



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

**DESENVOLVIMENTO DE UMA FLORA DE
MICRORGANISMOS OXIDADORES ANAERÓBIOS DE
AMÔNIA UTILIZANDO INÓCULOS PROVENIENTES DE
DEJETO DE SUÍNO**

GUILHERME FRANCISCO SCHIERHOLT NETO

Prof. PhD. Hugo Moreira Soares

ORIENTADOR

Prof. Dr. Airton Kunz

CO-ORIENTADOR

Florianópolis, 2007

Guilherme Francisco Schierholt Neto

**DESENVOLVIMENTO DE UMA FLORA DE
MICRORGANISMOS OXIDADORES ANAERÓBIOS DE
AMÔNIA UTILIZANDO INÓCULOS PROVENIENTES DE
DEJETO DE SUÍNO**

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-ORIENTADOR: Prof. Dr. Airton Kunz

Florianópolis,

Fevereiro de 2007

Guilherme Francisco Schierholt Neto

Dissertação submetida ao corpo docente do programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de

MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Aprovado por:

Prof. WILLIBALDO SCHMIDELL NETTO, Dr.

Prof. VALERIA REGINATTO SPILLER, Dr.

Prof. AIRTON KUNZ, Dr.

Prof. AGENOR FURIGO JÚNIOR, Dr.
(Coordenador)

Prof. HUGO MOREIRA SOARES, Dr.
(Orientador)

Florianópolis, SC – Brasil

Fevereiro/2007

“Quanto mais difícil a Batalha,
Melhores são os louros da conquista.”

AGRADECIMENTOS

A Deus, todo poderoso, por toda graça, força e sabedoria para passar pelos momentos de dificuldade e por me abençoar nesta trajetória.

Aos meus pais e minha irmã, por me encorajarem a fazer este mestrado e por toda sua ajuda, conselhos e palavras de sabedoria.

A Eliane, por todo seu amor, carinho, amizade e dedicação. Por todas as experiências divididas e conquistadas comigo, na pesquisa e na vida.

Ao professor Hugo e ao pesquisador Airton, pela oportunidade de realização deste trabalho, pela paciência, pelos conselhos e, principalmente, por todos os ensinamentos e experiências compartilhadas.

Aos colegas de mestrado que me incentivaram e ajudaram durante as disciplinas. E, principalmente, aos grandes amigos: Marcelo, Ronnis, Polenta, Sangóí, Carmo, Ricardo, Vivan, Suzana, Irede, Laerte, Fabi, Anildo e Rose por toda sua amizade, pelas alegrias e pela ajuda na realização dos experimentos.

Ao professor Agenor e ao Edevilson, pela atenção e cordialidade com que sempre me atenderam na Universidade. A professora Regina e sua equipe pelas análises de FISH e PCR.

Ao departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina e a Embrapa Suínos e Aves, pelos recursos disponibilizados para a realização deste trabalho.

A Embrapa Suínos e Aves, pela concessão da bolsa que tornou viável este trabalho.

Aos membros da banca examinadora, pela atenção e sugestões realizadas.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivo geral	4
2.2. Objetivos específicos	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. O dejetos de suíno	5
3.2. O problema ambiental do nitrogênio	8
3.3. Processos de remoção de nitrogênio	11
3.3.1. Processo de nitrificação e desnitrificação convencional	11
3.3.2. Sistemas de nitrificação e desnitrificação	13
3.3.3. Processo de oxidação anaeróbia de amônia (ANAMMOX)	15
3.3.4. Sistema de reator único para processo de conversão de altas concentrações de amônia em nitrito (SHARON)	21
3.3.5. Remoção autotrófica completa de nitrogênio via nitrito (CANON)	23
3.3.6. Vantagens e desvantagens dos processos	25
3.5. Técnicas de caracterização microbiológica	28
3.5.1. FISH (Hibridização Fluorescente “ <i>In Situ</i> ”)	28
3.5.2. PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1. Sistema de Tratamento	31
4.2. Inóculos	34
4.2.1. Origem	34
4.2.2. Aclimação	36
4.2.3. Inoculação	36

4.3. Meio de cultura.....	37
4.4. Controle.....	38
4.4.1. Progressão de carga.....	38
4.4.2. Obtenção dos coeficientes estequiométricos.....	40
4.5. Métodos analíticos.....	41
4.5.1. Nitrito.....	41
4.5.2. Nitrato.....	42
4.5.3. Amônia.....	43
4.5.4. Alcalinidade total.....	44
4.6. Caracterização Microbiológica.....	45
4.6.1. FISH.....	45
4.6.2. PCR.....	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1. Aclimação dos inóculos.....	49
5.2. Remoção de compostos nitrogenados.....	49
5.2.1 Reator RBA.....	52
5.2.2 Reator UD.....	54
5.2.3 Comparativo entre os reatores RBA e UD.....	58
5.3. Obtenção dos coeficientes estequiométricos.....	61
5.4 Análises microbiológicas.....	67
5.4.1 Análises de FISH.....	67
5.4.2 Análises de PCR.....	72
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES.....	76
7. SUJESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	77
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
ANEXO.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Quantidade de dejetos gerada por animal por fase de produção.	6
Tabela 3.2: Composição química média dos dejetos de suínos observada por diferentes autores.....	6
Tabela 3.3: Parâmetros para oxidação aeróbia e anaeróbia da amônia.	25
Tabela 3.4: Comparação dos novos processos de remoção de nitrogênio e o sistema de nitrificação e desnitrificação convencionais.....	26
Tabela 3.5: Comparação do consumo de alcalinidade e oxigênio dissolvido de diferentes processos de remoção de nitrogênio.....	27
Tabela 4.1: Resumo das características do reator e periféricos.....	33
Tabela 4.2: Composição e concentração da solução de macroatmentos.	37
Tabela 4.3: Composição e concentração da solução de microatmentos.....	38
Tabela 4.4: Informações sobre as sondas de FISH utilizadas. Todas as sondas são seqüências homologas a um fragmento do RNAr 16S dos microrganismos alvos.	46
Tabela 4.5: Configuração do termociclador para análise de PCR.....	48
Tabela 5.1: Progressão de carga para o reator RBA.....	50
Tabela 5.2: Progressão de carga para o reator UD.....	51
Tabela 5.3: Resumo com a carga máxima removida por cada um dos reatores.....	60
Tabela 5.4: Resumo dos coeficientes estequiométricos encontrados no período entre os dias 82 e 245 para o Reator RBA, entre os dias 100 e 266 para o Reator UD, em comparação com os encontrados na literatura.....	66
Tabela 5.5: Estimativa da abundância dos microrganismos presentes nas amostras compostas retiradas do reator UD no 250º dia de acompanhamento.....	69
Tabela 5.6: Estimativa da abundância dos microrganismos presentes nas amostras retiradas de diferentes locais do reator UD ao final do período de observação.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Representação esquemática da planta de tratamento de dejetos de suínos da Embrapa Suínos e Aves de Concórdia/ SC.	8
Figura 3.2: Porcentagem de amônia livre em relação ao pH (METCALF & EDDY, 2003).....	9
Figura 3.3: Faixas de transição e regiões de inibição de organismos nitrificantes por amônia livre e ácido nitroso, conforme a variação das suas concentrações e valores de pH (adaptado de ANTONISEN et al, 1976).....	12
Figura 3.4: Sequência de desnitrificação com nitrato como acceptor final de elétrons e o respectivo estado de oxidação do nitrogênio.....	13
Figura 3.5: Esquema simplificado de nitrificação e desnitrificação ocorrendo em reatores separados.....	14
Figura 3.6: Esquema simplificado de nitrificação e desnitrificação no mesmo reator sob operação em SBR.	14
Figura 3.7: Relação filogenética da bactéria anammox em comparação com bactérias aeróbias oxidadoras de amônia. A linha horizontal representa 10% de mudança na sequência de genes 16 S rRNA (adaptado de JETTEN, 2005).	16
Figura 3.8: Rota bioquímica de reação de ANAMMOX. (a) Representação simplificada do organismo, evidenciando o tamanho da anammoxosome. Esta é a organela responsável pela geração de energia na célula. (b) A membrana da anammoxosome, que consiste de uma bicamada lipídica identificada por DAMSTE (2002) e, o caminho da reação Anammox (adaptado de AHN,2006).	17
Figura 3.9: Representação esquemática dos ciclos do nitrogênio, envolvendo as diferentes formas nitrogenadas dos processos de nitrificação/ desnitrificação convencional e ANAMMOX (adaptado de AHN, 2006).....	19
Figura 3.10: Representação esquemática da aplicação de um sistema SHARON como pré tratamento de um reator ANAMMOX.	22

Figura 3.11: Representação esquemática de um Agregado em um reator utilizando o processo CANON.....	24
Figura 4.1: Disposição dos reatores e seus periféricos.....	31
Figura 4.2: Reatores de vidro com material suporte de PVC e fluxo ascendente.	32
Figura 4.3: Coleta do lodo que serviu de inóculo para o Reator UD.	35
Figura 4.4: Vista superior do reator biológico aerado e ao centro o decantador secundário, fonte do inóculo para o Reator RBA.	35
Figura 5.1: Evolução das concentrações de entrada e saída da diferentes formas nitrogenadas no reator RBA.	52
Figura 5.2: Evolução da carga removida em função do tempo no Reator RBA.	54
Figura 5.3: Evolução das concentrações de entrada e saída da diferentes formas nitrogenadas no reator UD.....	55
Figura 5.4: Evolução da carga removida em função do tempo no Reator UD.....	58
Figura 5.5: Evolução da eficiência de remoção de nitrogênio nos Reatores UD e RBA.....	59
Figura 5.6: Evolução das cargas de nitrogênio alimentada e removida pelos Reatores UD e RBA.	60
Figura 5.7: Relação entre a remoção de Amônia e a Remoção de alcalinidade para o Reator RBA.	61
Figura 5.8: Relação entre a remoção de Amônia e a Remoção de alcalinidade para o Reator UD.....	62
Figura 5.9: Evolução dos coeficientes estequiométricos para Nitrito e Nitrato em relação a Amônia, pelo balanço de nitrogênio no reator RBA e uma comparação com os valores disponíveis na literatura.....	63
Figura 5.10: Evolução dos coeficientes estequiométricos para Nitrito e Nitrato em relação a Amônia, pelo balanço de nitrogênio no reator UD e uma comparação com os valores disponíveis na literatura.	64
Figura 5.11: Relação entre a carga de nitrito e amônia removidos; entre a carga de nitrato produzido e amônia removida; entre a carga de nitrogênio removida e a carga de	

amônia removida para o período de estabilidade entre os dias 82 e 245, para o Reator RBA.....	65
Figura 5.12: Relação entre a carga de nitrito e amônia removidos e entre a carga de nitrato produzido e amônia removida para o período de estabilidade entre os dias 100 e 348, para o Reator UD.....	66
Figura 5.13: Foto tirada do Reator UD após o 200° dia de observação. Em destaque estão os aglomerados que se formaram durante a atividade do reator.	69
Figura 5.14. Imagem da eletroforese em gel de agarose 0,8% de amostras coletadas em diferentes pontos do Reator UD e do Inóculo utilizado no Reator RBA.	74
Figura 5.15. Imagem da eletroforese em gel de agarose 0,8% de amostras coletadas em diferentes pontos do Reator UD.	75

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

ΔG°	Varição da energia livre de Gibbs
ANAMMOX	<i>Anaerobic Ammonium Oxidation</i>
BOA	Bactéria Oxidadora de Amônia
C	Concentração
CANON	<i>Completely Autotrophic Nitrogen removal Over Nitrite</i>
D.I.	Diâmetro Interno
DBO ₅	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
FISH	<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>
K _s	Constante de afinidade pelo substrato
Microrganismos anammox	Microrganismos com atividade ANAMMOX
OD	Oxigênio dissolvido
OLAND	<i>Oxygen Limited Autotrophic Nitrification Denitrification</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
Q	Vazão de líquido
q _v	Carga Volumétrica
SBR	<i>Sequencing Batch Reactor</i>
SHARON	<i>Single Reactor High Activity Ammonia Removal Over nitrite</i>
SSV	Sólidos suspensos voláteis
T	Temperatura
TRH	Tempo de retenção hidráulica
V	Volume
Reator UD	Reator cujo inóculo é proveniente da Unidade Demonstrativa
Reator RBA	Reator cujo inóculo é proveniente do Sistema de lodos ativados da Embrapa suínos e aves

RESUMO

O dejetos de suíno é um passivo ambiental de grandes proporções, sendo capaz de causar grande impacto ambiental em rios e corpos d'água, quando lançados sem um tratamento adequado. Embora técnicas de remoção da matéria orgânica já estejam bem adaptadas a este tipo de matriz, a remoção das altas cargas de nitrogênio presentes neste tipo de efluente ainda carece de sistemas adequados à remoção eficiente. Desta forma, o processo ANAMMOX (Oxidação Anaeróbia de Amônio) se justifica. Este é um sistema autotrófico que consiste na remoção anaeróbia de amônia via nitrito. Desta maneira, buscando o desenvolvimento de uma flora de microrganismos anammox, submetem-se duas amostras de lodos provenientes de dois sistemas de tratamento de dejetos de suínos, com históricos distintos, a um processo de aclimação por 63 dias, com subsequente inoculação em reatores tubulares contendo meio suporte não-biodegradável e submetidos às condições ideais para o desenvolvimento de um sistema ANAMMOX. Quanto à inoculação, o lodo de uma lagoa de nitrificação desativada foi o inóculo do "Reator UD", enquanto que o lodo de um sistema de lodos ativados foi o inóculo do "Reator RBA". Após 350 dias de observação, a carga máxima removida foi atingida pelo Reator UD, $290 \text{ mg N}(\text{L}\cdot\text{dia})^{-1}$, confirmando a elevada capacidade de remoção de nitrogênio pelo sistema em questão. Através do balanço de amônio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-), foi possível encontrar os coeficientes estequiométricos globais dos reatores. Para o Reator RBA, a proporção média de NH_4^+ consumido : NO_2^- consumido : NO_3^- produzido : N_2 produzido foi de 1:1,45:0,49:0,98. Já para o Reator UD, essa proporção, constante durante grande parte do período observado, foi de 1:1,21:0,25:0,98, ambas ficando muito próxima à encontrada na literatura (1:1,31:0,22:1,05), confirmando o melhor desempenho desta fonte de inóculo. Por fim, as análises de FISH e PCR específico, confirmaram a presença de microrganismos anammox. Desta maneira, o dejetos de suíno mostrou-se como uma promissora fonte de inóculo para o enriquecimento de microrganismos anaeróbios oxidadores de amônia.

ABSTRACT

The swine wastewater is an environmental liability of great proportions, being capable to cause high environmental impact in soil and water, when not submitted to an appropriate treatment. Although, techniques to remove the organic matter are already well adapted to this effluent, the removal of the high nitrogen loads still lacks appropriate systems for efficient removal. In this way, the ANAMMOX process (Anaerobic Ammonium Oxidation) is justified. This is an autotrophic system that consists of the anaerobic removal of ammonia using nitrite as final electron acceptor. With this purpose, looking for the development of anammox microorganisms, we submitted two sludge samples from two distinct treatment systems of swine wastewater, to a process of acclimatization for 63 days, with subsequent inoculation in reactors, containing non-woven support, and submitted to the ideal conditions to develop a ANAMMOX system. The sludge of a disabled nitrifier lagoon seeded the “Reactor UD”, while the sludge of a activated sludge system was seeded “Reactor RBA”. After 350 days of observation, the maximum removed load was reached by the Reactor UD, $290 \text{ mg N(L}\cdot\text{day)}^{-1}$, confirming the high capacity of nitrogen removal of this system. Through the mass balance of ammonia (NH_4^+), nitrite (NO_2^-) and nitrate (NO_3^-), it was possible to find the global stoichiometric coefficients. For Reactor RBA, the medium rate of NH_4^+ consumed: NO_2^- consumed: NO_3^- produced: N_2 Produced was 1:1,45:0,49:0,98. However, for Reactor UD, the rate, during most part of the observed period, was 1:1,21:0,25:0,98, very closed to literature (1:1.31:0,22:1,05), confirming the best performance of this seed source. Finally, the analyses of specific PCR, confirmed the presence of microorganisms anammox. Therefore, the swine wastewater was shown as a promising seed source for the enrichment of anaerobic ammonia oxidation process.

1. INTRODUÇÃO

A temática ambiental tem se destacado em nossa sociedade face ao alto impacto que as mais distintas atividades humanas têm causado sobre o ambiente, trazendo como consequência a exaustão de muitos recursos naturais.

Dentre estas atividades impactantes, nos últimos trinta anos, a suinocultura vem se destacando, tornando-se uma das atividades mais importantes do agronegócio brasileiro, sendo o Brasil, atualmente, o quarto maior produtor de carne suína do mundo. Porém, a suinocultura tecnificada é uma atividade de grande potencial poluidor, em face da elevada carga de contaminantes presente em seus efluentes, que representam uma importante fonte de degradação ambiental. O lançamento dos dejetos na natureza, sem um tratamento adequado, pode causar impactos ambientais significativos, prejudicando a saúde e a qualidade do solo, da água e do ar.

Muitas técnicas de tratamento visando a remoção de matéria orgânica da água residuária de suinocultura foram desenvolvidas e implementadas com sucesso. Porém, a remoção de nutrientes não recebeu a mesma atenção, se tornando uma área carente de informações e técnicas viáveis para sua implementação para este tipo de efluente. Dentre estes nutrientes, o nitrogênio encontra-se presente em altas concentrações nos dejetos de suínos, ele está presente em várias formas e estados de oxidação.

Embora existam técnicas já consagradas para remoção deste poluente, tal como a nitrificação/ desnitrificação, tais técnicas têm encontrado dificuldade para serem aplicadas ao tratamento terciário de dejetos de suínos em virtude da baixa relação C:N existente neste efluente.

Dentre as formas nitrogenadas que permanecem no efluente final, após um tratamento visando apenas a remoção de matéria orgânica, tem-se o nitrogênio amoniacal, que apresenta-se tóxico para peixes e possui uma alta demanda de oxigênio. Além disso, sob o ponto de vista de saúde pública, o nitrato é agente causador da metahemoglobinemia (síndrome do bebê azul), enquanto que o nitrito pode ser o

responsável pela formação de substâncias de poder mutagênico e carcinogênico. Por fim, o nitrogênio é um dos principais agentes causadores de eutrofização nos corpos d'água.

Diante da necessidade de cumprir as normas ambientais, que vem se tornando mais rígidas, técnicas clássicas de remoção de nitrogênio como a nitrificação/desnitrificação foram aprimoradas e novas técnicas vêm sendo desenvolvidas.

Estas novas técnicas se destacam por reduzir os custos de implantação e operação de um sistema de tratamento terciário para remoção de nitrogênio, frente à nitrificação e desnitrificação convencional. Elas envolvem apenas nitrificação parcial, o que economiza no aporte de oxigênio necessário, ou apenas etapas autotróficas, economizando na necessidade de adição de carbono orgânico e, apresentando elevada eficiência de remoção, o que minimizam os custos com a construção dos reatores.

Esta nova gama de processos (ANAMMOX, SHARON, CANON, dentre outros), permite a escolha daquele que melhor se adequa ao tipo de efluente, condição climática da região e recursos financeiros disponíveis. Estas técnicas podem envolver microrganismos aeróbios, anaeróbios e facultativos, sendo realizadas nos mais diversos tipos de reatores: em batelada, batelada seqüencial, fluxo contínuo, biofiltros, biodiscos, dentre outros.

Dentre estas técnicas, tem-se destacado aquela que utiliza a, recém descoberta, oxidação anaeróbia de amônio (ANAMMOX). Este sistema consiste na remoção de amônia do efluente sob condições anóxicas, onde o amônio é levado a N_2 utilizando nitrito como acceptor final de elétrons. Sendo ainda um processo autotrófico, não necessita de adição de fontes extras de carbono orgânico. Devido a sua elevada eficiência de remoção, sua aplicação se viabiliza para efluentes com elevadas concentrações de nitrogênio.

Uma planta de tratamento convencional remove com eficiência a matéria orgânica presente no dejetos de suíno, restando no efluente final, elevadas concentrações

de nitrogênio amoniacal. Porém, a aplicação de processos como o sistema de lodos ativados, pode promover a presença, no efluente final, de parte do nitrogênio na forma de nitrito e parte como amônio, propiciando a aplicação do processo ANAMMOX para realizar o polimento final do tratamento desta água residuária.

Embora um reator ANAMMOX possa aumentar significativamente a remoção de nitrogênio e mesmo assim economizar até 90% dos custos de operação de um sistema convencional, ele apresenta algumas limitações. O afluente precisa estar em uma proporção de aproximadamente 1:1 de $\text{NH}_4^+:\text{NO}_2^-$, os microrganismos são inibidos pela presença de oxigênio dissolvido e, devido ao lento crescimento das mesmas, o “start-up” destes reatores é extremamente lento.

Diante destas informações, verifica-se a importância de se buscar fontes de inóculos de organismos oxidadores anaeróbios de amônio já adaptados aos dejetos de suínos, assim como a necessidade de realizar um enriquecimento dessa biomassa de forma que ela possa fornecer inóculos para acelerar o “start-up” de reatores em escalas maiores.

Neste contexto, este trabalho procurou analisar duas possíveis fontes de inóculos de microrganismos anammox em dejetos de suínos para, com o estabelecimento de uma cultura adaptada, proceder com o enriquecimento da mesma, visando utilizar este sistema como tratamento terciário de uma estação de tratamento, cujo efluente final apresenta características propícias para alimentar um reator ANAMMOX. A presença deste tipo de microrganismo pode ser confirmada através do balanço de massa das formas nitrogenadas que entram e saem do reator e de análises microbiológicas de DNA.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Estabelecer um processo de oxidação anaeróbia de amônia, visando o desenvolvimento de inóculo para futura remoção de nitrogênio remanescente do efluente final de uma planta de tratamento de dejetos de suínos.

2.2 Objetivos específicos

Partindo de duas fontes de inóculos distintas, provenientes do tratamento de dejetos de suínos, estabelecer o processo de remoção de nitrogênio via ANAMMOX, utilizando substrato sintético.

Confirmar a presença e acompanhar o desenvolvimento de uma flora de microrganismos anammox através do balanço de formas nitrogenadas no reator, da equação estequiométrica global do sistema e de técnicas de determinação microbiológicas baseadas em análise de DNA (FISH e PCR).

Determinar a eficiência de remoção de compostos nitrogenados por microrganismos aderidos a material suporte não biodegradável e em fluxo contínuo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. O dejetos de suíno

Estima-se que o brasileiro consuma 77,4% de toda carne suína produzida no país, com um consumo per capita de 11,1 Kg/pessoa/ano. Esse consumo elevado condiz com a elevada produção de suínos no Brasil, que ocupa o quarto lugar no ranking mundial, com 32.938 mil cabeças. O estado de Santa Catarina é o maior produtor nacional com 6 milhões cabeças (ANUALPEC, 2006). Diante deste quadro, percebe-se a importância deste ramo do agronegócio.

Aliando-se a quantidade de dejetos produzida ao fato de que a região oeste de Santa Catarina possui a maior concentração de animais do país e é atualmente o maior complexo agroindustrial de suínos e aves do Brasil, responsáveis por 76,45% do efetivo de suínos do Estado (IBGE, 2006), têm-se o maior problema ambiental da região e do estado. A Tabela 3.1 apresenta a quantidade de dejetos gerada por animal nas várias fases de produção (PERDOMO *et al*, 2003). Este quadro ainda é agravado, pelo fato de que no Brasil o manejo de dejetos suínos é praticado, muitas vezes, sob forma de estocagem para posterior aplicação direta no solo (KUNZ *et al*, 2004).

Os principais problemas ambientais associados à água residuária de suinocultura são sua elevada carga orgânica, de nutrientes e algumas espécies metálicas como Ferro, Cobre e Zinco. A Tabela 3.2 mostra a grande variabilidade das características físico-químicas dos dejetos de suínos, sendo esta variação devido a forma do sistema de criação, de como são manuseados, armazenados e do nível de diluição dos dejetos (KUNZ, 2006).

Combinando-se as informações dispostas nas Tabelas 3.1 e 3.2, pode-se estimar a produção média de Nitrogênio amoniacal pelo dejetos de suíno, apenas no estado de Santa Catarina, em $136 \text{ ton N-NH}_3(\text{m}^3\text{dia})^{-1}$. Diante desta realidade, fica evidente a necessidade de promover um tratamento eficiente e uma destinação adequada ao efluente da suinocultura.

Tabela 3.1: Quantidade de dejetos gerada por animal por fase de produção.

Categoria de Suínos	Esterco (Kg·dia ⁻¹)	Esterco + urina (Kg·dia ⁻¹)	Dejetos líquidos (L·dia ⁻¹)	Estrutura para estocagem (m ³ ·animal ⁻¹ ·mês ⁻¹)	
				Esterco + urina	Dejetos líquidos
25-100 Kg	2,30	4,90	7,00	0,16	0,25
Porcas em Gestação	3,60	11,00	16,00	0,34	0,48
Porcas em Lactação	6,40	18,00	27,00	0,52	0,81
Machos	3,00	6,00	9,00	0,18	0,28
Leitões desmamados	0,35	0,95	1,40	0,04	0,05
Média	2,35	5,80	8,60	0,17	0,27

Fonte: Adaptado de PERDOMO *et al*, 2003.

Tabela 3.2: Composição química média dos dejetos de suínos observada por diferentes autores.

Parâmetro (mg·L ⁻¹)	Duarte <i>et al</i> , 1992 (Portugal)	Sevrin-Reyssac <i>et al</i> , 1995 (França)	Medri, 1997 (SC/ Brasil)	Zanotelli, 2002 (SC/ Brasil)	Kunz <i>et al</i> , 2005 (SC/ Brasil)
pH	7,46	-	6,9	6,87	7,3
DQO total	21.670	80.000	21.647	26.387	65.090
DBO₅ total	7.280	40.000	11.979	-	34.300
NTK	2.150	8.100	2.205	2.539	4.530
NH₃	1.420	3.400	-	-	2.520
P total	-	7.100	633	1.215	1.600
Sólidos Totais	-	82.000	17.240	22.867	-
Sólidos Voláteis	-	66.000	10.266	16.855	39.220

Fonte: Adaptado de KUNZ, 2006.

Existem várias formas de tratar os dejetos de suínos, combinações de sistemas de lagoas, biodigestores, reatores aerados, incorporação em maravalha ou serragem para promoção de compostagem, dentre outras. Porém, diante das características deste efluente, nenhuma destas técnicas é aplicável separadamente, sendo necessário uma combinação das mesmas, de forma a maximizar a remoção da matéria orgânica e nutrientes.

Neste sentido, a Embrapa Suínos e Aves (Centro Nacional de Pesquisa em Suínos e Aves), sediada na cidade de Concórdia/ SC, está utilizando uma planta de tratamento que envolve: um processo de separação de sólidos, composto por uma peneira rotativa seguida de um floto-decantador (utilizando-se agentes coagulantes e floculantes biodegradáveis); o efluente líquido é encaminhado para um reator anaeróbio do tipo UASB e em seguida para um sistema de lodos ativados, conforme esquematizado na Figura 3.1; já o efluente sólido é encaminhado para um biodigestor seguido de um sistema de lagoas (KUNZ, 2004).

O efluente final da planta de tratamento de dejetos de suínos da Embrapa Suínos e Aves, em determinados períodos de monitoramento, apresentou uma relação de $\text{NH}_4^+:\text{NO}_2^-$ de aproximadamente 1:1, sendo a concentração na faixa de $0,5 \text{ g N- NH}_4^+/\text{L}$, a DBO_5 solúvel deste efluente é próxima de $60 \text{ mg DBO}_5/\text{L}^{-1}$ e alcalinidade da ordem de $1 \text{ g CaCO}_3/\text{L}^{-1}$ (KUNZ, 2004). Desta forma, dentre as técnicas de tratamento que serão apresentadas, fica evidente a possibilidade de aplicação direta do sistema ANAMMOX.

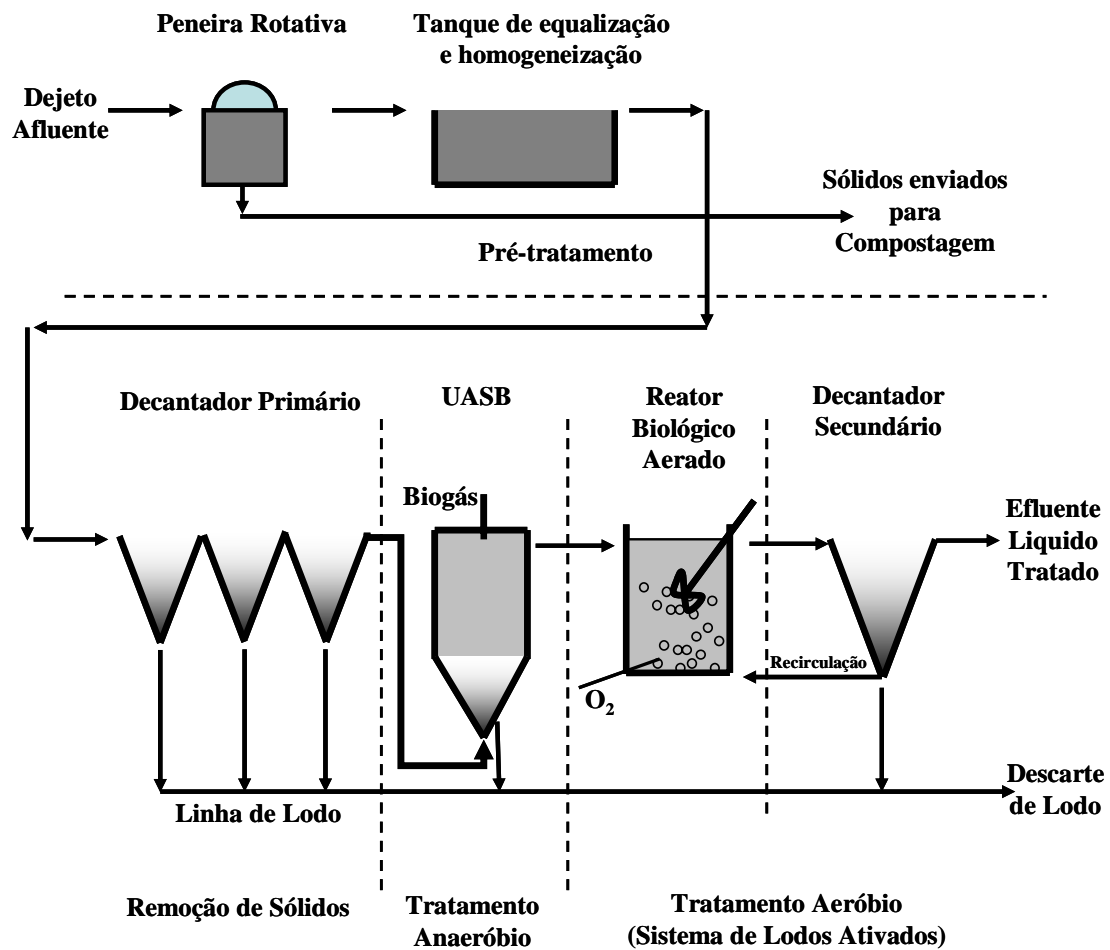


Figura 3.1: Representação esquemática da planta de tratamento de dejetos de suínos da Embrapa Suínos e Aves de Concórdia/ SC.

3.2. O problema ambiental do nitrogênio

O aporte do nitrogênio nos mananciais pode se dar em diferentes formas e estados de oxidação sendo as espécies mais comuns, e, portanto, mais importantes, o nitrogênio orgânico, o nitrogênio amoniacal ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$), o nitrito (NO_2^-) e o nitrato (NO_3^-) (JORDÃO & PESSOA, 1995).

O nitrogênio lançado no ambiente pode ter inúmeras origens, naturais (fixação bacteriana e lixiviação em vegetações nativas) ou pela interferência do homem (lixiviação do excesso de nitrogênio aplicado como adubo na agricultura, drenagem

pluvial urbana, esgoto doméstico e efluentes animais e industriais) (BEGON *et al*, 1996; VON SPERLING, 1996).

Dentre as várias conseqüências do excesso de nutrientes nos corpos d'água, a mais importante, e também a mais comum, é a eutrofização. Caracteriza-se como eutrofização, o crescimento excessivo de plantas aquáticas e algas, que dentre as inúmeras conseqüências negativas para o manancial, pode provocar problemas estéticos e recreacionais, desenvolver condições anaeróbias no corpo d'água, mortandade de peixes, elevação dos custos no tratamento de água, assoreamento de lagos e represas, dentre outras (VON SPERLING, 1996).

Além disso, o nitrogênio amoniacal, em condições de pH elevado, apresenta-se tóxico a peixes, devido ao fato de nestas condições se encontrarem predominantemente na forma de amônia livre. A Figura 3.2 apresenta a curva de distribuição da amônia livre e do íon amônio em função do pH. Outro aspecto negativo da presença de amônia nos mananciais hídricos é a alta demanda de oxigênio (1 mg de NH_3 necessita de 4,6 mg de O_2) para realização do processo de nitrificação, contribuindo para diminuição da concentração do oxigênio dissolvido e conseqüente depreciação da qualidade da água (BITTON, 1994).

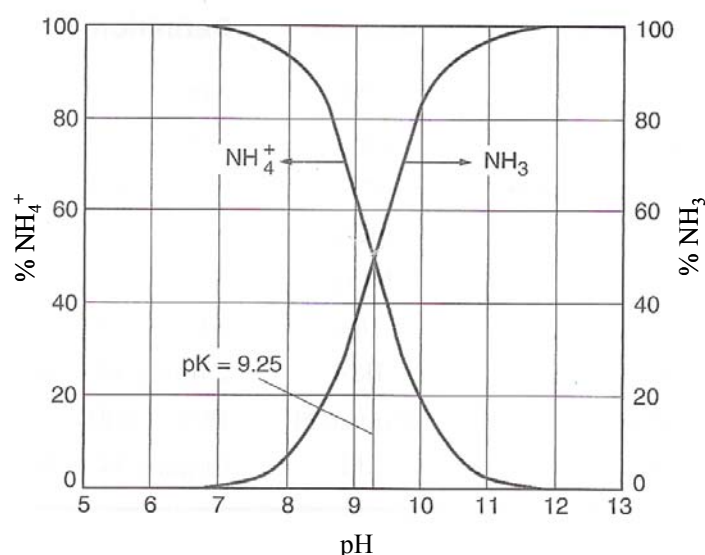


Figura 3.2: Porcentagem de amônia livre em relação ao pH (METCALF & EDDY, 2003).

Sob o ponto de vista de saúde pública, o nitrato pode causar metahemoglobinemia (síndrome do bebê azul), devido a redução do nitrato a nitrito por bactérias do trato intestinal, sendo que o Fe^{2+} da hemoglobina saudável é convertido a Fe^{3+} , originando a metahemoglobina, que é incapaz de se ligar ao O_2 , reduzindo assim, as trocas gasosas no organismo humano. O nitrito ainda pode se combinar com aminas secundárias, formando nitrosaminas com poder mutagênico e carcinogênico (BITTON, 1994).

Conforme observado, as concentrações das diferentes formas nitrogenadas devem ser rigorosamente controladas e monitoradas, para evitar que eventuais contaminações possam desencadear acidentes ambientais. Desta forma, a legislação brasileira, através do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) resolução n° 357 de 2005, classifica cinco classes de água segundo seu uso, estabelecendo, nas quatro classes que podem ser utilizada para abastecimento e consumo humano, o limite de nitrito de 1,0 mg/L e 10,0 mg/L para nitrato. Já para o lançamento de efluentes nos corpos receptores, esta mesma resolução estabelece um limite de lançamento de nitrogênio amoniacal de 20,0 mg/L.

Desta forma, visando atender as legislações pertinentes e, evitar a degradação do meio ambiente, diversas formas de remover nitrogênio dos efluentes tem sido aplicadas e desenvolvidas. Neste ponto, destacam-se os processos biológicos: a nitrificação/desnitrificação convencional e os novos processos SHARON, ANAMMOX, CANON e combinações entre os mesmos (KHIN & ANNACHHATRE, 2004; WINDEY *et al*, 2005).

3.3. Processos de remoção de nitrogênio

3.3.1. Processo de nitrificação e desnitrificação convencional

O processo biológico em questão, ocorre em duas fases distintas, a nitrificação, onde o NH_4^+ é convertido a NO_3^- e a desnitrificação, onde o NO_3^- produzido é reduzido a N_2 .

Espécies pertencentes ao gênero *Nitrosomonas* (que oxidam NH_4^+ a NO_2^-) e *Nitrobacter* (que oxidam NO_2^- a NO_3^-) são responsáveis pela maior parte da nitrificação na natureza (ANTHONISEN *et al.*, 1976). Enquanto que a nitrificação é um processo aeróbio e autotrófico, a desnitrificação ocorre em meio anóxico, sendo realizada por bactérias heterotróficas de vários gêneros (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Spirillum*, *Hyphomicrobium*, *Agrobacterium*, *Acinetobacter*, dentre outras) (BITTON, 2005).

Na etapa autotrófica, a nitrificação aeróbia ocorre com O_2 como acceptor de elétrons, o ion amônio é oxidado a nitrito e este posteriormente a nitrato segundo as Equações 3.1 e 3.2.



Na etapa heterotrófica, a desnitrificação anóxica é responsável pela conversão de NO_3^- ou NO_2^- a N_2 . Esta etapa acontece na presença de fonte de matéria orgânica, como pode ser observado nas Equações 3.3 e 3.4.



Como bactérias nitrificantes são autotróficas, seu crescimento não depende da matéria orgânica, utilizando o CO_2 como fonte de carbono. METCALF & EDDY (2003) apresentam um valor teórico de 7,14 g de Alcalinidade CaCO_3 para converter um grama de amônia em nitrato.

Os principais fatores ambientais que influenciam a nitrificação são temperatura, pH e oxigênio dissolvido. No que diz respeito a temperatura, observa-se a ocorrência de nitrificação em uma faixa de 5 a 50°C, sendo a temperatura ótima na faixa de 25 a 30°C (BITTON, 2005). Embora muitos autores coloquem a faixa de pH ideal como sendo entre 7,0 e 8,0 (BITTON, 2005; METCALF & EDDY, 2003; VON SPERLING, 1997; FERRETTI, 2005), ANTHONISEN, *et al* (1976) demonstra que mesmo em pHs próximos da neutralidade, dependendo da concentração de amônia total e nitrito do meio, pode existir inibição de *Nitrosomonas* e/ ou *Nitrobacters* pela presença de amônia livre ou ácido nitroso em excesso.

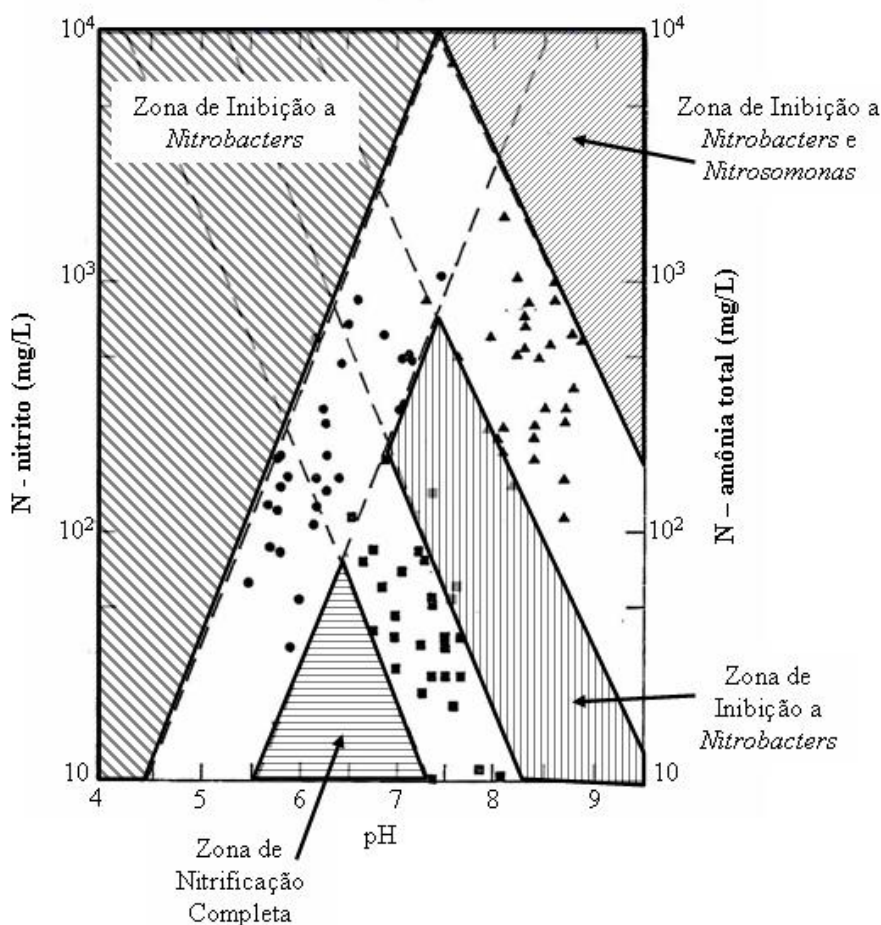


Figura 3.3: Faixas de transição e regiões de inibição de organismos nitrificantes por amônia livre e ácido nitroso, conforme a variação das suas concentrações e valores de pH (adaptado de ANTONISEN *et al*, 1976).

A Figura 3.3 apresenta a inibição de *Nitrosomonas* e *Nitrobacters* conforme a variação do pH e da concentração de amônia total e nitrito. Por fim, para que o oxigênio dissolvido não seja limitante à uma nitrificação completa, deve-se manter uma concentração superior a 2 mg O₂/L no reator.

Desta forma, através da manutenção de determinadas condições, tais como pH entre 7,5 e 8,5, concentração de amônia entre 100 e 1000 mg·L⁻¹ de NH₄⁺ e oxigênio dissolvido em baixas concentrações, promove-se o crescimento de organismos oxidadores de amônio, enquanto inibi-se as bactérias oxidadoras de nitrito, promovendo assim um acúmulo de nitrito no meio. Além desta forma, muitas outras combinações de controle de processo, mantendo condições de pH, temperatura, oxigênio dissolvido, concentração de amônio e outros fatores, podem ser utilizadas na obtenção de um efluente final com concentrações de amônio e nitrito pré-determinadas.

Quanto à desnitrificação, o nitrato ou nitrito é utilizado como acceptor de elétrons, e sendo reduzido de acordo com a Figura 3.4.

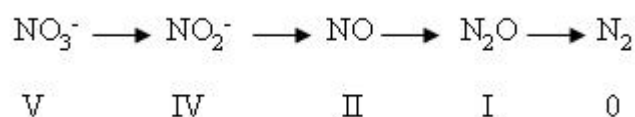


Figura 3.4: Seqüência de desnitrificação com nitrato como acceptor final de elétrons e o respectivo estado de oxidação do nitrogênio.

A presença de matéria orgânica é essencial para que o processo de desnitrificação ocorra, já que esta funciona como doadora de elétrons. Ela pode ser suprida através de compostos sintéticos adicionados ao meio (estequiometricamente, 0,83 moles de metanol são necessários para desnitrificar um mol de NO₃⁻) ou, pela matéria orgânica presente no próprio resíduo a ser tratado.

3.3.2. Sistemas de nitrificação e desnitrificação

Como observado, as etapas de nitrificação e desnitrificação acontecem sob diferentes condições e por diferentes microrganismos. Desta forma, observam-se duas

configurações mais comuns para este sistema: um reator anóxico, seguido de um reator aerado; um sistema SBR (Reator de Batelada Sequencial) operado com ciclos anóxicos e aeróbios intercalados. As Figura 3.5 e 3.6 apresentam desenhos esquemáticos dos dois processos, respectivamente (SCHMIDELL & REGINATTO, 2005). Estas configurações são possíveis, pois mesmo sob condições estritamente anaeróbias, as bactérias oxidadoras de amônio (BOAs) são capazes de sobreviver por um longo período e as oxidadoras de nitrato e nitrito também sobrevivem em meio aerado (JETTEN *et al*, 1999).

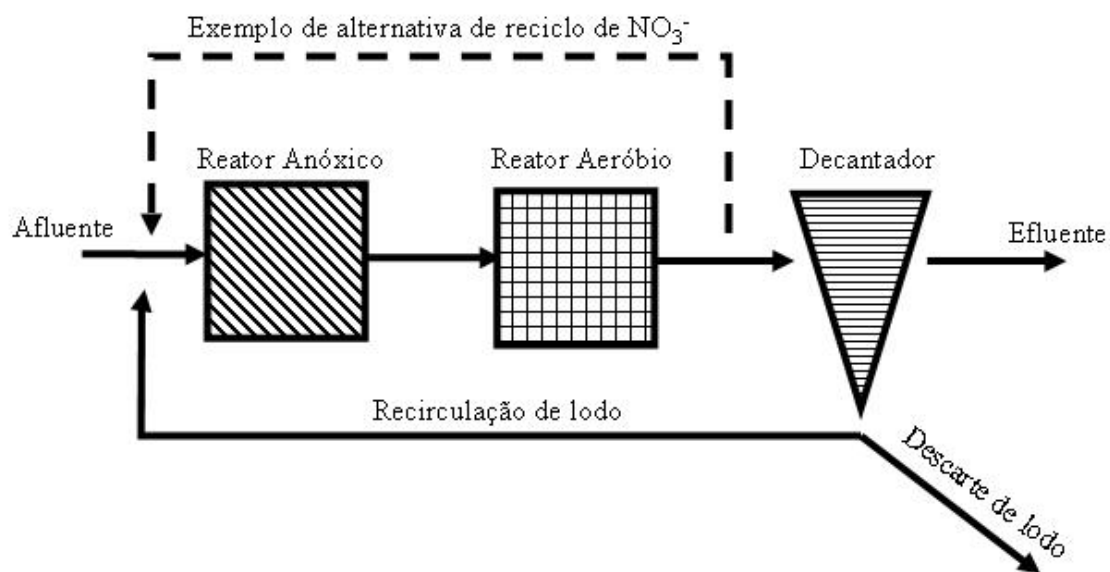


Figura 3.5: Esquema simplificado de nitrificação e desnitrificação ocorrendo em reatores separados.



Figura 3.6: Esquema simplificado de nitrificação e desnitrificação no mesmo reator sob operação em SBR.

As *Nitrobacters* são mais susceptíveis a inibição pela presença de amônia livre que as *Nitrosomonas*. ANTONISEN, (1976) afirma que para pH de 7,5 e concentrações de amônia total da ordem de 10^2 mg N/L, existe uma inibição de *Nitrobacters*, mas não de *Nitrosomonas*. Esta afirmativa vai ao encontro ao fato que, frequentemente, em sistemas de nitrificação para tratamento de dejetos de suínos, existe um acúmulo de nitrito, quando as concentrações de entrada de amônio são 1 g N-NH₄⁺/L (KUNZ, 2004). A utilização desta estratégia, permitiria a geração de um efluente final com características apropriadas para ser encaminhado diretamente ao processo de oxidação anaeróbia de amônia, como será explicado mais a frente, sem a necessidade de uma etapa de nitrificação parcial anterior.

3.3.3. Processo de oxidação anaeróbia de amônia (ANAMMOX)

Este processo foi descoberto acidentalmente na década de 90 por pesquisadores que observaram a perda de amônio em um reator desnitrificante de uma planta de tratamento de esgotos na Holanda (MULDER *et al*, 1995). O microrganismo responsável pela transformação anaeróbia de amônio em nitrogênio gasoso era desconhecido, porém, STROUS *et al* (1999a), identificaram o mesmo como uma bactéria autotrófica da ordem *Planctomycetales* e o processo foi batizado de ANAMMOX (anagrama do inglês “Anaerobic Ammonium Oxidation”).

Atualmente, já foram identificados microrganismos anammox em várias partes do mundo (DEN CAMP *et al*, 2006; DAPENA-MORA *et al*, 2006; TOH *et al*, 2002; FUJI *et al*, 2002), inclusive no Brasil (REGINATTO *et al*, 2005; KIELING, 2004), evidenciando uma característica de fácil desenvolvimento nos mais diversos habitats e, portanto, justificando sua busca no dejetos de suíno.

Após mais de dez anos dos primeiros experimentos, já foram identificados três gêneros de bactérias: *Brocadia* (*B. anammoxidans* e *B. fulgida*), *Kuenenia* (*K. stuttgartiensis*) e *Scalindua* (*S. wagneri*, *S. brodae* e *S. sorokinii*), sendo que todos os três possuem o mesmo metabolismo e possuem macro-estruturas similares (JETTEN *et al*, 2005).

A Figura 3.7 apresenta a relação filogenética dos microrganismos anammox com bactérias aeróbias oxidadoras de amônia.

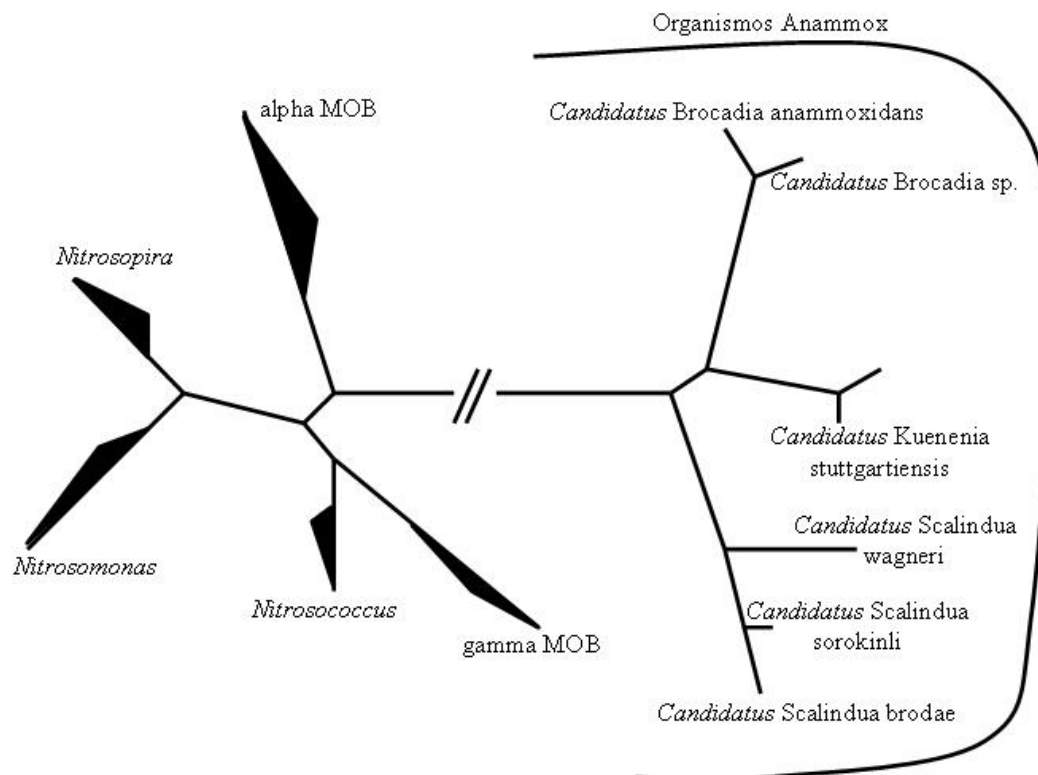


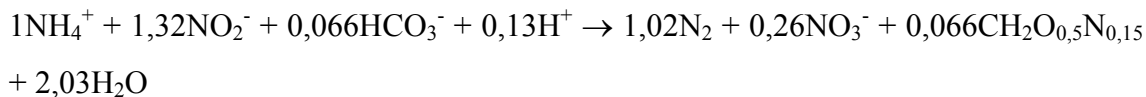
Figura 3.7: Relação filogenética da bactéria anammox em comparação com bactérias aeróbias oxidadoras de amônia. A linha horizontal representa 10% de mudança na seqüência de genes 16 S rRNA (adaptado de JETTEN, 2005).

Devido ao fato da bactéria ter sido apenas purificada, mas nunca ter sido isolada, organismos contaminantes podem contribuir para atividade Anammox. Esta contribuição pode se dar na forma de simbiose, onde o organismo contaminante é importante para o crescimento da bactéria em questão (STROUS *et al*, 1999a). Pelo mesmo motivo, em todas as espécies identificadas até o momento, permanece o prefixo *Candidatus*.

Estes microrganismos oxidam amônio (NH_4^+) diretamente a nitrogênio gasoso (N_2) sendo o nitrito (NO_2^-), o aceptor de elétrons. O processo é autotrófico, utilizando CO_2 como única fonte de carbono (STROUS *et al*, 1998). Um dos subprodutos é o nitrato (NO_3^-), que é o destino de aproximadamente 10% do nitrogênio removido

(KHIN & ANNACHHATRE, 2004). Quanto a estequiometria global de um processo ANAMMOX, VAN DE GRAAF, *et al* (1996) encontraram:

(Eq. 3.5)



Já STROUS, *et al* (1998) expressaram a equação estequiométrica global de seu reator da seguinte forma:

(Eq. 3.6)

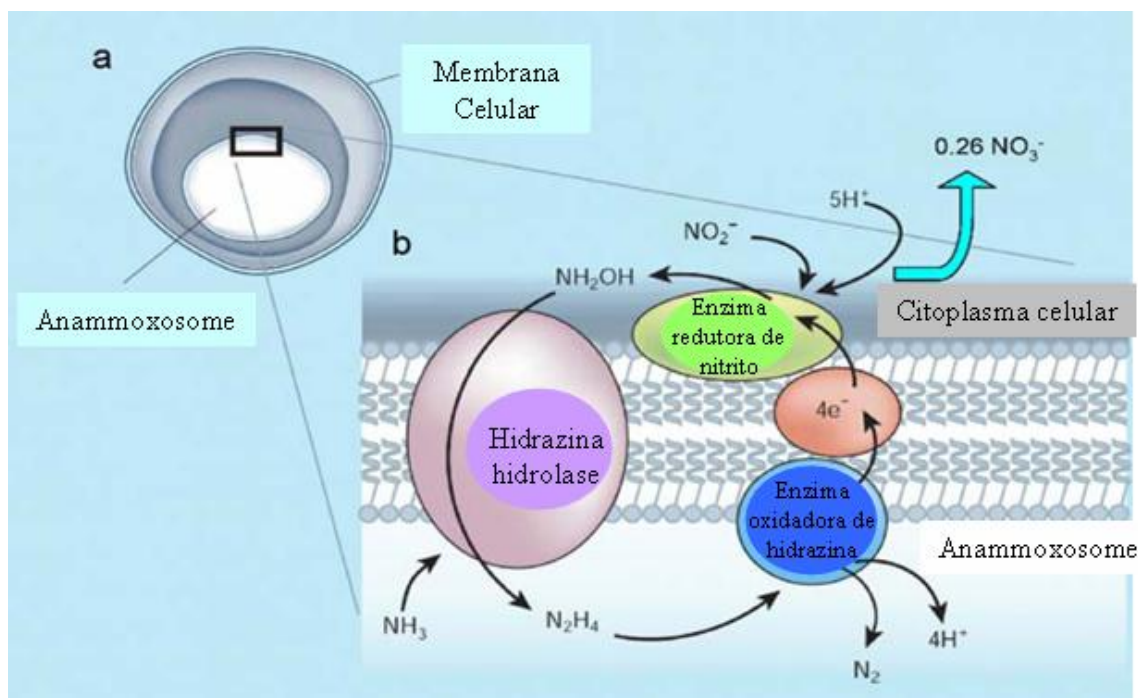
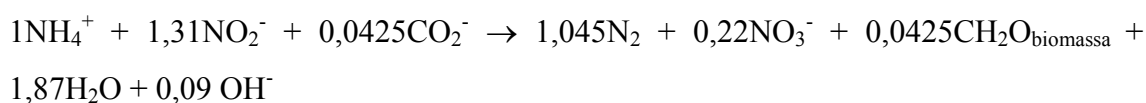


Figura 3.8: Rota bioquímica de reação de ANAMMOX. (a) Representação simplificada do organismo, evidenciando o tamanho da anammoxosoma. Esta é a organela responsável pela geração de energia na célula. (b) A membrana da anammoxosome, que consiste de uma bicamada lipídica identificada por DAMSTE (2002) e, o caminho da reação Anammox (adaptado de AHN,2006).

Quanto a rota metabólica, JETTEN, *et al* (1999) mostrou que o acceptor de elétrons, nitrito, é reduzido a hidroxilamina e a hidroxilamina de alguma maneira reage com o doador de elétrons amônio, culminando com a produção de nitrogênio gasoso. Já

JETTEN, *et al* (2000) acredita que a hidrazina é o intermediário desta última etapa, postulando que a oxidação da hidrazina a N_2 gera os elétrons para a redução inicial de nitrito a hidroxilamina. Parte desta rota metabólica ocorre dentro de um compartimento peculiar dessas bactérias chamado Anammoxosoma, que ocupa de 30 a 60% do volume da célula. A Figura 3.8 apresenta um desenho esquemático da rota bioquímica de um microrganismo anammox.

Ao entender melhor o funcionamento destes organismos, ficou evidente que a interface de ambientes óxicos e anóxicos, fornece o habitat ideal para microrganismos oxidadores anaeróbios de amônio. Por esta razão, tem-se encontrado tais bactérias em sistemas de tratamento de efluentes.

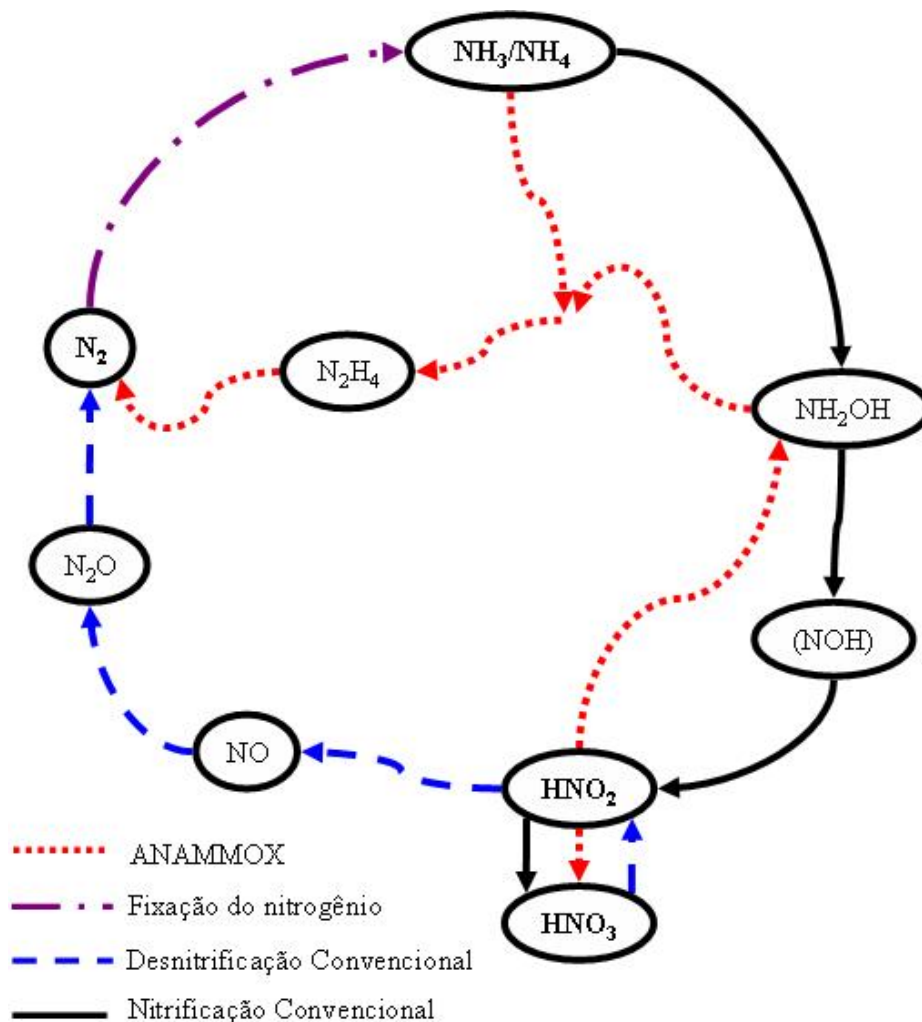


Figura 3.9: Representação esquemática dos ciclos do nitrogênio, envolvendo as diferentes formas nitrogenadas dos processos de nitrificação/ desnitrificação convencional e ANAMMOX (adaptado de AHN, 2006).

Em uma comparação preliminar, observa-se pela Figura 3.9 que a remoção de nitrogênio via ANAMMOX se mostra mais simples que aquela via nitrificação e desnitrificação convencional. Além disso, a reação ANAMMOX é tão energeticamente favorável ($\Delta G^{\circ} = -357$ KJ/mol) quanto, por exemplo, a reação de nitrificação ($\Delta G^{\circ} = -275$ KJ/mol) (JETTEN *et al*, 2000).

Quanto às características operacionais ótimas, para o desenvolvimento dessa microbiota, pode-se dizer que o pH ideal para crescimento dos microrganismos está entre 7 e 8 com o ótimo próximo de 8 e a temperatura de atuação está na faixa de 20 a 43° com o ótimo em 40 ± 3 °C (TOH *et al*, 2002; STROUS *et al*, 1999b; JETTEN *et al*, 1999).

Mesmo em condições ótimas, existem divergências quanto ao tempo de duplicação desses microrganismos. Em ensaios utilizando reatores SBR e com o tempo de duplicação estimado pela produção de biomassa (sólidos suspensos voláteis), STROUS, *et al* (1999b) obteve um tempo de duplicação de nove dias, já JETTEN, *et al* (2000) encontraram 10,6 dias, enquanto que STROUS, *et al* (1998) afirmavam ser de 11 dias. Porém, a maior diferença se encontra nos recentes estudos utilizando reatores de biomassa imobilizada e contagem direta de organismos via FISH, onde ISAKA, *et al* (2005) encontraram um tempo de duplicação de 1,8 dias, muito mais rápido que àqueles citados anteriormente.

O lento crescimento dos microrganismos anammox pode ser explicado pela sua baixíssima afinidade pelo substrato, estimada como sendo $\leq 10^{-4}$ g de $N-NH_4^+$ /L e $\leq 10^{-4}$ g de $NO_2^- - N$ /L (STROUS *et al*, 1999b). Também, segundo ISAKA, *et al* (2005), esse crescimento lento pode ser explicado devido a adoção de uma progressão de carga de alimentação muito lenta, durante o cultivo, sendo tão lenta quanto a fase estacionária dos microrganismos.

Bactérias anammox aderem facilmente a qualquer superfície sólida, não existindo de forma uniforme dentro dos reatores, fazendo com que um tempo de duplicação correto jamais seja obtido em reatores com suporte, caso apenas parte do reator seja retirada para amostragem (ISAKA *et al*, 2005). Devido a este lento crescimento, o start-up de reatores pode ser extremamente lento, sendo necessário de três meses (JETTEN *et al*, 1999) a mais de um ano (TOH *et al*, 2002) de operação, para se obter uma cultura enriquecida e estabilizada.

Diferentes relações S_0/X_0 , variando de 0,018 a 0,140 g N-NO₂⁻/ g SSV, não mostraram efeito significativo na atividade Anammox, isto é, nenhuma fase lag e aumento na atividade específica ocorreu com o aumento na relação S_0/X_0 . Isto pode estar relacionado com o lento crescimento da biomassa (DAPENA-MORA *et al*, 2006).

A coloração característica dessa cultura não necessariamente deverá ser uma variação do vermelho (TOH *et al*, 2002; FUJII *et al*, 2000; VAN DONGEN *et al*, 2001), já que em biomassa de coloração mais pálida, tem sido encontrados microrganismos anammox (REGINATTO *et al*, 2005).

Mesmo apresentando tantas restrições operacionais para o desenvolvimento de um reator em escala real, o esforço neste sentido é válido devido às elevadas cargas removidas por este tipo de sistema. A maior remoção atingida foi encontrada por SLIEKERS, *et al* (2003) que, utilizando um reator “*gas-lift*”, obtiveram uma remoção de 8,9 Kg N·(m³·dia)⁻¹. DAPENA-MORA, *et al* (2004), obtiveram uma remoção de 1,07 Kg N·(m³·dia)⁻¹ utilizando um reator SBR. Por fim, ISAKA (2005), obteve uma remoção de 0,93 Kg N·(m³·dia)⁻¹ utilizando um reator de biomassa imobilizada. Em todos os trabalhos, a taxa de conversão de nitrogênio foi sempre proporcional a população de bactérias anammox.

No que diz respeito a inibidores, o processo não é inibido pelo íon amônio ou pelo seu subproduto, nitrato, até concentrações no meio, da ordem de 1 g N/L. Porém, na presença de concentrações superiores a 0,1 gN/L de nitrito o processo é completamente inibido (STROUS *et al*, 1999). JETTEN, *et al* (1999) afirmam que a

exposição da microbiota a elevadas concentrações de nitrito por um período de 12 horas levam a uma inibição irreversível da atividade. Estes autores também investigaram a adição de substâncias orgânicas como o piruvato, metanol, etanol, glicose ou alanina e encontraram uma inibição severa do processo anammox. O processo anammox ainda sofre forte inibição pela presença de oxigênio dissolvido, mesmo em baixas concentrações como $2\mu\text{mol/L}$ ($0,06\text{ mgO}_2\text{L}^{-1}$). Porém, a inibição cessa imediatamente após a retirada do OD do meio sendo, portanto, uma inibição reversível.

Em um estudo mais detalhado, DAPENA-MORA, *et al* (2006), afirmam que em concentrações de nitrito de 25 mmolL^{-1} (350 mgL^{-1} de N-NO_2^-) inibe em 50% a atividade específica máxima do processo. Essa porcentagem de inibição somente é atingida em concentrações de 55 e 45 mmolL^{-1} para amônio e nitrato, respectivamente (770 mgL^{-1} de N-NH_4^+ e 630 mgL^{-1} de N-NO_3^-). NaCl, KCl e Na_2SO_4 não possuem nenhum efeito inibitório em concentrações de até 150 mmolL^{-1} ($8,61\text{ gL}^{-1}$), 100 mmolL^{-1} ($7,34\text{ gL}^{-1}$) e 50 mmolL^{-1} ($7,1\text{ gL}^{-1}$), respectivamente. O acetato não inibe o processo em concentrações de até 10 mmolL^{-1} (820 mgL^{-1} de NaAc). O fosfato inibe em 50% a atividade específica anammox em concentrações da ordem de 20 mmolL^{-1} ($1,9\text{ gL}^{-1}$ de PO_4^-), enquanto que o sulfito de sódio, em concentrações entre 1 e 2 mmolL^{-1} (78 e 156 mgL^{-1} de Na_2S), diminuem em 60% a atividade específica anammox.

Como visto anteriormente, Hidrazina (N_2H_4) e Hidroxilamina (NH_2OH) são intermediários do processo ANAMMOX, STROUS, *et al* (1999a) observaram que ao serem adicionados em um sistema com uma biomassa aparentemente inibida, o processo é restabelecido de forma muito mais acelerada, evidenciando um forte estímulo do processo por estes intermediários.

3.3.4. Sistema de reator único para processo de conversão de altas concentrações de íon amônio em nitrito (SHARON)

O processo SHARON é um dos novos processos de nitrificação desenvolvidos. Trabalham a temperaturas na faixa de 35 a 40°C e pH entre 7 e 8. O processo se diferencia por promover apenas uma nitrificação parcial do amônio, até nitrito (nitritação) e, portanto, economizando gastos de aeração (HELLINGA *et al*, 1998).

O processo SHARON é uma excelente alternativa de nitrificação para elevadas concentrações de amônio. Ele não produz grande quantidade de lodo biológico, requer menos oxigênio, pois a oxidação vai apenas até nitrito (Eq.3.7), economizando com energia e adição de fonte de carbono. Comparado ao método tradicional de nitrificação, o SHARON demanda 25% menos energia de aeração na etapa de nitritação e 40% menos de adição de carbono na etapa de desnitrificação (VAN DONGEN *et al*, 2001).



Comparado ao processo convencional, o processo SHARON requer um investimento inicial relativamente menor, devido ao fato das dimensões do reator serem bem menores. O processo não produz lodo químico e tem uma produção relativamente baixa de lodo biológico. Porém, seus custos operacionais podem ser maiores, devido a necessidade de promover um controle muito grande da temperatura, pH, tempo de retenção hidráulica, concentração do substrato e oxigênio dissolvido (VAN KEMPEN *et al*, 2001).

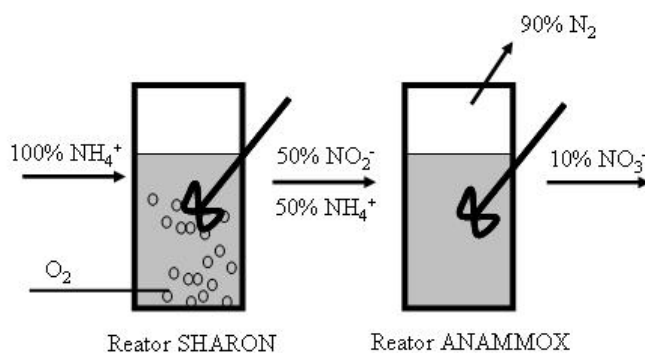
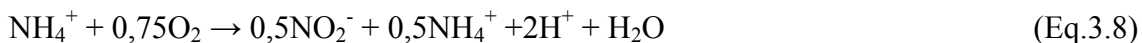


Figura 3.10: Representação esquemática da aplicação de um sistema SHARON como pré tratamento de um reator ANAMMOX.

Conforme observado, este tipo de sistema se torna uma excelente alternativa para servir como pré-tratamento de um reator ANAMMOX. Desta maneira, um efluente contendo apenas NH_4^+ , teria seu amônio parcialmente convertida a nitrito (Eq.3.8), colocando o efluente em uma condição ideal para utilização em um sistema ANAMMOX

(JETTEN *et al*, 1997 apud VAN DONGEN *et al*, 2001). A Figura 3.10 apresenta um desenho esquemático da utilização de um sistema combinado SHARON/ ANAMMOX.

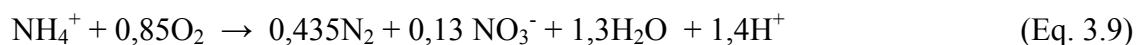


3.3.5. Remoção autotrófica completa de nitrogênio via nitrito (CANON)

Outro processo que pode ser utilizado envolvendo microrganismos ANAMMOX é o CANON (Completa remoção autotrófica de nitrogênio através do nitrito), trata-se da remoção de amônio em um único reator, em um único estágio, porém, com limitação de oxigênio (SLIEKERS *et al*, 2002).

O processo CANON é ideal para remoção de nitrogênio de efluentes contendo baixas concentrações de carbono orgânico. Os microrganismos responsáveis por este processo são populações autotróficas que desnitrificam sob condições limitadas de oxigênio dissolvido. O processo normalmente é conduzido em reatores que permitam a formação de biofilmes. Este processo é baseado na nitrificação parcial do amônio a nitrito e sua posterior remoção por oxidação anaeróbia da amônia (DIJKMAN & STROUS, 1999).

O processo ocorre sob condições limitadas de oxigênio ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ou $0,15 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$), de forma que bactérias nitrificantes aeróbias e microrganismos anammox passam a coexistir no mesmo ambiente. A oxidação do nitrito a nitrato é impedida primeiramente pela baixa concentração de OD no meio e também devido a manutenção de uma elevada concentração de NH_4^+ no meio ($5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ou $70\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de N-NH_4^+). A eficiência deste tipo de sistema é ligada diretamente com o fornecimento de oxigênio dissolvido, conforme o tamanho dos agregados ou espessura do biofilme, maiores quantidades de oxigênio podem ser fornecidas, aumentando a eficiência do sistema (NIELSEN *et al*, 2005). Segundo STROUS, (2000) apud KHIN & ANNACHHATRE (2004), a estequiometria geral para a remoção de amônio via CANON dada pela equação 3.9.



O processo CANON é um processo econômico e eficiente para o tratamento de efluentes, atingindo remoções de até 1,5 kg N/m³.dia. Além disso, o processo consome 63% menos oxigênio que o processo de nitrificação convencional (SLIEKERS *et al*, STROUS, M. (2000) Microbiology of anaerobic ammonium oxidation. PhD Thesis, Kluwer Laboratory, Delft University, Delft, The Netherlands).

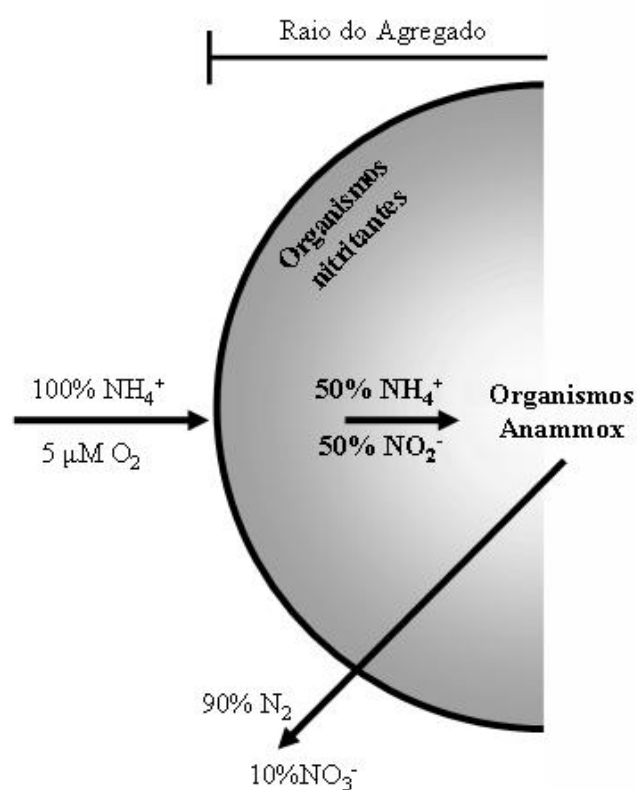


Figura 3.11: Representação esquemática de um agregado em um reator utilizando o processo CANON.

3.3.6. Vantagens e desvantagens dos processos

Diante desses diferentes processos de remoção de compostos nitrogenados, é necessário realizar uma avaliação criteriosa sobre aquele que mais se enquadra às necessidades do efluente a ser tratado.

Em uma comparação inicial dos processos descritos anteriormente, é interessante observar que os novos processos (ANAMMOX, SHARON e CANON) embora se apresentem como sendo mais econômicos sob o aspecto construtivo, necessitando de reatores menores, e no gasto com insumos (oxigênio e adição de carbono orgânico), eles demandam uma maior controlabilidade dos sistemas, necessitando de reatores equipados com modernos equipamentos de automação e controle, o que pode eventualmente inviabilizar economicamente e sua aplicabilidade em escala real.

Em uma comparação inicial, JETTEN, *et al* (2000) comparam os parâmetros obtidos para nitrificação convencional e pelo processo ANAMMOX. Na Tabela 3.3 fica evidente a baixa afinidade e a lenta duplicação dos microrganismos anammox frente à nitrificação convencional.

Tabela 3.3: Parâmetros para oxidação aeróbia e anaeróbia da amônia.

Parâmetro	Nitrificação	Anammox	Unidade
Energia Livre	-275	-357	Kj/mol
Rendimento de biomassa	0,08	0,07	mol/mol C
Velocidade aeróbia	200 a 600	0	nmol/min/mg proteína
Velocidade anaeróbia	2	60	nmol/min/mg proteína
Velocidade de crescimento	0,004	0,003	/hora
Tempo de duplicação	0,73	10,6	Dias
$K_s \text{ NH}_4^+$	5 a 2600	5	$\mu\text{mol L}^{-1}$
$K_s \text{ NO}_2^-$	-	< 5	$\mu\text{mol L}^{-1}$

Ks O₂	10 a 50	-	$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
-------------------------	---------	---	-----------------------------------

Fonte: Adaptado de JETTEN *et al*, 2000.

Tabela 3.4: Comparação dos novos processos de remoção de nitrogênio e o sistema de nitrificação e desnitrificação convencionais.

Característica	Sistemas			
	Nitrificação/ Desnitrificação convencional	ANAMMOX	SHARON	CANON
Número de reatores	2	1	1	1
Afluente	Água residuária	NH ₄ ⁺ ; NO ₂ ⁻	Água residuária	Água residuária
Efluente	NO ₂ ⁻ ; NO ₃ ⁻ ; N ₂	NO ₃ ⁻ ; N ₂	NH ₄ ⁺ ; NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻ ; N ₂
Condições	Óxico; anóxico	Anóxico	Óxico	Limitação de oxigênio
Requerimento de Oxigênio	Alto	Não	Baixo	Baixo
Controle de pH	Sim	Não	Não	Não
Retenção de biomassa	Não	Sim	Não	Sim
Requerimento de COD	Sim	Não	Não	Não
Produção de lodo	Alto	Baixo	Baixo	Baixo
Organismos	Nitrificantes autotróficos e desnitrificantes heterotróficos	Planctomycetes	Oxidadoras de NH ₄ ⁺	Oxidadoras de NH ₄ ⁺ e Planctomycetes

Fonte: Adaptado de JETTEN, *et al* (2002) apud KHIN & ANNACHHATRE (2004).

Porém, JETTEN, *et al* (2002) apud KHIN & ANNACHHATRE (2004) apresentam uma comparação entre os sistemas, permitindo uma melhor visualização das vantagens apresentadas pelos novos sistemas, apresentadas na Tabela 3.4. Neste sentido, JETTEN, *et al* (2004) afirmam que o sistema ANAMMOX pode reduzir em até 90% o custo operacional, quando comparado à sistemas de nitrificação/desnitrificação convencionais. Desta forma, o processo ANAMMOX é indicado para efluentes com elevadas concentrações de amônio e pouca matéria orgânica. Já que ele é capaz de substituir completamente o estágio de desnitrificação, economizar metade dos custos de aeração na etapa de nitrificação e não necessita de adição de carbono orgânico (FUJI *et al*, 2002).

A remoção total de nitrogênio pela combinação dos processos SHARON e ANAMMOX requer menos oxigênio (1,9 Kg O₂/Kg N ao invés de 4,6 Kg O₂/Kg N do sistema convencional), não necessita de fonte de carbono (enquanto que para o sistema convencional utiliza-se 2,6 Kg DBO/Kg N) e tem uma baixa produção de lodo (0,08 ao invés de 1 Kg SSV/ Kg N) (VAN LOOSDRECHT & JETTEN, 1998).

Muito se fala em economia com adição de carbono orgânico, já que estes processos são autotróficos, porém, deve-se lembrar que estas técnicas utilizam carbono inorgânico, o qual deve estar disponível em abundância para os microrganismos. Neste sentido, a Tabela 3.5 mostra uma comparação entre o consumo de alcalinidade e oxigênio dissolvido por diferentes processos.

Tabela 3.5: Comparação do consumo de alcalinidade e oxigênio dissolvido de diferentes processos de remoção de nitrogênio.

Processo	Primeira Etapa		Segunda Etapa	
	Oxigênio (g O ₂ /g N)	Alcalinidade (gCaCO ₃ /g N)	C Orgânico (gCOD/g N)	Alcalinidade (gCaCO ₃ /g N)
Nitrificação/Desnitrificação	4,57	1,14	3,7	(3,57)
Nitritação/ Desnitritação	3,43	7,14	2,3	(3,57)
SHARON/ ANAMMOX	1,71 a	3,57	-	0,24

	2,06			
CANON	1,94	3,68	-	-

Nota: () = alcalinidade produzida.

Fonte: Adaptado de AHN *et al*, 2006.

3.5. Técnicas de caracterização microbiológica

3.5.1. FISH (Hibridização Fluorescente “*In Situ*”)

O conhecimento das bactérias envolvidas na remoção do nitrogênio possibilita a identificação das condições favoráveis ao desenvolvimento destes microorganismos e caracterização do meio analisado, auxiliando nos estudos sobre melhores condições quantitativas e qualitativas para processos de tratamento de resíduos nitrogenados.

A hibridização fluorescente *in situ* - FISH (*fluorescence in situ hybridization*) - é uma das técnicas mais simples e rápidas aplicadas na detecção de espécies microbianas em amostras ambientais. A técnica baseia-se na observação de que existem seqüências conhecidas e tão específicas do ácido ribonucléico ribossômico (RNAr) de um organismo, que permitem que se desenhe uma seqüência complementar (sonda) à primeira. O RNAr está presente nas células metabolicamente ativas em grande número, o que permite a hibridização da sonda fluorescente aos ribossomos de células individuais específicas. Usualmente, a sonda fluorescente é uma seqüência pequena (15 a 30 nucleotídeos) de DNA de fita simples, ligada a fluoróforos, tais como: fluoresceína (Fluos), cianinas (Cy3 e Cy5) e rodamina. A sonda liga-se à seqüência complementar no RNAr e o microrganismo pode ser detectado por microscopia de fluorescência. (AMANN *et al*, 1990)

Na análise de FISH se determina a abundância relativa de um grupo de bactérias de interesse em relação a todas as células, feito através da utilização de corantes como o DAPI que se une a qualquer DNA, ou como porcentagem do número de bactérias do domínio Bactéria, utilizando a sonda EUB338. A relação EUB/DAPI dá um idéia aproximada da proporção de células bacterianas metabolicamente ativas, as células

coradas apenas com DAPI podem estar mortas ou inativas (ETCHEBEHERE & MENES, 2005)

Porém, esta técnica apresenta algumas desvantagens: um limite de detecção relativamente alto (10^3 a 10^4 cél./ mL); interferências com fluorescência de fundo; as sondas são muito específicas, limitando a aplicação do método e dificultando o desenvolvimento de novas sondas (AMANN *et al*, 1995; SHMID *et al*, 2000).

Esta técnica tem sido utilizada frequentemente para determinações qualitativas (KIELING *et al*, 2004) e quantitativas (ISAKA *et al*, 2005) de microrganismos oxidadores de amônio, sendo a sonda comumente utilizada a Amx-0820-a-A-22. Porém, devido a especificidade da sonda e a existência de diferentes espécies de microrganismos oxidadores de amônio, implica que obter resultados negativos de FISH para Anammox em uma determinada amostra, não significa que não se tem microrganismos anammox naquela amostra, apenas não se possui aquela determinada espécie (SHIMID *et al*, 2000)

3.5.2. PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

A técnica de PCR baseia-se na replicação *in vitro* do DNA a partir de um DNA molde, onde milhões de cópias de um determinado segmento são obtidas. A PCR é realizada a partir de uma enzima especial (Taq polimerase), nucleotídeos e iniciadores (“primers”). Os “primers” são seqüências curtas de DNA (aproximadamente 20 nucleotídeos) que se unem ao DNA molde e permitem a união da polimerase para iniciar a polimerização. Selecionando apropriadamente os “primers”, amplifica-se um determinado gene (ETCHEBEHERE & MENES, 2005).

A análise dos produtos de PCR normalmente é feita por eletroforese em gel de agarose, revelada por brometo de etídio. Com o auxílio de ferramentas computacionais, esta técnica pode oferecer tanto resultados qualitativos, quanto quantitativos dos produtos formados (LEHNINGER *et al.*, 2002).

O PCR é um método muito sensível de análise e por isso deve-se ter muito cuidado para evitar contaminações. Primeiramente extrai-se o material genético da célula sem danificá-lo. Normalmente o material extraído é o DNA. Depois de extraído o DNA, a este é adicionada uma mistura (pré-mix) que contém: os dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatos) para formação das novas moléculas, os primers e a enzima Taq polimerase em uma solução tampão. A mistura é colocada no termociclador, que faz ciclos de temperatura preestabelecidos com tempos exatos. Normalmente são realizados de 25 a 30 ciclos para cada reação na qual o total de células replicadas é a exponencial $2^{n^{\circ} \text{ de ciclos}}$ (SAIKI *et al*, 1988).

A PCR em si é apenas a replicação de um fragmento de DNA, complementar a ele, está a análise deste fragmento replicado. Uma das técnicas, como afirmado anteriormente, é a Eletroforese em gel, que se baseia na mobilidade eletroforética de fragmentos de DNA parcialmente desnaturizados com igual longitude mas seqüência diferentes, permitindo assim a obtenção de um padrão de bandas reflexo da presença ou não do organismo alvo na comunidade microbiana (ETCHEBEHERE & MENES, 2005).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Sistema de Tratamento

Foram adquiridos dois reatores tubulares com suporte de material plástico para imobilização da biomassa. Os reatores e seus periféricos estão expostos na Figura 4.1.

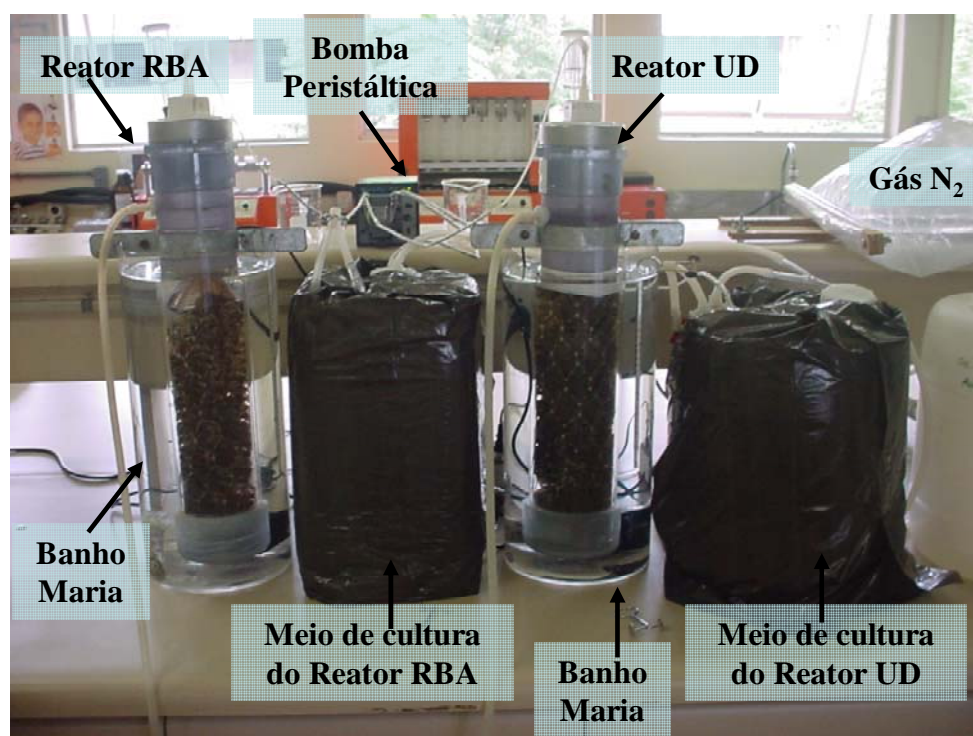


Figura 4.1: Disposição dos reatores e seus periféricos.

O sistema ainda é composto por bombonas de 20L onde é armazenado o meio de cultura à ser alimentado, estas bombonas eram totalmente vedadas, sendo sua tampa perfurada para passar as mangueiras de alimentação e a mangueira de silicone ligada ao reservatório de gás inerte. Este último consiste de um balão de nitrogênio gasoso, com o objetivo de evitar o contato do meio de cultura com o ar atmosférico e, uma eventual contaminação por oxigênio dissolvido. Por fim, foi realizado o controle da temperatura dos reatores através de banho-maria com termostatos de aquário, onde a água do banho era mantida em 35 ± 2 °C.

Os Reatores (Figura 4.2) eram feitos em vidro, com conexões em PVC, com um volume útil de 2L, sendo alimentado por uma bomba peristáltica (Masterflex 77120-62 de dois canais). Dois metros de tubo de tygon (D.I. de 0,06”), ligavam o reservatório de meio de cultura à um tubo de vidro (DI de 6 mm e 62 cm), passando pelo centro até o fundo do reator, promovendo um fluxo contínuo e ascendente. Na saída do reator foi instalada uma rede com poros de ≈ 1 mm de diâmetro, de forma a reter os aglomerados de microrganismos formados dentro do reator. Um funil de vidro na saída do reator, direcionar o gás produzido para um respiro. Além disso, ele estava disposto dentro de um banho maria feito em acrílico com volume total de 14 L, equipado com aquecedor, termostato e motobomba submersa para homogeneizar a água de aquecimento. A Tabela 4.1 apresenta um resumo das dimensões do reator e seus periféricos.



Figura 4.2: Reatores de vidro com material suporte de PVC e fluxo ascendente.

O material suporte foi fabricado e comercializado pela empresa japonesa Nitashi. Ele é composto por um polímero não biodegradável, formando uma rede nas dimensões de 30 x 40 cm, que foi enrolada de forma a formar um cilindro e recheiar o reator internamente.

Tabela 4.1: Resumo das características do reator e periféricos.

Características do reator	
Material	Vidro, com conexões em PVC
Altura	60 cm
Diâmetro Interno	7 cm
Volume total	2,3 L
Volume útil	2 L
TRH	24h até o dia 170 e 18h no restante do período
Características do material suporte	
Material	Fios de nylon envolvidos em polímero não biodegradável
Altura	30 cm
Largura	40 cm
Peso	31,6 g
Característica do Banho-maria	
Altura	45 cm.
Diâmetro	20 cm.
Volume total	14 L.
Bomba de recirculação	Motobomba Sarlo Better S90.
Aquecedor	Aquecedor de aquário com termostato 220V.

4.2. Inóculos

4.2.1. Origem

Com a finalidade de verificar a presença de bactérias oxidadoras anaeróbias de amônia, isto é, para o estabelecimento do processo ANAMMOX, em dejetos provenientes da suinocultura, foram escolhidas duas fontes de inóculo:

✓ Lodo UD: lodo retirado do fundo de uma lagoa experimental desativada, onde se desenvolveu um sistema de aeração intermitente a fim de promover a remoção de nitrogênio por Nitrificação/ Desnitrificação. Localizada na Unidade Demonstrativa (UD) da Embrapa, esta lagoa foi desativada cerca de dois anos antes de ser realizada a coleta do lodo, garantindo que esta biomassa esteve em anaerobiose completa durante um longo período de tempo. Além disso, o fato de existir amônio em abundância na lagoa, leva a existência de um ambiente favorável à sobrevivência de bactérias anaeróbias oxidadoras de amônia. A Figura 4.3 apresenta uma fotografia do aspecto do Lodo UD no ponto de coleta.

✓ Lodo RBA: A fim de se verificar a existência de microrganismos anammox em sistemas de tratamento de efluentes em funcionamento, foi utilizado como inóculo, o lodo do decantador secundário da estação de tratamento de dejetos suínos (ETDS) da EMBRAPA Suínos e Aves. Este decantador é a última etapa de um sistema composto de um reator UASB seguido por um sistema de lodos ativados (RBA). Caso os microrganismos Anammox estejam presentes, espera-se que seja em pequenas quantidades, devido a aeração e elevadas concentrações de nitrito existente no reator biológico que compõe o sistema de tratamento. Este ponto foi escolhido pelo fato de o efluente final ser composto de uma relação próxima de 1:1 de nitrito e amônio (KUNZ, 2004). A Figura 4.4 apresenta uma fotografia do reator RBA e seu respectivo decantador secundário da planta de tratamento de dejetos suínos da Embrapa, onde foi coletado o Lodo RBA para inóculo.



Figura 4.3: Coleta do lodo que serviu de inóculo para o Reator UD.



Figura 4.4: Vista superior do reator biológico aerado e ao centro o decantador secundário, fonte do inóculo para o Reator RBA.

4.2.2. Aclimação

Após a coleta dos inóculos procedeu-se a uma etapa de aclimação dos lodos, de forma a lavar e eliminar o máximo possível de microrganismos competidores ou que pudessem prejudicar o desenvolvimento dos microrganismos anammox. Também, foi nessa etapa que se procurou remover toda matéria orgânica disponível, a fim de evitar a inibição provocada pela mesma (JETTEN *et al*, 1999).

Desta forma, os lodos coletados foram dispostos em béqueres de 1L e lavados com água destilada em abundância. A matéria orgânica remanescente foi degradada biologicamente através da adição de várias alíquotas de NO_3^- , na forma de KNO_3 . Para estimular o crescimento das bactérias desnitrificantes. Este procedimento foi realizado de tal forma que a concentração de nitrato não excedesse o limite de inibição do processo ANAMMOX (DAPENA-MORA *et al*, 2006; STROUS *et al*, 1999). O consumo de NO_3^- foi o indicativo da degradação da matéria orgânica presente no inóculo. A partir do momento que a concentração de NO_3^- não variou mais, concluiu-se que grande parte de matéria orgânica havia sido degradada.

Neste período (63 dias), o lodo foi mantido sobre constante agitação, sendo que esta era desligada diariamente para coleta e análise do sobrenadante. Sempre que foi verificado o consumo de mais de 90% do NO_3^- , eram retirados 500 mL de sobrenadante, adicionado o mesmo volume de solução de KNO_3 a 100 mg L^{-1} de N-NO_3^- e $0,375 \text{ g L}^{-1}$ de NaHCO_3 , que atuava como tampão, para manter o pH entre 7 e 7,5 e como fonte de carbono inorgânico.

4.2.3. Inoculação

Foi fixado que deveria ser adicionado um volume de lodo tal, que se obtivesse após a inoculação uma concentração de 4 g/L de Sólidos Suspensos Totais nos reatores (VANOTTI, 2003).

Desta forma, o reator que recebeu o lodo proveniente da Unidade Demonstrativa, doravante chamado Reator UD, recebeu 300 mL de lodo aclimatado e uma complementação de 1.200 mL de lodo sem aclimação (tendo passado apenas por lavagens com água destilada), atingindo desta forma a concentração de 4 gSST/L desejada.

O reator que recebeu o lodo proveniente do decantador secundário da ETDS, doravante chamado Reator RBA, recebeu 250 mL de lodo aclimatado e uma complementação de 950 mL para atingir a concentração de 4 gSST/L.

4.3. Meio de cultura sintético

A alimentação dos reatores foi feita com meio de cultura, preparado semanalmente. As Tabelas 4.2 e 4.3 apresentam as composições das soluções preparadas.

Tabela 4.2: Composição e concentração da solução de macroelementos.

Nutriente	Concentração ($mmolL^{-1}$)	Concentração (mgL^{-1})
KHCO₃	1,25	125*
KH₂PO₄	0,19	27
FeSO₄.2H₂O	0,06	9
EDTA	0,01	5
MgSO₄.7H₂O	1,99	240
CaCl₂.2H₂O	1,29	143
NH₄Cl	Conforme a progressão de carga	
NaNO₂	Conforme a progressão de carga	
0,3 mlL ⁻¹ da solução de microelementos		

*Entre o dia 208 e 268, essa concentração foi elevada progressivamente até 500 mg/L.

Fonte: VANOTTI, (2004).

Tabela 4.3: Composição e concentração da solução de microelementos.

Nutriente	Concentração (mmolL⁻¹)	Concentração (mg·L⁻¹)
ZnSO₄	7,72	1247
MnSO₄	7,61	1149
CuSO₄·5H₂O	0,27	44
Al₂(SO₄)₃·14H₂O	0,59	201,5
Na₂MoO₄·2H₂O	0,63	129
CoCl₂·6H₂O	0,23	30
KCl	1,34	100
EDTA	2,600	975

Fonte: Adaptado de VANOTTI, (2004).

Para evitar a contaminação por O₂ nos reatores, borbulhava-se nitrogênio gasoso, utilizando uma pipeta como dispersor, no meio de cultura preparado na bombona de 20 L, até obter-se uma concentração de oxigênio dissolvido inferior a 0,5 mg·L⁻¹ de O₂. O procedimento era repetido sempre que era constatada uma contaminação por oxigênio ou quando da troca do meio de cultura.

4.4. Controle

4.4.1. Progressão de carga

A progressão de carga se deu através da fixação de uma eficiência de remoção à ser atingida, isto é, determinou-se que sempre que a concentração de saída fosse inferior à 30 mg N-NO₂⁻/L seria feito um aumento da carga de entrada através de uma mudança na concentração de nitrito e amônio do meio de cultura, mantendo o TRH constante. Até o dia 68 a progressão de carga do Reator RBA foi realizada segundo a eficiência atingida no Reator UD, devido a problemas operacionais. Após este período, a progressão de carga se deu independentemente para cada reator.

A vazão de alimentação sofreu apenas uma alteração ao longo do período de observação. Ela foi realizada da seguinte forma:

$$\text{Até o dia 170: } Q = \frac{V}{\text{TRH}} = \frac{2\text{L}}{1\text{d}} = 2\text{L/d} \quad (\text{Eq. 4.1})$$

$$\text{Após o dia 170: } Q = \frac{V}{\text{TRH}} = \frac{2\text{L}}{0,75\text{d}} = 2,67\text{L/d}$$

Onde:

Q: Vazão em $\text{L}\cdot\text{d}^{-1}$;

V: Volume útil do reator em litros;

TRH: Tempo de Retenção Hidráulico em dias.

Para o cálculo de carga volumétrica de nitrito e amônio convertidos e carga de nitrato produzido, utilizou-se a Equação:

$$q_v = \frac{C \times Q}{V} \quad (\text{Eq. 4.2})$$

Onde:

q_v : Carga volumétrica em $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$;

C: Concentração convertida ou produzida em $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$;

Para Nitrito: $C = (\text{mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ de N-NO}_2^- \text{ de entrada} - \text{mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ de N-NO}_2^- \text{ de saída})$

Para Íon Amônio: $C = (\text{mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ de N-NH}_4^+ \text{ de entrada} - \text{mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ de N-NH}_4^+ \text{ de saída})$

Para Nitrato: $C = (\text{mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ de N-NO}_3^- \text{ de saída} - \text{mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ de N-NO}_3^- \text{ de entrada})$

Q: Vazão em $\text{L}\cdot\text{d}^{-1}$;

V: Volume útil do reator em litros;

Quanto à eficiência de remoção de nitrogênio, a mesma foi determinada através do balanço das formas nitrogenadas em solução, conforme a Equação 4.3.

(Eq. 4.3)

$$\text{rem.(\%)} = \left(\frac{\left(\left(\text{mgN} - \text{NH}_4^+ \text{ convertido} \right) / \text{L} \right) + \left(\text{mgN} - \text{NO}_2^- \text{ convertido} \right) / \text{L} - \left(\text{mgN} - \text{NO}_3^- \text{ produzido} \right) / \text{L}}{\left(\text{mgN} - \text{NH}_4^+ \text{ entrada} \right) / \text{L} + \left(\text{mgN} - \text{NO}_2^- \text{ entrada} \right) / \text{L}} \right) \times 100$$

4.4.2. Obtenção dos coeficientes estequiométricos

Para o cálculo dos coeficientes estequiométricos da reação global nos reatores, considero-se o fato de que nas equações estequiométricas disponíveis na literatura (STROUS *et al*, 1998; VAN DE GRAAF *et al*, 1996) o componente íon amônio possui coeficiente 1,0. Desta maneira, procedeu-se da seguinte forma:

$$\text{CoeficienteNH}_4^+ = \frac{\text{Carga de NH}_4^+ \text{ convertido no dia } z \left(\frac{\text{mg N} - \text{NH}_4^+}{\text{L} \cdot \text{dia}} \right)}{\text{Carga de NH}_4^+ \text{ convertido no dia } z \left(\frac{\text{mg N} - \text{NH}_4^+}{\text{L} \cdot \text{dia}} \right)} = 1 \quad (\text{Eq. 4.4})$$

$$\text{CoeficienteNO}_2^- = \frac{\text{Carga de NO}_2^- \text{ convertido no dia } z \left(\frac{\text{mg N} - \text{NO}_2^-}{\text{L} \cdot \text{dia}} \right)}{\text{Carga de NH}_4^+ \text{ convertido no dia } z \left(\frac{\text{mg N} - \text{NH}_4^+}{\text{L} \cdot \text{dia}} \right)} \quad (\text{Eq. 4.5})$$

$$\text{CoeficienteNO}_3^- = \frac{\text{Carga de NO}_3^- \text{ produzido no dia } z \left(\frac{\text{mg N} - \text{NO}_3^-}{\text{L} \cdot \text{dia}} \right)}{\text{Carga de NH}_4^+ \text{ convertido no dia } z \left(\frac{\text{mg N} - \text{NH}_4^+}{\text{L} \cdot \text{dia}} \right)} \quad (\text{Eq. 4.6})$$

Onde,

z: um dia de observação qualquer.

Para melhor visualização dos resultados, graficou-se a dispersão Y/X, sendo que em Y foram dispostas as cargas removidas/ produzidas dos compostos em questão e, em X a respectiva carga de NH_4^+ removida. Desta maneira, obteve-se relações lineares, determinando o coeficiente angular, assim como o coeficiente de correlação destas relações lineares.

4.5. Métodos analíticos

Para acompanhar o desenvolvimento do processo ANAMMOX, análises de nitrogênio na forma de nitrato, nitrito e íon amônio e alcalinidade total foram realizadas em duplicatas, três vezes por semana durante as progressões de carga e, nos períodos de estabilidade no sistema, eram feitas apenas duas análises semanais.

4.5.1. Nitrito

Método:

Na determinação de nitrito optou-se por utilizar o método colorimétrico em um sistema de análise por injeção em fluxo conforme APHA, 1995, modificado segundo SCHIERHOLT NETO, *et al* (2006a).

Materiais e Soluções:

Foi utilizado um Sistema Multicanal FIALab – 2500. Cabos de fibra ótica SMA 200mm, que ligam a célula de reação ao espectrofotômetro (Ocean-optics S2000 – escala ótica de 200 a 850 nm). Lâmpada de halogênio de quartzo. Reagente de cor: Sulfanilamida, Ácido Ortofosfórico e N_1_naftiletildenodiamina dihidracloro, sendo todo reagente grau P.A..

Descrição do método:

O NO_2^- é determinado através da formação de um azo composto púrpura (λ_{max} em 540 nm) produzido pelo acoplamento entre o seu respectivo sal de diazônio, derivado da sulfanilamida, com N-(1-naftil)-etilediamina diidrocloreto, sendo que a faixa de aplicação do método é de 0,015 a 2 mgL^{-1} de N- NO_2^- . A curva padrão é preparada a partir de soluções padrões de NaNO_2 . As amostras eram diluídas com água deionizada até atingir uma concentração dentro da faixa de aplicação.

4.5.2. Nitrato

Método:

Na determinação de nitrato também se optou por utilizar o método colorimétrico em um sistema de análise por injeção em fluxo conforme APHA, 1995, modificado segundo SCHIERHOLT NETO, *et al* (2006a).

Materiais e Soluções:

Foi utilizado um Sistema Multicanal FIALab – 2500. Cabos de fibra ótica SMA 200mm, que ligam a célula de reação ao espectrofotômetro (Ocean-optics S2000). Lâmpada de halogênio de quartzo. Uma coluna com 5g de cádmio. Solução tampão: Cloreto de Amônio e EDTA Sal Dissódico. Reagente de cor: Sulfanilamida, Ácido Ortofosfórico e N_1_naftiletilenodiamina dihidraclorato, sendo todo reagente grau P.A..

Descrição do método:

Para a análise de nitrato a amostra, juntamente com a solução tampão de NH_4Cl (pH 8,5), passa por uma coluna de cádmio, onde todo o nitrato é reduzido a nitrito. O NO_2^- é determinado através da formação de um azo composto púrpura (λ_{max} em 540 nm) produzido pelo acoplamento entre o seu respectivo sal de diazônio, derivado da sulfanilamida, com N-(1-naftil)-etilediamina diidroclorato, sendo que a faixa de aplicação do método é de 0,04 a 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de N-NO_3^- , sendo a curva padrão preparada a partir de soluções padrões de KNO_3 e as amostras eram diluídas com água deionizada até atingir uma concentração dentro da faixa de aplicação. A concentração de nitrato é obtida pela diferença da análise da mesma amostra com e sem a coluna de cádmio.

4.5.3. Nitrogênio amoniacal total

Método:

Para determinação de nitrogênio amoniacal total, utilizou-se o método de destilação e titulação (método 4500-NH₃-B, segundo APHA, 1995).

Materiais e soluções:

Utilizou-se um conjunto para destilação, destilador TECNAL – TE-036/1, um pHmetro MICRONAL B474 e um titulador semi-automático TITRONIC T-200. Para a análise, se fez necessário preparar as seguintes soluções: Ácido sulfúrico 0,025 mol·L⁻¹ (devidamente padronizado através de destilação de solução de Hidroximetil amino metano); Oxido de magnésio; NaOH 10 mol·L⁻¹; Solução mista de Ácido Bórico (indicador vermelho de metila, verde de bromocresol, indicador de ácido bórico e NaOH 0,05 mol·L⁻¹, todos devidamente misturados e homogeneizado).

Discrição do método:

Destilou-se 10mL da amostra, sendo o destilado recolhido em 8 mL de solução mista de ácido bórico. A amônia do destilado é determinada titulometricamente (até pH 4,2) com ácido sulfúrico 0,025 mol·L⁻¹. Sendo que o valor da amônia é determinado pela equação:

$$\text{mg N - NH}_3 \cdot \text{L}^{-1} = \frac{2 \times (A - B) \times M \times 14000}{V} \quad (\text{Eq. 4.7})$$

Onde:

A = Volume de H₂SO₄ usado na titulação da amostra (mL);

B = Volume de H₂SO₄ usado na titulação do branco (mL);

M = Molaridade do ácido (mol·L⁻¹);

V = Volume de amostra (mL).

4.5.4. Alcalinidade total

Método:

Para determinação de alcalinidade, utilizou-se do método titulométrico (método 2320B, segundo APHA, 1995). Este método é aplicável à determinação da presença de carbonato e bicarbonatos em efluentes de sistemas de tratamentos de resíduos e água em geral.

Materiais e soluções:

Utilizou-se pHmetro TECNAL Tec-3MP; Bureta graduada de 25mL; solução padrão de H_2SO_4 $0,005 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Descrição do método:

É dada pela concentração de ions OH^- , HCO_3^- e CO_3^{2-} que podem ser titulados através de uma reação neutralizante com o ácido até pH 4,5. Uma alíquota de 50mL da amostra era disposta em um becker de 100mL, sendo introduzido no mesmo o eletrodo de pH e temperatura. Após anotar o pH da amostra, procedia-se a titulação com ácido até atingir pH 4,5. O volume de ácido gasto era anotado. O valor de alcalinidade é obtido segundo a equação:

$$\text{mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1} = \frac{M \times A \times 100000}{V} \quad (\text{Eq. 4.8})$$

Onde,

A= volume de ácido titulado (mL);

M= molaridade do ácido padronizado ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$);

V = Volume de amostra (mL).

4.6. Caracterização Microbiológica

As análises de FISH e PCR não obedeceram uma frequência analítica pré-determinada. As análises de FISH foram feitas no decorrer do experimento, de forma aleatória e com amostragem em diferentes pontos do reator. Já o PCR, foi realizado apenas ao final dos experimentos.

4.6.1. FISH

Método:

A metodologia utilizada para determinação de FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) seguiu as orientações de fixação e preparo de lâminas para análise microscópica, segundo AMANN *et al*, 1990.

Materiais e soluções:

Solução de NaH_2PO_4 $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e de Na_2HPO_4 $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para a preparação de um tampão de fosfato de sódio (PBS) que foi utilizado juntamente com uma solução de NaCl $5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, na elaboração de duas novas soluções, uma vez e três vezes concentradas, de tampão PBS. A PBS concentrada três vezes, juntamente com uma solução de NaOH $10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, foi utilizada na preparação do paraformaldeído 4% utilizado na fixação, assim como a solução de PBS uma vez concentrada. Também foi preparada uma solução de hibridização (HB).

Preparou-se uma solução de DAPI estoque ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), onde todo DNA é corado com fluorescência azul. A solução de trabalho é de $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. As sondas utilizadas são mostradas na Tabela 4.4. Já as soluções tampão de lavagem são preparadas de acordo com a concentração de formamida utilizada no tampão de hibridização.

Descrição do método:

As amostras foram fixadas utilizando as soluções de PBS e paraformaldeído 4%. Para hibridização, as amostras eram secas, imersas em etanol e secas novamente. Em seguida eram adicionadas a solução de hibridização e as sondas e, então, secadas novamente. Era adicionado o DAPI, secando a lâmina em seguida e procedendo a lavagem, por fim deixavam-se as lâminas para secar em temperatura ambiente e local escuro.

Tabela 4.4: Informações sobre as sondas de FISH utilizadas. Todas as sondas são seqüências homologas a um fragmento do RNAr 16S dos microrganismos alvos.

Sonda	Especificidade	Seqüência	FA (%)	Referência
EUB mix (EUB338 I + EUB338 II + EUB338 III)	Todas as bactérias	5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'	20	Amann <i>et al.</i> (1990).
Nso190	Todas as AOB beta	5-CGATCCCCTGCTTTTCTCC-3	55	Mobarry <i>et al.</i> (1996).
NIT3 (alfa) Competitor	<i>Nitrobacter</i> sp A maioria das	5-CCTGTGCTCCATGCTCCG-3 *5-CCTGTGCTCCATGCTCCG-3	40	Wagner <i>et al.</i> (1996).
NEU Competitor	<i>Nitrosomonas</i> sp haloficas e halotolerantes	5'-CCCCTCTGCTGCACTCTA-3' *5'-TTCCATCCCCCTCTGCCG-3'	40	Wagner <i>et al.</i> (1995).
Nmv	<i>Nitrosococcus mobilis</i>	5-TCCTCAGAGACTACTACGCGG-3	35	Juretschko <i>et al.</i> (1998).
Ntspn693	<i>Nitrospina gracilis (delta)</i>	5-TTCCCAATATCAACGCATTT-3	20	Juretschko S. (2000).
Ntspa 662	<i>Nitrospira</i> sp (filo <i>Nitrospira</i>) Candidatus ' <i>Brocadia anammoxidans</i> '	5'-GGAATTCCGCGCTCCTCT-3' * 5'-GGAATTCCGCTCCTCT-3'	35	Daims <i>et al.</i> (2001).
AMX820	and Candidatus ' <i>Kuenenia stuttgartiensis</i> '	5'- AAA ACC CCT CTA CTT AGT GCC C -3'	40	Schmid <i>et al.</i> (2001).

Para a análise microscópica, utilizou-se microscópio com epifluorescência, onde se observou, em cada célula, todo DNA corado com fluorescência azul (DAPI) e, comparou-se com o que estava corado com fluorescência vermelha (sonda), proporcionando uma visão dos microorganismos e suas respectivas quantidades presentes em cada amostra. Quando as amostras fixadas apresentavam células bem separadas, não muito agrupadas ou compactadas em colônias, era possível se fazer uma quantificação mais precisa dos microorganismos.

4.6.2. PCR

Método:

Para análise de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), foi utilizada a metodologia clássica (LEHNINGER *et al.*, 2002).

Materiais e soluções:

O DNA das amostras era extraído utilizando o KIT comercial DNA Purification – Wizard Genomic – Promega; PCR Super Mix; template; Primers Pla 46F e AMX 820R. Termociclador Thermo Hybaid - PCR Sprint Temperature Cycling System HBSP02. Para análise dos produtos utilizou-se de eletroforese em gel de agarose 0,8%.

Descrição do método:

Após realizada a coleta das amostras, realizou-se a extração do DNA genômico. Para isso, foi utilizada a metodologia descrita no KIT comercial DNA Purification KIT – Wizard Genomic – Promega.

Preparava-se previamente uma solução contendo 20µL de PCR Super Mix, 5µL do template recém preparado, 1µL de cada primer (correspondente aos primers: Pla 46F e AMX 820R) e completava-se o volume final de 25 µL com água deionizada. Após

esta etapa, procedia-se à polimerização no termociclador previamente ajustado conforme a Tabela 4.5.

A análise dos produtos de PCR foi feita por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TBE 0,5X, revelada por brometo de etídio. A intensidade das bandas (que aparecerem em aproximadamente 800 p.b.) foram observadas para uma avaliação qualitativa dos produtos formados.

Tabela 4.5: Configuração do termociclador para análise de PCR.

Estágios	Tempo	Temperatura (°C)
Estágio 1	4 min.	95
	45 s	95
Estágio 2 (35 ciclos)	45 s	56
	1 min.	72
Estágio 3	3 min.	72

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. *Aclimação dos inóculos*

A aclimação dos lodos durou 63 dias. Nesse período, observou-se que não havia mais consumo de NO_3^- , sendo este o indicativo da degradação da maior parte da matéria orgânica disponível. Desta forma, procedeu-se a inoculação dos reatores de forma a obter uma concentração final de 4g/L de Sólidos Suspensos Totais, como descrito no item 4.1.3.

Deu-se início então, a alimentação com o meio de cultura. Alimentavam-se os reatores a uma carga de $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ de N, sendo metade de N-NO_2^- e metade de N-NH_4^+ . Esta carga foi mantida por 75 dias. Durante este período, utilizava-se como metodologia analítica para análise de nitrito e nitrato o método Eletroquímico (APHA, 1995).

Porém, quando se iniciou a progressão de carga, observou-se uma falha na metodologia que culminou no descarte de todos os dados analíticos deste período. Esta falha consistiu no fato de a membrana do equipamento ter sido danificada no decorrer do experimento, provocando erros na leitura, além do fato de se identificar interferentes, provocando falsos positivos.

5.2. *Remoção de compostos nitrogenados*

Após os 75 dias de alimentação a $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ de N-NO_2^- e $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ de N-NH_4^+ , a carga de alimentação foi reduzida a $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ de N-NO_2^- e $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ de N-NH_4^+ , no meio sintético e, iniciou-se a progressão de carga.

A Tabela 5.1 mostra a evolução da progressão de carga do Reator RBA. Nela estão expostos os valores de carga preteridos e aqueles realmente obtidos para os respectivos períodos, mostrando a estabilidade do meio de cultura preparado. Para este reator observam-se três fases distintas. A fase A vai até o dia 68, a fase B está entre o dia 69 e o dia 216 e, a terceira fase, C, foi do dia 217 a 271.

Tabela 5.1: Progressão de carga para o reator RBA.

Fase	Período (dias)	Carga alimentada de Nitrito + Amônio (mg N/L.d)	Carga alimentada de Nitrito + Amônio (mg N/L.d)
		<i>Objetivo</i>	<i>Média Observada no período</i>
A	0 a 12	60	58,0±8,7
	13 a 19	120	113,9±10,0
	20 a 26	180	179,7±3,8
	27 a 61	240	240,7±6,0
	62 a 68*	240	312,18±5,3
B	68 a 89	80	79,2±13,9
	90 a 140	140	135,1±3,9
	141 a 216**	180	173,2±5,1
C	216 a 231	240	229,7±6,3
	232 a 271	300	289,7±7,4

* No preparo do meio de cultura para os intervalo entre os dias 63 e 67, devido à um erro de pesagem, inverteram-se as massas de nitrito e amônio.

** No dia 170 optou-se por aumentar a vazão de 2 para 2,67L/d, reduzindo o TRH para 18 horas (após verificado que não ocorreria perda de células). Desta maneira, reduziu-se a concentração de N no meio de cultura de forma a manter a carga. Isso permitiria, no futuro, um aumento de carga sem provocar inibição dos microrganismos pela concentração de nitrito.

Já a Tabela 5.2 mostra a evolução da progressão de carga do Reator UD. Para este reator observam-se também três fases distintas. A fase A vai até o dia 75, a fase B está entre o dia 76 e o dia 216 e, a terceira fase, C, foi do dia 217 a 348.

Tabela 5.2: Progressão de carga para o reator UD.

Fase	Período (dias)	Carga alimentada de Nitrito + Amônio (mg N/L.d)	Carga alimentada de Nitrito + Amônio (mg N/L.d)
		<i>Objetivo</i>	<i>Média Observada no período</i>
A	0 a 12	60	58,0±8,7
	13 a 19	120	113,9±10,0
	20 a 26	180	179,7±3,8
	27 a 67*	240	240,7±6,0
	68 a 75*	300	296,4±18,5
B	76 a 104	150	152,1±5,4
	105 a 140	200	196,3±5,5
	141 a 169	240	229,3±3,8
	170 a 216**	240	229,8±6,0
C	217 a 231	300	288,1±6,8
	232 a 266	420	407,8±6,5
	267 a 322***	620	587,6±13,6
	323 a 348	400	381,8±13,2

* No preparo do meio de cultura para os intervalo entre os dias 63 e 67, devido à um erro de pesagem, inverteram-se os pesos de nitrito e amônio. E, no intervalo entre os dias 68 e 75, novamente devido a um erro no preparo do meio, não se adicionou bicarbonato ao meio nesse período. Isto provocou uma queda da eficiência, levando a uma possível morte de microrganismos, visto que, mesmo após uma redução da carga de entrada existiu um lapso de 104 dias para retomar a atividade anterior.

** No dia 170 optou-se por aumentar a vazão de 2 para 2,67L/d, reduzindo o TRH para 18 horas (após verificado que não ocorreria perda de células). Desta maneira, reduziu-se a concentração de N no efluente de entrada de forma a manter a carga (Eq.4.2). Isso permitiria, no futuro, um aumento de carga sem provocar inibição dos microrganismos pela concentração de nitrito.

*** Neste período, optou-se por testar a inibição dos organismos por parte do nitrito, alimentando os reatores com concentração de nitrito de 230 mg N-NO₂⁻/L.d.

As planilhas de acompanhamento dos reatores podem ser observadas em Anexo.

5.2.1 Reator RBA

No reator RBA aconteceram dois eventos significativos, E.1 e E.2. O E.1 faz referência ao ponto em se passou a fazer a progressão de carga independente para o reator RBA, ele ocorre no dia 68, onde a carga de alimentação é reduzida de 240 mg N/L.d para 80 mg N/L.d. Já o evento E.2 marca o início de uma queda na eficiência do reator, sem causa identificada.

A Figura 5.1 mostra as concentrações de entrada e saída das diferentes formas nitrogenadas. Nela ficam evidentes os pontos em que existiu progressão ou regressão na carga aplicada, pois a vazão era constante em 2L/d até o dia 170 e 2,67L/d após. No dia 170, a concentração foi reduzida juntamente com o aumento da vazão de forma que a carga aplicada permaneceu a mesma.

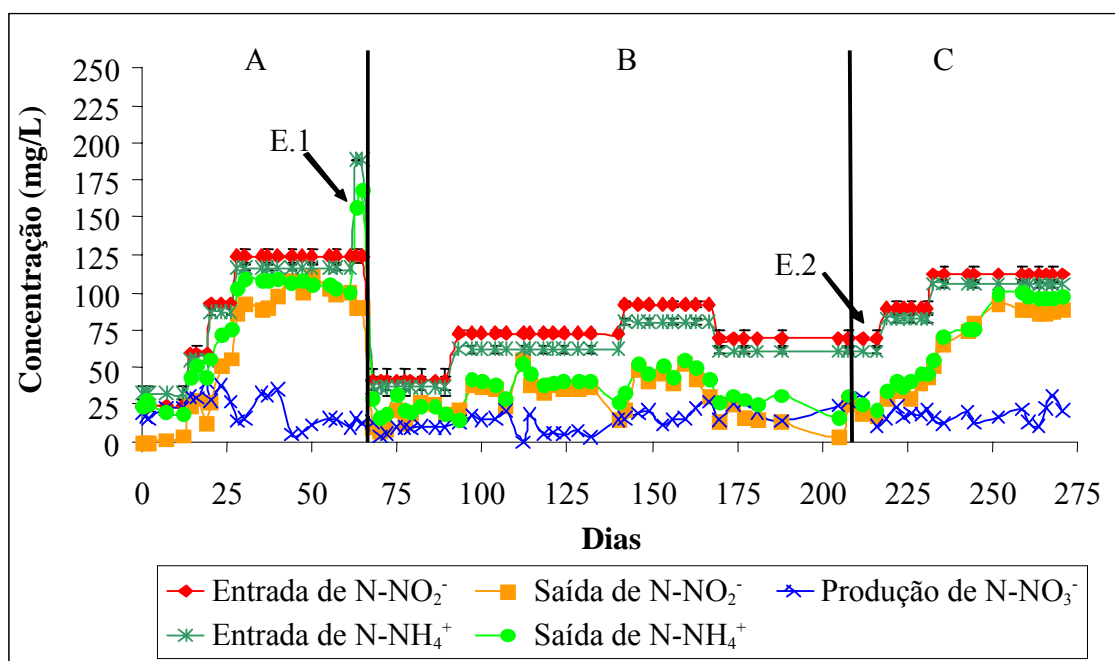


Figura 5.1: Evolução das concentrações de entrada e saída das diferentes formas nitrogenadas no reator RBA.

Para as concentrações de nitrito e amônio de entrada foi feita uma média do período em que estas eram constantes, de forma a facilitar a visualização dos gráficos e

pelo fato de a variação da concentração ser muito pequena, como fica evidente pelas barras indicando o desvio padrão das concentrações médias.

Na Figura 5.1, também se observa a consequência de um erro no preparo do meio, ocasionando o pico de amônio indicado em E.1, além da gradual diminuição da remoção de nitrito e amônio em E.2. Dois fatos chamam a atenção, o de que pouco antes de o sistema parar de remover nitrogênio, sua eficiência vinha aumentando (dias 160 a 180) e que a produção de nitrato permaneceu constante durante todo o período, independente da quantidade de amônio removido. Este último fato pode ser explicado pela pequena conversão estequiométrica do nitrato na equação global para ANAMMOX, que fica em torno de 0,22 (STROUS *et al*, 1998) a 0,26 mol N-NO₃⁻ / mol de N-NH₄⁺ (VAN DE GRAAF *et al*, 1996).

As fases A, B e C não foram pré-determinadas, elas representam os diferentes comportamentos dos reatores. Desta maneira, a Fase A para o reator RBA consiste na fase em que o mesmo recebia a mesma carga alimentada que o reator UD. Como havia apenas uma bomba peristáltica e um número limitado de reservatório de meio de cultura para os dois reatores, as variações de carga tinham de ser feitas através da variação na concentração do nitrito e amônio de entrada. Esta limitação operacional foi o motivo de até o dia 68 o reator RBA receber aumentos de carga, mesmo não atingindo valores inferiores a 30 mg N-NO₂⁻L⁻¹ na saída. Esses aumentos acompanhavam a evolução do reator UD.

Já a fase B se inicia com a separação da alimentação dos reatores, permitindo assim uma redução na carga de entrada e uma progressão independente para o reator RBA. Mesmo assim, o aumento de remoção se deu muito lentamente, considerando que mesmo na sua maior carga removida, este reator não removeu o que o reator UD fez com 60 dias de operação (conforme observado ao comparar as Tabelas 5.1 e 5.2).

Por fim, a fase C foi determinada como sendo aquela após a correção da concentração de bicarbonato (ver item 5.2.2.). Para o Reator RBA, a mudança na

concentração de bicarbonato de entrada não surtiu nenhum efeito aparente na eficiência de remoção.

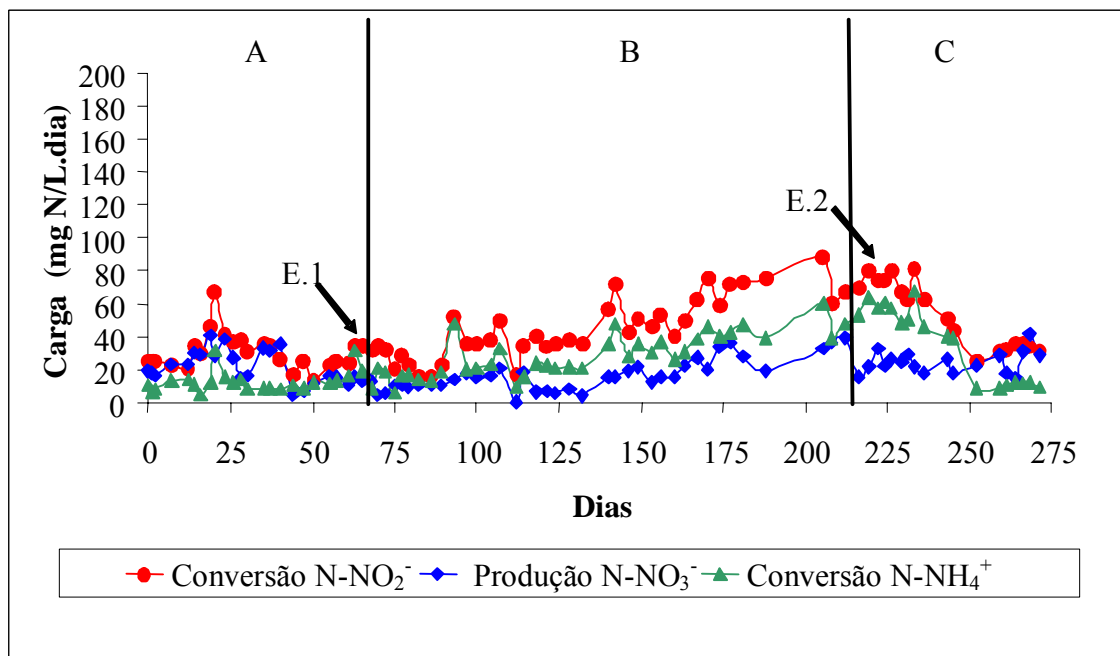


Figura 5.2: Evolução da carga de nitrito e amônio convertido e nitrato produzido em função do tempo no Reator RBA.

Na Figura 5.2 observa-se a evolução das cargas removidas de nitrito e amônio e produzida de nitrato. É possível observar que até o dia 90 grande parte do nitrito removido estava sendo convertido a nitrato. Nela também fica evidente que na Fase B o reator passou a mostrar um aumento nas cargas removidas de nitrito e amônio, assim como na carga produzida de nitrato. Imediatamente após o aumento da concentração de bicarbonato (dia 208), observa-se uma estabilização na remoção de nitrito e amônio e uma redução na quantidade de nitrato produzido.

5.2.2 Reator UD

No acompanhamento deste reator, destacam-se quatro eventos E.1 a E.4. E.1 foram os erros em seqüência no preparo do meio de cultura. Em E.2, dia 170, a vazão

foi elevada de $2 \text{ L}\cdot\text{d}^{-1}$ para $2,67 \text{ L}\cdot\text{d}^{-1}$ (de forma a reduzir o TRH de 24 para 18 h), mas a carga alimentada foi mantida pois a concentração do meio de cultura foi reduzida (Figura 5.3). Já E.3, é referente ao aumento da concentração de bicarbonato no meio, o efeito positivo desta alteração fica evidente ao observar o significativo aumento na remoção de nitrito e amônio no período subsequente. Por fim, E.4 se refere ao momento que o início da inibição por nitrito, em $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($140 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de $\text{N}\cdot\text{NO}_2^-$), foi ultrapassado, já que a concentração do mesmo foi elevada para $230 \text{ mg N}\cdot\text{NO}_2^-/\text{L}$, embora tenha ficado abaixo de $350 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de $\text{N}\cdot\text{NO}_2^-$, concentração que, é capaz de inibir em 50% a atividade máxima dos microrganismos anammox (DAPENA-MORA *et al.*, 2006).

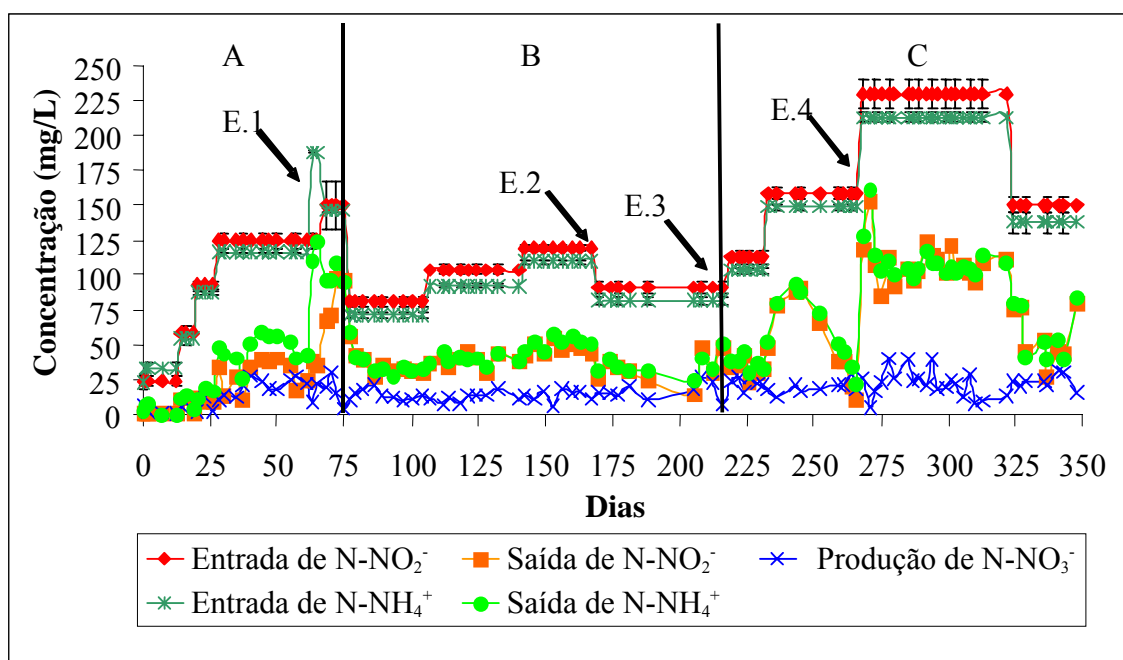


Figura 5.3: Evolução das concentrações de entrada e saída das diferentes formas nitrogenadas no reator UD.

A Figura 5.3 mostra o comportamento das concentrações de entrada e saída de nitrito e amônio e a produção de nitrato. Nela fica evidente o comportamento do reator frente aos eventos em destaque e a estabilidade do mesmo durante a Fase B, voltando a ter uma remoção significativa apenas após E.3, isto é, após a correção do bicarbonato. O

novo período de estabilidade após E.4 pode ser atribuído à inibição parcial da atividade pelo aumento da concentração de nitrito acima dos níveis inibitórios.

Durante a Fase A para o reator UD, o mesmo apresentou um excelente comportamento, permitindo uma rápida progressão de carga. Tal comportamento seria esperado para inóculos mais ricos em microrganismos anaeróbios oxidadores de amônio, além disso, não se pode desconsiderar os 63 dias de aclimatação e os 75 dias de dados descartados, onde o reator já estava submetido à condições propícias ao sistema ANAMMOX. Esse resultado seria comparado àqueles que obtiveram o start-up de reatores mais rápido, da ordem de três meses (JETTEN *et al*, 1999).

Porém, a evolução do reator não se mostrou contínua, como se ele tivesse atingido um limite de remoção (do dia 20 ao dia 63) de 145 mg N/L.d em média. Não se sabe por quanto tempo esta estabilização continuaria, pois ocorreram problemas operacionais no preparo do meio de cultura da semana do dia 63. Desta forma, do dia 63 ao 68, o reator ficou submetido a uma carga de amônio muito superior à de nitrito, segundo (DAPENA-MORA *et al*, 2006; STROUS *et al*, 1999b) o íon amônio só passa a ser inibidor em concentrações muito elevadas, da ordem de 50 mmol.L⁻¹ (700 mg.L⁻¹ de N-NH₄⁺). Desta maneira, não era de se esperar que este problema no meio de cultura prejudicasse o reator, já que a concentração atingida foi de 180 mg.L⁻¹ de N-NH₄⁺, isto é 13mmol.L⁻¹.

Neste ponto, dia 68, inicia-se a Fase B, onde após dois problemas consecutivos o reator iniciou um lento processo de recuperação. O incidente que provocou um dano significativo ao reator ocorreu no intervalo entre os dias 68 e 75, onde o reator não foi alimentado com bicarbonato. A função do bicarbonato, além de regular e manter o pH, é de ser fonte de carbono para os microrganismos autotróficos. Com este evento, ficou evidente a dificuldade do estabelecimento do processo ANAMMOX, já que foram precisos 104 dias para se obter o primeiro resultado com remoção equivalente aquela existente até o dia 75.

Além deste fato, no dia 67 retirou-se aproximadamente 80 mL de lodo depositado no fundo do reator para inocular um reator de batelada e realizar ensaios cinéticos. Embora possa ter sido retirado um lodo rico em microrganismos anammox, debilitando o Reator UD, o reator em batelada não apresentou nenhum tipo de atividade de remoção, permanecendo inerte durante os dois meses de observação e, por este motivo, não teve seus dados apresentados neste trabalho.

Considerou-se como início da Fase C, o dia 216 que está entre os dias 208 e 268 (período de aumento gradual de bicarbonato, partindo da concentração de 125 mg/L até 500 mg/L). Neste dia, iniciou-se um aumento significativo da remoção de nitrito e amônio, mostrando o efeito positivo do bicarbonato. Este fato explicaria porque ao final a Fase A observou-se uma estabilidade de remoção, que ocorreu devido ao fato de o bicarbonato estar atuando como limitante do processo, visto sua participação fundamental como fonte de carbono para os microrganismos autotróficos.

A mudança do bicarbonato ocorreu no intuito de iniciar os preparativos dos reatores para começarem a receber efluente real de suinocultura. Este tipo de efluente apresenta uma alcalinidade da ordem de $500 \text{ mg CaCO}_3\text{L}^{-1}$ (VANOTTI, 2004). Porém, como ficou evidente um novo aumento na remoção de nitrogênio, optou-se por manter os reatores com meio de cultura por mais tempo, visando um aumento da biomassa especializada.

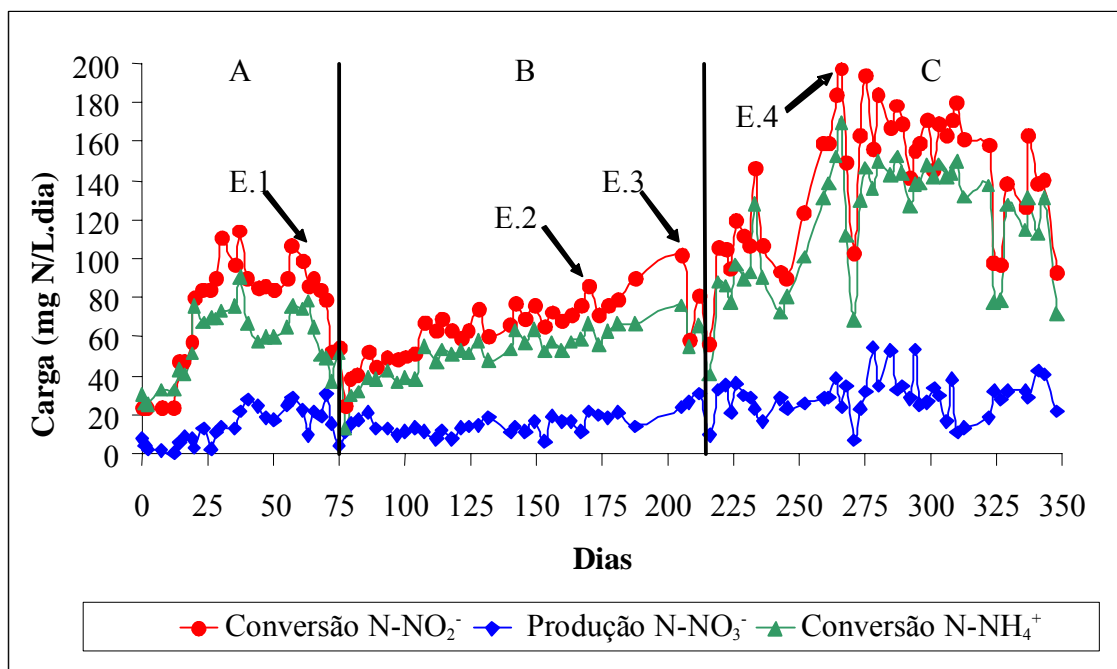


Figura 5.4: Evolução da carga de nitrito e amônio convertido e nitrato produzido em função do tempo no Reator UD.

A Figura 5.4 mostra a remoção das cargas de nitrito e amônio e a produção de nitrato. Nela também é possível visualizar as fases e os eventos principais que ocorreram no período. Ao comparar as Figuras 5.2 e 5.4, fica evidente como o reator UD apresentou um comportamento muito melhor que o reator RBA. Nessa figura observa-se o rápido aumento de remoção no início da Fase A e a estagnação até o problema com o bicarbonato e retirada de lodo (evento E.1) e sua recuperação no restante do período de observação.

Por fim, pode ser observado nas Figuras 5.3 e 5.4 que a produção de nitrato, diferentemente do reator RBA, acompanhou o crescimento da remoção de nitrito e amônio.

5.2.3 Comparativo entre os reatores RBA e UD

Observando a evolução dos dois reatores, verificou-se uma superioridade do reator UD sobre o reator RBA durante uma pequena parte do período, seja em termos de eficiência, apresentada na Figura 5.5 ou carga removida, apresentada na Figura 5.6.

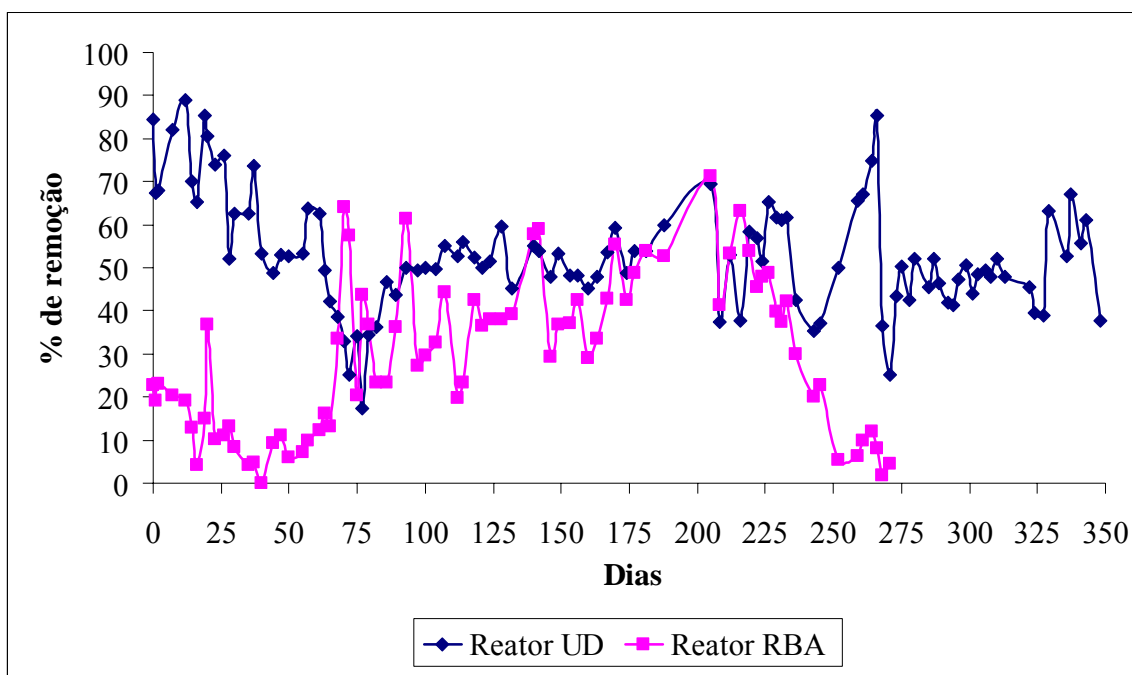


Figura 5.5: Evolução da eficiência de remoção de nitrogênio nos Reatores UD e RBA.

Na Figura 5.5 fica evidente uma maior estabilidade de remoção e o alcance de picos de eficiência mais elevados por parte do Reator UD. Ambos os reatores sofreram aumentos de carga durante todo o período, visto que o objetivo do experimento era aumentar ao máximo a quantidade de microrganismos específicos e com isso obter a remoção de cargas mais elevadas e mais próximas da realidade do efluente final de uma estação de tratamento de dejetos de suínos.

Já a Figura 5.6 deixa evidente a elevada capacidade de remoção deste processo. Nela observa-se que até o dia 68 ambos os reatores eram alimentados com a mesma carga e que após a separação e com uma progressão de carga mais adequada, o Reator RBA passou a apresentar resultados mais expressivos, chegando a remover a mesma quantidade que o Reator UD. O efeito do aumento da concentração de bicarbonato é facilmente observado pelo aumento na remoção de N do Reator UD entre os dias 250 e 275. Também fica evidente o fim da atividade do Reator RBA após o dia 250.

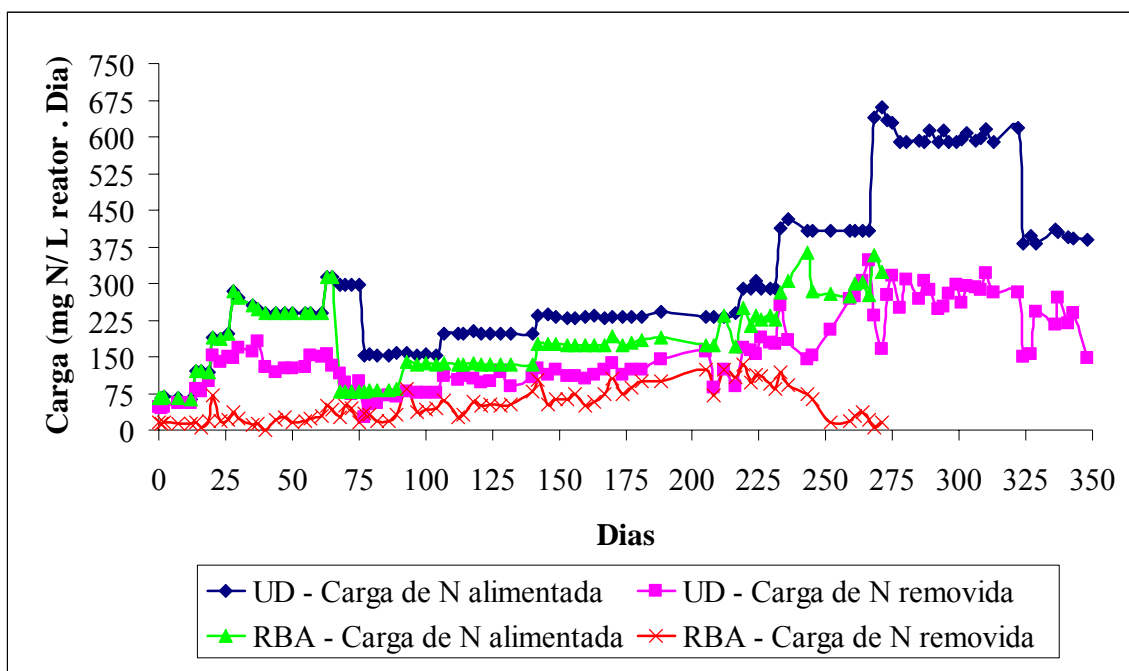


Figura 5.6: Evolução das cargas de nitrogênio alimentada e removida pelos Reatores UD e RBA.

Por fim, observa-se que após o último aumento de carga, colocando a concentração de nitrito em níveis considerados inibitórios, a remoção de nitrogênio se estabilizou, mas não diminuiu, mostrando uma tolerância do processo as concentrações utilizadas.

Tabela 5.3: Resumo com a carga máxima removida por cada um dos reatores.

Reator	Período (Dia)	Carga máxima removida (mg N·L ⁻¹ ·d ⁻¹)
UD	264 a 310	290,3
RBA	170 a 205	103,6

A Tabela 5.3 mostra o excelente desempenho do Reator UD com uma remoção de 290,3 mg N·L⁻¹·d⁻¹, valor próximo àquele encontrado por MULDER, *et al* (1995) de 400 mg N·L⁻¹·d⁻¹, mostrando que o sistema ainda tem potencial.

5.3. Obtenção dos coeficientes estequiométricos

Conforme observado na equação estequiométrica 3.7, STROUS *et al.* (1998) afirmam que existe uma correlação entre o consumo de amônio e carbonato de $1(\text{NH}_4^+):0,066(\text{HCO}_3^-)$. Porém, devido a uma limitação analítica, tal correlação não poderia ser feita de forma precisa. Era de se esperar que, em sistemas predominantemente ANAMMOX, existisse uma forte correlação entre o consumo de alcalinidade e amônio.

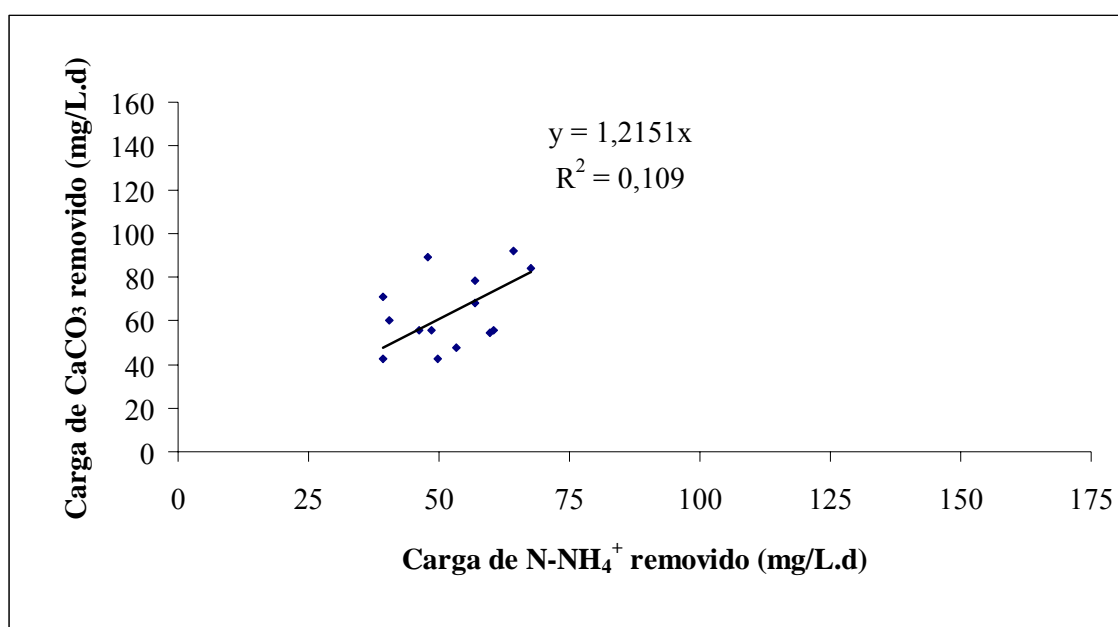


Figura 5.7: Relação entre a remoção de Amônio e a Remoção de alcalinidade para o Reator RBA.

A Figura 5.7 mostra a correlação entre a remoção de alcalinidade expressa em termos de CaCO_3 e a remoção de N-NH_4^+ para o Reator RBA. Fica evidente uma baixíssima correlação, com um R^2 da ordem de 0,11, mostrando que a remoção de alcalinidade independe da remoção de amônio.

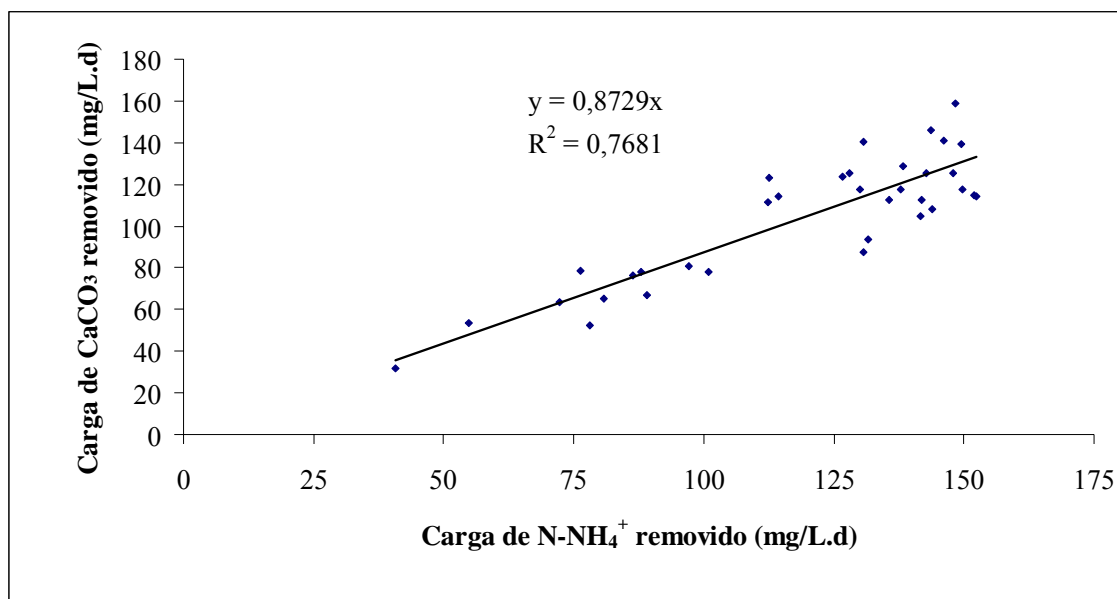


Figura 5.8: Relação entre a remoção de Amônio e a Remoção de alcalinidade para o Reator UD.

Porém, ao se observar a Figura 5.8, fica evidente que para o Reator UD a remoção de alcalinidade é diretamente proporcional a remoção de amônio, com um R^2 da ordem de 0,77. Esse resultado é um indicativo de que a amônia removida neste reator se deve a um processo autotrófico, tal como o processo ANAMMOX. Como afirmado anteriormente, o valor encontrado para remoção de alcalinidade não pode ser comparado ao coeficiente estequiométrico da literatura, pois no consumo de alcalinidade também está contabilizado o gasto de bicarbonato para manutenção do pH, que ficou em $7,1 \pm 0,2$ na saída do reator.

Segundo JETTEN *et al* (1999) existe um consumo e produção proporcional de $\text{NH}_4^+:\text{NO}_2^-:\text{NO}_3^-$ da ordem de 1:1,31:0,22. Desta forma, conforme exposto no item 4.2, obteve-se essa relação para os reatores UD e RBA, sendo que a evolução dos mesmos pode ser observada nas Figuras 5.9 e 5.10.

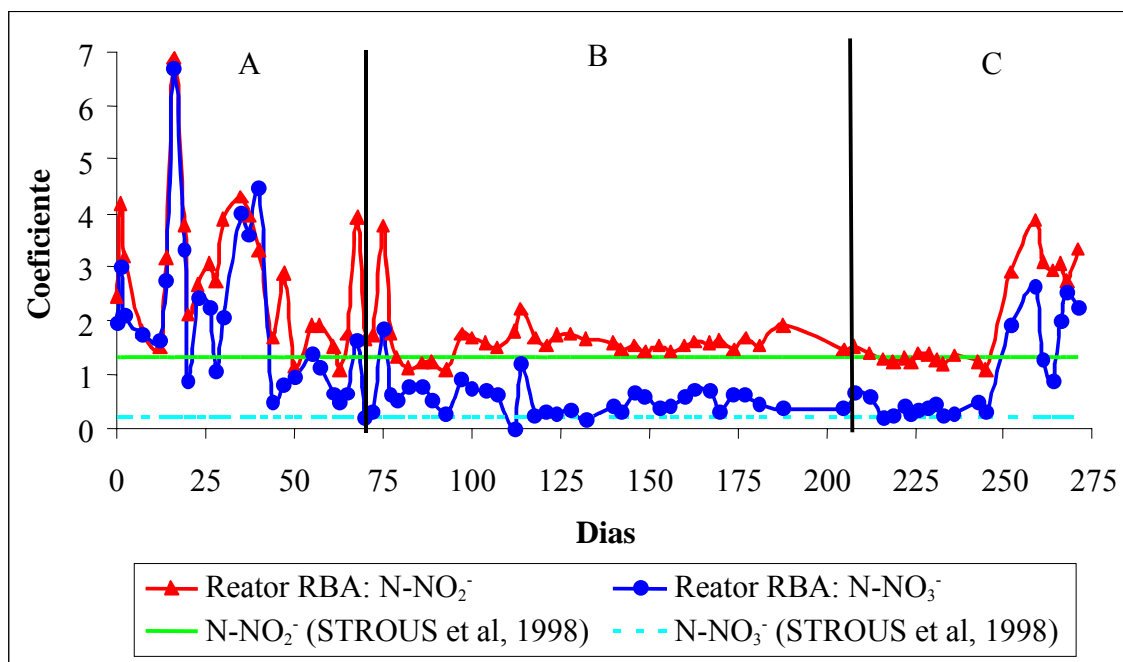


Figura 5.9: Evolução dos coeficientes estequiométricos para Nitrito e Nitrato em relação o íon Amônio, pelo balanço de nitrogênio no reator RBA e uma comparação com os valores disponíveis na literatura.

A Figura 5.9 refere-se a evolução dos coeficientes estequiométricos globais para remoção de nitrito e produção de nitrato para o Reator RBA. Nela, fica evidente a alta instabilidade do reator durante a fase A, onde ele recebia progressões de carga mesmo sem apresentar uma boa eficiência de remoção, conforme visto no item 5.1. A grande produção de nitrato, equivalendo a remoção de nitrito, pode ser o indicativo da existência de nitrificação no reator. Como o mesmo é totalmente vedado, não foi possível mensurar o oxigênio dissolvido no interior do mesmo para verificar essa hipótese.

A partir da fase B, quando o reator passou a receber uma progressão de carga individual, observou-se uma aproximação dos coeficientes determinados com aqueles existentes na literatura. Esta aproximação se tornou ainda mais evidente na fase C, quando a concentração de bicarbonato foi corrigida. Porém, o evento não determinado ocorrido próximo ao dia 250 desestabilizou novamente o reator e, após 25 dias sem remoção o mesmo foi desativado.

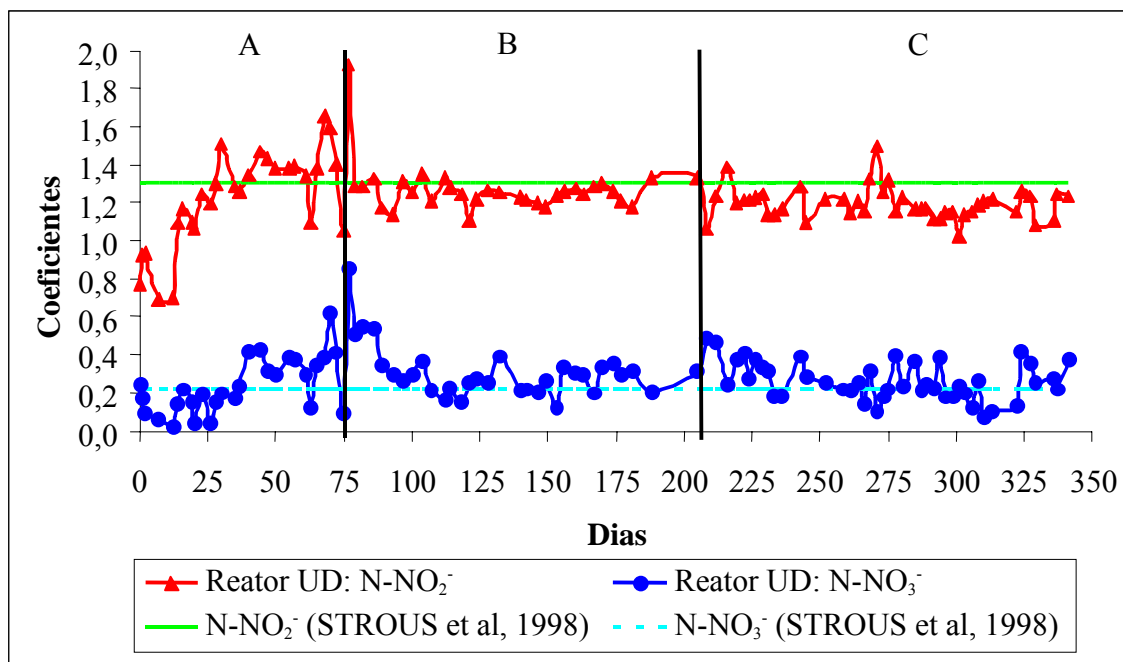


Figura 5.10: Evolução dos coeficientes estequiométricos para Nitrito e Nitrato em relação o íon Amônio, pelo balanço de nitrogênio no reator UD e uma comparação com os valores disponíveis na literatura.

Já a Figura 5.10 mostra a evolução dos coeficientes estequiométricos globais do Reator UD. Durante todo o período, salvo a passagem da fase A para B e os primeiros dias de monitoramento, os coeficientes globais observados estiveram muito próximos daqueles encontrados na literatura.

Pelos resultados observados nas Figuras 5.8 e 5.10 e, devido aos resultados das análises microbiológicas expostas no Item 5.4, confirma-se o estabelecimento de uma remoção de nitrogênio via processo ANAMMOX.

Através da análise da Figura 5.9, considerou-se uma faixa de observação entre os dias 82 e 245 para construir o gráfico exposto na Figura 5.11. Desta figura, pode-se extrair a inclinação da curva apresentada, o coeficiente da espécie em questão, além de observar através do R^2 a correlação entre a remoção de amônio e a remoção de nitrito e a correlação entre remoção de amônio e a produção de nitrato.

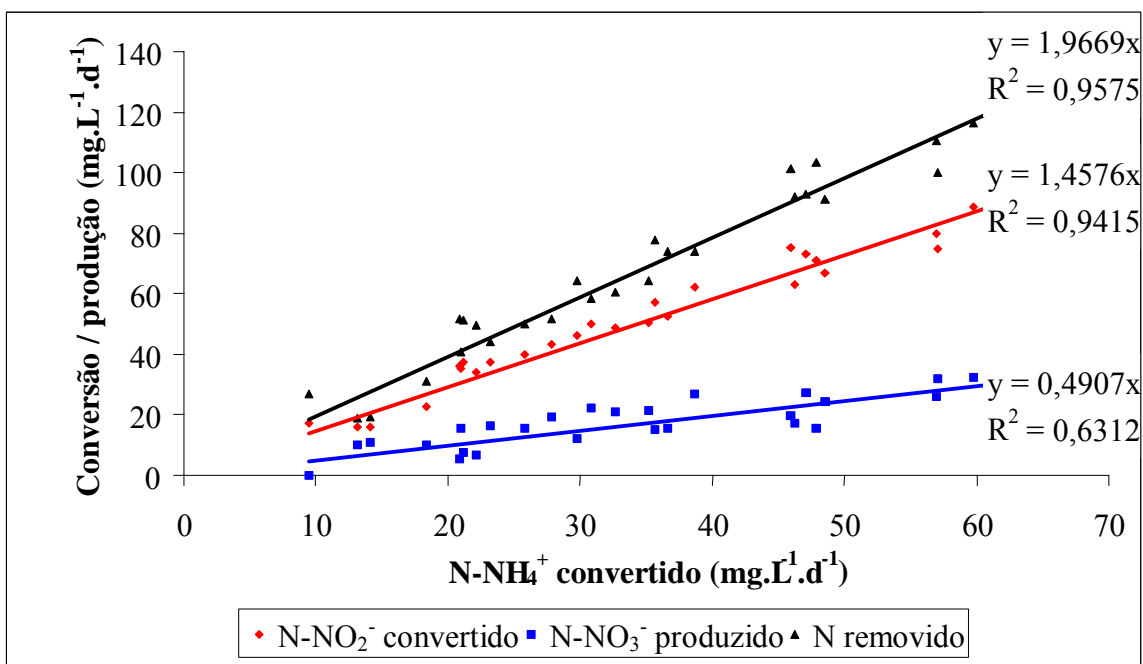


Figura 5.11: Relação entre a carga de nitrito e amônio removidos; entre a carga de nitrato produzido e amônio removido; entre a carga de nitrogênio removida e a carga de amônio removido para o período de estabilidade entre os dias 82 e 245, para o Reator RBA.

Desta forma, para o Reator RBA obtiveram-se as correlações de $\text{NH}_4^+:\text{NO}_2^-$: NO_3^- de 1:1,45:0,49, com um R^2 de 0,63 para produção de nitrato e de 0,94 para remoção de nitrito.

Já para o Reator UD, tomou-se o período entre os dias 100 e 266 e, obteve-se o gráfico exposto na Figura 5.12. Nela, observa-se uma relação $\text{NH}_4^+:\text{NO}_2^-:\text{NO}_3^-$ de 1:1,21:0,25. Através dos R^2 , acima de 0,98 para remoção de nitrito e de 0,48 para produção de nitrato, observa-se que existe uma grande correlação entre a remoção de

amônio e nitrito, porém, a produção de nitrato se mostrou instável frente a remoção de amônio.

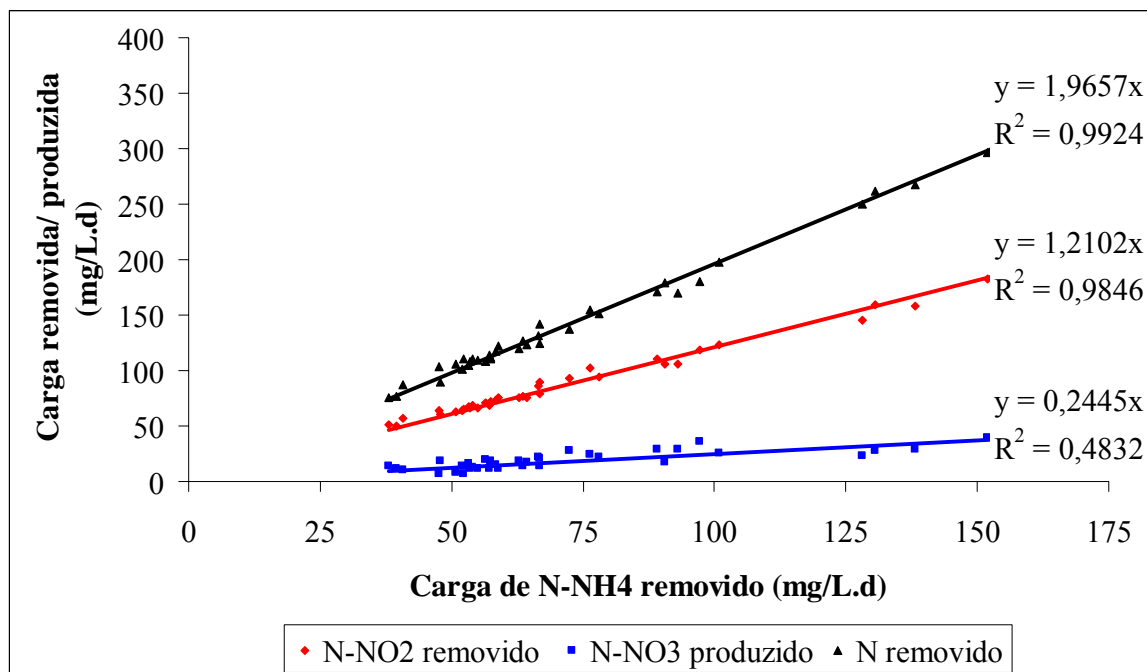


Figura 5.12: Relação entre a carga de nitrito e amônio removidos e entre a carga de nitrato produzido e amônio removido para o período de estabilidade entre os dias 100 e 266, para o Reator UD.

Na Figura 5.12 também encontra-se a quantidade de nitrogênio que sai do sistema, assumindo que esse nitrogênio saia na forma de N_2 , encontra-se um coeficiente de 0,98 que fica muito próximo daquele encontrado por VAN DE GRAAF, *et al* (1996) de 1,02. Uma outra forma que poderia se esperar perda de nitrogênio, seria através de N_2O . Porém, trabalhos indicam que o processo ANAMMOX não produz este gás (JETTEN *et al*, 1999).

Tabela 5.4: Resumo dos coeficientes estequiométricos encontrados no período entre os dias 82 e 245 para o Reator RBA, entre os dias 100 e 266 para o Reator UD, em comparação com os encontrados na literatura.

	Mol Consumido		Mol Produzido	
	NH_4^+	NO_2^-	NO_3^-	N_2
VAN DE	1	1,32	0,26	1,02

GRAAF (1996)				
STROUS (1999b)	1	1,31	0,22	1,045
Reator UD	1	1,21	0,25	0,98
Reator RBA	1	1,45	0,49	0,98

A Tabela 5.4 apresenta um resumo dos coeficientes obtidos nos reatores UD e RBA uma comparação com aqueles encontrados na literatura. Ambos os reatores ficaram próximos da estequiometria encontrada na literatura, confirmando mais uma vez o processo ANAMMOX em ambos os reatores.

A diferença entre os coeficientes estequiométricos obtidos e aqueles encontrados na literatura para culturas enriquecidas, pode ser explicada pela presença de *nitrosomonas*, as quais influenciam na estequiometria global do sistema. Segundo SHIMIDT, *et al* (2002), quanto maior a quantidade de nitrosomonas no meio, menor será a relação $\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$, sendo esta relação de 1,28 para presença de 10^7 células de *N. eutropha* por mL. Esta informação condiz com os resultados obtidos, pois, conforme será observado no item 5.4, foi detectada a presença de oxidadoras de amônio em grande quantidade em ambos os reatores.

5.4 Análises microbiológicas

5.4.1 Análises de FISH

As análises de FISH foram realizadas em intervalos aleatórios durante todo o período de observação e nos inóculos utilizados (Anexo 1). Pelo fato de se tratar de um reator de biomassa imobilizada, uma amostragem que representasse a totalidade do

reator, só poderia ser feita se toda biomassa fosse retirada do mesmo (ISAKA *et al*, 2005). Portanto, este procedimento não foi adotado.

Desta forma, optou-se, inicialmente, por coletas investigatórias, realizada através de uma amostragem composta em diferentes partes do reator. Posteriormente, após a verificação visual do desenvolvimento de aglomerados de coloração e forma diferentes da biomassa comum no Reator UD, optou-se por coletar estes aglomerados separadamente das demais amostras. Por fim, devido à um aumento significativo de diferentes formas em diferentes locais do reator, coletaram-se amostras de diferentes pontos dos reatores, visando estabelecer um perfil da microbiota dos mesmos. A Figura 5.13 apresenta uma fotografia do Reator UD, evidenciando os aglomerados de microrganismos.

Após realizadas doze coletas, nas diferentes fases e locais dos reatores (Anexo 1), nenhuma delas apresentou resultado significativamente positivo para ANAMMOX (sonda Amx -0820-a-A-22). Os resultados que apresentaram valores mais expressivos, se deram para amostras do Reator UD, coletadas no 250º dia de observação e ao final do período de observação do reator.

Para coleta realizada no 250º dia de observação, a biomassa coletada foi um composto entre a biomassa comum do reator e aquelas que se formaram durante o período de observação (Figura 5.13), sendo que as Amostras compostas 1 e 2 são repetições. Já aquela realizada ao final do experimento, consistiu de amostras compostas de aglomerados que se desenvolveram aderidos ao vidro do tubo interno que alimentava o reator e aderidas a rede de retenção de biomassa na saída do efluente do reator. Os resultados obtidos com estas amostras encontram-se nas Tabelas 5.5 e 5.6, respectivamente.



Figura 5.13: Foto tirada do Reator UD após o 200° dia de observação. Em destaque estão os aglomerados que se formaram durante a atividade do reator.

Tabela 5.5: Estimativa da abundância dos microrganismos presentes nas amostras compostas retiradas do reator UD no 250° dia de acompanhamento.

SONDA	AMOSTRA	
	Composta 1	Composta 2
EUB mix (todas as eubactérias)	Muitas células em DAPI e hibridizadas (98% DAPI)	Muitas células em DAPI e hibridizadas (98% DAPI)
Nos190 (Betaproteobactérias oxidadoras de amônia)	Muitas pequenas colônias (15% do DAPI)	Pequenas colônias (10% do DAPI)
NIT3 (<i>Nitrobacter spp</i>)	Pequenas colônias e células isoladas (5% do DAPI)	Pequenas colônias e células isoladas (3% do DAPI)
NEU (a maioria das <i>Nitrosomonas</i> + <i>Nitrosococcus mobilis</i>)	Muitas pequenas colônias (15% do DAPI)	Pequenas colônias (10% do DAPI)
Nmv (<i>Nitrosococcus mobilis</i>)	ND	ND
Ntspa662 (<i>Nitrospira spp</i>)	ND	ND
Ntspn693 (<i>Nitrospina gracilis</i>)	ND	ND
AMX 820 <i>Candidatus 'Brocadia anammoxidans'</i> e <i>Candidatus 'Kuenenia stuttgartiensis'</i>	Colônias arredondadas, pequenas, algumas envolta de uma matriz mucilagínosa. < 1% do DAPI	Raras colônias arredondadas

Observações:

- ✓ ND: Não detectado pelo método;
- ✓ Tanto o DAPI quanto as hibridizações ficaram bem claras;
- ✓ Muitas células presentes nas duas amostras;
- ✓ Poucas interferências foram verificadas.

Tabela 5.6: Estimativa da abundância dos microrganismos presentes nas amostras retiradas de diferentes locais do reator UD ao final do período de observação.

SONDA	AMOSTRA	
	Aglomerado formado no Tubo de Alimentação	Aglomerado formado na Rede de Retenção de saída
EUB mix (todas as eubactérias)	Presença de colônias e filamentos longos – Muitas (> 90% DAPI)	Presença de colônias grandes e pequenas - Muitas (> 90% DAPI)
Nos190 (Betaproteobactérias oxidadoras de amônia)	Presença de pequenas colônias e células isoladas – Poucas (\cong 20% DAPI)	Pequenas colônias - Poucas (\cong 15% DAPI)
NIT3 (<i>Nitrobacter spp</i>)	Presença de pequenas colônias – Poucas (\cong 10% DAPI)	Pequenas colônias - Poucas (\cong 10% DAPI)
NEU (a maioria das <i>Nitrosomonas</i> + <i>Nitrosococcus mobilis</i>)	Presença de pequenas colônias – Poucas (\cong 15% DAPI)	Pequenas colônias - Poucas (\cong 10% DAPI)
Nmv (<i>Nitrosococcus mobilis</i>)	Não detectado (\cong 0% DAPI)	Pequenas colônias - Poucas (\cong 10% DAPI)
Ntspa662 (<i>Nitrospira spp</i>)	Raras colônias - (< 2% DAPI)	Não detectado (\cong 0% DAPI)
Ntspn693 (<i>Nitrospina gracilis</i>)	Não detectado (\cong 0% DAPI)	Pequenas colônias - Poucas (\cong 10% DAPI)
AMX 820 Candidatus ' <i>Brocadia anammoxidans</i> ' e Candidatus ' <i>Kuenenia stuttgartiensis</i> '	Raras colônias pequenas - (< 2% DAPI)	Raras colônias - (< 2% DAPI)

A análise de FISH consistiu na comparação e estimativa visual, de um mesmo campo ótico, das células coradas com o DAPI (que cora todas as células bacterianas)

com aquelas coradas com a sonda em questão. A sonda Nos190 detecta todas as bactérias oxidadoras de amônio (BOA) do grupo beta Proteobactéria (gêneros *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosococcus*, *Nitrosovibrio*, *Nitrosolobus*), as demais sondas tem os gêneros e espécies detectados explicitados logo abaixo no nome da sonda.

Em todos os pontos, o que se observa é a presença de algumas (de 10 a 20%) BOAs. Este resultado era previsto, tendo em vista que o meio de cultura possui muitos nutrientes e, eventuais, contaminações de oxigênio dissolvido, mantém uma pequena atividade desse grupo de bactérias. Desta forma, uma parte muito pequena da amônia removida do reator, seria convertida por esses organismos a nitrito ou nitrato (conforme o nível de contaminação por oxigênio dissolvido), explicando a diferença encontrada entre a equação estequiométrica global obtida no reator e aquelas disponíveis na literatura (Item 5.3.).

SCHMID, *et al* (2000) testaram nove sondas específicas para Anammox. Porém, apenas uma delas, a Amx -0820-a-A-22, apresentou resultados positivos, mesmo assim, através de análises filogenéticas, ficou comprovada a descoberta de um possível novo microrganismo oxidador anaeróbio de amônio (*Candidatus* Kuenenia stuttgartiensis). Este fato mostra que mesmo com resultados negativos para uma determinada sonda, não pode ser confirmada a ausência de microrganismos ANAMMOX, isto se dá, devido a especificidade do método.

Além deste fato, não se descarta a possibilidade de falha na aplicação da metodologia utilizada para coleta e fixação das amostras, já que alguns meses após o término deste trabalho, realizou-se uma nova coleta de amostras para FISH no reator UD e, obteve-se, em um dos pontos coletados, a presença de microrganismos com atividade ANAMMOX em 40% do campo de visão (dados não mostrados).

5.4.2 Análises de PCR

Foram realizadas duas análises após o período de observação dos reatores. Em ambas encontraram-se resultado positivo para presença de organismos ANAMMOX em todas as amostras.

Quando se tornou possível realizar esta análise, o reator RBA já tinha sido desativado. Porém, uma amostra do lodo utilizado para inocular o reator RBA tinha sido armazenada e a mesma foi encaminhada para análise de PCR, retornando resultado positivo para presença de ANAMMOX. Tais resultados estão apresentados na Figura 5.14, onde as bandas resultantes, embora na altura adequada (aprox. 800 p.b.), apresentaram-se muito discretas, isto ocorre devido a pouca eficiência na amplificação ou baixa concentração de DNA genômico alvo.

Para o Reator UD, todas as amostras apresentaram resultados positivos, aquela que se mostrou mais evidente (Figura 5.15) confirma a presença do organismo em questão em todas as amostras coletadas nas diferentes fases e locais do Reator. Embora esta técnica possa ser quali-quantitativa (ETCHEBEHERE & MENES, 2005), devido a limitações da metodologia utilizada, as análises de PCR realizadas nas amostras em questão forneceram resultados qualitativos.

O fato de o PCR amplificar 2^{35} vezes o DNA alvo e ter retornado resultados positivos em detrimento das análises de FISH (mesmo ambas as análises tendo o primer e a sonda destinados à mesma espécie de microrganismo) indica a presença, possivelmente não predominante, de bactérias ANAMMOX já identificadas nos inóculos analisados e, sugere a presença de novos microrganismos oxidadores de amônio, que não são corados pelo FISH.

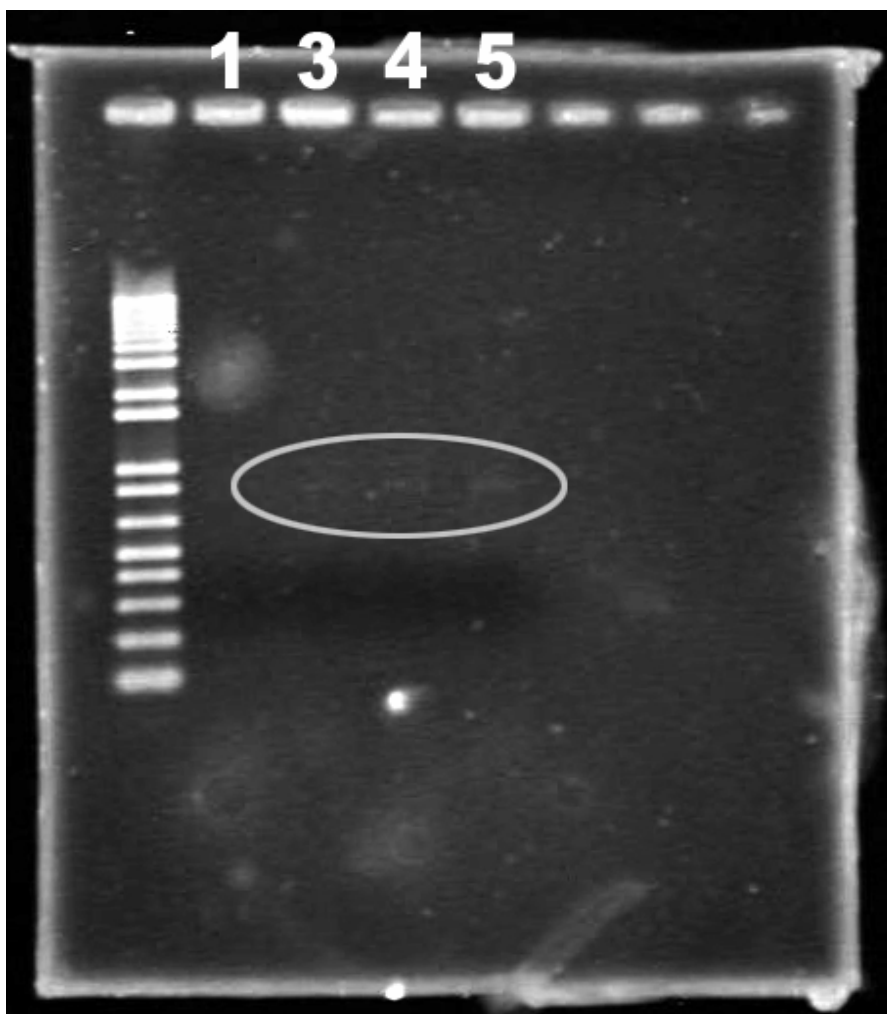


Figura 5.14. Imagem da eletroforese em gel de agarose 0,8% de amostras coletadas em diferentes pontos do Reator UD e do Inóculo utilizado no Reator RBA.

Observações:

- ✓ Amostra 1 = Biomassa aderida ao vidro interno do tubo de alimentação do Reator UD.
- ✓ Amostra 3 = Biomassa retirada de aglomerados distintos no interior do Reator UD com coloração avermelhada;
- ✓ Amostra 4 = Biomassa retirada de aglomerados distintos no interior do Reator UD com coloração marrom claro;
- ✓ Amostra 5 = Amostra retirada do restante do inóculo utilizado para inocular o Reator RBA e que tinha sido armazenada.

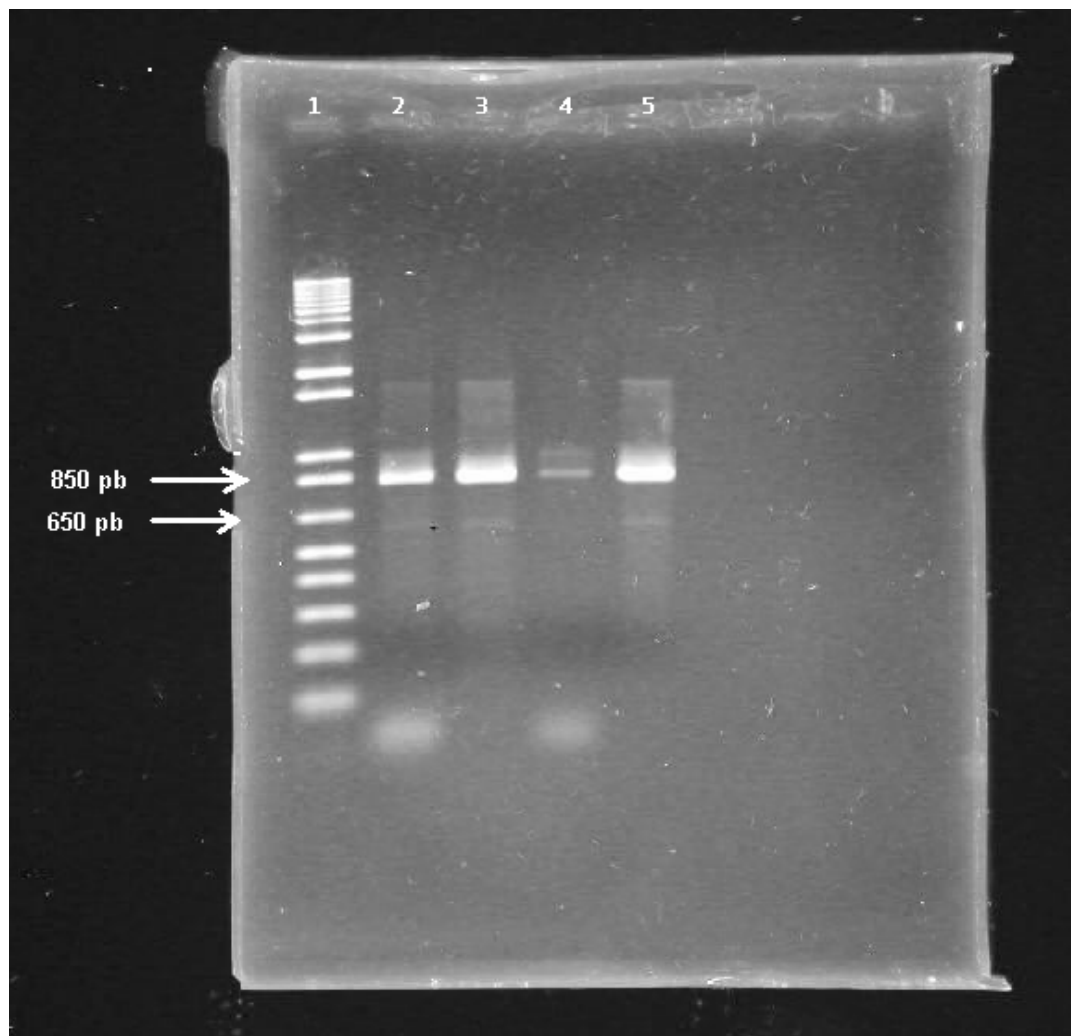


Figura 5.15. Imagem da eletroforese em gel de agarose 0,8% de amostras coletadas em diferentes pontos do Reator UD.

Observações:

- ✓ Amostra 1 = Padrão (Ladder);
- ✓ Amostra 2 = Biomassa aderida à parede do Reator UD;
- ✓ Amostra 3 = Biomassa aderida à rede de retenção na saída do Reator UD;
- ✓ Amostra 4 = Biomassa retirada de aglomerados distintos no interior do Reator UD;
- ✓ Amostra 5 = Biomassa aderida ao vidro interno do tubo de alimentação do Reator UD.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

A máxima carga de nitrogênio removida, foi de $290 \text{ mg N}(\text{L} \cdot \text{dia})^{-1}$, atingida pelo Reator UD após 350 dias da partida, já o Reator RBA atingiu $104 \text{ mg N}(\text{L} \cdot \text{dia})^{-1}$, mostrando a elevada capacidade de remoção de nitrogênio pelo sistema em questão. Esta carga removida poderia ser maior ou atingida prematuramente, caso não tivessem ocorrido os problemas com a concentração de bicarbonato no preparo do meio de cultura utilizado.

Através do balanço de massa de entrada e saída de amônio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-), foi possível encontrar os coeficientes estequiométricos globais dos reatores, encontrando uma grande semelhança com aqueles já consagrados na literatura. Este fato ocorreu apenas em um curto período de observação para o Reator RBA, obtendo a proporção média de NH_4^+ convertido : NO_2^- convertido : NO_3^- produzido : N_2 produzido de 1:1,45:0,49:0,98. Já para o Reator UD, a proporção média, obtida durante grande parte do período, foi de 1:1,21:0,25:0,98, ficando muito próxima à encontrada na literatura (1:1,31:0,22:1,05).

Por fim, as análises de PCR específico confirmaram a presença de microrganismos anammox em ambos os reatores. Porém, devido aos resultados negativos obtidos nas determinações de FISH, acredita-se que a espécie de microrganismo predominante presente nos reatores não pertença às espécies conhecidas: *Candidatus Brocadia anammoxidans* e *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*, que são aquelas determinadas pela sonda utilizada ou que possa ter existido problemas na fixação das amostras para realização das análises de FISH.

Desta forma, o dejetos de suíno mostrou-se como uma promissora fonte de inóculo para o enriquecimento de microrganismos oxidadores anaeróbios de amônia. O reator inoculado com o lodo proveniente de uma lagoa de nitrificação/ desnitrificação desativada (Reator UD) se mostrou como um inóculo melhor que o retirado do decantador secundário de um sistema de lodos ativados tratando dejetos de suínos (Reator RBA), porém também este se mostrou com o uma possível fonte abundante de microrganismos com atividade ANAMMOX.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Partir reatores em regime de alimentação seqüencial (SBR), objetivando a realização de ensaios cinéticos em inóculos provenientes de dejetos de suínos e da possibilidade de aplicação de maiores concentrações afluentes de nitrito. Estes tipos de reatores permitem uma maior flexibilidade operacional e a amostragem representativa dos microrganismos desenvolvidos para testes de caracterização.

Estudar novas estratégias de partida dos reatores, tal como manter a operação dos reatores por um período mais longo de forma a obter os parâmetros operacionais em condições estáveis.

Realizar análise de seqüenciamento de DNA em lodo enriquecido de microrganismos ANAMMOX de dejetos de suínos, verificando a possibilidade da existência de uma nova espécie de bactéria.

Utilizar efluente real de suinocultura, procurando alternativas de configuração de reatores, de forma a maximizar a eficiência deste processo, como tratamento terciário de dejetos de suínos.

8. REFERÊNCIAS

- AHN, Y. (2006) Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. *Process Biochemistry*, Vol. 41, p. 1709-1721.
- AMANN, R.I.; BINDER, B.J.; OLSON R.J.; CHISHOLM S.W.; DEVEREUX R.; STAHL D.A. (1990). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 56: 1919-1925.
- AMANN, R.I; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual cells without cultivation. *Microbiol Rev.* vol. 59. p. 143-169.
- ANTHONISEN, A.C., LOEHR R.C., PRAKASAM, T.B.S., SRINATH, E.G. (1976) Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Journal WPCF.* Vol 48. p. 835-852.
- ANUALPEC. (2006) Anuário da Pecuária Brasileira. São Paulo: *AngraFNP*, p. 370.
- APHA. (1995) Standard Methods – For the examination of water and wastewater, 19 ed.
- BEGON, M. (1996) Ecology: individuals, population and communities. United Kingdom: *Blackwell Science*. 1068 p.
- BITTON, G. (2005) Wastewater Microbiology, *Wiley Liss Pub.*, New York, 449 p.
- DAIMS H., NIELSEN J. L., NIELSEN P. H., SCHLEIFER K. H. AND WAGNER M. (2001). In situ characterization of Nitrospira-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 67. p. 5273-5284.
- DAMSTÉ, J.S.S.; STROUS, M.; RIJPSTRA, W.I.C.; HOPMANS, E.C.; GEENEVASEN, J.A.J.; VAN DUIN, A.T.; VAN NIFTRIK, L.A.; JETTEN, M.S.M. (2002) Linearly concatenated cyclobutane lipids form a dense bacterial membrane. *Nature*. Vol. 419. p. 708 - 712.

DAPENA-MORA, A.; CAMPOS, J.L.; MOSQUERA-CORRAL, A.; JETTEN, M.S.M.; MÉNDEZ, R. (2004) Stability of the ANAMMOX process in a gás-lift reactor and a SBR. *Journal of Biotechnol.* Vol. 110. p. 159-170.

DAPENA-MORA, A.; FERNÁNDEZ, I.; CAMPOS, J.L.; MOSQUERA-CORRAL, A.; MÉNDEZ, R.; JETTEN, M.S.M. (2006) Evaluation of activity and inhibition effects on Anammox process by batch tests based on the nitrogen gas production. *Enzyme Microbial Technol.* Accepted Manuscript. p. 29.

DEN CAMP, H.J.M.O.; KARTAL, B.; GUVEN, D.; VAN NIFTRIK L.A.M.P.; HAAIJER, S.C.M.; VAN DER STAR, W.R.L.; VAN DE PAS-SHOONEN, K.T.; CABEZAS, A.; YING, Z.; SCHMID, M.C.; KUYPERS, M.M.M.; VAN DE VOSSENBERG, J.; HARHANGI, H.R.; PICIOREANU, C.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; KUENEN, J.G.; STROUS, M. JETTEN, M.S.M. (2006) Global impact and application of the anaerobic ammonium-oxidizing (Anammox) bacteria. *Biochemical Society Transactions.* vol. 34. p. 174 a 178.

DIESEL, R., MIRANDA C. R., PERDOMO, C. C. (2002) Coletânea de tecnologias sobre dejetos suínos. Bipers nº14, *Embrapa Suínos e Aves.* p. 31.

DIJKMAN, H. STROUS, M. (1999) Process for ammonia removal from wastewater. *Patent PCT/NL 99/00446.*

ETCHEBEHERE, C. & MENES, R.J. (2005) Caracterização, Monitoramento e Controle de Processos: Técnicas de Caracterização Microbiológica. In: V Curso de Tratamento Biológico de Resíduos. *Florianópolis.* 18 p.

FIALAB INSTRUMENTS. (2006) FIALab - 2500. An automated Flow Injection Analyzer For Serial Chemical Assays. *Operation Manual.* 40 p.

FUJII, T.; SUGINO, H.; ROUSE, J.D.; FURUKAWA, K. (2002) Characterization of the microbial community in an anaerobic ammonium-oxidizing biofilm cultured on a nonwoven biomass carrier. *J. Biosci. Bioeng.* Vol 94. p. 412 a 418.

HELLINGA C.; SCHELLEN, A.A.J.C.; MULDER, J.W.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; HEIJNEN, J.J. (1998) The SHARON process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium rich wastewater. *Water Science Technology*. vol. 37. p. 135 a 142.

IBGE. (2006) Sistema de Recuperação Automática de Dados. IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em 23 de nov. de 2006.

ISAKA, K.; DATE, Y.; SUMINO, T.; YOSHIE, S.; TSUNEDA, S. (2005) Growth characteristic of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in an anaerobic biological filtrated reactor. *Appl Microbiol Biotechnol*. vol.70. p. 47-52.

JETTEN, M.S.M.; CIRPUST, I.; KARTAL, B.; VAN NIFTRIK L.; VAN DE PAS-SHOONEN, K.T.; SLIEKERS, O.; HAAIJER, S.; VAN DER STAR, W.; SCHMID, M.; VAN DE VOSSENBERG, J.; SCHMIDT, I.; HARHANGI, H.; VAN LOOSDRECHT, M.; KUENEN, J.G.; DEN CAMP, H.O.; STROUS, M. (2005) 1994-2004: 10 years of research on the anaerobic oxidation of ammonium. *Biochemical Society Transactions*. vol. 33. p. 119 a 123.

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. (1999) The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiol Rev*. Vol 22. p. 421 a 437.

JETTEN, M.S.M.; WAGNER, M.; FUERST, J.; VAN LOOSDRECHT, M.; KUENEN, G.; STROUS, M. (2000) Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation (“anammox”) process. *Curr. Opinion Biotechnol*. Vol 12. p. 283 a 288.

JORDÃO, E.P. & PESSOA, C.A. (1995) Tratamento de esgotos domésticos. Rio de Janeiro: ABES. 720 p.

JURETSCHKO S., TIMMERMANN, G., SCHMID, M., SCHLEIFER, K.H., POMMERENING-RÖSER, A., KOOPS, H.P.; WAGNER, M. (1998). Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated

sludge: Nitrosococcus mobilis and Nitrospira- like bacteria as dominant populations. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 64. 3042-3051..

KHIN, T. & ANNACHHATRE, A.P. (2004) Novel microbial nitrogen removal processes. *Biotechnology Advances.* vol 22. p. 519 a 532.

KIELING, D.D. (2004) Estudo da remoção biológica de nitrogênio a partir de lodo nitrificante cultivado em meio autotrófico sob condições anóxica. *Dissertação (Mestrado)* – Universidade Federal de Santa Catarina – Departamento de Engenharia Química e de Alimentos. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química. Florianópolis, 106 p.

KUNZ, A. (2004) Pesquisador A da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Suínos e Aves. Concórdia – SC. *Comunicação Pessoal.*

KUNZ, A. (2006) Impactos sobre a disposição inadequada de dejetos de animais sobre a qualidade de águas superficiais e subterrâneas. In: Anais do II simpósio nacional sobre o uso da água na agricultura. Passo Fundo: *UPF.* 6 p.

KUNZ, A. *et al.* (2004) Recomendações para uso de Esterqueiras para armazenagem de dejetos de suínos. Comunicado Técnico. Concórdia: *Embrapa Suínos e Aves.* n° 361, p 1-5.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. (2002) Principios de bioquímica. 3. ed. São Paulo: *Sarvier.* 975 p.

METCALF & EDDY. (2003). Wastewater Engineering: Treatment, disposal and reuse. *McGraw Hill*, 4° Ed., N. Y., 1819 p.

MOBARRY B. K., WAGNER M., URBAIN V., RITTMANN B. E. AND STAHL D. A. (1996). Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol 62. 2156-2162.

MULDER, A., VAN DE GRAAF, A.A. ROBERTSON, L.A., KUENEN, J.G. (1995) Anaerobic ammonium discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol. Ecol.* Vol. 16. p. 177-184.

NIELSEN, M.; BOLLMANN, A.; SLIEKERS, O.; JETTEN, M.; SCHMID, M.; STROUS, M.; SCHMIDT, I.; LARSEN, L.H.; NIELSEN, L.P.; REVSBECH, N.P. (2005) Kinetics, diffusional limitation and microscale distribution of chemistry and organisms in a CANON reactor. *FEMS Microbiology Ecology.* Vol. 51, p. 247-256.

PERDOMO, C.C.; OLIVEIRA, P.A.V.; KUNZ, A. (2003) Metodologia sugerida para estimar o volume e a carga de poluentes gerados em uma granja de suínos. Comunicado Técnico n° 332. Concórdia: *Embrapa Suínos e Aves*, p 1-6.

REGINATTO, V. ; TEIXEIRA, R. M. ; PEREIRA, F. ; SCHMIDELL, W. ; MENES, J. ; ETCHEBERERE, C. ; FURIGO JUNIOR, A. ; SOARES, H. M. (2005) Anaerobic Ammonium Oxidation in Bioreactor Treating Slaughterhouse Wastewater. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.22, n.4, p. 593-600.

SAIKI, R.K., GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. (1988) Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science.* Vol. 239. p. 487-491.

SCHIERHOLT NETO, G.F.; KUNZ, A.; HIGARASHI, M.M.; MATTEI, R.M.; MENOZZO, G.F. (2006a) Análise por injeção em fluxo para determinação de nitrato e nitrito em amostras de águas e dejetos de animais. In: XI Encontro Nacional sobre Metodologias de Laboratório da Embrapa - ANAIS - Documentos 112. Concórdia: *EMBRAPA*, 2006. p. 35-35.

SCHIERHOLT NETO, G.F.; KUNZ, A.; VANOTTI, M.B.; MATTEI, R.M.; SOARES, H.M. (2006b) Aclimação e acompanhamento da atividade de lodos de efluentes de suinocultura para remoção de nitrogênio pelo processo de oxidação anaeróbia de amônia (ANAMMOX). In: Anais do XXX CONGRESO INTERAMERICANO DE INGENIERÍA SANITARIA Y AMBIENTAL. URUGUAI: AIDIS, 8 p.

SCHMIDT, I.; HERMELINK, C.; VAN DE PAS-SHOONEM, K.; STROUS, M.; DEN CAMP, H.J.; KUENEN, J.G.; JETTEN, M.S.M. (2002) Anaerobic Ammonia Oxidation in the Presence of Nitrogen Oxides (NO_x) by Two Different Lithotrophs. *App. Environ. Microbiol.* Vol. 68. p 5351-5357.

SCHMID M., SCHMITZ-ESSER S., JETTEN M. AND WAGNER M. (2001) 16S-23S rDNA intergenic spacer and 23S rDNA of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: implications for phylogeny and in situ detection. *Environ. Microbiol.* Vol. 3. 450-459.

SCHMID, M.; TWACHTMANN, U.; KLEIN, M.; STROUS, M.; JURETSCHKO, S.; JETTEN, M.; METZGER, J.W.; SCHLEIFER, K.H.; WAGNER, M. (2000) Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation. *System. Appl. Microbiol.* vol 23. p. 93 a 106.

SCHMIDELL, W & REGINATTO, V.S. (2005) Remoção de Nitrogênio. In: *V Curso de Tratamento Biológico de Resíduos*. Florianópolis. 40 p.

SLIEKERS, A.O.; DERWORT, N.; CAMPOS GOMEZ, J.L.; STROUS, M.; KUENEN, J.G.; JETTEN, M.S.M. (2002) Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite in one single reactor. *Water Research*, vol 36, p. 2475-2482.

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

STROUS, M.; FUERST, J.; KRAMER, E.; LOGEMANN, S.; MUYZER, G.; VAN DE PAS, K.; WEBB, R.; KUENE, J.; JETTEN, M.S.M. (1999a) Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature*. Vol 400. p. 446 a 449.

STROUS, M.; HEIJNEN, J.J.; KUENEN, J.G.; JETTEN, M.S.M. (1998) The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium – oxidizing microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol.* Vol 50. p. 589 a 596.

STROUS, M.; KUENEN, J.G.; JETTEN, M.S.M. (1999b) Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. *Appl Environ Microbiol.* Vol 65. p. 3248 a 3250.

TOH, S.K., WEBB, R.I., ASHBOLT, N.J. (2002) Enrichment of Autotrophic Anaerobic Ammonium-Oxidizing Consortia from Various Wastewaters. *Microb Ecol.* v. 43. p. 154-167.

VAN DE GRAAF, A.A.; BRUIJN, P.; ROBERTSON, L.A.; JETTEN M.S.M.; KUENEN, J.G. (1996) Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology.* vol 142. p. 2187 a 2196.

VAN DONGEN, L.G.J.M.; JETTEN, M.S.M.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M. (2001) The combined Sharon/ Anammox process: A sustainable method for N-removal from sludge water. *STOWA.* 64 p. ISBN: 1 84339 000 0.

VAN KEMPEN, R., MULDER, J.W., UIJTERLLNDE C.A. (2001) Overview: Full scale experience of the SHARON process for treatment of rejection water of digested sludge dewatering. *Water Sci. Technol.* Vol. 44, p. 145-152.

VAN LOOSDRECHT, M.C.M. & JETTEN, M.S.M. (1998) Microbiological conversions in nitrogen removal. *Water Sci. Technol.* Vol. 38. p. 1-7.

VANOTTI, M.B. (2003) Pesquisador do Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, Coastal Plains Research Center. Florence - CS, EUA. *Comunicação Pessoal.*

VANOTTI, M.B. (2004) Evaluation of environmentally superior technology: Swine waste treatment system for elimination of lagoons, reduced environmental impact, and improved water quality. *USDA-ARS.* 56 p.

VON SPERLING, M. (1996) Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, *Universidade Federal de Minas Gerais*, 243 p.

VON SPERLING, M. (1997) Lodos Ativados. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, *Universidade Federal de Minas Gerais*, 428 p.

WAGNER M., RATH G., AMANN R., KOOPS H.P. AND SCHLEIFER K.H. (1995). In situ identification of ammonia-oxidizing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* Vol. 18. 251-264.

ANEXOS

Tabela A1.1: Estimativa da abundância dos microrganismos presentes nas amostras compostas retiradas dos reatores RBA e UD no 27º dia de acompanhamento.

SONDA	AMOSTRA	
	Composta Reator RBA	Composta Reator UD
Característica geral da amostra	Massa homogênea de bactérias dispersas na massa líquida, raras colônias. Muito material extracelular. Predominância de cocos, diplococos e bacilos. Raros e curtos filamentos. Ausência de eucariontes.	Muitas bactérias dispersas na massa líquida, raras colônias. Muito material extracelular. Predominância de cocos, diplococos e bacilos. Raros filamentos. Raros eucariontes.
EUB mix (todas as eubactérias) Nos190	40%	55%
(Betaproteobactérias oxidadoras de amônia) NIT3	<5%	<5%
(Nitrobacter spp) NEU	ND	ND
(a maioria das Nitrosomanas + Nitrosococcus mobilis) Nmv	ND	<2%
(Nitrosococcus mobilis) Ntspa662	<1%	<1%
(Nitrospira spp) Ntco206	ND	ND
(Nitrococcus mobilis) Ntspn693	ND	ND
(Nitrospina gracilis) AMX 820	ND	ND
<i>Candidatus</i> 'Brocadia anammoxidans' e <i>Candidatus</i> 'Kuenenia stuttgartiensis'	ND	ND

Observações: ND: Não detectado pelo método

Tabela A1.2: Estimativa da abundância dos microrganismos presentes na amostra composta retirada do reator UD no 250° dia de acompanhamento.

SONDA	AMOSTRA	
	Composta de aglomerados vermelhos e Marrons 1	Composta de aglomerados vermelhos e Marrons 2
EUB mix (todas as eubactérias) Nos190 (Betaproteobactérias oxidadoras de amônia)	Muitas células em DAPI e hiridizadas (98% DAPI)	Muitas células em DAPI e hiridizadas (98% DAPI)
NIT3 (Nitrobacter spp)	Pequenas colônias e células isoladas (5% do DAPI)	Pequenas colônias e células isoladas (3% do DAPI)
NEU (a maioria das Nitrosomanas + Nitrosococcus mobilis) Nmv (Nitrosococcus mobilis)	Muitas pequenas colônias (15% do DAPI)	Pequenas colônias (10% do DAPI)
Ntspa662 (Nitrospira spp)	ND	ND
Ntspn693 (Nitrospina gracilis)	ND	ND
AMX 820 anaerobic ammonium-oxidizing bacteria, Candidatus 'Brocadia anammoxidans' and Candidatus 'Kuenenia stuttgartiensis'	Colônias arredondadas, pequenas, algumas envolta de uma matrix mucilaginosa < 1% do DAPI	Raras colônias arredondadas

Observações:

ND: Não detectado pelo método;

Tanto o DAPI quanto as hibridizações ficaram bem claras;

Muitas células presentes nas duas amostras;

Poucas interferências foram verificadas.

Tabela A1.3: Estimativa da abundância dos microrganismos presentes nas amostras diferenciadas retiradas do reator UD no 250° dia de acompanhamento.

SONDA	AMOSTRA		
	Aglomerado preto e resistente 1	Aglomerado preto e resistente 2	Aglomerado preto e solto
EUB mix (todas as eubactérias) Nos190 (Betaproteobactérias oxidadoras de amônia) NIT3 (Nitrobacter spp) NEU (a maioria das Nitrosomanas + Nitrosococcus mobilis) Nmv (Nitrosococcus mobilis) Ntspa662 (Nitrospira spp) Ntspn693 (Nitrospina gracilis) AMX 820 anaerobic ammonium-oxidizing bacteria, Candidatus 'Brocadia anammoxidans' and Candidatus 'Kuenenia stuttgartiensis'	Pouco DAPI Pouco EUB Raros ND Raros ND ND ND ND ND	Pouco DAPI Pouco EUB Raros ND ND ND ND ND ND	Pouco DAPI Pouco EUB Raros ND ND ND

Observações:

ND: Não detectado pelo método;

Pouquíssimas células coradas com DAPI;

Baixa densidade de bactérias nas amostras;

Muito material extracelular;

Na luz vermelha apareceram estruturas inespecíficas com brilho forte amarelado nas 3 amostras (talvez algum sal);

Tabela A1.4: Estimativa da abundância dos microrganismos presentes nas amostras diferenciadas retiradas do reator UD no 314º dia de acompanhamento.

SONDA	AMOSTRA	
	Aglomerado Branco retirado do meio do reator.	Biomassa retirada da rede de retenção de saída.
Caracterização geral da amostra	Amostra heterogênea, com aglomerados celulares de diversos tamanhos. Presença de colônias, e células dispersas, sendo estas cocos, bacilos, diplobacilos e poucos filamentos longos. Presença de muito material extracelular.	Amostra heterogênea, apresentando flocos irregulares de diversos tamanhos. Presença de células dispersas, sendo estas cocos, bacilos, diplobacilos e filamentos curtos e longos. Presença de pouco material extracelular.
EUB mix (todas as eubactérias)	Muitas - (> 90% DAPI)	Presença de colônias grandes e pequenas - Muitas (> 90% DAPI)
Nso190 (Betaproteobactérias oxidadoras de amônia)	Pequenas colônias e células dispersas - Algumas (\cong 20% DAPI)	Pequenas colônias - Algumas (\cong 30% DAPI)
NEU (a maioria das Nitrosomanas + Nitrosococcus mobilis)	Poucas colônias (\cong 5% DAPI)	Pequenas colônias - Poucas (\cong 10% DAPI)
Nmv (Nitrosococcus mobilis)	Não detectado (\cong 0% DAPI)	Não detectado (\cong 0% DAPI)
NIT3 (Nitrobacter spp)	Não detectado (\cong 0% DAPI)	Não detectado (\cong 0% DAPI)
Ntspa662 (Nitrospira spp)	Pequenas colônias – Algumas (< 20% DAPI)	Não detectado (\cong 0% DAPI)
Ntspn693 (Nitrospina gracilis)	Raras colônias - (< 2% DAPI)	Não detectado (\cong 0% DAPI)
AMX 820 anaerobic ammonium-oxidizing bacteria, Candidatus 'Brocadia anammoxidans' and Candidatus 'Kuenenia stuttgartiensis'	Raras colônias e células pouco dispersas - (\cong 1% DAPI)	Não detectado (\cong 0% DAPI)

Tabela A1.5: Estimativa da abundância dos microrganismos presentes nas amostras retiradas de diferentes locais do reator UD ao final do período de observação.

AMOSTRA SONDA	Tube de Alimentação	Rede de Retenção
Caracterização geral da amostra	Amostra heterogênea com flocos irregulares. Presença de pequenas colônias e células na sua maioria agrupadas, sendo estas cocos, bacilos, diplobacilos e filamentos curtos e longos. Presença de muito material extracelular.	Amostra heterogênea com flocos irregulares. Presença de pequenas colônias e células na sua maioria dispersas, sendo estas cocos, bacilos, diplobacilos e filamentos curtos e longos. Presença de muito material extracelular.
EUB mix (todas as eubactérias)	Presença de colônias e filamentos longos – Muitas (> 90% DAPI)	Presença de colônias grandes e pequenas - Muitas (> 90% DAPI)
Nso190 (Betaproteobactérias oxidadoras de amônia)	Presença de pequenas colônias e células isoladas – Poucas (\cong 20% DAPI)	Pequenas colônias - Poucas (\cong 15% DAPI)
NEU (a maioria das Nitrosomanas + Nitrosococcus mobilis)	Presença de pequenas colônias – Poucas (\cong 10% DAPI)	Pequenas colônias - Poucas (\cong 10% DAPI)
Nmv (Nitrosococcus mobilis)	Presença de pequenas colônias – Poucas (\cong 15% DAPI)	Pequenas colônias - Poucas (\cong 10% DAPI)
NIT3 (Nitrobacter spp)	Não detectado (\cong 0% DAPI)	Pequenas colônias - Poucas (\cong 10% DAPI)
Ntspa662 (Nitrospira spp)	Raras colônias - (< 2% DAPI)	Não detectado (\cong 0% DAPI)
Ntspn693 (Nitrospina gracilis)	Não detectado (\cong 0% DAPI)	Pequenas colônias - Poucas (\cong 10% DAPI)
AMX 820 anaerobic ammonium-oxidizing bacteria, Candidatus 'Brocadia anammoxidans' and Candidatus 'Kuenenia stuttgartiensis'	Raras colônias pequenas - (< 2% DAPI)	Raras colônias - (< 2% DAPI)

Tabela A1.6: Estimativa da abundância dos microrganismos presentes nas amostras de aglomerados de coloração avermelhada retiradas do reator UD ao final do período de acompanhamento.

SONDA	AMOSTRA		
	A1	A2	A3
Caracterização geral da amostra	Amostra heterogênea, com aglomerados celulares de diversos tamanhos. Presença de colônias, e células dispersas, sendo estas cocos, bacilos, diplobacilos e filamentos longos. Presença de muito material extracelular.	Amostra homogênea com flocos irregulares de diferentes tamanhos. Presença de pequenas colônias, predomínio de cocos, e alguns filamentos. Presença de pouco material extracelular.	Amostra heterogênea. Presença de células dispersas, sendo estas cocos, bacilos, diplobacilos e filamentos curtos e longos. Presença de pouco material extracelular.
EUB mix (todas as eubactérias)	Presença de células dispersas, colônias e filamentos - Muitas - (> 90% DAPI)	Presença de células dispersas, colônias e filamentos - Muitas (> 90% DAPI)	Presença de colônias grandes e pequenas - Muitas (> 90% DAPI)
Nso190 (Betaproteobactérias oxidadoras de amônia)	Pequenas colônias e células dispersas - Raras (\cong 1% DAPI)	Pequenas colônias - Raras (\cong 2% DAPI)	Pequenas colônias - Raras (\cong 5% DAPI)
NEU (a maioria das Nitrosomanas + Nitrosococcus mobilis)	Raras colônias (\cong 1% DAPI)	Pequenas colônias e células isoladas - Raras (\cong 2% DAPI)	Pequenas colônias - Raras (\cong 2% DAPI)
Nmv (Nitrosococcus mobilis)	Pequenas colônias - Raras (< 1% DAPI)	Não detectado (\cong 0% DAPI)	Pequenas colônias - Raras (< 1% DAPI)
NIT3 (Nitrobacter spp)	Pequenas colônias - Raras (< 2% DAPI)	Não detectado (\cong 0% DAPI)	Não detectado (\cong 0% DAPI)
Ntspa662 (Nitrospira spp)	Não detectado (\cong 0% DAPI)	Pequenas colônias - Raras (< 2% DAPI)	Pequenas colônias - Raras (< 2% DAPI)
Ntspn693 (Nitrospina gracilis)	Não detectado (\cong 0% DAPI)	Pequenas colônias - Raras (< 5% DAPI)	Pequenas colônias - Raras (< 1% DAPI)
AMX 820 anaerobic ammonium-oxidizing bacteria, Candidatus 'Brocadia anammoxidans' and Candidatus 'Kuenenia stuttgartiensis'	Não detectado (\cong 0% DAPI)	Não detectado (\cong 0% DAPI)	Não detectado (\cong 0% DAPI)

Tabela A1.7: Estimativa da abundância dos microrganismos presentes nas amostras de aglomerados de coloração marrons, e mais comuns, retiradas do reator UD ao final do período de acompanhamento.

SONDA	AMOSTRA
	B1
Caracterização geral da amostra	Amostra heterogênea. Presença de colônias e células isoladas, sendo estas cocos, bacilos e filamentos curtos e longos. Presença de pouco material extracelular.
EUB mix (todas as eubactérias)	Presença de células dispersas, colônias e filamentos - Muitas (> 90% DAPI)
Nso190 (Betaproteobactérias oxidadoras de amônia)	Não detectado (\cong 0% DAPI)
NEU (a maioria das Nitrosomanas + Nitrosococcus mobilis)	Presença de pequenas colônias – Raras (\cong 1% DAPI)
Nmv (Nitrosococcus mobilis)	Não detectado (\cong 0% DAPI)
NIT3 (Nitrobacter spp)	Não detectado (\cong 0% DAPI)
Ntspa662 (Nitrospira spp)	Não detectado (\cong 0% DAPI)
Ntspn693 (Nitrospina gracilis)	Presença de pequenas colônias – Raras (\cong 5% DAPI)
AMX 820 anaerobic ammonium-oxidizing bacteria, Candidatus 'Brocadia anammoxidans' and Candidatus 'Kuenenia stuttgartiensis'	Não detectado (\cong 0% DAPI)

Tabela A2.1: Acompanhamento das concentrações de entrada e saída de nitrito, nitrato e amônia para o Reator RBA.

Data	Dia	Entrada N-NO ₂ ⁻ (mgL ⁻¹)	Erro	Saída de N-NO ₂ ⁻ (mgL ⁻¹)	Entrada N-NO ₃ ⁻ (mgL ⁻¹)	Saída de N-NO ₃ ⁻ (mgL ⁻¹)	Entrada N-NH ₄ ⁺ (mgL ⁻¹)	Erro	Saída de N-NH ₄ ⁺ (mgL ⁻¹)	Remoção N-NO ₂ ⁻ (mgL ⁻¹)	Produção N-NO ₃ ⁻ (mgL ⁻¹)	Remoção N-NH ₄ ⁺ (mgL ⁻¹)	Vazão RBA (L·d ⁻¹)
17/8/05	0	24,70	3,71	0,27	7,02	26,44	33,32	4,95	23,44	24,43	19,43	9,88	2,00
18/8/05	1	24,70		0,26	9,08	26,60	33,32		27,48	24,44	17,52	5,84	2,00
19/8/05	2	24,70		0,37	10,64	26,74	33,32		25,72	24,32	16,11	7,61	2,00
24/8/05	7	24,70		1,30	8,23	30,97	33,32		20,46	23,40	22,74	12,86	2,00
29/8/05	12	24,70		3,81	4,77	27,49	33,32		19,51	20,89	22,72	13,81	2,00
31/8/05	14	58,95	4,99	24,23	6,72	37,02	54,93	5,04	43,94	34,72	30,30	10,98	2,00
2/9/05	16	58,95		28,92	7,21	36,51	54,93		50,55	30,03	29,30	4,37	2,00
5/9/05	19	58,95		12,93	4,16	44,68	54,93		42,76	46,02	40,52	12,16	2,00
6/9/05	20	92,61	2,08	25,92	10,06	38,25	87,11	1,66	55,64	66,69	28,19	31,48	2,00
9/9/05	23	92,61		50,92	7,47	45,72	87,11		71,48	41,69	38,25	15,63	2,00
12/9/05	26	92,61		55,75	18,04	45,10	87,11		75,10	36,86	27,06	12,01	2,00
14/9/05	28	124,18	4,65	85,99	42,44	56,98	116,54	1,39	102,65	38,19	14,54	13,89	2,00
16/9/05	30	124,18		93,06	29,86	46,28	116,54		108,58	31,12	16,42	7,96	2,00
21/9/05	35	124,18		88,59	14,90	47,91	116,54		108,28	35,59	33,01	8,26	2,00
23/9/05	37	124,18		89,32	6,48	38,14	116,54		107,76	34,86	31,66	8,78	2,00
26/9/05	40	124,18		98,11	0,00	35,23	116,54		108,66	26,07	35,23	7,89	2,00
30/9/05	44	124,18		107,13	0,00	4,93	116,54		106,49	17,05	4,93	10,05	2,00
3/10/05	47	124,18		99,24	0,00	7,14	116,54		107,91	24,94	7,14	8,63	2,00
6/10/05	50	124,18		110,26	0,00	11,46	116,54		104,50	13,92	11,46	12,05	2,00
11/10/05	55	124,18		102,23	0,00	15,79	116,54		105,11	21,95	15,79	11,43	2,00
13/10/05	57	124,18		98,60	0,00	15,24	116,54		103,31	25,58	15,24	13,24	2,00
17/10/05	61	124,18		99,97	0,00	10,42	116,54		100,63	24,21	10,42	15,91	2,00
19/10/05	63	124,18		89,66	0,00	15,70	188,00		156,40	34,52	15,70	31,60	2,00
21/10/05	65	124,18		89,78	0,00	12,92	188,00		168,47	34,40	12,92	19,53	2,00
24/10/05	68	41,72	7,19	9,95	0,00	13,35	37,52	6,68	29,41	31,77	13,35	8,10	2,00
26/10/05	70	41,72		7,31	0,00	4,26	37,52		16,81	34,40	4,26	20,71	2,00
28/10/05	72	41,72		9,10	0,35	5,97	37,52		18,78	32,62	5,62	18,74	2,00

Tabela A2.1 (cont.): Acompanhamento das concentrações de entrada e saída de nitrito, nitrato e amônia para o Reator RBA.

Data	Dia	Entrada N-NO ₂ ⁻ (mgL ⁻¹)	Erro	Saída de N-NO ₂ ⁻ (mgL ⁻¹)	Entrada N-NO ₃ ⁻ (mgL ⁻¹)	Saída de N-NO ₃ ⁻ (mgL ⁻¹)	Entrada N-NH ₄ ⁺ (mgL ⁻¹)	Erro	Saída de N-NH ₄ ⁺ (mgL ⁻¹)	Remoção N-NO ₂ ⁻ (mgL ⁻¹)	Produção N-NO ₃ ⁻ (mgL ⁻¹)	Remoção N-NH ₄ ⁺ (mgL ⁻¹)	Vazão RBA (L·d ⁻¹)
31/10/05	75	41,72	7,19	20,78	0,00	10,35	37,52	6,68	31,94	20,94	10,35	5,57	2,00
2/11/05	77	41,72		12,90	0,00	10,29	37,52		21,31	28,82	10,29	16,20	2,00
4/11/05	79	41,72		18,96	3,43	12,69	37,52		20,45	22,75	9,26	17,06	2,00
7/11/05	82	41,72		25,77	2,86	13,71	37,52		23,40	15,94	10,86	14,12	2,00
11/11/05	86	41,72		25,76	1,64	11,91	37,52		24,33	15,96	10,28	13,18	2,00
14/11/05	89	41,72		19,08	6,06	16,01	37,52		19,19	22,64	9,95	18,32	2,00
18/11/05	93	72,86	1,67	20,88	4,12	17,98	62,19	2,27	14,84	51,98	13,86	47,35	2,00
22/11/05	97	72,86		37,80	0,00	18,05	62,19		42,41	35,05	18,05	19,78	2,00
25/11/05	100	72,86		37,45	2,78	18,34	62,19		41,19	35,40	15,57	21,00	2,00
29/11/05	104	72,86		35,49	0,00	16,43	62,19		38,96	37,37	16,43	23,23	2,00
2/12/05	107	72,86		23,88	1,51	22,59	62,19		29,51	48,97	21,08	32,69	2,00
7/12/05	112	72,86		55,66	0,00	0,00	62,19		52,69	17,20	0,00	9,50	2,00
9/12/05	114	72,86		38,26	0,00	18,72	62,19		46,69	34,60	18,72	15,50	2,00
13/12/05	118	72,86		32,71	1,11	7,12	62,19		38,50	40,15	6,01	23,70	2,00
16/12/05	121	72,86		38,73	0,00	6,71	62,19		40,09	34,13	6,71	22,10	2,00
19/12/05	124	72,86		36,55	0,00	5,65	62,19		41,31	36,30	5,65	20,88	2,00
23/12/05	128	72,86		35,35	0,00	7,49	62,19		41,03	37,51	7,49	21,16	2,00
27/12/05	132	72,86		37,38	0,00	3,59	62,19		41,07	35,48	3,59	21,13	2,00
4/1/06	140	72,86		15,62	0,00	15,08	62,19		26,47	57,24	15,08	35,72	2,00
6/1/06	142	92,17		1,57	20,92	2,41	18,09		80,53	1,60	32,64	71,25	15,68
10/1/06	146	92,17	48,97		3,83	23,13	80,53	52,67	43,21		19,30	27,86	2,00
13/1/06	149	92,17	41,64		2,31	23,69	80,53	45,35	50,53		21,38	35,18	2,00
17/1/06	153	92,17	45,85		0,00	12,00	80,53	50,73	46,33		12,00	29,80	2,00
20/1/06	156	92,17	39,45		1,81	17,19	80,53	43,85	52,73		15,38	36,68	2,00
24/1/06	160	92,17	52,04		0,00	15,73	80,53	54,75	40,14		15,73	25,78	2,00
27/1/06	163	92,17	42,00		2,01	24,43	80,53	49,68	50,17		22,41	30,85	2,00
31/1/06	167	92,17	30,11		0,00	26,84	80,53	41,83	62,07		26,84	38,70	2,00

Tabela A2.1 (cont.): Acompanhamento das concentrações de entrada e saída de nitrito, nitrato e amônia para o Reator RBA.

Data	Dia	Entrada N-NO ₂ ⁻ (mgL ⁻¹)	Erro	Saída de N-NO ₂ ⁻ (mgL ⁻¹)	Entrada N-NO ₃ ⁻ (mgL ⁻¹)	Saída de N-NO ₃ ⁻ (mgL ⁻¹)	Entrada N-NH ₄ ⁺ (mgL ⁻¹)	Erro	Saída de N-NH ₄ ⁺ (mgL ⁻¹)	Remoção N-NO ₂ ⁻ (mgL ⁻¹)	Produção N-NO ₃ ⁻ (mgL ⁻¹)	Remoção N-NH ₄ ⁺ (mgL ⁻¹)	Vazão RBA (L·d ⁻¹)
3/2/06	170	69,68	4,97	13,14	13,72	28,68	60,98	2,04	26,51	75,39	14,96	45,97	2,67±0,27
7/2/06	174	69,68		25,12	0,00	25,12	60,98		31,06	59,41	25,12	39,90	2,67±0,27
10/2/06	177	69,68		15,78	3,94	30,91	60,98		29,02	71,88	26,96	42,63	2,67±0,27
14/2/06	181	69,68		14,80	7,88	28,50	60,98		25,68	73,18	20,62	47,07	2,67±0,27
21/2/06	188	69,68		13,35	11,83	26,10	60,98		31,66	75,11	14,28	39,11	2,67±0,27
10/3/06	205	69,68		3,13	0,00	24,14	60,98		16,19	88,74	24,14	59,73	2,67±0,27
13/3/06	208	69,68		24,95	0,00	26,98	60,98		31,54	59,64	26,98	39,26	2,67±0,27
17/3/06	212	69,68		19,31	0,66	29,83	60,98		25,03	67,16	29,17	47,95	2,67±0,27
21/3/06	216	69,68		17,95	0,73	12,10	60,98		20,94	68,98	11,38	53,39	2,67±0,27
24/3/06	219	89,75		29,63	7,31	23,30	82,93		34,80	80,18	15,99	64,17	2,67±0,27
27/3/06	222	89,75		33,53	1,88	25,94	82,93		40,17	74,98	24,06	57,02	2,67±0,27
29/3/06	224	89,75		33,98	10,94	27,70	82,93		37,52	74,38	16,76	60,55	2,67±0,27
31/3/06	226	89,75		29,98	2,09	21,55	82,93		40,20	79,72	19,46	56,98	2,67±0,27
3/4/06	229	89,75		39,48	4,39	22,65	82,93		46,55	67,05	18,26	48,51	2,67±0,27
5/4/06	231	89,75		42,90	0,31	22,51	82,93		45,68	62,48	22,20	49,67	2,67±0,27
7/4/06	233	112,40	5,09	51,25	2,56	18,54	105,44	2,34	54,76	81,54	15,98	67,59	2,67±0,27
10/4/06	236	112,40		65,05	14,55	27,55	105,44		70,78	63,14	13,00	46,23	2,67±0,27
17/4/06	243	112,40		74,58	1,53	21,43	105,44		75,17	50,44	19,90	40,38	2,67±0,27
19/4/06	245	112,40		79,60	3,85	17,20	105,44		75,92	43,74	13,35	39,37	2,67±0,27
26/4/06	252	112,40		93,28	0,00	16,88	105,44		98,89	25,50	16,88	8,73	2,67±0,27
3/5/06	259	112,40		88,68	0,00	21,58	105,44		99,31	31,64	21,58	8,19	2,67±0,27
5/5/06	261	112,40		88,25	13,10	26,28	105,44		97,68	32,20	13,18	10,36	2,67±0,27
8/5/06	264	112,40		85,90	10,68	21,40	105,44		96,42	35,34	10,73	12,03	2,67±0,27
10/5/06	266	112,40		85,53	0,00	23,18	105,44		96,69	35,84	23,18	11,67	2,67±0,27
12/5/06	268	112,40		86,80	21,05	52,48	105,44		96,11	34,14	31,43	12,44	2,67±0,27
15/5/06	271	112,40		88,60	20,13	41,60	105,44		98,30	31,74	21,48	9,53	2,67±0,27

Tabela A2.2: Acompanhamento das concentrações de entrada e saída de nitrito, nitrato e amônia para o Reator UD.

Data	Dia	Entrada N-NO ₂ ⁻ (mgL ⁻¹)	Erro	Saída de N-NO ₂ ⁻ (mgL ⁻¹)	Entrada N-NO ₃ ⁻ (mgL ⁻¹)	Saída de N-NO ₃ ⁻ (mgL ⁻¹)	Entrada N-NH ₄ ⁺ (mgL ⁻¹)	Erro	Saída de N-NH ₄ ⁺ (mgL ⁻¹)	Remoção N-NO ₂ ⁻ (mgL ⁻¹)	Produção N-NO ₃ ⁻ (mgL ⁻¹)	Remoção N-NH ₄ ⁺ (mgL ⁻¹)	Vazão UD (Ld ⁻¹)
17/8/05	0	24,70	3,71	0,94	7,02	14,48	23,76	4,95	2,72	23,76	7,46	30,60	2,00
18/8/05	1	24,70		0,81	9,08	13,49	33,32		7,61	23,89	4,41	25,72	2,00
19/8/05	2	24,70		1,08	10,64	12,93	33,32		7,94	23,62	2,29	25,39	2,00
24/8/05	7	24,70		1,59	8,23	10,23	33,32		0,00	23,11	2,00	33,32	2,00
29/8/05	12	24,70		1,43	4,77	5,56	33,32		0,00	23,27	0,78	33,32	2,00
31/8/05	14	58,95	4,99	11,49	6,72	12,84	54,93	5,04	11,61	47,46	6,13	43,32	2,00
2/9/05	16	58,95		11,57	7,21	16,17	54,93		14,37	47,38	8,96	40,56	2,00
5/9/05	19	58,95		2,07	4,16	11,94	54,93		3,27	56,88	7,78	51,66	2,00
6/9/05	20	92,61	2,08	12,20	10,06	13,16	87,11	1,66	11,56	80,41	3,10	75,55	2,00
9/9/05	23	92,61		8,58	7,47	20,46	87,11		19,80	84,03	12,99	67,31	2,00
12/9/05	26	92,61		9,42	18,04	20,74	87,11		17,29	83,19	2,70	69,82	2,00
14/9/05	28	124,18	4,65	34,59	42,44	31,73	116,54	1,39	47,48	89,59	10,79	69,06	2,00
16/9/05	30	124,18		13,65	29,86	44,32	116,54		43,16	110,53	14,47	73,39	2,00
21/9/05	35	124,18		26,85	14,90	27,89	116,54		40,88	97,33	12,99	75,66	2,00
23/9/05	37	124,18		10,48	6,48	28,36	116,54		26,11	113,70	21,88	90,43	2,00
26/9/05	40	124,18		34,54	0,00	28,06	116,54		50,13	89,64	28,06	66,41	2,00
30/9/05	44	124,18		39,66	0,00	24,78	116,54		58,82	84,52	24,78	57,72	2,00
3/10/05	47	124,18		38,02	0,00	18,71	116,54		56,55	86,16	18,71	60,00	2,00
6/10/05	50	124,18		40,51	0,00	17,67	116,54		56,04	83,67	17,67	60,50	2,00
11/10/05	55	124,18		35,07	0,00	25,00	116,54		52,03	89,11	25,00	64,51	2,00
13/10/05	57	124,18		18,24	0,00	28,18	116,54		40,55	105,94	28,18	75,99	2,00
17/10/05	61	124,18		24,92	0,00	22,42	116,54		42,43	99,26	22,42	74,12	2,00
19/10/05	63	124,18		38,59	0,00	9,47	188,00		109,76	85,59	9,47	78,24	2,00
21/10/05	65	124,18		35,06	0,00	22,29	188,00		123,33	89,12	22,29	64,67	2,00
24/10/05	68	150,17	17,05	66,40	0,00	19,58	146,25	0,99	95,54	83,77	19,58	50,71	2,00
26/10/05	70	150,17		71,44	0,00	30,69	146,25		96,89	78,73	30,69	49,36	2,00
28/10/05	72	150,17		97,45	0,00	15,51	146,25		108,52	52,72	15,51	37,73	2,00
31/10/05	75	150,17		95,90	0,00	4,83	146,25		94,70	54,27	4,83	51,55	2,00

Tabela A2.2 (Cont.): Acompanhamento das concentrações de entrada e saída de nitrito, nitrato e amônia para o Reator UD.

Data	Dia	Entrada N-NO ₂ ⁻ (mgL ⁻¹)	Erro	Saída de N-NO ₂ ⁻ (mgL ⁻¹)	Entrada N-NO ₃ ⁻ (mgL ⁻¹)	Saída de N-NO ₃ ⁻ (mgL ⁻¹)	Entrada N-NH ₄ ⁺ (mgL ⁻¹)	Erro	Saída de N-NH ₄ ⁺ (mgL ⁻¹)	Remoção N-NO ₂ ⁻ (mgL ⁻¹)	Produção N-NO ₃ ⁻ (mgL ⁻¹)	Remoção N-NH ₄ ⁺ (mgL ⁻¹)	Vazão UD (Ld ⁻¹)
2/11/05	77	80,78	3,04	56,13	0,00	10,92	71,29	2,37	58,48	24,65	10,92	12,82	2,00
4/11/05	79	80,78		42,23	2,03	17,38	71,29		41,33	38,55	15,35	29,96	2,00
7/11/05	82	80,78		39,74	0,30	17,99	71,29		39,43	41,04	17,69	31,86	2,00
11/11/05	86	80,78		28,08	0,00	21,49	71,29		31,63	52,70	21,49	39,66	2,00
14/11/05	89	80,78		36,31	5,90	19,00	71,29		33,43	44,47	13,11	37,87	2,00
18/11/05	93	80,78		31,74	6,41	19,10	71,29		28,32	49,05	12,69	42,97	2,00
22/11/05	97	80,78		32,37	0,00	9,90	71,29		34,47	48,42	9,90	36,82	2,00
25/11/05	100	80,78		31,19	2,35	14,29	71,29		31,77	49,60	11,95	39,52	2,00
29/11/05	104	80,78		29,39	0,00	13,88	71,29		33,32	51,39	13,88	37,97	2,00
2/12/05	107	103,85		37,42	2,25	14,10	92,49		37,39	66,43	11,85	55,10	2,00
7/12/05	112	103,85	40,47	0,00	7,47	92,49	44,99	63,38	7,47	47,50	2,00		
9/12/05	114	103,85	34,72	1,55	13,91	92,49	38,46	69,13	12,37	54,02	2,00		
13/12/05	118	103,85	40,51	6,26	14,10	92,49	41,66	63,34	7,85	50,83	2,00		
16/12/05	121	103,85	45,22	0,00	13,37	92,49	39,54	58,63	13,37	52,95	2,00		
19/12/05	124	103,85	40,40	0,00	14,24	92,49	40,48	63,45	14,24	52,01	2,00		
23/12/05	128	103,85	30,11	0,00	14,83	92,49	34,19	73,74	14,83	58,29	2,00		
27/12/05	132	103,85	43,80	0,00	18,88	92,49	44,64	60,05	18,88	47,85	2,00		
4/1/06	140	103,85	37,99	0,00	11,29	92,49	38,94	65,85	11,29	53,54	2,00		
6/1/06	142	119,53	42,32	5,61	19,67	109,79	46,12	77,21	14,06	63,67	2,00		
10/1/06	146	119,53	51,02	8,63	20,40	109,79	52,67	68,51	11,77	57,12	2,00		
13/1/06	149	119,53	43,55	2,29	19,23	109,79	45,52	75,98	16,94	64,27	2,00		
17/1/06	153	119,53	54,76	0,00	6,53	109,79	57,48	64,77	6,53	52,31	2,00		
20/1/06	156	119,53	46,92	0,37	19,52	109,79	52,30	72,61	19,15	57,49	2,00		
24/1/06	160	119,53	51,60	1,83	18,36	109,79	56,46	67,93	16,52	53,33	2,00		
27/1/06	163	119,53	48,07	4,28	21,14	109,79	52,47	71,46	16,86	57,32	2,00		
31/1/06	167	119,53	43,85	0,00	11,96	109,79	50,94	75,68	11,96	58,85	2,00		
3/2/06	170	91,08	26,30	0,00	16,63	81,70	31,76	86,39	16,63	66,61	2,67±0,23		
7/2/06	174	91,08	37,67	0,00	15,03	81,70	39,42	71,22	15,03	56,39	2,67±0,23		

Tabela A2.2 (Cont.): Acompanhamento das concentrações de entrada e saída de nitrito, nitrato e amônia para o Reator UD.

Data	Dia	Entrada N-NO ₂ ⁻ (mgL ⁻¹)	Erro	Saída de N-NO ₂ ⁻ (mgL ⁻¹)	Entrada N-NO ₃ ⁻ (mgL ⁻¹)	Saída de N-NO ₃ ⁻ (mgL ⁻¹)	Entrada N-NH ₄ ⁺ (mgL ⁻¹)	Erro	Saída de N-NH ₄ ⁺ (mgL ⁻¹)	Remoção N-NO ₂ ⁻ (mgL ⁻¹)	Produção N-NO ₃ ⁻ (mgL ⁻¹)	Remoção N-NH ₄ ⁺ (mgL ⁻¹)	Vazão UD (L·d ⁻¹)
10/2/06	177	91,08	3,25	34,39	0,00	14,00	81,70	2,71	34,60	75,60	14,00	62,82	2,67±0,23
14/2/06	181	91,08		32,02	0,00	21,07	81,70		31,66	78,77	21,07	66,74	2,67±0,23
21/2/06	188	91,08		24,25	9,48	19,93	81,70		31,66	89,12	10,45	66,74	2,67±0,23
10/3/06	205	91,08		14,73	0,00	17,99	81,70		24,43	101,82	17,99	76,38	2,67±0,23
13/3/06	208	91,08		47,54	0,00	26,83	81,70		40,52	58,07	26,83	54,93	2,67±0,23
17/3/06	212	91,08		30,38	1,74	24,94	81,70		32,39	80,94	23,20	65,77	2,67±0,23
21/3/06	216	91,08		48,68	5,88	13,33	81,70		51,15	56,55	7,45	40,75	2,67±0,23
24/3/06	219	113,14		34,18	0,00	24,78	103,44		37,55	105,30	24,78	87,86	2,67±0,23
27/3/06	222	113,14	4,55	34,78	0,00	26,63	103,44	2,24	38,74	104,50	26,63	86,28	2,67±0,23
29/3/06	224	113,14		42,10	11,55	27,75	103,44		44,95	94,73	16,20	77,99	2,67±0,23
31/3/06	226	113,14		23,90	0,00	27,35	103,44		30,52	119,00	27,35	97,23	2,67±0,23
3/4/06	229	113,14		29,88	0,00	22,23	103,44		36,67	111,04	22,23	89,04	2,67±0,23
5/4/06	231	113,14		33,78	0,83	22,78	103,44		33,63	105,84	21,95	93,09	2,67±0,23
7/4/06	233	158,10	4,09	48,83	4,10	21,71	148,53	2,41	52,51	145,72	17,61	128,04	2,67±0,23
10/4/06	236	158,10		78,65	17,68	30,40	148,53		80,55	105,95	12,73	90,66	2,67±0,23
17/4/06	243	158,10		88,28	0,00	21,21	148,53		94,26	93,11	21,21	72,37	2,67±0,23
19/4/06	245	158,10		91,28	0,00	17,59	148,53		87,87	89,11	17,59	80,89	2,67±0,23
26/4/06	252	158,10		66,00	0,00	19,35	148,53		72,87	122,82	19,35	100,90	2,67±0,23
3/5/06	259	158,10		38,85	0,00	21,24	148,53		50,58	159,02	21,24	130,62	2,67±0,23
5/5/06	261	158,10		39,23	0,00	22,00	148,53		44,90	158,52	22,00	138,19	2,67±0,23
8/5/06	264	158,10		20,83	0,00	29,29	148,53		34,52	183,06	29,29	152,04	2,67±0,23
10/5/06	266	158,10		10,45	0,00	18,01	148,53		21,48	196,89	18,01	169,42	2,67±0,23
12/5/06	268	229,57		10,49	118,10	38,75	65,10		212,21	3,11	128,01	148,65	26,35
15/5/06	271	229,57	152,60		54,50	59,68	212,21	160,95	102,64		5,18	68,35	2,67±0,23
17/5/06	273	229,57	107,05		33,95	51,43	212,21	114,68	163,38		17,48	130,05	2,67±0,23
19/5/06	275	229,57	84,90		29,10	52,90	212,21	102,55	192,92		23,80	146,22	2,67±0,23
22/5/06	278	229,57	112,50		0,35	41,35	212,21	110,49	156,11		41,00	135,64	2,67±0,23
24/5/06	280	229,57	92,15		0,00	26,20	212,21	100,00	183,25		26,20	149,63	2,67±0,23

Tabela A2.2 (Cont.): Acompanhamento das concentrações de entrada e saída de nitrito, nitrato e amônia para o Reator UD.

Data	Dia	Entrada N-NO ₂ ⁻ (mgL ⁻¹)	Erro	Saída de N-NO ₂ ⁻ (mgL ⁻¹)	Entrada N-NO ₃ ⁻ (mgL ⁻¹)	Saída de N-NO ₃ ⁻ (mgL ⁻¹)	Entrada N-NH ₄ ⁺ (mgL ⁻¹)	Erro	Saída de N-NH ₄ ⁺ (mgL ⁻¹)	Remoção N-NO ₂ ⁻ (mgL ⁻¹)	Produção N-NO ₃ ⁻ (mgL ⁻¹)	Remoção N-NH ₄ ⁺ (mgL ⁻¹)	Vazão UD (Ld ⁻¹)
29/5/06	285	229,57	10,49	104,75	1,30	40,90	212,21	3,11	105,12	166,45	39,60	142,81	2,67±0,23
31/5/06	287	229,57		95,85	0,00	24,58	212,21		97,91	178,32	24,58	152,42	2,67±0,23
2/6/06	289	229,57		103,20	18,55	45,00	212,21		104,48	168,51	26,45	143,66	2,67±0,23
5/6/06	292	229,57		123,65	0,00	21,45	212,21		117,15	141,24	21,45	126,76	2,67±0,23
7/6/06	294	229,57		113,80	17,20	57,30	212,21		108,86	154,38	40,10	137,82	2,67±0,23
9/6/06	296	229,57		110,80	0,00	18,80	212,21		108,56	158,38	18,80	138,22	2,67±0,23
12/6/06	299	229,57		102,00	0,00	19,68	212,21		101,31	170,11	19,68	147,88	2,67±0,23
14/6/06	301	229,57		120,75	3,35	28,75	212,21		105,92	145,11	25,40	141,74	2,67±0,23
16/6/06	303	229,57		103,15	14,05	36,60	212,21		100,99	168,58	22,55	148,31	2,67±0,23
19/6/06	306	229,57		107,20	3,10	15,70	212,21		105,85	163,18	12,60	141,83	2,67±0,23
21/6/06	308	229,57		101,20	5,55	34,25	212,21		104,30	171,18	28,70	143,90	2,67±0,23
23/6/06	310	229,57		94,50	20,00	28,10	212,21		100,04	180,12	8,10	149,57	2,67±0,23
26/6/06	313	229,57		109,15	0,00	10,38	212,21		113,47	160,58	10,38	131,67	2,67±0,23
5/7/06	322	229,57		111,00	22,05	36,00	212,21		109,47	158,11	13,95	137,01	2,67±0,23
7/7/06	324	149,40		5,41	76,14	0,00	24,40		137,69	7,61	79,50	97,69	24,40
10/7/06	327	149,40	76,40		11,40	32,20	137,69	78,62	97,35		20,80	78,77	2,67±0,23
12/7/06	329	149,40	45,70		0,00	24,50	137,69	41,86	138,29		24,50	127,79	2,67±0,23
19/7/06	336	149,40	54,55		21,00	45,15	137,69	51,92	126,49		24,15	114,37	2,67±0,23
20/7/06	337	149,40	27,50		15,95	37,75	137,69	39,66	162,56		21,80	130,73	2,67±0,23
24/7/06	341	149,40	45,40		8,55	40,41	137,69	53,28	138,69		31,86	112,56	2,67±0,23
26/7/06	343	149,40	44,49		7,00	37,63	137,69	39,69	139,90		30,63	130,68	2,67±0,23
31/7/06	348	149,40	80,09		5,35	21,66	137,69	84,05	92,43		16,31	71,53	2,67±0,23

Tabela A2.3: Acompanhamento da remoção de Alcalinidade e Amônia para o reator RBA.

Data	Dia	KHCO ₃ do Meio de cultura (mgL ⁻¹)	Alcalinidade CaCO ₃ de entrada (mgL ⁻¹)	Alcalinidade CaCO ₃ de saída (mgL ⁻¹)	Entrada de N-NH ₄ ⁺ (mgL ⁻¹)	Saída de N-NH ₄ ⁺ (mgL ⁻¹)	Remoção de Alcalinidade CaCO ₃ (mgL ⁻¹ .d ⁻¹)	Remoção de N-NH ₄ ⁺ (mgL ⁻¹ .d ⁻¹)	pH de Entrada	pH de Saída
10/3/06	205	125	57,00	16,00	60,98	16,19	54,67	59,73	7,58	6,88
13/3/06	208	200	82,00	29,00	60,98	31,54	70,68	39,26	7,84	6,71
17/3/06	212	200	104,80	38,10	60,98	25,03	88,94	47,95	7,79	6,92
21/3/06	216	200	81,00	45,20	60,98	20,94	47,74	53,39	7,29	7,00
24/3/06	219	200	107,10	38,10	82,93	34,80	92,01	64,17	7,59	6,76
27/3/06	222	200	95,20	44,00	82,93	40,17	68,28	57,02	7,41	6,80
29/3/06	224	200	79,80	38,10	82,93	37,52	55,61	60,55	7,14	6,62
31/3/06	226	200	107,70	48,80	82,93	40,20	78,54	56,98	7,67	6,73
3/4/06	229	200	91,70	50,00	82,93	46,55	55,61	48,51	7,38	6,62
5/4/06	231	200	71,40	39,30	82,93	45,68	42,81	49,67	7,00	6,60
7/4/06	233	300	156,00	93,00	105,44	54,76	84,01	67,59	7,82	6,85
10/4/06	236	300	131,00	89,30	105,44	70,78	55,61	46,23	6,95	6,95
17/4/06	243	300	142,90	97,60	105,44	75,17	60,41	40,38	7,56	7,04
19/4/06	245	300	119,00	86,90	105,44	75,92	42,81	39,37	7,28	6,91

Tabela A2.4: Acompanhamento da remoção de Alcalinidade e Amônia para o reator UD.

Data	Dia	KHCO ₃ do Meio de cultura (mgL ⁻¹)	Alcalinidade CaCO ₃ de entrada (mgL ⁻¹)	Alcalinidade CaCO ₃ de saída (mgL ⁻¹)	Entrada de N-NH ₄ ⁺ (mgL ⁻¹)	Saída de N-NH ₄ ⁺ (mgL ⁻¹)	Remoção de Alcalinidade CaCO ₃ (mgL ⁻¹ d ⁻¹)	Remoção de N-NH ₄ ⁺ (mgL ⁻¹ d ⁻¹)	pH de Entrada	pH de Saída
10/3/06	205	125	73,00	14,00	81,70	24,43	78,68	76,38	7,56	6,81
13/3/06	208	200	84,00	44,00	81,70	40,52	53,34	54,93	7,75	7,13
21/3/06	216	200	89,30	65,50	81,70	51,15	31,74	40,75	7,46	7,24
24/3/06	219	200	103,60	45,20	103,44	37,55	77,88	87,86	7,61	7,03
27/3/06	222	200	96,40	39,30	103,44	38,74	76,14	86,28	7,48	6,90
29/3/06	224	200	84,50	45,20	103,44	44,95	52,41	77,99	7,25	6,82
31/3/06	226	200	103,60	42,90	103,44	30,52	80,94	97,23	7,70	6,76
3/4/06	229	200	95,20	45,20	103,44	36,67	66,68	89,04	7,47	6,68
7/4/06	233	300	159,50	65,50	148,53	52,51	125,35	128,04	7,75	6,94
17/4/06	243	300	153,60	106,00	148,53	94,26	63,47	72,37	7,69	7,09
19/4/06	245	300	129,80	81,00	148,53	87,87	65,07	80,89	7,42	7,00
26/4/06	252	300	139,30	81,00	148,53	72,87	77,74	100,90	7,47	6,94
3/5/06	259	300	152,40	86,90	148,53	50,58	87,34	130,62	7,71	6,91
5/5/06	261	300	169,00	72,60	148,53	44,90	128,55	138,19	7,72	6,89
8/5/06	358	300	161,90	75,00	149,74	34,52	114,71	152,04	7,63	7,00
12/5/06	268	500	266,70	183,30	212,21	128,01	111,21	112,28	7,97	7,38
17/5/06	273	500	248,80	160,70	212,21	114,68	117,48	130,05	7,77	7,12
19/5/06	275	500	258,30	152,40	212,21	102,55	141,22	146,22	7,81	7,12
22/5/06	278	500	253,60	169,00	212,21	110,49	112,81	135,64	7,78	7,17
24/5/06	280	500	257,10	169,00	212,21	100,00	117,48	149,63	7,67	7,17
29/5/06	285	500	260,70	166,70	212,21	105,12	125,35	142,81	7,76	7,10
31/5/06	287	500	251,20	165,50	212,21	97,91	114,28	152,42	7,64	7,09

Tabela A2.4 (cont.): Acompanhamento da remoção de Alcalinidade e Amônia para o reator UD.

Data	Dia	KHCO ₃ do Meio de cultura (mg·L ⁻¹)	Alcalinidade CaCO ₃ de entrada (mg·L ⁻¹)	Alcalinidade CaCO ₃ de saída (mg·L ⁻¹)	Entrada de N-NH ₄ ⁺ (mg·L ⁻¹)	Saída de N-NH ₄ ⁺ (mg·L ⁻¹)	Remoção de Alcalinidade CaCO ₃ (mg·L ⁻¹ ·d ⁻¹)	Remoção de N-NH ₄ ⁺ (mg·L ⁻¹ ·d ⁻¹)	pH de Entrada	pH de Saída
2/6/06	289	500	270,20	160,70	212,21	104,48	146,02	143,66	7,96	7,21
5/6/06	292	500	263,10	170,20	212,21	117,15	123,88	126,76	7,86	7,10
7/6/06	294	500	246,40	158,30	212,21	108,86	117,48	137,82	7,69	7,03
12/6/06	299	500	253,60	159,50	212,21	101,31	125,48	147,88	7,56	7,03
14/6/06	301	500	229,80	151,20	212,21	105,92	104,81	141,74	7,37	7,03
16/6/06	303	500	271,40	152,40	212,21	100,99	158,69	148,31	7,80	7,05
19/6/06	306	500	257,10	172,60	212,21	105,85	112,68	141,83	7,73	7,16
21/6/06	308	500	239,30	158,30	212,21	104,30	108,01	143,90	7,56	7,07
23/6/06	310	500	261,50	157,10	212,21	100,04	139,22	149,57	7,94	7,08
26/6/06	313	500	257,10	186,80	212,21	113,47	93,75	131,67	7,88	7,37
19/7/06	336	500	225,30	139,60	137,69	51,92	114,28	114,37	7,55	7,25
24/7/06	341	500	254,90	162,60	137,69	53,28	123,08	112,56	7,80	7,21
26/7/06	343	500	228,60	123,10	137,69	39,69	140,68	130,68	7,57	6,89