Anammox. A utilização de reatores de leito fluidizado, permite a aplicação de elevadas cargas de nitrogênio. No entanto, reatores do tipo RBS (Reator Sequencial em Batelada) são mais simples e podem ser operados de maneira estável por um longo período de tempo, além de que altas velocidades de conversão de nitrogênio podem ser alcançadas (JETTEN *et al.*, 2001).

Um enriquecimento em microrganismos Anammox foi obtido por EGLI *et al.* (2001) a partir de uma biomassa retirada de um biodisco rotatório de contato, usado para o tratamento de efluente rico em amônio e com baixo conteúdo de carbono orgânico. O enriquecimento levou a uma população de 88% de bactérias Anammox, as quais foram identificadas por uma análise da seqüência 16S rDNA e por FISH. A percentagem de identidade entre a bactéria estudada e organismos Anammox anteriormente identificados, foi de 90,9% para *Brocadia anammoxidans* e entre 98,5 e 98,9% para *Kuenenia stuttgartiensis*.

3.4.3 Processos Envolvendo Nitrificação Parcial e Oxidação Anaeróbia do Amônio

Novos sistemas de nitrificação onde íon amônio é parcialmente convertido a nitrito (prevenindo a formação de nitrato), tais como OLAND, SHARON e CANON, os quais serão descritos nos itens seguintes, têm surgido como possibilidade de associação à desnitrificação autotrófica por oxidação anaeróbia do amônio. Desta maneira, o processo torna-se auto-sustentável, uma vez que não há necessidade de adição de nitrito ou fonte externa de carbono, e possibilita uma economia significativa de oxigênio (energia) com a nitrificação parcial em relação ao processo tradicional (FUX *et al.*, 2002).

Acúmulo de nitrito é freqüentemente observado em plantas de tratamento de efluentes devido à incompleta nitrificação. STEIN & ARP (1998), sugeriram uma inativação irreversível de bactérias amônio-oxidantes por nitrito a uma concentração de 420mgN-NO₂.L⁻¹. MULLER *et al.* (1995) reportaram que a velocidade de oxidação de

amônio foi reduzida pela metade quando em contato com $42\text{-}70\text{mgN-NO}_2^-\cdot\text{L}^{-1}$ quando comparada a $0\text{-}14\text{mgN-NO}_2^-\cdot\text{L}^{-1}$. Devido aos riscos inerentes ao acúmulo de nitrito, como a toxicidade, precauções especiais devem ser tomadas na utilização de novos processos de remoção de nitrogênio que utilizam este íon como substrato (PHILIPS & VERSTRAETE, 2001).

3.4.3.1 SHARON

O processo Sharon (“Single reactor system for High Ammonium Removal Over Nitrite”) é uma técnica empregada para tratamento biológico de efluentes com altas cargas de nitrogênio. Neste processo, o amônio é parcialmente convertido a nitrito sob condições aeróbias por bactérias amônio-oxidantes (*Nitrosomonas*), de acordo com a reação:



Devido ao curto TRH (aproximadamente 1 dia) e alta temperatura (35°C), as bactérias nitrito-oxidantes (*Nitrobacter*) são lavadas do reator. A temperatura, associada ao curto TRH, torna-se um fator de seletividade, pois, como mostra a Figura 3.7, a 35°C a máxima velocidade de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) de bactérias nitrito-oxidantes é aproximadamente a metade do que a das amônio-oxidantes ($0,5$ e 1dia^{-1} , respectivamente) (VERSTRAETE & PHILIPS, 1998; JETTEN *et al.*, 2001; van KEMPEN *et al.*, 2001).

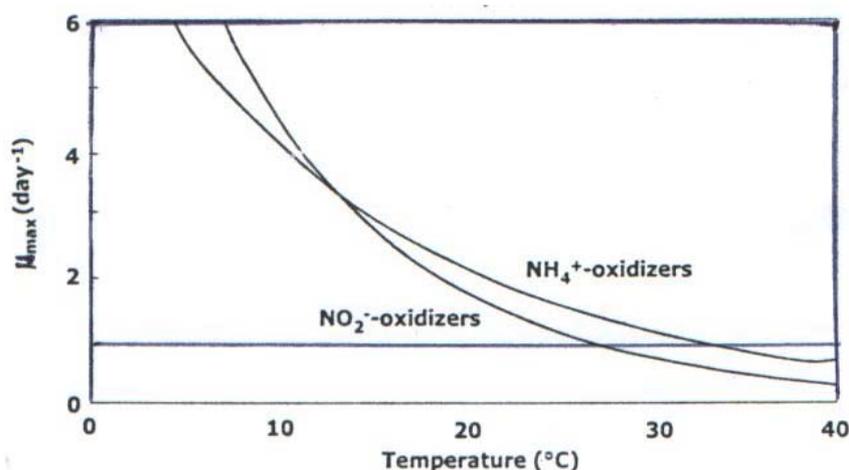


Figura 3.7: Efeito da temperatura na máxima velocidade de crescimento de bactérias amônio e nitrito oxidantes (Fonte: JETTEN *et al.*, 2001)

A nitrificação parcial a nitrito também foi reportada por POLLICE *et al.*, (2002) como sendo tecnicamente viável e economicamente favorável, especialmente para o tratamento de efluentes com altas concentrações de amônio e baixa relação C/N. A nitrificação pode ser obtida pela regulação apropriada do pH, temperatura e tempo de retenção do lodo do sistema. Associados a estes métodos já conhecidos, o sistema de aeração intermitente, pode ter um importante papel na inibição de nitrito oxidantes. Estes autores demonstraram pela realização de testes de nitrificação utilizando dois reatores, operados sob aeração contínua e intermitente, que a nitrificação parcial a nitrito foi regularmente obtida sob limitação de oxigênio, independente do tempo de retenção de lodo. Dessa forma, o sistema de aeração foi proposto como um parâmetro alternativo ao TRH para o controle da oxidação de amônio a nitrito.

JETTEN *et al.* (2001) estudaram a combinação dos processos SHARON e Anammox para a remoção de nitrogênio. O reator utilizado para o processo SHARON foi alimentado com efluente de digestão de lodo com elevada concentração de amônio, operado a 35°C e com um TRH (Tempo de Retenção Hidráulico) inicial de 2 dias, para conversão de 50% do amônio a nitrito. Quando o processo de nitrificação foi estabelecido, o TRH diminuiu para 1 dia para favorecer as bactérias amônio-oxidantes, devido a sua maior velocidade de crescimento nesta condição. Para o processo Anammox, foi escolhido um reator RBS, o qual recebeu como inóculo um lodo enriquecido em biomassa Anammox. Após um período de adaptação da biomassa, o reator RBS passou a receber o efluente do reator SHARON contendo amônio e nitrito na proporção molar de aproximadamente 1:1 (ideal 1:1,32). Os substratos amônio e nitrito foram convertidos a nitrogênio gasoso no reator Anammox, demonstrando que o sistema combinado pôde ser operado com sucesso.

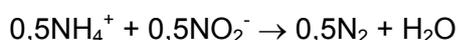
3.4.3.2 OLAND

No processo OLAND (“Oxygen Limited Autotrophic Nitrification Denitrification”), o oxigênio é fornecido em quantidade estequiométrica para que a nitrificação proceda apenas até nitrito e, subseqüentemente, devido à escassez de aceptores de elétrons, o nitrito formado é consumido para oxidar o restante do amônio (VERSTRAETE & PHILIPS, 1998).

O potencial de um sistema OLAND com lodo nitrificante como biocatalisador foi investigado por KUI & VERSTRAETE (1998), em escala laboratorial. Um reator RBS foi

inoculado com 3gSSV.L⁻¹, alimentado com efluente sintético contendo 1gN-NH₄.L⁻¹ e operado a 33°C. A uma carga de 0,13gN-NH₄.L⁻¹.d⁻¹ a velocidade de remoção de nitrogênio foi da ordem de 50mgN.L⁻¹.d⁻¹, correspondente a uma velocidade de remoção específica de 16mgN.(gSSV)⁻¹.d⁻¹. Os microrganismos que catalisaram o processo OLAND foram assumidos ser nitrificantes, dominadas por amônio oxidantes do gênero *Nitrosomonas*.

As reações sumarizadas a seguir demonstram que espécies de *Nitrosomonas* presentes no lodo nitrificante obtêm energia suficiente para manutenção celular, a partir desta ação combinada de nitrificação e desnitrificação (VERSTRAETE & PHILIPS, 1998):



O processo OLAND, comparado ao processo de nitrificação e desnitrificação convencional, permite uma economia de 62,5% de oxigênio (energia) e 100% de agente redutor (fonte de carbono orgânico). Além de que, a oxidação direta de amônio a nitrogênio gasoso pode ser alcançada em uma única fase (VERSTRAETE & PHILIPS, 1998).

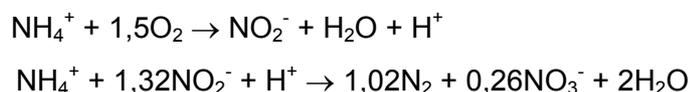
O processo OLAND não requer condições anóxicas, mas pode ocorrer em condições microaeradas. A hipótese formulada por PHILIPS *et al.* (2002) para reações do tipo OLAND é que sob condições de limitação de oxigênio, as nitrificantes podem passar a oxidação de amônio com nitrito para nitrogênio gasoso e utilizar este gás como um meio de transporte. Dessa forma, as nitrificantes poderiam se mover para fora do sedimento de lodo e ascender ao longo de uma coluna de água. Tal movimento, baseado nas bolhas de gás, propiciaria às bactérias a oportunidade de migrar para a superfície e captar oxigênio para recomeçar a nitrificação aeróbia, levando a formação de nitrito. Uma vez que o nitrogênio fosse liberado para a atmosfera, os microrganismos retornariam para o sedimento por gravidade. No interior do sedimento, devido a zonas de limitação de oxigênio, o nitrito formado reagiria com amônio liberando novamente nitrogênio gasoso.

3.4.3.3 CANON

Substanciais perdas de nitrogênio têm sido reportadas em reatores com baixa concentração de oxigênio dissolvido e com baixa quantidade de DQO presente no

efluente. É provável que nestes sistemas, um processo de desnitrificação autotrófica seja promovido por bactérias tipo Anammox (SLIEKERS *et al.*, 2002). Bactérias que oxidam amônio a nitrito necessitam de oxigênio, enquanto bactérias que convertem nitrito a nitrogênio gasoso são anaeróbias. Recentemente tem sido mostrado que ambas bactérias podem co-existir em um único reator desde que o sistema seja mantido em condições de oxigênio limitado (JETTEN *et al.*, 2002).

No processo CANON (“Completely Autotrophic Nitrogen removal Over Nitrito”), amônio é parcialmente convertido a nitrito por amônio oxidantes aeróbias sob oxigênio limitado e, subseqüentemente, bactérias Anammox convertem o nitrito produzido junto com parte do amônio remanescente a nitrogênio gasoso e pequena quantidade de nitrato é formada conforme as reações (SLIEKERS *et al.*, 2002; JETTEN *et al.*, 2002):



Considerando que bactérias Anammox são reversivelmente inibidas por baixas concentrações de oxigênio (0,5% da saturação do ar), para que o processo CANON possa ocorrer em um único reator, a oxidação aeróbia do amônio deve remover todo o oxigênio do líquido (SLIEKERS *et al.*, 2002). Para tanto, o fluxo de entrada de amônio no reator deve ser mantido acima do fluxo de entrada de oxigênio (JETTEN *et al.*, 2002).

HAO *et al.* (2002) desenvolveram um modelo matemático para o processo CANON em biofilme e avaliaram os parâmetros relevantes envolvidos no processo. O nível ótimo de oxigênio dissolvido no qual ocorreu a máxima remoção de nitrogênio é relatada para uma determinada carga superficial no biofilme. Uma carga superficial de $2\text{gN}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$, associada com uma concentração de oxigênio dissolvido de $1,3\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ no líquido, com um mínimo de 1mm de profundidade do biofilme pareceram ser as condições apropriadas para um processo de remoção de amônio em um único estágio. Sob estas condições e a temperatura de 30°C , a eficiência de remoção de amônio foi de 94% (82% de eficiência de remoção de nitrogênio total). Melhor eficiência de remoção de amônio poderia ser alcançada com um aumento da concentração de oxigênio dissolvido, mas isto poderia limitar fortemente o processo Anammox, diminuindo o total de nitrogênio removido.

3.4.3.4 Desamonificação em Sistemas de Biofilmes

Nitrificação e desnitrificação simultânea pode ocorrer em plantas de tratamento de efluentes com sistema de lodos ativados ou biofilmes, devido a microzonas anóxicas no centro do floco ou nas camadas internas do biofilme. Nas camadas superficiais, os microrganismos em contato com oxigênio levam a nitrificação, oxidação parcial de amônio a nitrito e, internamente, na ausência de oxigênio ocorre o processo de desamonificação, através do qual nitrito e amônio são levados a nitrogênio gasoso (HELMER e KUNST, 1998). A Figura 3.8 apresenta as diferentes fases envolvendo o biofilme, bem como as reações que se processam em seu interior.

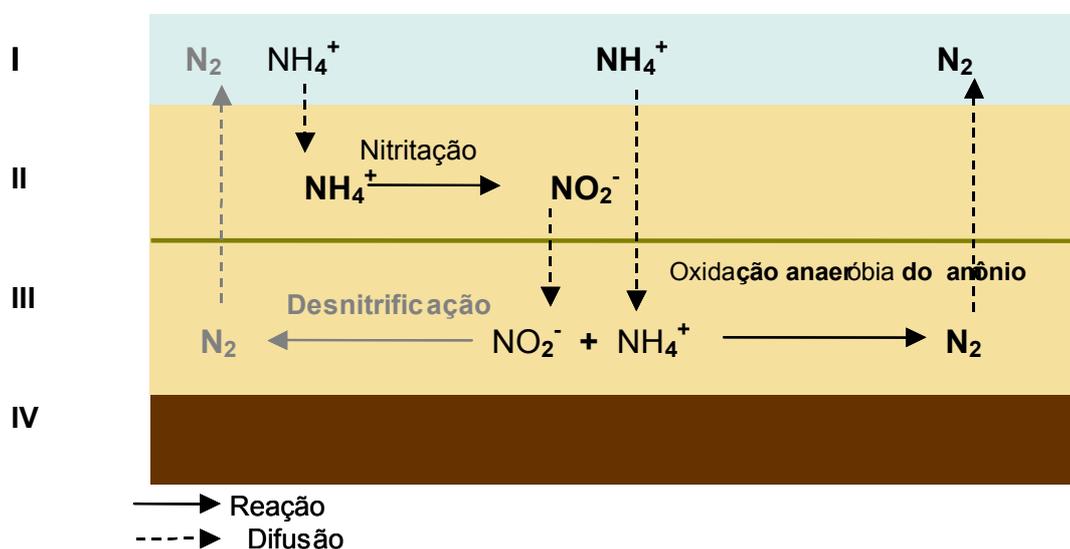


Figura 3.8: Processos de nitrificação parcial e desamonificação em biofilme
 I – Fase líquida; II – Fase aeróbia; III – Fase anóxica (Biofilme); IV – Suporte
 (Fonte: HELMER & KUNST, 1998)

Em biofilmes, diferentes grupos microbiológicos podem estar mais ou menos segregados. Organismos com baixa velocidade de crescimento do tipo nitrificantes competem pelo oxigênio em regiões superficiais com organismos de crescimento rápido como as heterotróficas. Isto significa que as nitrificantes estão sujeitas a limitação de oxigênio, pois, uma vez que sua constante de afinidade pelo oxigênio é relativamente alta, estarão em desvantagem (JETTEN *et al.*, 1997).

Os reatores com biomassa aderida diferem dos reatores com biomassa em suspensão por apresentarem distintas fases: uma líquida contínua e outra sólida formada

por microrganismos aderidos a suportes. Os substratos têm que atravessar a interface líquido-biofilme e, por difusão, serem transportados ao longo do filme, podendo resultar, assim, condições não homogêneas no reator. Desta forma, os microrganismos no biofilme podem estar sujeitos a diferentes microambientes (van LOOSDRECHT & HEIJNEN, 1994, apud BRANDÃO, 2002).

HELMER & KUNST (1998) observaram perdas de nitrogênio da ordem de 90% em um RBC (“Rotating Biological Contactor”) utilizado para fase de nitrificação do pré-tratamento de chorume. Considerando a baixa remoção de DQO, a possibilidade de desnitrificação convencional foi descartada. Devido à existência de microzonas anóxicas no biofilme, uma conversão autotrófica de amônia a nitrogênio gasoso poderia ser assumida.

3.4.4 Desnitrificação por Bactérias Nitrificantes

Por um longo tempo, bactérias amônio oxidantes do gênero *Nitrosomonas* foram consideradas ser obrigatoriamente litoautotróficas e aeróbias. Recentemente tem sido demonstrado que *Nitrosomonas* também podem ser organismos desnitrificantes, pois dispõe de enzimas do tipo nitrito-redutase e óxido redutase para formar óxido nitroso (N_2O) e dinitrogênio (N_2). Em condições de limitação de oxigênio, as células utilizam NO_2 comoceptor de elétrons e economizam oxigênio para a reação da monooxigenase, que catalisa a oxidação do amônio a hidroxilamina (ZART & BOCK, 1997; SHRESTHA *et al.*, 2000).

A oxidação anaeróbia de amônio por *Nitrosomonas* indica um complexo papel dos óxidos de nitrogênio (NO e NO_2) no metabolismo aeróbio de amônio oxidantes. Uma das espécies de *Nitrosomonas* descritas, capaz de realizar este metabolismo é a *N. eutropha*, a qual pode oxidar amônio na ausência de oxigênio dissolvido, substituindo o oxigênio molecular por NO_2 ou N_2O_4 . Como nitrito não está disponível em ambientes naturais sob condições anóxicas, uma oxidação anaeróbia do amônio é dependente do transporte de NO_2 de camadas óxicas (SCHMIDT *et al.*, 2002).

ZART & BOCK (1997) estudaram a habilidade de bactérias litotróficas amônio oxidantes *N. eutropha* para nitrificação e simultânea desnitrificação sob condições óxicas, suplementando o ar usado na aeração com dióxido de nitrogênio (NO_2) ou óxido nítrico (NO). Na presença de NO_2 gasoso, aproximadamente 50% do nitrito produzido foi

reduzido a nitrogênio gasoso, revelando altas perdas de nitrogênio. Neste caso, produção biológica de NO foi também observada e sua permanência constante na atmosfera do fermentador, segundo os autores, pode ser responsável por uma indução cumulativa das enzimas de desnitrificação, NO₂ redutase e NO redutase, levando ao aumento da velocidade de desnitrificação. Quando NO foi suprido na atmosfera do fermentador, as células morreram em poucos dias, o que indicou uma maior toxicidade do NO em relação ao NO₂.

Buscando esclarecer a rota metabólica que as *Nitrosomonas* seguem para permanecer viáveis e crescer sob condições anaeróbias, ABELIOVICH & VONSHAK (1992) procuraram pelos doadores e aceptores de elétrons destas reações. Para tanto, *Nitrosomonas europaea* ATCC 19718 foi cultivada em meio contendo nitrito, amônia e/ou piruvato, mantido em ambiente absolutamente anaeróbio. As células incubadas na presença de amônio e piruvato consumiram o nitrito do meio, enquanto que na presença de um ou outro a concentração de nitrito foi pouco afetada, indicando uma necessidade específica por ambos reagentes para manter uma constante redução de nitrito.

Neste mesmo trabalho, ABELIOVICH & VONSHAK (1992) demonstraram que não houve incorporação do piruvato pelas células, indicando que ele não participa do metabolismo intracelular. Segundo estes autores, o piruvato provê a energia requerida para a assimilação do CO₂, por uma reação que produz acetilfosfato e CO₂ na superfície da membrana celular ou por criar diretamente uma diferença de potencial na membrana, gerando, assim, ATP.

O efeito do oxigênio no processo de desnitrificação por *N. europaea* foi investigado por SHRESTHA *et al.* (2000). Os autores observaram que em condições aeróbias, amônio foi convertido a nitrito, enquanto que sob condições de oxigênio limitante (0,6mgO₂/L) ou de anaerobiose estrita, o nitrito formado na oxidação da amônia pelas células de *N. europaea* foi reduzido a N₂O e N₂ com um máximo de 22% de conversão. Foi demonstrado que tanto a baixas pressões parciais de oxigênio quanto em condições de ausência de oxigênio, *N. europaea* são hábeis a desnitrificar.

As pesquisas apresentadas pelos autores acima mencionados (ABELIOVICH & VONSHAK, 1992; ZART & BOCK, 1997; SHRESTHA *et al.*, 2000) demonstraram um potencial para assimilação de carbono inorgânico pelas *Nitrosomonas*, particularmente pertencentes às espécies de *N. eutropha* e *N. europaea* utilizando outros aceptores de elétrons em substituição ao oxigênio, o que sugere que estes microrganismos são

capazes de seguir uma rota metabólica alternativa, sem envolver nitrificação, em ausência de oxigênio.

3.5 Técnicas Empregadas para o Estudo de Populações Microbianas

3.5.1 Número Mais Provável

O método do Número Mais Provável (NMP) permite estimar a densidade da população microbiana sem uma contagem individual das células ou colônias. Microbiologistas freqüentemente estimam o tamanho de populações com base na maior diluição na qual o crescimento pode ser obtido. Então, se o crescimento foi observado na diluição 10^{-4} , mas não na 10^{-5} , o número de células viáveis é estimado estar entre 10^4 e 10^5 . O teste de várias alíquotas de uma série de diluições sucessivas, junto com cálculos estatísticos e interpolações, fornece estimativas muito mais precisas (ALEXANDER, 1982).

O princípio do método proposto por ALEXANDER & KLARK (1982) para análise de solos foi adaptado para análise de lodos. Para enumerar *Nitrosomonas*, bactéria oxidante do amônio, as diluições da amostra devem ser inoculadas em meio inorgânico contendo o íon amônio como fonte de nitrogênio. No caso de ter *Nitrosomonas* na forma viável no inóculo, haverá crescimento e nitrito será produzido, porém, é necessário não ter produção de nitrito nos tubos não inoculados (controle). Mesmo que nitrito não seja encontrado, antes de afirmar que o teste é negativo, é necessário fazer o teste para nitrato, porque as bactérias oxidantes de nitrito convertem o nitrito produzido pelas *Nitrosomonas* em nitrato. Portanto, no caso de nitrato ser encontrado, indica também a presença de *Nitrobacter*, bactéria nitrito-oxidante, mas, novamente, os testes nos tubos controle devem ser negativos. Na enumeração de *Nitrobacter*, o meio empregado deve ser livre de matéria orgânica e como fonte de energia é utilizado nitrito. A presença de *Nitrobacter* é dada pelo teste negativo de nitrito e teste positivo nos tubos não inoculados.

Inúmeros autores têm utilizado a técnica de NMP em suas pesquisas para quantificação de populações, tais como PHILIPS *et al.* (2002), MUXI *et al.* (2002) e van de GRAAF *et al.* (1996). A contagem por NMP é um método comumente utilizado para avaliar a proporção de grupos fisiológicos de microrganismos em um ecossistema particular (ETCHEBEHERE *et al.*, 2001). A microbiota desnitrificante presente no lodo de

diferentes reatores foi avaliada por contagem NMP de desnitrificantes, associada a medidas de atividade específica (ETCHEBEHERE *et al.*, 2001).

3.5.2 Fluorescent In Situ Hybridisation

O método FISH (“Fluorescent In Situ Hybridisation”) é baseado na hibridização de sondas marcadas com um radioisótopo como ^{32}P para uma parte específica do 16S rRNA de uma bactéria. Uma sonda consiste de 15 a 30 nucleotídeos (bases), complementares ao DNA de interesse, denominado DNA-alvo, e é marcada com um agente corante fluorescente que permite a visualização microscópica das células de um dado tipo de bactéria. As sondas são empregadas para identificar qual dos clones de uma biblioteca ou qual banda de um gel contém o DNA-alvo (PASSAGLIA & ZAHA, 1996). A técnica empregada para a realização da análise FISH é apresentada de forma esquematizada na Figura 3.9. A grande vantagem oferecida por esta análise é que não há necessidade de purificação prévia da amostra de lodo a ser investigada (JETTEN *et al.*, 2001).

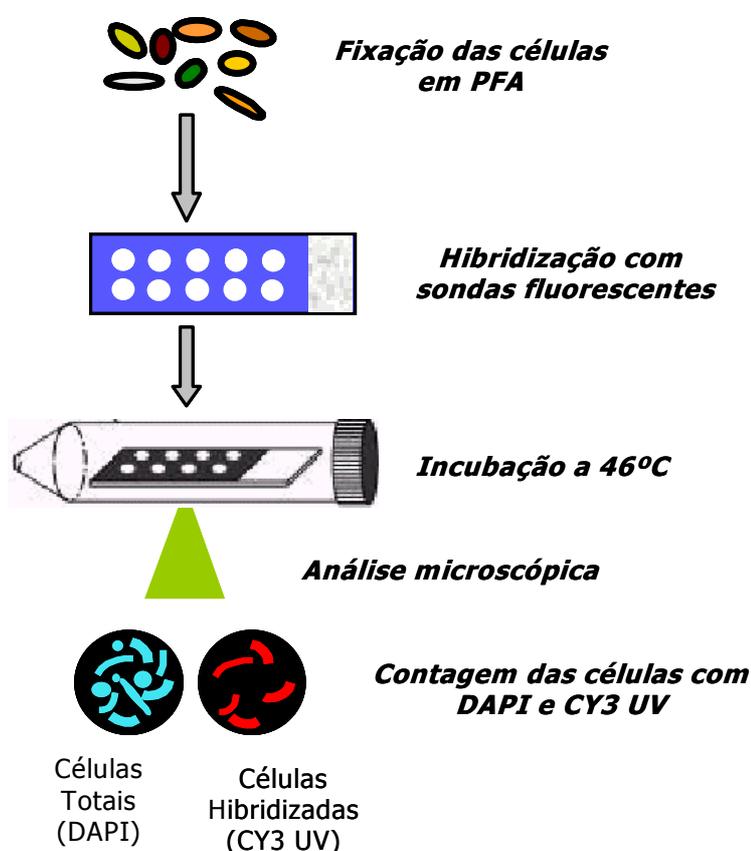


Figura 3.9: Representação esquemática da técnica empregada para análise FISH

Durante a hibridização, uma sequência de fita simples de um DNA-alvo liga-se a uma sonda contendo uma sequência complementar de nucleotídeos. O DNA de fita simples, produzido por desnaturação alcalina do DNA de dupla fita, é primeiramente ligado a um suporte sólido, como uma membrana de nitrocelulose. As fitas de DNA imobilizadas não podem ligar-se umas às outras, mas estão disponíveis para hibridização a uma sonda de DNA exógeno de fita simples. A extensão da hibridização é medida pela retenção de radioatividade na membrana utilizando uma sonda marcada radioativamente. As moléculas de sonda em excesso que não hibridizam são removidas por lavagem do filtro e, assim, não interferem na análise (PASSAGLIA & ZAHA, 1996).

Utilizando análise FISH, tipos específicos ou grupos de bactérias podem ser observados sob uma microscopia fluorescente e neste sentido a presença bem como a quantidade de dada bactéria na amostra de lodo pode ser investigada (JETTEN *et al.*, 2001). Inúmeros autores têm utilizado técnicas de biologia molecular em seus trabalhos e, dentre elas, a análise FISH consiste em uma importante ferramenta para acompanhar o desenvolvimento de populações microbianas nos bioreatores estudados (PERSSON *et al.*, 2002; TOH *et al.*, 2002; EGLI *et al.*, 2001; JETTEN *et al.*, 2001).

4. METODOLOGIA

4.1 Caracterização do Inóculo

Os reatores estudados no decorrer deste trabalho foram inoculados com um lodo nitrificante proveniente de um sistema de lodos ativados para tratamento de esgoto sanitário, da Companhia de Saneamento do Estado de Santa Catarina (CASAN). Este lodo coletado na unidade insular da CASAN, foi adaptado por 130 dias em meio nitrificante autotrófico, de acordo com a composição proposta por CAMPOS *et al.* (1999) apresentada nas Tabelas 4.1 e 4.2, mantido a temperatura ambiente e sob aeração, sendo alimentado diariamente aplicando-se uma carga da ordem de $90\text{mgN-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, a qual foi aumentada progressivamente.

Tabela 4.1: Composição do meio nitrificante

Componentes	Concentração ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1047
NH_4Cl	850
KH_2PO_4	222
MgSO_4	53
NaCl	889
NaHCO_3	4444
Solução de micronutrientes	$0,5\text{mL} \cdot \text{L}^{-1}$

Fonte: CAMPOS *et al.* (1999)

Tabela 4.2: Composição da solução de micronutrientes *

Componentes	Concentração ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
EDTA	50000
FeSO_4	2728
ZnSO_4	12354
CaCl_2	5540
MnCl_2	3220
CuSO_4	1004
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	1036
CoCl_2	880

Fonte: CAMPOS *et al.* (1999); *O pH foi ajustado em 6,0 com KOH

4.1.1 Determinação dos Sólidos Suspensos Totais

Para estimar a concentração celular do lodo, foi determinada a massa de sólidos suspensos totais (gSST) presente em determinado volume de amostra (L), seguindo a metodologia indicada por Andreas Karoli Gombert – Depto Eng. Química da Escola Politécnica/USP. Primeiramente, foram recortados papéis de filtro comum de forma circular com aproximadamente 5cm de diâmetro, enumerados e secos em microondas por 15 minutos, a 20% da potência. Terminado este tempo, os papéis foram imediatamente pesados sendo o peso correspondente anotado.

A seguir, foram filtrados 20mL de suspensão de lodo em filtro a vácuo, efetuando a amostragem em triplicata. Os papéis contendo o lodo foram novamente levados ao aparelho de microondas, permanecendo por 15 minutos a 20% da potência para retirada da umidade. Após nova pesagem foi obtida a massa de sólidos, por diferença de peso, presente nos 20mL de amostra. Através de uma simples relação para 1000mL, foi obtida a concentração de sólidos do lodo em gSST.L^{-1} .

4.1.2 Determinação da Atividade Nitrificante

Para verificar a atividade nitrificante do lodo, foi realizado um ensaio de respirometria no qual se determina a cinética de consumo de oxigênio relacionada ao consumo de substrato. Inicialmente, um determinado volume de lodo nitrificante com aproximadamente 2gSST.L^{-1} foi retirado do reator nitrificante e lavado por várias vezes com água destilada, o suficiente para remover as formas nitrogenadas dissolvidas (NH_4^+ , NO_2^- e NO_3^-). Terminada a lavagem, o lodo foi ressuspensionado em solução de macro e micronutrientes conforme a composição proposta por Campos *et al.* (1999) apresentada nas Tabelas 4.1 e 4.2 (porém livre de amônio), completando um volume final de 1L. Foi determinada a concentração de sólidos da suspensão final através da análise descrita no item 4.1.1.

A suspensão de lodo foi colocada em um erlenmeyer, ao qual acoplou-se um eletrodo de pH, devidamente calibrado com soluções padrão de pH 7,0 e 14,0 e um eletrodo galvânico (Oxi 340/SET – WTW Germany), calibrado com água destilada e ajustado para medir a concentração de oxigênio dissolvido em $\text{mgO}_2.\text{L}^{-1}$, com relação a saturação ($C_s = 7\text{mgO}_2.\text{L}^{-1}$ a 1atm e 35°C). A temperatura foi mantida em 35°C e a agitação em 300rpm através do uso de um agitador magnético provido de aquecimento.

O pH foi mantido em 7,5, sendo utilizada solução de HCL 10% (v/v) ou NaOH 5% (p/v) para corrigir o mesmo, conforme necessário. A aeração do meio era feita através de um dispersor acoplado a um sistema de compressão de ar.

Inicialmente foi determinada a respiração endógena dos microrganismos. Para tanto, o meio foi aerado até atingir aproximadamente a concentração de saturação de oxigênio, então a aeração foi suspensa e, imediatamente após, foi procedida a leitura do consumo de oxigênio ($\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$) em função do tempo (s), na ausência de substrato. Subseqüentemente, foram dados pulsos de amônio, inicialmente de $1\text{-}2\text{mgN-NH}_4\cdot\text{L}^{-1}$ e depois de $10\text{-}20\text{mgN-NH}_4\cdot\text{L}^{-1}$, até verificar alguma inibição pelo substrato, evidenciada por uma diminuição no consumo de oxigênio.

Após ser dado o pulso, o meio era homogenizado antes de retirar a amostra para determinação da concentração de amônio. Logo após retirar a amostra era suspensa a aeração, iniciando imediatamente a leitura da concentração de oxigênio dissolvido a cada intervalo de tempo, de acordo com a atividade das células. Quando a concentração de oxigênio atingia aproximadamente 30% da C_s , era novamente retornada a aeração, evitando que a concentração de oxigênio caísse além do valor crítico que é de aproximadamente $0,1C_s$ para a maioria dos microrganismos. Os volumes do pulso e da amostra retirada eram os mesmos, aproximadamente 10mL, de modo a manter o volume no erlenmeyer praticamente constante ao longo do experimento.

A partir da inclinação da reta da variação da concentração de oxigênio dissolvido ($\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$) em função do tempo (s), foi possível obter a velocidade de consumo de oxigênio (Q_{O_2X}) a cada pulso de amônio, conforme a Equação 4.3, sendo esta corrigida descontando-se o valor correspondente a respiração endógena. Conhecendo-se o valor da concentração celular (que é considerada constante ao longo do experimento), foi determinado o valor de Q_{O_2} ($\text{mgO}_2\cdot\text{gcel}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$), o qual pôde ser expresso como velocidade específica de consumo de substrato considerando um fator estequiométrico de conversão entre oxigênio e amônio ($4,25\text{gO}_2/\text{gN-NH}_4^+$). A partir da velocidade específica ($\text{mgN-NH}_4\cdot\text{gSST}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) obtida em função da concentração de substrato ($\text{mgN-NH}_4\cdot\text{L}^{-1}$) e aplicando uma regressão não linear no programa *Statistica*, para ajuste dos dados ao modelo cinético proposto por ANDREWS (1968) (Equação 4.4), o qual considera o termo de inibição pelo substrato, puderam ser determinados os parâmetros de atividade μ_{\max} , K_s e K_i .

A seguir são apresentadas as equações utilizadas para a determinação cinética.

De acordo com SCHMIDELL (2001), em um biorreator descontínuo aerado e agitado, o balanço de massa para o oxigênio pode ser escrito:

$$K_L a (C_S - C) - Q_{O_2} X = \left(\frac{dC}{dt} \right) \quad (4.1)$$

onde: C = concentração de oxigênio dissolvido (mg.L⁻¹)

C_S = concentração de oxigênio dissolvido na saturação (mg.L⁻¹)

K_La = coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (h⁻¹)

Q_{O₂}X = velocidade de consumo de oxigênio (mgO₂.L⁻¹.min⁻¹)

Q_{O₂} = velocidade específica de respiração (mgO₂.gcel⁻¹.d⁻¹)

X = concentração celular (g.L⁻¹)

t = tempo (h)

Considerando que ao interromper a aeração a transferência de oxigênio para o líquido seja praticamente nula (K_La = 0), desta forma:

$$- Q_{O_2} X = \left(\frac{dC}{dt} \right) \quad (4.2)$$

A integração da equação anterior fornece a equação de uma reta, na qual os valores práticos de C em função do tempo permitem o cálculo de Q_{O₂}X (coeficiente angular da reta), conforme a seguir:

$$C = C_0 - Q_{O_2} X * t \quad (4.3)$$

onde: C₀ = concentração de oxigênio dissolvido no instante t=0

A determinação dos parâmetros de atividade está baseada no modelo cinético proposto por ANDREWS (1968), de maneira que:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_I}} \quad (4.4)$$

4.1.3 Determinação do Número Mais Provável

A metodologia empregada na determinação do número mais provável foi adaptada do método proposto por ALEXANDER & CLARK (1982), uma vez que este é baseado em análise de solos. Os meios de cultura utilizados nesta análise são específicos para oxidadoras de amônio e oxidadoras de nitrito, possibilitando o desenvolvimento dos diversos gêneros bacterianos envolvidos em cada um destes

grupos. No entanto, levando-se em conta que as bactérias *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* são as principais representantes do grupo de oxidadoras de amônio e de oxidadoras de nitrito, respectivamente, será feita referência apenas a estes dois gêneros, sem descartar a possibilidade de que outras bactérias podem também estar sendo quantificadas.

4.1.3.1. Número mais Provável de *Nitrosomonas*

Preparo do material:

1. Meio Amônia-carbonato de cálcio para *Nitrosomonas*

Para 1000mL de água, foram adicionados 0.302g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1,0g de K_2HPO_4 ; 0,03g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,3 de NaCl; 0,3g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 3,33 g de CaCO_3 . Desta solução foram transferidos 3 mL para tubos de ensaio e esterilizados em autoclave.

2. Reagente de Griess-Ilosvay

Foram dissolvidos 0,6g de ácido sulfanílico em 70mL de água destilada quente. Após resfriar a solução, foram adicionados 20mL de HCl concentrado, diluindo a seguir a mistura para 100mL com água destilada e misturando bem. Foram dissolvidos 0,6g de alfa-naftalamina em 10 a 20mL de água contendo 1mL de HCl concentrado, diluindo em seguida para 100mL com água. Foram dissolvidos 16,4g de $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ em água e completado o volume da solução para 100mL com água. As soluções foram acondicionadas em vidros escuros, separadamente, e estocadas sob refrigeração.

3. Reagente de nitrato: Foram dissolvidos 50mg de difenilamina em 25mL de H_2SO_4 concentrado, sendo guardado em frascos protegidos da luz por no máximo 14dias.

4. Foram feitos brancos com água destilada.

Procedimento analítico:

A amostra do lodo nitrificante adaptado (a ser utilizado como inóculo) foi submetida a uma agitação com pérolas de vidro, de modo a desagregar os flocos de lodo tanto quanto possível. Foram preparadas as diluições em série transferindo alíquotas de 1mL para cada um dos cinco tubos contendo meio estéril, a partir da mais alta diluição

preparada. Esse mesmo procedimento foi repetido para as outras quatro mais baixas diluições. Os tubos inoculados foram incubados por 3 semanas a 28 ° C, juntamente com uma seqüência de tubos não inoculados (brancos), utilizados como controle.

Após o período de incubação, foi realizado o teste para nitrito, em cada tubo, usando o reagente de Griess-Ilosvay. Primeiramente, foram misturadas partes iguais dos três reagentes e, então, adicionadas três gotas da mistura na cultura a ser testada. Se ocorresse, em poucos minutos, o aparecimento de uma cor vermelho-púrpura, indicava a presença de nitrito, sendo o teste, portanto, positivo. Para os tubos que não apresentaram resultado positivo, era feito o teste para nitrato, adicionando uma gota do reagente de difenilamina. Se ocorresse desenvolvimento de uma cor azul o teste era considerado positivo para *Nitrosomonas*, significando que o nitrito produzido pelas *Nitrosomonas* tinha sido convertido pelas *Nitrobacter* em nitrato. Caso ocorresse teste positivo para nitrito ou nitrato nos tubos controle (brancos), significaria a ocorrência de alguma contaminação e o resultado obtido deveria ser desprezado.

O NMP para *Nitrosomonas* foi determinado utilizando a tabela proposta por ALEXANDER & CLARK (1982), a qual consta em Anexo neste trabalho.

4.1.3.2. Número Mais Provável de *Nitrobacter*

Preparo do material:

1. Meio Nitrito-carbonato de cálcio para *Nitrobacter*

Para 1000 ml de água destilada, foram adicionados 0,006g de KNO_2 , 1,0g de K_2HPO_4 , 0,3g de NaCl , 0,1g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,03g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0g de CaCO_3 e 0,3g de CaCl_2 . A seguir, foram transferidos 3mL do meio para tubos de ensaio e esterilizados em autoclave por 15 minutos.

2. Reagente Griess-Ilosvay (conforme descrito no item 4.1.3.1).

3. Foram feitos brancos com água destilada.

Procedimento analítico:

A amostra de lodo adaptado foi coletada do reator nitrificante e preparada para a determinação através de agitação com bolinhas de vidro, de modo a desagregar os flocos tanto quanto possível. Foram preparadas as diluições em série transferindo alíquotas de 1mL para cada um dos cinco tubos contendo meio estéril, a partir da mais alta diluição preparada. Este mesmo procedimento foi repetido para as outras quatro diluições mais baixas. Os tubos inoculados foram incubados por 3 semanas a 28°C, juntamente com uma seqüência de tubos não inoculados (brancos), utilizados como controle.

No final do período de incubação, foi testado apenas nitrito usando o reagente de Griess Ilosvay. O teste era considerado positivo para *Nitrobacter* se o meio não desenvolvesse coloração avermelhada (coloração característica de nitrito) e negativo se apresentasse coloração.

O NMP para *Nitrobacter* foi determinado utilizando a tabela proposta por ALEXANDER & CLARK (1982), a qual consta em Anexo.

4.1.4 Análise FISH

As amostras de lodo retiradas para a análise FISH foram previamente fixadas com paraformaldeído, conforme descrito no item abaixo, guardadas a -20°C e posteriormente enviadas para a Faculdade de Ciências do Uruguai.

4.1.4.1 Fixação com paraformaldeído

Preparo dos reagentes:

1. Tampão PBS 3X (390mM NaCl, tampão fosfato 30mM pH 7,2-7,4)

Foram preparadas as soluções de NaH₂PO₄ 0,5M (60g em 1000mL de água destilada) e Na₂HPO₄ 0,5M (71g em 1000mL de água destilada). Para preparar 1000mL de tampão fosfato de sódio 0,5M pH 7,2-7,4 foram misturados 280mL de NaH₂PO₄ 0,5M com 720mL de Na₂HPO₄ 0,5M. Para preparar 300mL de tampão PBS 3X foram misturados 23,4mL de NaCl 5M, 18,0mL de tampão fosfato de sódio 0,5M e 258,6mL de água.

2. Tampão PBS 1X: foi diluída uma parte de PBS 3X para duas de água.

3. Solução 4% PFA-PBS (100mL)

Foram aquecidos 66mL de água destilada a 60°C. A seguir, foram agregados 4g de paraformaldeído (PFA) e gotas de NaOH 10N para a dissolução do PFA (aproximadamente 100 μ L), em frasco com tampa devido a formação de vapores tóxicos, deixando no banho-maria a 60°C até completa dissolução (não mais que 10 minutos). Foram, então, agregados 33mL de PBS 3X. Após esfriar a 20°C o pH foi ajustado a 7,2-7,4 com gotas de HCl concentrado e, caso houvesse formação de precipitado, poderia ser filtrado em papel de 0,45 μ m. A solução foi armazenada a 4°C até o momento do uso (não devendo permanecer estocada por mais de duas semanas).

Procedimento analítico:

Primeiramente, um volume de suspensão de lodo de aproximadamente 300 μ L foi colocado em tubo ependorf e centrifugado a 5000rpm por 10 minutos. Após descartar o sobrenadante, o *pellet* foi lavado com PBS 1X agitando vigorosamente e centrifugado novamente. O sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado foi ressuspendido em 300 μ L de PBS 1X. Foram agregados 900 μ L de solução 4% PFA-PBS e incubado por 3 a 4h a 4°C (tempo de incubação nunca superior a 18h).

A amostra foi centrifugada a 5000rpm por 10 minutos, foi descartado o sobrenadante e o *pellet* foi lavado com PBS 1X, agitando vigorosamente. Novamente foi centrifugado a 5000rpm por 10 minutos e ressuspendido em 300 μ L de PBS 1X. Foram agregados 300 μ L de etanol absoluto, misturando bem. Após este procedimento, a amostra pode ser guardada por vários meses a -20°C.

4.2 Montagem e Operação dos Reatores

Foram construídos dois reatores de mistura completa, utilizando cilindros de acrílico concêntricos, tendo uma diferença de 4cm no diâmetro de modo que o cilindro de menor diâmetro (interno) constituísse um reator com um volume útil de 2,5L, restando ainda um pequeno volume vazio no topo. A base e a tampa eram constituídas de chapas planas recortadas de forma circular, sendo que a tampa possuía perfurações onde foram acopladas 3 tubulações: entrada da alimentação, saída do efluente tratado e saída de gás. A tubulação de saída de gás era acoplada a um sistema de medida de gás, constituído de frasco invertido do tipo mariote, contendo solução de soda a 5%, e proveta para medida do volume de soda a ser deslocado pelo gás produzido. A diferença entre os diâmetros dos cilindros externo e interno constituiu uma camisa de troca térmica, permitindo a circulação da água de aquecimento.

Foi também especialmente adequado um frasco para alimentação, sendo este vedado com uma rolha de borracha perfurada por onde passava a tubulação a ser conectada na bomba peristáltica. Era borbulhado diariamente gás inerte (He ou Ar), de modo que o meio sintético a ser alimentado aos reatores permanecesse em ausência de oxigênio.

O lodo nitrificante adaptado foi lavado com água destilada, de modo a remover todas as formas nitrogenadas (NH_4^+ , NO_2^- e NO_3^-) e ressuspenso em meio mineral sintético contendo nitrito e amônio como fonte de nitrogênio, outros sais, além da solução de nutrientes I e II (1mL por litro de meio), conforme a composição proposta por van de GRAAF (1996) que consta nas Tabelas 4.3 e 4.4.

A suspensão de lodo foi, então, inoculada nos reatores I e II, completando um volume de 2,5L. A concentração celular em gSST.L^{-1} foi determinada pelo método descrito no item 4.1.4, para cada um dos reatores. Para eliminar o oxigênio dissolvido, foi borbulhado gás argônio no meio (utilizando um dispersor acoplado a um cilindro de gás), por um período de 15 minutos. Este tempo foi determinado previamente, acoplado um oxímetro a um béquer contendo água destilada a temperatura ambiente, enquanto era borbulhado o gás, de modo que transcorridos 15 minutos foi atingida a concentração mínima de $0,55\text{mg O}_2.\text{L}^{-1}$ (a qual não sofria mais redução ao longo do tempo). Imediatamente após retirar o dispersor de gás, foi colocada a tampa no reator, vedando apropriadamente com cola de silicone.

Tabela 4.3: Composição do meio anammox

Componentes	Concentração (mg.L ⁻¹)
(NH ₄) ₂ SO ₄	330
NaNO ₂	345
KHCO ₃	500
MgSO ₄ .7H ₂ O	300
CaCl ₂ .2H ₂ O	180
Solução de micronutrientes I e II	1mL.L ⁻¹

Fonte: van de GRAAF (1996)

Tabela 4.4: Composição das soluções de micronutrientes

Componentes	Concentração (mg.L ⁻¹)	Concentração (mg.L ⁻¹)
	para solução I	para solução II
EDTA	5000	15000
FeSO ₄	5000	-
ZnSO ₄ .7H ₂ O	-	430
CoCl ₂ . 6H ₂ O	-	240
MnCl ₂ .4H ₂ O	-	990
CuSO ₄ .5H ₂ O	-	250
NaMoO ₄ .2H ₂ O	-	220
NiCl ₂ .6H ₂ O	-	190
NaSeO ₄ .10H ₂ O	-	210
H ₃ BO ₄	-	14

Fonte: van de GRAAF (1996)

Foram considerados os seguintes dados operacionais:

$$V_R = 2,5L$$

$$TRH = 5 \text{ dias}$$

Considerando:

$$TRH = \frac{V_R}{V_{R'}} \quad (4.5)$$

onde: TRH = tempo de retenção hidráulico (d)

V_R = volume utilizado do reator (L)

$V_{R'}$ = volume retirado por dia (L.d⁻¹)

Utilizando a equação 4.5 e os dados operacionais ($TRH = 5$ dias e $V_R = 2,5L$), foi calculado o volume a ser retirado por dia ($V_{R\cdot}$), sendo este de 0,5L.

Os reatores foram operados como RBS (Reator Sequencial em Batelada), o qual compreende ciclos de alimentação, sedimentação e retirada de sobrenadante. Assim, o volume retirado deveria ser repostado diariamente, o que era realizado por uma mesma bomba peristáltica para ambos os reatores (RI e RII). Para tanto, primeiramente era desligada a agitação e aguardado um tempo para ocorrer a sedimentação do lodo (aproximadamente 40 minutos).

A seguir, era retirado 0,5L do sobrenadante dos reatores. Antes de iniciar a alimentação, era borbulhado gás nos reatores por 15 minutos, conectando a tubulação de alimentação ao cilindro de argônio. Terminado este tempo, a tubulação de entrada era novamente conectada a uma das extremidades da bomba peristáltica, para a alimentação.

Inicialmente a alimentação era realizada de forma ininterrupta, regulando a rotação da bomba peristáltica no valor mínimo tolerado (10rpm). Mas, desta forma, a alimentação era realizada em apenas 3h. A partir do 150° dia de operação, foi acoplado um temporizador à bomba peristáltica de modo que a alimentação pudesse ser melhor distribuída ao longo do dia, permanecendo 15 minutos ligada e 45 minutos em repouso, por 7h, até completar a alimentação.

Nos primeiros 9 dias de funcionamento do sistema em estudo, o reator RI foi operado de forma diferenciada, tendo sido submetido a uma lavagem inicial de células. Para tanto, o meio era mantido homogêneo (a agitação permanecia ligada) durante a retirada dos 0,5L de meio, de modo que parte do lodo era removida. A análise de SST era efetuada diariamente, para acompanhar a diminuição da concentração celular ao longo do tempo. Uma vez que a concentração celular atingiu um valor limite previamente estipulado, o qual foi alcançado em 9 dias, o procedimento de lavagem foi encerrado e os reatores passaram a ser operacionalizados da mesma maneira, conforme descrito no parágrafo anterior.

O meio utilizado para a alimentação dos reatores foi proposto por van de GRAAF (1996) e está descrito nas Tabelas 4.3 e 4.4. A preparação do meio era feita semanalmente, ficando armazenado a temperatura ambiente. A caracterização físico-química de cada novo meio preparado era realizada através das análises de NH_4^+ , NO_2^- ,

NO_3^- , pH, DQO e Alcalinidade, de acordo com as metodologias descritas no item 4.3, sendo os dados computados como valores de entrada dos reatores (Apêndice 2).

O pH do meio de cultivo dos reatores era mantido em torno de 7,5 através do ajuste do valor de pH do meio de alimentação com solução de NaOH ou HCl. A temperatura do meio de cultivo era mantida em 35°C através da circulação de água aquecida ($\pm 37^\circ\text{C}$) na camisa do reator, sendo esta monitorada diariamente por leitura em termômetro.

A Figura 4.1 mostra o esquema prático montado para o funcionamento e operação dos reatores.



Figura 4.1: Sistema operacional para o estudo da remoção biológica de nitrogênio

Problemas com a montagem dos reatores, tais como freqüente descolamento da tampa e da base, levaram a substituição dos cilindros de acrílico por vidros providos de tampa com rosca. A troca permitiu um melhor controle da vedação dos reatores, além de prevenir a perda de células que poderia ocorrer devido a rompimentos.

4.3 Análises para o Acompanhamento dos Reatores

O monitoramento analítico dos reatores envolveu análises físico-químicas para verificação das condições de entrada (meio de alimentação) e saída dos reatores (NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- , pH, DQO e Alcalinidade), bem como quantificação celular pela determinação de sólidos (SST) e análises para acompanhamento das populações microbianas (NMP e FISH). Também foi realizada uma análise do lodo em microscópio ótico. As análises foram efetuadas conforme a frequência apresentada na Tabela 4.5.

Tabela 4.5: Frequência analítica para acompanhamento dos reatores RI e RII

Análise	Reator	Frequência
pH	I e II	diariamente
NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^-	I e II	2 vezes por semana
DQO e Alcalinidade	I e II	1 vez por semana
SST	I	diariamente durante lavagem
	I e II	0, 75, 150 e 225 dias
NMP	I	final da lavagem
	I e II	0, 75, 150 e 225 dias
FISH (Fixação)	I e II	0, 75, 150 e 225 dias
Microscopia	I e II	200dias
Ensaio cinético	Nitrificante	inóculo
	I e II	225dias

As amostras para as análises físico-químicas foram obtidas a partir da filtração do sobrenadante retirado dos reatores, sendo estes dados computados como valores de saída dos reatores (Apêndice 2). Com os dados obtidos a partir das análises das formas nitrogenadas, foi possível determinar a eficiência de remoção (em %) para cada reator e calcular a carga de nitrogênio de entrada e saída dos reatores, considerando as equações 4.6 e 4.7.

$$Eficiência = \frac{(C_N)_E - (C_N)_S}{(C_N)_E} \quad (4.6)$$

onde: $(C_N)_E$ = concentração de nitrogênio na forma de amônio, nitrito e nitrato na entrada do reator (mgN.L^{-1});

$(C_N)_S$ = concentração de nitrogênio na forma de amônio, nitrito e nitrato na saída do reator (mgN.L^{-1}).

$$q = \frac{C_N}{TRH} \quad \text{ou} \quad q = C_N * D \quad (4.7)$$

$$D = \frac{Q}{V} = \frac{0,5L/d}{2,5L} = 0,2d^{-1}$$

onde: q = carga ($\text{mgN} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)

C_N = concentração de nitrogênio [$\text{N-NH}_4^+ + \text{N-NO}_2^- + \text{N-NO}_3^-$] ($\text{mgN} \cdot \text{L}^{-1}$)

D = vazão específica de alimentação (d^{-1})

Q = vazão ($\text{L} \cdot \text{d}^{-1}$)

V = volume do reator (L)

Para as análises de SST, NMP, FISH e microscopia, foi retirado um volume de aproximadamente 30mL de cada reator, sendo o meio de cultivo completamente homogenizado antes de efetuar a amostragem.

4.3.1 Determinação de Amônio

A determinação de amônio foi realizada segundo o método de Nessler, descrito por VOGUEL (1981). Inicialmente foi preparado o reagente de Nessler dissolvendo 100g de iodeto de mercúrio (II) e 70g de iodeto de potássio em 100mL de água, adicionando a seguir uma solução fria de 160g de NaOH em 700mL de água destilada, completando o volume final da solução para 1L. O precipitado foi deixado decantar por alguns dias antes de utilizar o reagente, o qual deve ser submetido a uma padronização, utilizando uma solução de cloreto de amônio.

Para determinação da concentração de amônio, foram adicionados 100 μL do reagente de Nessler para 5mL de amostra e, após aguardar 10 minutos de reação, foi efetuada a leitura da absorbância em espectrofotômetro (Hach DR/2010) a 525nm. Com o valor da absorbância, foi obtida a concentração de amônio a partir da curva padrão.

4.3.2 Determinação de Nitrito

Foi empregado o kit analítico NitriVer 2 Hach Company, que abrange a faixa de concentração de 0 a 150 $\text{mgNO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$, baseado em uma curva padrão obtida com nitrito de sódio. Este método está baseado na redução do nitrito para óxido nitroso na presença de sulfato ferroso e em meio ácido. O óxido é, então, convertido em um cromógeno pela

reação com o cádmio permitindo a leitura em espectrofotômetro. Para a análise foram utilizados 10 mL de amostra e um envelope do reagente NitriVer 2, sendo agitado por 2 minutos e aguardados 10 minutos de reação. Então, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro 585nm, sendo obtido o valor da concentração através da curva padrão.

4.3.3 Determinação de Nitrato

A determinação de nitrato foi realizada pelo método do ácido salicílico, de acordo com o procedimento descrito por CATALDO *et al.* (1975). Para a análise da concentração de nitrato, foram utilizados 200 μ L da amostra ao qual foram adicionados 0,8mL do reagente AS-H₂SO₄. Aguardados 20 minutos para a reação, foram adicionados 19mL de solução de NaOH 2N e efetuada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 410nm. Para a determinação da concentração de nitrato foi utilizada uma curva de calibração preparada com KNO₃.

O reagente AS-H₂SO₄ foi preparado dissolvendo 50g de ácido salicílico com H₂SO₄ concentrado, completando a solução para 1L. A solução de NaOH foi obtida dissolvendo 80g de NaOH em água destilada, completando o volume para 1L.

4.3.4 Determinação de DQO

A análise de DQO foi realizada segundo procedimento do *Standard methods for the examination of water and wastewater* (APHA, AWWA, WEF, 1995). O procedimento é baseado no refluxo fechado por digestão ácida na presença de dicromato de potássio com 2,5 mL de amostra filtrada, realizada em um digestor a 150°C por duas horas. A quantificação é alcançada por método colorimétrico em função do dicromato consumido pela oxidação da matéria orgânica. Para determinação foram colocados em uma cubeta apropriada 2,5mL de amostra, 3,5mL de solução de H₂SO₄ e 1,5mL de solução digestora, permanecendo por 2h a 150°C, sendo efetuada a leitura da absorbância em espectrofotômetro (Hach DR/2010) a 600nm após resfriamento. A concentração de DQO foi determinada a partir de uma curva padrão obtida com solução de biftalato de potássio.

A solução de ácido foi obtida adicionando a um frasco de 1L de H₂SO₄ concentrado 5,5g de AgSO₄, deixando em repouso por 1 a 2 dias para dissolver. Para

obter a solução digestora foram adicionados a 500mL de água destilada 167mL de H₂SO₄ concentrado, 10,21g de dicromato de potássio seco e 33,3g de AgSO₄, diluindo após resfriar para 1L.

4.3.5 Determinação da alcalinidade

A determinação da alcalinidade foi realizada pelo método da titulação, de acordo com o *Standard Methods*. Foram utilizados 20mL de amostra, completando o volume para 40mL com água destilada, os quais foram titulados com solução de H₂SO₄ 0,027N até pH 4,7, sendo lido o volume gasto na titulação. A alcalinidade foi determinada em mgCaCO₃.L⁻¹, de acordo com a equação:

$$\text{Alcalinidade} = \frac{A \times N \times 50000}{V}$$

onde: A = volume de H₂SO₄ gasto na titulação (mL)

N = normalidade da solução de H₂SO₄ (N)

V = volume de amostra (mL)

4.3.6 Determinação dos Sólidos em Suspensão Totais e Voláteis

A determinação da concentração celular presente nos reatores foi determinada através da análise de SST pela metodologia indicada por Andreas Karoli Gombert – Depto Eng. Química da Escola Politécnica/USP, conforme descrito no item 4.1.1.

No período final de acompanhamento dos reatores (225dias), foi conduzida paralelamente uma determinação de SST conforme metodologia do *Standard Methods*. Inicialmente, os cadinhos de porcelana foram identificados e tarados na mufla a 600°C por 30 minutos para cada cadinho. A seguir, uma amostra de 10mL de suspensão de lodo foi filtrada em papel de filtro a vácuo, sendo o papel contendo o lodo colocado dentro do cadinho, repetindo em triplicata. Foi feito também um branco colocando apenas papel de filtro no cadinho, sem amostra. Os cadinhos foram levados a estufa a 105°C por 24h, sendo resfriados e pesados. Então, os cadinhos foram levados a mufla a 600°C por 1-1,5h por cadinho, resfriados e pesados.

Por diferença de peso entre a amostra depois da calcinação e depois da secagem, tendo sido descontado o valor do branco, foi obtido o SSV, ou seja, a massa de matéria orgânica transformada em CO₂ e água, presente em 10mL de amostra. O SST, ou massa de sólidos suspensos totais, em 10mL de amostra também foi obtido nesta determinação através da diferença de peso entre a amostra depois da estufa e o peso inicial do cadinho, já descontado o valor do branco. Fazendo uma simples relação para 1000mL, os sólidos foram expressos em gSSV.L⁻¹ e gSST.L⁻¹. Pela diferença entre o peso da amostra após calcinação e o peso inicial do cadinho, foi estimada a percentagem de matéria inorgânica presente no lodo.

4.3.7 Número Mais Provável

A quantificação das populações bacterianas de *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* pelo NMP foi realizada ao longo do período de acompanhamento dos reatores, de acordo com a metodologia previamente descrita no item 4.1.3.

4.3.8 Fluorescent In Situ Hybridisation

Foi realizada a fixação com paraformaldeído, a cada período de amostragem, de acordo com a metodologia explicitada no item 4.1.4.1. Todas as amostras fixadas foram mantidas congeladas e enviadas para a Faculdade de Ciências, Uruguai, no final do período de acompanhamento dos reatores (225dias), no entanto, devido a não haver possibilidade de analisar todas as amostras, optou-se por excluir a amostra correspondente a 150dias. Foram então analisados por FISH o inóculo, 75 e 225dias de RI e RII.

4.4 Microscopia

Foi realizada uma análise de microscopia do lodo de cada reator, buscando avaliar o tamanho e grau de dispersão dos flocos. Para tanto, foi colocada uma gota da amostra de lodo em lâmina apropriada e visualizado em microscópio ótico, num aumento de 100 e 400X. O aparelho conectado a um computador, permitiu que as imagens fossem digitalizadas e armazenadas. Utilizando uma escala, foi possível estimar o diâmetro dos flocos.

4.5 Cinética de Consumo de Substrato

Para verificar a atividade do lodo, foi realizado um ensaio cinético de consumo dos substratos amônio e nitrito no final do período de acompanhamento dos reatores, tendo em vista que o processo demonstrou uma estabilidade após 150 dias de operação. O ensaio foi conduzido nos próprios reatores, alimentando 0,5L de meio em uma única etapa (sem distribuir a alimentação), sendo mantidas as condições anóxicas borbulhando gás argônio por um período de 15 minutos. Logo após foram retiradas amostras do tempo zero, a cada 1h e 30 minutos nas primeiras 7,5h e, posteriormente, de forma mais espaçada até completar 48h.

As amostras foram filtradas e analisadas com relação a concentração de NH_4^+ , NO_2^- e NO_3^- , de acordo com as metodologias anteriormente descritas. O volume de amostra retirado (10mL) era repostado utilizando um meio contendo apenas as soluções de micronutrientes I e II, no qual eram ressuspensas as células filtradas de modo que pudessem ser retornadas para o reator. Desta forma, pôde ser evitado que o volume reacional e a concentração celular sofressem variação ao longo do experimento. Através da variação na concentração de NH_4^+ , NO_2^- , foi determinada a cinética de consumo de substrato para cada reator.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do Inóculo

Após um período de adaptação de 130 dias, o lodo nitrificante apresentou uma concentração celular de $1,6\text{g.L}^{-1}$. O lodo original coletado de um sistema de lodos ativados da CASAN (Companhia de Abastecimento de Água e Saneamento do Estado de Santa Catarina), antes do período de adaptação, possuía uma concentração celular de $5,96\text{g.L}^{-1}$. Esta diminuição na concentração celular pode ter ocorrido devido a morte de heterotróficos, causada pelas condições seletivas do meio de cultivo, as quais favoreceram o enriquecimento do lodo em microrganismos autotróficos, bem como pela retirada de células pela própria alimentação do reator.

5.1.1 Determinação da Atividade Nitrificante

O gráfico da Figura 5.1 foi construído a partir dos dados obtidos durante o ensaio de respirometria para o lodo nitrificante adaptado (Apêndice 1), considerando uma concentração celular (X) de $1,6\text{gSST.L}^{-1}$. Neste gráfico estão apresentados a velocidade específica de consumo de amônio obtida experimentalmente, bem como os valores fornecidos pelo modelo cinético de ANDREWS (1968).

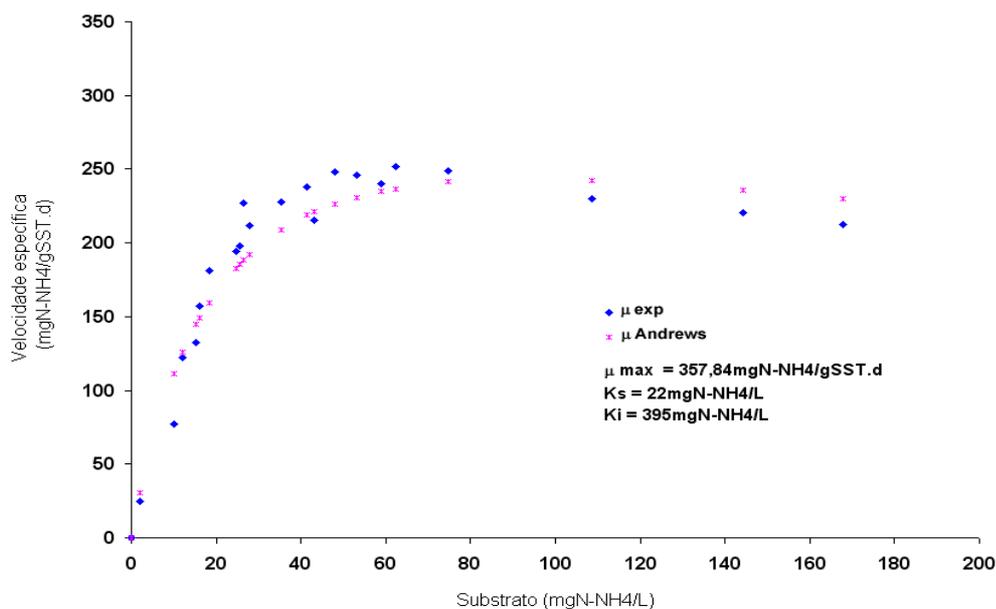


Figura 5.1: Velocidade específica de consumo de substrato em função da concentração de amônio e ajuste pelo modelo de Andrews

Como pode ser observado na Figura 5.1, o modelo cinético de ANDREWS (1968) se ajustou muito bem aos dados experimentais, indicando a existência de uma efetiva inibição causada pelo substrato. O valor encontrado para μ_m de $358\text{mgN-NH}_4.(\text{gSST})^{-1}.\text{d}^{-1}$ demonstra que o lodo estava com uma atividade nitrificante bastante elevada, indicando que houve uma boa adaptação da biomassa às condições autotróficas no reator nitrificante.

5.1.2 NMP e FISH

A Tabela 5.1 expressa os valores encontrados para a quantificação das populações, a partir das determinações de NMP e FISH efetuadas para o lodo nitrificante adaptado.

Analisando os resultados desta tabela, verifica-se que o número de células de *Nitrosomonas* determinado por NMP está próximo do número de oxidadoras de amônio determinado por FISH (mesma ordem de grandeza). Este resultado parece bastante razoável, uma vez que, segundo GRAY (1992), a reação de oxidação do amônio é geralmente considerada ser catalisada pelo gênero *Nitrosomonas*. No entanto, o número de *Nitrobacter* encontrado por FISH foi superior ao NMP e, inclusive, maior que o número de *Nitrosomonas*. Considerando que a máxima velocidade de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) de nitrato-oxidantes é menor que de amônio-oxidantes, a 35°C e TRH de 1dia (JETTEN *et al.*, 2001), e que a oxidação de amônio a nitrito é a etapa limitante da reação de nitrificação (GRAY, 1992), esperava-se encontrar uma população mais abundante de *Nitrosomonas* do que de *Nitrobacter* em um lodo nitrificante.

Tabela 5.1: Resultados de NMP e FISH para o lodo nitrificante adaptado

FISH	cel.mL ⁻¹	NMP	cel.mL ⁻¹
DAPI	$6,0 \times 10^7$	-	-
Nso1225	$6,0 \times 10^5$	<i>Nitrosomonas</i>	$2,1 \times 10^5$
Nit3	$2,0 \times 10^6$	<i>Nitrobacter</i>	$5,1 \times 10^3$
Amx820	$< 10^3$ *	-	-

* O limite de detecção do método é 10^3cél.mL^{-1}

A análise FISH, realizada pela Cátedra de Microbiologia da Universidade de la República - Uruguai, foi baseada no emprego de sondas específicas. O tingimento com DAPI detecta todas as células bacterianas (cora células vivas e mortas porque conservam o DNA), não sendo considerado hibridização por FISH. A determinação dos demais gêneros de bactérias foi feita com relação ao total de células coradas por DAPI. A sonda Nso1225 detecta todas as bactérias oxidadoras de amônio do grupo beta Proteobacteria (gêneros *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosococcus*, *Nitrosovibrio*, *Nitrosolobus*). A sonda Nit3 apenas detecta o gênero *Nitrobacter*, que em geral é o gênero mais abundante de oxidadoras de nitrito neste tipo de reator (não detecta outros gêneros, como *Nitrospira*, que em alguns casos pode ser importante). A sonda Amx820 detecta as bactérias anammox descritas até o momento (Candidatus *Kuenenia stuttgartiensis* e *Brocadia anammoxidans*, que ainda não foram isoladas em cultivo puro), sendo o limite de detecção de 10^3cél.mL^{-1} .

5.2 Acompanhamento dos Reatores

5.2.1 Concentração Celular e Microscopia

Ao longo do período de lavagem celular do reator RI (9 dias), foi feito um acompanhamento diário da concentração celular através da determinação dos sólidos em suspensão no lodo, cujos resultados são representados graficamente na Figura 5.2.

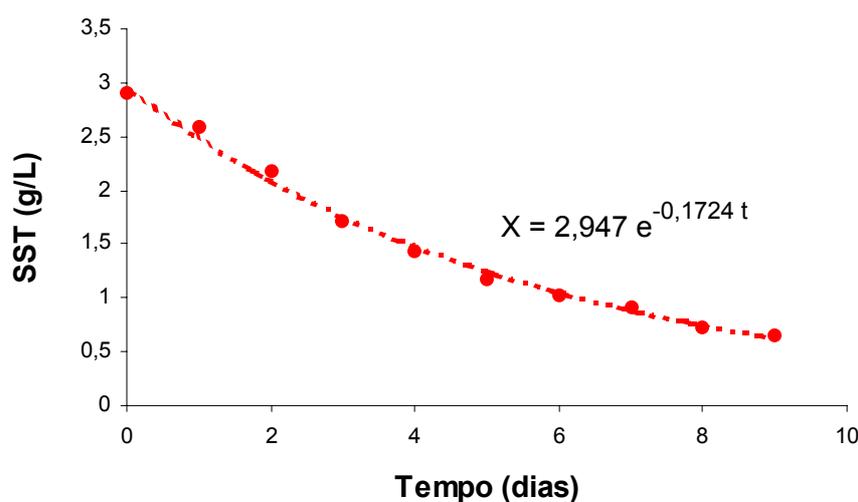


Figura 5.2: Variação da concentração de SST durante a lavagem do reator RI

SCHMIDELL (2001) descreveu o balanço de massa para as células em um reator contínuo homogêneo sem reciclo de células. Embora os reatores utilizados sejam do tipo RBS, será aplicado o mesmo equacionamento por razão de simplificação, conforme apresentado a seguir:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - DX$$

Essa equação integrada fornece:

$$X = X_i \cdot e^{(\mu - D)t}$$

Onde: X_i = concentração celular inicial

X = concentração celular no instante t

Então, a partir da equação exponencial obtida com o ajuste dos dados experimentais, pôde ser calculado o valor de μ :

$$X = 2,947e^{-0,1724 t}$$

$$(\mu - D) = -0,1724$$

$$D = Q / V = 0,5L \cdot d^{-1} / 2,5L = 0,2d^{-1}$$

$\mu = 0,0276d^{-1}$

O valor da vazão específica de alimentação maior do que a velocidade de crescimento ($D > \mu$) ocasiona a lavagem, o que fica evidenciado pela intensa redução da concentração celular observada na Figura 5.2. O valor de μ de 0,0276 equivale a um tempo de duplicação de 25 dias, superior ao tempo de duplicação de 11 dias das bactérias anammox que são citadas pela literatura como bactérias de crescimento muito lento (STROUS *et al.*, 1998). Deve-se considerar que a lavagem celular não é uma condição favorável ao desenvolvimento das populações microbianas, o que explica o crescimento celular extremamente lento neste período.

Na Tabela 5.2 são apresentados os valores de SST encontrados desde a partida até o período de 225 dias de acompanhamento dos reatores RI e RII. Fica evidente uma perda de células, em ambos os reatores, no entanto mais acentuada no reator RI mesmo após o término do período de lavagem. Embora o tempo de duplicação celular em

condições anóxicas seja bastante lento, esperava-se verificar algum aumento na concentração celular, tendo em vista o longo período de incubação.

Tabela 5.2: Resultados da determinação de SST durante o acompanhamento dos reatores.

Período	SST (g.L ⁻¹)	
	RI	RII
0	2,91	1,86
Após lavagem	0,65	-
75	0,44	1,46
150	0,41	1,11
225	0,28	1,43

A análise microscópica do lodo revelou flocos pequenos e bastante dispersos, conforme pode ser verificado nas Figuras 5.3 e 5.5, com diâmetros variando de 50 a 90 μ m, tanto para o reator RI quanto para o reator RII. De acordo com VAZOLLER (1988), um floco que apresente um pequeno diâmetro caracteriza um lodo disperso e de difícil sedimentação; um diâmetro de floco médio a grande (100 a 300 μ m) é encontrado em lodos com boas condições de sedimentabilidade. Isto explica a dificuldade de enriquecimento da biomassa, pois devido a sedimentabilidade inadequada do lodo, muitas células permaneciam em suspensão no meio de cultivo no período sem agitação e acabavam sendo removidas com o sobrenadante durante a retirada do efluente dos reatores.

Somado a isto está o fato de que bactérias em condições anóxicas, de um modo geral, apresentam um crescimento muito lento; mais especificamente, bactérias anammox apresentam um tempo de duplicação de 11 dias. Nestes casos, segundo SCHMIDT *et al.* (2002), reatores com um sistema de retenção de biomassa muito eficiente são necessários para o enriquecimento. Sistemas como discos rotatórios ou reatores com material suporte, parecem ser uma boa alternativa, uma vez que a biomassa permanece fortemente aderida, evitando que as células sejam carregadas com a vazão de alimentação e favorecendo, assim, o enriquecimento da cultura.

As Figuras 5.4 e 5.6, fornecem uma imagem ampliada de flocos individuais (aumento de 400X), permitindo uma melhor visualização do tipo de estrutura formada.

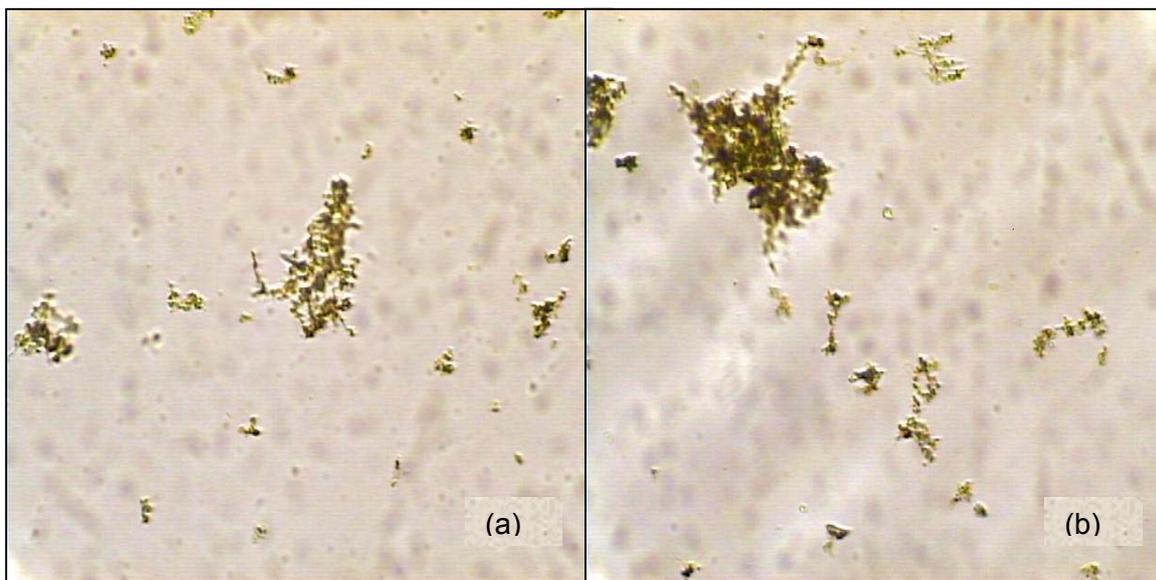


Figura 5.3: Microscopia ótica mostrando a estrutura dos flocos do reator RI com aumento de 100X (medida estimada do diâmetro do flocos maior em (a): $51 \times 57 \mu\text{m}$ e em (b): $80 \times 88 \mu\text{m}$)

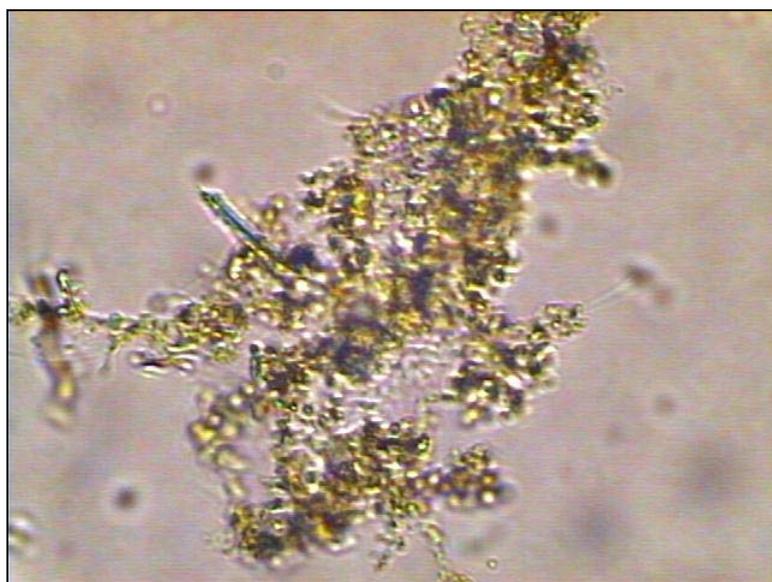


Figura 5.4: Microscopia ótica mostrando a estrutura do flocos do reator RI com aumento de 400X

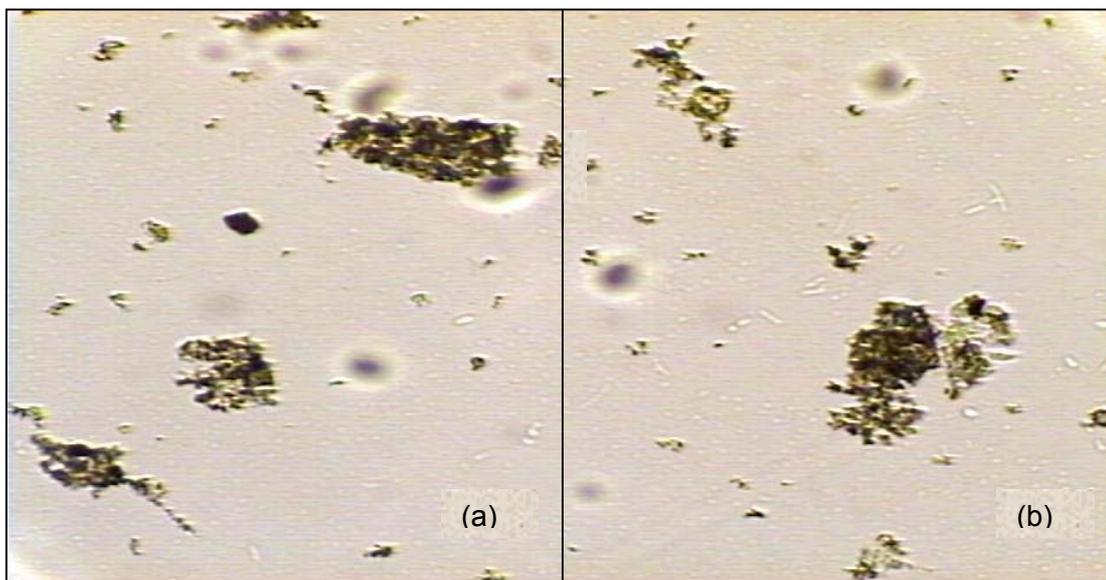


Figura 5.5: Microscopia ótica mostrando a estrutura dos flocos do reator RII com aumento de 100X (medida estimada do floco maior em (a): $76 \times 37 \mu\text{m}$ e em (b): $50 \times 51 \mu\text{m}$)

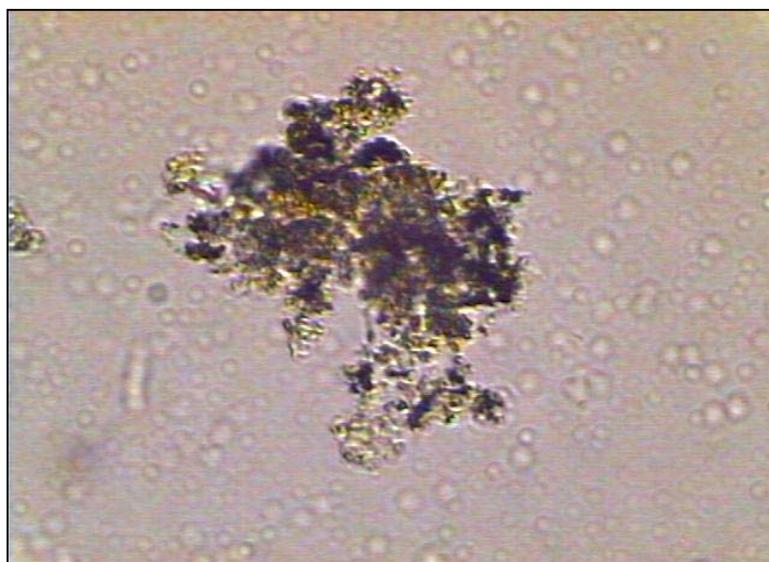


Figura 5.6: Microscopia ótica mostrando a estrutura do floco do reator RII com aumento de 400X

Os dados obtidos para a análise de sólidos suspensos totais por diferentes metodologias, para a amostragem realizada no período de 225d de monitoramento dos reatores, bem como a determinação de sólidos suspensos voláteis, são apresentados na Tabela 5.3. Pode ser observado que para ambos os reatores há grande proximidade entre os resultados de SST, demonstrando que a técnica utilizando microondas (proposta por A. K. Gombert), além de muito mais prática e rápida que a determinação em estufa (conforme é proposto pelo S. Methods), apresenta boa confiabilidade, conforme já havia sido verificado em outros testes comparativos realizados no LTE – Laboratório de Tratamento de Efluentes do Depto de Engenharia Química e de Alimentos da UFSC.

Tabela 5.3: Dados comparativos das análises de sólidos em suspensão

Amostra	SST (g.L ⁻¹) (Microondas)*	SST (g.L ⁻¹) Standard Methods	SSV (g.L ⁻¹) Standard Methods
RI 225d	0,28	0,30	0,26
RII 225d	1,43	1,47	0,63

* indicação de Andreas Karoli Gombert – Depto Eng. Química da Escola Politécnica/USP

Considerando que o SSV representa a massa de matéria orgânica presente na amostra (transformada em CO₂ e água), e que o único carbono orgânico presente é aquele incorporado na biomassa, esta análise quantifica indiretamente o material celular. Para o reator RI, o valor de SSV está bastante próximo do SST, indicando que a maior parte do material em suspensão no lodo é constituída de células. No entanto, para o reator RII, o valor encontrado para o SSV representa menos de 50% dos sólidos suspensos totais, o que indica uma considerável proporção de material inorgânico em suspensão no lodo.

5.2.2 Acompanhamento das Formas Nitrogenadas

As Figuras 5.7 e 5.8 apresentam graficamente os resultados obtidos para os reatores RI e RII, respectivamente, durante o acompanhamento analítico das formas nitrogenadas amônio, nitrito e nitrato, a partir das análises de entrada (meio de alimentação) e saída (sobrenadante).

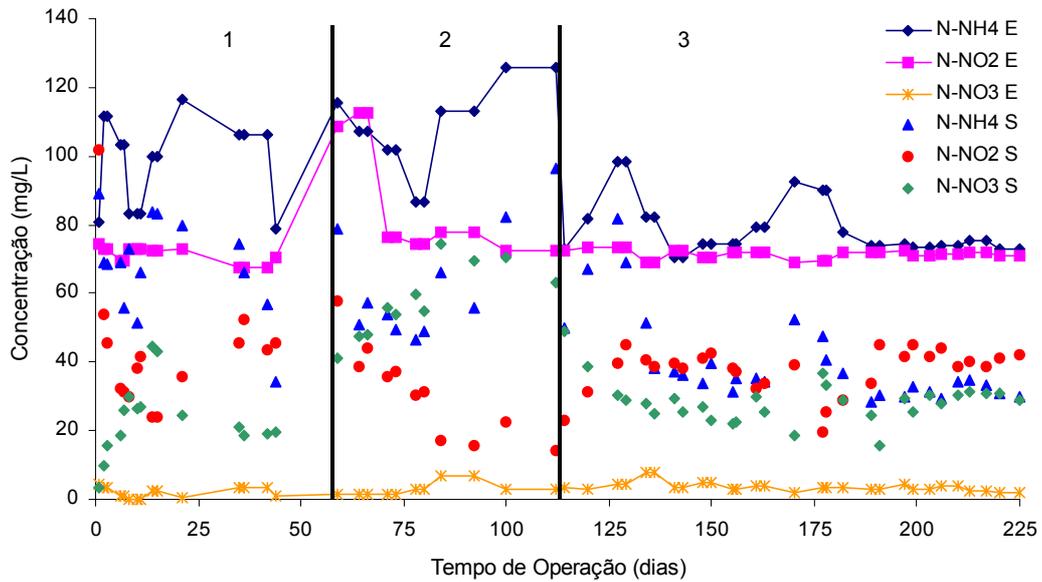


Figura 5.7: Concentração das formas nitrogenadas na entrada (E) e saída (S) do reator RI

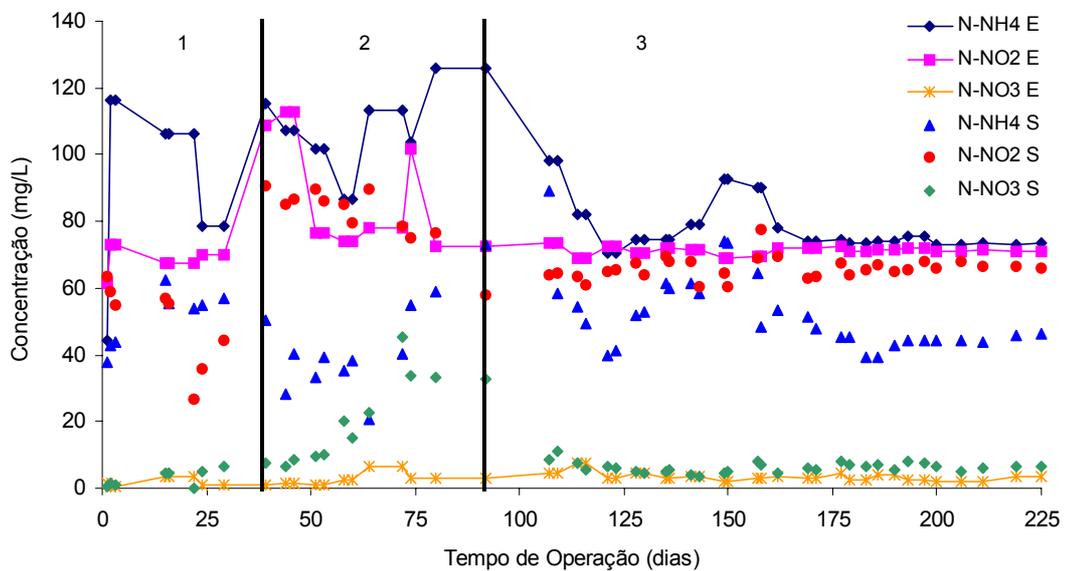


Figura 5.8: Concentração das formas nitrogenadas na entrada (E) e saída (S) do reator RII

A fase 1 representada nas Figuras 5.7 e 5.8 para o reator RI e RII, respectivamente, foi caracterizada por uma grande oscilação do sistema, tendo em vista a variação das concentrações de saída das formas nitrogenadas de amônio, nitrito e nitrato (N-NH_4^+ , N-NO_2^- e N-NO_3^-). Isto é justificado pelo fato de as populações microbianas estarem em um período de adaptação e seleção, uma vez que o inóculo partiu de um lodo nitrificante, ou seja, os microrganismos estavam sob aeração e recebendo um meio contendo amônio como único substrato. Então, o lodo nitrificante foi colocado em reatores anóxicos e passou a ser alimentado com um meio contendo amônio e nitrito, constituindo uma condição totalmente adversa devido ao estresse da ausência de oxigênio e presença de nitrito no meio de cultivo.

Considerando que a rota metabólica dos microrganismos está na dependência de seu sistema enzimático (YE & THOMAS, 2001), parece razoável que neste período inicial tenha sido necessária uma readequação do metabolismo microbiano às novas condições impostas. Aqueles cujo sistema enzimático não apresenta flexibilidade, também não apresentarão capacidade de adaptação, sendo levados à morte ou permanecendo num estado de inércia até encontrar alguma condição favorável, como a entrada de oxigênio no reator.

A lavagem inicial de células aplicada em RI parece ter acelerado e/ou acentuado a seleção de microrganismos, originando uma biomassa muito mais especializada no processo de interesse: oxidação anaeróbia do amônio via nitrito, sob condições anóxicas, tendo em vista que houve um concomitante consumo destes substratos durante todo o período de monitoramento do reator (Figura 5.7). Provavelmente, as células que não se adaptaram nos primeiros dias ou morreram, foram sendo removidas do reator RI durante o período de lavagem. Já no reator RII não foi realizada lavagem e todas as células permaneceram retidas, podendo ter sido prejudicando o desenvolvimento de bactérias anaeróbias capazes de oxidar concomitantemente amônio e nitrito. Conforme pode ser observado na Figura 5.8, o consumo de N-NH_4^+ (diferença entre entrada e saída) em RII foi sempre muito superior ao de N-NO_2^- .

A fase 2 é marcada por uma sobrecarga de nitrito no sistema, devido a uma concentração de N-NO_2^- no meio de alimentação acima de 100mg.L^{-1} . Além disso, nesta mesma fase pode-se observar um aumento crescente do nitrato na saída de RI e RII (a concentração de N-NO_3^- aumentou cerca de três vezes neste período, em ambos os reatores). Parece razoável considerar que a elevação da concentração de nitrito tenha afetado o sistema enzimático, causando uma mudança no metabolismo microbiano. O

aumento na concentração de nitrato pode ter sido favorecido por uma entrada de ar nos reatores, levando a um nitratação pelas bactérias oxidadoras de nitrito.

Inúmeras pesquisas têm demonstrado a toxicidade do nitrito em relação aos microrganismos. STEIN & ARP (1998), sugeriram uma inativação irreversível de amônio-oxidantes por nitrito a uma concentração de $420\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (equivalente a $128\text{mgN}\cdot\text{NO}_2^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$). MULLER *et al.* (1995) reportaram uma redução à metade da velocidade de oxidação de amônio na faixa de $42\text{-}70\text{ mgN}\cdot\text{NO}_2^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$ quando comparada com $0\text{-}14\text{ mgN}\cdot\text{NO}_2^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$. Durante o estudo da fisiologia microbiana da comunidade anammox, STROUS *et al.* (1998) verificaram uma inibição da oxidação anaeróbia do amônio (via nitrito) por concentrações de nitrito acima de 20mM , embora quando a concentração permaneceu acima de 5mM ($70\text{mgN}\cdot\text{NO}_2^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$) por um longo período (12h), a atividade foi completamente perdida. Considerando que a concentração de nitrito no meio de alimentação estava em torno de $110\text{mgN}\cdot\text{NO}_2^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$ no período de sobrecarga, este fato pode ter afetado as populações microbianas presentes, porém de forma reversível, uma vez que a atividade foi recuperada posteriormente.

Segundo TIEDJE (1988), apud PRATES (1997) a redução desassimilatória do nitrato a amônio seria benéfica para a célula bacteriana, pois constituiria um mecanismo de retirada do nitrito acumulado no meio. No entanto, caso estivesse ocorrendo a RDNA, resultaria em um consumo de nitrato ou nitrito e concomitante aumento na concentração de amônio. No entanto, neste período de desequilíbrio (fase 2, Figura 5.8) foi verificado um aumento na concentração de nitrato, não parecendo ter havido remoção do mesmo. Além disso, um aumento na concentração de amônio foi verificado apenas no período entre 74 e 107 dias, o qual parece acompanhar o aumento da entrada de amônio no reator.

Por razão da toxicidade do nitrito, talvez tenha sido acionado um sistema enzimático para oxidação do nitrito a nitrato, como um mecanismo de defesa microbiano, de forma a diminuir a condição de inibição imposta ao meio de crescimento. Assim, a oxidação do amônio via nitrito, seja ela realizada por amônio-oxidantes do gênero *Nitrosomonas*, bactérias anammox ou outra cultura, provavelmente tenha sido minimizada ou ficado temporariamente inibida.

Na fase 3, como pode ser observado nas Figuras 5.7 e 5.8, os reatores demonstraram um perfil de relativa estabilidade, podendo ser observado algumas diferenças peculiares entre RI e RII. A partir de 125 dias de operação do reator RI, passou

a haver um consumo de amônio e nitrito quase na mesma proporção (ao redor de 30mgN.L^{-1}) e a concentração de nitrato na saída esteve ao redor de 25mgN.L^{-1} , resultando em uma remoção da ordem de 35mgN.L^{-1} . Já no reator RII, a partir do início da terceira fase (correspondente a 105 dias), embora tenha sido verificado um consumo de amônio de cerca de 30mgN.L^{-1} , como em RI, houve um baixo consumo de nitrito e a concentração de nitrato na saída permaneceu abaixo de 10mgN.L^{-1} .

Foram, então, calculadas as relações molares entre nitrito consumido e nitrato formado por mol de amônio, para tentar delinear o processo de remoção de nitrogênio desenvolvido nos reatores. Nas Figuras 5.9 e 5.10 são apresentados os resultados obtidos a partir dos dados experimentais, para os reatores RI e RII, respectivamente, comparativamente as relações estequiométricas definidas para o processo anammox (van de GRAAF *et al.*, 1996; STROUS *et al.*, 1998):

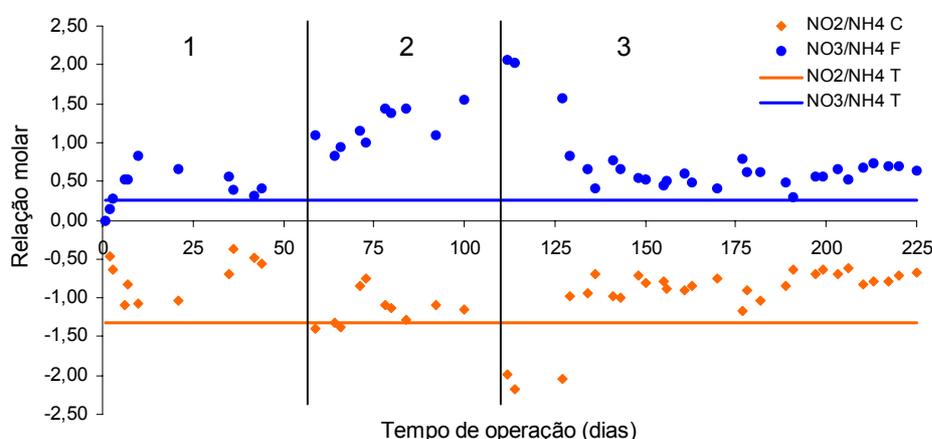
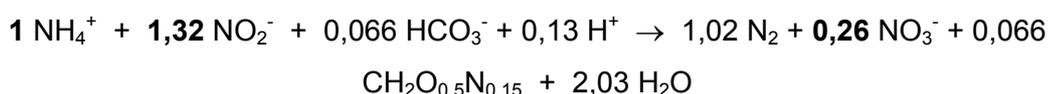


Figura 5.9: Relações molares de consumo de substrato e formação de produto no reator RI em comparação a estequiometria do processo anammox (C = consumido; F = formado; T = teórico)

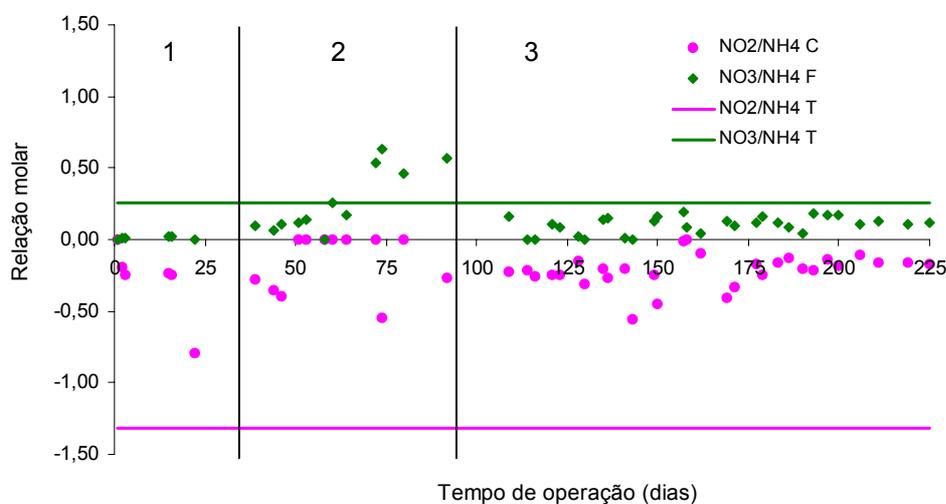


Figura 5.10: Relações molares de consumo de substrato e formação de produto no reator RII em comparação a estequiometria do processo anammox.

(C = consumido; F = formado; T = teórico)

Observando o gráfico da Figura 5.9, verifica-se que, ao longo de quase todo o período de acompanhamento, a relação molar de nitrito consumido por mol de amônio permaneceu abaixo do valor teórico que é de 1,32 mol de NO_2 por mol de NH_4 , de acordo com a estequiometria do processo anammox. Por outro lado, a relação molar de nitrato formado por mol de amônio, principalmente nas fases 1 e 2, esteve sempre acima do valor teórico de 0,26 mol de NO_3 por mol de amônio. Isto pode indicar que nestas fases parte do nitrito e amônio estavam sendo oxidados a nitrato, enquanto outra parte poderia estar sendo oxidada a nitrogênio gasoso, evidenciando a possibilidade dos dois processos estarem se desenvolvendo simultaneamente: nitrificação e oxidação anaeróbia do amônio. Entretanto, na fase 3, a média de consumo de nitrito por mol de amônio foi ao redor de 1, muito próxima do valor teórico que é de 1,32. Da mesma forma, a produção de nitrato foi de 0,5 em relação ao consumo de amônio, enquanto a teórica é de 0,26, indicando que algum processo aeróbio poderia estar ocorrendo.

A nitrificação poderia estar ocorrendo durante a decantação do reator, uma vez que esta operação era realizada mantendo uma abertura para a atmosfera, de modo que o ar pudesse equilibrar a pressão negativa causada pelo bombeamento do sobrenadante. Caso não fosse tomada esta medida, a diferença de pressão entre o meio interno e externo poderia ocasionar a ruptura do reator. Neste momento, as bactérias nitrito-oxidantes, provavelmente, encontravam um meio favorável para que seu sistema

enzimático pudesse ser ativado. Logo após a decantação, o gás argônio borbulhado no meio restabelecia as condições anóxicas, induzindo a utilização do nitrito como aceptor de elétrons pela cultura nitrificante ou tornando o meio favorável para atividade da população de anaeróbias amônio-oxidantes.

Conforme já discutido anteriormente, o consumo de nitrito no reator RII foi muito baixo ao longo de praticamente todo o período de acompanhamento, embora tenha havido um considerável consumo de amônio. Portanto, uma relação molar de nitrito consumido por mol de amônio muito aquém do valor teórico de 1,32 mol de NO_2 por mol de NH_4 , de acordo com a estequiometria do processo anammox, já era esperada, o que pode ser observado no gráfico da Figura 5.10. Em contraste com o RI, a relação molar de nitrato formado por mol de amônio de 0,15 obtida em RII, esteve abaixo do valor teórico de 0,26 mol de NO_3 por mol de amônio, com exceção ao período de desequilíbrio do sistema (39 a 92 dias).

Tendo em vista a concentração celular mais elevada, assim como uma maior variedade de populações microbianas no reator RII em relação ao RI, é provável que tenha havido uma maior competição pelo oxigênio que viesse a entrar no reator. Dessa forma, poderia estar ocorrendo uma nitrificação parcial de amônio a nitrito, a qual consumiria todo o oxigênio disponível, impossibilitando a formação de nitrato pela ação de nitrito-oxidantes. Embora parte do nitrito e amônio estivesse sendo oxidada a nitrogênio gasoso quando as condições anóxicas eram restabelecidas, ainda permanecia um residual de nitrito relativamente elevado, aparentando ter havido um consumo mínimo do mesmo. Esta hipótese explicaria os baixos níveis de nitrato formado, bem como o consumo de amônio (aparentemente) muito superior ao de nitrito.

A biomassa anammox é considerada estritamente anóxica, tendo sido evidenciado por STROUS *et al.* (1999) uma perda completa de atividade, mas de forma reversível, mesmo em concentrações muito baixas de oxigênio. Uma vez que o sistema operacional utilizado neste trabalho não possibilitava a ausência permanente de oxigênio, a presença deste, mesmo que em baixas concentrações, pode ter inibido a oxidação anaeróbia do amônio nos reatores. Em decorrência disso, talvez a atividade das bactérias anammox esteja associada a outros grupos microbianos, cuja atividade consome o oxigênio do ambiente em que elas se encontram, propiciando condições anóxicas no sistema. Possivelmente, por esta razão as bactérias anammox não tenham sido isoladas em culturas puras até o momento.

POLANCO *et al.* (2001) descrevem a redução desassimilatória do sulfato (RDS) como uma alternativa para remoção simultânea de nitrogênio e enxofre, sob condições anaeróbias. Os mesmos autores apontam a vantagem energética do processo em relação a outros processos anóxicos. Considerando que neste trabalho o meio de cultivo possui sulfato de amônio na sua composição, bactérias redutoras de sulfato poderiam estar utilizando o hidrogênio como doador e sulfato como aceptor final de elétrons para obtenção de energia. Ainda, sulfito poderia ser doador de elétrons, sendo reoxidado a S^0 ou sulfato por bactérias como o *Thiobacillus denitrificans* usando nitrato como aceptor de elétrons. A RDS seria uma rota de desnitrificação alternativa, entretanto, nitrato estaria sendo convertido a amônio.

Embora tenha sido observado aumento na concentração de amônio em alguns pontos isolados durante o monitoramento de RII, este parece acompanhar a oscilação da concentração de entrada. No entanto, quando se tem a possibilidade de mais de um processo estar ocorrendo num mesmo reator, fica difícil monitorar a formação e consumo de todos os compostos envolvidos, uma vez que há uma dinâmica de reações e interconversão entre os componentes presentes no meio. Considerando que o inóculo utilizado partiu de uma estação de tratamento de esgoto doméstico, mesmo após o período de adaptação do lodo nitrificante, este deveria conter inúmeros gêneros microbianos, de forma que não seria surpreendente a presença de bactérias do tipo *Thiobacillus denitrificans* nos reatores, principalmente em RII, o qual não sofreu uma pré-seleção com lavagem de células.

A seguir, nas Figuras 5.11 e 5.12, são apresentados os gráficos de eficiência de remoção de nitrogênio durante o monitoramento dos reatores, com relação às cargas de entrada e saída de RI e RII, respectivamente.

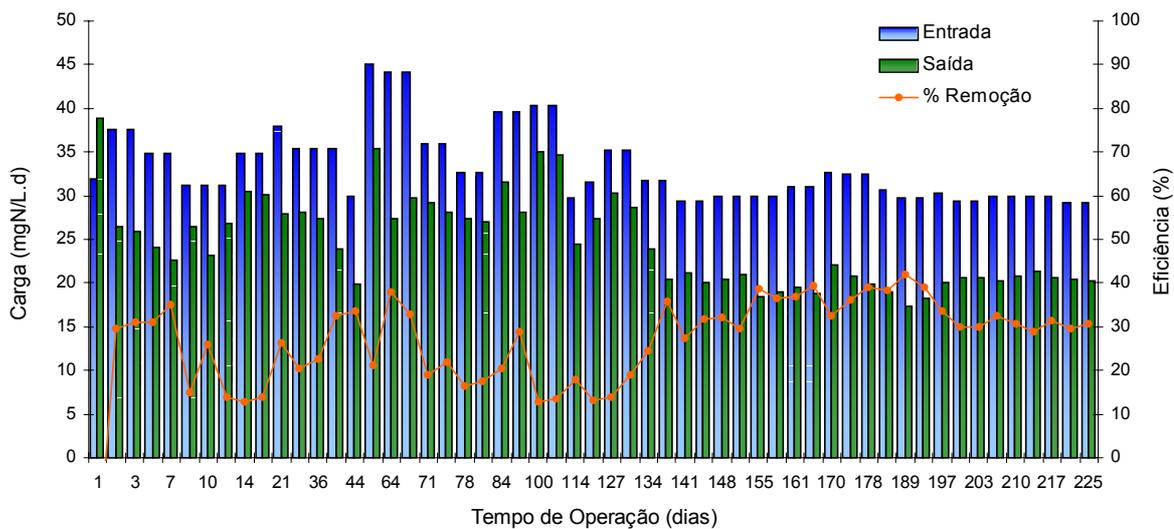


Figura 5.11: Eficiência de remoção de nitrogênio com relação a carga de entrada e saída do reator RI

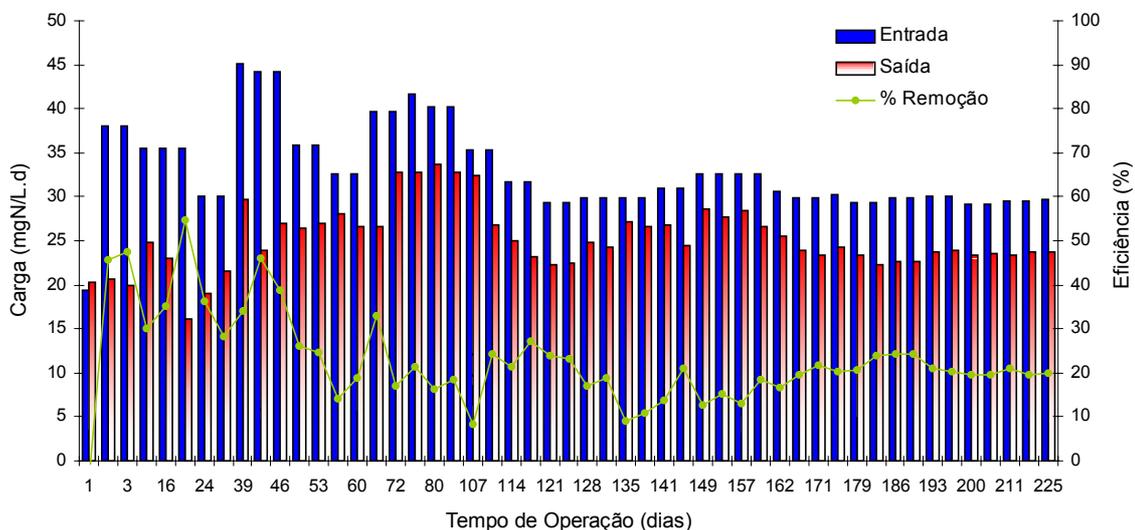


Figura 5.12: Eficiência de remoção de nitrogênio com relação a carga de entrada e saída do reator RII

Analisando-se a Figura 5.11, é possível observar um período de oscilação do sistema até o 134º dia de operacionalização do reator RI. A partir daí até o final do período de acompanhamento (225 dias), a remoção de nitrogênio foi da ordem de $10\text{mgN.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, correspondente a uma eficiência de remoção entre 30 e 40%, caracterizando um perfil estável do processo.

Comparando os resultados apresentados pela Figura 5.12 para o RII com a Figura 5.11, referente ao RI, verifica-se que inicialmente o reator RII apresentou uma maior eficiência de remoção, o que provavelmente se deve a maior concentração celular e variedade microbiana presente, uma vez que este não foi submetido a lavagem inicial. Nos últimos 75 dias de acompanhamento, entre os dias 150 e 225, o RII apresentou uma remoção em torno de $5\text{mgN.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, correspondente a uma eficiência de remoção aproximadamente constante e em torno de 20%. Resultado similar foi reportado por SHRESTHA *et al.* (2000), que obtiveram um máximo de 22% de remoção de nitrogênio empregando cultura pura de *Nitrosomonas europaea* sob condições de oxigênio limitante ($0,6\text{mgO}_2/\text{L}$).

Tendo em vista os resultados anteriormente apresentados com relação a determinação de SST, verifica-se que embora o reator RI tenha demonstrado uma diminuição acentuada da concentração celular, pode ser observado na Figura 5.13 um aumento da remoção de nitrogênio específica, em intervalos de 75 dias. Em RII, a remoção específica média ficou em torno de $5\text{mgN.gSST}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ao longo de todo o período de acompanhamento e em RI, a remoção específica média que inicialmente estava em torno de 10 passou para $25\text{mgN.gSST}^{-1}.\text{d}^{-1}$ no intervalo de 150 a 225 dias de monitoramento. Estes resultados indicam fortemente o enriquecimento da biomassa presente no reator RI em microrganismos especializados na oxidação anaeróbia do amônio.

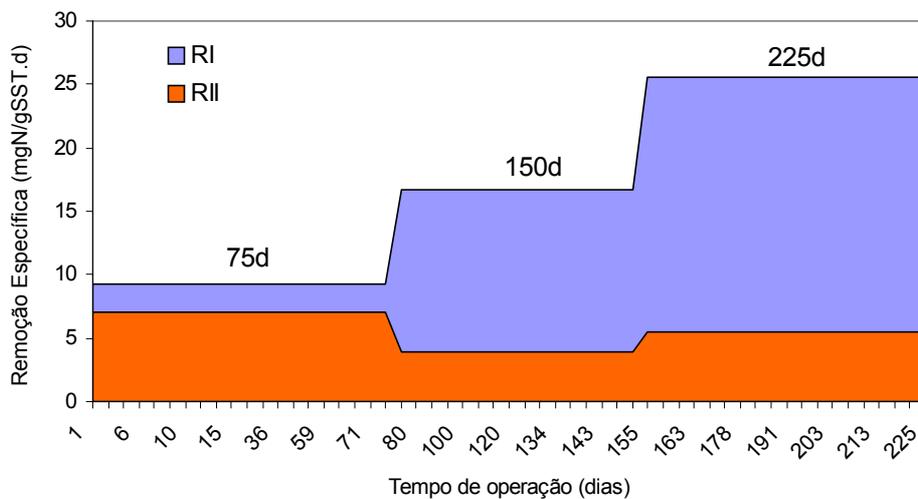


Figura 5.13: Valores médios da remoção específica de nitrogênio a cada intervalo de 75dias

5.2.3 Acompanhamento da DQO

A Figura 5.14 expressa os valores de DQO determinados para o reator RI (a) e RII (b), no período de 225dias de acompanhamento. O objetivo desta determinação era monitorar a morte celular, a qual seria evidenciada por um aumento na DQO de saída devido à liberação do carbono que faz parte da composição química da biomassa.

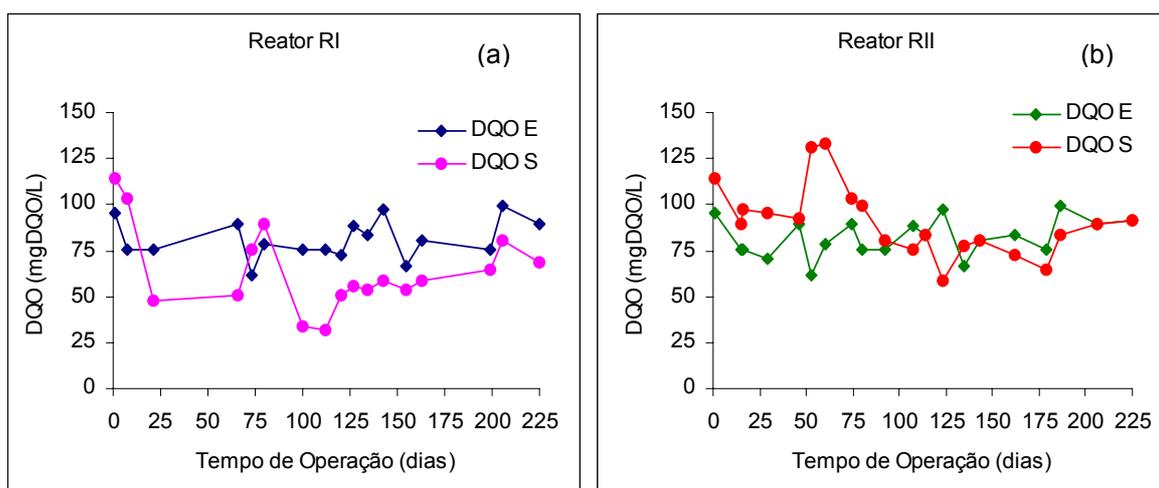


Figura 5.14: Valores de DQO em RI (a) e RII (b) durante o período de acompanhamento.

Levando-se em consideração que não há fonte de carbono orgânico, os valores de DQO do meio de alimentação se devem basicamente ao nitrito, o qual é sabido expressar alguma DQO. Os valores de entrada para RI e RII estão na mesma faixa ($80\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$), o que era esperado devido a se tratar do mesmo meio de alimentação. Com relação à saída, podem ser verificados alguns pontos em que os valores de DQO são maiores que a entrada, como nos primeiros dias de operação de RI e RII, em que as células ainda estavam se adaptando ao meio e não apresentavam um consumo efetivo do substrato, e entre 50 e 75 dias para RII, provavelmente por apresentar níveis mais elevados de nitrito, o qual acumulou no reator neste período devido a um desequilíbrio do sistema (nitrito na saída maior do que na entrada), conforme visto anteriormente no gráfico de acompanhamento das formas nitrogenadas (Figura 5.8).

Considerando que o maior aumento observado (Figura 5.14 b) foi da ordem de 50mgDQO , é possível constatar que isto se deva muito mais ao nitrito presente no meio do que a morte celular. Esta constatação está de acordo com a justificativa apresentada no item 5.2.1, para a diminuição da concentração celular. Conforme discorrido anteriormente, a perda de células se deveria a inadequada sedimentabilidade do lodo. Uma vez que os reatores foram inoculados com lodo já adaptado a condições autotróficas, era esperada uma inibição microbiana devido à ausência de oxigênio e presença de nitrito, mas considerável morte apenas seria observada caso as condições se tornassem extremamente desfavoráveis, como excesso de temperatura e quedas ou elevações bruscas de pH. Neste caso, a determinação da DQO também serviria como um indicativo de descontrole do sistema.

5.2.4 Acompanhamento da Alcalinidade

Nas Figuras 5.15 e 5.16 são apresentados os valores encontrados pela determinação da alcalinidade dos reatores RI e RII, respectivamente.

A alcalinidade de entrada média foi de $230\text{mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$, a qual provém do bicarbonato de potássio presente no meio de alimentação. Considerando que o bicarbonato constitui-se na única fonte de carbono para incorporação celular, o consumo de alcalinidade indica o consumo de carbono inorgânico, o qual está diretamente relacionado com o crescimento da biomassa.

Para o reator RI, o consumo de alcalinidade ao longo do período de acompanhamento foi de aproximadamente 50mgCaCO₃.

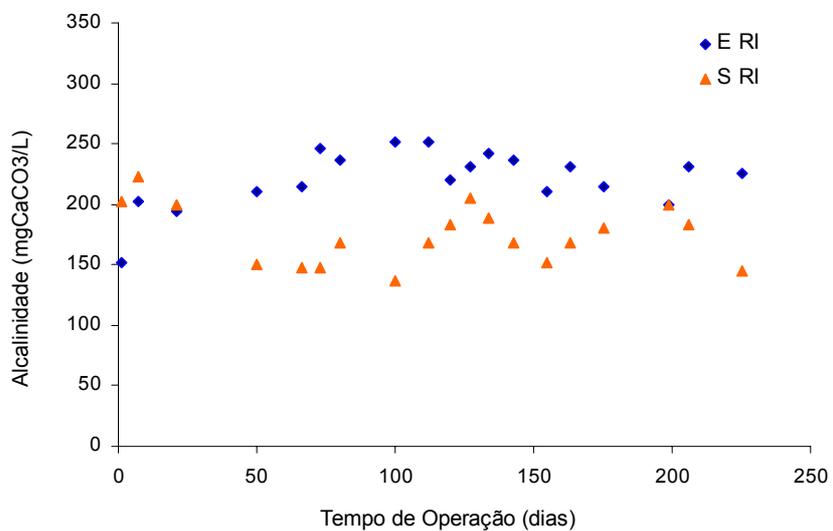


Figura 5.15: Valores de alcalinidade de entrada (E) e saída (S) do reator RI

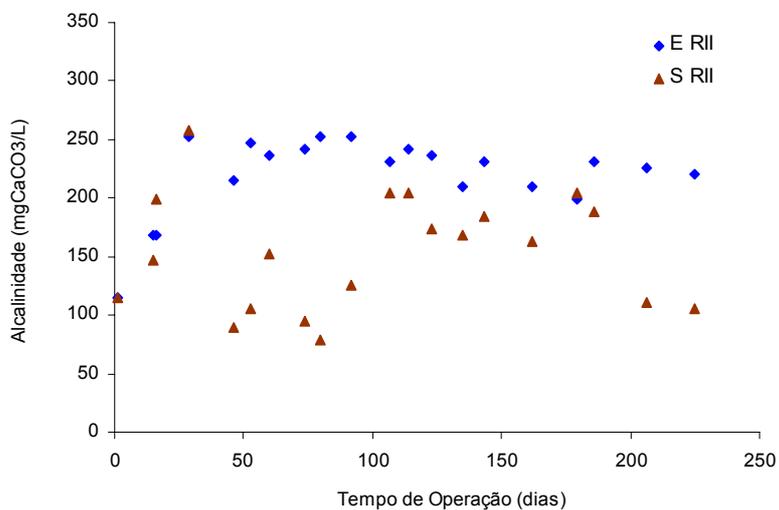


Figura 5.16: Valores de alcalinidade de entrada (E) e saída (S) do reator RII

Em RII, há um período inicial e final de maior consumo de alcalinidade, que coincide com as maiores concentrações celulares, conforme observado pela determinação de SST (Tabela 5.2). O menor consumo de alcalinidade foi observado no período entre 125 e 175 dias, o qual coincide com uma elevação da concentração de amônio na saída do RII (Figura 5.8) e com a menor concentração celular determinada (Tabela 5.2, 150 dias). Isto parece indicar um período de estagnação da biomassa, ou seja, talvez o metabolismo tenha sido inibido ou retardado neste período, devido à diminuição no consumo de amônio e baixo crescimento. Não há evidência das possíveis causas desta inibição. De forma geral, comparando os dois reatores, o consumo de alcalinidade no reator RII foi superior ao verificado em RI.

Durante o estudo ecofisiológico da comunidade anammox em um reator SBR, STROUS *et al.* (1998) determinaram os parâmetros de rendimento da biomassa como sendo de $0,066 \pm 0,01 \text{ mol C} \cdot (\text{mol NH}_4^+)^{-1}$. Buscando comparar os dados experimentais com este valor teórico, calculou-se o consumo molar de carbono a partir do consumo de alcalinidade em mgCaCO_3 e relacionou-se com o consumo molar de amônio, para ambos os reatores. Os resultados obtidos para RI e RII são apresentados graficamente na Figura 5.17.

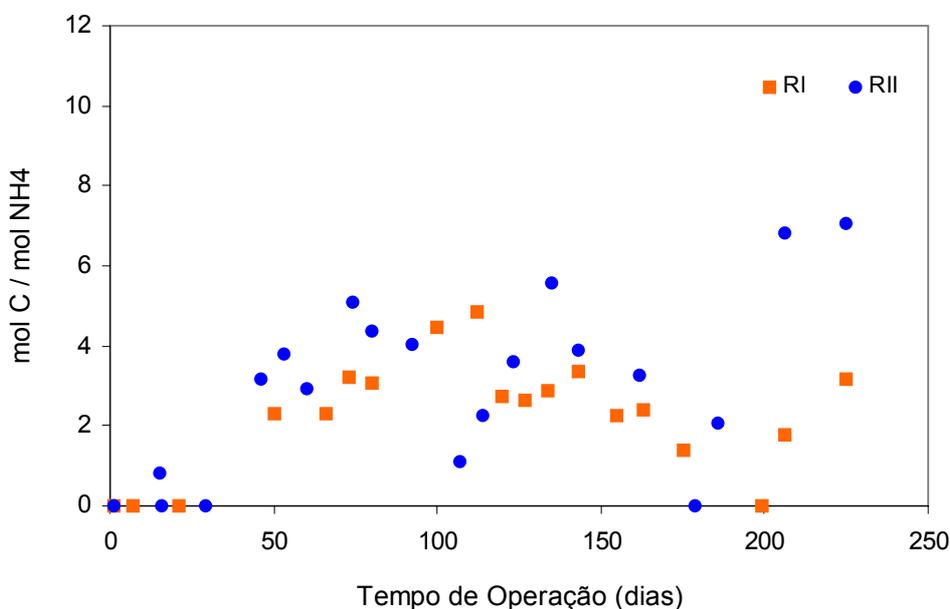


Figura 5.17: Relação molar de consumo de carbono e amônio

Analisando-se o gráfico da Figura 5.17, observa-se uma certa dispersão dos dados em ambos os reatores. De forma geral, a relação molar de consumo de mol de C por mol de NH_4^+ esteve muito acima da relação proposta por STROUS *et al.* (1998) para cultura anammox. Este resultado indica que o lodo dos dois reatores é composto por uma população mista, na qual os microrganismos em maior proporção apresentam velocidade de crescimento muito superior ao de bactérias anammox, o que explicaria o elevado consumo de carbono inorgânico calculado a partir do consumo de alcalinidade. Mesmo no reator RI, que sofreu uma lavagem inicial de células, visando a seleção, o lodo está longe de poder ser comparado com uma cultura pura.

Conforme representado na Figura anterior, até cerca de 50 dias, a relação molar de consumo foi baixa, provavelmente devido a adaptação da biomassa. No período de 50 a 200 dias, a relação oscilou entre 2 e 6 molC.mol NH_4^+ , indicando uma certa instabilidade. Nos últimos 25 dias de acompanhamento dos reatores percebe-se uma elevação acentuada no consumo de carbono em relação ao amônio para RII (Figura 5.17), o que está relacionado com o aumento da concentração celular verificada neste mesmo período pela determinação de SST (Tabela 5.2, 225 dias). Isto parece indicar um enriquecimento da biomassa o qual deve ter ocorrido em ambos reatores, embora não tenha sido verificado aumento da concentração celular em RI, que pode ser explicado por uma maior perda de células devido à inadequada sedimentação do lodo ou pela menor precisão do método a baixas concentrações de sólidos.

5.2.3 Quantificação e Caracterização das Populações

As Tabelas 5.4 e 5.5 apresentam os resultados da determinação do número mais provável de bactérias oxidadoras de amônio e nitrito, aqui denominadas como *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*, para os reatores RI e RII, respectivamente. A partir dos resultados de NMP.mL⁻¹ e dos dados de SST disponíveis na Tabela 5.2, calculou-se o NMP.gSST⁻¹ e o log do NMP.gSST⁻¹, cujos valores obtidos constam nas Tabelas a seguir.

Tabela 5.4: Número mais provável de *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* em RI

Dias	<i>Nitrosomonas</i>			<i>Nitrobacter</i>		
	NMP.mL ⁻¹	NMP.gSST ⁻¹	log NMP.gSST ⁻¹	NMP.mL ⁻¹	NMP.gSST ⁻¹	log NMP.gSST ⁻¹
0*	2,1x10 ⁵	1,3x10 ⁸	8,11	5,1x10 ³	3,5x10 ⁶	6,54
9**	1,4x10 ⁵	2,1x10 ⁸	8,32	1,8x10 ³	2,7x10 ⁶	6,43
75	9,2x10 ⁵	2,1x10 ⁹	9,32	1,1x10 ³	2,5x10 ⁶	6,40
150	2,2x10 ⁷	5,4x10 ¹⁰	10,70	3,2x10 ⁴	7,8x10 ⁷	7,89
225	1,7x10 ⁷	6,8x10 ¹⁰	10,80	4,0x10 ³	1,6x10 ⁷	7,20

* Inóculo (lodo nitrificante adaptado); ** Final do período de lavagem

Tabela 5.5: Número mais provável de *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* em RII

Dias	<i>Nitrosomonas</i>			<i>Nitrobacter</i>		
	NMP.mL ⁻¹	NMP.gSST ⁻¹	log NMP.gSST ⁻¹	NMP.mL ⁻¹	NMP.gSST ⁻¹	log NMP.gSST ⁻¹
0*	2,1x10 ⁵	1,3x10 ⁸	8,11	5,1x10 ³	3,5x10 ⁶	6,54
75	2,2x10 ⁶	1,5x10 ⁹	9,18	3,1x10 ²	2,1x10 ⁵	5,32
150	9,2x10 ⁶	8,3x10 ⁹	9,92	1,9x10 ¹	1,7x10 ⁴	4,23
225	1,4x10 ⁸	9,8x10 ¹⁰	11,00	3,2x10 ²	2,2x10 ⁵	5,34

* Inóculo (lodo nitrificante adaptado)

A partir dos valores de NMP.gSST⁻¹ do reator RI, percebe-se que a lavagem celular realizada por um período de 9 dias propiciou um aumento do NMP de *Nitrosomonas* em cerca de 1,6 vezes em relação ao inóculo, enquanto o NMP de *Nitrobacter* sofreu uma redução da ordem de 1,3 vezes. O objetivo da lavagem era de fazer prevalecer o número de oxidadoras de amônio em relação as nitrito oxidantes, de modo que o nitrito não fosse levado a nitrato e ficasse disponível para oxidação anaeróbia do amônio. Além disso, também se desejava alcançar uma pré-seleção microbiana, de modo a reduzir a competição pelo substrato e tornar as células mais específicas para a oxidação anaeróbia do íon amônio.

A lavagem parcial de nitrito oxidantes do reator RI foi favorecida pela temperatura, pois, segundo JETTEN *et al.* (2001) a 35°C e um curto TRH, a máxima velocidade de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) de bactérias nitrito-oxidantes é aproximadamente duas vezes menor que de amônio-oxidantes (0,5 e 1 dia⁻¹, respectivamente). Então, a redução no número de *Nitrobacter* só não foi maior devido ao tempo de retenção hidráulico de 5 dias, pois os autores citados consideram um TRH de aproximadamente 1 dia. Dessa forma, uma lavagem mais efetiva de nitrito-oxidantes poderia ser alcançada utilizando um TRH mais baixo, de forma a minimizar a formação de nitrato no reator a qual se manteve acima do esperado, conforme discutido anteriormente.

Após enriquecimento de uma cultura de microrganismos anaeróbios amônio-oxidantes em reator de leito fluidizado, o método de NMP mostrou que bactérias nitrificantes aeróbias estiveram presentes no lodo, mas o número permaneceu constante e em torno de $9 \pm 5 \times 10^3$ células.(mgSV)⁻¹ de amônio oxidantes e $1 \pm 0,9 \times 10^3$ células.(mgSV)⁻¹ de nitrito oxidantes (van de GRAAF *et al.*, 1996). Calculando-se os valores de NMP.(mgSV)⁻¹ para RI e RII 225 dias, a partir dos valores de NMP.mL⁻¹ das Tabelas 5.4 e 5.5 e dos valores de SSV da Tabela 5.3 (convertidos para mg.L⁻¹), encontrou-se 6×10^4 células.(mgSV)⁻¹ de *Nitrosomonas* e 1×10^1 células.(mgSV)⁻¹ de *Nitrobacter* para RI e 2×10^5 células.(mgSV)⁻¹ de *Nitrosomonas* e 5×10^{-1} células.(mgSV)⁻¹ de *Nitrobacter* para RII.

Pode-se perceber que o número de amônio oxidantes presente nos reatores SBR em estudo é mais elevado do que o encontrado por van de GRAAF *et al.* (1996), por outro lado o número de nitrito oxidantes é bem menor. Esta diferença pode ser devido ao tipo de inóculo utilizado e condições de seletividade empregadas. Neste estudo o inóculo adaptado partiu de um reator nitrificante (sob aeração), que já apresentava inicialmente um número de *Nitrosomonas* em maior proporção do que de *Nitrobacter*. Enquanto os autores citados utilizaram um inóculo de um reator desnitrificante (anaeróbio), sendo a quantificação celular por NMP realizada após enriquecimento da cultura em microrganismos anaeróbios amônio-oxidantes.

A partir dos valores de log do NMP.gSST⁻¹ (Tabelas 5.4 e 5.5) foram construídos os gráficos das Figuras 5.18 e 5.19, os quais permitem uma melhor visualização do desenvolvimento das populações durante o acompanhamento dos reatores RI e RII.

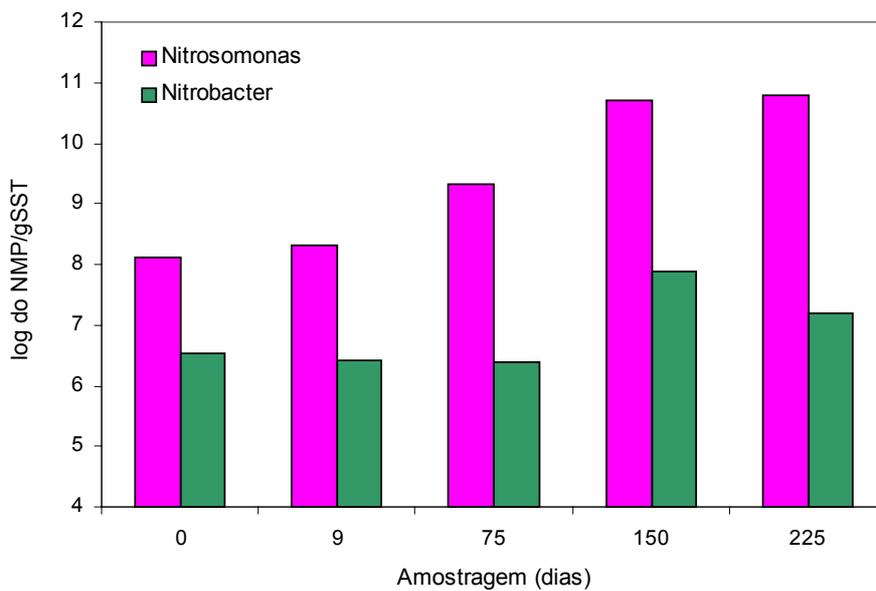


Figura 5.18: Desenvolvimento das populações de *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* durante o acompanhamento do reator RI

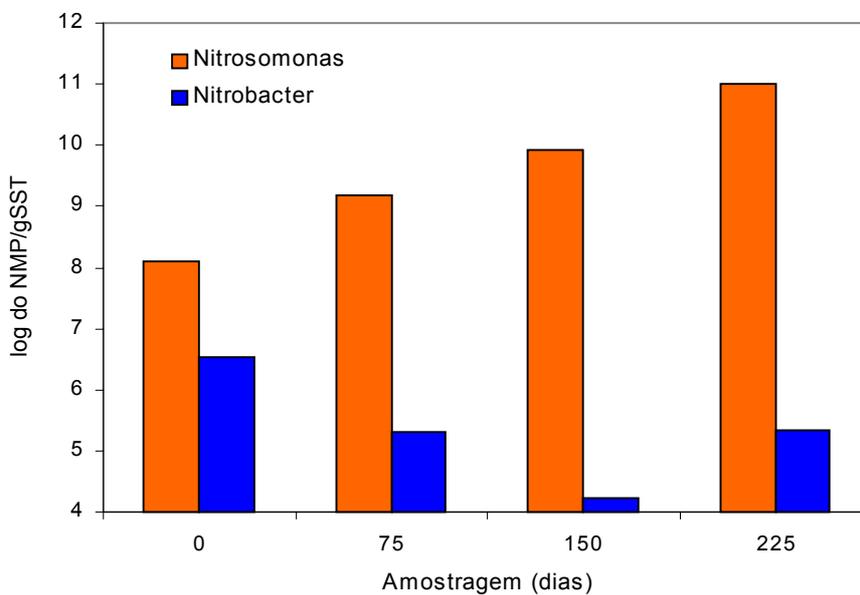


Figura 5.19: Desenvolvimento das populações de *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* durante o acompanhamento do reator RII

Analisando-se a Figura 5.18, pode-se observar um enriquecimento da população de *Nitrosomonas* ao longo dos 225 dias de acompanhamento do reator RI. Com relação a população de *Nitrobacter*, houve alguma diminuição até os 75 dias iniciais, mas aos 150 dias parecem ter se desenvolvido novamente e aumentado em número. Mesmo tendo ainda sofrido alguma diminuição, no final do período de acompanhamento o número estava acima do inicial.

LAANBROEK & GERARDS afirmam que as bactérias nitrito-oxidantes são mais afetadas que as amônio-oxidantes pelas baixas concentrações de oxigênio no meio, devido a apresentarem maiores valores de constante de afinidade pelo oxigênio (K_m). Considerando que o K_m representa o inverso da afinidade, quanto maior o K_m maior é a dificuldade da célula se ligar ao oxigênio para processar a reação. Então, em baixas concentrações de oxigênio, as bactérias nitrito-oxidantes não conseguem competir pelo oxigênio com amônio-oxidantes, sendo esperado um maior desenvolvimento das células de *Nitrosomonas* em relação as *Nitrobacter*, conforme verificado pelo NMP.

Estudando uma cultura mista de *Nitrosomonas europaea* e *Nitrobacter winogradskyi* sob diferentes concentrações de oxigênio, LAANBROEK & GERARDS (1992) encontraram um número de *Nitrosomonas* de aproximadamente $7,5 \times 10^7$ NMP.mL⁻¹ a 0kPa e $1,8 \times 10^8$ NMP.mL⁻¹ a 2kPa ($0,7 \text{mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$), utilizando um TRH de 3 dias. Estes valores são próximos aos resultados apresentados pelos reatores RI e RII para o NMP.mL⁻¹ de *Nitrosomonas*, na amostra de 225 dias (Tabela 5.4 e 5.5). Com relação a *Nitrobacter*, os autores citados verificaram uma maior redução do número em função da diminuição da concentração de oxigênio, tendo sido encontrado $3,2 \times 10^6$ NMP.mL⁻¹ a 0kPa e $1,6 \times 10^8$ NMP.mL⁻¹ a 2kPa, com o mesmo TRH. Apesar do menor TRH utilizado, os valores de NMP.mL⁻¹ de *Nitrobacter* segundo LAANBROEK & GERARDS (1992) estão bem acima do determinado para RI e RII a cada 75 dias de amostragem. O máximo valor encontrado foi de $3,2 \times 10^4$ NMP.mL⁻¹ de *Nitrobacter* para RI 150 dias.

A partir da Figura 5.19, também verifica-se um aumento crescente da população de *Nitrosomonas* no reator RII ao longo do período de 225 dias de acompanhamento. Com relação a população de *Nitrobacter*, percebe-se uma efetiva diminuição da população até 150 dias, ocorrendo um desenvolvimento e aumento do número nos últimos 75 dias de operação do reator RII.

O número mais provável de *Nitrobacter* em 75dias foi maior em RI, apesar da lavagem. Talvez em RII, devido a maior variedade de populações e mais elevada concentração celular, possa ter ocorrido uma maior competição pelo oxigênio que poderia ter entrado no reator, evitando o desenvolvimento das *Nitrobacter*. Já em RI, embora a lavagem tenha efetuado uma seleção prévia, o que é favorável pela diminuição da competição pelo substrato, beneficiando o desenvolvimento de microrganismos específicos, restou uma quantidade de células bastante reduzida. Então, parte do oxigênio que possa ter entrado no reator devido a prováveis vazamentos, mesmo que em baixa concentração, ficou disponível para as *Nitrobacter* possibilitando seu desenvolvimento.

As Tabelas 5.6 e 5.7 apresentam os resultados comparativos entre NMP e FISH, para as amostras equivalentes a 0 (inóculo), 75 e 225dias de operação de RI e RII.

Tabela 5.6: Dados comparativos entre NMP e FISH obtidos para RI

Amostra	NMP.mL ⁻¹	FISH	NMP.mL ⁻¹	FISH	FISH
	<i>Nitrosomonas</i>	Nso1225 (n°.mL ⁻¹)	<i>Nitrobacter</i>	Nit3 (n°.mL ⁻¹)	Amx820 (n°.mL ⁻¹)
0*	2,1x10 ⁵	6,0x10 ⁵	5,1x10 ³	2,0x10 ⁶	< 10 ³
75	9,2x10 ⁵	6,0x10 ⁶	1,1x10 ³	8,0x10 ⁶	< 10 ³
225	1,7x10 ⁷	2,0x10 ⁶	4,0x10 ³	6,0x10 ⁵	6,0x10 ⁵

* Inóculo (lodo nitrificante adaptado)

Tabela 5.7: Dados comparativos entre NMP e FISH obtidos para RII

Amostra	NMP.mL ⁻¹	FISH	NMP.mL ⁻¹	FISH	FISH
	<i>Nitrosomonas</i>	Nso1225 (n°.mL ⁻¹)	<i>Nitrobacter</i>	Nit3 (n°.mL ⁻¹)	Amx820 (n°.mL ⁻¹)
0*	2,1x10 ⁵	6,0x10 ⁵	5,1x10 ³	2,0x10 ⁶	< 10 ³
75	2,2x10 ⁶	<10 ³	3,1x10 ²	<10 ³	< 10 ³
225	1,4x10 ⁸	5,0x10 ⁴	3,2x10 ²	< 10 ³	< 10 ³

* Inóculo (lodo nitrificante adaptado)

Analisando-se os resultados apresentados nas Tabelas 5.6 e 5.7, percebe-se alguma distinção entre os valores determinados por FISH e NMP na maioria das amostras, mas há que se considerar que cada método tem suas limitações e erros. De forma geral as duas técnicas de quantificação revelaram um enriquecimento na população de bactérias amônio-oxidantes em relação a nitrito-oxidantes em ambos os reatores. Vários pesquisadores (ABELIOVICH & VONSHAK, 1992; ZART & BOCK, 1997; SHRESTHA *et al.*, 2000) têm demonstrado um potencial para assimilação de carbono inorgânico pelas *Nitrosomonas*, utilizando outros aceptores de elétrons em substituição ao oxigênio, o que lhes possibilita permanecer viáveis e crescer sob condições anóxicas.

Nos resultados das amostras onde o valor é $<10^3$ (Tabelas 5.6 e 5.7), significa que não foram detectadas células com a sonda empregada, devido a ser este o limite de detecção do método. Portanto, o fato de determinadas bactérias não terem sido identificadas por FISH, não significa que estejam ausentes, mas que a concentração é inferior a 1000 células.mL⁻¹.

Deve-se destacar que no reator RI, na amostra correspondente a 225 dias de operação foi verificada a presença de bactérias anaeróbias amônio-oxidantes (anammox), por hibridização com a sonda Amx820 que detecta as espécies descritas até o momento (*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* e *Brocadia anammoxidans*). A identificação deste grupo de bactérias no reator RI indica fortemente que o consumo concomitante de amônio e nitrito, bem como uma maior remoção específica de nitrogênio, deve ter ocorrido pelo processo anammox.

As condições que podem ter levado ao desenvolvimento de bactérias anammox em RI e as razões para o mesmo não ter ocorrido em RII, parecem estar relacionadas com a partida diferenciada do reator. Os resultados apresentados revelam que a lavagem celular inicial a que foi submetido o reator RI beneficiou de alguma forma, ou acelerou, o desenvolvimento de uma população mais especializada na oxidação aneróbica do amônio, neste caso, as bactérias anammox.

Tanto a determinação por FISH quanto por NMP revelaram uma população dominante de *Nitrosomonas* em relação as *Nitrobacter* nos reatores. Uma vez que bactérias anammox e nitrificantes estão presentes no reator RI, não há como identificar a parcela de contribuição de cada cultura na remoção biológica de nitrogênio que foi verificada. No caso do reator RII, a remoção parece estar sendo proporcionada pelas *Nitrosomonas*, tendo em vista os resultados obtidos.

Segundo SCHIMIDT *et al.* (2002), *Nitrosomonas* podem oxidar amônio na ausência de oxigênio dissolvido, substituindo o O₂ por NO₂. Assim, economizam oxigênio para a reação da monoxigenase, que catalisa a oxidação do amônio a hidroxilamina (ZART & BOCK, 1997). Em ausência de oxigênio, ocorre a indução das enzimas de desnitrificação nitrito redutase, levando o nitrito presente no meio a N₂O e N₂ (SHRESTHA *et al.*, 2000). Considerando que hidroxilamina foi identificada como um importante intermediário na reação anammox (van de GRAAF *et al.*, 1996) e que bactérias nitrificantes sempre estiveram presentes nos reatores anaeróbios amônio-oxidantes estudados até o momento, parece bastante razoável que bactérias anammox e *Nitrosomonas* possam agir em simbiose para efetivar a remoção de nitrogênio em ausência ou limitação de oxigênio.

5.2.4 Cinética de Consumo do Substrato

As Figuras 5.20 e 5.21 expressam graficamente os resultados do ensaio cinético de consumo de substrato conduzido para os reatores RI e RII, após 225 dias de operação.

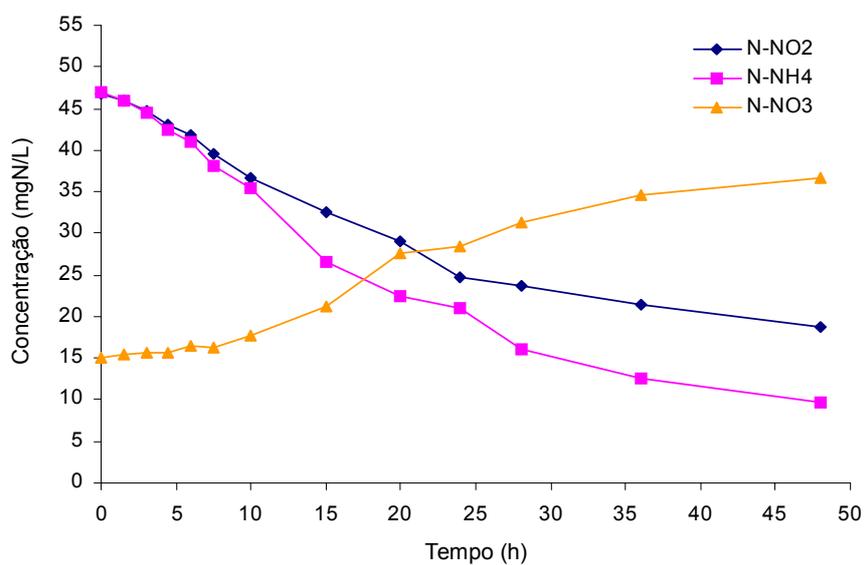


Figura 5.20: Resultados experimentais do ensaio cinético para o reator RI

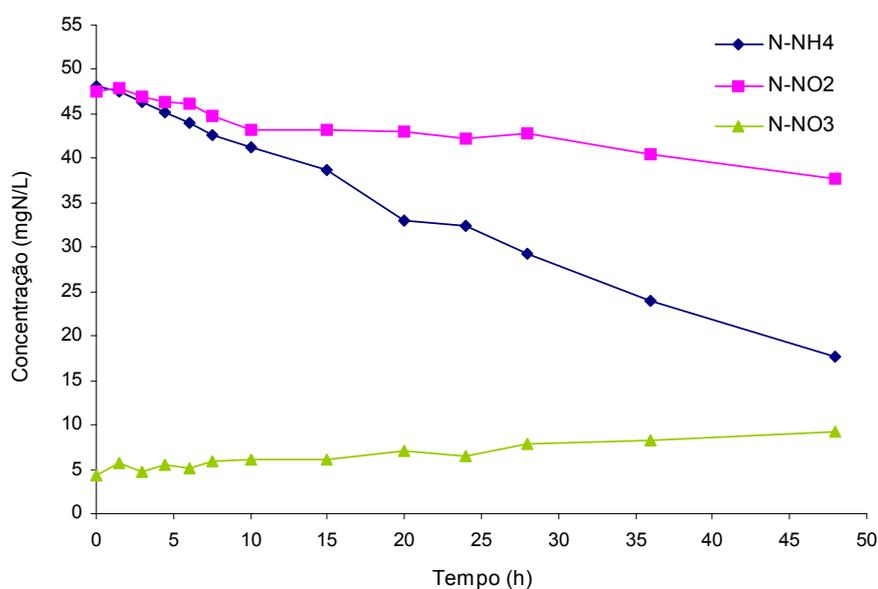


Figura 5.21: Resultados experimentais do ensaio cinético para o reator RII

Analisando-se o gráfico da Figura 5.20, observa-se que o consumo mais acentuado de amônio e nitrito ocorreu no período inicial de 10h, sendo este praticamente equimolar. Neste mesmo período, a concentração de nitrato permaneceu aproximadamente estável e ao redor de $15\text{mgN-NO}_3\cdot\text{L}^{-1}$. A partir deste instante foi observado um maior consumo de amônio em relação ao nitrito e um progressivo aumento da formação de nitrato. Tendo em vista que a análise por FISH identificou a presença de bactérias anammox em RI 225dias, talvez inicialmente se tenha uma ausência de oxigênio mais efetiva devido ao gás hélio borbulhado no reator, favorecendo a ação desta população e ocasionando, assim, maior o consumo de amônio e nitrito.

Após determinado tempo de reação, pode ter ocorrido alguma penetração de oxigênio no reator, devido a algum microvazamento ou devido a própria permeabilidade do sistema, tornando as condições propícias para a oxidação de amônio a nitrito e de nitrito a nitrato, uma vez que foi verificado um aumento acentuado de nitrato após 10h e a análise FISH identificou o mesmo número de *Nitrobacter* em RI 225dias que de anammox. Esta mesma dificuldade, de manter o sistema permanentemente em condições anóxicas, foi encontrada durante todo o período de operação dos reatores, conforme previamente discutido.

Com relação ao reator RII, observa-se um consumo de amônio e nitrito apenas no período inicial de 10h, conforme apresentado no gráfico da Figura 5.21, no qual a concentração de nitrato permaneceu aproximadamente estável e em torno de $5\text{mgN-NO}_3\cdot\text{L}^{-1}$. Devido ao limite de detecção da sonda, não foi identificada a presença de bactérias anammox em RII 225dias pela análise FISH, o que não significa que não estejam presentes, mas não atingiram ainda um suficiente nível de enriquecimento.

A partir do período inicial do ensaio cinético de 10h, passou a haver um maior consumo de amônio em relação ao nitrito. Devido a alguma presença de oxigênio, cujas causas foram anteriormente exemplificadas, pode ter passado a ocorrer uma conversão parcial de amônio a nitrito e, devido a oxidação anaeróbia não ocorrer na mesma proporção de RI, o reator RII apresenta consumo de nitrito quase nulo. Este mesmo comportamento também foi verificado durante a operação do RII, uma vez que os gráficos de acompanhamento mostraram um consumo muito baixo de nitrito. Após 28h, há novamente evidência de consumo de nitrito, com algum aumento na formação de nitrato, embora a níveis muito abaixo do encontrado em RI ao longo de todo o período do ensaio.

As velocidades de consumo de substrato foram determinadas a partir dos valores de inclinação das tangentes das respectivas curvas de concentração de nitrito e amônio, apresentadas nas figuras anteriores. Considerando que há uma variação na inclinação das tangentes em determinados períodos de tempo, calculou-se as velocidades (r_s) e velocidades específicas (μ_s) para 7,5, 24 e 36h, de acordo com as seguintes equações:

$$r_s = -\frac{dS}{dt}$$

$$\mu_s = \frac{1}{X} \left(-\frac{dS}{dt} \right)$$

Sendo: $X = 0,28\text{gSST.L}^{-1}$ para RI e $X = 1,43\text{gSST.L}^{-1}$ para RII.

Os valores encontrados para as velocidades e velocidades específicas, correspondente aos reatores RI e RII, constam nas Tabelas 5.8 e 5.9, respectivamente.

Tabela 5.8: Valores de velocidades de consumo de amônio e nitrito para RI

Tempo (h)	r_{NH_4} (mgN-NH ₄ .L ⁻¹ .h ⁻¹)	r_{NO_2} (mgN-NO ₂ .L ⁻¹ .h ⁻¹)	μ_{NH_4} (mgN-NH ₄ .gSST ⁻¹ .h ⁻¹)	μ_{NO_2} (mgN-NH ₄ .gSST ⁻¹ .h ⁻¹)
7,5	1,23	1,07	4,39	3,82
24	0,81	0,50	2,89	1,79
36	0,32	0,24	1,14	0,86

Tabela 5.9: Valores de velocidades de consumo de amônio e nitrito para RII

Tempo (h)	r_{NH_4} (mgN-NH ₄ .L ⁻¹ .h ⁻¹)	r_{NO_2} (mgN-NO ₂ .L ⁻¹ .h ⁻¹)	μ_{NH_4} (mgN-NH ₄ .gSST ⁻¹ .h ⁻¹)	μ_{NO_2} (mgN-NH ₄ .gSST ⁻¹ .h ⁻¹)
7,5	0,64	0,53	0,45	0,37
24	0,64	0,063	0,45	0,044
36	0,64	0,26	0,45	0,18

STROUS *et al.* (1997), estudando os efeitos das condições aeróbias e microaeróbias na oxidação anaeróbia do amônio, determinaram uma atividade anammox constante no período anaeróbio equivalente a $2\mu\text{mol de NH}_4.(\text{gSSV})^{-1}.\text{min}^{-1}$. Calculando o valor da velocidade de consumo de amônio do reator RI, no tempo de 7,5h (maior valor de velocidade encontrado a partir dos dados experimentais), nas mesmas unidades utilizadas pelos autores, determinou-se uma atividade de $4\mu\text{mol de NH}_4.(\text{gSSV})^{-1}.\text{min}^{-1}$, o dobro da referência citada.

A velocidade de consumo de amônio foi constante para RII, conforme pode ser verificado na Tabela 5.9. As velocidades de consumo de substrato, tanto para amônio quanto para nitrito, de RII são bem menores do que de RI para $t = 7,5\text{h}$. No entanto, a partir de 24h, os valores de velocidade de RI e RII são bastante próximos. Com relação a velocidade específica, esta se manteve inferior em RII em todos os intervalos estudados, atingindo o valor mais elevado no período inicial ($t = 7,5\text{h}$) em RI. Este resultado está de acordo com a argumentação efetuada anteriormente, baseada na remoção específica, de que em RI teria se desenvolvido uma população mais especializada na oxidação anaeróbia do amônio, o que torna-se evidente devido as maiores velocidades específicas de consumo de amônio e nitrito apresentadas.

6. CONCLUSÕES

A adaptação de um lodo proveniente de um sistema de Lodos Ativados propiciou a seleção de microrganismos autotróficos com elevada atividade nitrificante.

A lavagem de células nas condições de temperatura de 35°C e TRH de 5 dias aplicados a um reator RBS, promoveu uma seleção de microrganismos levando a uma redução parcial de oxidadoras de nitrito do gênero *Nitrobacter* e um aumento no número de oxidadoras de amônio do gênero *Nitrosomonas*.

As estratégias diferenciadas de partida dos reatores, RI com lavagem celular inicial e RII sem lavagem inicial, ambos operados com retenção de células, após 225 dias de operação, levaram ao desenvolvimento de floras bacterianas em diferentes proporções e a um desempenho diferenciado em termos de remoção de nitrogênio amoniacal e nitrito, inclusive das possíveis rotas metabólicas seguidas pelos mesmos.

No período de estabilidade, o reator RI apresentou maior eficiência de remoção e maior remoção específica de nitrogênio em relação ao RII e, conseqüentemente, maiores velocidades de consumo de amônio e nitrito. A porcentagem de remoção em RI foi de 30 a 40% e a máxima remoção específica foi de $25\text{mgN} \cdot (\text{gSST})^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, enquanto em RII foi obtido 20% de remoção e uma máxima remoção específica $5\text{mgN} \cdot (\text{gSST})^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, demonstrando que a estratégia de lavagem celular inicial é uma alternativa eficiente quanto ao desenvolvimento de uma população microbiana especializada na oxidação anaeróbia do amônio em um menor tempo de operação.

No reator submetido a lavagem celular inicial foi verificada a presença de bactérias anammox dentre as espécies descritas até o momento, evidenciando um enriquecimento do lodo em biomassa anaeróbia amônio-oxidante e comprovando que é possível alcançar o desenvolvimento de bactérias anammox a partir de um lodo de um sistema de lodos ativados.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Otimizar o sistema operacional dos reatores para assegurar condições anóxicas constantes, de modo a beneficiar a oxidação anaeróbia do amônio e atingir níveis mais elevados de remoção biológica de nitrogênio.
- Buscar uma metodologia para determinação de intermediários da reação de oxidação do amônio em condições anóxicas, específicos para determinada via metabólica, para que se possa avaliar a parcela de contribuição de cada população, *Nitrosomonas* e bactérias anammox.
- Testar a agregação da biomassa em material suporte, como estratégia para uma maior retenção celular, de modo que seja alcançado um enriquecimento mais efetivo e num tempo reduzido.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELIOVICH, A. ; VONSHAK, A.. “Anaerobic Metabolism of *Nitrosomonas europaea*”. Archives of Microbiology. V. 158, pp. 267 – 270. 1992.
- ALEXANDER, M.. “Most probable number method for microbial populations”. In C. A. Black (ed.), Methods of soil analysis, part 2. Chemical and microbiological properties. pp. 1467 – 1472. American Society of Agronomy. Madison, Wis. 1982.
- ALEXANDER, M.; CLARK, F. E.. “Nitrifying bacteria”. In C. A. Black (ed.), Methods of soil analysis, part 2. Chemical and microbiological properties, pp. 1477 – 1483. American Society of Agronomy. Madison, Wis. 1982.
- ANDREWS, J. F.. “A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrate”. Biotechnology and Bioengineering, v. 10, p. 707-723. 1968.
- APHA, AWWA, WEF.. “Standard methods for the examination of water and wastewater”. 19th. edn. American Public Health Association. Washington, DC. 1995.
- BROCK, T. D. & MADIGAN, M.T.. “Biology of Microorganisms”. New Jersey. Prentice Hall. 1994.
- CAMPOS, J. L.; MOSQUERA-CORAL, A.; SÁNCHEZ, M.; MÉNDEZ, R.; LEMA, J. M.; “Nitrification in saline wastewater with high ammonia concentration in an activated sludge unit”. Water Research, 36, pp. 2555-2560. 2002.
- CATALDO, D. A.; HAROON, M.; SCHRADER, L. E.; YOUNGS, V. L. “Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid”. Comum Soil Sci Plant Anal. 6:71-80. 1975.
- EGLI, K.; FANGER, U.; ALVAREZ, P.J.J.; SIEGRIST, H.; VAN DER MEER, J. R.; ZEHNDER, A. J. B.. “Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate”. Archives of Microbiology, 175, pp. 198-207. 2001.

- ETCHEBEHERE, C.; ERRAZQUIN, I.; BARRANDEGUY, E.; DABERT, P. ; MOLETTA, R.; MUXI, L.. "Evaluation of the Denitrifying Microbiota of Anoxic Reactors". FEMS Microbiology Ecology. V. 35, pp. 259 – 265. 2001.
- FUX, C.; BOEHLER, M.; HUBER, P.; BRUNNER, I.; SIEGRIST, H.. "Biological treatment of ammonium-rich wastewater by partial nitrification and subsequent anaerobic ammonium oxidation (anammox) in a pilot plant". Journal of Biotechnology, 99, 295-306. 2002.
- GRAY, N. F.. "Biology of Wastewater Treatment". Oxford University Press. New York, US. 1992.
- GUPTA, A.B.. "*Thiosphaera pantotropha*: a sulphur bacterium capable of simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification". Enzyme and Microbial Technology, 21, pp. 589-595. 1997.
- HAO, X.; HEIJNEN, J. J.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.. "Sensitivity Analysis of a Biofilm Model Describing a One-Stage Completely Autotrophic Nitrogen Removal (CANON) Process". Biotechnology and Bioengineering, Vol. 77, N°3, pp. 266-277. 2002.
- HELMER, C.; KUNST, S.. "Simultaneous nitrification and denitrification in an aerobic biofilm system". Water Science Technology 37(4-5), pp.183-187. 1998.
- HUNIK, J. H.; MEIJER, H. J. G.; TRAMPER, J.. "Kinetics of *Nitrobacter agilis* at extreme substrate, product and salt concentrations". Applied and Microbiology Biotechnology, 40, 442-448. 1993.
- ILIES, P.; MAVINIC, D.S.. "The Effect of Decreased Ambient Temperature on the Biological Nitrification and Denitrification of a High Ammonia Landfill Leachate". Water Research. Britain. Vol. 35, N° 8, pp. 2065-2072. 2001.
- JETTEN, M.S.M.; LOGEMANN, S.; MUYZER, G.; ROBERTSON, L. A.; DE VRIES, S.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; KUENEN, J.G.. "Novel principles in the microbial conversion of nitrogen compounds". Applied Water Management Research (STOWA), 71, pp.75-93. 1997.

JETTEN, M.S.M.; STROUS, M.; VAN DE PAS-SCHOONEN, K.T.; SCHALK, J.; VAN DONGEN, U.G.J.M.; VAN DE GRAAF, A. A.; LOGEMANN, S.; MUYZER, G.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; KUENEN, J.G.. "The anaerobic oxidation of ammonium". FEMS Microbiology Reviews 22, pp. 421-43. 1999.

JETTEN, M. S. M.; VAN DONGEN, L. G. J. M.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.. "The Combined Sharon/Anammox Process". Stowa: Foundation for Applied Water Research. IWA Publishing. London. 2001.

JETTEN, M.S.M.; SLIEKERS, A. O.; THIRD, K. A.; ABMA, W.; KUENEN, J.G.. "CANON and Anammox in a gas-lift reactor". FEMS Microbiology Letters 218, pp. 339-344. 2003.

KUAI, L. & VERSTRAETE, W.. "Ammonium Removal by the Oxygen-Limited Autotrophic Nitrification-Denitrification System". Applied and Environmental Microbiology, p. 4500-4506. 1998.

LAANBROEK, H. J. & GERARDS, S.. "Competition for limiting amounts of oxygen between *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradskyi* grown in mixed cultures". Microbiology, 159, pp. 453-459. 1993.

MULLER, E. B.; STOUTHAMER, A.H.; VAN VERSEVELD, H. W.. "A novel method to determine maximal nitrification rates by sewage sludge at non-inhibitory nitrite concentration applied to determine maximal rates as function of the nitrogen load". Water Research, 29, pp. 1191-1197. 1995.

MULDER, A.; VAN DE GRAAF, A. A.; ROBERTSON, L. A.; KUENEN, J. G.. "Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor". FEMS Microbiology Ecology, 16, pp. 177-184. 1995.

MUXI, L.. "Aspectos Microbiológicos de los Procesos de Nitrificación-Denitrificación". In: Taller y Seminario Latinoamericano Tratamiento Anaeróbico de Aguas Residuales. Anais, p.55-63. Montevideo, Uruguay. 1994.

MUXI, L.; ETCHEBEHERE, C.; ERRAZQUIN, M. I.; DABERT, P.. "Community análisis of a denitrifying reactor treating landfill leachate". FEMS Microbiology Ecology, 40, pp. 97-106. 2002.

- PASSAGLIA, L. M. P.; ZAHA, A.. “Técnicas de DNA Recombinante”. In: “Biologia Molecular Básica”. Série Ciência XXI. Ed. Mercado Aberto. Porto Alegre. 1996.
- PATUREAU, D.; BERNET, N.; DELGENÈS, J. P.; MOLETTA, R.. “Effect of dissolved oxygen and carbon-nitrogen loads on denitrification by an aerobic consortium”. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54, pp. 535-542. 2000.
- PATUREAU, D.; HELLOIN, E.; RUSTRIAN, E.; BOUCHEZ, T.; DELGENÈS, J. P.; MOLETTA, R.. “Combined Phosphate and Nitrogen Removal in a Sequencing Batch Reactor Using the Aerobic Denitrifier, *Microvirgula aerodenitrificans*”. *Water Research*, Vol. 35, N°1, pp. 189-197. 2001.
- PERSSON, F.; WIK, T.; SÖRENSON, F.; HERMANSSON, M.. “Distribution and activity of ammonia oxidizing bacteria in a large full-scale trickling filter”. *Water Research*, 36, pp. 1439-1448. 2002.
- PHILIPS, S. & VERSTRAETE, W.. “Effect of repeated addition of nitrite to semi-continuous activated sludge reactors”. *Bioresource Technology*, 80, pp.73-82. 2001.
- PHILIPS, S.; WYFFELS, S.; SPRENGERS, R.; VERSTRAETE, W.. “Oxygen-limited autotrophic nitrification/denitrification by ammonia oxidisers enables upward motion towards more favourable conditions”. *Applied and Microbiology Biotechnology*, 59, pp. 557-566. 2002.
- POLLICE, A.; TANDOI, V.; LESTINGI, C.. “Influence of aeration and sludge retention time on ammonium oxidation to nitrite and nitrate”. *Water Research*, 36, pp. 2541-2546. 2002.
- POLANCO, F.; POLANCO, M.; FERNANDEZ, N.; URUEÑA, M. A.; GARCIA, P. A.; VILLAVARDE, S.. “New Process for Simultaneous Removal of Nitrogen and Sulphur Under Anaerobic Conditions”. *Water Research*, V. 35, N° 4, pp. 1111-1114. 2001.
- PRATES, K.V.M.C. “Verificação da Produção Biológica de Nitrogênio a Partir de Lodos Anaeróbios Granulados Cultivados em Meio Contendo Nitrogênio Amoniacal e Baixas Concentrações de Compostos Orgânicos”. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo. 1997.

- SÁNCHEZ, M.; MOSQUERA-CORRAL, A.; MÉNDEZ, R.; LEMA, J.M.. "Simple Methods for the Determination of the Denitrifying Activity of Sludges". *Bioresource Technology* 75 pp.1-6. 2000.
- SCHMIDELL, W.. "Agitação e aeração em biorreatores". In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.. "Biotecnologia industrial", Vol. 2, Edgard Blücher Ltda., p. 277-331. 2001.
- SCHMIDT, I.; SLIEKERS, O.; SCHMID, M.; CIRPUS, I.; STROUS, M.; BOCK, E.; KUENEN, J.G.; JETTEN, M.S.M.. "Aerobic and Anaerobic Ammonia Oxidizing Bacteria – Competitors or Natural Partners?". *FEMS Microbiology Ecology* 39, pp. 175-181. 2002.
- SCHMID, M.; TWACHTMANN, U.; KLEIN, M.; STROUS, M.; JURETSCHKO, S.; JETTEN, M.; METZGER, J. W.; SCHLEIFER, K-H.; WAGNER, M.. "Molecular evidence for genus-level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation". *Microbiology*, 23, pp. 93-106. 2000.
- SHRESTHA, N. K.; HADANO, S.; KAMACHI, T.; OKURA, I.. "Conversion of Ammonium to Dinitrogen in Wastewater by *Nitrosomonas europaea*". *Applied Biochemistry and Biotechnology*. V. 90, pp. 221 – 232. 2001.
- SLIEKERS, A. O.; DERWORT, N.; CAMPOS GOMES, J.L.; STROUS, M.; KUENEN, J.G.; JETTEN, M.S.S.. "Completely Autotrophic Nitrogen Removal over Nitrite in one Single Reactor". *Water Research* 36, pp. 2475-2482. 2002.
- STEIN, L. Y. & ARP, D. J.. "Loss of ammonia monooxygenase activity in *Nitrosomonas europaea* upon exposure to nitrite". *Applied Environmental Microbiology*, 64 (10), pp. 4098-4102. 1998.
- STROUS, M.; VAN GERVEN, E.; KUENEN, J.G.; JETTEN, M.. "Effects of Aerobic and Microaerobic Conditions on Anaerobic Ammonium-oxidizing (Anammox) Sludge". *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (6), pp.2446-2448. 1997.
- STROUS, M.; HEIJNEN, J.J.; KUENEN, J.G.; JETTEN, M.S.M.. "The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-

- oxidizing microorganisms". *Applied and Microbiology Biotechnology*, 50, pp. 589-596. 1998.
- STROUS, M.; KUENEN, J.G.; JETTEN, M.S.M.. "Key Physiology of Anaerobic Ammonium Oxidation". *Applied and Environmental Microbiology*, 50, pp. 589-596. 1999.
- STUMM, W.; MORGAN, J.J.. "Aquatic Chemistry Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters". 3ª edição, New York, Wiley Interscience. 1996.
- TEIXEIRA, R. M.; PEREIRA, E. B.; PEREIRA, F. F.; REGINATTO, V. S.; SOARES, H. M.; FURIGO Jr, A. "Remoção de Nitrogênio de Efluentes Agro-industriais Usando Bioreatores". In: XIV Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Natal, RN. 2002.
- TIEDJE, J. M.. "Ecology of Denitrification and Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium". In: ZEHNDER, A. J. B.. "Biology of Anaerobic Microorganisms". New York. John Wiley & Sons. Inc. cap. 4, p. 179-245.
- TOH, S.K.; WEBB, R.I.; ASHBOLT, N.J.. "Enrichment of Autotrophic Anaerobic Ammonium-oxidizing Consortia from Various Wastewaters". *Microbial Ecology*, 43, pp.154-167. 2002.
- VAN DE GRAAF, A. A.; BRUIJN, P.; ROBERTSON, L. A.; JETTEN, M.; KUENEN, J. G.. "Autotrophic Growth of Anaerobic Ammonium-oxidizing Micro-organisms in a Fluidized Bed Reactor". *Microbiology*, 142, pp. 2187-2196. 1996.
- VAN DE GRAAF, A. A.; BRUIJN, P.; ROBERTSON, L. A.; JETTEN, M.; KUENEN, J. G.. "Metabolic Pathway of Anaerobic Ammonium Oxidation on the Basis of ¹⁵N Studies in a Fluidized Bed Reactor". *Microbiology*, 143, pp. 2415-2421. 1997.
- VAN KEMPEN, R.; MULDER, J. W.; UIJTERLINDE, C. A.; LOOSDRECHT, M. C. M.. "Overview: full scale experience of the SHARON® process for treatment of rejection water of digested sludge dewatering". *Water Science and Technology*, Vol. 44, N°1, pp.145-152. IWA Publishing. 2001.
- VAZOLLER, R. F.. "Microbiologia de Lodos Ativados". CETESB. Série Manuais, Secretaria do Meio Ambiente. São Paulo. 1988.

- VERSTRAETE, W.; PHILIPS, S.. "Nitrification-denitrification processes and technologies in new contexts". *Environmental Pollution*, 102, pp.717-72. 1998.
- VIEIRA, E. C.; GAZZINELLI, G.; MARES-GUIA, M.. "Bioquímica Celular e Biologia Molecular". 2ª edição. Editora Atheneu. São Paulo, SP. Brasil. 1991.
- VOGEL, A. I.. "Análise Inorgânica Quantitativa". 4ª edição. Editora Guanabara. Rio de Janeiro. 1981.
- VON SPERLING, M.. "Princípio do Tratamento Biológico de Águas Residuárias – Lodos Ativados". Vol. 4. 2ª edição. Editora FCO. UFMG. Belo Horizonte. Minas Gerais. 2002.
- YE, R.W.; THOMAS, S.M.. "Microbial nitrogen cycles: physiology, genomics and application". *Current Opinion in Microbiology*, 4 pp. 307-312. 2001.
- WOOMER, P. L.. "Most Probable Number Counts". In *Methods of soil analysis, part 2. Chemical and microbiological properties*. 83. American Society of Agronomy, Madison, Wis., pp. 1477 – 14. 1994.
- ZART, D. & BOCK, E.. "High rate of aerobic nitrification and denitrification by *Nitrosomonas eutropha* grown in a fermentor with complete biomass retention in the presence of gaseous NO₂ or NO". *Microbiology*, 169, pp. 282-286. 1998.

ANEXOS E APÊNDICES

ANEXO

Tabela de NMP e limites a 95% de confiança para várias combinações de resultados positivos quando vários números de tubos são usados para diluição (10mL; 1,0mL e 0,1mL)

Combinações de positivos	Tubos por diluição					
	3			5		
	NMP/100mL	Limites 95% Confiança		NMP/100mL	Limites 95% Confiança	
		Inferior	Superior		Inferior	Superior
0-0-0	< 3			< 2		
0-0-1	3	< 0,5	9	2	< 0,5	7
0-1-0	3	< 0,5	13	2	< 0,5	7
0-2-0	-			4	< 0,5	11
1-0-0	4	< 0,5	20	2	< 0,5	7
1-0-1	7	1	21	4	< 0,5	11
1-1-0	7	1	23	4	< 0,5	11
1-1-1	11	3	36	6	< 0,5	15
1-2-0	11	3	36	6	< 0,5	15
2-0-0	9	1	36	5	< 0,5	13
2-0-1	14	3	37	7	1	17
2-1-0	15	3	44	7	1	17
2-1-1	20	7	89	9	2	21
2-2-0	21	4	47	9	2	21
2-2-1	28	10	150	-		
2-3-0	-			12	3	28
3-0-0	23	4	120	8	1	19
3-0-1	39	7	130	11	2	25
3-0-2	64	15	380	-		
3-1-0	43	7	210	11	2	25
3-1-1	75	14	230	14	4	34
3-1-2	120	30	380	-		
3-2-0	93	15	380	14	4	34
3-2-1	150	30	440	17	5	46
3-2-2	210	35	470	-		
3-3-0	240	36	1300	-		
3-3-1	460	71	2400	-		
3-3-2	1100	150	4800	-		
3-3-3	≥ 2400			-		
4-0-0	-			13	3	31
4-0-1	-			17	5	46

Tabela de NMP (continuação)

Combinções de positivos	Tubos por diluição					
	3			5		
	NMP/100mL	Limites 95% Confiança		NMP/100mL	Limites 95% Confiança	
		Inferior	Superior		Inferior	Superior
4-1-0	-			17	5	46
4-1-1	-			21	7	63
4-1-2	-			26	9	78
4-2-0	-			22	7	67
4-2-1	-			26	9	78
4-3-0	-			27	9	80
4-3-1	-			33	11	93
5-0-0	-			23	7	70
5-0-1	-			31	11	89
5-0-2	-			43	15	110
5-1-0	-			33	11	93
5-1-1	-			46	16	120
5-1-2	-			63	21	150
5-2-0	-			49	17	130
5-2-1	-			70	23	170
5-2-2	-			94	28	220
5-3-0	-			79	25	190
5-3-1	-			110	31	250
5-3-2	-			140	37	340
5-3-3	-			180	44	500
5-4-0	-			130	35	300
5-4-1	-			170	43	490
5-4-2	-			220	57	700
5-4-3	-			280	90	850
5-4-4	-			350	120	1000
5-5-0	-			240	68	750
5-5-1	-			350	120	1000
5-5-2	-			540	180	1400
5-5-3	-			920	300	3200
5-5-4	-			1600	640	5800
5-5-5	-			≥ 2400		

Fonte: ALEXANDER & CLARK (1982)

APÊNDICE 1

Dados correspondentes a determinação da atividade nitrificante por Respirometria

S	Q_{O_2X}	Q_{O_2}	μ_{exp}	$\mu_{Andrews}$	$\mu_{Andrews}$
(mg N-NH ₄ /L)	mgO ₂ /L.min	(mgO ₂ /gSST.min)	(mgN-NH ₄ /gSST.d)	(mgO ₂ /gSST.min)	(mgN-NH ₄ /gSST.d)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2,04	0,16	0,10	24,77	0,12	30,33
10,05	0,49	0,31	76,86	0,44	111,33
12,17	0,78	0,49	122,33	0,50	126,07
15,31	0,84	0,52	132,24	0,57	144,54
16,14	1,00	0,62	157,40	0,59	148,86
18,32	1,15	0,72	181,12	0,63	159,23
25,50	1,26	0,79	197,98	0,74	185,67
43,05	1,37	0,85	215,29	0,88	220,89
35,33	1,44	0,90	227,50	0,83	209,00
26,51	1,44	0,90	227,06	0,75	188,64
24,59	1,23	0,77	194,30	0,73	182,86
27,79	1,34	0,84	211,50	0,76	192,18
41,38	1,51	0,95	238,28	0,87	218,67
47,89	1,57	0,98	247,89	0,90	226,39
53,02	1,56	0,98	245,93	0,92	230,99
58,92	1,52	0,95	239,83	0,93	235,03
74,82	1,58	0,99	249,08	0,96	241,22
62,26	1,60	1,00	251,67	0,94	236,83
167,90	1,35	0,84	212,25	0,91	229,96
108,67	1,46	0,91	230,24	0,96	242,18
144,31	1,40	0,87	220,13	0,94	235,76

APÊNDICE 2

Acompanhamento analítico dos reatores durante o período de operação

Acompanhamento do reator RI - Dados de entrada

Dias	Meio	pH	Abs	diluição	Abs	diluição	Abs	diluição	Abs	diluição	Alcalinidade (mL H2SO4)	Concentração (mg/L)			DQO (mg DQO/L)	Alcalinidade (mg CaCO3/L)	Carga (mg N/L.d)
			NH4		NO2		NO3		DQO			N-NH4	N-NO2	N-NO3			
1	i	7,56	0,263	20	0,258	5	0,040	1	0,052	1	2,25	80,80	74,52	4,43	94,93	151,88	31,95
2	1	7,65	0,333	20	0,253	5	0,033	1				111,50	73,13	3,53			37,63
3	1	7,65	0,333	20	0,253	5	0,033	1				111,50	73,13	3,53			37,63
6	3	7,53	0,314	20	0,116	10	0,014	1				103,17	69,69	1,07			34,79
7	3	7,53	0,314	20	0,116	10	0,014	1	0,045	1	3,00	103,17	69,69	1,07	75,61	202,50	34,79
8	4	7,55	0,269	20	0,1215	10	0,000	1				83,43	72,76	0,00			31,24
10	4	7,55	0,269	20	0,1215	10	0,000	1				83,43	72,76	0,00			31,24
11	4	7,55	0,269	20	0,1215	10	0,000	1				83,43	72,76	0,00			31,24
14	5	7,63	0,307	20	0,121	10	0,023	1				99,88	72,48	2,26			34,92
15	5	7,63	0,307	20	0,121	10	0,023	1	0,044	1	3,00	99,88	72,48	2,26	72,85	202,50	34,92
21	6	7,57	0,344	20	0,122	10	0,013	1	0,045	1	3,70	116,32	73,04	0,58	75,61	194,25	37,99
35	8	7,85	0,321	20	0,112	10	0,030	1	0,045	1	3,20	106,24	67,46	3,44	75,61	168,00	35,43
36	8	7,85	0,321	20	0,112	10	0,030	1	0,045	1	3,20	106,24	67,46	3,44	75,61	168,00	35,43
42	8	7,85	0,321	20	0,112	10	0,030	1	0,045	1	3,20	106,24	67,46	3,44	75,61	168,00	35,43
44	9	7,90	0,258	20	0,117	10	0,016	1	0,043	1	4,80	78,61	70,25	1,09	70,09	252,00	29,99
59	11	7,80	0,342	20	0,186	10	0,017	1	0,045	1	4,60	115,44	108,81	1,26	75,61	241,50	45,10
64	12	7,80	0,323	20	0,193	10	0,018	1	0,050	1	4,10	107,11	112,72	1,42	89,41	215,25	44,25
66	12	7,80	0,323	20	0,193	10	0,018	1	0,050	1	4,10	107,11	112,72	1,42	89,41	215,25	44,25
71	13	7,35	0,311	20	0,128	10	0,017	1	0,040	1	4,70	101,85	76,40	1,26	61,81	246,75	35,90
73	13	7,35	0,311	20	0,128	10	0,017	1	0,040	1	4,70	101,85	76,40	1,26	61,81	246,75	35,90
78	14	7,80	0,276	20	0,124	10	0,026	1	0,046	1	4,50	86,50	74,16	2,77	78,37	236,25	32,69
80	14	7,80	0,276	20	0,124	10	0,026	1	0,046	1	4,50	86,50	74,16	2,77	78,37	236,25	32,69
84	15	7,50	0,337	20	0,131	10	0,049	1				113,25	78,07	6,63			39,59
92	15	7,50	0,337	20	0,131	10	0,049	1				113,25	78,07	6,63			39,59
100	17	7,60	0,366	20	0,121	10	0,024	1	0,046	1	4,80	125,97	72,48	2,79	75,06	252,00	40,25
112	17	7,60	0,366	20	0,121	10	0,024	1	0,046	1	4,80	125,97	72,48	2,79	75,06	252,00	40,25
114	18	7,80	0,245	20	0,121	10	0,027	1	0,044	1	4,60	72,91	72,48	3,28	69,60	241,50	29,73

Acompanhamento do reator RI - Dados de entrada (Continuação)

Dias	Meio	pH	Abs		Abs		Abs		Abs		Alcalinidade (mL H2SO4)	Concentração (mg/L)			DQO (mg DQO/L)	Alcalinidade (mg CaCO3/L)	Carga (mg NL.d)
			NH4	diluição	NO2	diluição	NO3	diluição	DQO	diluição		N-NH4	N-NO2	N-NO3			
120	19	7,99	0,265	20	0,123	10	0,024	1	0,045	1	4,2	81,68	73,60	2,79	72,33	220,50	31,61
127	20	7,90	0,303	20	0,123	10	0,034	1	0,051	1	4,4	98,34	73,60	4,42	88,72	231,00	35,27
129	20	7,90	0,303	20	0,123	10	0,034	1	0,051	1	4,4	98,34	73,60	4,42	88,72	231,00	35,27
134	21	7,83	0,266	20	0,115	10	0,075	1	0,049	1	4,6	82,12	69,13	7,69	83,26	241,50	31,79
136	21	7,83	0,266	20	0,115	10	0,075	1	0,049	1	4,6	82,12	69,13	7,69	83,26	241,50	31,79
141	22	7,84	0,240	20	0,121	10	0,031	1	0,054	1	4,5	70,71	72,48	3,24	96,92	236,25	29,29
143	22	7,84	0,240	20	0,121	10	0,031	1	0,054	1	4,5	70,71	72,48	3,24	96,92	236,25	29,29
148	23	7,70	0,419	10	0,244	5	0,045	1				74,61	70,61	4,66			29,98
150	23	7,70	0,419	10	0,244	5	0,045	1				74,61	70,61	4,66			29,98
155	24	7,62	0,418	10	0,249	5	0,030	1	0,043	1	4,0	74,39	72,01	3,14	66,87	210,00	29,91
156	24	7,62	0,418	10	0,249	5	0,030	1	0,043	1	4,0	74,39	72,01	3,14	66,87	210,00	29,91
161	25	7,65	0,440	10	0,248	5	0,036	1	0,048	1	4,4	79,21	71,73	3,75	80,53	231,00	30,94
163	25	7,65	0,440	10	0,248	5	0,036	1	0,048	1	4,4	79,21	71,73	3,75	80,53	231,00	30,94
170	26	7,42	0,501	10	0,256	5	0,019	1				92,59	68,87	2,03			32,70
177	27	7,44	0,490	10	0,258	5	0,031	1				90,17	69,42	3,24			32,57
178	27	7,44	0,490	10	0,258	5	0,031	1				90,17	69,42	3,24			32,57
182	28	7,65	0,434	10	0,267	5	0,032	1	0,049	1	4,0	77,90	71,85	3,34	83,26	210,00	30,62
189	29	7,45	0,416	10	0,268	5	0,029	1				73,95	72,12	3,04			29,82
191	29	7,45	0,416	10	0,268	5	0,029	1				73,95	72,12	3,04			29,82
197	30	7,55	0,419	10	0,269	5	0,028	1				74,61	72,39	4,62			30,32
199	31	7,45	0,413	10	0,263	5	0,017	1	0,046	1	3,8	73,29	70,77	2,70	75,06	199,50	29,35
203	31	7,45	0,413	10	0,263	5	0,017	1	0,046	1	3,8	73,29	70,77	2,70	75,06	199,50	29,35
206	32	7,56	0,416	10	0,266	5	0,025	1	0,055	1	4,4	73,95	71,58	4,09	99,65	231,00	29,92
210	32	7,56	0,416	10	0,266	5	0,025	1	0,055	1	4,4	73,95	71,58	4,09	99,65	231,00	29,92
213	33	7,47	0,423	10	0,268	5	0,015	1				75,48	72,12	2,36			29,99
217	33	7,47	0,423	10	0,268	5	0,015	1				75,48	72,12	2,36			29,99
220	34	7,50	0,411	10	0,264	5	0,012	1	0,045	1	4,3	72,85	71,04	1,83	88,95	225,75	29,14
225	34	7,50	0,411	10	0,264	5	0,012	1	0,045	1	4,3	72,85	71,04	1,83	88,95	225,75	29,14

Acompanhamento do reator RI - Dados de saída

Dias	pH	Abs	diluição	Abs	diluição	Abs	diluição	Abs	diluição	Alcalinidade (mL H2SO4)	Concentração (mg/L)			DQO (mgDQO/L)	Alcalinidade (mg CaCO3/L)	Carga (mg N/L.d)	Eficiência Remoção (%)
		NH4		NO2		NO3		N-NH4			N-NO2	N-NO3					
1	7,42	0,486	10	0,355	5	0,034	1	0,059	1	3,00	89,30	101,63	3,59	114,25	202,50	38,90	-21,76
2	7,55	0,237	20	0,088	10	0,080	1				69,18	53,76	9,58			26,50	29,57
3		0,235	20	0,073	10	0,127	1				68,52	45,66	15,63			25,96	31,01
6	7,24	0,236	20	0,049	10	0,152	1				68,96	32,25	18,85			24,01	30,98
7	8,00	0,207	20	0,047	10	0,163	1	0,055	1	3,30	56,02	31,13	25,78	103,21	222,75	22,59	35,07
8		0,246	20	0,045	10	0,187	1				73,13	29,73	29,81			26,53	15,06
10		0,196	20	0,060	10	0,167	1				51,20	38,12	26,45			23,15	25,88
11	8,05	0,229	20	0,066	10	0,169	1				65,89	41,75	26,79			26,89	13,94
14		0,270	20	0,035	10	0,275	1				83,87	24,14	44,59			30,52	12,61
15	7,58	0,268	20	0,035	10	0,266	1	0,036	1	5,70	82,99	24,14	43,08	50,77	384,75	30,04	13,98
21	7,79	0,261	20	0,055	10	0,155	1	0,035	1	3,80	79,92	35,60	24,44	48,00	199,50	27,99	26,32
35	7,00	0,248	20	0,154	5	0,136	1	0,040	1	2,90	74,22	45,46	21,25			28,19	20,44
36	7,33	0,230	20	0,085	10	0,120	1	0,044	1	3,10	66,33	52,37	18,56			27,45	22,51
42	7,50	0,208	20	0,148	5	0,122	1				56,68	43,79	18,89			23,87	32,61
44	6,74	0,157	20	0,155	5	0,125	1				34,31	45,74	19,40			19,89	33,67
59	7,62	0,258	20	0,198	5	0,254	1				78,61	57,76	41,07			35,49	21,32
64	7,05	0,195	20	0,129	5	0,292	1				50,98	38,48	47,45			27,38	38,12
66	6,89	0,209	20	0,149	5	0,294	1	0,036	1	2,8	57,12	44,07	47,79	50,77	147,00	29,79	32,67
71	7,02	0,202	20	0,119	5	0,343	1				54,05	35,68	56,02			29,15	18,80
73	7,69	0,191	20	0,125	5	0,329	1	0,045	1	2,8	49,22	37,36	53,67	75,61	147,00	28,05	21,87
78	7,67	0,185	20	0,100	5	0,366	1				46,59	30,37	59,88			27,37	16,26
80	7,18	0,190	20	0,104	5	0,335	1	0,050	1	3,2	48,79	31,49	54,67	89,41	168,00	26,99	17,43
84	7,57	0,229	20	0,053	5	0,452	1				65,89	17,24	74,33			31,49	20,46
92	7,08	0,206	20	0,047	5	0,422	1				55,80	15,56	69,29			28,13	28,95
100	8,25	0,266	20	0,072	5	0,441	1	0,031	1	2,6	82,12	22,55	70,70	34,08	136,50	35,07	12,86
112	8,12	0,299	20	0,042	5	0,394	1	0,030	1	3,2	96,59	14,17	63,04	31,35	168,00	34,76	13,64
114	7,90	0,193	20	0,074	5	0,308	1				50,10	23,11	49,04			24,45	17,77

Acompanhamento do reator RI - Dados de saída (Continuação)

Dias	pH	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Alcalinidade	Concentração (mg/L)			DQO	Alcalinidade	Carga	Eficiência	
		NH4								N-NH4	N-NO2	N-NO3					(mgDQO/L)
120	7,86	0,232	20	0,104	5	0,244	1	0,037	1	3,5	67,21	31,49	38,62	50,48	183,75	27,46	13,13
127	7,89	0,265	20	0,133	5	0,193	1	0,039	1	3,9	81,68	39,60	30,31	55,94	204,75	30,32	14,05
129	8,14	0,236	20	0,153	5	0,283	1				68,96	45,18	28,71			28,57	19,00
134	7,96	0,196	20	0,136	5	0,276	1	0,038	1	3,6	51,42	40,43	28,01	53,21	189,00	23,97	24,59
136	7,45	0,166	20	0,129	5	0,248	1				38,26	38,48	25,18			20,38	35,88
141	7,99	0,417	5	0,134	5	0,289	1				37,08	39,87	29,32			21,26	27,43
143	7,66	0,411	5	0,128	5	0,252	1	0,040	1	3,2	36,43	38,20	25,58	58,67	168,00	20,04	31,57
148	7,65	0,233	10	0,139	5	0,264	1				33,82	41,27	26,79			20,38	32,02
150	7,61	0,260	10	0,144	5	0,226	1				39,74	42,67	22,95			21,07	29,70
155	7,75	0,222	10	0,128	5	0,219	1	0,038	1	2,9	31,41	38,20	22,24	53,21	152,25	18,37	38,58
156	7,74	0,240	10	0,125	5	0,220	1				35,36	37,36	22,35			19,01	36,43
161	7,61	0,240	10	0,107	5	0,296	1				35,36	32,33	30,03			19,54	36,83
163	7,95	0,236	10	0,126	5	0,249	1	0,040	1	3,2	34,48	33,77	25,28	58,67	168,00	18,71	39,54
170	7,92	0,318	10	0,146	5	0,182	1				52,46	39,17	18,51			22,03	32,64
177	8,02	0,296	10	0,073	5	0,363	1				47,64	19,46	36,80			20,78	36,20
178	7,62	0,265	10	0,095	5	0,328	1				40,84	25,40	33,26			19,90	38,90
182	7,93	0,246	10	0,108	5	0,286	1	0,037	1	3,0	36,67	28,91	29,02			18,92	38,21
189	7,38	0,208	10	0,126	5	0,243	1				28,34	33,77	24,67			17,36	41,80
191	7,68	0,218	10	0,167	5	0,152	1				30,53	44,84	15,47			18,17	39,07
197	7,92	0,215	10	0,155	5	0,170	1				29,87	41,60	29,31			20,16	33,52
199	8,16	0,228	10	0,167	5	0,147	1	0,042	1	3,8	32,73	44,84	25,31	64,14	199,50	20,58	29,90
203	7,70	0,221	10	0,155	5	0,175	1				31,19	41,60	30,18			20,59	29,84
206	7,82	0,212	10	0,165	5	0,161	1	0,048	1	3,5	29,22	44,30	27,75	80,53	183,75	20,25	32,32
210	7,88	0,235	10	0,145	5	0,177	1				34,26	38,90	30,53			20,74	30,70
213	7,97	0,238	10	0,150	5	0,183	1				34,92	40,25	31,57			21,35	28,82
217	7,88	0,231	10	0,144	5	0,180	1				33,38	38,63	31,05			20,61	31,27
220	7,47	0,219	10	0,153	5	0,178	1				30,75	41,06	30,70			20,50	29,65
225	7,65	0,216	10	0,157	5	0,168	1	0,038	1	2,0	30,09	42,14	28,96	68,64	105,00	20,24	30,55

Acompanhamento do reator RII - Dados de entrada

Dias	Meio	pH	Abs		Abs		Abs		Abs		Alcalinidade (mL H2SO4)	Concentração (mg/L)			DQO (mg DQO/L)	Alcalinidade (mg CaCO3/L)	Carga (mg N/L.d)
			NH4	diluição	NO2	diluição	NO3	diluição	DQO	diluição		N-NH4	N-NO2	N-NO3			
1	i	7,65	0,180	20	0,101	10	0,019	1	0,052	1	2,2	44,40	61,31	1,59	94,93	115,50	19,47
2	6	7,57	0,344	20	0,122	10	0,013	1	0,045	1	3,7	116,32	73,04	0,58	75,61	194,25	37,99
3	6	7,57	0,344	20	0,122	10	0,013	1	0,045	1	3,7	116,32	73,04	0,58	75,61	194,25	37,99
15	8	7,85	0,321	20	0,112	10	0,030	1	0,045	1	3,2	106,24	67,46	3,44	75,61	168,00	35,43
16	8	7,85	0,321	20	0,112	10	0,030	1	0,045	1	3,2	106,24	67,46	3,44	75,61	168,00	35,43
22	8	7,85	0,321	20	0,112	10	0,030	1	0,045	1	3,2	106,24	67,46	3,44	75,61	168,00	35,43
24	9	7,90	0,258	20	0,117	10	0,016	1	0,043	1	4,8	78,61	70,25	1,09	70,09	252,00	29,99
29	9	7,90	0,258	20	0,117	10	0,016	1	0,043	1	4,8	78,61	70,25	1,09	70,09	252,00	29,99
39	11	7,80	0,342	20	0,186	10	0,017	1	0,045	1	4,6	115,44	108,81	1,26	75,61	241,50	45,10
44	12	7,80	0,323	20	0,193	10	0,018	1	0,050	1	4,1	107,11	112,72	1,42	89,41	215,25	44,25
46	12	7,80	0,323	20	0,193	10	0,018	1	0,050	1	4,1	107,11	112,72	1,42	89,41	215,25	44,25
51	13	7,35	0,311	20	0,128	10	0,017	1	0,040	1	4,7	101,85	76,40	1,26	61,81	246,75	35,90
53	13	7,35	0,311	20	0,128	10	0,017	1	0,040	1	4,7	101,85	76,40	1,26	61,81	246,75	35,90
58	14	7,80	0,276	20	0,124	10	0,026	1	0,046	1	4,5	86,50	74,16	2,77	78,37	236,25	32,69
60	14	7,80	0,276	20	0,124	10	0,026	1	0,046	1	4,5	86,50	74,16	2,77	78,37	236,25	32,69
64	15	7,50	0,337	20	0,131	10	0,049	1				113,25	78,07	6,63			39,59
72	15	7,50	0,337	20	0,131	10	0,049	1				113,25	78,07	6,63			39,59
74	16	7,86	0,315	20	0,173	10	0,028	1	0,050	1	4,6	103,60	101,55	3,10	89,41	241,50	41,65
80	17	7,60	0,366	20	0,121	10	0,024	1	0,046	1	4,8	125,97	72,48	2,79	75,06	252,00	40,25
92	17	7,60	0,366	20	0,121	10	0,024	1	0,046	1	4,8	125,97	72,48	2,79	75,06	252,00	40,25
107	20	7,90	0,303	20	0,123	10	0,034	1	0,051	1	4,4	98,34	73,60	4,42	88,72	231,00	35,27
109	20	7,90	0,303	20	0,123	10	0,034	1	0,051	1	4,4	98,34	73,60	4,42	88,72	231,00	35,27
114	21	7,83	0,266	20	0,115	10	0,075	1	0,049	1	4,6	82,12	69,13	7,69	83,26	241,50	31,79
116	21	7,83	0,266	20	0,115	10	0,075	1	0,049	1	4,6	82,12	69,13	7,69	83,26	241,50	31,79
121	22	7,84	0,240	20	0,121	10	0,031	1	0,054	1	4,5	70,71	72,48	3,24	96,92	236,25	29,29
123	22	7,84	0,240	20	0,121	10	0,031	1	0,054	1	4,5	70,71	72,48	3,24	96,92	236,25	29,29
128	23	7,70	0,419	10	0,244	5	0,045	1				74,61	70,61	4,66			29,98

Acompanhamento do reator RII - Dados de entrada (Continuação)

Dias	Meio	pH	Abs		Abs		Abs		Abs		Alcalinidade (mL H2SO4)	Concentração (mg/L)			DQO (mg DQO/L)	Alcalinidade (mg CaCO3/L)	Carga (mg N/L.d)
			NH4	diluição	NO2	diluição	NO3	diluição	DQO	diluição		N-NH4	N-NO2	N-NO3			
130	23	7,70	0,419	10	0,244	5	0,045	1				74,61	70,61	4,66			29,98
135	24	7,62	0,418	10	0,249	5	0,030	1	0,043	1	4,0	74,39	72,01	3,14	66,87	210,00	29,91
136	24	7,62	0,418	10	0,249	5	0,030	1	0,043	1	4,0	74,39	72,01	3,14	66,87	210,00	29,91
141	25	7,65	0,440	10	0,248	5	0,036	1	0,048	1	4,4	79,21	71,73	3,75	80,53	231,00	30,94
143	25	7,65	0,440	10	0,248	5	0,036	1	0,048	1	4,4	79,21	71,73	3,75	80,53	231,00	30,94
149	26	7,42	0,501	10	0,256	5	0,019	1				92,59	68,87	2,03			32,70
150	26	7,42	0,501	10	0,256	5	0,019	1				92,59	68,87	2,03			32,70
157	27	7,44	0,490	10	0,258	5	0,031	1				90,17	69,42	3,24			32,57
158	27	7,44	0,490	10	0,258	5	0,031	1				90,17	69,42	3,24			32,57
162	28	7,65	0,434	10	0,267	5	0,032	1	0,049	1	4,0	77,90	71,85	3,34	83,26	210,00	30,62
169	29	7,45	0,416	10	0,268	5	0,029	1				73,95	72,12	3,04			29,82
171	29	7,45	0,416	10	0,268	5	0,029	1				73,95	72,12	3,04			29,82
177	30	7,55	0,419	10	0,269	5	0,028	1				74,61	72,39	4,62			30,32
179	31	7,45	0,413	10	0,263	5	0,017	1	0,046	1	3,8	73,29	70,77	2,70	75,06	199,50	29,35
183	31	7,45	0,413	10	0,263	5	0,017	1	0,046	1	3,8	73,29	70,77	2,70	75,06	199,50	29,35
186	32	7,56	0,416	10	0,266	5	0,025	1	0,055	1	4,4	73,95	71,58	4,09	99,65	231,00	29,92
190	32	7,56	0,416	10	0,266	5	0,025	1	0,055	1	4,4	73,95	71,58	4,09	99,65	231,00	29,92
193	33	7,47	0,423	10	0,268	5	0,015	1				75,48	72,12	2,36			29,99
197	33	7,47	0,423	10	0,268	5	0,015	1				75,48	72,12	2,36			29,99
200	34	7,50	0,411	10	0,264	5	0,012	1	0,045	1	4,3	72,85	71,04	1,83	88,95	225,75	29,14
206	34	7,50	0,411	10	0,264	5	0,012	1	0,045	1	4,3	72,85	71,04	1,83	88,95	225,75	29,14
211	35	7,60	0,414	10	0,266	5	0,014	1				73,51	71,58	2,18			29,45
219	36	7,25	0,412	10	0,263	5	0,023	1				73,07	70,77	3,75			29,52
225	37	7,30	0,415	10	0,264	5	0,021	1	0,046	1	4,2	73,73	71,04	3,40	91,85	220,50	29,63

Acompanhamento do reator RII - Dados de saída

Dias	pH	Abs	diluição	Abs	diluição	Abs	diluição	Abs	diluição	Alcalinidade (mL H2SO4)	Concentração (mg/L)			DQO (mgDQO/L)	Alcalinidade (mg CaCO3/L)	Carga (mg N/L.d)	Eficiência Remoção (%)
		NH4		NO2		NO3		N-NH4			N-NO2	N-NO3					
1	7,58	0,165	20	0,105	10	0,012	1	0,059	1	2,2	37,82	63,54	0,42	114,25	115,50	20,36	-4,55
2	7,65	0,176	20	0,202	5	0,018	1				42,65	58,88	1,42			20,59	45,80
3	7,63	0,175	20	0,188	5	0,016	1				43,96	54,96	1,09			20,00	47,35
15	7,03	0,217	20	0,195	5	0,036	1	0,050	1	2,8	62,38	56,92	4,45	89,41	147,00	24,75	30,14
16	7,28	0,201	20	0,090	10	0,037	1	0,053	1	3,8	55,36	55,16	4,62	97,69	199,50	23,03	35,00
22	7,83	0,198	20	0,086	5	0,003	1				54,05	26,46	0,00			16,10	54,55
24	6,78	0,200	20	0,119	5	0,039	1				54,93	35,68	4,95			19,11	36,27
29	6,83	0,204	20	0,150	5	0,049	1	0,052	1	4,9	56,68	44,35	6,63	94,93	257,25	21,53	28,20
39	7,04	0,190	20	0,315	5	0,054	1				50,54	90,45	7,47			29,69	34,17
44	6,98	0,139	20	0,295	5	0,048	1				28,18	84,86	6,46			23,90	45,99
46	6,66	0,167	20	0,301	5	0,059	1	0,051	1	1,7	40,45	86,54	8,31	92,17	89,25	27,06	38,85
51	6,85	0,151	20	0,313	5	0,065	1				33,44	89,89	9,32			26,53	26,10
53	7,48	0,164	20	0,300	5	0,069	1	0,065	1	2,0	39,14	86,26	9,99	130,81	105,00	27,08	24,58
58	7,20	0,155	20	0,296	5	0,130	1				35,19	85,14	20,24			28,11	13,99
60	7,23	0,162	20	0,276	5	0,099	1	0,066	1	2,9	38,26	79,55	15,03	133,57	152,25	26,57	18,71
64	7,05	0,122	20	0,312	5	0,144	1				20,72	89,61	22,59			26,58	32,85
72	7,70	0,167	20	0,273	5	0,278	1				40,45	78,72	45,10			32,85	17,02
74	7,15	0,200	20	0,260	5	0,211	1	0,055	1	1,8	54,93	75,08	33,84	103,21	94,50	32,77	21,32
80	7,47	0,209	20	0,265	5	0,212	1	0,055	1	1,5	58,87	76,48	33,41	99,65	78,75	33,75	16,14
92	8,20	0,241	20	0,199	5	0,209	1	0,048	1	2,4	72,91	58,04	32,92	80,53	126,00	32,77	18,58
107	7,87	0,278	20	0,221	5	0,059	1	0,046	1	3,9	89,13	64,18	8,49	75,06	204,75	32,36	8,25
109	8,08	0,208	20	0,222	5	0,107	1				58,43	64,46	10,92			26,76	24,12
114	7,86	0,199	20	0,218	5	0,072	1	0,049	1	3,9	54,49	63,35	7,39	83,26	204,75	25,04	21,21
116	7,72	0,187	20	0,209	5	0,055	1				49,22	60,83	5,67			23,15	27,19
121	7,70	0,438	5	0,224	5	0,063	1				39,82	65,02	6,48			22,27	23,98
123	8,09	0,451	5	0,225	5	0,057	1	0,040	1	3,3	41,25	65,30	5,87	58,67	173,25	22,48	23,23
128	7,75	0,311	10	0,232	5	0,051	1				51,80	67,26	5,27			24,87	17,05

Acompanhamento do reator RII - Dados de saída (Continuação)

Dias	pH	Abs	diluição	Abs	diluição	Abs	diluição	Abs	diluição	Alcalinidade (mL H2SO4)	Concentração (mg/L)			DQO (mgDQO/L)	Alcalinidade (mg CaCO3/L)	Carga (mg N/L.d)	Eficiência Remoção (%)
		NH4		NO2		NO3		DQO			N-NH4	N-NO2	N-NO3				
130	7,80	0,316	10	0,220	5	0,045	1				52,90	63,91	4,66			24,29	18,96
135	7,70	0,356	10	0,240	5	0,047	1	0,047	1	3,2	61,67	69,49	4,86	77,80	168,00	27,20	9,04
136	7,61	0,347	10	0,235	5	0,052	1				59,70	68,10	5,37			26,63	10,95
141	7,52	0,356	10	0,235	5	0,037	1				61,67	68,10	3,85			26,72	13,62
143	8,06	0,342	10	0,224	5	0,034	1	0,048	1	3,5	58,60	60,23	3,55	80,53	183,75	24,48	20,89
149	8,17	0,413	10	0,239	5	0,043	1				74,17	64,28	4,46			28,58	12,59
150	7,51	0,410	10	0,224	5	0,049	1				73,51	60,23	5,06			27,76	15,10
157	7,81	0,369	10	0,257	5	0,080	1				64,52	69,15	8,20			28,37	12,88
158	7,30	0,295	10	0,289	5	0,067	1				48,29	77,79	6,88			26,59	18,34
162	7,72	0,319	10	0,258	5	0,042	1	0,045	1	3,1	53,56	69,42	4,36	72,33	162,75	25,47	16,83
169	7,50	0,308	10	0,234	5	0,057	1				51,14	62,93	5,87			23,99	19,55
171	7,82	0,293	10	0,236	5	0,053	1				47,86	63,47	5,47			23,36	21,67
177	7,87	0,282	10	0,251	5	0,049	1				45,44	67,52	8,09			24,21	20,15
179	8,15	0,282	10	0,238	5	0,044	1	0,042	1	3,9	45,44	64,01	7,23	64,14	204,75	23,34	20,49
183	7,89	0,255	10	0,243	5	0,040	1				39,52	65,36	6,53			22,28	24,08
186	7,58	0,254	10	0,249	5	0,044	1	0,049	1	3,6	39,30	66,98	7,23	83,26	189,00	22,70	24,13
190	7,92	0,270	10	0,242	5	0,034	1				42,81	65,09	5,49			22,68	24,21
193	7,90	0,278	10	0,244	5	0,049	1				44,57	65,63	8,09			23,66	21,11
197	7,48	0,276	10	0,252	5	0,046	1				44,13	67,79	7,57			23,90	20,31
200	7,37	0,278	10	0,245	5	0,040	1				44,57	65,90	6,53			23,40	19,71
206	7,56	0,277	10	0,253	5	0,031	1	0,045	1	2,1	44,35	68,06	4,96	88,95	110,25	23,48	19,45
211	7,65	0,275	10	0,248	5	0,036	1				43,91	66,71	5,83			23,29	20,92
219	7,83	0,283	10	0,247	5	0,040	1				45,66	66,44	6,53			23,73	19,61
225	7,59	0,285	10	0,246	5	0,040	1	0,046	1	2,0	46,10	66,17	6,53	91,85	105,00	23,76	19,81