

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

ANGELINA MARIA DE LIMA PHILIPS

UTILIZAÇÃO DE REATOR DE BIODISCOS
PARA TRATAMENTO DE EFLUENTES COM ALTAS
CONCENTRAÇÕES DE NITROGÊNIO

Prof. Dr. Hugo Moreira Soares
ORIENTADOR

Profa. Dra. Valéria Reginatto Spiller
CO-ORIENTADORA

Florianópolis, Fevereiro de 2008

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

ANGELINA MARIA DE LIMA PHILIPS

UTILIZAÇÃO DE REATOR DE BIODISCOS
PARA TRATAMENTO DE EFLUENTES COM ALTAS
CONCENTRAÇÕES DE NITROGÊNIO

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção do título de Doutora em Engenharia Química

Prof. Dr. Hugo Moreira Soares
ORIENTADOR

Profa. Dra. Valéria Reginatto Spiller
CO-ORIENTADORA

Florianópolis, Fevereiro de 2008

UTILIZAÇÃO DE REATOR DE BIODISCOS PARA TRATAMENTO DE EFLUENTES COM ALTAS CONCENTRAÇÕES DE NITROGÊNIO

por

Angelina Maria de Lima Philips

Dissertação julgada para obtenção do título de **Doutora em Engenharia Química**, área de concentração **Processos Biotecnológicos** e aprovada em sua forma final pelo Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof. Dr. Hugo Moreira Soares
Orientador

Profa. Dra. Valéria Reginatto Spiller
Co-orientadora

Prof. Dr. Agenor Furigo Júnior
Coordenador do CPGENQ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Hugo Moreira Soares

Profa. Dra. Valéria Reginatto Spiller

Prof. Dr. Willibaldo Schmidell Netto

Profa. Dra. Cristiane Pereira Zdradek

Dr. Airton Kunz

Florianópolis, Fevereiro de 2008

SUMÁRIO

Sumário.....	iv
Lista de Tabelas.....	vii
Lista de Figuras.....	ix
Simbologia.....	xiii
Resumo.....	xv
Abstract.....	xvi
1 . Introdução	1
2 . Objetivos	5
2.1 . Objetivo Geral.....	5
2.2 . Objetivos Específicos.....	5
3 . Revisão Bibliográfica.....	7
3.1 . Origem da Contaminação por Nitrogênio.....	7
3.1.1 . <i>Amônia</i>	7
3.1.2 . Nitrato e Nitrito	11
3.2 . O Ciclo do Nitrogênio.....	12
3.3 . Processos Biológicos para a Remoção do Nitrogênio	14
3.3.1 . Processo de <i>Nitrificação / Denitrificação</i>	14
a) Nitrificação.....	15
b) Nitrificação incompleta (nitritação).....	17
3.3.2 . Novas Tecnologias Biológicas	19
a) Processo SHARON	19
b) Processo ANAMMOX (Anaerobic Ammonium Oxidation)	20
c) Processo Combinado SHARON / ANAMMOX.....	23
d) Processo NOx	25
d.1) Ciclo do NOx	26
d.1.1) Oxidação Anaeróbia da Amônia.....	26
d.1.2) Oxidação Aeróbia da Amônia.....	28
e) Processo CANON.....	29
f) Processo OLAND	30
3.4 . Reatores de Biodiscos Rotativos (RBR)	31
3.4.1 . Parâmetros de Projeto	32
3.4.2 . Utilizações dos RBR.....	33
3.5 . Formação de Biofilmes	36
3.5.1 . A Formação de Biofilmes como Modo de Desenvolvimento Microbiano.....	37
3.5.2 . Aspectos Físico-Químicos do Biofilme	38
3.5.3 . Processo CANON em biofilmes	40
3.6 . Caracterização da População Microbiana	42
em Reatores Biológicos	42
3.6.1 . Técnicas Moleculares.....	44

4 . Material e Métodos.....	49
4.1 . Sistema Experimental de Reatores de Biodiscos Rotativos	49
4.2 . Materiais Suporte.....	51
4.3 . Inóculo	52
4.4 . Meio para Alimentação	53
4.5 . Partida e Operação dos Reatores	55
4.6 . Cargas Aplicadas Aos Reatores	55
4.7 . Acompanhamento dos Reatores	56
4.7.1 . Determinação dos íons nitrogenados.....	57
4.7.2 . Determinação da Atividade Nitrificante	58
4.7.3 . Obtenção dos parâmetros cinéticos da biomassa.....	60
4.7.4 . Ensaio de Atividade.....	62
4.7.5 . Perfil de Consumo de Substrato, pH e OD ao Longo dos Reatores..	62
4.8 . Cálculos Efetuados	63
4.9 . Análises Microbiológicas.....	64
4.9.1 . Determinação do Número Mais Provável.....	64
a) Número mais Provável de Bactérias Oxidadoras de Amônia (BOA)	64
b) Número Mais Provável de Bactérias Oxidadoras de Nitrito (BON).....	66
4.9.2 . Análise de FISH (Fluorescence in Situ Hybridization)	66
4.9.3 . Microscopia Ótica e Microscopia Eletrônica	71
5 . Resultados e Discussão	72
5.1 . Condições de Processo nos Reatores.....	72
5.1 . Desempenho dos Reatores	74
5.1.1 . Etapa 1	75
5.1.2 . Etapa 2.....	78
5.1.3 . Etapa 3.....	84
5.1.4 . Etapa 4.....	88
5.1.5 . Etapa 5.....	94
5.2 . Considerações Sobre o Desempenho dos Reatores.....	98
5.3 . Perfis de Consumo de Substrato	103
5.3.1 . Reatores PVC, PS e PU - Etapa 1	103
5.3.2 . Reatores PVC, PS e PU - Etapa 2	105
5.3.3 . Reator PVC e PS - Etapa 3.....	106
5.3.4 . Reatores PVC e PS - Etapa 4	107
5.3.5 . Reatores PVC e PS - Etapa 5	108
5.3.6 . Reator PU - Etapa 3.....	109
5.3.7 . Reator PU - Etapas 4 e 5	110
5.4 . Perfis de Oxigênio Dissolvido	112
5.5 . Determinação dos Parâmetros Cinéticos de.....	114
Oxidação do Amônio.....	114
5.6 . Ensaio de Atividade Autotrófica Anaeróbia de Eliminação	115
de Nitrogênio	115
5.7 . Ensaio de Atividade Autotrófica Aeróbia de Eliminação	118
de Nitrogênio	118
5.8 . Características dos Materiais Suporte Quanto	125
à Formação de Biofilme	125
5.9 . Características Microbiológicas dos Biofilmes	128
5.9.1 . Número Mais Provável (NMP).....	129
5.9.2 . Fluorescence in Situ Hybridization (FISH).....	129

5.9.3 . Microscopia Ótica dos Biofilmes.....	133
6 . Conclusões.....	137
7 . Sugestões de continuidade	140
8 . Bibliografia.....	141

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Resumo dos parâmetros de dimensionamento de biodiscos	33
Tabela 3.2: Parâmetros do sistema RBR para remoção de carbono e nitrogênio utilizado por HIRAS <i>et al.</i> , (2004).	34
Tabela 3.3: Parâmetros do RBR utilizado por PYNAERT <i>et al.</i> (2002) para remoção de carbono e nitrogênio.....	35
Tabela 4.1: Características dos reatores RBR	51
Tabela 4.2: Tempo de operação dos reatores em que foi removido todo o lodo depositado no fundo e realizadas análises de SST	53
Tabela 4.3: Composição do meio autotrófico nitrificante.....	54
Tabela 4.4: Composição da solução de micronutrientes.....	54
Tabela 4.5: Sondas utilizadas para identificação dos microrganismos presentes nos biofilmes dos reatores.....	69
Tabela 5.1: Condições de processo nas diferentes etapas de operação do reator em PVC.....	72
Tabela 5.2: Relação carbono/nitrogênio utilizada no reator PVC durante a Etapa 5.....	72
Tabela 5.3: Condições de processo nas diferentes etapas de operação do reator em PS	73
Tabela 5.4: Condições de processo nas diferentes etapas de operação do reator em PU.....	74
Tabela 5.5: Valores médios encontrados no efluente do reator PVC e suas respectivas conversões durante as cinco etapas de funcionamento do reator.....	83
Tabela 5.6: Valores médios encontrados no efluente do reator PS e suas respectivas conversões durante as cinco etapas de funcionamento do reator.	83
Tabela 5.7: Valores médios encontrados no efluente do reator PU e suas respectivas conversões durante as cinco etapas de funcionamento do reator.	84

Tabela 5.8: Parâmetros cinéticos da biomassa dos reatores PVC, PS e PU no dia 586 de operação.	114
Tabela 5.9: Determinação de sólidos suspensos totais retirados do fundo dos reatores ao longo do período de operação.....	127
Tabela 5.10: Estimativa das populações de BOA e BON expressa em NMP/gSST durante o período de operação dos reatores.	129

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Distribuição da amônia e do íon amônio em função do pH e da temperatura (WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION, 1991).	8
Figura 3.2 - Percentagem de amônia livre como N (em relação ao total de N presente) e percentagem de ácido nitroso como N, em relação à quantidade de nitrito presente (Fonte: SCHMIDELL & REGINATTO, 2005).	10
Figura 3.3 - Representação esquemática das reações envolvidas no ciclo biológico do nitrogênio (Fonte: YE & THOMAS, 2001).....	13
Figura 3.4: Modelo proposto para a oxidação anaeróbia da amônia para microrganismos do tipo <i>Brocadia</i> . HH: hidrazina hidrolase; HZO: enzima oxidante da hidrazina; NR: enzima redutora de nitrito (Fonte: SCHMIDT <i>et al.</i> , 2001).	22
Figura 3.5: Apresentação esquemática do sistema combinado sharon/anammox (van DONGEN <i>et al.</i> , 2001).	24
Figura 3.6: Ciclo NO _x . Modelo hipotético da oxidação anaeróbia dependente de NO ₂ pelas Nitrosomonas. O N ₂ O ₄ é o oxidante para a oxidação da amônia (SCHMIDT <i>et al.</i> , 2001).	27
Figura 3.7: Ciclo NO _x . Modelo hipotético da oxidação aeróbia da amônia pelas <i>Nitrosomonas</i> . De acordo com este modelo, N ₂ O ₄ é o oxidante para a oxidação da amônia. Sob condições aeróbias o oxigênio é utilizado para re-oxidar o NO a NO ₂ (N ₂ O ₄). A hidroxilamina é oxidada a nitrito (Fonte: SCHMIDT <i>et al.</i> , 2001).	29
Figura 3.8 – Esquema para tratamento secundário em reator de biodiscos rotativos (Fonte: METCALF & EDDY, 1991).	32
Figura 3.9: Modelo de desenvolvimento de biofilme. Células livres individuais podem formar contatos célula-superfície ou célula-célula, resultando na formação de microcolônias. As células aderidas ao biofilme podem retornar ao estilo de vida livre para completar o ciclo de desenvolvimento do biofilme (O'TOOLE <i>et al.</i> , 2000).	37
Figura 3.10: Desenho esquemático da estrutura da comunidade dos biofilmes no reator de biodiscos rotativos da cidade de Kölliken e as principais reações de conversão do nitrogênio (adaptada de EGLI <i>et al.</i> , 2003).	41
Figura 3.11: Representação esquemática da técnica empregada para	

análise FISH (Fonte: KIELING, 2004).	47
Figura 4.1: Desenho esquemático de um reator do sistema de reatores de biodiscos rotativos utilizado nos experimentos.	49
Figura 4.2: Sistema de reatores de biodiscos rotativos construídos em PVC, PS e PU.	50
Figura 4.3: Esquema dos Microrganismos Analisados.....	70
Figura 5.1: Acompanhamento analítico do reator PVC durante a Etapa 1.....	76
Figura 5.2: Acompanhamento analítico do reator PS durante a Etapa 1.	77
Figura 5.3: Acompanhamento analítico do reator PU durante a Etapa 1.	78
Figura 5.4: Acompanhamento analítico do reator PVC durante a Etapa 2.....	79
Figura 5.5: Acompanhamento analítico do reator PS durante a Etapa 2.	79
Figura 5.6: Acompanhamento analítico dos reatores PVC, PS e PU durante 913 dias de operação.....	81
Figura 5.7: Carga aplicada e remoção de Nitrogênio em função do tempo de operação dos reatores PVC, PS e PU.....	82
Figura 5.8: Acompanhamento analítico do reator PU durante a Etapa 2.	84
Figura 5.9: Acompanhamento analítico do reator PVC durante a Etapa 3.....	86
Figura 5.10: Acompanhamento analítico do reator PS durante a Etapa 3.	87
Figura 5.11: Acompanhamento analítico do reator PU durante a Etapa 3.	88
Figura 5.12: Acompanhamento analítico do reator PVC durante a Etapa 4.....	89
Figura 5.13: Acompanhamento analítico do reator PS durante a Etapa 4.	91
Figura 5.14: Acompanhamento analítico do reator PU durante a Etapa 4.	93
Figura 5.15: Acompanhamento analítico do reator PVC durante a Etapa 5.....	95
Figura 5.16: Acompanhamento analítico do reator PS durante a Etapa 5.	97
Figura 5.17: Acompanhamento analítico do reator PU durante a Etapa 5.	98
Figura 5.18 – Concentração e percentual de remoção de nitrogênio em função do tempo em teste aeróbio realizado com meio autotrófico.	101
Figura 5.19: Representação esquemática do metabolismo	

simultâneo de nitrificação e desnitrificação, tendo o NO como indutor do metabolismo anóxico. Fonte: LEITÃO <i>et al.</i> , (2006).....	102
Figura 5.20: Análise detalhada dos componentes inorgânicos de nitrogênio (amônia, nitrito e nitrato) e pH ao longo do reator PVC, PS e PU durante a Etapa 1.....	104
Figura 5.21: Análise detalhada dos componentes inorgânicos de nitrogênio (amônia, nitrito e nitrato) e pH ao longo do reator PVC, Etapa 2.....	105
Figura 5.22: Análise detalhada dos componentes inorgânicos de nitrogênio (amônia, nitrito e nitrato) e pH ao longo do reator PVC, Etapa 3.....	107
Figura 5.23: Análise detalhada dos componentes inorgânicos de nitrogênio (amônia, nitrito e nitrato) e pH ao longo do reator PVC, Etapa 4.....	108
Figura 5.24: Análise detalhada dos componentes inorgânicos de nitrogênio (amônia, nitrito e nitrato) e pH ao longo dos reatores PVC e PS, Etapa 5.....	109
Figura 5.25: Análise detalhada dos componentes inorgânicos de nitrogênio (amônia, nitrito e nitrato) e pH ao longo do reator PU, Etapa 3.....	110
Figura 5.26: Análise detalhada dos componentes inorgânicos de nitrogênio (amônia, nitrito e nitrato) e pH ao longo do reator PU, Etapa 4.....	111
Figura 5.27: Análise detalhada dos componentes inorgânicos de nitrogênio e pH ao longo do reator PU, Etapa 5.....	112
Figura 5.28: Perfil de oxigênio dissolvido nos reatores durante os dias 430 e 473 de operação, referentes à Etapa 4 nos reatores PVC e PS e Etapa 3 no reator PU, e Etapa 5 (913 dias) para todos os reatores.	113
Figura 5.29: Teste cinético de atividade anammox com biomassa suspensa para os reatores PVC, PS e PU. (a): Concentrações de amônio no teste anaeróbio, (b) Concentrações de nitrito no teste anaeróbio.....	117
Figura 5.30: Teste cinético de atividade aeróbia para os reatores PVC e PS e de atividade anammox para o reator PU com biomassa suspensa. (a) Concentrações de amônia no teste aeróbio para os reatores PVC e PS e continuação do teste anaeróbio para o reator PU. (b) Concentrações de nitrito para teste aeróbio nos reatores PVC e PS e continuação do teste anaeróbio no reator PU.....	119
Figura 5.31: Teste cinético de atividade aeróbia para os reatores PVC,	

PS e PU com biomassa suspensa. (a) Concentrações de amônia em teste aeróbio para os reatores PVC, PS e PU. (b) Concentrações de nitrito em teste aeróbio para os reatores PVC, PS e PU.....	120
Figura 5.32: Fotografias com aumento de 120 vezes dos materiais exibindo sua estrutura superficial.	125
Figura 5.33: Valores de SST obtidos para o fundo dos reatores PVC, PS e PU.	127
Figura 5.34: Fotografias obtidas através de microscópio eletrônico de varredura dos biofilmes PVC e PS após 333 dias de operação dos reatores.	128
Figura 5.35: Grandes grupos de eubactérias.	130
Figura 5.36: grupos específicos de bactérias oxidadoras de amônio nos 3 reatores nas difentes fases.	131
Figura 5.37: grupos específicos de bactérias oxidadoras de nitrito nos 3 reatores nas diferentes fases.	132
Figura 5.38: Características microbiológicas do reator PVC: a) bactérias filamentosas na Etapa 1, b) abundância de ciliados, c) presença de nematóides.	134
Figura 5.39: Características microbiológicas do reator PS: a) bactérias filamentosas, b) abundância de rotíferos, c) presença de protozoários.....	134
Figura 5.40: Características microbiológicas do reator PU: a) bactérias filamentosas, b) bactérias filamentosas e tecamebas, c) ciliados.	135

SIMBOLOGIA

ANAMMOX = (*Anaerobic Ammonium Oxidation*) ou oxidação anaeróbia do amônio

ARDRA – *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*

BOA – Bactérias Oxidadoras de Amônia

BON – Bactérias Oxidadoras de Nitrito

C:N - relação carbono nitrogênio

CANON - *Completely Autotrophic Nitrogen Removal Over Nitrite*

CASAN - Companhia de Saneamento de Água e Esgoto de Santa Catarina

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

Cs - concentração de oxigênio dissolvido na saturação (mg.L^{-1})

DBO - Demanda Bioquímica de Oxigênio ($\text{mg O}_2.\text{L}^{-1}$)

DQO - Demanda Química de Oxigênio ($\text{mg O}_2.\text{L}^{-1}$)

DGGE - *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*

EQA - Departamento de Engenharia Química e de Engenharia de Alimentos

FISH - *Fluorescence in Situ Hybridization*

IDEA - *Intermittently Decanted Extended Aeration*

K_i – constante de inibição (mg.L^{-1})

K_o - constante de saturação do oxigênio (mg.L^{-1})

K_s - constante de saturação por substrato (mg.L^{-1})

μ_s - veloc. específica de consumo de amônio ($\text{mg N-NH}_4^+ . (\text{g SSV.h})^{-1}$)

μ_{max} - velocidade específica máxima de crescimento (d^{-1})

N-NH_4^+ - Nitrogênio na forma de íon amônio

N_2 - Nitrogênio gasoso

N-NO_2^- - Nitrogênio na forma de nitrito

N-NO_3^- - Nitrogênio na forma de nitrato

OD - Oxigênio dissolvido ($\text{mg de O}_2.\text{L}^{-1}$)

OLAND - *Oxygen Limited Autotrophic Nitrification and Denitrification*

PCR - *Polimerase Chain Reaction*

PS - poliestireno (*polystyrene*)

PVC - cloreto de vinila

PU - poliuretano

Q_{O_2X} - velocidade de consumo de oxigênio ($\text{mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)

Q_{O_2} - velocidade específica de respiração ($\text{mg O}_2 \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)

RBR - Reator de Biodiscos Rotativos

SBR - *Sequencing Batch Reactor* (Reator de Batelada em Seqüência)

SHARON - *Single Reactor High Activity Ammonia Removal Over Nitrite*

S_0 - Concentração inicial de substrato ($\text{mg N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$)

SST - Sólidos Suspensos Totais ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

SSV - sólidos suspensos voláteis ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

T - temperatura ($^{\circ}\text{C}$)

TGGE - *Temperature Gradient Gel Electrophoresis*

T-RFLP - *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*

TRH - Tempo de retenção hidráulica

v - veloc. de consumo de substrato ou formação de produtos ($\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)

X - concentração celular ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

X_0 - concentração inicial de microrganismos ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

Y_{XS} - fator de conversão de substrato em células (g de células produzido/g substrato consumido)

RESUMO

A utilização dos processos convencionais da nitrificação e desnitrificação oferece algumas limitações quando se objetiva o tratamento de efluentes contendo elevadas concentrações de nitrogênio e baixa DQO, dentre estas estão a dificuldade de transferência de altas quantidades de oxigênio necessárias à nitrificação, bem como na necessidade de grande quantidade de matéria orgânica na etapa de desnitrificação. Novos processos de remoção de nitrogênio têm sido desenvolvidos para possibilitar a remoção sustentável de elevadas concentrações de nitrogênio por via biológica. Tais Processos utilizam a nitrificação parcial, ou seja, a oxidação da amônia a nitrito, e a maior parte deles, não utiliza matéria orgânica, utilizando o próprio amônio como doador de elétrons. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um processo de remoção de nitrogênio em altas concentrações utilizando um Reator de Biodiscos Rotativos. O sistema era constituído por três reatores de biodiscos independentes, diferindo entre si apenas nos diferentes materiais suporte utilizados na confecção dos discos, os quais foram: cloreto de polivinila (PVC), poliestireno (PS) e poliuretano (PU). Os reatores foram inoculados com lodo proveniente de uma estação de tratamento de esgotos domésticos e foram alimentados diariamente com meio sintético contendo amônio (NH_4^+). Durante um período de 913 dias as cargas aplicadas aos reatores PVC e PS variaram de 519 a 6670 $\text{mg N-NH}_4^+ \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$. Para o reator PU, as variações na carga foram de 1206 até 8280 $\text{mg N-NH}_4^+ \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$. Nas cargas mais elevadas, os reatores apresentaram alta capacidade de oxidação do amônio apresentando valores de 4902, 5403, 5336 $\text{mg N-NH}_4^+ \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ oxidados, para os reatores PVC, PS e PU, respectivamente. Uma remoção de N de 29% sob condições completamente aeróbias foi observada para os três reatores na carga mais baixa aplicada. Nas cargas mais elevadas, condições limitantes de OD foram estabelecidas em torno de 0,4 a 0,6 $\text{mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ para os reatores PVC e PS, e mais baixas para o reator PU variando entre 0,08 e 0,3 $\text{mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$, gerando acúmulo de nitrito. Os testes FISH confirmaram a presença de vários tipos de BOA, entre elas: *Nitrosomonas* sp, *Nitrosolobus multiformis*, *Nitrosospira briensis*, *Nitrosovibrio tenuis*, as quais apareceram nas etapas com cargas mais elevadas, além de *Nitrosococcus mobilis*. Entretanto, verificou-se a diminuição da população de BON nos reatores. Os testes de eliminação de nitrogênio realizados em batelada com as biomassas retiradas dos reatores, apresentaram velocidades específicas de remoção de 18,4; 16,4 e 28,3 $\text{mg N} \cdot \text{gSST}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, respectivamente, para os reatores de PVC, PS e PU, demonstrando que a biomassa removida do reator PU foi a que apresentou a mais alta velocidade específica de remoção de nitrogênio sob condições limitantes de oxigênio, assim como, foi a única que apresentou remoção anaeróbia. Além disto, o reator PU apresentou um camada de biofilme mais homogênea, uma maior adesão dos microrganismos, e também uma maior remoção de nitrogênio, em torno de 50%, correspondendo a 3340 $\text{mg N} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$. A alta remoção, juntamente com condições limitantes de OD e a detecção de bactérias anammox através do teste FISH, assim como a constatação de atividade anaeróbia, evidenciam o estabelecimento do processo ANAMMOX neste reator.

ABSTRACT

The use of conventional processes, as nitrification and denitrification, for treatment of wastewater rich in ammonium nitrogen, and low COD, can be difficult, and includes problems on transferring high oxygen concentrations, needed on nitrification step, as well as the need of high organic carbon concentrations on denitrification step, and also, the high sludge production at complete process. The new nitrogen removal processes has been studied at recent years for making possible sustainable biological removal of high nitrogen concentrations in effluents. These processes uses partial nitrification, where ammonium is oxidized until nitrite, and some of them uses ammonium as the electron donor instead of organic carbon, accomplishing so an autotrophic nitrogen removal. With this purpose, the aim of this work was to stablish a nitrogen high concentrations removal process using a rotating biological contactor. The system was composed by three rotating biological contactors having its disks made up of different support materials: polivinilchloride (PVC), polystyrene (PS) and poliurethane. The inoculum for reactors comes from a municipal wastewater treatment plant, and reactors were feeded daily with synthetic wastewater containing mainly ammonium (NH_4^+). During a period of 913 days, the load applied to PVC and PS reactors varied from 519 to 6670 $\text{mg N-NH}_4^+ \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$. For PU reactor, load varied from 1206 to 8280 $\text{mg N-NH}_4^+ \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$. Reactors showed a high ammonium oxidation capacity with the following oxidised ammonium values: 4902, 5403, 5336 $\text{mg N-NH}_4^+ \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ for PVC, PS and PU reactors, respectively. A nitrogen removal of 29% over completely oxic conditions was observed to all reactors at first step. Oxygen-limited conditions were reached and ranged between 0,4 a 0,6 $\text{mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ for PVC and PS reactors, and lower to PU reactor, ranging between 0,26 to 0,08 $\text{mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$, leading to a nitrite accumulation, because of nitrite oxidating bacteria decay in three reactors. FISH tests confirmed the presence of some kinds of ammonium oxidating bacteria: *Nitrosomonas* sp, *Nitrosolobus multiformis*, *Nitrosospira briensis*, *Nitrosovibrio tenuis* and *Nitrosococcus mobilis* which were present on high loads steps. Deammonification tests at oxygen limited conditions, revealed autotrophic nitrogen removal without the needing of nitrogen oxides (NO , N_2O) addition. At these tests, it was possible to measure the specific rate of nitrogen removal of 18,4, 16,36 and 28,27 $\text{mg N} \cdot \text{gSST}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, respectively for reactors PVC, PS and PU, showing that biomass from PU reactor presented the highest specific aerobic nitrogen removal over oxygen-limited conditions, as well, it was the only reactor which was possible to detect anaerobic nitrogen removal. Moreover, PU reactor showed a biofilm layer more homogeneous and a better microrganisms attachment and the most nitrogen removal that was around 50%, corresponding to 3340 $\text{mg N} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$. This high nitrogen removal, parallel to oxygen-limited conditions and the detection of annamox bacteria by FISH tests, as well as the presence of annaerobic activity, make evident the anammox process stablishment on this reactor.

1 . INTRODUÇÃO

O tratamento de águas residuárias foi, por muito tempo, focado apenas na remoção da matéria carbonada, a qual é, certamente, motivo de grande preocupação, por seu alto poder de consumo de oxigênio quando descartado em corpos receptores. Entretanto, devido, principalmente a problemas relacionados com a eutrofização de corpos d'água e de contaminação de lençóis freáticos pelo lançamento de resíduos ricos em nitrogênio, estudos relacionados ao tratamento deste elemento têm tomado muita importância nos últimos anos. Em países como o Brasil, com um forte potencial para a atividade agroindustrial, a maioria dos resíduos, direta ou indiretamente, gerados por esta atividade, contêm elevado teor de material orgânico carbonado e também de proteínas. Para eliminar os compostos carbonados se realizam muitas vezes tratamentos anaeróbios, no qual o nitrogênio permanece na forma de amônio resultante da degradação de proteínas.

No Brasil, a Resolução CONAMA Nº. 357, de 17 de março de 2005, que estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, fixa o limite máximo de emissão apenas para o nitrogênio amoniacal, por ser esta a forma mais nociva ao meio ambiente, em 20 mg de $N-NH_4.L^{-1}$. Entretanto, não houve nesta recente legislação a preocupação em se limitar a descarga de outras formas de nitrogênio, como o nitrato e o nitrito, que também oferecem riscos de contaminação ambiental.

Em águas potáveis, por sua vez, a legislação estabelece a concentração máxima de nitrato em 10 mg $N-NO_3.L^{-1}$ e de nitrito em 1 mg $N-NO_2.L^{-1}$ e a concentração de nitrogênio amoniacal nestas águas é fixada de acordo com o pH, sendo que, para pH igual ou abaixo de 7,5 a concentração máxima permitida é 3,7 mg $N-NH_4.L^{-1}$.

Para se atingir os limites de emissão de nitrogênio estabelecidos na legislação, evitando assim os riscos de contaminação que estes compostos representam, o tratamento de efluentes contendo elevadas concentrações de

nitrogênio, conforme os exemplos acima mencionados, ainda é um desafio tecnológico.

As alternativas tecnológicas mais usuais para o tratamento biológico do nitrogênio lançam mão dos processos de nitrificação e desnitrificação. Na fase da nitrificação o amônio é oxidado em duas fases: na primeira, é levado até nitrito pelas bactérias oxidadoras de amônio, e numa etapa subsequente o nitrito é consumido pelas bactérias oxidadoras de nitrito, produzindo nitrato. Sob condições anaeróbias, o amônio oxidado é então convertido por bactérias heterotróficas em nitrogênio gasoso. Neste processo, conhecido como desnitrificação heterotrófica, a matéria orgânica carbonácea biodegradável é utilizada como o doador de elétrons.

Entretanto, a utilização dos processos convencionais da nitrificação e da desnitrificação torna-se limitada quando se deseja tratar resíduos contendo elevadas concentrações de nitrogênio e baixa DBO, ou seja, com baixa relação DBO/nitrogênio, como por exemplo, efluentes de biodigestão de lodos, chorume e efluentes agro-industriais pré-tratados.

As principais limitações, neste caso específico, residem na dificuldade de transferência de altas quantidades de oxigênio necessárias à nitrificação, bem como na necessidade de grande quantidade de matéria orgânica biodegradável na etapa de desnitrificação.

Neste sentido, novos processos de remoção de nitrogênio têm sido desenvolvidos nos últimos anos, para possibilitar a remoção de elevadas concentrações de nitrogênio por via biológica. Dentre os novos processos encontra-se na literatura várias denominações como o processo ANAMMOX (*anaerobic ammonium oxidation*), processo SHARON (*single reactor high activity ammonia removal over nitrite*), processo combinado SHARON-ANAMMOX, processo CANON (*completely autotrophic nitrogen removal over nitrite*), processo OLAND (*oxygen limited autotrophic nitrification and denitrification*) e processo NOx.

Todos estes novos processos utilizam da nitrificação parcial, ou seja, oxidação do amônio até nitrito, e, a maior parte deles, não utiliza matéria orgânica, utilizando o próprio amônio como doador de elétrons, ou seja, realiza a remoção autotrófica do nitrogênio. Portanto, as vantagens referentes a tais processos relacionam-se, principalmente, com a redução da aeração para a

nitrificação e diminuição da necessidade de matéria orgânica para a desnitrificação. Conseqüentemente, por se tratar de processos autotróficos, ocorre uma baixa produção de lodo e a diminuição da emissão de CO_2 , anteriormente ocasionada pela desnitrificação heterotrófica.

Entretanto, esta baixa produção de lodo, característica dos processos autotróficos e anaeróbios constituem-se em uma dificuldade, principalmente, no início de operação de reatores, quando não se dispõe de um inóculo enriquecido.

Desta maneira, estes processos requerem um tipo de reator que possibilite uma alta retenção celular, como por exemplo, reator de batelada em sequência, (SBR), bioreatores a membrana, e bioreatores com biomassa aderida. Dentre estes, destaca-se o reator de biodiscos rotativos que possibilita a formação de um gradiente de O_2 no interior do biofilme, favorecendo a remoção de nitrogênio em um único reator .

O Reator de biodiscos rotativos possui uma alta retenção celular, característica esta, desejada no tratamento de elevadas concentrações de nitrogênio. A estratégia para a eliminação de nitrogênio em tal reator é utilizar uma baixa rotação dos discos e altas cargas de amônia, limitando-se, assim, o oxigênio dissolvido no meio, o que favorece a inibição de bactérias oxidadoras de nitrito, possibilitando a oxidação parcial do amônio até nitrito. Nas camadas mais profundas do biofilme aderido aos discos, onde condições anaeróbias podem ser obtidas, a amônia juntamente com o nitrito são utilizados por microrganismos capazes de realizar a oxidação anaeróbia do íon amônio (anammox), convertendo-os a nitrogênio gasoso. Este processo foi descrito anteriormente na literatura, porém, partindo-se de inóculos previamente adaptados a oxidação anaeróbia do amônio.

Diante do contexto acima exposto, percebe-se que a remoção de nitrogênio de efluentes contendo altas concentrações deste elemento, utilizando-se um único reator, é uma tarefa difícil, e alvo de extensivas pesquisas, restando-se ainda muito por estudar e esclarecer à respeito de tal processo. Neste sentido, o presente trabalho tem como objetivo estudar a oxidação parcial do amônio a nitrito com vistas à eliminação de nitrogênio em um único sistema, utilizando Reactores de Biodiscos Rotativos (RBR), assim como as características microbiológicas dos biofilmes formados nestes reatores, utilizando-se diferentes

materiais suporte, como cloreto de vinila (PVC), poliestireno (PS) e poliuretano (PU).

2 . OBJETIVOS

2.1 . OBJETIVO GERAL

Estabelecer um processo de remoção de nitrogênio para o tratamento de efluentes com elevadas concentrações deste composto em um único reator, utilizando-se para tal um Reator de Biodiscos Rotativos (RBR).

2.2 . OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I - Projetar e operar um reator de biodiscos rotativos para a remoção biológica de nitrogênio de um efluente sintético com alta concentração de amônio.
- II - Testar três materiais suporte para a confecção dos discos: Cloreto de vinila (PVC), Poliestireno (PS), Poliuretano (PU), e definir qual apresenta o melhor desempenho para o processo.
- III - Estabelecer a limitação da concentração de oxigênio dissolvido do meio, afim de que, parte do amônio alimentado seja oxidado a nitrito e que as formas amônio e nitrito coexistam no reator.
- IV - Determinar parâmetros cinéticos da biomassa formadora dos biofilmes com base em modelos propostos na literatura.
- V - Acompanhar o desenvolvimento da microbiota nos reatores de biodiscos e caracterizar os principais microrganismos envolvidos no processo de oxidação do amônio e remoção de nitrogênio através de técnicas tradicionais de microbiologia (número mais provável) e de biologia molecular (*Fluorescence in situ hybridization* - FISH).

- VI - Estabelecer um processo estável de remoção de nitrogênio e discutir as possíveis vias metabólicas utilizadas para este fim.

3 . REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 . ORIGEM DA CONTAMINAÇÃO POR NITROGÊNIO

Atividades como fertilização de solos e queima de combustíveis fósseis contribuem altamente para o aumento da concentração de nitrogênio em fontes naturais como aquíferos subterrâneos, chuvas e corpos receptores. Outras fontes de contaminação do meio ambiente por nitrogênio, são sistemas confinados de produção de animais (avicultura, suínocultura, etc.), esgotos domésticos municipais, drenagem de sub-superfície de terras agrícolas e de fossas sépticas, e efluentes industriais (EPA, 1975).

Dentre os efluentes industriais com alta concentração de nitrogênio pode-se citar aqueles provenientes da produção de fertilizantes, do processamento de produtos alimentícios proteicos em geral, de refinarias de petróleo, fábricas de fibra sintética e outras indústrias químicas (WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION, 1991). Para exemplificar a magnitude destas emissões, segundo JONES (1974) a carga de nitrogênio gerada por uma indústria de leite e derivados é de 325 g de N para cada kilograma de leite produzido.

A descarga de águas residuárias contendo altas concentrações de nitrogênio, na forma de óxidos, de amônia, ou orgânica, causa a contaminação dos corpos receptores, sendo que os principais contaminantes serão descritos a seguir (ABREU, 1994).

3.1.1 . Amônia

A amônia existe em solução aquosa, tanto na forma de íon (NH_4^+) como na forma livre, não ionizada (NH_3), segundo a Equação 3.1:

Esta relação entre amônia livre (NH_3) e amônia ionizada (NH_4^+) é altamente dependente do pH e da temperatura, como pode ser observado na Figura 3.1, Para valores de pH em torno de 7, apenas íons amônio estão presentes em solução; para pH em torno de 12 apenas amônia na forma livre está presente como gás dissolvido em solução, para valores de pH entre 7 e 12 estão presentes tanto íons amônio (NH_4^+) quanto amônia gasosa (NH_3) (WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION, 1991).

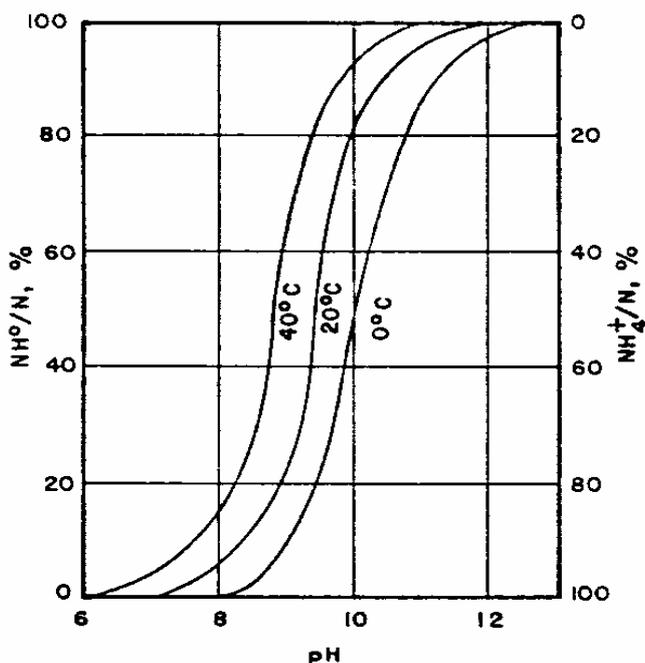
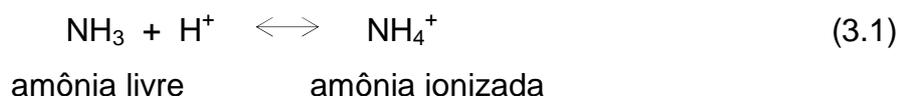


Figura 3.1 - Distribuição da amônia e do íon amônio em função do pH e da temperatura (WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION, 1991).

Conforme também pode ser observado na Figura 3.1, a temperatura influencia neste equilíbrio, sendo que, o aumento de temperatura favorece a formação de amônia. Este efeito da concentração de amônio, pH e temperatura é descrito pelas seguintes equações (Von SPERLING (1997):



A Equação 3.2 descreve o equilíbrio entre as espécies químicas envolvidas na Equação 3.1:

$$K_a = \frac{[N - NH_4^+]}{[N - NH_3] \cdot [H^+]} \quad (3.2)$$

onde:

$[N - NH_4^+]$ = concentração do íon amônio (mgN.L⁻¹)

$[N - NH_3]$ = concentração de amônia (mgN.L⁻¹)

$[H^+]$ = concentração do íon hidrogênio (mg.L⁻¹)

A Equação 3.2 resulta em:

$$[N - NH_3] = \frac{([N - NH_4^+] + [N - NH_3]) \cdot 10^{pH}}{K_a + 10^{pH}} \quad (3.3)$$

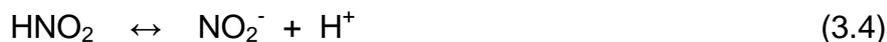
Onde:

$([N - NH_4^+] + [N - NH_3])$ = amônia total como N (mgN.L⁻¹)

$K_a = e^{(6344 / 273 + t)}$

t = temperatura em graus Celsius

Para o equilíbrio nitrito/ácido nitroso tem-se:



$$\text{Sendo: } K_b = \frac{[N - NO_2^-] \cdot [H^+]}{[HNO_2]} \quad (3.5)$$

Onde:

$[N - NO_2^-]$ = concentração de nitrito (mg N.L⁻¹)

$[HNO_2]$ = concentração de ácido nitroso (mg N.L⁻¹)

$$\text{Resultado: } [\text{HNO}_2] = \frac{[N - \text{NO}_2^-]}{K_b * 10^{\text{pH}}} \quad (3.6)$$

$$\text{Onde: } K_b = e^{(-2300 / 273 + t)}$$

t = temperatura em graus Celsius

A partir das Equações 3.3 e 3.6 é possível calcular as quantidades de amônia livre e ácido nitroso livre para distintos valores de pH e distintas temperaturas conforme pode ser verificado na Figura 3.2 onde pode-se perceber que, no intervalo de valores de pH entre 7 e 8 a percentagem de ácido nitroso é praticamente nula, havendo o crescimento desta percentagem para valores de pH abaixo de 7 e, em particular, para valores abaixo de 6, o que pode provocar uma intensa inibição do sistema biológico (SCHMIDELL & REGINATTO, 2005)

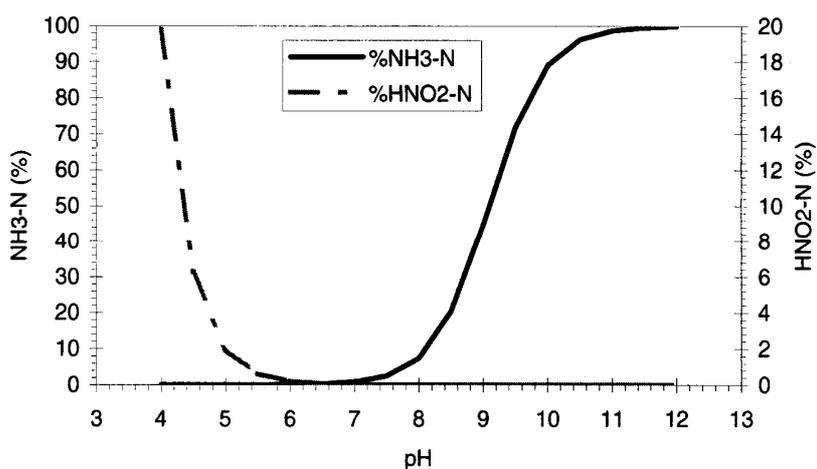


Figura 3.2 - Percentagem de amônia livre como N (em relação ao total de N presente) e percentagem de ácido nitroso como N, em relação à quantidade de nitrito presente (Fonte: SCHMIDELL & REGINATTO, 2005).

A amônia na forma gasosa (NH_3) é altamente tóxica para os peixes, podendo, em concentrações acima de $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ causar a morte de algumas espécies (WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION, 1991; HAGOPIAN & RILEY, 1998). A entrada da amônia, em altas concentrações, em corpos receptores causa uma redução drástica na concentração de oxigênio dissolvido devido à alta demanda de OD ($4,6 \text{ mg}$ de oxigênio para cada miligrama de NH_4^+)

na oxidação biológica da amônia a nitrato, o que normalmente, tem um significado negativo para a vida aquática (EPA, 1975; BITTON, 1994).

Além dos efeitos de toxicidade da amônia e do consumo de oxigênio, o nitrogênio, juntamente com o fósforo, podem causar a eutrofização em lagos, inviabilizando o uso destas águas para qualquer fim.

No Brasil, a Resolução CONAMA N^o. 357, de 17 de março de 2005, que estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, fixa o limite máximo apenas para nitrogênio amoniacal em 20 mg de $N-NH_4^+ \cdot L^{-1}$, não havendo, até então, a preocupação em se limitar a descarga de nitrogênio total.

A legislação ambiental do Estado de Santa Catarina, porém, através do Decreto N^o. 14.250 de 5 de junho de 1981, Art. 19^o, fixa o limite máximo para nitrogênio total em 10 mg.L⁻¹ para lançamentos em trechos de corpos de água contribuintes de lagoas, lagunas e estuários. No entanto, apesar da rigidez da legislação, poucos são os sistemas de tratamento de esgotos, tanto doméstico como industriais, no país, que contemplam uma etapa destinada à remoção de nitrogênio.

3.1.2 . Nitrato e Nitrito

Nitrato e nitrito estão envolvidos na patogenicidade para mamíferos e humanos, podendo ser reduzidos no trato gastrointestinal. O nitrito pode se combinar com aminoácidos para formar nitrosaminas, que são presumidamente carcinogênicas (ESQUIAN & SIMON¹, (1990) apud CHAZAL & LENS, 2000). O nitrito pode também se combinar com a hemoglobina para formar a metahemoglobina, uma proteína incapaz de conduzir o oxigênio no sangue como faz a hemoglobina (de SAINT-BLANQUAT & FRITSCH², (1994) apud CHAZAL & LENS, 2000), podendo, assim, causar severas formas de anemia, levando até mesmo à morte. Por isto, a concentração destas formas de nitrogênio são reguladas nas águas potáveis.

¹ ESQUIAN, A. & SIMON, J.C. (1990). Danger des nitrates, A la pointe de l'élevage – Spécial fourrages et nitrates. 6-8.

² De SAINT BLANQUAT, G. & FRITSCH, P. (1994). Nitrates – nitrites – nitrosamines. Aspects chimiques environnementaux et approches toxicologiques. In: Les Nitrates. Coll. Santé et Société. n. 1 p.20-52.

CHAZAL & LENS (2000), relatam que na Comunidade Européia, os níveis máximos admissíveis de nitrato e nitrito em água potável são, atualmente, 50 e 0,1 mg.L⁻¹ respectivamente, ou seja: 11.3 mg N-NO₃.L⁻¹ e 0,03 mg N-NO₂.L⁻¹. No entanto, o nível de contaminação por nitrato de águas subterrâneas ou de águas de superfície podem estar bem acima dos valores permitidos pela legislação, alcançando valores entre 80-100 mg.L⁻¹ (18-22.6 mg N-NO₃.L⁻¹).

CHAZAL & LENS (2000), comentam ainda, que alguns países do norte europeu tais como Bélgica, Holanda, Alemanha e Dinamarca são severamente afetados pela contaminação por nitrato de águas de superfície e subterrâneas. Este é também o caso de numerosas áreas na França, onde a cultura animal é, assim como em várias regiões do Brasil, intensiva.

3.2 . O CICLO DO NITROGÊNIO

O nitrogênio, um importante elemento para todos os organismos vivos é capaz de assumir um grande número de estados de oxidação podendo, assim, existir em muitos compostos (HAGOPIAN & RILEY, 1998).

Um percentual significativo do nitrogênio global existe sob a forma de nitrogênio gasoso, o qual não está disponível para a biota terrestre. O suprimento e ciclagem ambiental das formas disponíveis deste elemento, são largamente dependentes da decomposição biológica do nitrogênio presente nos componentes acumulados dentro da biota (CHAZAL & LENS, 2000).

Alguns processos mediados por microrganismos são capazes de implementar transformações no estado de oxidação do nitrogênio (EPA, 1975). Estes processos, conhecidos como: fixação, amonificação, nitrificação e desnitrificação fazem parte do ciclo biológico do nitrogênio, onde o mesmo, é altamente dependente das atividades microbianas (CHAZAL & LENS, 2000).

Na Figura 3.3 encontram-se representadas as interconversões biológicas do nitrogênio, onde, inicialmente, o nitrogênio gasoso do ar é reduzido no solo ou na água a amônia por fixação bacteriana do mesmo. A amônia assim formada, ou mesmo aquela produzida através da decomposição de compostos nitrogenados orgânicos, pode ser assimilada para síntese celular ou oxidada a

nitrato pela atividade de bactérias nitrificantes. A oxidação da amônia até nitrito possui a hidroxilamina como composto intermediário. O nitrito formado a partir do nitrito é convertido através do processo de desnitrificação a óxido nitroso e nitrogênio gasoso sendo novamente liberado para a atmosfera (BROCK & MANDIGAN, 1991).

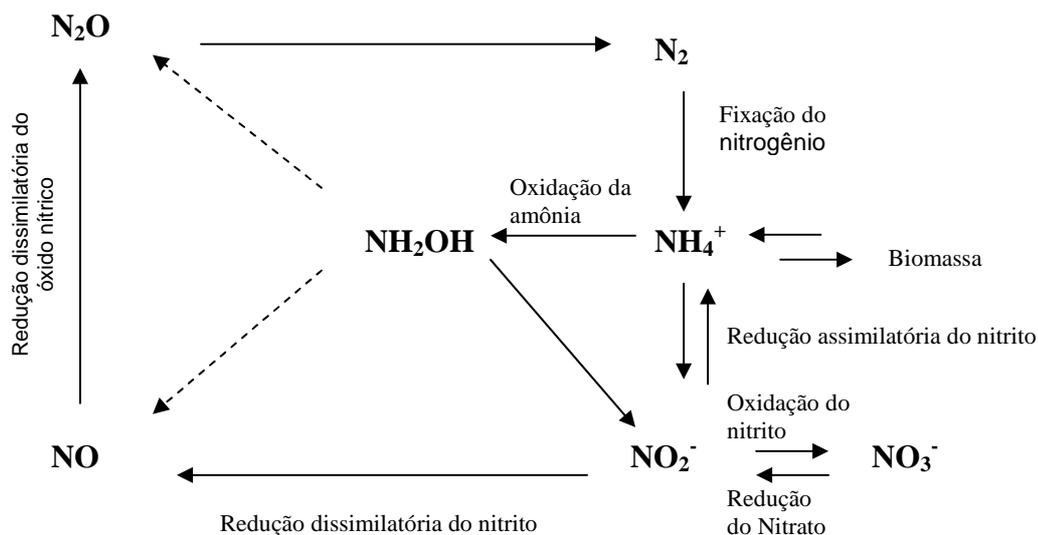


Figura 3.3 - Representação esquemática das reações envolvidas no ciclo biológico do nitrogênio (Fonte: YE & THOMAS, 2001).

O ciclo do nitrogênio está aqui apresentado de forma resumida, porém o mesmo tem sido extensiva e periodicamente revisto durante os últimos anos. Dados recentes sugerem que este ciclo seja muito mais complexo do que se imaginava, devido a novas espécies bacterianas isoladas, numerosas interações entre comunidades microbianas e interferências entre as rotas metabólicas (VERSTRAETE & PHILIPS, 1998).

Alguns destes novos conhecimentos envolvidos nas transformações biológicas do N serão descritos com mais detalhes nos próximos itens, pois, estes têm sido a base do desenvolvimento de novos processos de eliminação do nitrogênio.

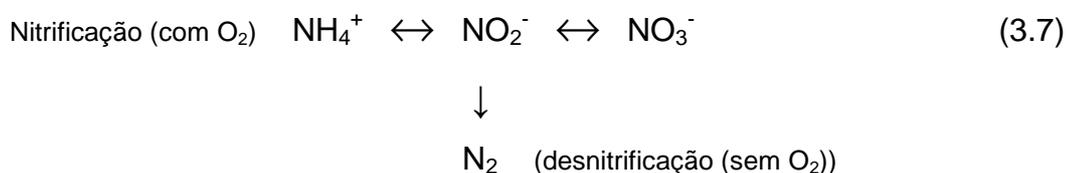
3.3 . PROCESSOS BIOLÓGICOS PARA A REMOÇÃO DO NITROGÊNIO

O nitrogênio pode ser removido de efluentes tanto por tratamentos físico-químicos como por via biológica. No entanto, a remoção do nitrogênio por processos biológicos apresenta-se efetiva e com baixos custos, razão pela qual tem sido utilizada preferencialmente em detrimento dos processos físico-químicos (EPA, 1993).

3.3.1 . Processo de Nitrificação / Desnitrificação

Neste item será dado ênfase ao processo da nitrificação, pois nela encontram-se os fundamentos e princípios dos novos processos de eliminação de nitrogênio que, finalmente, é o objetivo deste trabalho.

A tradicional remoção de nitrogênio por via microbiana está baseada em nitrificação autotrófica e desnitrificação heterotrófica (KHIN & ANNACHHATRE, 2004). No primeiro estágio, o da nitrificação, o amônio é oxidado em presença de oxigênio a nitrito e em seguida a nitrato por intermédio das bactérias nitrificantes. Num segundo estágio o nitrato é, em ausência de oxigênio, reduzido a nitrito, e posteriormente a nitrogênio gasoso através das bactérias heterotróficas desnitrificantes (TARTAKOVSKY, 1996). A Equação 3.7 (GRUNDITZ *et al.* 1998) mostra a reação global de forma simplificada:



As reações convencionais de nitrificação/desnitrificação já são conhecidas há bastante tempo. KHIN & ANNACHHATRE (2004) em revisão de literatura

citam referência bibliográfica do século XIX sobre tal assunto: (WINOGRADSKY³, 1890).

A experiência com este processo demonstra que as duas etapas devem ser separadas em tempo ou espaço para que funcionem efetivamente, uma vez que, as exigências nutricionais quanto à presença de carbono orgânico e oxigênio são distintas.

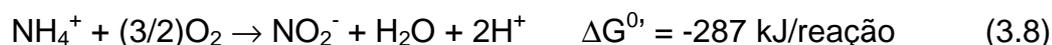
E por tratar-se de dois processos complementares, porém independentes, a sua análise é feita separadamente, conforme os itens seguintes.

a) **Nitrificação**

A nitrificação é um processo que ocorre em vários ambientes naturais, como por exemplo no solo, quando bactérias denominadas genericamente de nitrificantes oxidam o amônio até nitrato.

As bactérias responsáveis por estas reações são bactérias aeróbias quimiolitotróficas, isto é, obtêm energia para as suas funções vitais da oxidação de um composto inorgânico, no caso amônio ou nitrito e utilizam como fonte de carbono apenas o carbono inorgânico (MADIGAN *et al.*, 1997).

Apesar do produto da nitrificação ser reconhecidamente o nitrato, este processo é realizado em duas etapas. Numa primeira etapa, bactérias oxidadoras de amônio (BOA), sendo o gênero mais comum as *Nitrosomonas*, são responsáveis pela oxidação do amônio em nitrito tendo a hidroxilamina como intermediário. Conforme pode ser verificado na Equação 3.8.



Hoje, sabe-se que vários outros gêneros de BOA, como, por exemplo, *Nitrosolobus* e *Nitrosospira* são capazes de oxidar o amônio a nitrito prevalecendo um ou outro gênero de acordo com as condições ambientais impostas aos microrganismos (SCHMIDT *et al.*, 2001).

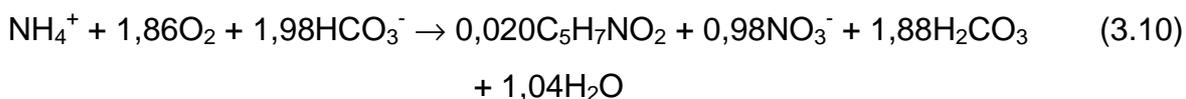
Numa segunda etapa as bactérias oxidadoras de nitrito, sendo o gênero mais conhecido o *Nitrobacter*, hidrolisa o nitrito levando-o finalmente o nitrato,

³ WINOGRADSKY, S. (1890). Recherches sur les organismes de la nitrification. *Ann Inst. Pasteur* n. 4, p. 213-231.

conforme a Equação 3.9. Assim como no caso das BOA, existem outros gêneros bastante freqüentes na oxidação do nitrito, como *Nitrospina*, *Nitrospira* (SCHMIDT *et al.*, 2001).



Como reação global, incorporando o crescimento celular pode-se observar a Equação 3.10.



Nesta equação pode-se observar que o processo da nitrificação, mais especificamente a nitritação, como é freqüentemente chamada a primeira etapa de oxidação do amônio, gera íons H^+ que podem diminuir o pH do processo, caso o efluente não contenha alcalinidade em quantidade suficiente para tamponar a ação destes íons. Como foi mencionado anteriormente, estas bactérias são autotróficas, portanto utilizam apenas o carbono inorgânico na síntese celular. Por isto, na prática, os valores de alcalinidade, principalmente na forma de CO_3^{2-} e HCO_3^- , necessários à nitrificação são superiores aos da estequiometria descrita na Equação 3.10.

Mais um aspecto importante da nitrificação é o baixo crescimento celular característico de bactérias autotróficas, pois a incorporação do carbono inorgânico demanda uma quantidade grande de energia e a oxidação do amônio e do nitrito geram uma quantidade pequena de energia, de forma que o saldo energético destas bactérias é bastante pequeno. Isto se reflete no baixo coeficiente de conversão de substrato em células que pode ser calculado a partir da Equação 3.10, sendo a soma das duas etapas 0,16g de células formadas por grama de amônio oxidado. Quando comparado com processos heterotróficos aeróbios este valor chega a ser 10 vezes menor (ECKENFELDER & MUSTERMAN, 1995).

Estas características do processo de nitrificação tornam propício o uso de reatores com reciclo total ou parcial de células de forma a aumentar as velocidades de conversão dos substratos. Na literatura, os sistemas de lodos ativados para a nitrificação são comumente citados para a nitrificação de esgostos

domésticos (von SPERLING, 1997). Outros reatores com material suporte, como filtros percoladores, biodiscos rotativos e, mais recentemente, de reatores com membranas têm sido os mais utilizados com vistas à retenção de células dentro do reator, isto é particularmente interessante quando a concentração de amônio no efluente a ser tratado é mais elevada (von SPERLING, 1997).

Neste último caso, a quantidade de oxigênio necessária para a oxidação do amônio afluente também é bem maior, e por este motivo, todos os novos processos de eliminação de nitrogênio são via nitrito, conforme será discutido no item 3.3.2 (b).

Comparando-se a quantidade de oxigênio necessário para oxidar amônio até nitrito ($3,24\text{gO}_2.\text{gN-NH}_4^{-1}$), pode-se perceber que este valor é 25 % menor do que o da oxidação completa até nitrato ($4,57\text{gO}_2.\text{gN-NH}_4^{-1}$), conforme as estequiometrias descritas nas Equações 3.8 e 3.9 (van DONGEN *et al.*, 2001)

O oxidação até nitrito, além de promover uma economia de oxigênio (aeração) de 25%, também possui a vantagem de necessitar de menor quantidade de matéria orgânica para fazer a desnitrificação heterotrófica. Este contexto é particularmente interessante quando se pretende tratar efluentes com elevadas concentrações de amônio e baixas concentrações de matéria orgânica para doar elétrons para reduzir o nitrato/nitrito até nitrogênio gasoso (VERSTRAETE & PHILIPS, 1998).

b) **Nitrificação incompleta** (nitritação)

Há algum tempo, a idéia de tornar o processo da nitrificação/desnitrificação mais econômico tem sido abordada. ABELING & SEYFRIED em artigo publicado no ano de 1992, propuseram uma desnitrificação heterotrófica via nitrito para tratamento de águas residuárias. Entretanto, há relatos ainda anteriores a este que datam de 1965 na Austrália, onde um SBR era operado com aeração intermitente de forma a limitar a nitrificação, o qual recebeu a sigla de IDEA (*Intermittently Decanted Extended Aeration*) (ZDRADEK, 2005).

Estes processos obviamente estão fundamentados na possibilidade de se separar ou selecionar as bactérias oxidadoras de amônio (BOA) em detrimento das oxidadoras de nitrito (BON). Na literatura atual são reportadas algumas

possibilidades para se fazer esta seleção, sendo sumarizadas por YOO *et al.*, (1999).

Uma das possibilidades de selecionar as bactérias oxidadoras de amônia é o controle do pH do sistema, pois a concentração de amônia no efluente é dependente do pH do meio. A medida que o pH do meio se eleva, o equilíbrio da reação do amônio em solução é deslocado para a amônia livre (NH_3), sendo esta inibitória tanto para as bactérias oxidadoras de amônia (BOA) como as bactérias oxidadoras de nitrito (BON), porém as bactérias, principalmente as do gênero *Nitrobacter* parecem ser mais sensíveis a este ocomposto (ZDRADEK, 2005).

A temperatura também tem sido usada como pressão de seleção das oxidadoras de amônio, uma vez que estas possuem uma velocidade de crescimento mais alta que as BON em temperaturas mais elevadas que 28°C (van DONGEN *et al.*, 2001). Portanto, ao se aplicar vazões específicas de alimentação maiores que a velocidade específica de crescimento das BON pode-se lavá-las do sistema em reatores contínuos (ZDRADEK, 2005). É nisto que se baseia o processo SHARON, que será apresentado mais adiante.

Um dos controles que têm sido mais enfatizados na literatura para se fazer a nitrificação é o oxigênio dissolvido. Apesar de ambos os grupos de bactérias nitrificantes serem aeróbios, as BON podem ser inibidas em baixas concentrações de oxigênio dissolvido (ZDRADEK, 2005). Isto deve-se ao fato deste grupo de bactérias possuírem uma constante de afinidade pelo oxigênio (K_o) bem maior que as BOA. Esta observação foi feita por LANBROECK & GERARDS (1993) estudando a cinética de consumo de oxigênio por *Nitrosomonas europaea* e *Nitrobacter winogradskyi*. Estes autores verificaram intervalos de K_o entre 1 - 15 e 22 -166 μMO_2 para as oxidadoras de amônio e de nitrito, respectivamente. Estes resultados indicam claramente a vantagem das *Nitrosomonas* em relação as *Nitrobacter* em ambientes com limitação de oxigênio (ZDRADEK, 2005).

Há relatos, na literatura, da existência de prolongados períodos de acúmulo de nitrito, quando se realizava a aeração com as células oriundas de um período em condição anóxica, períodos esses que poderiam durar algumas horas de plena aeração (ZDRADEK, 2005). Estas observações confirmam que a estratégia de intercalar períodos de aeração com períodos sem aeração, desde que bem planejados, deve resultar em acúmulo de nitrito sem a ocorrência do surgimento de quantidades significativas de nitrato. Inclusive, do ponto de vista prático, esta

estratégia é mais simples do que imaginar o controle da concentração de oxigênio dissolvido em valores extremamente baixos, tendo em vista as dimensões dos reatores para esta finalidade (ZDRADEK, 2005).

Desta forma, a limitação em oxigênio dissolvido é uma alternativa das mais interessantes para a geração de nitrito e para a inibição das oxidadoras de nitrito, sem prejudicar sobremaneira a ação das oxidadoras de amônio (ZDRADEK, 2005). Nos itens seguintes encontram-se relacionados os novos processos de eliminação de nitrogênio, autotróficos e heterotróficos, que utilizam o nitrito como acceptor final de elétrons.

3.3.2 . **Novas Tecnologias Biológicas**

Apesar dos novos processos serem patenteados (exceto o OLAND) com diferentes denominações, todos eles baseiam-se na nitrificação parcial, para posteriormente fazer a eliminação do nitrogênio via nitrito. As rotas bioquímicas e os microrganismos envolvidos nas reações dos processos ainda são objeto de muita discussão, encontrando-se na própria literatura especializada conflitos referentes aos conceitos dos processos. Por isto, neste trabalho, optou-se por usar a nomenclatura genérica dos processos, ou seja, desnitrificação autotrófica anaeróbia, quando o nitrito é reduzido em ausência de matéria orgânica e desnitrificação heterotrófica, quando em presença de matéria orgânica .

Uma vez constatada a dificuldade em se realizar a remoção de nitrogênio de efluentes altamente concentrados, os novos processos propostos, encontram-se descritos a seguir.

a) **Processo SHARON**

O processo SHARON (*Single Reactor High Activity Ammonia Removal Over Nitrite*) foi desenvolvido na Universidade Técnica de Delft, na Holanda (HELLINGA *et al.*, 1998) e baseia-se no fato de que, conforme anteriormente mencionado, em altas temperaturas (acima de 28 °C), as *Nitrobacter* têm uma

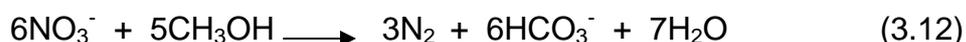
velocidade de crescimento mais lenta do que as *NitrosomonaS* (van DONGEN *et al.*, 2001).

A utilização de um reator de mistura completa com tempo de residência baixo, de aproximadamente 1 dia; temperatura de 35 °C e manutenção do pH acima de 7, faz com que ocorra uma lavagem das *Nitrobacter*, e utilizando-se aeração intermitente é possível nitrificar e desnitrificar um efluente (van DONGEN *et al.*, 2001).

Portanto, o processo SHARON utiliza a nitrificação até nitrito e a desnitrificação heterotrófica pela adição de uma fonte externa de carbono, como o metanol, por exemplo. Desta forma o processo promove uma economia de 25% de oxigênio e 40% de carbono orgânico (van DONGEN *et al.*, 2001).

A razão para a economia de oxigênio foi mostrada anteriormente (item 3.3.1), pela comparação entre as Equações 3.8 e 3.9.

Quanto à economia de matéria orgânica, sabe-se que, na desnitrificação, tanto o nitrito como o nitrato podem ser reduzidos a N₂, sob condições anóxicas em presença de carbono orgânico, por organismos heterotróficos, de acordo com as reações apresentadas nas Equações 3.11 e 3.12 (van DONGEN *et al.*, 2001):



É possível verificar pelas Equações 3.11 e 3.12 que para a desnitrificação do nitrito necessita-se de 40% menos metanol do que para a desnitrificação do nitrato (van DONGEN *et al.*, 2001).

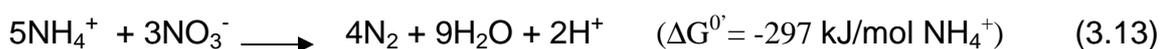
O processo SHARON foi aplicado em escala real com sucesso em uma planta de tratamento de efluentes em Rotterdam, para tratamento de água de prensagem de lodo, e segundo MULDER *et al.*, (2001), um reator de 1500 m³ esteve em operação por dois anos tratando 1000 kg de N.dia⁻¹.

b) **Processo ANAMMOX** (*Anaerobic Ammonium Oxidation*)

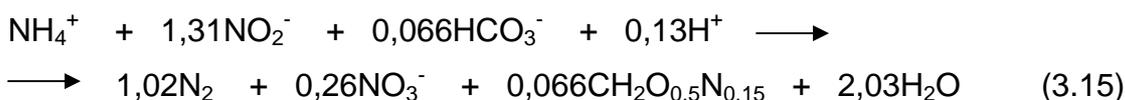
A descoberta do anammox é considerada um dos mais inovadores avanços tecnológicos em termos de remoção do nitrogênio amoniacal de efluentes

(STROUS *et al.*, 1999a). Por um longo período acreditou-se que a oxidação da amônia estava restrita a ambientes aeróbios. Não era conhecido o fato de que a amônia pudesse ser oxidada em ambientes anaeróbios. Porém, BRODA, já em 1976, através de cálculos termodinâmicos verificou a possibilidade de oxidação do amônio em presença de nitrito ou nitrato como aceptores de elétrons vista a situação favorável, em termos de energia livre, de reações conforme as Equações 3.13 e 3.14, ou seja a reação que libera maior quantidade de energia (valor negativo mais alto do ΔG^0) será a rota metabólica preferida pelos microrganismos. Tal previsão foi experimentalmente confirmada e o processo patenteado como Anaerobic Ammonium Oxidation, ou ANAMMOX (JETTEN *et al.*, 2001).

A descoberta aconteceu na Holanda, de forma inesperada, quando MULDER *et al.* (1995), trabalhando com um reator de leito fluidizado desnitrificante anaeróbio, utilizando-o no pós-tratamento do efluente de um reator metanogênico, percebeu que grandes quantidades de amônio desapareciam, enquanto o consumo de nitrato e a produção de nitrogênio gasoso aumentavam simultaneamente, como mostra a Equação 3.13 (MULDER *et al.*, 1995). Pouco depois, van de GRAAF *et al.* (1995) e BOCK *et al.* (1995) observaram que o acceptor de elétrons preferido no processo era o nitrito (Equação 3.14).



No processo Anammox, o produto principal da oxidação anaeróbia do amônio é o N_2 , porém, cerca de 20% do nitrogênio fornecido (nitrito e amônio) é convertido em NO_3^- , a reação completa está apresentada na Equação 3.15, onde observou-se que a razão entre o consumo de NH_4^+ e NO_2^- era de 1:1,31 e a razão de conversão de NH_4^+ em NO_3^- foi de 1:0,26 (STROUS *et al.*, 1998).



Desta estequiometria pode-se verificar que a conversão de substrato em células (Yx/s) deste processo é ainda menor que o da nitrificação cerca de 0,11g

de células/ g N-NH_4^+ consumido. Este parece ser um dos maiores entraves do processo, que na falta de inóculo adequado requer longos tempos de “start-up”.

Os microrganismos responsáveis pela conversão anaeróbia do amônio são bactérias identificadas como sendo os novos membros autotróficos da ordem Planctomycetales. O primeiro gênero caracterizado, proveniente do reator de leito fluidizado em Delft foi o *Candidatus Brocadia Anammoxidans*. Atualmente, estão descritas seis espécies de bactérias anammox, pertencentes a três gêneros distintos: *Brocadia*, *Kuenenia* e *Scalindua* (STROUS *et al.*, 1999a).

Experimentos com ^{15}N -marcado foram realizados afim de se esclarecer as rotas metabólicas para a oxidação anaeróbia do amônio em *Brocadia anammoxidans*. Foi possível mostrar que o amônio e o nitrito são combinados para formar nitrogênio gasoso e bicarbonato radioativo foi incorporado à biomassa (van de GRAAF *et al.*, 1997). Quando um excesso de hidroxilamina foi adicionado ao meio, um acúmulo transiente de hidrazina foi observado, indicando que a hidrazina é um intermediário do processo. Supõe-se que a oxidação da hidrazina a nitrogênio gasoso gera quatro elétrons, os quais, são utilizados para a redução inicial do nitrito a hidroxilamina, como apresentado na Figura 3.4.

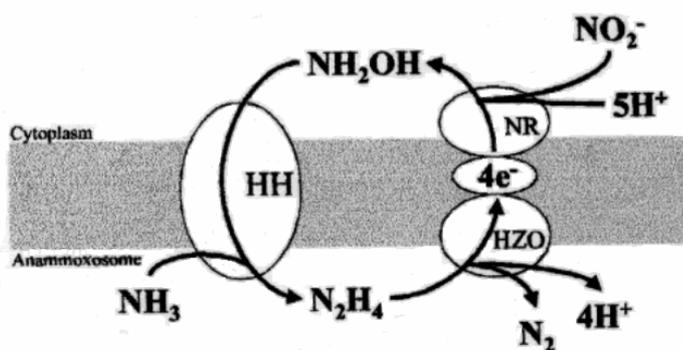


Figura 3.4: Modelo proposto para a oxidação anaeróbia da amônia para microrganismos do tipo *Brocadia*. HH: hidrazina hidrolase; HZO: enzima oxidante da hidrazina; NR: enzima redutora de nitrito (Fonte: SCHMIDT *et al.*, 2001).

Quanto às condições ótimas do cultivo de *Brocadia Anammoxidans*, observou-se que, altos valores de atividade são encontrados para o pH entre 6.4 e 8.3 e uma faixa de temperatura entre 20 e 43 °C (SLIEKERS *et al.*, 2001).

O pH e temperatura ótimos para os outros microrganismos do tipo anammox são muito similares. As mais altas atividades anammox para *K.*

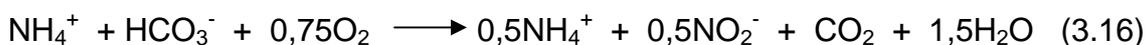
stuttgartiensis foi $26.5 \text{ nmol N}_2 \cdot (\text{mg proteína})^{-1} \text{ min}^{-1}$ em pH 8 e temperatura de 37°C (EGLI *et al.*, 2001). Esta atividade é mais baixa do que a atividade anammox máxima para *B. anammoxidans* ($55 \text{ nmol N}_2 \cdot (\text{mg proteína})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ em pH 8 e temperatura 40°C (JETTEN *et al.*, 1999). No entanto, *K. stuttgartiensis* tem uma tolerância mais alta a nitrito, e é menos inibida por fosfato quando comparada com *B. anammoxidans* (EGLI *et al.*, 2001).

O processo anammox apresenta um bom potencial para remoção de amônio de efluentes (KHIN & ANNACHHATRE, 2004). Segundo STROUS *et al.*, (1997a) os reatores de leito fixo e leito fluidizado apresentam uma configuração adequada para o processo anammox. O mesmo tem sido facilmente mantido em um reator 'gas lift'. As velocidades de remoção de nitrogênio já alcançadas são algo em torno de $8,9 \text{ kg N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$. Tal velocidade de remoção é 20 vezes maior quando comparada com velocidades de remoção já alcançadas em laboratório para o mesmo processo (SLIEKERS *et al.*, 2003).

O processo anammox não necessita da adição de uma fonte de carbono orgânico, além disso, se este processo estiver combinado com uma etapa prévia de nitrificação, apenas parte do amônio precisa ser nitrificada a nitrito, enquanto o processo anammox combina o amônio remanescente com o nitrito, produzindo nitrogênio gasoso. Isto reduz a demanda de oxigênio no reator nitrificante e reduz custos relacionados à adição de matéria orgânica. A produção de biomassa é muito baixa e conseqüentemente, pouco lodo é produzido; o que torna os custos de operação mais baixos (JETTEN *et al.*, 1997).

c) **Processo Combinado SHARON / ANAMMOX**

O processo combinado sharon/anammox, cujo esquema está apresentado na Figura 3.5, utiliza dois reatores. No primeiro reator, um afluente contendo amônio, é oxidado até nitrito, resultando em um efluente cuja composição é 50% de amônio e 50% de nitrito, de acordo com a Equação 3.16 (JETTEN *et al.*, 1997):



O efluente do reator sharon, contendo uma mistura de amônio e nitrito, torna-se ideal como afluente para o processo anammox, onde amônio e nitrito são convertidos anaerobicamente a nitrogênio gasoso, como apresentado anteriormente na Equação 3.14 (van DONGEN *et al.*, 2001).

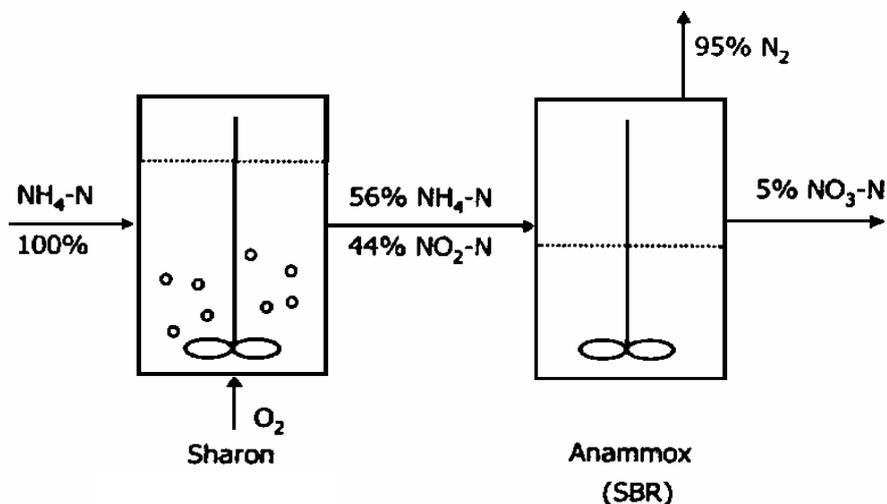


Figura 3.5: Apresentação esquemática do sistema combinado sharon/ anammox (van DONGEN *et al.*, 2001).

A razão entre amônia e nitrito necessária ao processo anammox é de cerca de 1. Para água de lodo, esta razão pode ser alcançada sem a necessidade de controle do pH, porque a água de lodo contém elevada quantidade de bicarbonato que exerce efeito tampão. Quando a metade do amônio é convertido a nitrito, a alcalinidade da água cai, levando a uma queda do pH, o que inibe a ação das oxidadoras de nitrito, prevenindo uma posterior nitrificação (JETTEN *et al.*, 2002).

O processo combinado sharon/anammox é adequado para água de lodo concentrado "sludge liquor" e efluentes industriais contendo uma alta concentração de amônia e uma baixa quantidade de carbono orgânico. O processo combinado pode normalmente ser implantado em dois reatores separados ou em um único reator (DIJKMAN & STROUS, 1999). A remoção completa de nitrogênio no processo combinado requer pouco oxigênio ($1,9 \text{ kg O}_2 \cdot \text{kg N}^{-1}$ em vez de $4,6 \text{ kg O}_2 \cdot \text{kg N}^{-1}$), nenhuma fonte de carbono e apresenta uma baixa produção de lodo ($0,08$ em vez de aproximadamente $1 \text{ kg SSV} \cdot \text{kg N}^{-1}$) (van LOOSDRECHT & JETTEN, 1998).

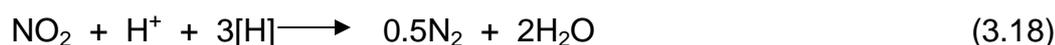
d) **Processo NOx**

BOCK *et al*⁴, (1996) apud (SCHMIDT *et al.*, 2003), relata que o controle e a estimulação da atividade desnitrificante autotrófica de microrganismos do gênero *Nitrosomonas* pela adição de óxidos de nitrogênio (NOx) oferece novas possibilidades no tratamento de efluentes. Na presença de NOx, organismos do tipo *Nitrosomonas* nitrificam e desnitrificam simultaneamente, mesmo sob condições completamente aeróbias, sendo N₂ o principal produto. As conversões de nitrogênio influenciadas por seus óxidos são apresentadas nas Equações 3.17 a 3.19 (SCHMIDT *et al.*, 2003):

Nitrificação:



Desnitrificação:



Soma:



O NOx (NO/NO₂) é o sinal de indução regulatório da atividade desnitrificante das bactérias oxidadoras de amônia, o qual é introduzido apenas em quantidades traço; como consequência, cerca de 50% dos equivalentes redutores [H] (fornecidos por uma fonte de carbono externa) são então transferidos para nitrito comoceptor final de elétrons (Eq. 3.18) em vez do oxigênio. Deste modo, o consumo de oxigênio do processo é reduzido (Eq. 3.17 e 3.19).

As interconversões dos compostos de nitrogênio, que ocorrem no processo NOx, serão apresentadas mais detalhadamente a seguir, através do Ciclo do NOx.

⁴ BOCK, E.; SCHMIDT, I.; STÛVEN, R.; ZART, D. (1996). Verfahren zur biologischen Umsetzung von in Wasser gelöstem Ammonium unter Verwendung ammoniak-oxidierender Bakterien. Az. DE 196, n. 17, p. 331-0-41.

d.1) **Ciclo do NOx**

d.1.1) **Oxidação Anaeróbia da Amônia**

Dados publicados recentemente evidenciaram a oxidação anaeróbia da amônia pelas *Nitrosomonas* (SCHMIDT & BOCK, 1997). Estes resultados indicam um complexo papel dos óxidos de nitrogênio (NO e NO₂) no metabolismo de oxidadoras 'aeróbias' de amônia. A *Nitrosomonas eutropha* pode oxidar a amônia na ausência de oxigênio dissolvido (SCHMIDT & BOCK, 1997; SCHMIDT & BOCK, 1998) substituindo o oxigênio molecular por dióxido de nitrogênio ou tetróxido de nitrogênio. O balanço completo de nitrogênio mostrado nas Equações 3.20, 3.21 e 3.22 apresenta uma média em torno de 1: 1: 1: 2 para a conversão da amônia, tetróxido de nitrogênio, nitrito e óxido nítrico:



Hidroxilamina e óxido nítrico são formados nesta reação. Enquanto o óxido nítrico não for metabolizado, a hidroxilamina é oxidada a nitrito. O nitrito produzido é parcialmente utilizado como acceptor de elétrons levando à formação de nitrogênio gasoso, como mostrado na Equação 3.23 (SCHMIDT *et al*, 2001) :



Existem poucas diferenças entre a oxidação anaeróbia e a aeróbia realizada por *Nitrosomonas*. Em vez de O₂ no curso da oxidação aeróbia da amônia, N₂O₄ (tetróxido de nitrogênio) é utilizado como acceptor de elétrons e NO, sendo um produto adicional, é liberado na oxidação anaeróbia da amônia. O NO₂ não está disponível em ambientes naturais sob condições anóxicas. Uma oxidação anaeróbia da amônia é então dependente do transporte do NO₂ proveniente das camadas óxicas.

O novo modelo hipotético de oxidação da amônia (SCHMIDT *et al.*, 2001), incluindo o papel dos óxidos de nitrogênio é apresentado na Figura 3.6.

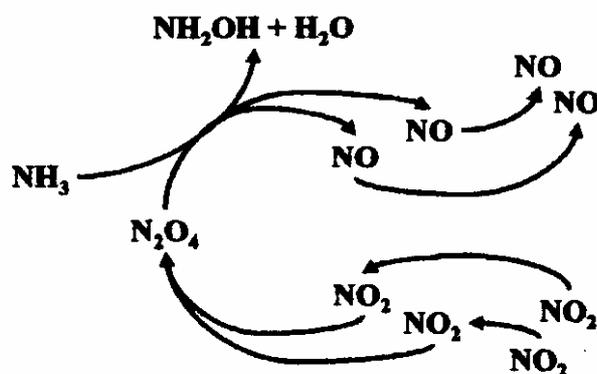


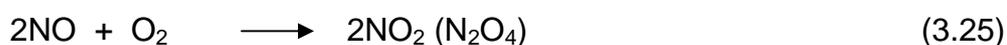
Figura 3.6: Ciclo NOx. Modelo hipotético da oxidação anaeróbica dependente de NO_2 pelas Nitrosomonas. O N_2O_4 é o oxidante para a oxidação da amônia (SCHMIDT *et al.*, 2001).

A oxidação anaeróbica da amônia depende da presença do agente oxidante N_2O_4 . O óxido nítrico (NO) é produzido em quantidades estequiométricas. Apenas quando o NO_2 está disponível sob condições anóxicas, a amônia é oxidada e a hidroxilamina surge como um intermediário enquanto NO é formado como produto final. A hidroxilamina é depois oxidada a nitrito (SCHMIDT & BOCK, 1998).

Sob condições anaeróbicas o nitrito serve como acceptor final de elétrons. Na ausência de amônia as *Nitrosomonas* são capazes de utilizar diferentes substratos como doadores de elétrons. Durante a oxidação da hidroxilamina pelas oxidadoras de amônia, pequenas quantidades de óxido nítrico e nitroso são liberadas (HOOPER & TERRY, 1979). Além disso, as *Nitrosomonas* são capazes de realizar desnitrificação anaeróbica com hidrogênio molecular (BOCK *et al.*, 1995) ou compostos orgânicos simples (ABELIOVICH & VONHAK, 1992) servindo como doadores de elétrons.

d.1.2) **Oxidação Aeróbia da Amônia**

Na presença de O_2 , o NO produzido pode ser re-oxidado a NO_2 . Logo, apenas pequenas quantidades de NO são detectáveis na fase gasosa em suspensões de células de *Nitrosomonas*. De acordo com o modelo apresentado na Figura 3.7 (Equação 3.24), N_2O_4 é o agente oxidante sob condições aeróbias. A hidroxilamina e o NO são produzidos como intermediários. Enquanto a hidroxilamina é oxidada a nitrito (Equação 3.21), o NO é re-oxidado a NO_2 (N_2O_4), segundo a Equação 3.25 (SCHMIDT *et al.*, 2001):



A soma das Equações 3.24 e 3.25 resulta na Equação 3.26, já descrita anteriormente como a reação de oxidação aeróbia da amônia (HOOPER *et al.*, 1997), a qual está em completa concordância com o modelo hipotético. De acordo com o novo modelo, o O_2 é utilizado para oxidar o NO. O produto, NO_2 , é então consumido durante a oxidação da amônia. O oxigênio da hidroxilamina, mesmo sendo originado do oxigênio molecular, é, no entanto, incorporado via NO_2 (SCHMIDT *et al.*, 2001).

O novo processo oferece a possibilidade de ser integrado em uma planta de tratamento de efluentes já existente com custos mínimos de instalação e manutenção. Segundo informações fornecidas por SCHMIDT *et al.*, (2003), existem, na Alemanha, duas plantas piloto em uma estação de tratamento de efluentes utilizando o sistema de nitrificação/desnitrificação equipadas com o método NO_x , tratando com sucesso efluentes com carga variando entre $2\text{kg N-NH}_4^+ \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ e $4,7\text{kg N-NH}_4^+ \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, obtendo uma remoção em torno de 65% de nitrogênio.

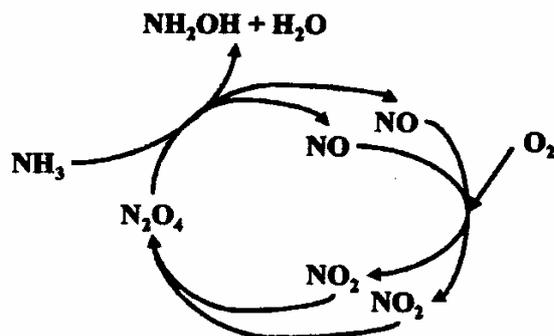
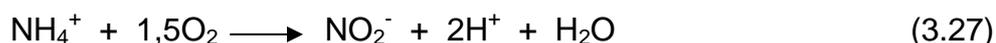


Figura 3.7: Ciclo NOx. Modelo hipotético da oxidação aeróbia da amônia pelas *Nitrosomonas*. De acordo com este modelo, N_2O_4 é o oxidante para a oxidação da amônia. Sob condições aeróbias o oxigênio é utilizado para re-oxidar o NO a NO_2 (N_2O_4). A hidroxilamina é oxidada a nitrito (Fonte: SCHMIDT *et al.*, 2001).

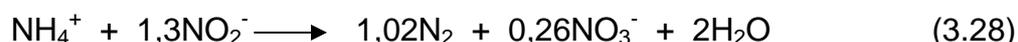
e) **Processo CANON**

O processo CANON (*Completely Autotrophic Nitrogen Removal over Nitrite*) combina nitrificação parcial e processo ANAMMOX, sempre em um único reator e muito aplicado em reatores com biofilmes (SCHMIDT *et al.*, 2003). A diferença entre o processo CANON e o processo SHARON, é que o SHARON utiliza nitrificação parcial e desnitrificação heterotrófica pela adição de uma fonte externa de carbono, além de ter fixados parâmetros como TRH de 1 dia, temperatura de 35 °C e pH acima de 7.

Em sua revisão de literatura, KHIN & ANNACHHATRE (2004), relatam que, sob condições limitadas de oxigênio, o amônio é oxidado a nitrito por nitrificantes aeróbias como as *Nitrosomonas*, segundo a Equação 3.27:



Subseqüentemente, bactérias tipo anammox, oxidadoras anaeróbias do amônio, convertem o amônio, juntamente com o nitrito em nitrogênio gasoso e traços de nitrato, segundo a Equação 3.28:



A interação entre as bactérias oxidadoras de amônio aeróbias e anaeróbias, sob condições limitadas de oxigênio, resulta em uma quase completa conversão de amônio a nitrogênio gasoso.

O processo CANON apresenta-se como uma alternativa econômica e eficiente para o tratamento de efluentes, especialmente para aqueles ricos em amônio e pobres em carbono orgânico. Tal processo é completamente autotrófico não necessitando da adição de DQO. Além disso, a completa remoção de N pode ser possível em um único reator com pouca aeração. Isto significa redução das necessidades de energia e espaço (KHIN & ANNACHHATRE, 2004).

Apesar deste processo ter sido desenvolvido em reatores do tipo SBR, estas reações também são observadas em ambientes que apresentam interface aeróbia/anaeróbia, como os biofilmes.

f) **Processo OLAND**

KUAI & VERSTRAETE (1998), descrevem o processo OLAND (*Oxygen-Limited Autotrophic Nitrification and Denitrification*) como um novo processo para remoção de amônia em um único passo sem adição de carbono orgânico. As conversões de nitrogênio no processo OLAND estão representadas nas Equações 3.29, 3.30 e 3.31 (AHN, 2006):



A principal diferença entre o processo OLAND e o processo CANON é que o processo OLAND leva em conta a atividade desnitrificante das bactérias nitrificantes convencionais, enquanto que o processo CANON incorpora o processo ANAMMOX (AHN, 2006), realizado por bactérias específicas e anaeróbias estritas.

SCHMIDT *et al.*, (2003), comentam que, tirando o fato das nitrificantes estarem envolvidas, o mecanismo do processo OLAND ainda não está

compreendido. Ainda, segundo os autores acima citados, parece possível que o OLAND esteja baseado no conceito CANON ou no processo NOx.

3.4 . REATORES DE BIODISCOS ROTATIVOS (RBR)

Um reator de biodiscos rotativos consiste em uma série de discos circulares como material suporte para o crescimento de microrganismos com espaçamento bem próximo, onde os mesmos são submersos no efluente e girados vagarosamente (METCALF & EDDY, 1991). Apesar de cloreto de vinila e poliestireno serem os materiais mais utilizados, o uso de espuma de poliuretano na confecção dos discos, tem se apresentado como uma tecnologia emergente para tratamento biológico de águas residuárias (GUIMARÃES *et al.*, 2005).

Os RBR foram primeiramente instalados na Alemanha em 1960 e depois introduzidos nos Estados Unidos, onde cerca de 70% dos sistemas RBR instalados são utilizados para remoção apenas de carbono, 25% para remoção de carbono e nitrificação e 5% apenas para a nitrificação.

Quando em operação, os microrganismos se aderem às superfícies dos discos e formam uma camada de limo sobre a superfície molhada dos mesmos. A rotação dos discos faz com que a biomassa entre em contato com o substrato no efluente e depois com a atmosfera para adsorção do oxigênio. A rotação dos discos afeta a transferência de oxigênio e mantém a biomassa em uma condição aeróbia. A rotação também funciona como um mecanismo para remoção do excesso de sólidos dos discos através das forças de cisalhamento ela remove e mantém os sólidos decantados em suspensão, que podem ser removidos do RBR para um clarificador. Os reatores de biodiscos rotativos podem ser utilizados para o tratamento secundário, e podem também ser operados por temporada e nos modos de nitrificação contínua e desnitrificação (METCALF & EDDY, 1991). A Figura 3.8 apresenta um diagrama de fluxo para tratamento secundário em um reator de biodiscos rotativos.

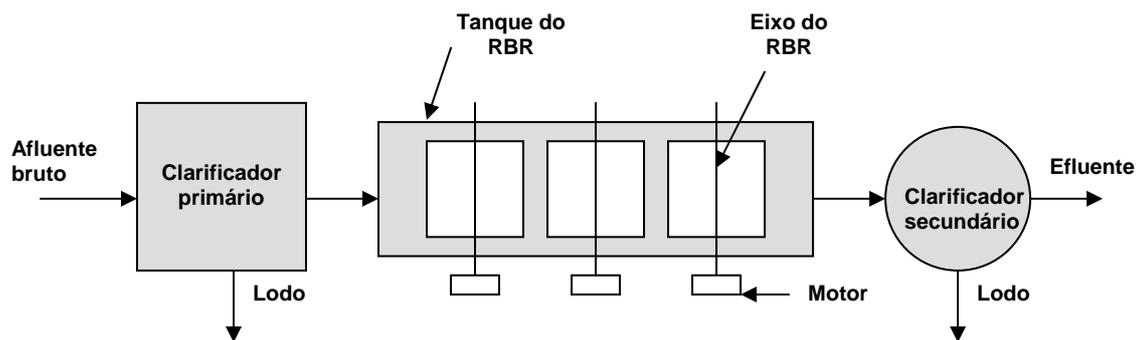


Figura 3.8 – Esquema para tratamento secundário em reator de biodiscos rotativos (Fonte: METCALF & EDDY, 1991).

3.4.1 . Parâmetros de Projeto

Os RBR são normalmente projetados com base nos fatores de carga obtidos de planta piloto. Quando projetados adequadamente, estes geralmente são bastante confiáveis, devido à grande quantidade de biomassa presente, o que permite que sejam resistentes a choques de cargas orgânicas e hidráulicas, mais efetivamente. O efeito de setorização em sistemas de fluxo-pistão amortece choques devido a altas cargas (METCALF & EDDY, 1991). A Tabela 3.1, pode ser utilizada como base para o dimensionamento de sistemas de biodiscos (GONÇALVES et al. 2001):

Tabela 3.1 - Resumo dos parâmetros de dimensionamento de biodiscos

Item	Nível de tratamento		
	Secundário	Secundário com nitrificação	Nitrificação de efluente secundário
Taxa de aplicação hidráulica ($m^3 \cdot m^{-2} \cdot d^{-1}$)	0,08 a 0,16	0,03 a 0,08	0,04 a 0,10
Carga orgânica superficial (g DBOsolúvel. $m^{-2} \cdot d^{-1}$)	3,7 a 9,8	2,4 a 7,3	0,5 a 1,5
Carga orgânica superficial (g DBO. $m^{-2} \cdot dia^{-1}$)	9,8 a 17,2	7,3 a 14,6	1,0 a 2,9
Máxima carga orgânica superficial no 1º. estágio (g DBOsolúvel. $m^{-2} \cdot d^{-1}$)	19 a 29 (14 *)	19 a 29 (14 *)	-
Máxima carga orgânica superficial no 1º. estágio (g DBOI. $m^{-2} \cdot d^{-1}$)	39 a 59 (30*)	39 a 59 (30*)	-
Carga orgânica superficial de N amoniacal (g N-NH ₄ ⁺ . $m^{-2} \cdot d^{-1}$)	-	0,7 a 1,5	1,0 a 2,0
Tempo de detenção hidráulica (h)	0,7 a 1,5	1,5 a 4,0	1,2 a 2,9
DBO do efluente (mg O ₂ .L ⁻¹)	15 a 30	7 a 15	7 a 15
N-NH ₄ ⁺ efluente (mgN.L ⁻¹)	-	< 2	< 2

*cargas usualmente utilizadas em projeto

Fonte: (GONÇALVES et al. 2001 adaptada de METCALF & EDDY, 1991)

3.4.2 . Utilizações dos RBR

Os reatores de biodiscos rotativos (RBR) constituem-se, então, como uma tecnologia comprovadamente eficiente no tratamento de efluentes em larga escala, oferecendo vantagens como: ambiente com baixa tensão de cisalhamento, fácil scale-up, alta área de superfície por unidade de volume, baixos custos de manutenção, baixo requerimento de energia e simples construção e operação (GUIMARÃES *et al.*, 2005). Tais reatores têm sido empregados recentemente para o tratamento de vários tipos de substrato (HIRAS *et al.*, 2004).

HIRAS *et al.* (2004), utilizaram um sistema RBR em escala de laboratório com uma unidade aeróbia com 35% de submersão, e uma anóxica

completamente submersa, para remoção de nitrogênio e carbono, aplicando cargas de 38-182 g DQO.m⁻².d⁻¹ e 0.22-14 g N oxidado.m⁻².d⁻¹ na unidade anóxica, e 3.4-18 g DQO.m⁻².d⁻¹ e 0.24-1.8 g N-NH₄.m⁻².d⁻¹ na aeróbia e variando a razão de reciclo entre 1, 2, 3 e 4, obtiveram remoções de 82% de DQO e 54% de N total. A Tabela 3.2 apresenta os dados do sistema.

Tabela 3.2: Parâmetros do sistema RBR para remoção de carbono e nitrogênio utilizado por HIRAS *et al.*, (2004).

Parâmetros	unidade Anóxica	unidade Aeróbia
Área de superfície	100 cm ²	372 cm ²
Profundidade do	11.5 cm	9.4cm
Volume de operação	1.0L	2.75L
Nº. discos	4	4
Diâmetro	7cm	20cm
Imersão	100%	35%
Área de superfície	343 cm ²	2710 cm ²
Veloc. de rotação	2 rpm	8 rpm

Fonte: HIRAS *et al.*, (2004).

Conforme já foi descrito anteriormente, o processo ANAMMOX, mais especificamente o processo CANON, foi observado em RBR no tratamento de água de prensagem de lodo. Com o intuito de estabelecer o processo CANON em RBR, PYNAERT *et al.* (2002), utilizaram um RBR contendo discos de PVC, cujos parâmetros estão apresentados na Tabela 3.3.

O reator cujos parâmetros estão descritos na Tabela 3.3 foi operado à uma temperatura de 20 °C, velocidade rotacional dos discos de 2 rpm e TRH de 1 dia. Inicialmente inoculou-se uma cultura nitrificante, e após 60 dias adicionou-se metanol ao sistema, como fonte de carbono. As concentrações do meio de alimentação utilizadas para aumento de carga foram de: 120, 200, 250, 350 e 450 mg N-NH₄⁺ .L⁻¹, além da diminuição do TRH por um período total de operação de 160 dias. Ao final deste período obteve-se um percentual de remoção de 84% para uma carga de 2300 mgN.m⁻².d⁻¹. Os autores concluíram que provavelmente tal remoção poderia ser atribuída a um processo de desnitrificação convencional, juntamente com o processo Oland.

Tabela 3.3: Parâmetros do RBR utilizado por PYNAERT et al. (2002) para remoção de carbono e nitrogênio.

Parâmetros	Valores
No. de estágios	2
No. de discos/estágio	20
Comprimento	88cm
Largura	34 cm
Altura	30 cm
Nível de efluente no RBR	18 cm
Diâmetro do disco	30 cm
Espessura	0,5cm
Espaço entre os discos	1 cm
Área superficial total	5.84 m ²
Volume líquido no RBC	44 L
% imersão	50%

Fonte: PYNAERT *et al.* (2002)

Posteriormente, os mesmos autores (PYNAERT *et al.*, 2003), adicionaram ao mesmo reator, lodo granular anaeróbico, removeram a fonte de carbono do afluente. Após estas modificações foram realizados testes em batelada com nitrogênio marcado, provando que a remoção de nitrogênio era devido a desnitrificação heterotrófica, e também desnitrificação autotrófica,

Na continuidade deste trabalho, PYNAERT *et al.* (2003), revelaram que após 615 dias da partida do reator e 415 dias após a adição de lodo granular anaeróbico, as cargas, foram gradualmente elevadas durante um período de 150 dias de 4714 para 8304 mg N.m⁻².d⁻¹, e mantida em 8304 durante 100 dias, alcançando-se ao final do período uma remoção de 89% de N.

Várias outras aplicações para os sistemas de RBR são encontrados na literatura; por exemplo, GUIMARÃES *et al.* (2005) utilizaram tal sistema para descoloração de efluente de refinaria de açúcar, BRAR & GUPTA (2000), conseguiram remover 99,89% do tricloroetileno de um efluente sintético contendo 30 mg.L⁻¹ deste composto. JIANLONG (2000) utilizou um RBR para produção de ácido cítrico por cultura de *Aspergillus niger* imobilizada em espuma de poliuretano.

3.5 . FORMAÇÃO DE BIOFILMES

Os biofilmes podem ser definidos de forma simples e abrangente, como comunidades microbianas que estão aderidas à uma superfície. Um esforço concentrado para se estudar biofilmes microbianos teve início há duas décadas atrás, com a redescoberta de que, em sistemas aquáticos naturais, as bactérias são encontradas predominantemente aderidas à superfícies (GEESEY *et al.*, 1977). Segundo WHURMANN, um percentual entre 90 e 99% dos microrganismos existem como biofilmes em rios a uma profundidade abaixo de 1,5m.

Os biofilmes podem compreender uma única ou múltiplas espécies microbianas (O'TOOLE *et al.*, 2000). Estudos indicam que os biofilmes são um ponto estável em um ciclo biológico que inclui: iniciação, maturação, manutenção e dissolução, como apresentado na Figura 3.9. As bactérias parecem iniciar o desenvolvimento de biofilmes em resposta a condições ambientais específicas, como por exemplo a disponibilidade de um determinado nutriente. Tais biofilmes continuam a se desenvolver enquanto houver nutriente fresco sendo fornecido, no entanto, quando há uma limitação deste, os microrganismos se desprendem da superfície e retornam ao modo livre de crescimento. Presumivelmente, tal comportamento permite à célula procurar por uma nova fonte de nutrientes.

Uma vez que os microrganismos se estabeleceram na superfície, eles começam a resistir a uma série de mudanças que os faz se adaptarem à vida em superfície. As adaptações mais comuns já observadas incluem a produção de grandes quantidades de exopolissacarídeos (ou limo), que desempenham um papel de proteção do biofilme (BAYER *et al.*, 1991; BOYD & CHAKRABARTY, 1995; GACESA, 1998; MAY *et al.*, 1991). Além disso, biofilmes maduros podem ter aspectos arquiteturais complexos. Os estudos iniciais de biofilmes por microscopia eletrônica levavam à desidratação das amostras permitindo uma visão simplificada dos biofilmes como células empilhadas umas sobre as outras (COSTERTON *et al.*, 1995).

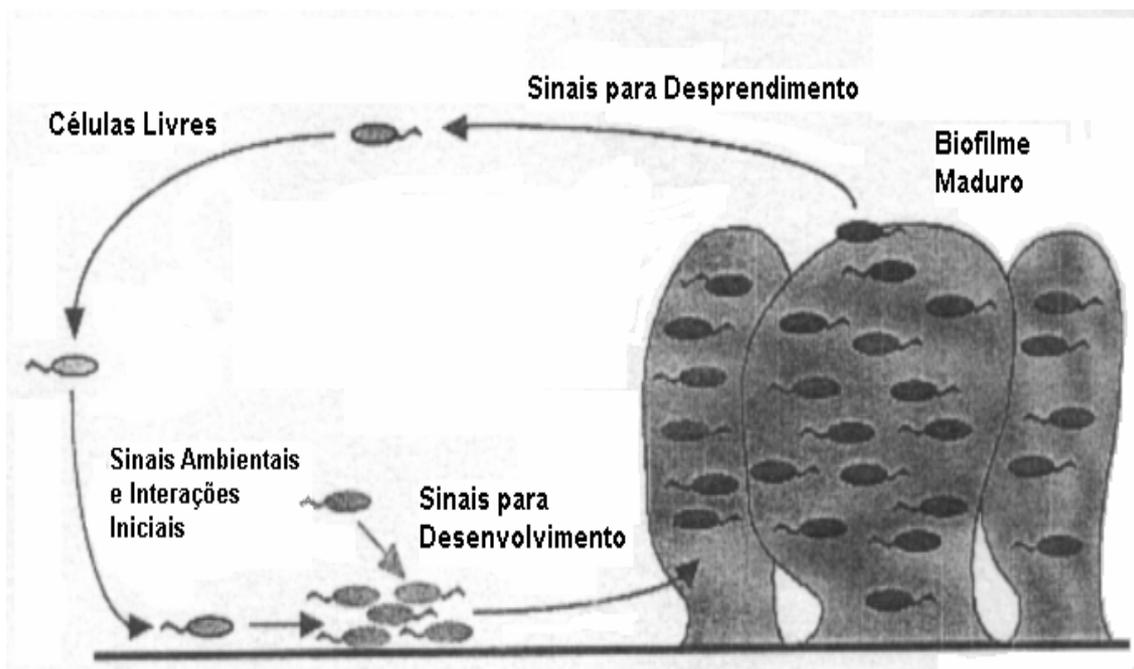


Figura 3.9: Modelo de desenvolvimento de biofilme. Células livres individuais podem formar contatos célula-superfície ou célula-célula, resultando na formação de microcolônias. As células aderidas ao biofilme podem retornar ao estilo de vida livre para completar o ciclo de desenvolvimento do biofilme (O'TOOLE *et al.*, 2000).

3.5.1 . A Formação de Biofilmes como Modo de Desenvolvimento Microbiano

Para determinar se a formação de biofilmes constitui uma forma de desenvolvimento microbiano, deve-se primeiro entender o termo 'desenvolvimento microbiano' (SHIMKETS & BRUN, 1999).

Os mesmos autores o definem como mudanças na forma e função que desempenham um papel proeminente no ciclo de vida do organismo. Talvez as mudanças na forma sejam refletidas nas mudanças nas relações entre indivíduos e grupos de células; isto é, a bactéria resiste a uma transição da forma livre para uma existência baseada em uma complexa comunidade de organismos, na qual os microrganismos devem integrar sinais interna e externamente, tomar substrato de seus vizinhos pela determinação de sua densidade e espécie e coordenar uma série de comportamentos multicelulares sincronizados que estão provavelmente associados às mudanças morfológicas.

Embora alguns conceitos gerais possam ser aplicados à formação de todos os biofilmes, existem muitos comportamentos específicos de determinadas espécies que refletem uma necessidade única de cada microrganismo. É importante, então, ter em mente, que a maioria dos biofilmes representa um consórcio de múltiplas espécies. As múltiplas espécies de biofilmes seguramente desenvolvem a habilidade de se comunicarem entre si e sugerem a possibilidade de organismos em particular que desempenham papéis especializados na comunidade (O'TOOLE *et al.*, 2000).

3.5.2 . Aspectos Físico-Químicos do Biofilme

A fase inicial no desenvolvimento do biofilme envolve a adsorção de compostos orgânicos sobre o material que será colonizado (TRULEAR & CHARACKLIS, 1982). Esta camada orgânica inicial, é um pré-requisito para a posterior adesão microbiana (BAIER, 1972; FLETCHER, 1980), tal adesão é fortemente influenciada pela carga de superfície e acontece imediatamente sobre as superfícies carregadas positivamente, mas pode ser retardada por várias horas se a carga for negativa. A duração desta fase de adesão vai depender de vários fatores: a natureza do suporte, a carga de superfície, a natureza e a concentração da alimentação, etc (BELKHADIR, 1986). A colonização inicial da superfície ocorre nas cavidades do suporte, o qual deve ter uma rugosidade favorável ao desenvolvimento do biofilme (TIJHUIS *et al.*, 1994).

A fase de crescimento é a soma das fases de reprodução celular e produção de polímero extracelular. Durante esta fase ocorre um rápido desenvolvimento do biofilme devido ao crescimento de microcolônias e da aderência de novas bactérias (CAPDEVILLE & NGUYEN, 1990), deste modo, ao final desta fase, a superfície estará totalmente coberta pelo biofilme, com uma complexa estrutura de agregados celulares (de BEER *et al.*, 1994). Esta fase de crescimento pode ser dividida em duas etapas: a primeira com um crescimento logarítmico do biofilme e a segunda com uma velocidade constante de acúmulo do biofilme, que continua até seu desprendimento parcial, onde um estado estacionário de espessura do biofilme é alcançado (APILANEZ *et al.* 2003).

IWAI & KITAO (1994) fazem uma comparação entre sistemas com crescimento disperso e com crescimento aderido, e os seguintes aspectos relativos ao crescimento aderido são ressaltados:

- O reator pode ser operado com tempos de detenção hidráulica inferiores ao tempo de geração celular;
- A concentração de biomassa ativa pode ser superior à de sistemas com crescimento disperso;
- A velocidade de remoção de substrato pode ser superior à de sistemas com crescimento disperso;
- A coexistência entre microrganismos aeróbios e anaeróbios é maior que nos sistemas de crescimento disperso, porque a espessura do biofilme é usualmente superior ao diâmetro do floco biológico;
- As células estão fixas à fase sólida, enquanto o substrato está na fase líquida. Esta separação reduz a necessidade ou os requisitos para o estágio de clarificação posterior;
- Os microrganismos são continuamente reutilizados. Nos sistemas com crescimento disperso a reutilização só pode ser implementada através da recirculação da biomassa;

LUBBERDING (1995), explica a diferença potencial entre a atividade da biomassa dispersa e aderida, e conseqüentemente da velocidade de remoção de substrato. Segundo o autor, a biomassa dispersa possui uma densidade próxima à do esgoto, movendo-se praticamente na mesma direção e velocidade que o mesmo no reator. Em decorrência a biomassa permanece exposta à mesma alíquota do líquido por um maior período de tempo, fazendo com que a concentração de substrato na vizinhança da célula seja baixa. Com baixas concentrações de substrato, a atividade bacteriana e a própria velocidade de remoção de substrato são mais baixas. Apenas à uma distância um pouco afastada da célula, a concentração de substrato é mais elevada. Considerando-se esta dependência entre concentração do substrato e atividade microbiana, torna-se evidente a importância representada pelo nível de mistura no reator.

Nos sistemas com biomassa aderida, a densidade do conjunto meio suporte-biomassa é bastante diferente da densidade do líquido no reator, possibilitando a existência de gradientes de velocidade entre o líquido e a camada

externa do biofilme. Como resultado, as células estão continuamente expostas a novos substratos, potencialmente aumentando a sua atividade (von SPERLING, 1996).

3.5.3 . Processo CANON em biofilmes

Segundo APILANEZ *et al.* (2003), o desenvolvimento de novos reatores biológicos tem sido realizado a fim de promover a formação de biofilmes com o objetivo de tratar efluentes e alcançar níveis superiores de purificação.

O processo CANON, que combina nitrificação parcial e processo anammox, tem sido aplicado com sucesso em reatores de biodiscos para remoção de amônio de efluentes em uma única etapa.

É apresentado na Figura 3.10 um esquema da estrutura espacial da comunidade microbiana e as principais reações de conversão de acordo com EGLI *et al.* (2003) que estudou a composição microbiana dos biofilmes de um reator de biodiscos rotativos utilizado no tratamento de efluentes da cidade de Kölliken, na Suíça, contendo altas concentrações de amônia (acima de 500 mg N-NH₄⁺.L⁻¹),.

A partir de determinações genéticas e moleculares, que serão discutidas posteriormente, os autores anteriormente referenciados encontraram que os principais grupos de microrganismos que constituíam o biofilme eram de bactérias oxidadoras de amônia do grupo *Nitrosomonas europaea* e *Nitrosomonas eutropha*; bactérias anaeróbias oxidadoras de amônia do tipo *Candidatus Kueneia stuttgartiensis*; bactérias filamentosas do filo Bacteroidetes e bactérias oxidadoras do nitrito do gênero *Nitrospira*.

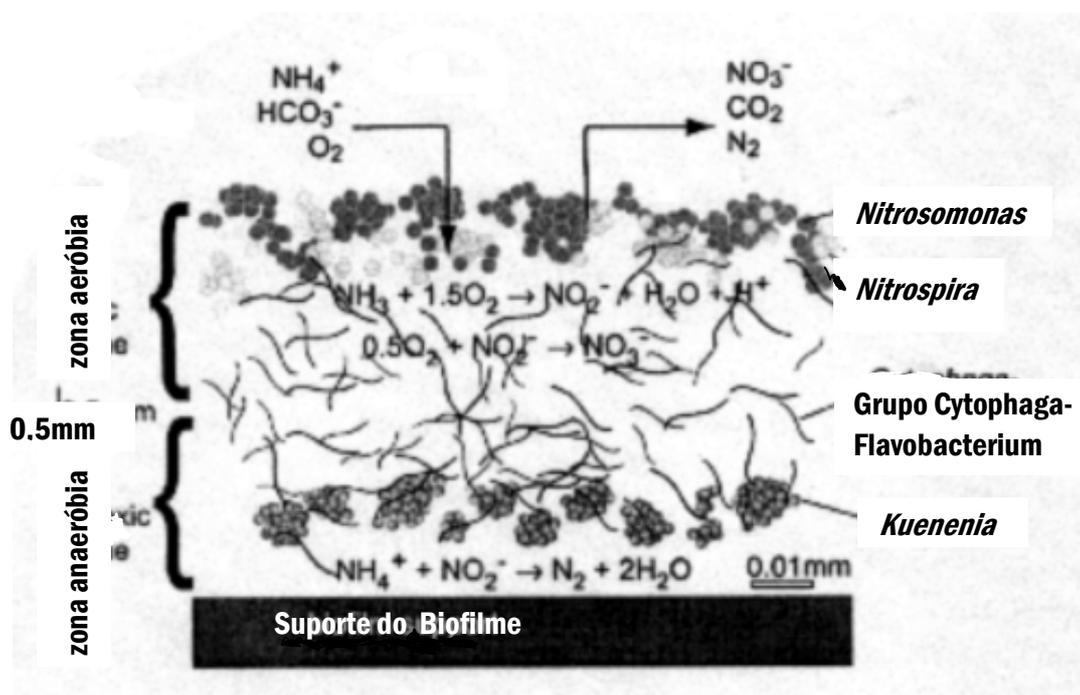


Figura 3.10: Desenho esquemático da estrutura da comunidade dos biofilmes no reator de biodiscos rotativos da cidade de Kölliken e as principais reações de conversão do nitrogênio (adaptada de EGLI *et al.*, 2003).

As bactérias oxidadoras de amônia aeróbicas e anaeróbicas estavam presentes em quantidades em torno de 20 a 30% da biomassa, enquanto que membros do filo *Bacterioidetes* estavam presentes em torno de 7%. Apenas uma pequena quantidade das bactérias oxidadoras de nitrito foi encontrada (menos de 5%).

A técnica de microscopia confocal permitiu observar a estrutura do biofilme representado na Figura 3.10, onde as bactérias nitrificantes aeróbicas estão localizadas na camada mais externa do biofilme em alta densidade formando aglomerados densos típicos, e as mesmas estavam intimamente próximas às oxidadoras de nitrito. As bactérias anammox estavam exclusivamente presentes apenas nas camadas mais profundas do biofilme. Estas observações auxiliaram no entendimento do modelo apresentado na Figura 3.11, no qual as BOA seriam responsáveis pela liberação de nitrito para as anammox que em camadas mais profundas (sem oxigênio) utilizam o nitrito para oxidar o amônio.

Segundo HAO *et al.* (2002), a espessura do biofilme influencia as conversões de nitrogênio quando a profundidade do biofilme é limitada, principalmente devido a um pequeno volume de biofilme anóxico limitando o espaço de crescimento dos organismos anammox.

Os mesmos autores, através de simulações com diferentes espessuras de biofilme realizadas em diferentes temperaturas e uma carga de amônio superficial de $2\text{g N-NH}_4^+/\text{m}^2\cdot\text{d}$, observaram que, com um aumento da espessura do biofilme, uma produção máxima de nitrogênio gasoso ocorreu junto com o aumento da concentração do OD do meio, revelando assim, que deveria haver uma espessura ótima do biofilme para se alcançar uma eficiência máxima de remoção de nitrogênio para cada temperatura. Isto é devido a que, um biofilme mais espesso, acima da profundidade ótima, não pode contribuir para melhorar a remoção de nitrogênio, em vez disso, uma concentração mais alta de OD é necessária. Ou seja, uma grande espessura de biofilme geralmente contém uma alta fração inerte e assim uma atividade volumétrica diminuída do mesmo, o qual vai precisar de uma concentração de OD maior para manter a mesma eficiência de remoção. Como conclusão, os autores estabeleceram que as condições ótimas para o estabelecimento do processo anammox em biofilmes pelo modelo estudado seria uma carga superficial superior a $2\text{g N}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$, associado a uma concentração de OD em torno de $1,3\text{ g O}_2\cdot\text{L}^{-1}$ no líquido e uma espessura de biofilme mínima de 1mm.

Os autores também concluíram que a temperatura afeta fortemente a espessura ótima do biofilme para que uma eficiência máxima de remoção seja alcançada. Temperaturas mais baixas requerem um biofilme mais espesso associado a uma concentração mais alta de OD no meio. A espessura exata necessária, está também, na realidade, associada à densidade do biofilme.

3.6 . CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO MICROBIANA EM REATORES BIOLÓGICOS

Os métodos utilizados para estudar a flora presente em sistemas complexos podem ser de dois tipos: métodos dependentes de cultivo, e métodos independentes de cultivo. Os primeiros são importantes pois permitem isolar e identificar os microrganismos presentes no sistema. No entanto, estima-se que apenas uma faixa percentual entre 1 a 15% da flora de lodos ativados seja possível cultivar por estes métodos, daí a importância fundamental da utilização das técnicas independentes de cultivo (AMMAN, 1995). Tais métodos são de

difícil aplicação para a flora nitrificante, pois estes microrganismos são autótrofos, apresentam baixa velocidade de crescimento e são de difícil cultivo.

Os métodos independentes de cultivo incluem medidas de atividade fisiológica e métodos de biologia molecular, baseados em extração de DNA e amplificação por PCR (polimerase chain reaction), ou métodos de hibridização *in situ* como o FISH (fluorescence *in situ* hybridization) (CABEZAS, 2005).

Dentre os métodos dependentes de cultivo utilizados para quantificar bactérias nitrificantes e desnitrificantes em lodos de sistemas de tratamento de efluentes, encontra-se o método do número mais provável (NMP).

O número mais provável (NMP), é um método de contagem no qual se realizam diluições da amostra e inoculação de séries de 3 ou 5 tubos em meio de cultivo líquido adequado. Os tubos são incubados a uma temperatura e tempo determinados e são tidos como positivos os tubos que apresentarem crescimento ou nos quais seja possível medir algum dos substratos ou produtos presentes no meio de cultivo. Utilizando-se uma tabela de NMP, entra-se com um número determinado pela quantidade de tubos positivos obtidos em cada série e obtém-se o número mais provável de microrganismos presentes na amostra (CABEZAS, 2005).

O método do número mais provável (NMP) permite estimar a densidade da população microbiana sem que seja necessária uma contagem individual das células ou colônias (ALEXANDER, 1982), tal método apresenta-se como um método bastante utilizado na quantificação de populações.

Entretanto, atualmente, os métodos de medida de atividades fisiológicas e as técnicas de biologia molecular têm sido amplamente utilizados para o estudo da microbiologia de sistemas de tratamento de efluentes. Permitem o estudo da composição, atividade, quantidade e diversidade das bactérias presentes na amostra.

Um dos grandes desafios atualmente é relacionar a presença de certas bactérias com sua atividade no ecossistema, pois tem-se tentado desenvolver metodologias que tendem a combinar a detecção de grupos de microorganismo e sua atividade *in situ* (PHILIPOT & HALLIN, 2005). O FISH é um exemplo destes métodos e tem sido utilizado para o estudo de bactérias nitrificantes e desnitrificantes em sistemas de tratamento de efluentes (GINIGE *et al.*, 2004).

3.6.1. Técnicas Moleculares

A recente utilização de novas abordagens, tal como a aplicação de técnicas moleculares, tem permitido o monitoramento *in situ* de comunidades microbianas de biofilmes. Tal monitoramento envolve a identificação de afiliações filogenéticas, determinação da distribuição espacial, elucidação de funções e atividades e estabelecimento da coordenação em comunidades microbianas de biofilmes (AOI, 2002).

As técnicas de “finger printing” para populações baseadas em análises do 16S rDNA são: ARDRA (amplified ribosomal DNA restriction analysis), DGGE ou TGGE (denaturing or temperature gradient gel electrophoresis) e T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism), e todas estas técnicas envolvem o isolamento do DNA, amplificação dos genes ou fragmentos destes que codificam para o 16S RNA por PCR (polimerase chain reaction) (de BEER & STOODLEY, 2005).

a) **PCR** (*polimerase chain reaction*): Algumas vezes chamada de “fotocópia molecular”, a polimerase chain reaction (PCR) é uma técnica rápida e de baixo custo, utilizada para amplificar ou copiar pequenos segmentos de DNA. Na realização de análises moleculares ou genéticas, normalmente são necessárias grandes quantidades de uma amostra de DNA, pois estudos de partes isoladas do mesmo são praticamente impossíveis de serem realizadas sem amplificação por PCR (de BEER & STOODLEY, 2005).

Para amplificar um segmento de DNA usando-se PCR, a amostra é inicialmente aquecida, causando desnaturação do DNA, ou separando-se em duas fitas. Posteriormente, uma enzima conhecida como “Taq polimerase”, sintetiza duas novas fitas de DNA, usando as fitas originais como temporárias. Este processo resulta na duplicação do DNA original, com cada uma das novas moléculas contendo uma fita nova e uma antiga do DNA. Depois cada uma destas fitas pode ser usada para criar duas novas cópias, e assim sucessivamente. O ciclo de desnaturação e síntese do novo DNA é repetido por 30 ou 40 vezes, resultando em mais de um bilhão de cópias exatas do segmento do DNA original. O ciclo completo do processo de PCR é automatizado e pode

ser completado em poucas horas em um termociclador, o qual é programado para alterar a temperatura de reação a cada poucos minutos permitindo a desnaturação e síntese do DNA (<http://www.genome.gov/10000207http>).

A amplificação do DNA em uma amostra por PCR é necessária se os microrganismos em questão estiverem presentes em número menor do que 10^6 /ml (AKKERMANS *et al.*, 1994). A técnica PCR é aplicável ao estudo de bactérias, fungos e vírus em amostras de solos, sedimentos, água, etc. (HAUGHLAND *et al.*, 1999).

b) **RFLP** (*restriction fragment length polymorphism*): esta técnica envolve a exposição do DNA à uma ou mais enzimas de restrição. Estas enzimas clivam o DNA em fragmentos com sequências específicas que variam em comprimento de 100 pares de base (pb) a 10 kpb. Tais fragmentos são separados por tamanho através de eletroforese por gel. Após a separação, um fragmento contendo uma sequência de bases específica pode ser identificada por hibridização com uma fita complementar marcada (sonda de DNA). Os fragmentos de restrição são então separados sobre um segundo gel agarose, desnaturados para formar fitas únicas de DNA e transferidos para uma folha de nitrocelulose. Uma autoradiografia é utilizada para identificar os fragmentos de restrição com uma sequência complementar àquela sonda de DNA (STRYER, 1988)

Uma limitação da análise por RFLP é que a mesma só pode ser utilizada para espécies únicas de microrganismos. Logo, a análise de populações mistas, a amostra deve ser primeiro separada por cultura, por PCR com primers específicos, ou por PCR e técnicas de clonagem. A aplicação de RFLP é mais adequada para análise de culturas isoladas de microrganismos, ou amostras com baixa biodiversidade (ATKINS, 2000).

c) **DGGE** (*denaturing gradient gel electrophoresis*): é uma técnica que pode ser usada para separar fragmentos de DNA de mesmo comprimento diferindo apenas em uma base. O princípio da técnica é que fragmentos de DNA com diferentes sequências de nucleotídeos desnaturam-se em diferentes graus na presença de um desnaturante químico em uma determinada concentração (uréia 7M e formamida 40% e temperatura de 50-60 °C). Quanto mais desnaturado o fragmento de DNA, mais baixa é a sua mobilidade eletroforética no gel de

poliacrilamida. Devido a que DGGE seja baseada em análises de sequências de ácidos nucleicos, ela é aplicável ao estudo de bactérias, vírus e fungos em qualquer ambiente no qual o DNA possa ser extraído. A sensibilidade da técnica depende da qualidade do DNA extraído da amostra e é similar àquela para PCR. Como DGGE requer o uso de PCR para amplificar o DNA presente, ela pode ser descrita como uma técnica semi-quantitativa (ATKINS, 2000).

d) **TGGE** (*Temperature Gradient Gel Electrophoresis*): é uma técnica similar à DGGE. No entanto, com TGGE a concentração de desnaturante químico permanece uniforme enquanto a temperatura do gel é aumentada gradual e uniformemente, de modo que, o DNA que passa sob o gel encontra-se gradualmente aumentando sua temperatura. A vantagem da TGGE sobre a DGGE é que como nenhum gradiente químico é necessário, é possível rastrear a amostra mais rapidamente (ATKINS, 2000).

e) **ARDRA** (*amplified rDNA restriction analysis*): Constitui-se em um método molecular quantitativo para análises rápidas de comunidades microbianas complexas. Na verdade trata-se de uma extensão da análise de RFLP, onde os rDNAs são obtidos por amplificação por PCR utilizando-se primers universal, o produto é digerido com enzimas de restrição com pontos de reconhecimentos de 4bp. ARDRA é mais utilizado na confirmação da presença de grupos filogenéticos específicos ou na estimativa de enriquecimento de espécies (LIU, 1997).

f) **FISH** (*fluorescent in situ hybridization*): A técnica FISH foi desenvolvida recentemente e consiste em uma poderosa ferramenta na quantificação de populações em uma comunidade microbiana e também para determinação da distribuição espacial das populações em diferentes níveis taxonômicos.

O método é baseado na hibridização de sondas marcadas com um radioisótopo como ³²P para uma parte específica do 16S rRNA de uma bactéria. Uma sonda consiste de 15 a 30 nucleotídeos (bases), complementares ao DNA de interesse, denominado DNA-alvo, e é marcada com um agente corante fluorescente que permite a visualização microscópica das células de um dado tipo

de bactéria. As sondas são empregadas para identificar qual dos clones de uma biblioteca ou qual banda de um gel contém o DNA-alvo (PASSAGLIA & ZAHA, 1996). Um esquema da técnica é apresentado na Figura 3.11.

A grande vantagem deste método é a sensibilidade, rapidez, baixo custo e sua aplicação direta sobre a amostra sem as restrições que implicam o cultivo e a extração do DNA e a amplificação por PCR. A limitação desta técnica é encontrar sondas que permitam avaliar grupos microbianos de interesse para o estudo da comunidade.

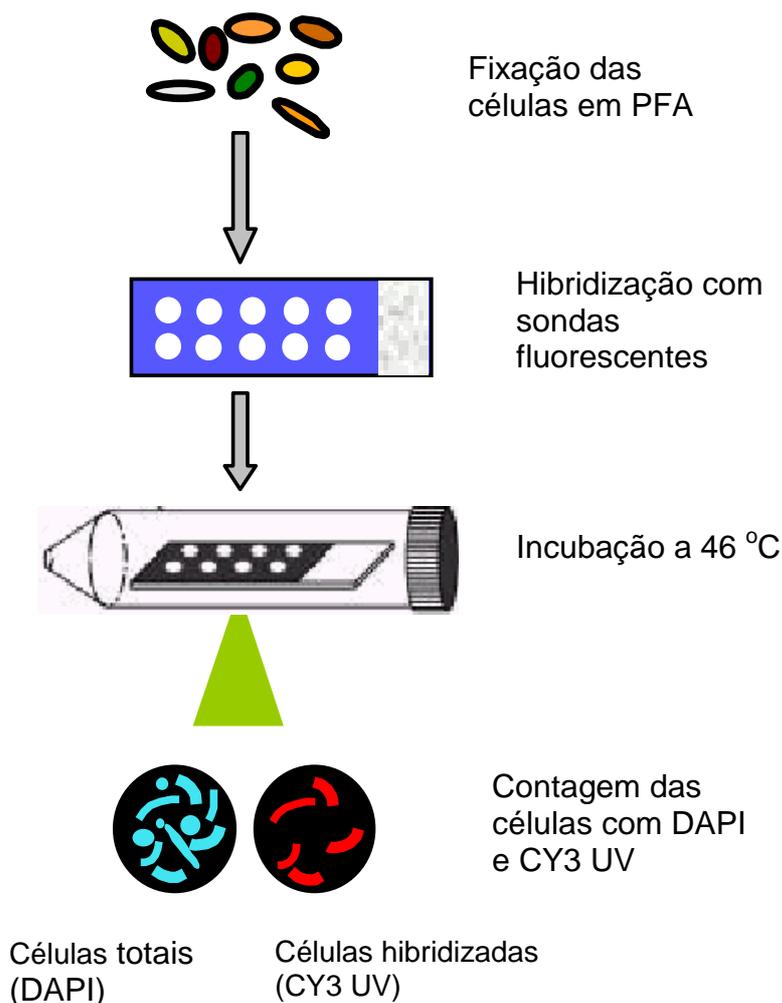


Figura 3.11: Representação esquemática da técnica empregada para análise FISH (Fonte: KIELING, 2004).

O termo hibridização *in situ* refere-se ao fato de que as células individuais podem ser observadas em seu habitat natural e portanto o FISH fornece mais informações do que a hibridização dot-blot, pois além de informar o número de

microrganismos cultiváveis e não cultiváveis, informa também sobre a morfologia e distribuição espacial (AMANN, 1995).

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

4 . MATERIAL E MÉTODOS

4.1 . SISTEMA EXPERIMENTAL DE REATORES DE BIODISCOS ROTATIVOS

O sistema utilizado no trabalho, consistiu de três reatores de biodiscos construídos em um mesmo bloco, operados em paralelo de forma individual. Cada reator consiste de um tubo de PVC de 50 cm de comprimento e 21cm de diâmetro, cortado ao meio transversalmente ao longo de todo o seu comprimento formando uma calha, fixada em duas placas retangulares de PVC nas suas extremidades. Uma haste de aço inox foi apoiada nestas extremidades retangulares servindo como suporte aos biodiscos e como eixo giratório. A Figura 4.1 apresenta um desenho esquemático do reator.

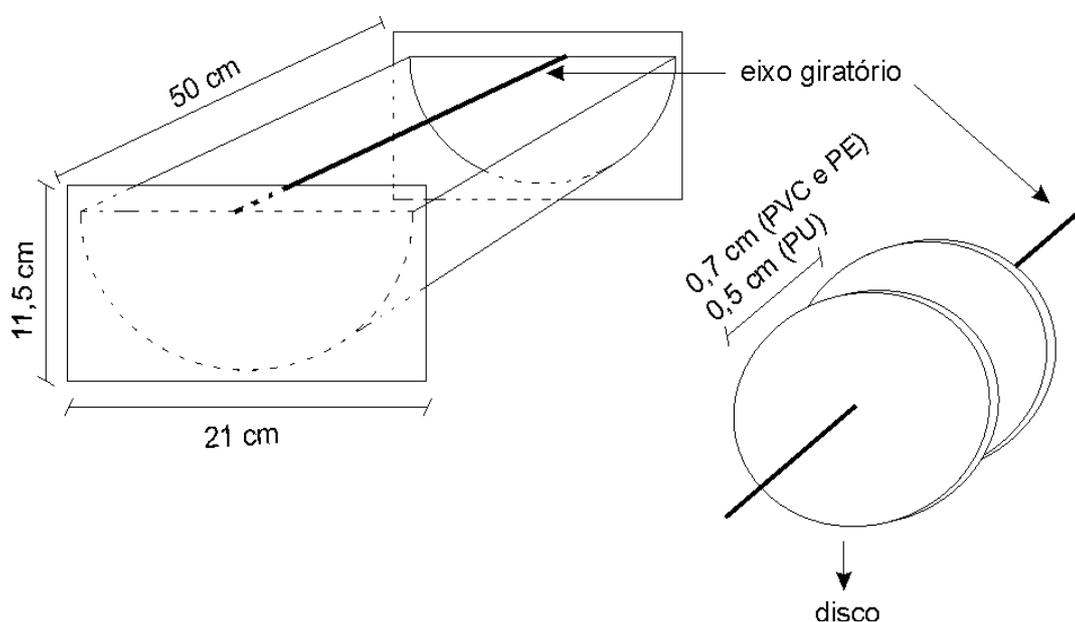


Figura 4.1: Desenho esquemático de um reator do sistema de reatores de biodiscos rotativos utilizado nos experimentos.

Os três reatores foram fixados entre si por meio de barras em alumínio formando um retângulo, constituindo um sistema único, permitindo assim, que um pequeno

motor acoplado através de um anel de borracha a um sistema de polias, onde cada uma destas está fixada à extremidade do eixo de cada módulo, faça girar os conjuntos de discos dos três reatores à uma mesma velocidade. Um controlador de velocidade foi adaptado ao sistema com a finalidade de se poder ajustar a rotação dos discos, quando necessário. A Figura 4.2 apresenta uma fotografia do sistema com os três reatores.

A diferença entre os reatores está no material suporte utilizado na confecção dos discos. No módulo 1 os discos são de cloreto de vinila (PVC), no módulo 2 de poliestireno (PS) e no módulo 3 de poliuretano (PU). As características dos três reatores podem ser conferidas na Tabela 4.1 e maiores detalhes sobre os materiais dos biodiscos encontram-se descritos no item 4.2.



Figura 4.2: Sistema de reatores de biodiscos rotativos construídos em PVC, PS e PU.

A alimentação de cada um dos reatores foi realizada através de bomba peristáltica, cuja vazão era medida e controlada.

Os reatores eram alimentados diariamente com meio sintético, conforme descrito no item 4.4, mantendo-se o pH entre 7,5 e 8,5, pelo ajuste desta com bicarbonato de sódio. A temperatura de operação foi a ambiente, a qual variou entre 18 e 28 °C durante o período de realização dos ensaios. A velocidade de rotação dos discos em todos os reatores foi fixada em 2rpm.

Tabela 4.1: Características dos reatores RBR

	PVC	PS	PU
Volume (L)	4,73	4,73	4,73
Nº. de discos	40	40	25
Espaç. entre discos (cm)	0,7	0,7	0,5
Diâmetro dos discos (cm)	17	17	14
Espessura dos discos (mm)	3	3	10
Área superf. de 1 disco (m ²)	0,045	0,045	0,031
Área superf. por módulo (m ²)	1,8	1,8	0,775
Área Submersa (%)	42	42	39

4.2 . MATERIAIS SUPORTE

Alguns critérios como peso do material, porosidade, toxicidade e custo foram avaliados para a escolha do material dos discos. Levando-se em conta tais critérios, os materiais selecionados foram poliestireno (PS), cloreto de polivinila (PVC) e poliuretano (PU).

As placas de PVC e PS foram cortadas em formato circular, no diâmetro estabelecido (apresentado na Tabela 4.1), e em seguida, lixadas, tornando a superfície destes materiais mais áspera, afim de conferir-lhes uma maior rugosidade, permitindo aos microrganismos uma melhor adesão.

Para a obtenção das placas de poliuretano, foi necessário, inicialmente, realizar-se a expansão do polímero em tubo de PVC. O polímero foi obtido a partir da reação entre dois compostos químicos: um poliisocianato e um poliál. Tomou-se, então, separadamente, 200 mL de cada um dos dois compostos líquidos, misturando-os com vigorosa e rápida agitação em uma garrafa plástica de 500 mL de volume. Esta mistura foi transferida imediatamente para um tubo de PVC, pois a reação química ocorre quase que instantaneamente, aguardando-se, assim, a sua completa expansão, para finalmente, cortar-se os discos na espessura desejada utilizando-se para isto uma serra tipo fita.

4.3 . INÓCULO

O inóculo utilizado para iniciar os reatores foi proveniente do sistema de lodos ativados para tratamento de esgoto doméstico da Companhia de Saneamento do Estado de Santa Catarina (CASAN - Insular).

A caracterização do inóculo foi realizada através dos seguintes testes: determinação da atividade nitrificante do lodo, concentração de sólidos suspensos voláteis (SSV), avaliação microbiológica de bactérias nitrificantes pelos métodos do número mais provável (NMP) e fluorescence in situ hybridization (FISH). Tais testes serão descritos detalhadamente mais adiante.

Ao se inocular os reatores, uma razoável quantidade de lodo ficou depositada no fundo destes, mesmo após a constatação visual da formação de uma fina camada de biofilme aderido às placas. Sabe-se, pois, que este material celular de fundo, contém uma grande quantidade de células mortas, que poderia vir a ser utilizada como fonte de carbono para as bactérias heterotróficas, tornando possível, assim, a remoção de nitrogênio pelo processo heterotrófico, processo este, não desejado para os objetivos deste trabalho. Além disso, este lodo poderia apresentar, também, atividades nitrificante e desnitrificante autotrófica, que se somaria às mesmas atividades desenvolvidas pelas células aderidas aos biodiscos.

Com o objetivo de efetuar-se uma análise do desempenho dos reatores apenas pelos microrganismos aderidos aos biodiscos, procedeu-se a uma remoção periódica do lodo acumulado no fundo dos reatores.

Inicialmente, após 13 dias de operação dos reatores, foram inseridas bombas de sucção (bombas de aquário) dentro destes, por um período de cinco dias, a fim de manter o material do fundo em suspensão, sendo lentamente eliminados na saída do efluente, sem que fosse necessário a retirada do conjunto de discos do reator.

Após alguns ajustes, foi possível a remoção do conjunto de discos dos reatores por um curto período de tempo, podendo-se homogeneizar o conteúdo de fundo dos mesmos, retirar uma amostra de cada um deles, realizar-se uma análise de SST e remover-se, logo após, todo o lodo depositado, trazendo-se novamente os conjuntos de discos para dentro dos reatores. Tais remoções e

determinações de SST do fundo foram realizadas no tempo de operação especificado, de acordo com o esquema apresentado na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Tempo de operação dos reatores em que foi removido todo o lodo depositado no fundo e realizadas análises de SST (X = sim; -- = não).

Tempo (dias)	Remoção de Mat. de fundo	Determinação de SST
52	X	--
108	X	--
229	X	x
320	X	x
461	X	x
624	X	x
804	X	--

A determinação de SST no fundo dos reatores foi realizada com o intuito de verificar-se, qual dos materiais utilizados (PVC, PS e PU), apresentava uma melhor adesão dos microrganismos, pois, ao longo do período de funcionamento dos reatores, observou-se que, em alguns momentos, havia desprendimento dos biofilmes aderidos às placas, onde os mesmos voltavam a se formar após algum tempo. Tal constatação era possível de ser realizada visualmente, e foi mais evidente em um dos materiais. Este fato será discutido adequadamente no próximo capítulo.

4.4 . MEIO PARA ALIMENTAÇÃO

O meio utilizado para alimentação diária dos reatores, era preparado com água de torneira como diluente, tratando-se de um meio nitrificante autotrófico proposto por CAMPOS *et al.*, (1999), cuja formulação está apresentada nas Tabelas 4.3 e 4.4. A solução de micronutrientes necessita, ao final, de um ajuste de pH para que este permaneça no valor de 6.0.

Tabela 4.3: Composição do meio autotrófico nitrificante

Reagentes	Conc. (mg.L ⁻¹)	Conc. (mmol.L ⁻¹)
(NH ₄) ₂ SO ₄	1047	7,93
NH ₄ Cl	850	15,9
KH ₂ PO ₄	222	1,63
MgSO ₄	53	0,44
NaCl	889	15,2
NaHCO ₃	4444	52,9
Sol. de micronutrientes	0,5ml.L ⁻¹	-

Fonte: CAMPOS *et al.* (1999)

Tabela 4.4: Composição da solução de micronutrientes

Reagentes	Conc.(mg.L ⁻¹)	Conc (mmol.L ⁻¹)
EDTA	50000	134,3
FeSO ₄	2728	17,9
ZnSO ₄	12354	76,5
CaCl ₂	5540	50
MnCl ₂	3220	25,5
CuSO ₄	1004	6,3
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	1036	0,89
CoCl ₂	880	3,7

Fonte: CAMPOS *et al.* (1999)

4.5 . PARTIDA E OPERAÇÃO DOS REATORES

Adicionou-se 5 litros de lodo CASAN insular em cada um dos reatores, de forma que a concentração de SST fosse de $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, em cada reator. A rotação dos discos foi iniciada, e durante 3 dias os reatores não foram alimentados, afim de se permitir uma maior adesão dos microrganismos aos discos. Após o 3º. dia, iniciou-se a alimentação diária dos reatores com meio sintético.

O pH nos reatores foi controlado através da adição de bicarbonato de sódio ao meio, onde o mesmo, além de controlar o pH, através de seu poder tamponante, cumpre também o papel de fonte de carbono inorgânico para os microrganismos autotróficos. Diariamente, o pH foi medido na saída dos reatores e no meio de alimentação, e dependendo da necessidade, aumentava-se ou diminuía-se a quantidade de bicarbonato nos mesmos.

As amostras para análise do desempenho dos reatores foram colhidas duas a três vezes por semana, retirando-se, um volume de amostra em torno de 30 ml, tanto do meio de alimentação como da saída dos reatores, para análise da série nitrogenada (amônio, nitrato e nitrito) e posteriormente também de DQO.

A temperatura nos reatores foi medida na ocasião de retirada das amostras.

Um acompanhamento da concentração de oxigênio dissolvido foi realizado periodicamente em cada etapa de operação (item 4.7.5) dos reatores, ora apenas na saída dos mesmos, ora ao longo destes, em pontos fixos, previamente determinados, os quais serão descritos posteriormente.

4.6 . CARGAS APLICADAS AOS REATORES

As cargas superficiais aplicadas aos reatores foram calculadas do seguinte modo:

$$\text{Carga superficial (mg N}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}) = \frac{C \times Q}{A} \quad (4.1)$$

onde:

C = Concentração do meio de alimentação ($\text{mg N-NH}_4^+\cdot\text{L}^{-1}$)

Q = Vazão de alimentação aplicada em cada reator ($\text{L}\cdot\text{d}^{-1}$)

A = Área de superfície total dos discos (m^2)

A carga pode ser expressa também como carga hidráulica em $mg\ N:L^{-1}.d^{-1}$. Neste caso, ao invés de se utilizar a área de superfície total dos discos, no cálculo, utiliza-se o volume do reator (L).

Sendo que, o tempo de retenção hidráulica (TRH):

$$TRH\ (dia) = \frac{V}{Q} \quad (4.2)$$

Onde:

V = Volume do reator (L)

Q = Vazão de alimentação ($L.d^{-1}$)

Ao longo do período de operação dos reatores, o aumento progressivo de carga foi realizado, tanto por aumento da concentração do meio de alimentação, como por redução do tempo de retenção hidráulica (TRH).

Afim de facilitar a compreensão, e melhor sistematizar os períodos de aplicação das diversas cargas, convencionou-se, que, cada período de operação em uma determinada carga seria denominado de “etapa”. Detalhes sobre as condições de processo nas diferentes etapas de operação dos reatores estão apresentados no próximo capítulo: Resultados e Discussão.

4.7 . ACOMPANHAMENTO DOS REATORES

Os testes realizados para o acompanhamento do desempenho dos reatores foram os seguintes: medidas de pH, temperatura, medição das concentrações de NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- , no meio de alimentação e na saída, Sólidos Suspensos Totais (SST), Número Mais Provável (NMP), Fluorescence in Situ Hybridization (FISH), Microscopia Ótica, Microscopia Eletrônica, Perfis de consumo de substrato e de Oxigênio Dissolvido ao longo dos reatores.

Medidas de pH: As medições de pH foram realizadas através de medidas potenciométricas utilizando-se um eletrodo combinado de vidro e prata/cloreto de prata. O pHmetro marca QUIMIS, modelo Q400A, foi calibrado com soluções tampão de pH 7.0 e 4.0, de acordo com metodologia indicada em APHA, (1995).

Determinação da Concentração Celular (Sól. Suspensos Totais): Foram determinados segundo a metodologia indicada por OLSSON & NIELSEN (1997), onde utilizava-se papel de filtro qualitativo, seco em microondas por 15 minutos na potência de 180 Watts e imediatamente pesados ao final deste tempo. Em seguida filtrava-se à vácuo um determinado volume de amostra neste papel, e levava-o novamente ao microondas nas mesmas condições de secagem do papel (15 min., 180 Watts). Pesava-se novamente o papel contendo o material seco, e pela razão entre a diferença de peso pelo volume de amostra utilizado, obtinha-se o valor final em gSST.L⁻¹.

4.7.1 . **Determinação dos íons nitrogenados**

A determinação dos íons amônio (NH₄⁺), nitrito (NO₂⁻) e nitrato (NO₃⁻) foi realizada em espectrofotômetro da marca HACH, modelo DR 2000.

a) *Determinação de Amônia (NH₄⁺):* Utilizou-se o método de Nessler para determinação da amônia, de acordo com VOGEL (1981). As amostras foram lidas em comprimento de onda 525 nm.

b) *Determinação de Nitrato (NO₃⁻):* O comprimento de onda para leitura das amostras foi 410 nm, e utilizou-se o método do ácido salicílico, de acordo com a metodologia descrita em CATALDO *et al.*, (1975).

c) *Determinação de Nitrito (NO₂⁻):* Foi realizada através de kits Hach (Nitriver 2), onde o nitrito é reduzido, em meio ácido, a óxido nitroso na presença de sulfato ferroso. O óxido é, então, convertido em um composto colorido pela reação com o cádmio, permitindo a leitura espectrofotométrica em comprimento de onda 585 nm.

4.7.2 . Determinação da Atividade Nitrificante

A atividade nitrificante do lodo foi medida através de ensaios respirométricos, determinando-se alguns parâmetros cinéticos do lodo, tais como $\mu_{\text{máx}}$ e K_s . Para os ensaios respirométricos, os seguintes passos foram seguidos:

- Lavagem do Lodo: Tomou-se aproximadamente 1 litro do lodo trazido da estação de tratamento de esgotos e filtrou-se. O material retido no filtro foi removido para um becker e adicionou-se, então, cerca de 500 ml de água destilada, agitou-se levemente o lodo, e novamente filtrou-se. A lavagem foi realizada diversas vezes até que não apresentasse resíduos das formas nitrogenadas dissolvidas (amônia, nitrato e nitrito) no sobrenadante.
- Ajuste da Concentração de SST: Após a lavagem, o lodo filtrado foi suspenso em solução de macro e micro nutrientes, de acordo com CAMPOS *et al.* (1999), conforme Tabelas 4.3 e 4.4, sem a adição de cloreto e sulfato de amônio. O volume final foi ajustado para 230 mL e a concentração de SST em torno de 1g.L^{-1} .
- Aeração: A aeração do meio foi realizada com ar comprimido percorrendo através de uma fina mangueira de silicone com uma pedra difusora em forma cilíndrica fixa em sua extremidade.
- Ajuste do pH e Temperatura: A suspensão acima descrita, foi transferida para um erlenmeyer de 250 mL, onde ajustou-se o pH em 7.5, utilizando-se NaOH ou HCl, de acordo com as necessidades. O erlenmeyer foi colocado sobre um agitador magnético com controle de agitação e temperatura, permitindo, assim, que esta fosse mantida em $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante todo o período de duração do teste.
- Montagem do Equipamento: um erlenmeyer adaptado com dois orifícios laterais; um para conter o eletrodo para controle do pH e temperatura, e outro para conter o eletrodo de medição de oxigênio dissolvido foi utilizado para realizar o ensaio. Pelo orifício superior do erlenmeyer o líquido era aerado com auxílio de ar comprimido e uma pedra difusora. E pela parte superior também eram realizadas as retiradas de amostra e adição de soluções para controle do pH, etc.

- O teste foi iniciado aerando-se o meio até que a concentração de OD deste atingiu um valor próximo à saturação (em torno de $7.0 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$). A aeração foi, então, interrompida e imediatamente procedeu-se a leitura do consumo de oxigênio dissolvido na ausência de substrato em intervalos de tempo fixados, obtendo-se, assim, a medida da respiração endógena dos microrganismos.
- Em seguida, iniciou-se o fornecimento de pulsos de amônio, de modo que a concentração de N-NH_4 no erlenmeyer alcance valores crescentes em torno de 1, 5, 10, 15, 20 $\text{mg N-NH}_4\cdot\text{L}^{-1}$. Os pulsos foram adicionados até que se percebesse uma diminuição na velocidade do consumo de OD, evidenciando-se, assim, uma inibição pelo substrato.
- Ao se adicionar o pulso, a aeração era suspensa e iniciada a leitura do consumo de OD em função do tempo. Quando esta atingia valores em torno de 30% da C_s (concentração de oxigênio dissolvido na saturação), retornava-se a aeração do líquido.
- No momento em que adicionava-se a solução de amônio (pulso), aguardava-se alguns segundos para que houvesse a homogeneização do meio, e retirava-se um volume de amostra (5 ou 10 mL) para análise da concentração de N-NH_4^+ , retornando-se igual volume de líquido (meio Campos) para o erlenmeyer, afim de não haver modificação no volume. A amostra era filtrada, e as células, removidas do filtro e inseridas novamente no meio para evitar a modificação da concentração celular.

A velocidade de consumo de oxigênio para cada concentração de amônio (Q_{O_2X}) foi determinada, medindo-se a inclinação da reta obtida no gráfico da concentração de OD ($\text{mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$) em função do tempo (em segundos). O valor da respiração endógena era descontado na obtenção do valor de Q_{O_2X} , que dividindo-se pelo valor da concentração celular do meio (X), e utilizando-se o fator estequiométrico de consumo de oxigênio e amônio ($4,25 \text{g O}_2\cdot\text{gN-NH}_4^{-1}$), conforme equação 3.8, obtém-se a velocidade específica de consumo de substrato ($\text{mg N-NH}_4\text{gSST}^{-1}\cdot\text{x}^{-1}$).

4.7.3 . Obtenção dos parâmetros cinéticos da biomassa

Para a obtenção dos parâmetros cinéticos das biomassas estudadas, foram utilizados os valores das velocidades de consumo de oxigênio $Q_{O_2}X$, conforme acima descrito, em função da concentração de substrato dos pulsos, no software *Statistic 6.0*, aplicando-se uma regressão não linear para ajuste dos dados à Equação 4,10, obtida a partir do modelo proposto por Andrews (Eq. 4.3), pelo método dos mínimos quadrados, pela metodologia Quasi-Newton, determinando-se, então, os valores de K_s e K_i . A seguir, apresenta-se o modo como a Eq. 4.10 foi obtida, partindo-se do modelo proposto por Andrews (Eq. 4.3):

$$\mu = \mu_{\max}^* \frac{S}{S + K_s + S^2 / K_i} \quad (4.3)$$

Neste modelo, a definição do parâmetro μ_{\max} , refere-se ao valor máximo de velocidade na ausência de inibição, isto implica que, quanto maior o nível de inibição mais super estimado será o seu valor. Assim, o autor propõe uma correção deste valor pela Equação 4.4:

$$\mu_{\max} = \frac{\mu_{\max}^*}{1 + 2 \cdot \sqrt{\frac{K_s}{K_i}}} \quad \therefore \quad \mu_{\max}^* = \mu_{\max} \left[1 + 2 \sqrt{\frac{K_s}{K_i}} \right] \quad (4.4)$$

Substituindo-se μ_{\max}^* (Equação. 4.4) na Equação 4.3 tem-se:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S + S^2 / K_i} \left[1 + 2 \sqrt{\frac{K_s}{K_i}} \right] \quad (4.5)$$

A Equação 4.5 pode ser rearranjada do seguinte modo:

$$\frac{\mu}{\mu_{\max}} = \frac{S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}} \left[1 + 2 \sqrt{\frac{K_s}{K_i}} \right] \quad (4.6)$$

Se m_0 for desprezível na Equação 4.7 a seguir:

$$Q_{o_2} = m_0 + \frac{1}{y_{x/o}} \cdot \mu \quad (4.7)$$

Tem-se então:

$$Q_{o_2} = \frac{1}{y_{x/o}} \cdot \mu \quad \therefore \quad Q_{o_{2\max}} = \frac{1}{Y_{x/o}} \cdot \mu_{\max} \quad (4.8)$$

Multiplicando-se a Equação 4.8 pela concentração celular:

$$Q_{o_{2\max}} \cdot X = \frac{\mu_{\max}}{Y_{x/o}} \cdot X \quad (4.9)$$

Por outro lado:

$$\frac{\mu}{\mu_{\max}} = \frac{\frac{\mu \cdot X}{Y_{x/o}}}{\frac{\mu_{\max} \cdot X}{Y_{x/o}}} = \frac{Q_{o_2} \cdot X}{Q_{o_{2\max}} \cdot X}$$

Portanto:

$$\frac{Q_{o_2} X}{Q_{o_{2\max}} X} = \frac{S}{K_s + S + S^2 / K_i} \cdot \left[1 + 2 \cdot \sqrt{\frac{K_s}{K_i}} \right] \quad (4.10)$$

Os mesmos dados foram testados para o modelo cinético proposto por Monod, apresentado na Equação 4.11, abaixo, determinando-se, então, os valores de K_s e μ_{\max} .

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \quad (4.11)$$

4.7.4 . Ensaio de Atividade

Os testes para verificação de atividade compreenderam: a) testes anaeróbios, que tiveram como objetivo verificar se havia remoção anaeróbia nos reatores. b) Testes aeróbios, para constatação de remoção aeróbia.

- a) Teste Anaeróbio: Este teste foi realizado aos 899 dias de operação dos reatores. O biofilme foi removido da 5^a. placa dos reatores PVC e PS e da 3^a. placa do reator PU. As concentrações de N-NH_4^+ e N-NO_2^- utilizadas no teste foram de 100 mg.L^{-1} e 25 mg.L^{-1} , respectivamente.
- b) Testes Aeróbios: foram realizados aos 899 dias de operação dos reatores, onde, caso não fosse observado remoção de nitrogênio durante o teste anaeróbio, injetava-se 50 cm^3 de ar nos mesmos frascos utilizados para os testes anaeróbios realizando-se o acompanhamento da série nitrogenada nos intervalos abaixo estipulados.

As concentrações de sólidos utilizadas nos testes foram: $3,32 \text{ g SST.L}^{-1}$ (PVC), $2,75 \text{ g SST.L}^{-1}$ (PS) e $2,72 \text{ g SST.L}^{-1}$ (PU). Os testes foram realizados em triplicata, o volume das amostras foi de 25 ml. Utilizou-se meio macro mais micronutrientes de acordo com CAMPOS *et al.* (1999), conforme Tabelas 4.3 e 4.4. O pH foi ajustado para 7,5 e utilizou-se um tampão para mantê-lo neste valor durante todo o teste. A temperatura foi mantida em 35°C . As amostras foram retiradas nos tempos 0h, 24h, 48h, 72h.

4.7.5 . Perfil de Consumo de Substrato, pH e OD ao Longo dos Reatores

Este teste foi utilizado com o objetivo de verificar-se como se desenvolvia o consumo de substrato e formação de produtos ao longo dos reatores. A coleta de amostras para o teste era realizada sempre com os reatores em funcionamento. Para isto, foram marcados pontos fixos nos reatores a partir do ponto de alimentação, os quais foram: 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45cm. Com o auxílio de uma seringa acoplada a uma pequena mangueira de silicone em sua ponta, a amostra era retirada por sucção. A seringa era posicionada sempre em uma mesma altura de líquido dentro dos reatores, e um volume de amostra em

torno de 30 mL era succionado, o qual era filtrado e analisados os íons nitrogenados: N-NH_4 , N-NO_2^- e N-NO_3^- . Na mesma ocasião, também era realizado um perfil de pH em todas as amostras retiradas dos pontos anteriormente descritos.

A concentração de oxigênio dissolvido ao longo dos reatores também foi determinada, e para isto, utilizou-se um oxímetro digital portátil, marca WTW, modelo OXI340 set.

Devido à limitações práticas, causadas pelo pequeno espaço lateral disponível nos reatores de PVC e PS, não foi possível inserir-se a sonda diretamente no reator. Utilizou-se, novamente, a seringa com mangueira de silicone presa em sua ponta, da mesma maneira como realizado para o perfil de consumo de substrato, onde imergia-se a seringa no fundo do reator, desta vez, retirando-se o líquido até que o êmbolo fosse removido da seringa, evitando-se o máximo, contato do líquido com o oxigênio do ar. No momento em que o êmbolo era removido, imediatamente imergia-se a sonda para medição do OD. A medida de OD foi realizada em três pontos de cada reator, os quais são: 5, 25 e 45cm.

No reator de PU, no entanto, os discos eram menores e isto permitia a inserção da sonda diretamente no líquido nestes pontos. Porém, para efeito de comparação dos dados entre os três reatores, mediu-se o OD no reator PU das duas maneiras: medindo-o do líquido retirado do reator com a seringa, e também, inserindo-se diretamente a sonda no interior do reator, nas mesmas distâncias utilizadas para medição nos outros reatores: 5, 25 e 45cm.

4.8 . CÁLCULOS EFETUADOS

$$\% \text{ Remoção} = 100 - \left[\frac{[\text{N-NH}_4]_o - [\text{Ntotal}]}{[\text{N-NH}_4]_o} \times 100 \right]$$

Onde:

$[\text{N-NH}_4]_o$ = Concentração de nitrogênio amoniacal do meio de alimentação

[N-total] = Soma das concentrações de N-NH₄, N-NO₂ e N-NO₃ na saída dos reatores

$$\% \text{ de Amônio Oxidado} = \frac{[\text{N-NH}_4]_o - [\text{N-NH}_4]}{[\text{N-NH}_4]_o} \times 100$$

4.9 . ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Para verificar as características microbiológicas do inóculo e para acompanhar as modificações ocorridas na microbiota em cada um dos reatores de biodiscos, foram utilizadas técnicas microbiológicas convencionais como o NMP, técnicas de biologia molecular (FISH) e microscópicas.

4.9.1 . Determinação do Número Mais Provável

As análises de NMP foram realizadas no inóculo e após 319 e 460 dias de operação. O material para a análise foi coletado da 5^a. placa dos reatores PVC e PS e 3^a. placa do reator PU.

A metodologia utilizada será descrita aqui, em detalhes, por tratar-se de uma adaptação do método proposto para análise em solos por ALEXANDER & CLARK (1982).

a) Número mais Provável de Bactérias Oxidadoras de Amônia (BOA)

Meio de Amônia-carbonato de cálcio para BOA: Adiciona-se 1L de água destilada para 0,302g de (NH₄)₂SO₄; 1,0g de K₂HPO₄; 0,03g de FeSO₄.7H₂O; 0,3g de NaCl; 0,3g de MgSO₄.7H₂O; 3,33g de CaCO₃. Transfere-se daí 3 mL para tubos de ensaio e esteriliza-se em autoclave.

Reagente de Griess-Ilosvay: Dissolve-se 0,6g de ácido sulfanílico em 70 mL de água destilada quente. Resfria-se a solução e adiciona-se 20 mL de HCl

concentrado, diluindo-se a seguir a mistura para 100 mL com água destilada e misturando-se bem. Dissolve-se 0,6g de alfa-naftilamina em 10 a 20 mL de água contendo 1mL de HCl concentrado, diluindo-se em seguida para 100 mL com água. Dissolve-se 16,4g de $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ em água e completa-se o volume da solução para 100 mL com água. As soluções foram acondicionadas em vidros escuros, separadamente, e estocadas sob refrigeração.

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

Os testes em branco foram preparados com água destilada.

Procedimento:

A amostra do lodo foi coletada dos discos, raspando-se com uma pequena espátula, diluída e homogeneizada para, em seguida, realizar-se uma análise de SST afim de expressar os resultados, no final. Posteriormente, agitou-se a mesma com pérolas de vidro, desagregando-se ao máximo o biofilme. Preparou-se diluições em série, transferindo-se alíquotas de 1mL para cada um dos cinco tubos contendo meio estéril, a partir da diluição mais alta. Tal procedimento foi repetido para as outras quatro diluições mais baixas. Os tubos inoculados foram incubados por 3 semanas a 28 °C, juntamente com uma seqüência de tubos não inoculados (brancos), utilizados como controle.

Após o período de incubação, realizou-se o teste para nitrito, em cada tubo, utilizando-se o reagente de Griess-Ilosvay. Inicialmente, foram misturadas partes iguais dos três reagentes e adicionou-se três gotas da mistura na cultura a ser testada. O aparecimento da cor vermelho-púrpura em poucos minutos, indicava a presença de nitrito, evidenciando, assim, teste positivo para nitrito. Nos tubos que não apresentaram resultado positivo, realizava-se o teste para nitrato, adicionando-se uma gota do reagente de difenilamina. O aparecimento de uma cor azul demonstrava teste positivo para *Bactérias Oxidadoras de Amônia* (BOA), significando que o nitrito produzido pelas BOA havia sido convertido pelas *Bactérias Oxidadoras de Nitrito* (BON) em nitrato. Os mesmos testes eram realizados também para os tubos controle (brancos), caso desse positivo para

nitrito ou nitrato, isto significaria alguma contaminação e o resultado obtido deveria ser desprezado.

Utilizando-se a tabela de ALEXANDER & CLARK (1982), determinava-se o NMP para BOA.

b) Número Mais Provável de Bactérias Oxidadoras de Nitrito (BON)

Meio Nitrito-carbonato de cálcio para BON: utiliza-se a mesma formulação do meio nitrito-carbonato para Bactérias Oxidadoras de Amônia (BOA), utilizando-se 0,006g de KNO_2 em vez de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. O procedimento para as diluições e esterilização também é igual ao utilizado para o meio BOA.

Procedimento:

O procedimento utilizado aqui, é idêntico àquele utilizado para Bactérias Oxidadoras de Amônia (BOA), sendo que no final do período de incubação, testou-se os tubos apenas para nitrito utilizando-se o reagente de Griess- Ilosvai. Considerava-se teste positivo para Bactérias Oxidadoras de Nitrito (BON) caso o meio não desenvolvesse coloração avermelhada (característica de nitrito) e negativo caso houvesse aparecimento de cor. Ao final utilizava-se a tabela de ALEXANDER & CLARK (1982).

4.9.2 . Análise de FISH (*Fluorescence in Situ Hybridization*)

As análises de FISH foram realizadas no inóculo e na biomassa retirada dos reatores nos seguintes dias de operação: 73, 205, 323 e 540 dias.

O procedimento para esta análise iniciava-se com a coleta de amostra dos biodiscos, onde com o auxílio de uma espátula raspava-se uma pequena quantidade de material, diluía-se em tubo de ensaio, homogeneizava-se as mesmas através de agitação em vórtex, e iniciava-se os procedimentos para fixação da amostra:

Fixação com PFA (Paraformaldeído) (Gram negativos e alguns Gram positivos)

Reagentes e Soluções:

- 3x PBS

- 1x PBS (130 mM de NaCl, 10 mM de tampão Fosfato de Sódio (pH 7,2 – 7,4))
- 4% de Paraformaldeído

3x tampão PBS (Phosphate Buffer Solution) (390 mM NaCl, tampão fosfato 30 mM pH 7,2 – 7,4))

Preparar: NaH_2PO_4 0,5M (6g em 100 mL)

Na_2HPO_4 0,5M (7,1g em 100 mL) ou 13,31g de Na_2HPO_4
heptahidratado

Preparar: 100 mL de tampão fosfato de sódio 0,5M (pH 7,2-7,4)

Misturando: 28 mL de NaH_2PO_4 0,5M

72 mL de Na_2HPO_4 0,5M

Para 300 mL de PBS 3x misturar:

23,4 mL de NaCl 5M (29,25g/100 mL)

18,0 mL de tampão fosfato de sódio 0,5M

258,6 mL de H_2O

Esterilizar e guardar na geladeira

Solução 4% PFA-PBS

Preparação:

1. Aquecer 20 mL de água destilada a 60 °C
2. Agregar 1,2121g de paraformaldeído (cuidado para não aspirar) e gotas de NaOH 2N até dissolução (aprox. 100 microlitros).
Deixar em banho-maria até dissolver o PFA (não mais que 5 – 10 min.);
tomar cuidado com os vapores tóxicos.
3. Agregar 10 mL de 3x PBS
4. Esfriar a 20°C e ajustar o pH a 7,2 – 7,4 com gotas de HCl. Se houver precipitado, filtrar em membrana 0,45 μ .
5. Armazenar a 4°C por não mais que duas semanas.

Após a fixação, as amostras eram guardadas a -20°C , para posteriormente realizar-se os testes microscópicos no MIP, com as respectivas sondas, para identificação dos microrganismos, utilizando-se a sequência abaixo (PELLIZARRO, 2005):

1. Imobilização e desidratação das células sobre a lâmina;
2. Hibridização das células com oligonucleotídeos fluorescentes (sondas);
3. Lavagem das lâminas para otimização da estringência;
4. Coloração das células com *DNA intercalating dye 4,6 diamino-2 phenylindole* (DAPI) (não específico, cora bactérias e eucariontes; não cora Archaea);
5. Cobertura da lâmina com lamínula e adição de um anti “fading” (CitiFluor) entre ambas;
6. Observação em microscópio epifluorescente.
7. Imobilização e desidratação das células sobre a lâmina;
8. Hibridização das células com oligonucleotídeos fluorescentes (sondas);
9. Lavagem das lâminas para otimização da estringência;
10. Coloração das células com *DNA intercalating dye 4,6 diamino-2 phenylindole* (DAPI) (não específico, cora bactérias e eucariontes; não cora Archaea);
11. Cobertura da lâmina com lamínula e adição de um anti “fading” (CitiFluor) entre ambas;
12. Observação em microscópio epifluorescente.

Foram utilizadas sondas de elevado nível taxonômico: EUBmix, Ntspa712; níveis intermediários: BETA42a, e níveis específicos para as bactérias oxidadoras de amônia e nitrito: Nso190, NIT3, NEU, Nmv, Ntspa662, Ntco206, Ntspn693, Nsv443. Tais sondas e os microrganismos por estas identificados estão exibidos na Tabela 4.5 (PELLIZZARO, 2005). A Figura 4.3 apresenta um esquema dos microrganismos estudados.

Tabela 4.5: Sondas utilizadas para identificação dos microrganismos presentes nos biofilmes dos reatores.

Sonda	Especificidade	Origem	Seqüência	REFERÊNCIA
UNI1389a	Bactéria, não Epsilonproteobactéria	16S rRNA	5'-ACGGGCGGTGTGTACAAG-3'	Loy <i>et al.</i> (2002)
EUK1195	Eucariontes	18S rRNA	5'-GGGCATCACAGACCTG-3'	Giovannoni <i>et al.</i> (1990)
EUB338	todas as bactérias	16S rRNA	5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT--3'	Amann <i>et al.</i> (1990)
ARC915	todas Archae	16S rRNA	5'-GTGCTCCCCCGCCAATTCCT-3'	Stuhl <i>et al.</i> (1991)
Delta495a	A maioria das Delta bactérias	16S rRNA	5'-AGTTAGCCGGTGCTTCCT-3'	Loy <i>et al.</i> (2002)
Alf1b	Alphaproteobactéria, algumas Deltaproteobactéria, Spirochaetes	16S rRNA	5'-CGTTCGYTCTGAGCCAG-3'	Manz <i>et al.</i> (1992)
BET42a Competidor	Beta bactérias	23S rRNA	5'-GCCTTCCCCTTCGTTT-3' *5'-GCCTTCCCACATCGTTT-3'	Manz <i>et al.</i> (1992)
GAM42a	Gamma bactérias	23S rRNA	5'-GCCTTCCCACATCGTTT-3' *5'-GCCTTCCCCTTCGTTT-3'	Manz <i>et al.</i> (1992)
Ntspa712 Competidor	A maioria dos membros do Filo Nitrospira	16S rRNA	5-CGCCTTCGCCACCGGCCTTCC-3 *5-CGCCTTCGCCACCGGTGTTCC-3	Daims <i>et al.</i> (2001)
NSO190 NSO1225	Todas as BOA beta	16S rRNA	5-CGATCCCCTGCTTTTCTCC-3 5-CGCCATTGTATTACGTGTGA-3	Mobarry <i>et al.</i> (1996)
NIT3 (alfa) Competidor	<i>Nitrobacter sp</i>	16S rRNA	5-CCTGTGCTCCATGCTCCG-3 *5-CCTGTGCTCCATGCTCCG-3	Wagner <i>et al.</i> (1995)
Nsv443	<i>Nitrosolobus multififormis</i> <i>Nitrospira briensis</i> <i>Nitrosovibrio tenuis</i>	16S rRNA	5'-CCGTGACCGTTTTCGTTCCG-3'	Mobarry <i>et al.</i> (1996)
NEU Competidor	A maioria das <i>Nitrosomonas sp</i> halófilas e halotolerantes	16S rRNA	5'-CCCCTCTGCTGCACTCTA-3' *-TTCCATCCCCCTCTGCCG-3'	Wagner <i>et al.</i> (1995)
Nmv (espécie de Nitrosomonas)	<i>Nitrosococcus mobilis</i>	16S rRNA	5-TCCTCAGAGACTACTACGCGG-3	Juretschko <i>et al.</i> (1998)
Nitcoc206 (gama)	<i>Nitrosococcus mobilis</i>	16S rRNA	5-CGGTGCGAGCTTGCAAGC-3	Juretschko <i>et al.</i> (2000)
Ntspn693	<i>Nitrospina gracilis</i> (delta)	16S rRNA	5-TTCCCAATATCAACGCATTT-3	Juretschko <i>et al.</i> (2000)
Ntspa 662	<i>Nitrospira sp</i> (filo Nitrospira)	16S rRNA	5'-GGAATTCGCGCTCCTCT-3' *5'-GGAATTCGCTCCTCT-3'	Daims <i>et al.</i> (2001)
Ps Agl	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Agl (gama)	23S rRNA	5'-GATAACTCGTCATCAGCTC-3'	Boye <i>et al.</i> (1995)

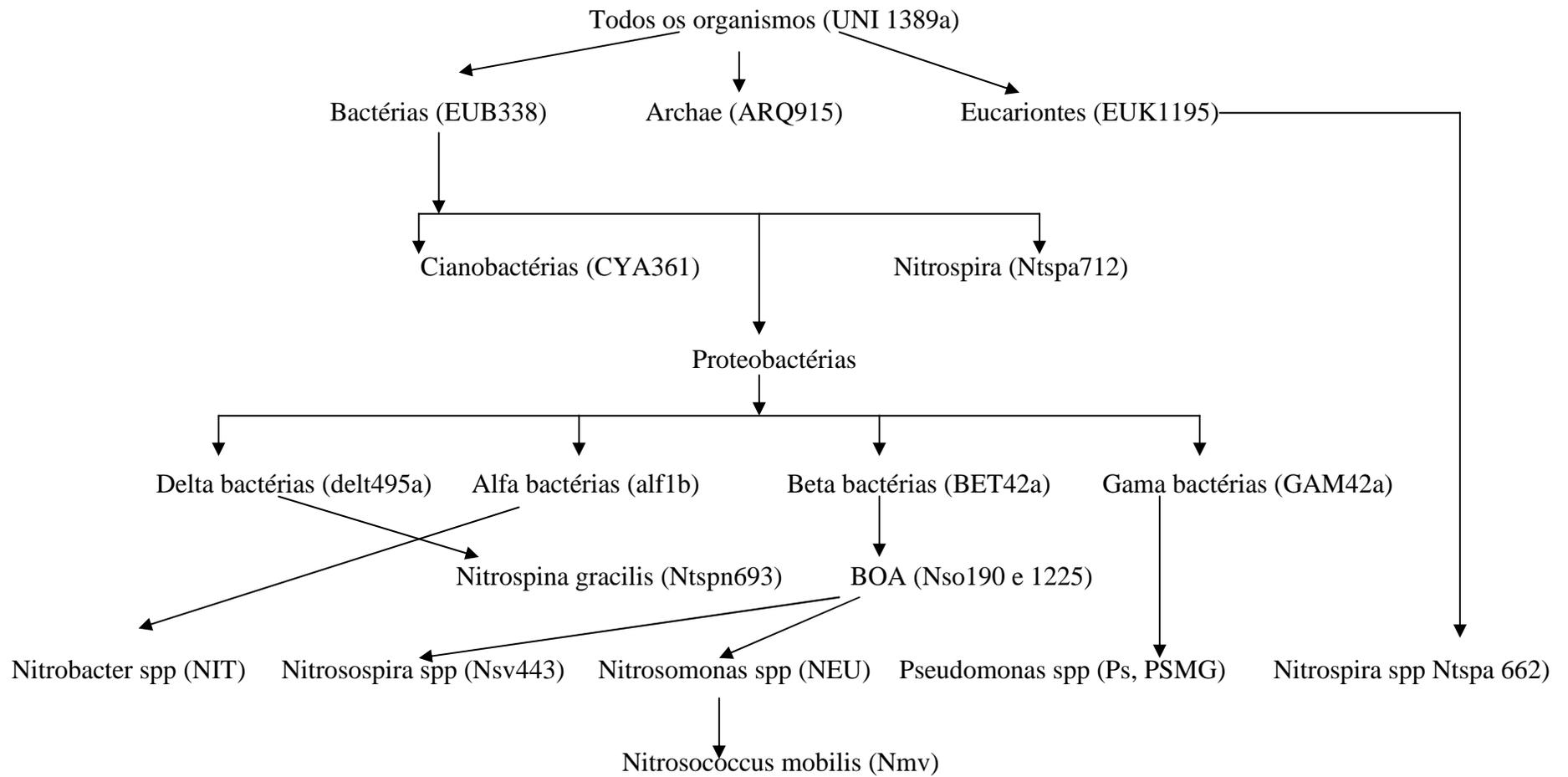


Figura 4.3: Esquema dos Microrganismos Analisados.

4.9.3 . Microscopia Ótica e Microscopia Eletrônica

Os biofilmes foram analisados através de microscopia ótica (Olympus BX 40), e também por microscopia eletrônica, onde, determinou-se também as espessuras dos biofilmes, com 333 dias de operação, sendo para isto, necessário um preparo adequado das amostras segundo VARESCHE et al (1997). O microscópio eletrônico de varredura utilizado era da marca PHILIPS, modelo XL30 no Laboratório de Materiais do Curso de Engenharia Mecânica da UFSC. As análises de microscopia ótica foram realizadas nos dias de operação: 107, 215 e 327. A visualização dos biofilmes no microscópio eletrônico foi realizada no dia 228 de operação.

5 . RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 . CONDIÇÕES DE PROCESSO NOS REATORES

As Tabelas 5.1, 5.3 e 5.4 apresentam as condições de processo em cada uma das etapas dos reatores. A Tabela 5.1 para o reator em PVC, a Tabela 5.3 para o reator em PS e a Tabela 5.4 para o reator em PU.

Tabela 5.1: Condições de processo nas diferentes etapas de operação do reator em PVC

	Conc. (mg N- NH ₄ ⁺ .L ⁻¹)	Vazão (L.d ⁻¹)	TRH (dia)	Carga Volumétrica (mgN.L ⁻¹ .d ⁻¹)	Carga Superficial (mgN.m ⁻² .d ⁻¹)	Período (dias)
Etapa 1	187	5	0,95	198	519	1-152
Etapa 2	513	5	0,95	542	1425	153-205
Etapa 3	1035	5	0,95	1094	2875	206-406
Etapa 4	1035	11,6	0,41	2560	6670	407-628
Etapa 5	1035	11,6	0,41	2560	6670	629-913

Na etapa 5 para o reator PVC introduziu-se na alimentação, uma fonte de carbono orgânico (acetato de sódio). As relações C/N utilizadas estão apresentadas na Tabela 5.2.

Tabela 5.2: Relação carbono/nitrogênio utilizada no reator PVC durante a Etapa 5.

Relação C/N	Período (dias)
0,2	655-780
0,75	781-913

Tabela 5.3: Condições de processo nas diferentes etapas de operação do reator em PS

	Conc. (mg N- NH ₄ ⁺ .L ⁻¹)	Vazão (L.d ⁻¹)	TRH (dia)	Carga Volumétrica (mgN.L ⁻¹ .d)	Carga Superficial (mgN/m ² .d ⁻¹)	Período (dias)
Etapa 1	187	5	0,95	198	519	1-152
Etapa 2	513	5	0,95	542	1425	153-205
Etapa 3	1035	5	0,95	1094	2875	206-406
Etapa 4	1035	11,6	0,41	2560	6670	407-628
Etapa 5-1	1035	11,6	0,41	2560	5000	629-640
Etapa 5-2	1035	6,9	0,68	1510	4000	641-647
Etapa 5-3	1035	6,1	0,77	1335	3500	648-659
Etapa 5-4	1035	5,2	0,91	1138	3000	660-669
Etapa 5-5 (re-inoculação)	828	4,3	1,1	753	2000	670-719
Etapa 5-6	643	7,0	0,67	951	2500	720-737
Etapa 5-7	643	8,4	0,56	1142	3000	738-773
Etapa 5-8	1035	6,1	0,77	1335	3500	774-810
Etapa 5-9	1035	6,9	0,68	1510	4000	811-881
Etapa 5-10	1035	7,8	0,61	1707	4500	882-913

Na Etapa 5 o reator PS foi re-inoculado, desta vez, com lodo anaeróbio proveniente de lagoa de estabilização de um sistema de tratamento de dejetos suínos da EMBRAPA Suínos e Aves (Concórdia, SC) que apresentava atividade ANAMMOX. No entanto, antes da inoculação, foi necessário baixar a carga aplicada de modo progressivo até que a concentração de nitrito alcançasse valores abaixo de 50 mg N-NO₂⁻, valor este, considerado seguro pela literatura quanto à inibição das bactérias anammox.

Nesta etapa, a carga no reator PS foi então reduzida até alcançar o valor de 2000 mg N-NH₄.m⁻².d⁻¹. Nesta carga, a concentração de N-NO₂⁻ na saída do reator encontrava-se abaixo de 50 mg e neste momento foi realizada a inoculação. Após inoculação, o reator permaneceu sem alimentação durante três dias, procedendo-se posteriormente à progressão de carga.

Tabela 5.4: Condições de processo nas diferentes etapas de operação do reator em PU.

	Conc. (mg N-NH ₄ ⁺ .L ⁻¹)	Vazão (L.d ⁻¹)	TRH (dia)	Carga Volumétrica (mgN.L ⁻¹ .d ⁻¹)	Carga Superficial (mgN.m ⁻² .d ⁻¹)	Período (dias)
Etapa 1	187	5	0,95	198	1206	1-152
Etapa 2	513	5	0,95	542	3310	153-205
Etapa 3-1	1035	5	0,95	1094	6670	206-316
Etapa 3-2	1035	5	0,95	1094	6670	317-410
Etapa 3-3	1035	5	0,95	1094	6670	411-564
Etapa 4	1035	5	0,95	1094	6670	565-797
Etapa 5	1293	4,96	0,95	1356	8280	798-913

A Etapa 3 para o reator PU teve uma duração muito longa (de 206 a 564 dias), a qual foi sub-dividida, mesmo não havendo modificações nas condições de processo, afim de melhor organizar a discussão dos resultados.

5.1 . DESEMPENHO DOS REATORES

A Figura 5.6 ilustra o comportamento dos reatores PVC, PS e PU durante os 913 dias de operação. Nesta Figura está representado o acompanhamento das cargas aplicadas, assim como das concentrações de nitrogênio nas formas solúveis no meio líquido, quais sejam: N-NH₄⁺, N-NO₂⁻ e N-NO₃⁻, assim como a concentração de nitrogênio amoniacal alimentada aos reatores, cujos patamares indicam a média da concentração do meio de alimentação dos mesmos. A

concentração de amônia no meio de alimentação foi idêntica para os três reatores até a Etapa 4, sofrendo modificações ao longo da Etapa 5 para os reatores PS e PU.

Foram realizados quatro aumentos de carga nitrogenada para os reatores PVC e PS e três para o reator PU durante as etapas de 1 a 4. Na etapa 5 a carga do reator PVC foi mantida e adicionou-se uma fonte de carbono (Tabela 5.2), enquanto as cargas dos reatores PS e PU sofreram aumentos e reduções durante a Etapa 5.

5.1.1 . Etapa 1

Na Etapa 1, correspondente a um período de 151 dias de operação, a concentração média do meio de alimentação foi de $187 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$. Pode-se observar nas Figuras 5.1, 5.2 e 5.3 ou na Figura 5.6, que durante este período, os três reatores apresentaram comportamentos bastante semelhantes, alcançando rapidamente a estabilidade.

Durante os 50 primeiros dias, um residual de amônio não oxidado em torno de 37 mg N-NH_4^+ era detectado na saída dos reatores, e gradativamente, sua concentração cai para valores bem próximos a zero. Um pico de nitrito em torno de 50 mg N-NO_2^- foi observado entre os dias 12 e 15, provavelmente devido à retirada das células do fundo do reator, conforme descrito no item 4.3, Tabela 4.2 (Material e Métodos) caindo posteriormente, também, para valores próximos de zero; enquanto que o teor de nitrato sobe, alcançando valores estáveis, e mantendo-se assim até o final do período. Segundo LANBROECK & GERARDS (1993) em condições normais, a reação de oxidação da amônia a nitrito é a etapa limitante da velocidade, ao contrário do nitrito que é rapidamente oxidado a nitrato, deste modo o nitrito raramente é acumulado em reatores nitrificantes.

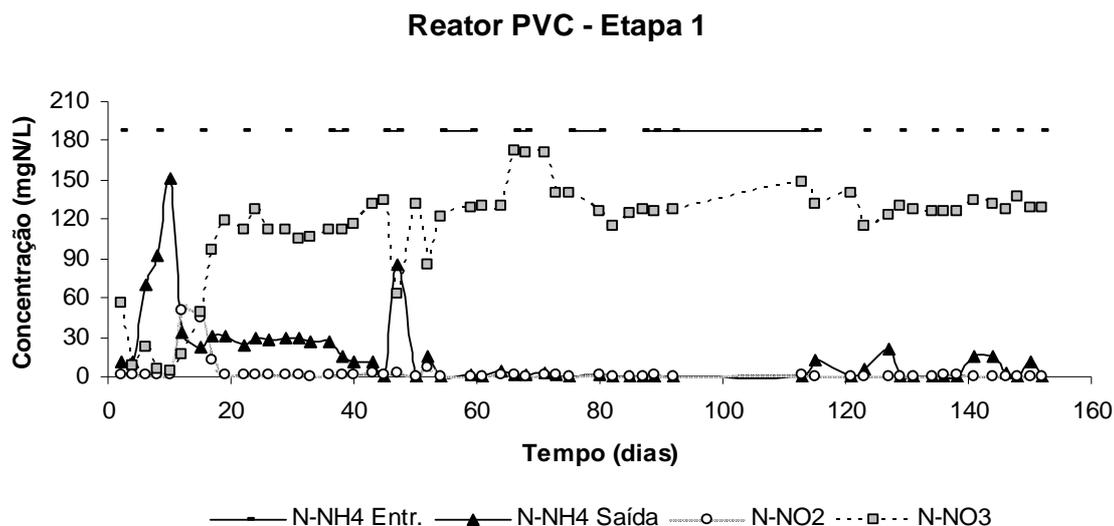


Figura 5.1: Acompanhamento analítico do reator PVC durante a Etapa 1.

Após os 50 primeiros dias, a nitrificação completa é estabelecida em todos os reatores e até o final da Etapa 1, como apresentado nas Tabelas 5.5 e 5.6, que, para a carga superficial aplicada de $519 \text{ mgN.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$, nos reatores PVC e PS, todo o nitrogênio introduzido no sistema na forma amoniacal foi oxidado. Uma média de 70% deste nitrogênio foi encontrada no efluente na forma de N-NO_3^- ; 0,7% como N-NO_2^- . A remoção média de Nitrogênio observada neste período foi de $151 \text{ mg de N.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$, correspondente a 29% do nitrogênio aplicado (Figura 5.7).

Apenas lembrando, o reator PU, como já mencionado no item Material e Métodos, por apresentar uma menor área superficial dos seus discos tem sua carga 2,36 vezes superior àquelas aplicadas aos reatores PVC e PS, portanto, como se pode observar na Tabela 5.7, a carga aplicada ao reator PU na Etapa 1 é de $1206 \text{ mg N.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$. No entanto, o mesmo reage de modo semelhante aos reatores PVC e PS, apresentando uma média de 70% deste nitrogênio no efluente na forma de N-NO_3^- , 0,3% como N-NO_2^- , e uma remoção média de N de $338 \text{ mg de N.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$, correspondente a 28% do nitrogênio aplicado. Estes valores são bem próximos aos encontrados por PYNAERT *et al.* (2001), que, utilizando um reator semelhante ao do presente trabalho e aplicando uma carga de $1022 \text{ mg N/m}^2.\text{d}$, obteve uma remoção média de 20% de nitrogênio.

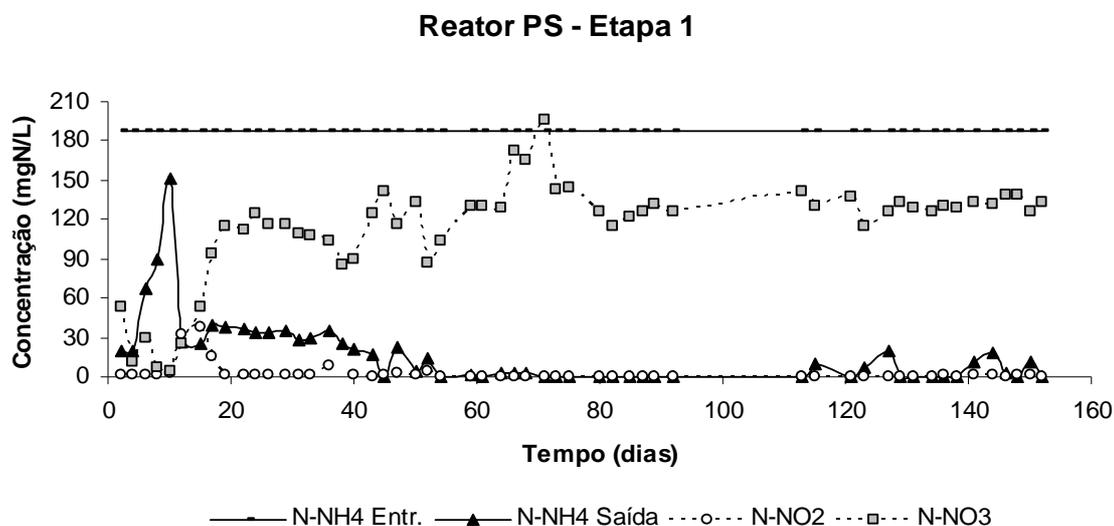


Figura 5.2: Acompanhamento analítico do reator PS durante a Etapa 1.

Embora o reator PU recebesse uma carga maior do que os reatores PVC e PS, apresentou comportamento semelhante aos outros dois reatores, indicando, assim, que, possivelmente, a carga aplicada na Etapa 1 nos reatores PVC e PS poderia ser a mesma praticada para o reator PU. Além disso, a nitrificação completa é atingida, estabelecendo-se o equilíbrio nos reatores em torno de 50 dias, sugerindo deste modo, que a Etapa 1 poderia ter um período de duração mais reduzido. PYNAERT et al (2003), utilizando como inóculo para um RBC (*Rotating Biological Contactor*) uma cultura nitrificante enriquecida, aumentado-se a carga gradativamente, desde 55 até 300 mgN.L⁻¹.d⁻¹, sugere um período de apenas 47 dias para esta partida.

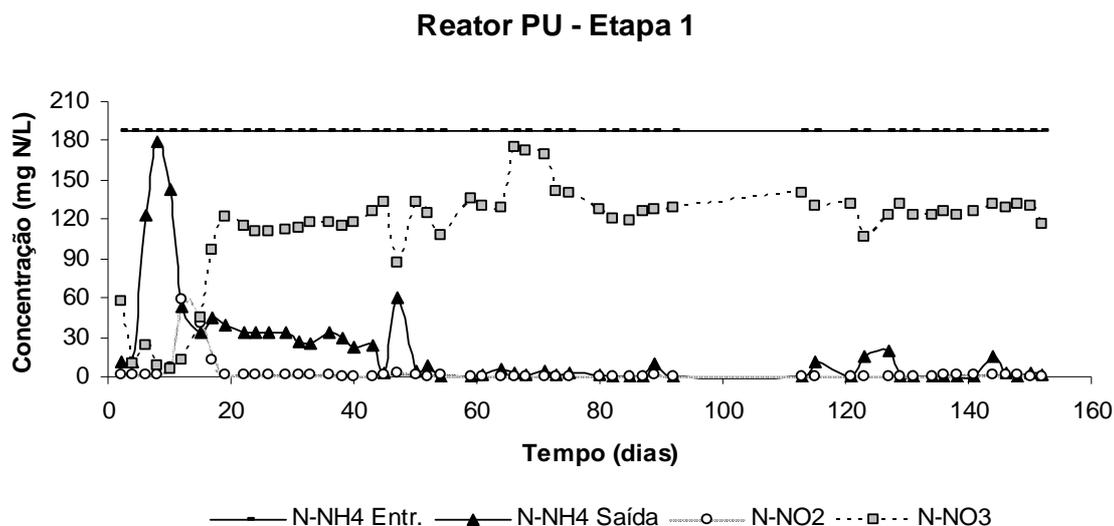


Figura 5.3: Acompanhamento analítico do reator PU durante a Etapa 1.

5.1.2 . Etapa 2

Após 151 dias de operação (período correspondente à Etapa 1), procedeu-se a um aumento da carga aplicada aos reatores, pelo aumento na concentração do meio de alimentação. Verificando-se nas Tabelas 5.1, 5.3 e 5.4, constata-se que a concentração foi aumentada de 187 para 513 mg N-NH₄⁺, atingindo-se, assim, uma carga de 1425 mg N.m⁻².d⁻¹ para os reatores PVC e PS e 3310 mg N.m⁻².d⁻¹ para o reator PU.

A Etapa 2 teve duração de 59 dias, entre 153 e 205 após a partida do reator. Novamente, como se pode observar nas Figuras 5.4, 5,5 e 5.8 ou na Figura 5.6, neste período, os reatores também apresentaram comportamentos semelhantes.

Durante os primeiros dez dias após o aumento da carga, houve um residual de amônia na saída dos reatores (Figura 5.6), e também observou-se um pequeno acúmulo de nitrito, caindo depois, gradativamente a zero, ou a valores bem próximos disto, enquanto que a nitrificação completa até nitrato foi estabelecida, mantendo-se assim até o final deste período em todos os reatores.

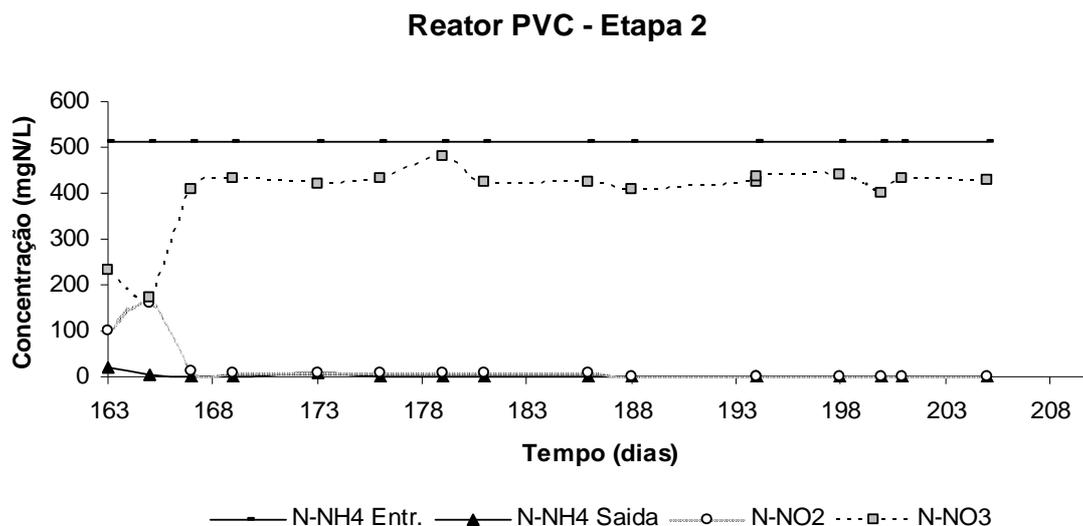


Figura 5.4: Acompanhamento analítico do reator PVC durante a Etapa 2.

Para os reatores PVC e PS a carga aplicada foi de $1425 \text{ mg N.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$. Percentuais médios de 95,2% e 99,2% de oxidação de N-NH_4^+ foram obtidos nos reatores de PVC e PS, respectivamente. Detectou-se em seus efluentes (Tabelas 5.5 e 5.6), um percentual de N-NO_3^- de 78% para o reator PVC e 83% para o reator PS. O percentual médio de N-NO_2^- encontrado na saída dos dois reatores foi de 0,2%. Neste período (Figura 5.7), a remoção média de nitrogênio alcançada foi de 17% no reator PVC e 16% no reator PS, correspondendo a 242 e 228 $\text{mg N.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$, respectivamente.

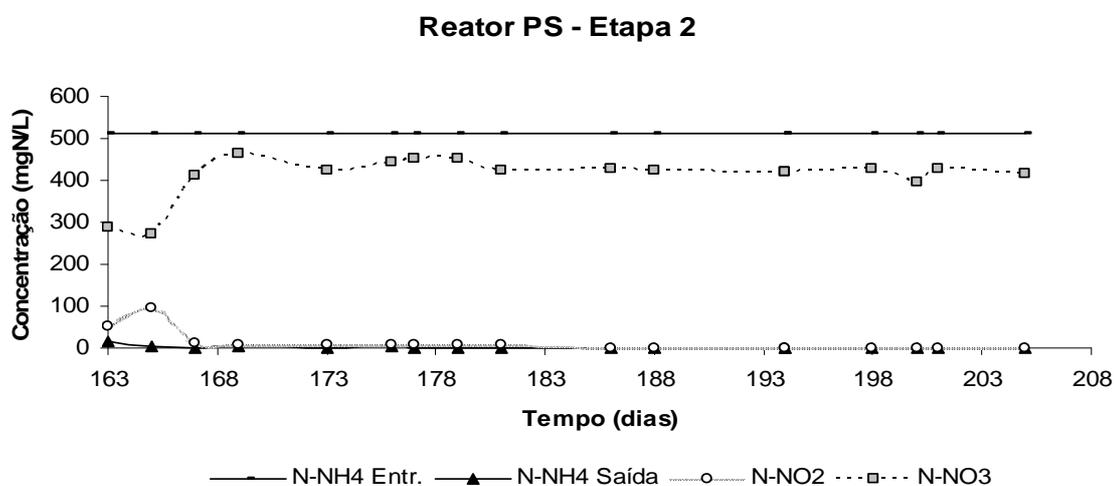


Figura 5.5: Acompanhamento analítico do reator PS durante a Etapa 2.

Comparando-se os resultados obtidos na Etapa 2 para estes dois reatores, com os resultados obtidos por PYNAERT *et al.* (2001), quando o mesmo aplicou uma carga de $1715 \text{ mg N.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$ obtendo uma remoção em torno de 18% e um percentual de oxidação de N-NH_4^+ de 79%, correspondendo a $1353 \text{ mg N.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$, observa-se que os resultados aqui alcançados são bastante semelhantes aos obtidos pelos autores. No entanto, vale ressaltar, que o inóculo utilizado pelos autores, tratava-se, de uma cultura nitrificante conhecida como “ABIL” (*Ammonium Binding Inoculum Liquid*), produzida no Laboratory of Microbial Ecology and Technology (LabMET). Tal cultura é desenvolvida para uso na indústria de aquicultura e apresenta uma altíssima velocidade específica de nitrificação de 2-3 g de N/g SSV.d, enquanto que o inóculo utilizado no presente trabalho, trata-se de lodo proveniente de uma estação de tratamento de efluentes domésticos, produzindo resultados semelhantes, levando-se à constatação de que a utilização de um inóculo especial, com alta velocidade específica de nitrificação poderia ser dispensável.

No reator PU, nesta etapa, a carga aplicada foi de $3310 \text{ mg N.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$. Na Tabela 5.7 pode-se observar que 81% do nitrogênio aplicado, foi recuperado no efluente na forma de N-NO_3^- , 0,2% na forma de N-NO_2^- (idêntico aos outros dois reatores) detectando-se, assim, como pode-se observar também na Figura 5.7, um percentual de 17% de remoção de N, correspondendo a $562 \text{ mg N.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$.

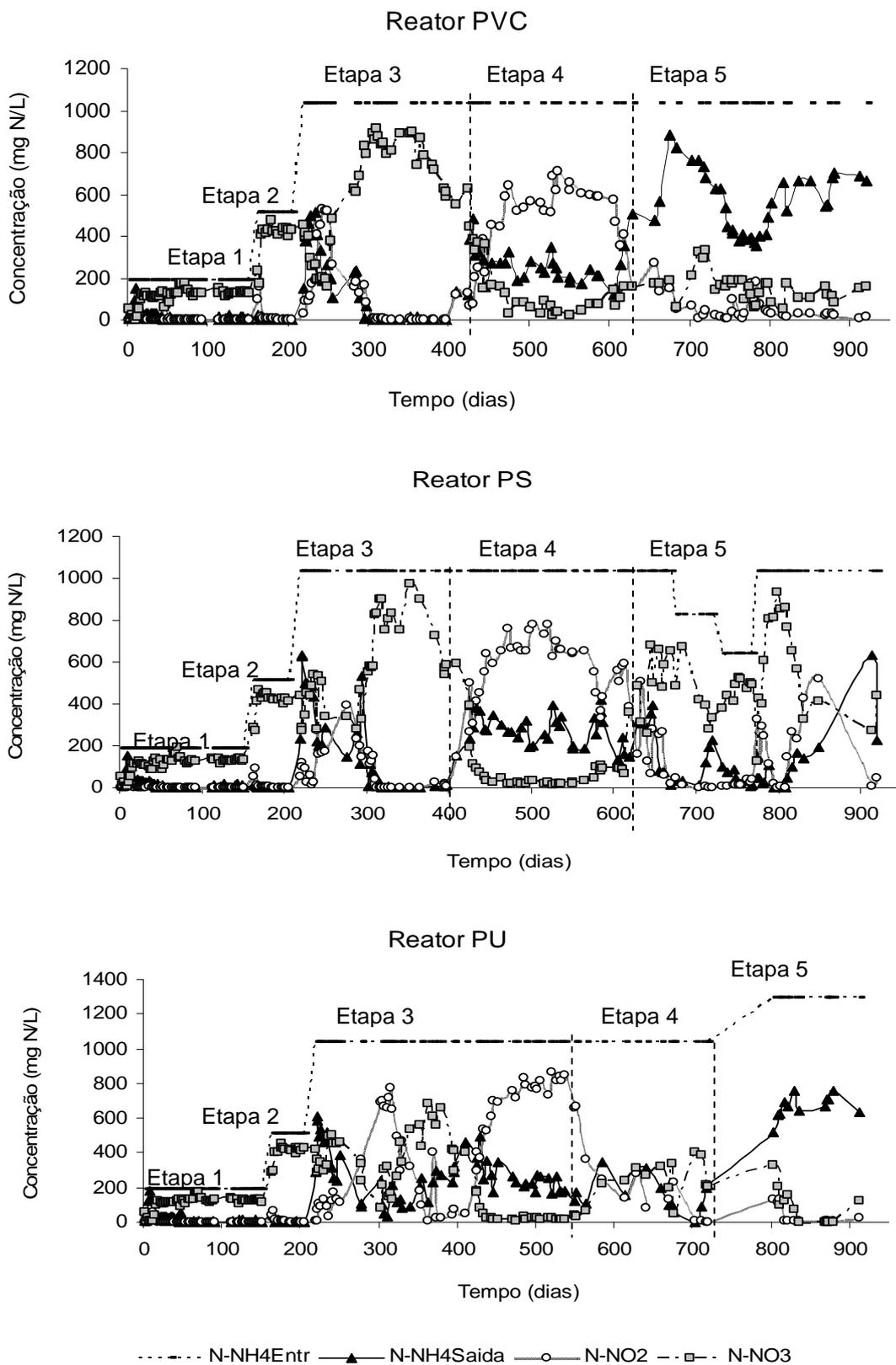


Figura 5.6: Acompanhamento analítico dos reatores PVC, PS e PU durante 913 dias de operação.

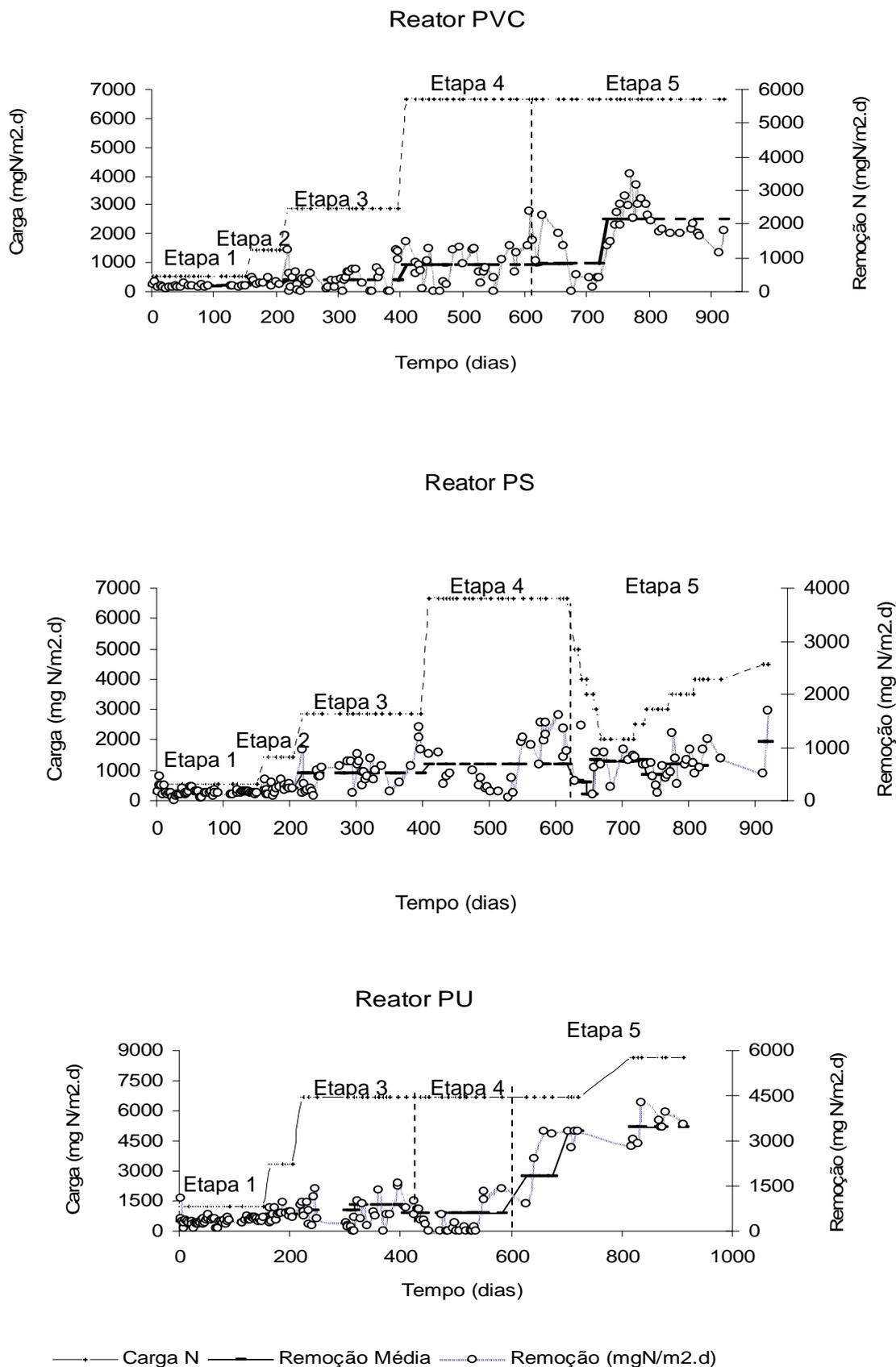


Figura 5.7: Carga aplicada e remoção de Nitrogênio em função do tempo de operação dos reatores PVC, PS e PU.

Tabela 5.5: Valores médios encontrados no efluente do reator PVC e suas respectivas conversões durante as cinco etapas de funcionamento do reator.

Etapa	Carga (mgN.m ⁻² .d ⁻¹)	Rem méd N (mgN.m ⁻² .d ⁻¹)	% Rem N	% N-NH ₄ ⁺ oxidado	% N-NO ₂ Efluente	% N-NO ₃ efluente
1	519	151	29	99,7	0,7	70
2	1425	242	17	95,2	0,2	78
3	2875	374	13	90	0,2	77
4	6670	800	12	73	54,4	6,6
5	6670	2134	32	49,4	4,2	13,2

Tabela 5.6: Valores médios encontrados no efluente do reator PS e suas respectivas conversões durante as cinco etapas de funcionamento do reator.

Etapa	Carga (mgN.m ⁻² .d ⁻¹)	Rem méd N (mgN.m ⁻² .d ⁻¹)	% Rem N	% N-NH ₄ ⁺ oxidado	%N-NO ₂ Efluente	%N-NO ₃ efluente
1	519	151	29	99,6	0,6	70
2	1425	228	16	99,2	0,2	83
3	2875	517	18	93,6	0,6	75
4	6670	667	10	73	55	8
5-1	5000	350	7	78	33	38
5-2	4000	320	8	63	10	45
5-3	3500	105	3	85	26	56
5-4	3000	750	25	92	16	51
5-5	2000	740	37	85	2	46
5-6	2500	925	30	65	1	34
5-7	3000	480	16	64	2	46
5-8	3500	665	19	94	12	63
5-9	4000	843	21	99	27	51
5-10	4500	1080	24	61	3	34

Tabela 5.7: Valores médios encontrados no efluente do reator PU e suas respectivas conversões durante as cinco etapas de funcionamento do reator.

Etapa	Carga (mgN.m ⁻² .d ⁻¹)	Rem méd N (mgN.m ⁻² .d ⁻¹)	% Rem N	% N-NH ₄ ⁺ oxidado	%N-NO ₂ efluente	%N-NO ₃ efluente
1	1206	338	28	98,3	0,3	70
2	3310	562	17	98,2	0,2	81
3-1	6670	800	12	72	29	31
3-2	6670	800	12	75	19	44
3-3	6670	333	5	76	67	4
4	6670	3335	50	79	5	24
5	8280	3312	40	51	3	8

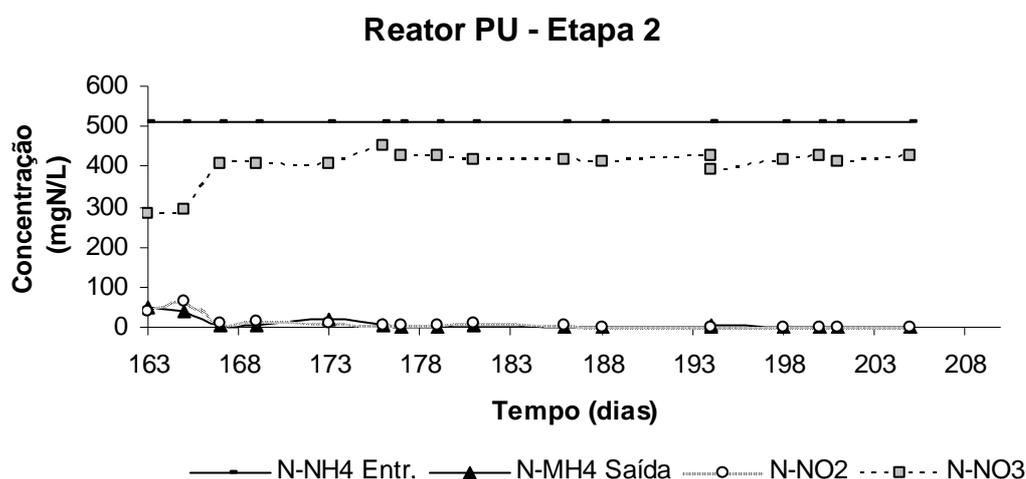


Figura 5.8: Acompanhamento analítico do reator PU durante a Etapa 2.

5.1.3 . Etapa 3

A Etapa 3 para os reatores PVC e PS estendeu-se do dia 206 ao dia 406, perfazendo um período de 200 dias de operação. Nesta etapa, o aumento de carga foi realizado, novamente, através do aumento de concentração do meio de alimentação, deste modo, a concentração média do meio foi elevada de 513 para 1035 mg N-NH₄⁺.L⁻¹, atingindo-se, assim, uma carga superficial média de 2875 mg N.m⁻².d⁻¹ nestes dois reatores (Tabelas 5.1 e 5.3). Para o reator PU, tal

aumento na concentração do meio, significou um aumento de carga de 3310 para 6670 mg N.m⁻².d⁻¹ (Tabela 5.4).

Durante os 30 primeiros dias após o aumento da carga, mesmo esta sendo bem mais elevada no reator PU do que nos reatores PVC e PS, os três reatores se comportaram de modo semelhante, como se pode observar nas Figuras 5.9, 5.10 e 5.11 e também na Figura 5.6. Houve um aumento crescente da concentração de amônia não oxidada na saída dos reatores PVC, PS e PU, chegando, em alguns momentos, a atingir picos acima de 500 mg N-NH₄⁺.L⁻¹ no reator PVC e maiores do que 600 mg N-NH₄⁺.L⁻¹ nos reatores PS e PU. A concentração de nitrito aumentou em todos os reatores, enquanto que a nitrificação completa até nitrato foi afetada, e, em alguns momentos, a concentração de N-NO₃, caiu a valores inferiores a 300 mg N-NO₃.L⁻¹. A seguir descreve-se, separadamente, o comportamento para cada um dos reatores a partir do 306^o dia de operação.

Reator PVC

Os valores médios encontrados no efluente para as concentrações de amônia, nitrito e nitrato durante os primeiros 100 dias (do 206^o ao 306^o dia) foi de 244 mg N-NH₄⁺, 232 mg N-NO₂⁻ e 458 mg N-NO₃⁻, correspondendo, respectivamente, a 24%, 23% e 44% do nitrogênio total fornecido ao reator PVC. Após este período, o reator estabilizou-se, de modo a não se detectar mais a presença de amônia e nitrito em seu efluente, reestabelecendo-se, assim, a nitrificação completa até nitrato, mantendo-se deste modo até o final do período (Figura 5.9). O percentual médio de N-NH₄⁺ oxidado foi de 90%, correspondendo a um valor de 2588 mg N-NH₄⁺, enquanto que 77% do nitrogênio aplicado foi encontrado no efluente na forma de N-NO₃⁻ e 0,2% como N-NO₂⁻. A remoção média de N alcançada durante este período foi de 13%, ou 374 mg N.m⁻².d⁻¹.

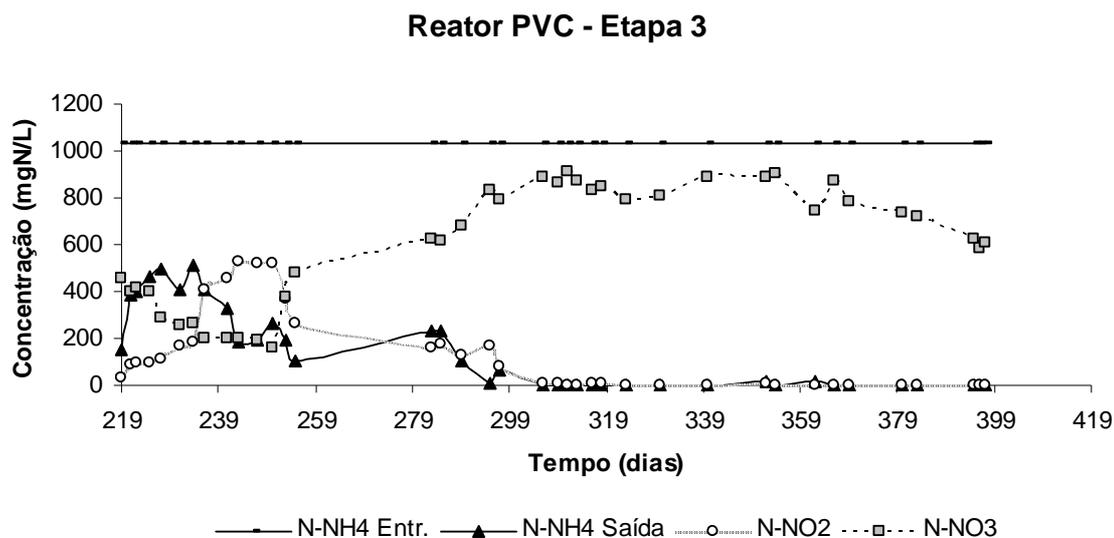


Figura 5.9: Acompanhamento analítico do reator PVC durante a Etapa 3.

Reator PS

Para o reator PS, durante esta mesma fase, a concentração de amônia não oxidada no efluente foi de 312 mg N-NH₄⁺, que corresponde a 30% do N fornecido, o que representa um percentual próximo àquele apresentado no reator PVC. As concentrações de nitrito e nitrato na saída foram de 128 mg N-NO₂⁻ e 445 mg de N-NO₃⁻, correspondendo a 12% e 43% respectivamente do nitrogênio aplicado ao reator.

No entanto, após este período de 100 dias de operação na referida carga, o reator PS apresentou um comportamento apenas levemente diferente do reator PVC. A Tabela 5.6 demonstra que o mesmo apresentou baixos residuais de amônia não oxidada, e também de nitrito, porém, não chegaram a desaparecer por completo, sendo suas concentrações médias em torno de 62 mg N-NH₄⁺.L⁻¹ (6%), e 6,0 mg N-NO₂⁻.L⁻¹ (0,6%). A nitrificação completa, no entanto, continuou bem pronunciada e a concentração média de nitrato foi de 779 mg N-NO₃⁻.L⁻¹, correspondendo a 75% do N fornecido. A remoção obtida durante a Etapa 3 para o reator PS foi em torno de 18% o que correspondeu a 517 mg N.m⁻².d⁻¹.

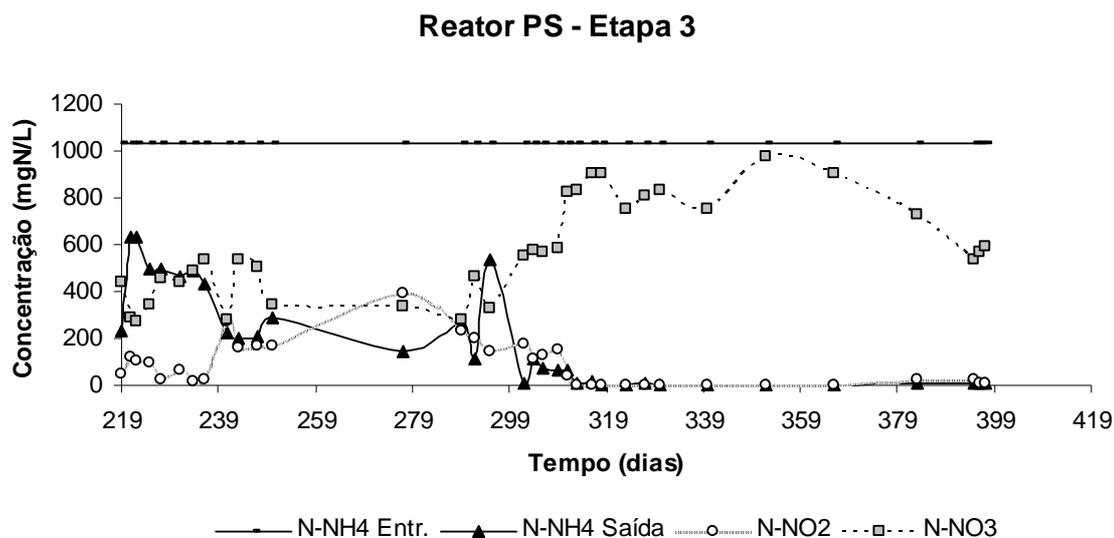


Figura 5.10: Acompanhamento analítico do reator PS durante a Etapa 3.

Reator PU

A Etapa 3 para o reator PU foi dividida, como apresentado na Tabela 5.7, em três sub-etapas, afim de melhor explicar o comportamento do mesmo nesta fase. O reator PU por ter recebido uma carga superficial de nitrogênio mais elevada do que os outros dois reatores, em torno de $6670 \text{ mg N.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$, foi operado por um total de 358 dias, pois apresentou um período de instabilidade muito longo, frente à perturbação causada ao sistema (Figura 5.11).

A Etapa 3-1 corresponde, então, ao período de operação entre 206 a 316 dias (Tabela 5.7). As concentrações médias de amônia não oxidada, nitrito e nitrato no efluente do reator PU e seus respectivos valores percentuais em relação ao nitrogênio aplicado nesta Etapa, são respectivamente: $273 \text{ mg N-NH}_4^+.\text{L}^{-1}$ (26%), $299 \text{ mg N-NO}_2.\text{L}^{-1}$ (29%) e $325 \text{ mg N-NO}_3.\text{L}^{-1}$ (31%). A remoção de nitrogênio observada foi em torno de 12% e o percentual de N-NH_4^+ oxidado foi de 72%, ou $4802 \text{ mg N.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$.

Na Etapa 3-2, percorreu-se uma fase de 93 dias, (de 317 a 410 desde a partida do reator) onde houve uma queda gradativa do nitrito e mais levemente da amônia e uma ligeira tendência ao aumento da concentração de nitrato no efluente. O percentual de remoção, entretanto, continuou igual ao da Etapa 3-1 (12%), e a nitrificação completa deu sinais de reestabelecimento, alcançando um

percentual médio de nitrato em torno de 44%, mais alto do que na Etapa 3-1 (Figura 5.11 e Tabela 5.7).

O comportamento observado na Figura 5.11 na Etapa 3-3 traduz-se em números na Tabela 5.7, e desta vez, após completar 153 dias de operação na carga de $6670 \text{ mg N.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$, correspondente aos dias 411 ao 564 após a partida do reator, as concentrações de nitrito na saída do reator PU apresentam uma forte tendência a subir, resultando em um percentual médio de 67%, enquanto que as concentrações de nitrato sofrem uma expressiva queda ao longo do período apresentado um valor médio de 4%. A remoção percentual de nitrogênio também caiu quando comparada com as Etapas 3-1 e 3-2, ficando em torno de 5%.

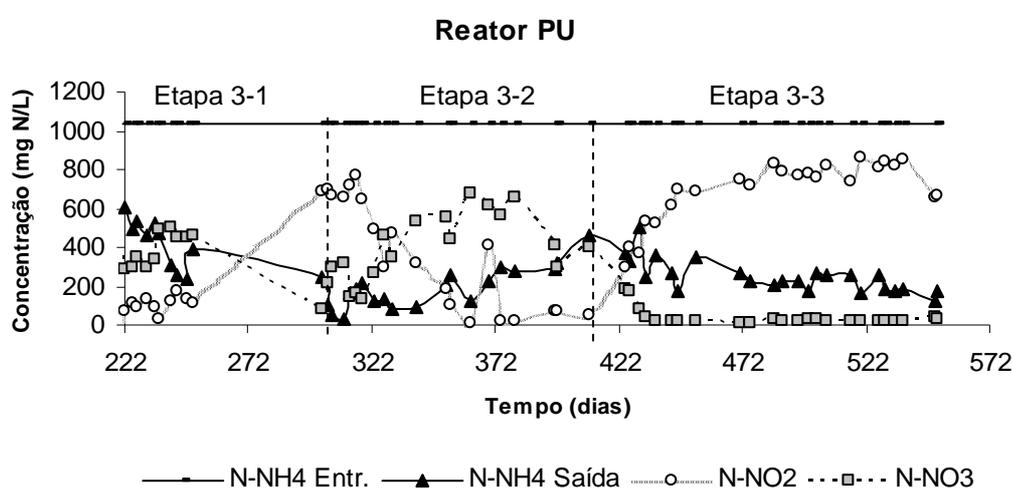


Figura 5.11: Acompanhamento analítico do reator PU durante a Etapa 3.

5.1.4 . Etapa 4

Nesta etapa, embora a carga do reator PU não tenha sido alterada, o seu comportamento diferiu dos reatores PVC e PS, sendo assim discutido separadamente (Figura 5.14). Esta etapa compreendeu os dias 407 ao 628 para os reatores PVC e PS, e dias 565 ao 732 para o reator PU (Tabela 5.7).

Reatores PVC e PS

Na Etapa 4, as cargas dos reatores PVC e PS foram elevadas de 2875 para 6670 mg N.m⁻².d⁻¹. O incremento na carga foi realizado através de uma redução no Tempo de Retenção Hidráulica (TRH) de 0,95d para 0,41d, mantendo-se a concentração do meio em 1035 mg N-NH₄⁺.L⁻¹, (Tabelas 5.1 e 5.3).

É possível observar-se nas Figuras 5.12 e 5.13 assim como na Figura 5.6, um aumento crescente na concentração de nitrito e redução na concentração de nitrato nos dois reatores, sendo que, no reator PS, a concentração de nitrito foi, em média, mais alta do que no reator PVC e a concentração de nitrato caiu para valores bem mais baixos no reator PS, indicando, provavelmente, uma possível supressão das bactérias oxidadoras de nitrito (BON).

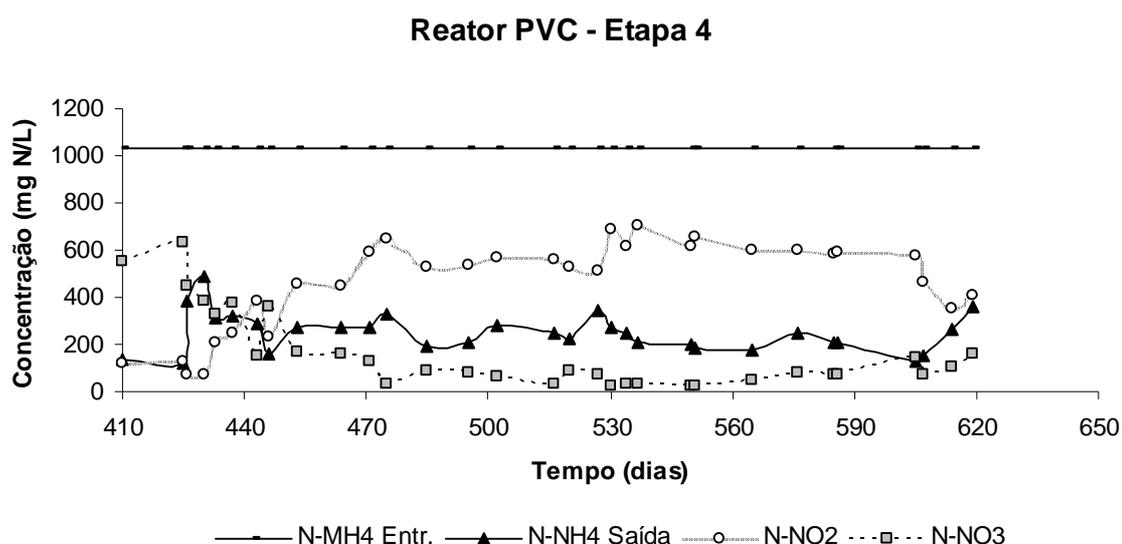


Figura 5.12: Acompanhamento analítico do reator PVC durante a Etapa 4.

Segundo van DONGEN *et al.* (2001), em temperaturas mais altas, acima de 20 °C, juntamente com um baixo TRH (tempo de retenção hidráulica) e pH acima de 7,0 as bactérias oxidadoras de nitrito podem ser seletivamente lavadas do sistema. Neste período, a temperatura média nos reatores encontrava-se em torno de 26 °C e o pH médio de 7,5. Para HELLINGA *et al.*, (1998), a energia de ativação dos dois grupos bacterianos (BOA e BON) e suas sensibilidades à mudança de temperatura são bem diferentes, assim, um aumento de temperatura

não apenas promove o crescimento das BOA, mas pode também expandir a diferença de velocidades específicas de crescimento entre BOA e BON, a qual foi verificada por outros pesquisadores (YOO et al., 1999). TONKOVIC (1998) observou acúmulo de nitrito em uma planta de lodos ativados durante o verão.

De acordo com BROUWER et al. (1996), em relação à velocidade específica de crescimento, apenas em temperaturas acima de 25 °C é possível que as bactérias oxidadoras de amônio vençam a competição com as bactérias oxidadoras de nitrito, no entanto, o oposto ocorre para temperaturas abaixo de 15 °C. PENG & ZHU (2006) comentam que, em outras palavras, não é necessário elevar excessivamente a temperatura para estabelecer nitrificação parcial, mesmo quando a temperatura é o único parâmetro para controle da nitrificação.

Neste pH médio de 7,5 em que se encontravam os reatores, uma maior concentração de amônia livre (NH_3) estaria presente no meio, o que poderia também ter contribuído para a seleção das BOA, pois segundo consta em ANTHONISEN *et al.* (1976), a amônia não ionizada é altamente inibitória tanto para *Nitrobacter* quanto para *Nitrosomonas*, entretanto, as *Nitrobacter* apresentam uma sensibilidade maior a tal composto do que as *Nitrosomonas*. Segundo YANG & ALLEMAN, (1992), a amônia livre é um inibidor competitivo da atividade da nitrito oxidoreductase, que está localizada na membrana celular da bactéria oxidadora de nitrito.

Outra possibilidade de seleção poderia ter ocorrido através da inibição das bactérias oxidadoras de nitrito (BON) devido à competição pelo oxigênio com as bactérias oxidadoras de amônia (BOA), já que a concentração de OD, no meio, nesta etapa, caiu para valores em torno de 0,5 mg de $\text{O}_2\cdot\text{L}^{-1}$, como mostram os perfis de OD apresentados posteriormente na Figura 5.28.

De acordo com PICIOREANU et al., (1997), os coeficientes de meia saturação para BOA e BON são respectivamente 1,2 – 1,5 mg/L. Logo, baixas concentrações de oxigênio dissolvido são mais restritivas para o crescimento das BON do que para o crescimento das BOA, resultando assim, no acúmulo de nitrito (PENG et al., 2004a).

Embora alguns pesquisadores relataram haver acúmulo de nitrito em baixas concentrações de OD, GARRIDO et al. (1997), encontrou que a velocidade de oxidação do amônio, assim como o acúmulo de nitrito alcançaram o máximo quando a concentração de OD era de 1,5 mg/L. Abaixo de 0,5 mg/L de OD

ocorreu acúmulo de amônio não oxidado. Comenta-se também que baixas concentrações de OD diminuem a velocidade da nitrificação e propicia o crescimento de bactérias filamentosas no lodo (PENG et al., 2004b).

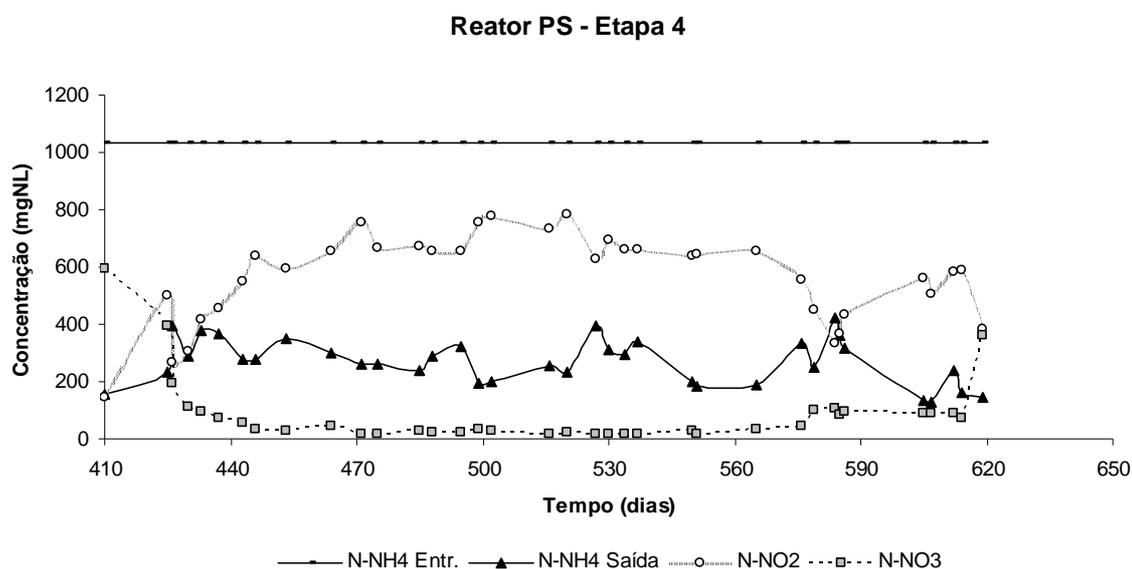


Figura 5.13: Acompanhamento analítico do reator PS durante a Etapa 4.

Os resultados obtidos, apresentando produção de nitrito e amônia não oxidada na saída dos reatores, configura-se em uma condição favorável ao estabelecimento do processo ANAMMOX nos reatores, muito embora, segundo consta na literatura, altas concentrações de nitrito possa ter efeito inibitório ao processo. Este de fato, parece ser um fator limitante do estabelecimento do processo ANAMMOX, uma vez que JETTEN *et al.*, (1999) indicam que concentrações de N-NO_2^- acima de 70 mg^{-1} já seriam inibitórias à *B. anammoxidans*. ABELLING & SEYFRIED (1992), sugerem que uma concentração de $0,13 \text{ mg/L}$ de nitrito seja tóxica para bactérias desnitrificantes. Deste modo, o desafio do uso deste tipo de sistema para obtenção do processo ANAMMOX parece ser o controle da formação de nitrito no reator.

Observa-se nesta fase um alto potencial de oxidação de amônia apresentado pelos reatores PVC, PS e PU: 4902, 5403, 5336 $\text{mg N.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$, respectivamente (os valores percentuais correspondentes estão apresentados nas Tabelas 5.5, 5.6 e 5.7), valores estes, próximos aos apresentados na literatura para reatores em escala de laboratório que gira em torno de 6000 mg

$\text{N.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$, (KINLI, 1999), e altíssimos quando comparados a dados de plantas de tratamento em grande escala (HIPPEN et. al., 1997).

Porém, a oxidação da amônia por si só, é apenas um passo para a sua eliminação, que posteriormente pode ser via autotrófica, em presença de nitrito, ou heterotrófica, em presença de matéria orgânica.

Reator PU

A Etapa 4 no reator PU ocorreu durante o período de 565 a 732 dias, e como se pode observar na Tabela 5.4, nenhuma modificação no reator em relação à Etapa 3 foi realizada. Ou seja, as condições operacionais do reator foram mantidas iguais: a carga aplicada ($6670 \text{ mg N.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$), o TRH (0,95d) e a concentração do meio ($1035 \text{ mg N-NH}_4.\text{L}^{-1}$). No entanto, houve uma importante modificação no desempenho do reator, a qual será explicada ao longo dos parágrafos seguintes.

Durante a Etapa 3, o reator PU, vinha acumulando nitrito em altas concentrações, que, em alguns momentos alcançou picos de $850 \text{ mg}^{\text{L}^{-1}}$ na saída do reator, e cuja média durante a referida etapa (etapa 3-3) foi de $692 \text{ mg N-NO}_2^{\cdot-}.\text{L}^{-1}$, correspondendo a um valor percentual médio de 67%, como se pode observar na Tabela 5.7.

Por volta do 565º dia, sem modificação alguma nas condições operacionais do reator, os valores percentuais de nitrato (N-NO_3^-) e nitrito (N-NO_2^-) no efluente do reator PU começaram a baixar (Figura 5.14) e giraram em torno de 32% e 11,6%, respectivamente. A remoção média de nitrogênio nesta fase foi de 50%, correspondendo a $3340 \text{ mg N.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$.

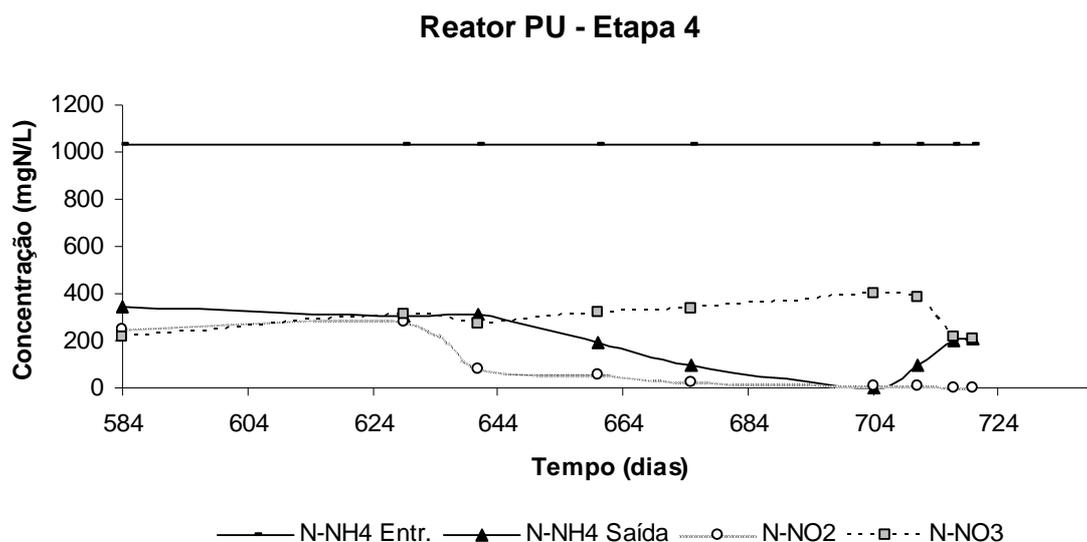


Figura 5.14: Acompanhamento analítico do reator PU durante a Etapa 4.

Esta elevada remoção de nitrogênio, alcançada após um período no qual concentrações de nitrito da ordem de $860 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ na saída do reator contradiz as informações que constam na literatura especializada sobre o efeito altamente inibidor do nitrito, tanto para as culturas nitrificantes, quanto para as culturas anammox. Provavelmente, houve uma aclimatação dos microrganismos envolvidos, às altas concentrações de nitrito encontradas no sistema por um período muito longo.

Muitas referências relatam valores diferentes de inibição por nitrito, no entanto, alguns fatores devem ser levados em consideração, especialmente o pH e o tamanho do agregado de células. STROUS, *et al.* (1998) verificaram inibição da atividade anammox quando a concentração de nitrito foi mais alta do que 5 mM ($70 \text{ mgN} \cdot \text{L}^{-1}$) por um longo período. Em outra referência, STROUS *et al.*, (1999), reportaram valores inibitórios em torno de $100 \text{ mgN} \cdot \text{NO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$. JETTEN *et al.* (1999) reportou que, valores em torno de 20 mM ($280 \text{ mg N} \cdot \text{NO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$) foram inibitórios, porém concentrações acima de 5 mM ($70 \text{ mg N} \cdot \text{NO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$) por um longo período de tempo poderia também causar inibição.

A remoção observada muito provavelmente ocorreu pelo estabelecimento do processo de oxidação anaeróbia da amônia (ANAMMOX), pois, juntamente com a observação do aumento da remoção de nitrogênio, houve também um aumento da população de bactérias anammox, fato este que pode ser

acompanhado pelas análises realizadas pelo método FISH (item 5.9.2), onde foi possível detectar-se a presença destas bactérias apenas no final da etapa quatro nos reatores PS e PU, não sendo possível antes. Além disso, as baixas concentrações de oxigênio dissolvido alcançadas nos reatores juntamente com a observação do decaimento da concentração de nitrito, aliado ao fato de que não havia material orgânico disponível, proveniente do desprendimento do biofilme e crescimento da biomassa aderida depositado no fundo dos reatores que poderiam, provavelmente, servir como fonte de carbono orgânico, configurando-se, portanto, em condições apropriadas para estabelecimento do processo ANAMMOX.

5.1.5 . Etapa 5

A etapa 5 para os reatores PVC e PS tem início no dia 629, estendendo-se até o dia 913 de operação (Figuras 5.15 e 5.16). Nesta etapa foram realizadas algumas modificações nos reatores, as quais estão descritas a seguir.

Reator PVC

No reator PVC introduziu-se na alimentação, uma fonte de carbono orgânico (acetato de sódio), conforme descrito no item 4.6 (Material e Métodos). A relação DQO/N aplicada inicialmente foi de 0,2 durante o período de operação de 655 a 780 dias, ou seja, uma relação baixa, pois o objetivo, ao se introduzir carbono era que este promovesse primeiramente, o crescimento de bactérias heterotróficas. Aumentando-se esta população, a concentração de OD no meio, seria reduzida e a espessura do biofilme, aumentada, fornecendo deste modo, condições mais favoráveis para o crescimento de bactérias anamnox.

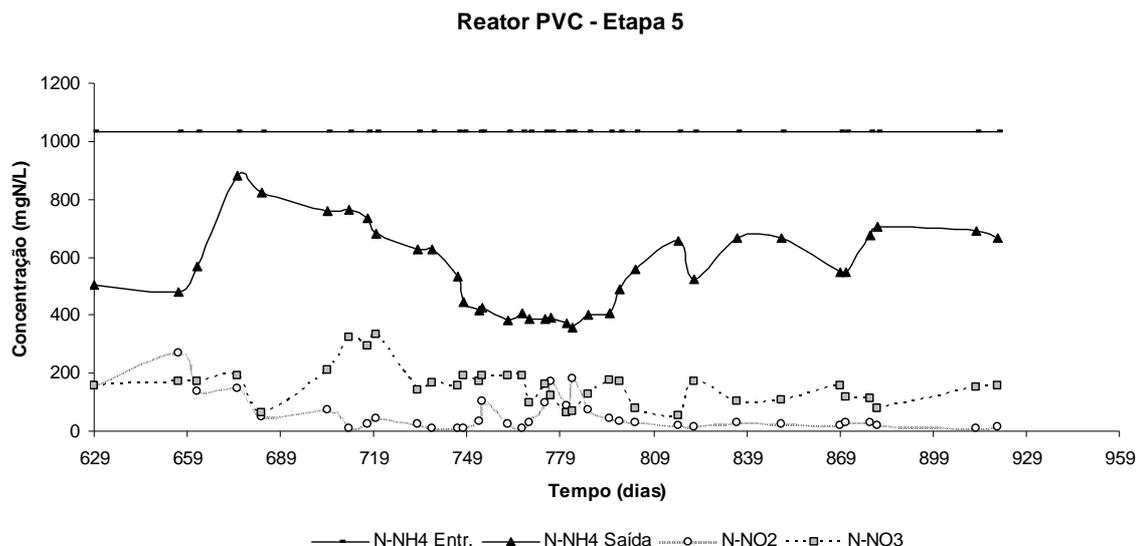


Figura 5.15: Acompanhamento analítico do reator PVC durante a Etapa 5.

Observou-se, que, embora a relação DQO/N aplicada tenha sido baixa, a nitrificação na Etapa 5 foi drasticamente afetada, encontrando-se no efluente deste reator, após a introdução da DQO, um percentual médio de amônia (N-NH_4^+) não oxidado em torno de 53% e de N-NO_2^- e N-NO_3^- de 4,2 e 13,2 % respectivamente (Tabela 5.5). Este fato pode ser relacionado com a baixa concentração de oxigênio dissolvido (em torno de $0,06 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$) encontrada no reator, causada provavelmente pela respiração das bactérias heterotróficas, ocasionando a falta de oxigênio para as bactérias nitrificantes. A remoção percentual de nitrogênio, que durante a Etapa 4 estava em torno de 12%, decresceu para cerca de 5% durante os 60 dias logo após a introdução da fonte de carbono, voltando a se recuperar, alcançando uma média de 34% ao final de 125 dias de operação na relação C/N de 0,2.

No período entre 781 e 913 dias de operação, a relação C/N foi elevada para 0,75, no entanto, os valores percentuais de amônio não oxidado, nitrato e nitrito na saída do reator PVC, assim como o percentual de remoção não sofreram modificações significativas, variando entre 2 a 3 pontos percentuais.

Quanto ao aumento da espessura do biofilme, este foi visível. Ao final do período de 913 dias a espessura do biofilme aumentou consideravelmente, chegando a preencher todo o espaço vazio entre as três primeiras placas do reator, completando uma espessura igual à distância entre as placas do mesmo

(0,7cm). Isto pode indicar ser esta uma boa condição para o desenvolvimento das bactérias ANAMMOX no reator PVC, pois o biofilme estava bem espesso promovendo, assim, áreas anóxicas nas partes internas do mesmo, configurando-se deste modo, um ambiente propício para o desenvolvimento de tais bactérias. A espessura do biofilme foi maior nas placas iniciais, próximas ao ponto de alimentação, diminuindo ao longo do reator, onde possivelmente o carbono já havia sido consumido.

Reator PS

Uma re-inoculação do reator PS foi realizada como parte da estratégia para obter o processo ANAMMOX. Os procedimentos adotados antes e após a re-inoculação estão descritos no item 4.6, e, apenas lembrando: a carga no reator PS foi reduzida até alcançar o valor de $2000 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{m}^2\cdot\text{d}^{-1}$. Nesta carga a concentração de N-NO_2^- na saída do reator encontrava-se abaixo de 50 mg, valor este, considerado seguro, de acordo com a literatura, para a não inibir as bactérias anammox. Neste momento, aos 670 dias de operação do reator PS, foi realizada a inoculação com lodo anaeróbio proveniente de lagoa de estabilização de um sistema de tratamento de dejetos de suínos que apresentava atividade ANAMMOX. Após a re-inoculação, o reator permaneceu sem alimentação durante três dias, para propiciar a adesão dos microrganismos às placas procedendo-se posteriormente à progressão de carga.

É possível observar-se na Tabela 5.6, e também nas Figuras 5.6 5.7 e 5.16, o comportamento apresentado pelo reator PS durante a Etapa 5. Percebe-se que até a aplicação da carga de $3500 \text{ mg N}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ a remoção de nitrogênio sofre uma queda gradativa até valores bem baixos, em torno de 3%. No entanto, quando a carga é reduzida para $2000 \text{ mg N}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$, a remoção começa a dar sinais de recuperação, aumentando conforme o aumento da carga aplicada, alcançando valores entre 37 e 30% para as cargas aplicadas de 2500 e 3000 $\text{mg N}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$.

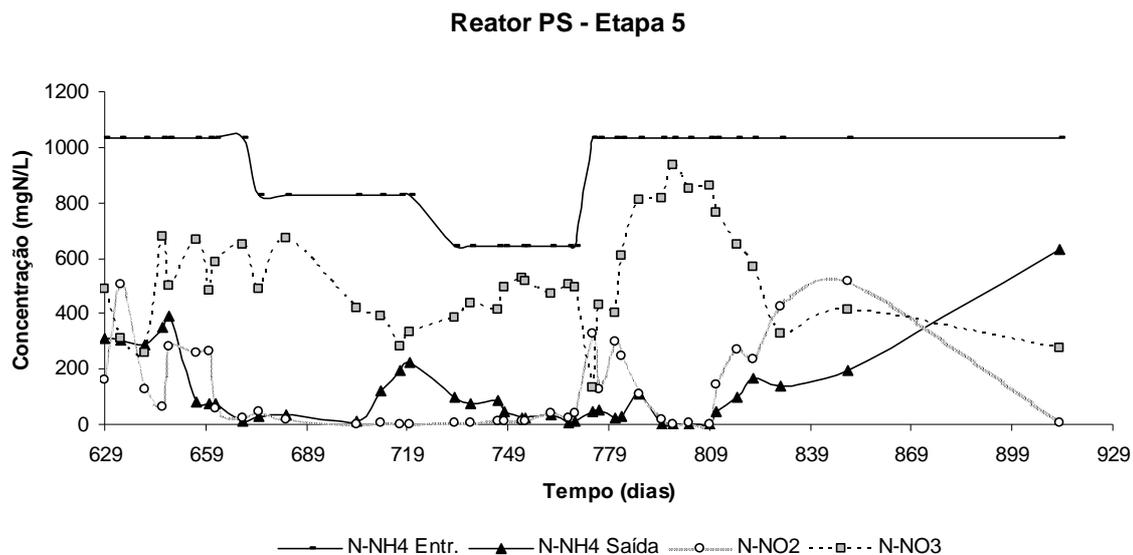


Figura 5.16: Acompanhamento analítico do reator PS durante a Etapa 5.

Os valores médios das concentrações de nitrito e amônia caem gradativamente ao longo do período, havendo um aumento da concentração percentual de nitrato na saída do reator, até o aumento de carga alcançar o valor de $3500 \text{ mg N.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$, onde verifica-se um aumento da concentração de nitrito alcançando-se valores médios de 318 mgN-NO_2^- na saída do reator, durante a carga de $4000 \text{ mg N.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$, sendo necessário um período bem mais longo para que as concentrações de nitrito caíssem abaixo de $50 \text{ mg N-NO}_2^-.\text{L}^{-1}$, percebendo-se, que, com os aumentos de carga aumenta-se o tempo até que caíam as concentrações de nitrito. No entanto, para a carga aplicada de $4500 \text{ mg N.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$, observa-se que o período para a queda do nitrito foi mais rápida, e que a remoção percentual sofreu uma recuperação alcançando o valor de 24%.

O fato relatado no parágrafo anterior poderia indicar, que, provavelmente o lodo com atividade anammox inoculado ao reator, necessitou de um período de enriquecimento e aclimatação às novas condições impostas, até iniciar o processo de remoção de forma mais intensa. PYNAERT *et al.*, (2003) trabalhando com um reator de biodiscos, após 200 dias de operação inoculou lodo anaeróbio granular proveniente de uma fábrica de processamento de batatas, alcançou após um período de 615 dias da inoculação do lodo anaeróbio, uma remoção média de 86% de nitrogênio, com cargas aplicadas na faixa de 675 a $1189 \text{ mg de N.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ (4714 a $8304 \text{ mg N.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$).

Reator PU

A Etapa 5 está definida entre os dias 798 a 913 de operação (Figura 5.17). Tendo em vista, que, ao final da Etapa 4 alcançou-se uma remoção de nitrogênio de 50%, procedeu-se, na Etapa 5, a mais um aumento de carga, desta vez, elevando-se de 6670 para 8280 mgN-NH₄⁺.m⁻².d⁻¹, através do aumento da concentração do meio de alimentação, de acordo com a Tabela 5.4. Os resultados contidos na Tabela 5.7 demonstram agora, uma queda das concentrações percentuais de nitrito e nitrato na saída do reator de 3 e 8%, respectivamente, um percentual de amônio oxidado de 51% correspondendo a 4223 mg N.m⁻².d⁻¹, e o reator PU exibindo uma remoção percentual média de 40%, ou seja, 3312 mg N.m⁻².d⁻¹, percebendo-se, assim, que praticamente não houve variação em termos de remoção de nitrogênio por área superficial, a qual era de 3340 mg N.m⁻².d⁻¹ no final da Etapa 4, passando para 3312 mg N.m⁻².d⁻¹.

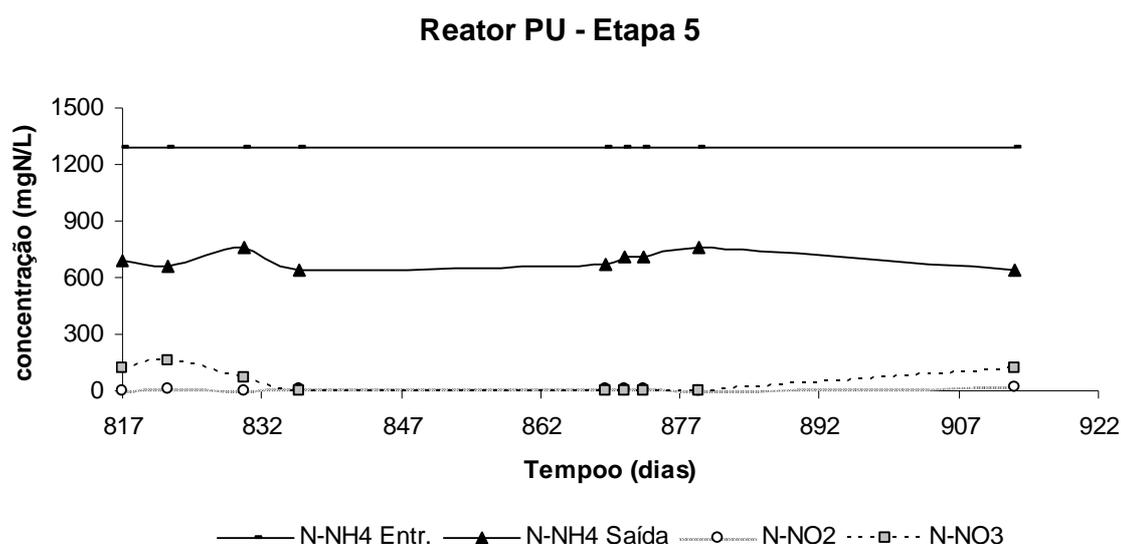


Figura 5.17: Acompanhamento analítico do reator PU durante a Etapa 5.

5.2 . CONSIDERAÇÕES SOBRE O DESEMPENHO DOS REATORES

Como já comentado anteriormente no item 4.3 (Material e Métodos), apenas para relembrar, ao se inocular os reatores, uma razoável quantidade de

lodo ficou depositada no fundo destes, mesmo após a constatação visual da formação de uma fina camada de biofilme aderido às placas.

Sabe-se, pois, que este material celular de fundo pode conter uma grande quantidade de células mortas, que poderia servir como fonte de carbono para as bactérias heterotróficas presentes no meio, tornando possível, assim, a remoção de nitrogênio pelo processo heterotrófico; processo este, não desejado para os objetivos deste trabalho. Além disso, este lodo poderia apresentar, também, atividades nitrificante e desnitrificante autotrófica, que se somaria às mesmas atividades desenvolvidas pelas células aderidas aos biodiscos.

O que se observa na Figura 5.6, na Etapa 1, após o dia 107, quando se removeu todo o material em suspensão do fundo dos reatores, que não houve nenhuma alteração significativa do percentual de remoção de N obtido, levando-nos a crer que esta remoção não poderia ser atribuída a um processo heterotrófico, já que não mais havia material orgânico depositado no fundo dos reatores. Ou, talvez, a desnitrificação heterotrófica poderia ter ocorrido, porém, de modo não significativo.

Durante o período inicial (Etapa 1), a concentração de OD nos reatores era em torno de $7,0 \text{ mg de O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$, indicando, assim, uma condição aeróbia tanto nos reatores como no biofilme, pois, após 107 dias, a espessura do biofilme era ainda muito fina, não apresentando profundidade suficiente para obtenção de condições anóxicas e estabelecimento do processo ANAMMOX. De acordo com HAO *et al.* (2002), que utilizaram um programa de simulação e dados da literatura para reatores em biofilmes, seria necessário uma espessura de biofilme mínima de 1mm, para obter-se remoção de amônio em etapa única.

Apesar disto, foi observada uma remoção de aproximadamente 30% nos reatores, mesmo após a retirada do lodo de fundo, que poderia fornecer carbono para a desnitrificação heterotrófica. Sendo assim, uma outra possibilidade de remoção de nitrogênio seria pelo processo de desnitrificação autotrófica aeróbia, pois, segundo PHILIPPOT (2002), pode ocorrer desnitrificação em presença de oxigênio, neste caso, os microrganismos relatados são: *Paracoccus pantotrophus*, *Microvirgula aerodesnitrificans* e *Thauera mechernichensis*, esta última, isolada de um sistema de tratamento de efluentes com biodiscos. Não pode ser descartada, entretanto, a possibilidade de que a remoção observada nos reatores possa ter sido realizada pelo processo NOx, descrito aqui em maiores detalhes no

item 3.3.2 (d). Neste processo, segundo BOCK *et al.* (1996), na presença de compostos NO_x, como NO e NO₂, organismos do tipo *Nitrosomonas* nitrificam e desnitrificam simultaneamente, mesmo sob condições completamente aeróbias, com N₂ como o principal produto.

SCHMIDT & BOCK (1997, 1998), mostraram que bactérias oxidadoras de amônia são capazes de desnitrificar produzindo óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N₂O) e nitrogênio (N₂). Tais compostos gasosos de nitrogênio são produzidos por uma variedade de mecanismos, incluindo redução do nitrito sob condições aeróbias via nitrito redutase (RITCHIE & NICHOLAS 1972), a oxidação da hidroxilamina ocorre sob condições aeróbias (POTH & FOCHT, 1985).

Com o intuito de verificar a presença de remoção de nitrogênio por via autotrófica aeróbia nos reatores durante a Etapa 4, após 558 dias de operação dos mesmos, realizou-se um teste em batelada sob condições completamente aeróbias, onde, a concentração de OD foi mantida em torno de 6,0 mg O₂.L⁻¹ através de aeração e agitação do reator. A biomassa foi coletada da 5^a. placa do reator PVC, a temperatura do teste foi mantida em 26 °C, o pH mantido em 7,5 e a concentração de sólidos suspensos totais foi de 0,64 gSST.L⁻¹. O meio inicial continha amônio (498,58 mg N-NH₄⁺.L⁻¹), soluções de macro e micro nutrientes (de acordo com as Tabelas 4.3 e 4.4) e bicarbonato de sódio.

Após 70 horas, uma remoção de nitrogênio em torno de 45% foi obtida e a velocidade específica de remoção foi de 124 mg N.m⁻².d⁻¹, comprovando-se, assim, a existência de remoção autotrófica aeróbia nos reatores (Figura 5.18), sem que houvesse adição dos óxidos de nitrogênio (NO ou NO₂).

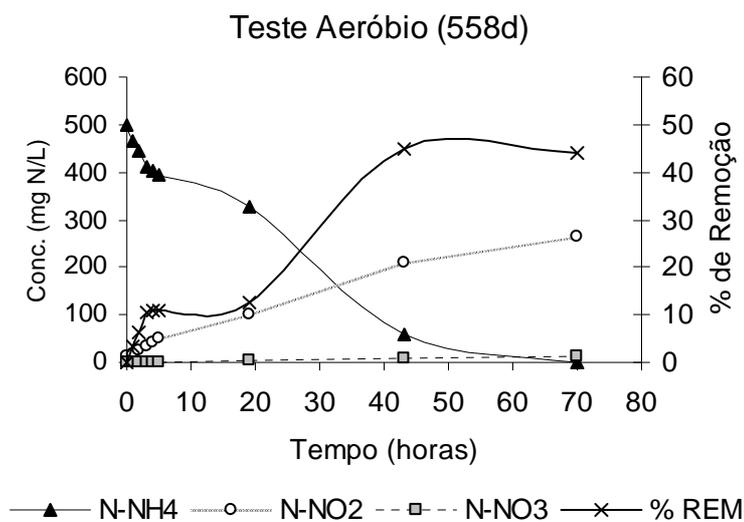


Figura 5.18 – Concentração e percentual de remoção de nitrogênio em função do tempo em teste aeróbio realizado com meio autotrófico.

LEITÃO *et al.* (2006) trabalhando com cultivos completamente aeróbios com uma cultura mista de bactérias nitrificantes em reator em batelada sequencial obteve eliminação de nitrogênio de até 50%. Os autores, a partir destes estudos concluíram que apresenta-se uma nova possibilidade metabólica das bactérias oxidadoras de amônio, até então, não explorada. Conseguiu-se, simultaneamente a oxidação aeróbia do amônio, e sua oxidação anaeróbia, via nitrito, sem a adição de indutor enzimático (NO), de acordo com o esquema apresentado na Figura 5.19.

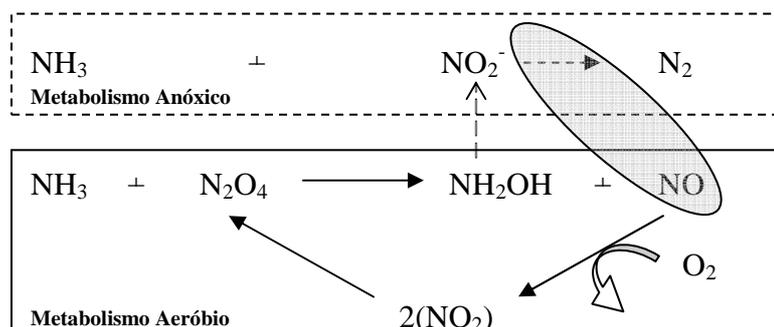


Figura 5.19: Representação esquemática do metabolismo simultâneo de nitrificação e desnitrificação, tendo o NO como indutor do metabolismo anóxico. Fonte: LEITÃO *et al.*, (2006).

Observa-se ainda na Figura 5.7, que o aumento da carga aplicada aos reatores nas Etapas 2, 3 e 4, provocou uma queda gradativa na remoção de nitrogênio. Deve-se ressaltar que o aumento de carga aplicado aos reatores tinha como objetivo a limitação do OD e a formação de nitrito para o estabelecimento do processo ANAMMOX. Entretanto, a queda de eficiência de remoção observada, poderia indicar uma inibição pelo substrato, já que com o aumento da carga havia um aumento de amônia livre (NH_3) no reator, e que sua concentração aumenta com o aumento de pH, sendo esta amônia livre tóxica para os microrganismos envolvidos. Outro fator inibitório seria devido à limitação de oxigênio, pois o oxigênio dissolvido no meio, poderia não ser suficiente até mesmo para as BOA oxidarem toda a amônia afluente ao reator, ou seja, a transferência de oxigênio para o meio líquido não é um processo dos mais fáceis, como já observado por muitos autores anteriormente. E ainda, a inibição poderia se dar pelo nitrito formado, já que, como visto anteriormente microrganismos envolvidos no processo de remoção via ANAMMOX, são sensíveis a nitrito, e segundo STROUS *et al.*, (1999), concentrações em torno de 100 mg.L^{-1} de nitrito são inibitórias para os mesmos. JUNG *et al.*, (2007) encontrou um valor um pouco mais baixo, de 70 mg.L^{-1} de N-NO_2^- , como sendo inibitórias para cultivos de bactérias anammox.

5.3 . PERFIS DE CONSUMO DE SUBSTRATO

Os perfis de consumo de substrato e formação de produtos apresentados nas Figuras de 5.20 a 5.27, tiveram como objetivo fornecer um conhecimento mais detalhado dos reatores em estudo, bem como, um melhor entendimento das transformações do nitrogênio ao longo dos mesmos.

5.3.1 . Reatores PVC, PS e PU - Etapa 1

As amostras para a análise dos compostos nitrogenados foram retiradas no 95^o. dia de operação, ao longo dos reatores, como descrito em Material e Métodos (item 4.7.5). Apesar da concentração de N-NH_4^+ na alimentação ser de 200 mg.L^{-1} nesta etapa, o valor mais alto observado dentro dos reatores foi um pouco acima de $50 \text{ mg N-NH}_4^+.\text{L}^{-1}$. Tal comportamento se repete em todas as outras etapas, o que provavelmente se deve a um efeito de diluição, onde o líquido próximo à saída dos reatores contendo baixas concentrações de amônia é misturado ao líquido na entrada, devido ao movimento rotacional das placas, fazendo com que a concentração de amônia, na entrada, sofra uma queda. Efeito semelhante foi observado por PYNAERT et al., (2001), quando um reator de biodiscos era alimentado com $450 \text{ mg N-NH}_4^+.\text{L}^{-1}$ e o valor de concentração de amônio mais alto encontrado dentro do reator era da ordem de $70 \text{ mg N-NH}_4^+.\text{L}^{-1}$.

Além disto, como pode ser observado nas Figura 5.20, há uma imediata oxidação do amônio, e já nos pontos mais próximos da alimentação, a concentração de amônia cai e a de nitrato sobe, nos primeiros dez centímetros do reator, sugerindo, assim, que a nitrificação completa é estabelecida entre as cinco e dez primeiras placas do reatores PVC e PS, e entre a terceira e quinta primeiras placas do reator PU, indicando um elevado potencial nitrificante do sistema neste intervalo, e ainda, que os reatores poderiam absorver cargas mais elevadas. Foi possível perceber, mesmo visualmente, que houve um maior escurecimento no conjunto inicial de placas, indicando uma maior concentração de microrganismos ali aderidos, confirmando o fato acima descrito, devido, provavelmente a uma maior oferta de substrato no ponto inicial, onde os reatores eram alimentados,.

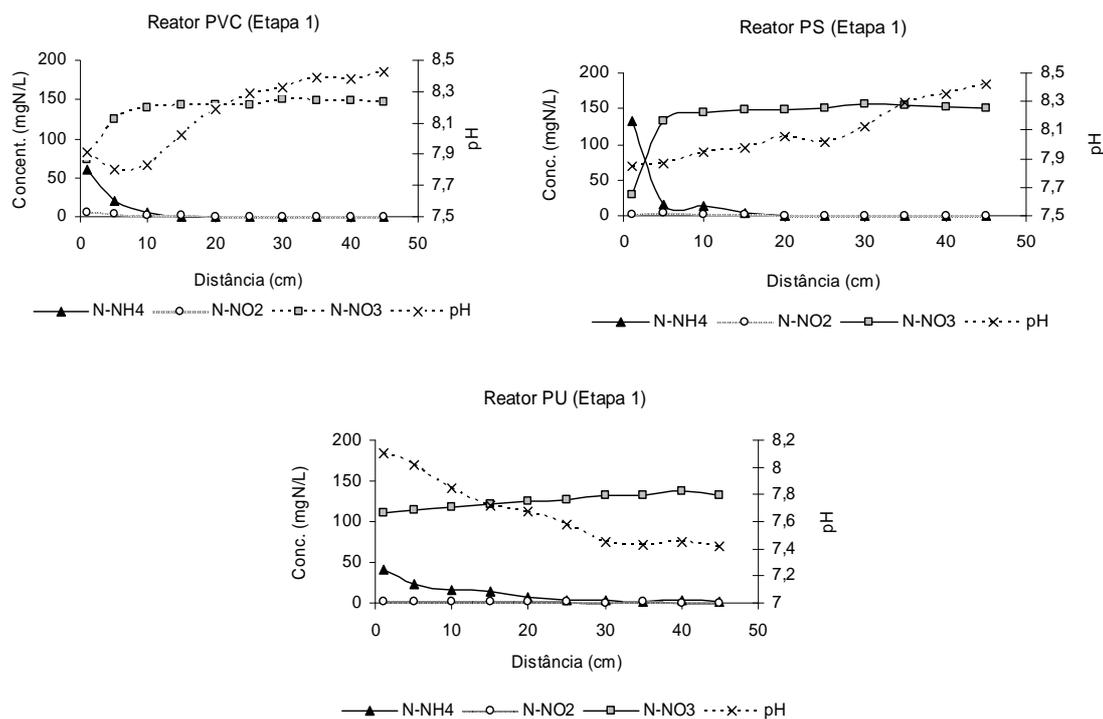


Figura 5.20: Análise detalhada dos componentes inorgânicos de nitrogênio (amônia, nitrito e nitrato) e pH ao longo do reator PVC, PS e PU durante a Etapa 1.

Ainda nos perfis apresentados na Figura 5.20, na Etapa 1 dos reatores PVC e PS, percebe-se um pH mais baixo no início, indicando, possivelmente, estar havendo naquela área um processo de nitrificação mais intenso, e depois, uma ligeira elevação do mesmo, mantendo-se mais ou menos estável ao longo dos reatores.

Observando-se mais atentamente, verifica-se que os perfis apresentados na Figura 5.20, para os três reatores são bastante semelhantes, apresentando o mesmo comportamento em relação às concentrações de nitrato nitrito e amônia, indicando uma estabilização dos mesmos ao final da etapa 1, fato este que também pode ser constatado observando-se os gráficos de acompanhamento da eficiência dos reatores na Figura 5.20.

5.3.2 . Reatores PVC, PS e PU - Etapa 2

Os perfis foram realizados no dia 195^o. de operação dos reatores. A carga mais alta do que na Etapa 1, aplicada na Etapa 2, (1425 mg N.m⁻².d⁻¹ para os reatores PVC e PS, e 3310 mg N.m⁻².d⁻¹ para o reator PU) ampliou um pouco mais o limite de utilização dos reatores PVC, PS e PU, pois durante a Etapa 1, as transformações dos íons nitrogenados ocorriam nos primeiros dez centímetros ao longo dos reatores, desde o ponto de alimentação. Já na Etapa 2, esta distância é aumentada e as concentrações de amônia e nitrito atingem valores próximos de zero na distância em torno dos 20 cm como se pode observar na Figura 5.21, indicando que cargas ainda mais altas podem ser aplicadas aos reatores.

Os perfis de concentração dos componentes nitrogenados dos três reatores são aqui, também, muito semelhantes, embora a carga aplicada ao reator PU seja bem mais alta do que a dos reatores PVC e PS, como mostra a Figura 5.21. A diminuição do pH observada, mais acentuada durante os 20 primeiros centímetros e com leve queda a partir deste ponto, é uma indicação do processo de nitrificação que estava ocorrendo ao longo dos reatores pois coincide com a oxidação do amônio a nitrato.

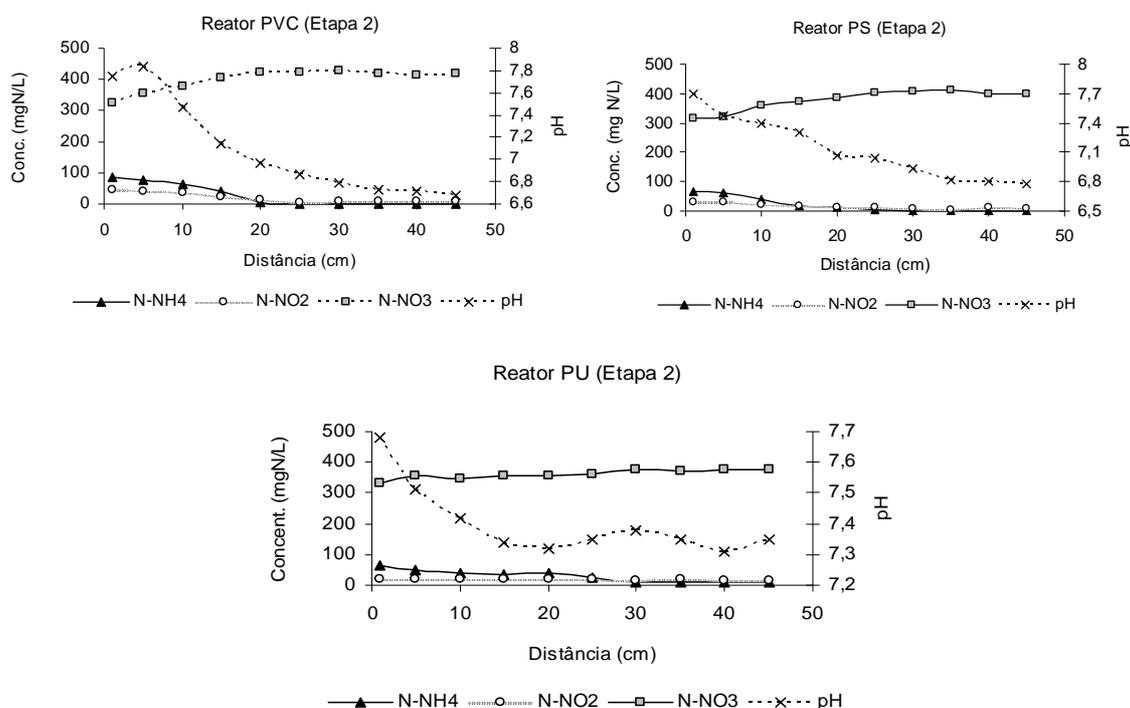


Figura 5.21: Análise detalhada dos componentes inorgânicos de nitrogênio (amônia, nitrito e nitrato) e pH ao longo do reator PVC, Etapa 2.

5.3.3 . Reator PVC e PS - Etapa 3

Os perfis na etapa 3 foram realizados aos 316^o. dias de operação dos reatores. Nos perfis apresentados nesta etapa na Figura 5.22, tanto para o reator PVC, quanto para o reator PS, é possível verificar, também aqui, a similaridade de comportamento, destes reatores. Estes perfis foram realizados aos 316 dias de operação, onde percebe-se que o equilíbrio nestes reatores se dá um pouco além dos 300 dias de operação (Figura 5.20), apresentando altas concentrações de nitrato e concentrações de nitrito e amônia bem próximas de zero. É possível perceber que os valores das concentrações de amônia e nitrito aproximam-se de zero em torno da distância dos 20 cm, tal qual os perfis realizados nas etapas 1 e 2, o que mostra que houve um enriquecimento da biomassa especializada, ainda maior nesta área dos reatores, do que nas Etapas 1 e 2.

Ao se observar a Tabela 5.6 contendo os resultados de NMP para BOA (bactérias oxidadoras de amônia) e BON (bactérias oxidadoras de nitrito), percebe-se que, embora aos 319 dias, durante a Etapa 3, a população de BON tenha caído bastante, elas continuavam produzindo nitrato em altas concentrações conforme apresentado nos perfis (Figura 5.22) e também na Figura 5.20.

Nesta etapa, a carga aplicada aos reatores em PVC e PS foi de 2875 mg N.m⁻².d⁻¹ e foi observada a produção de nitrito, que era um dos objetivos do aumento de carga, em concentrações em torno de 200 mg.L⁻¹, como pode ser observado na Figura 5.22.

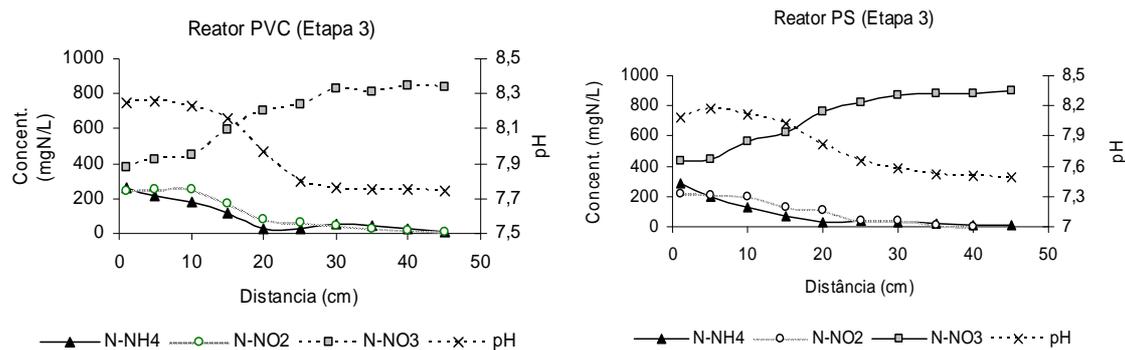


Figura 5.22: Análise detalhada dos componentes inorgânicos de nitrogênio (amônia, nitrito e nitrato) e pH ao longo do reator PVC, Etapa 3.

5.3.4 . Reatores PVC e PS - Etapa 4

Nesta etapa, a carga de nitrogênio aplicada aos reatores foi de $6670 \text{ mg N.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$. Os perfis aqui apresentados foram realizados aos 475 dias de operação, e nestes, observou-se um aumento significativo nas concentrações de nitrito, enquanto o nitrato, que sempre foi detectado nos perfis anteriores, não foi formado aqui.

O aparecimento de nitrito nos reatores PVC e PS nesta fase (Figura 5.23), deve-se, provavelmente, à redução da concentração do oxigênio dissolvido do meio, devido ao aumento de carga realizado, como foi observado. Este efeito pode afetar a população de bactérias nitrificantes, uma vez que as BOA têm uma maior afinidade pelo oxigênio do que as BON, prevalecendo em sistemas com pouco oxigênio dissolvido.

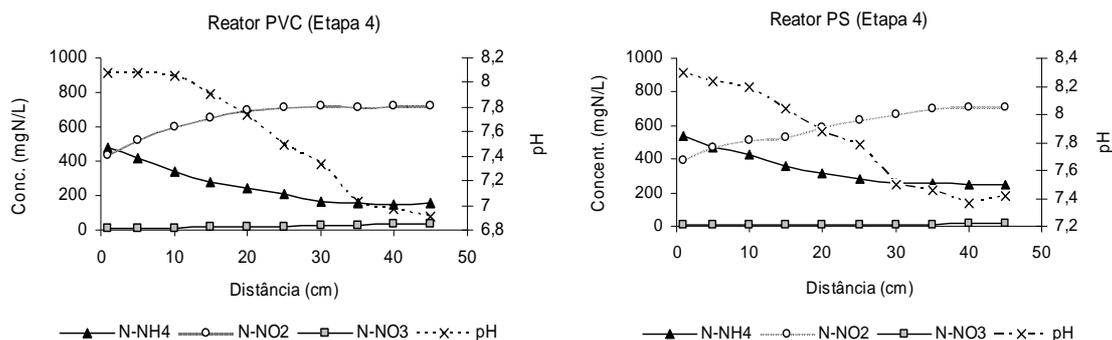


Figura 5.23: Análise detalhada dos componentes inorgânicos de nitrogênio (amônia, nitrito e nitrato) e pH ao longo do reator PVC, Etapa 4.

5.3.5 . Reatores PVC e PS - Etapa 5

O perfil apresentado na Figura 5.24, correspondente à Etapa 5, realizado aos 913 dias de operação do reator PVC, após a introdução de uma fonte de carbono, conforme mencionado anteriormente, difere de todos os outros perfis já apresentados para este reator, pois, desde o ponto mais próximo de alimentação as concentrações de amônio, nitrito e nitrato mantêm-se praticamente estáveis, não variando ao longo do reator, apresentando um alto teor de amônio residual não oxidado no reator. Provavelmente, esta não oxidação do amônio, observada no perfil, seja devida ao fato de que, com a introdução de DQO no reator, tenha ocorrido uma modificação da microbiota, propiciando o crescimento de bactérias heterotróficas, as quais utilizavam todo o oxigênio dissolvido do meio para metabolizar o carbono, não restando, assim, oxigênio suficiente para oxidar todo o amônio.

Cumprе ressaltar que após a introdução da DQO, um grande aumento na espessura do biofilme aderido nas placas, foi observado. Este fato também foi observado por HIPPEN *et al.*, (1997) e PYNART *et al.*, (2002). Segundo os autores, este rápido crescimento do biofilme após a adição de DQO, especialmente na série de discos mais próximas ao ponto de alimentação é um fenômeno relacionado às características de reatores do tipo plug-flow, onde as concentrações do substrato são sempre mais altas próximas ao ponto de alimentação, levando a um crescimento excessivo da biomassa e permitindo o

crescimento de bactérias heterotróficas nos discos, que serviria como uma matriz onde as nitrificantes poderiam crescer.

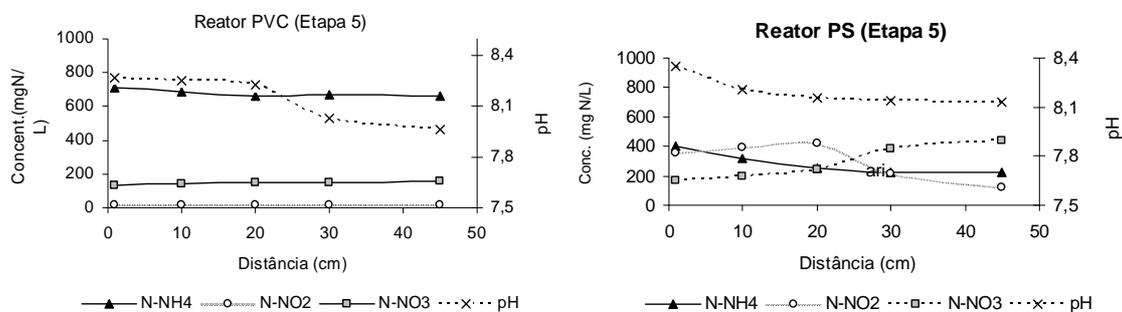


Figura 5.24: Análise detalhada dos componentes inorgânicos de nitrogênio (amônia, nitrito e nitrato) e pH ao longo dos reatores PVC e PS, Etapa 5.

No perfil exibido na Figura 5.24, relativo à Etapa 5 do reator PS, observa-se que as concentrações de amônia e nitrito diminuem enquanto que a de nitrato aumenta em torno de 20 a 30 cm ao longo do reator, ou seja, semelhante aos perfis mostrados anteriormente, onde as reações também ocorriam em torno dos 20-30 cm. O pH sofre uma ligeira queda, devido à ocorrência do processo de nitrificação, o qual, gera íons H^+ , fazendo com que o pH, no reator, diminua.

5.3.6 . Reator PU - Etapa 3

A Etapa 3 para o reator PU, compreendeu o período do dia 206 até o dia 564 de operação. O perfil apresentado na Figura 5.25, é relativo ao dia 538° de operação (Etapa 3-3), cuja carga aplicada era de $6670 \text{ mg N} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$.

As concentrações de amônia variaram entre 200 a 100 mgN-NH_4 , enquanto as de nitrato encontravam-se em valores bem próximos a zero ao longo do reator. No entanto as concentrações de nitrito se apresentavam entre 600 - 700 $\text{mgN-NO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$. Estas concentrações de nitrito são extremamente elevadas, e segundo JETTEN *et al.*, (1999), seriam suficientes para inibir irreversivelmente a atividade dos microrganismos anammox. Porém, deve-se destacar que os estudos de

inibição por nitrito realizados pelos autores, foi em biomassa suspensa. Nenhum dado na literatura refere-se a inibição anammox por nitrito em biofilme. Pode-se considerar aqui, que a espessura do biofilme no reator de PU seja a espessura do próprio material suporte, pela elevada porosidade apresentada pelo material. Desta forma, seria possível que a concentração de nitrito em contato com a biomassa mais interna do biofilme seja bastante inferior à determinada no líquido, o que protegeria os microrganismos anammox deste tipo de inibição. Esta característica dos reatores com biofilmes é destacada por HAO *et al.*, (2001).

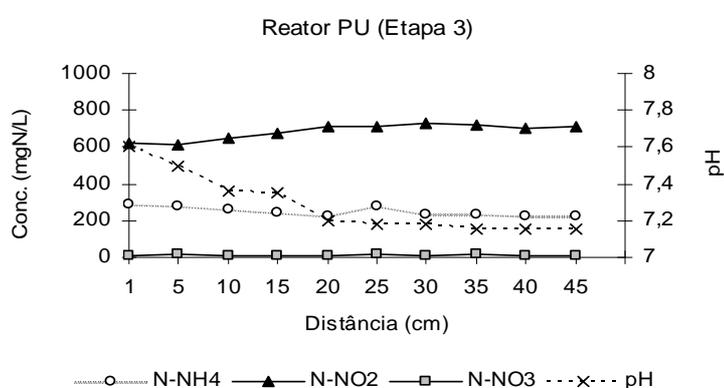


Figura 5.25: Análise detalhada dos componentes inorgânicos de nitrogênio (amônia, nitrito e nitrato) e pH ao longo do reator PU, Etapa 3.

5.3.7 . Reator PU - Etapas 4 e 5

O perfil apresentado na Etapa 4 para o reator PU foi realizado aos 720 dias de operação. A Etapa 4 correspondeu aos dias de operação ente 565 ao 732, e a carga aplicada era de $6670 \text{ mg N.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$. Observa-se neste perfil (Figura 5.26) que a concentração residual de nitrito e nitrato continuaram próximas àquela observada no perfil da Etapa 3 (Figura 5.25), entretanto, a concentração de amônia dentro do reator diminuiu bastante ficando um pouco abaixo de $200 \text{ mg N-NH}_4^+.\text{L}^{-1}$, obtendo-se, deste modo, uma remoção de nitrogênio da ordem de 50% nesta etapa, que corresponde a $3335 \text{ mg N.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$ (Tabela 5.7).

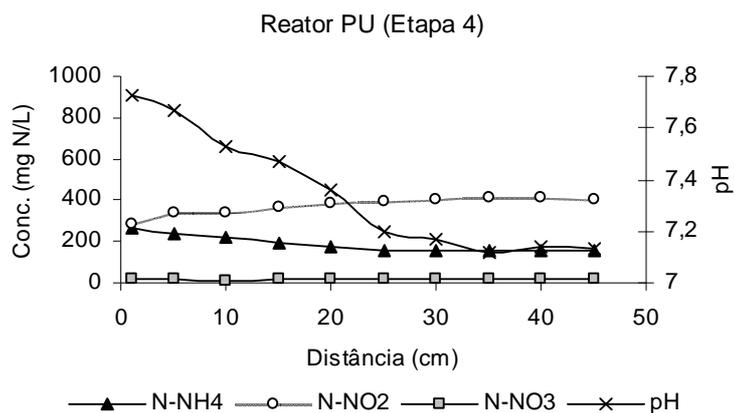


Figura 5.26: Análise detalhada dos componentes inorgânicos de nitrogênio (amônia, nitrito e nitrato) e pH ao longo do reator PU, Etapa 4.

Na Etapa 5 a carga aplicada foi mais elevada ($8280 \text{ mg N.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$) e o perfil de concentrações de íons nitrogenados e pH realizado na Etapa 5 para o reator PU que está apresentado na Figura 5.27 foi relativo ao dia 913 de operação. Observa-se que os valores de nitrito e nitrato encontram-se bem baixos, ao longo do reator, enquanto há uma concentração de amônia não oxidada muito alta, variando entre 800 e 700 mg-N-NH_4 ao longo do mesmo. De acordo com os resultados contidos na Tabela 5.7, sabe-se que, o percentual de remoção do reator PU na Etapa 5 foi em torno de 40%, ou seja, $3312 \text{ mg N.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$, apresentando concentrações percentuais de nitrito e nitrato na saída do reator de 3 e 8%, respectivamente, um percentual de amônio oxidado de 51% correspondendo a $4223 \text{ mg N.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$. Este alto residual de amônio não oxidado no reator deve-se, provavelmente à baixa concentração de oxigênio dissolvido no meio, como pode-se verificar na Figura 5.28, tornando-se insuficiente para oxidar a alta quantidade de amônio que é aportada ao reator por ocasião da alta carga aplicada que, neste caso é de $8280 \text{ mg N.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$. Entretanto, o aspecto mais importante observado nesta etapa, assim como na Etapa 4, foi a elevada remoção de cerca de $3300 \text{ mg N.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$, a qual é mais elevada do que a obtida por SIEGRIST *et al.*, (1998), que trabalhando com reator de biodiscos alimentado com efluente com baixa DQO e altas concentrações de nitrogênio amoniacal, obtiveram uma remoção da ordem de $2000 \text{ mg N.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$. Provavelmente, se aumentássemos a rotação dos discos, uma maior quantidade de amônia oxidada seria obtida.

É importante salientar que esta oxidação até nitrito, só foi obtida quando da aplicação de cargas mais elevadas ao reator, no entanto, esta alta carga aplicada na Etapa 5 gerou um alto residual de amônia na saída do mesmo, sendo considerada bastante elevada, se comparada à exigida pela legislação CONAMA 357 de 17 de março de 2005 fixada em $20 \text{ mgN} \cdot \text{L}^{-1}$, porém, o reator de biodiscos, reduziu cerca de 50% da elevada carga de N aplicada, o que torna o efluente muito mais adequado para um tratamento posterior pelos métodos convencionais da nitrificação/desnitrificação. Deste modo, esta característica do processo de eliminação de Nitrogênio via ANAMMOX com reatores de biofilmes, o configura como um eficiente pré-tratamento de águas residuárias com elevadas concentrações de nitrogênio.

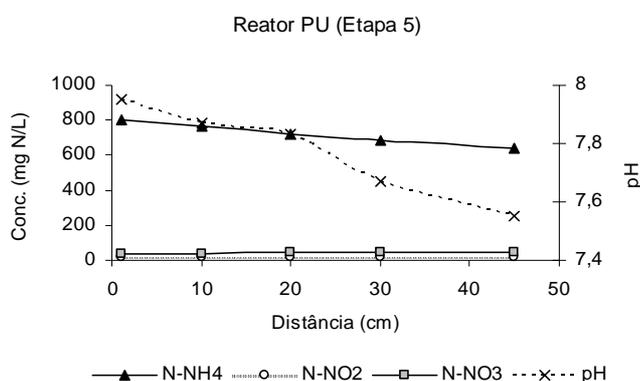


Figura 5.27: Análise detalhada dos componentes inorgânicos de nitrogênio (amônia, nitrito e nitrato) e pH ao longo do reator PU, Etapa 5.

5.4 . PERFIS DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO

Os perfis de oxigênio apresentados na Figura 5.28, são relativos aos dias de operação 430, 473 e 913 dias. Observa-se que as concentrações de OD nos reatores no dia 430 varia entre 0,3 e 0,5 $\text{mg de O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$, e no dia 473 tal variação vai de 0,6 a 0,4 $\text{mg de O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$, concentrações estas, bem baixas, significando um estado de limitação do OD nos reatores na Etapa 4.

No perfil de OD realizado no dia 913 de operação, o comportamento para os reatores PVC e PS é similar ao apresentado na Etapa 4, apenas para o reator PU as concentrações de OD foram um pouco mais baixas variando de 0,26 a 0,08 $\text{mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$.

As temperaturas medidas nos reatores, no momento da realização de tais perfis eram, respectivamente, 24 °C e 19 °C. Percebe-se que, embora haja uma variação de temperatura de 5 °C, a diferença na concentração de OD é pequena e varia em torno de 0,2 mg de O₂.L⁻¹. Esta observação é importante, pois constata-se que as concentrações de OD nos reatores mantêm-se em baixos valores mesmo durante o inverno, quando as temperaturas são mais baixas, o que facilitaria a dissolução do oxigênio no meio líquido.

Segundo o modelo proposto por HAO *et al.*, (2002) com uma concentração de oxigênio dissolvido no líquido em torno de 1,3 mg O₂.L⁻¹ e uma espessura mínima de biofilme de 1mm é uma condição apropriada para remoção do amônio pelo processo anammox. Neste caso, comparando-se com os dados fornecidos pelo autor, é de se esperar que, embora com uma espessura do biofilme menor do que 1mm, seja possível obter condições anóxicas no interior do mesmo, pois a concentração média de OD neste trabalho ($\cong 0,5\text{mg.L}^{-1}$) é bem mais baixa do que a indicada por HAO *et al* (2002).

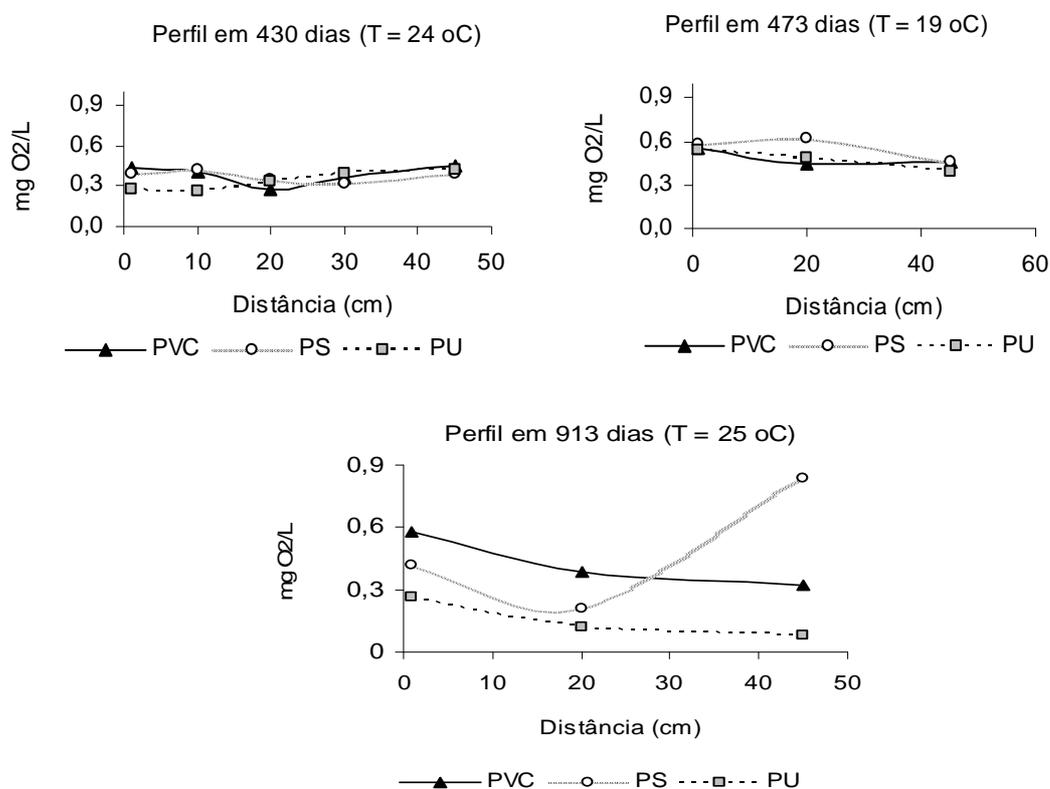


Figura 5.28: Perfil de oxigênio dissolvido nos reatores durante os dias 430 e 473 de operação, referentes à Etapa 4 nos reatores PVC e PS e Etapa 3 no reator PU, e Etapa 5 (913 dias) para todos os reatores.

5.5 . DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DE OXIDAÇÃO DO AMÔNIO

Na Tabela 5.4 são apresentados os dados obtidos a partir dos ensaios de respirometria da biomassa retirada dos biofilmes dos reatores de PVC, PS e PU aos 540 dias de operação. Os resultados obtidos pelos ensaios foram ajustados ao modelo cinético apresentado na Equação 4.10, item 4.7.3 (Material e Métodos). Para a determinação dos parâmetros cinéticos da biomassa, os dados apresentados na Tabela 5.8 são referentes aos valores já corrigidos obtidos pela Equação 4.7.

O modelo de Monod (item 4.7.3, Equação 4.11) também foi utilizado para ajustar os resultados obtidos. Porém, o modelo de Monod não apresentou um bom ajuste dos dados experimentais, obtendo-se, assim, valores muito baixos de R^2 , optando-se, então, por não apresentar-se aqui os parâmetros cinéticos obtidos por este modelo. O modelo de Andrews, por sua vez, inclui um parâmetro que representa inibição pelo substrato (K_i), e portanto, foi mais adequado para representar os resultados obtidos.

Inicialmente foi feita uma caracterização do inóculo, e os resultados dos parâmetros obtidos para o inóculo dos reatores, de acordo com o modelo de Andrews foram: $K_s = 1,5 \text{ mgN-NH}_4 \cdot \text{L}^{-1}$ e $K_i = 26,7 \text{ mgN-NH}_4 \cdot \text{L}^{-1}$.

Tabela 5.8: Parâmetros cinéticos da biomassa dos reatores PVC, PS e PU no dia 586 de operação.

Parâmetro	Reator PVC		
	5 cm	20 cm	40 cm
$K_s \text{ (mgN-NH}_4 \cdot \text{L}^{-1})$	484,1	261,3	100,2
$K_i \text{ (mgN-NH}_4 \cdot \text{L}^{-1})$	677,0	320,6	113,9
	Reator PS		
$K_s \text{ (mgN-NH}_4 \cdot \text{L}^{-1})$	329,6	123,6	-
$K_i \text{ (mgN-NH}_4 \cdot \text{L}^{-1})$	440,6	177,4	-
	Reator PU		
$K_s \text{ (mgN-NH}_4 \cdot \text{L}^{-1})$	133,8	101,0	75,1
$K_i \text{ (mgN-NH}_4 \cdot \text{L}^{-1})$	331,8	296,3	250,1

Quando observamos os valores de K_s ao longo dos três reatores (Tabela 5.4), percebe-se uma diminuição deste parâmetro, podendo indicar que, as bactérias oxidadoras de amônio, no início e no final do reator encontram-se em estados fisiológicos completamente diferentes, provavelmente pela diferença de concentração de substratos nos pontos estudados.

Os parâmetros K_i de todos os reatores, apresentados na Tabela 5.4 comparados ao inóculo aumentaram bastante, indicando a adaptação da biomassa dos reatores às elevadas concentrações de amônio, uma vez que concentrações bem maiores deste substrato são necessárias para diminuir a sua atividade de oxidação de amônio. De forma geral, este parâmetro ao longo dos reatores tende a baixar, indicando um aumento da inibição pelo substrato ao longo dos reatores. Entretanto, os diferentes valores de K_i encontrados nos ensaios podem estar relacionados, não apenas com a concentração do substrato amônio, mas com o produto nitrito (não analisado durante os ensaios de respirometria), que provavelmente chegaram a níveis bem elevados e também são inibidores da atividade de oxidação de amônio.

5.6 . Ensaio de Atividade Autotrófica Anaeróbia de Eliminação de Nitrogênio

A biomassa foi retirada aos 899 dias de operação dos reatores para a realização do teste de atividade anammox, uma vez que neste período era observada uma remoção de nitrogênio da ordem de $2134 \text{ mg N.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$, $1080 \text{ mg N.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$ e $3312 \text{ mg N.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$ para os reatores PVC, PS e PU, respectivamente. As concentrações celulares utilizadas neste teste foram $3,32 \text{ g SST.L}^{-1}$ (PVC), $2,75 \text{ g SST.L}^{-1}$ (PS) e $2,72 \text{ g SST.L}^{-1}$ (PU), enquanto que as concentrações de amônio e nitrito foram de $100 \text{ mg N-NH}_4.\text{L}^{-1}$ e $25 \text{ mg N-NO}_2.\text{L}^{-1}$. O procedimento para realização do teste está descrito no item 4.7.4 (Material e Métodos).

A Figura 5.29 apresenta o resultado do teste de atividade anammox para os três reatores. Nesta é possível observar que as concentrações de amônio e nitrito não mudam em função do tempo para os reatores PVC e PS, evidenciando

que não foi possível verificar remoção anaeróbia nestes dois reatores. No entanto, observa-se que no reator de PU, tanto as concentrações de amônio (Figura 5.29 (a)) como de nitrito (Figura 5.29 (b)) diminuem ao longo das 72 horas de teste, sendo possível verificar uma remoção anaeróbia de 23% de nitrogênio. As concentrações de amônio baixaram de 91,23 para 76,5 mgN-NH₄.L⁻¹, ou seja, em 72 horas foram consumidas 14,73 mgN-NH₄.L⁻¹, o que resulta em uma velocidade de remoção específica, tendo nitrito como acceptor de elétrons de 1,8 mgN-NH₄.gSSV⁻¹.d⁻¹, ou seja, uma velocidade muito baixa, quando comparada à velocidade de remoção obtida por PYNAERT *et al.* (2004), onde os autores, utilizando um bio-reator de filme fixo inoculado com lodo proveniente de um reator de biodiscos rotativos, obteve, em um teste realizado em condições anaeróbias dentro do próprio reator, uma velocidade específica de remoção de 434 mgN-NH₄.gSSV⁻¹.d⁻¹.

Esta baixa atividade obtida nos testes cinéticos, pode, provavelmente, ser explicada pelo fato de que, ao realizar-se o teste anaeróbio, a biomassa foi retirada das placas e homogeneizada, e isso pode ter causado danos fisiológicos, ou mesmo exposto as bactérias anammox ao contato com oxigênio no momento da raspagem, além de desfazer a estrutura do biofilme formado. Segundo SHIMKETS & BRUN (1999), a formação de biofilmes constitui uma forma de desenvolvimento microbiano. De acordo com estes autores, modificações na forma podem se refletir em mudanças nas relações entre indivíduos e grupos de células; isto é, a bactéria resiste a uma transição da forma livre para uma existência baseada em uma complexa comunidade de organismos, na qual os microrganismos devem integrar sinais interna e externamente, tomar substrato de seus vizinhos pela determinação de sua densidade e espécie e coordenar uma série de comportamentos multicelulares sincronizados que estão provavelmente associados às mudanças morfológicas.

O'TOOLE *et al.*, (2000) relata também, que, embora alguns conceitos gerais possam ser aplicados à formação de todos os biofilmes, existem muitos comportamentos específicos de determinadas espécies que refletem uma necessidade única de cada microrganismo que compõe o biofilme. É importante, então, ter em mente, que a maioria dos biofilmes representa um consórcio de múltiplas espécies. As múltiplas espécies de biofilmes seguramente desenvolvem a habilidade de se comunicarem entre si e sugerem a possibilidade de

organismos em particular que desempenham papéis especializados na comunidade.

Estas observações parecem ser particularmente importantes no processo anammox, onde se sabe que várias espécies de microrganismos estão envolvidos e trabalham em uma perfeita simbiose, segundo o modelo proposto por EGLI *et al.*, (2003), apresentado no item 3.5.3.

A bioquímica do processo anammox também não está totalmente esclarecida, mas sabe-se que compostos como o NO e NO₂ gasosos induzem enzimas como a nitrito redutase, essencial para a formação da hidroxilamina, que é o real substrato para a oxidação do amônio pelo processo anammox (van de GRAAF *et al.*, (1997).

Refletindo-se sobre as informações transmitidas pelos parágrafos anteriores, provavelmente, se houvesse a possibilidade de realizar-se o teste anaeróbio nos próprios reatores, seria possível medir-se a real remoção anaeróbia dos mesmos, no entanto, esta alternativa, infelizmente, não foi possível de ser executada nas condições operacionais dos reatores naquele momento.

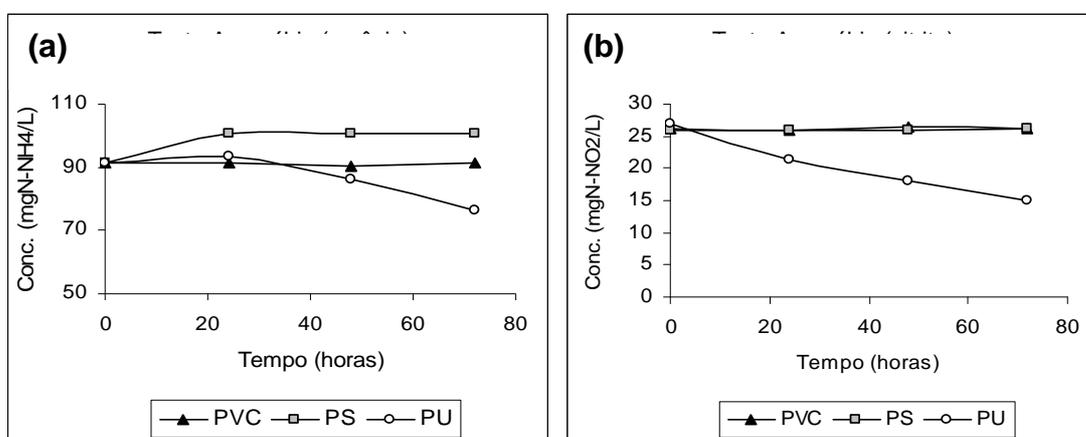


Figura 5.29: Teste cinético de atividade anammox com biomassa suspensa para os reatores PVC, PS e PU. (a): Concentrações de amônio no teste anaeróbio, (b) Concentrações de nitrito no teste anaeróbio.

Na mesma biomassa do reator PU, adicionou-se mais nitrito ao teste, alcançando-se uma concentração de 69,32 mg N-NO₂.L⁻¹ dentro do frasco do ensaio, e manteve-se o teste anaeróbio, pois, a princípio, imaginou-se que a baixa

remoção do reator PU poderia, provavelmente, ser devida à baixa concentração de nitrito do primeiro teste, que era de 25mgN.L^{-1} .

A Figura 5.30 (a) e (b) apresenta os resultados do segundo teste; nela, observa-se que, desta vez, não houve remoção anaeróbia no reator PU, pois, as concentrações de amônia e nitrito permaneceram inalteradas durante todo o teste, o que provavelmente ocorreu devido à uma inibição pelo nitrito, que, neste caso, devido à estar em uma concentração mais alta ($69,32\text{ mg N-NO}_2.\text{L}^{-1}$) poderia ter sido inibitório para as bactérias anammox, já que, devido à raspagem do biofilme e sua exposição ao ar, como já comentado anteriormente, estariam mais suscetíveis a estas concentrações.

5.7 . Ensaio de Atividade Autotrófica Aeróbia de Eliminação de Nitrogênio

Devido a não observação de remoção anaeróbia no primeiro teste com as biomassas dos reatores de PVC e PS, injetou-se 50 cm^3 de ar nos mesmos frascos utilizados no primeiro teste.

Na Figura 5.30 (a) e (b), pode-se observar os resultados obtidos nestes ensaios. As concentrações de amônia e nitrito diminuíram, não sendo detectada a presença de nitrato ao longo do teste. Desta forma, demonstrou-se, que houve remoção aeróbia autotrófica de nitrogênio pelas biomassas dos reatores PVC e PS.

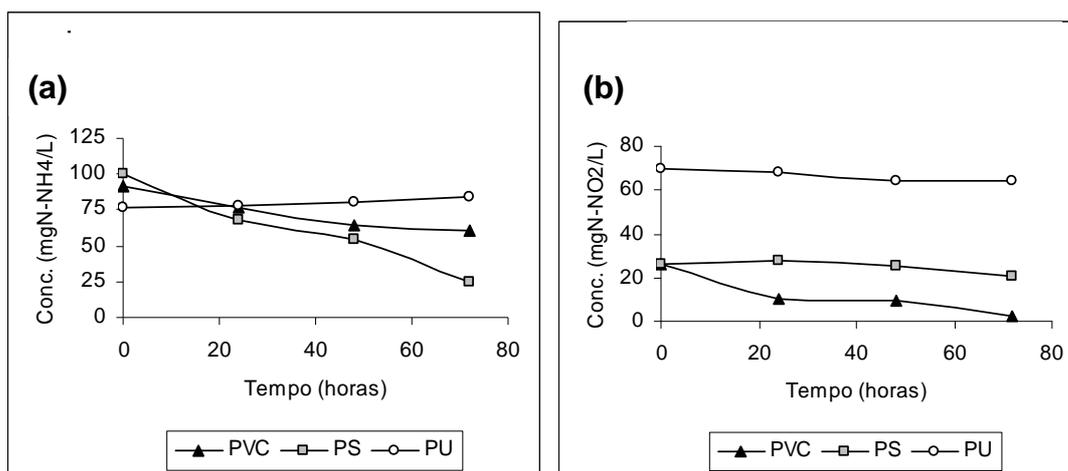


Figura 5.30: Teste cinético de atividade aeróbia para os reatores PVC e PS e de atividade anammox para o reator PU com biomassa suspensa. (a) Concentrações de amônia no teste aeróbio para os reatores PVC e PS e continuação do teste anaeróbio para o reator PU. (b) Concentrações de nitrito para teste aeróbio nos reatores PVC e PS e continuação do teste anaeróbio no reator PU.

Para a biomassa do reator PVC, as concentrações de amônio caíram, ao longo de 72 horas de teste, de 91,33 para 61,14 mg N-NH₄.L⁻¹, enquanto as de nitrito, foram de 26,21 para 2,6 mg N-NO₂.L⁻¹, obtendo-se uma remoção de nitrogênio de 46% e uma velocidade específica de remoção de nitrogênio de 5,39 mg N.m⁻².d⁻¹. Para a biomassa do reator PS, as concentrações de amônio caíram de 100,86 para 68,33 mg N-NH₄.L⁻¹, enquanto as de nitrito foram de 26,21 para 20,65 mg N-NO₂.L⁻¹ correspondendo a uma remoção de nitrogênio de 64% e uma velocidade específica de remoção de nitrogênio de 9,93 mg N.m⁻².d⁻¹.

Devido a um residual de amônio e nitrito ao final do segundo teste aeróbio com a biomassa dos reatores PVC e PS, borbulhou-se mais 50 cm³ de ar nos mesmos frascos, objetivando-se verificar se o processo de remoção estacionou devido à baixa concentração de nitrito após 72 horas, ou, se por falta de oxigênio dissolvido no meio.

No teste com a biomassa do reator PU, após o término do teste anaeróbio, borbulhou-se também 50 cm³ de ar, para verificar a ocorrência de remoção de nitrogênio pela via autotrófica aeróbia no mesmo.

A Figura 5.31 (a) e (b) apresenta os resultados obtidos nestes testes para os reatores PVC, PS e PU. Nela observa-se, que, em todos os reatores a

concentração de amônio vai a zero ou valores bem baixos durante as primeiras 24 horas de teste.

No teste aeróbio com a biomassa do reator PVC, a concentração de amônio no início do teste era de 61,14 caindo para 2,56 mg N-NH₄.L⁻¹ durante as primeiras 24 horas do teste, mantendo-se assim até o final (72 horas), enquanto que a concentração de nitrito no início do teste era de 2,6 mg N-NO₂.L⁻¹ caindo a zero após 24 horas obtendo-se uma remoção de 96%, e uma velocidade específica de remoção de nitrogênio de 18,4 mg N.m⁻².d⁻¹.

Nos ensaios com as células retiradas do reator PS, as concentrações iniciais de amônio (24,62mg N-NH₄.L⁻¹) e nitrito (20,65mg N-NO₂.L⁻¹) já eram baixas desde o início do teste, caindo para zero em 24 horas. A remoção aqui foi de 99% uma velocidade específica de remoção de nitrogênio de 16,36 mg N.m⁻².d⁻¹.

Na biomassa do reator PU, a concentração inicial de amônio era de 84,49mg N-NH₄.L⁻¹ e de nitrito de 64,19mg N-NO₂.L⁻¹, as quais, durante 24 horas caíram para 6,12mg N-NH₄.L⁻¹ e 48,56mg N-NO₂.L⁻¹, respectivamente e a remoção aqui foi de 63% uma velocidade específica de remoção de nitrogênio de 28,27 mg N.m⁻².d⁻¹.

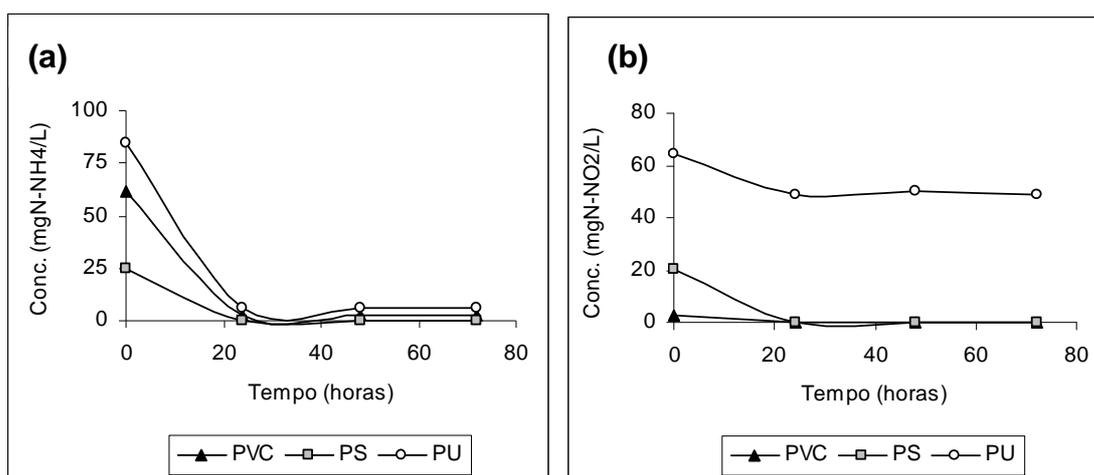


Figura 5.31: Teste cinético de atividade aeróbia para os reatores PVC, PS e PU com biomassa suspensa. (a) Concentrações de amônia em teste aeróbio para os reatores PVC, PS e PU. (b) Concentrações de nitrito em teste aeróbio para os reatores PVC, PS e PU.

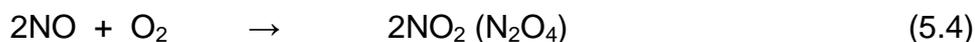
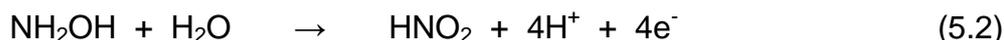
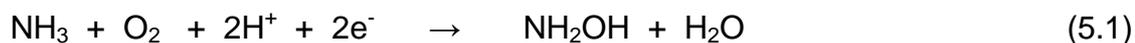
Os resultados obtidos nos testes aeróbios autotróficos de remoção de nitrogênio demonstram um aumento na velocidade específica de remoção para os reatores PVC e PS, aparentando provavelmente, uma aclimatação dos microrganismos envolvidos, melhorando, assim, o seu desempenho. No entanto, dentre os biofilmes testados, a biomassa removida do reator PU foi a que apresentou a mais alta velocidade específica de remoção aeróbia de nitrogênio, assim como, foi a única que apresentou remoção anaeróbia, indicando que, provavelmente, o poliuretano foi o material, dentre os testados, que demonstrou um melhor desempenho. Os ensaios cinéticos demonstraram a flexibilidade metabólica dos microrganismos constituintes das biomassas em termos de remoção de nitrogênio

A concentração inicial de oxigênio dissolvido (OD) medida nos frascos para os ensaios aeróbios foi de 0,98 mg de $O_2.L^{-1}$. De acordo com SCHMIDT *et al.*, (2003), meios de cultivo cujas concentrações de OD estiverem acima de 0,8 $mgO_2.L^{-1}$ são considerados estar em condições aeróbias.

SCHMIDT *et al.*, (2003) relatou que as bactérias oxidadoras de amônia na presença de oxigênio ($>0,8 mg O_2.L^{-1}$), convertem amônia a nitrito. Em concentrações de OD abaixo de 0,8 $mg O_2.L^{-1}$, ou seja, condições restritivas de oxigênio, as mesmas utilizam pequenas quantidades do nitrito produzido como acceptor final de elétrons, produzindo NO , N_2O e N_2 . Na ausência de óxidos de nitrogênio, cerca de 15% da amônia convertida pode ser desnitrificada sob condições anóxicas.

Baseado nas informações do parágrafo anterior, acredita-se, provavelmente, que a explicação para a remoção aeróbia obtida no segundo e terceiro testes, seja que, inicialmente havia amônia juntamente com nitrito, no entanto, este nitrito inicial não foi utilizado pelas BOA para desnitrificação pois não havia condições restritivas de OD no meio de cultivo para formação dos óxidos de nitrogênio. Deste modo, as BOA, em condições aeróbias transformaram a amônia presente, sob a ação da enzima amônia monoxigenase em hidroxilamina (Equação 5.1), a qual, é posteriormente oxidada a nitrito (óxido nitroso HNO_2), (Equação 5.2), assim, a concentração de oxigênio no meio foi diminuindo até atingir valores abaixo de 0,8 $mg de O_2.L^{-1}$ (condições restritivas de oxigênio). A partir deste momento, a produção de nitrito através da oxidação da amônia

começa a produzir óxidos de nitrogênio (NO, N₂O) em quantidades traço (Equação 5.3) (SCHMIDT *et al.*, 2003). O NO é oxidado produzindo NO₂ (N₂O₄) (Equação 5.4) onde o mesmo funciona como indutor da atividade desnitrificante das BOA produzindo nitrogênio gasoso tendo nitrito como acceptor final de elétrons (Equação 5.5) (Processo NOx).



A remoção de nitrogênio no segundo teste aeróbio autotrófico parou, provavelmente devido ao consumo de todo o OD do meio, ocorrendo, possivelmente, a interrupção do processo de oxidação da amônia, conseqüentemente, afetando a produção dos óxidos NO e NO₂, no entanto, este mecanismo de funcionamento dos óxidos de nitrogênio ainda não está suficientemente compreendido, sendo ainda, objeto de muitas pesquisas.

Cumprе ressaltar, que, a remoção de nitrogênio obtida nos testes aeróbios autotróficos, ocorreu sem que houvesse a adição dos óxidos NO₂ ou NO, e mesmo quando realizou-se o teste aeróbio descrito no item 5.2, página 94, cujas concentrações de OD do meio eram mantidas em torno de 6,0 mg O₂.L⁻¹, obteve-se remoção aeróbia autotrófica, levando-se a crer que provavelmente os óxidos de nitrogênio sejam formados pelas BOA, não só sob limitação de oxigênio, como também sob condições plenas de aeração, permitindo a formação do dímero N₂O₄, agente oxidante da amônia sob condições aeróbias e anaeróbias. É provável que alguma espécie de BOA dentro do conjunto das que foram identificadas na biomassa dos reatores através dos testes FISH tenha esta habilidade em particular. Enfim, estes fatos devem ser investigados mais profundamente, para um maior conhecimento sobre estes microrganismos tão versáteis que são as bactérias oxidadoras de amônia.

HELMER & KUNST (1998) realizaram testes em batelada, nos quais, o meio era agitado e aerado constantemente, mantendo-se uma concentração de OD de $1,0 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ ao longo do experimento, e concentração celular de $3,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ e concentração de amônia de 60 mg N-NH_4^+ , utilizando meio completamente autotrófico e biomassa removida de um RBR, ou seja, condições semelhantes às utilizadas nos testes de aeróbios autotróficos, obtiveram uma remoção de Nitrogênio de 50% ao longo de 240 horas (velocidade específica de remoção: $1 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{gSST}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). No entanto a velocidade de remoção obtida pela biomassa nestes testes foi bem mais alta do que a velocidade obtida com a biomassa utilizada nos testes realizados por HELMER & KUNST (1998). Principalmente no terceiro teste, para o reator PU, onde a concentração inicial de amônio era de $84,49 \text{ mg N-NH}_4 \cdot \text{L}^{-1}$, caindo, durante 24 horas para $6,12 \text{ mg N-NH}_4 \cdot \text{L}^{-1}$, ou seja, a remoção aqui foi de 63% em 24 horas de teste (velocidade específica de remoção: $29 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{gSST}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), demonstrando assim, uma eficiência e velocidade de remoção de nitrogênio quase 30 vezes maior do que os obtidos pelos autores acima.

Diferentemente do ocorrido nos testes de remoção autotrófica aeróbia, e dos resultados obtidos por HELMER & KUNST (1998), um experimento realizado por PYNAERT *et al.* (2003), consistindo em um teste em batelada utilizando-se biofilme removido de um reator RBR alimentado com meio autotrófico, o qual foi aerado em meio contendo amônia e nitrito durante 48 horas, e, no entanto, não foi observado nenhuma remoção.

A presença de nitrato foi detectada apenas após o final do terceiro teste aeróbio autotrófico, porém, em concentrações muito baixas (abaixo de $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ N-NO₃), indicando, que as BON, estão presentes na biomassa dos reatores em pequenas quantidades, como se pode verificar nos testes de NMP (Tabela 5.6). Porém, quando em algum momento a carga nos reatores foi diminuída devido a problemas operacionais, tem-se sempre um residual de nitrato, provavelmente, devido ao fato destas competirem com outros grupos de bactérias presentes nos reatores: bactérias anammox, e principalmente com as BOA. Segundo PYNAERT *et al.* (2003), existem as seguintes competições em biofilmes: as BOA e as BON competem por O₂, as bactérias anammox e as BON competem pelo nitrito (NO₂⁻).

SLIEKERS *et al.*, (2005) em revisão de literatura comentam que, sob condições limitantes de oxigênio, BOA e BON competem pelo oxigênio, e nesta

competição as BON perdem, pois sua afinidade pelo oxigênio é menor do que a da BOA. O mesmo autor comenta ainda que, em um sistema alimentado apenas com amônio, que é o caso dos RBR utilizados no presente trabalho, as BON são mais sensíveis à inibição por amônia livre do que as BOA. Além disso, SCHMIDT *et al.* (2003) relata que os óxidos de nitrogênio (NOx) são tóxicos para alguns microrganismos, dentre eles: bactérias oxidadoras de nitrito (BON) e bactérias heterotróficas, com redução do número de células das BON.

Este fato está de acordo com o comportamento observado no reator PVC, onde, até o final da Etapa 3 as concentrações de nitrato estavam elevadas, porém, ao se elevar a carga de 2875 mg N.m⁻².d⁻¹ para 6670 mg N.m⁻².d⁻¹, a concentração de nitrato cai sensivelmente, apresentando apenas um pequeno residual na saída do reator.

De maneira geral, observa-se nos 3 reatores, que, ao se aplicar cargas de amônio mais baixas do que 6670 mg N.m⁻².d⁻¹, começa a haver um aumento da concentração de nitrato nos mesmos, confirmando o fato, de que, altas concentrações de amônio geram um aumento de amônia livre, bem como condições restritivas de oxigênio, além da formação dos óxidos de nitrogênio, onde o NO exerce efeito tóxico sobre as BON, suprimindo a ação destas. Além disso, de acordo com PYNAERT *et al.* (2003), devido às condições de limitação de oxigênio em reatores de biodiscos, estas bactérias tendem a crescer nas partes mais externas do biofilme, devido à sua afinidade com o oxigênio mais baixa do que as BOA, e devido também ao comportamento dinâmico do biofilme (desprendimento e novo crescimento das partes mais externas) as BON não consigam se manter em grande número nos biodiscos.

Após uma análise dos resultados observados, sobre o comportamento dos reatores de biodiscos rotativos utilizados neste trabalho, acredita-se que os seguintes processos de remoção ocorram simultaneamente nos mesmos: processo de remoção autotrófica anaeróbia ou processo ANAMMOX, processo de remoção autotrófica sob condições restritivas de oxigênio, assim como, sob condições completamente aeróbias (processo NOx), sem adição dos óxidos de nitrogênio, evidenciando-se, assim, o comportamento versátil das BOA. No reator PVC, além de todos estes processos, provavelmente, alguma remoção heterotrófica também poderia ter ocorrido.

5.8 . CARACTERÍSTICAS DOS MATERIAIS SUPORTE QUANTO À FORMAÇÃO DE BIOFILME

Apenas relembando o que já foi comentado no item 4.3, as determinações de SST no fundo dos reatores foram realizadas com o objetivo de verificar-se, o comportamento dos materiais utilizados: PVC, PS e PU, em relação à adesão dos microrganismos. A densidade dos materiais suporte PVC, PS e PU foi medida através do método de Arquimedes e foram, respectivamente, as seguintes: 0,92; 1,04; 0,049 g.cm⁻³.

Na Figura 5.32 estão apresentadas fotografias realizadas através de microscopia eletrônica de varredura exibindo a estrutura superficial destes materiais utilizando-se um aumento de 120 vezes. Como pode ser observado, nesta Figura as ranhuras apresentadas no PVC e PS, são resultado do “lixamento” destes materiais para facilitar a adesão dos microrganismos. Porém, observa-se que o PU apresenta cavidades tipo “colméia” em seu interior, que também auxilia na fixação de microrganismos.

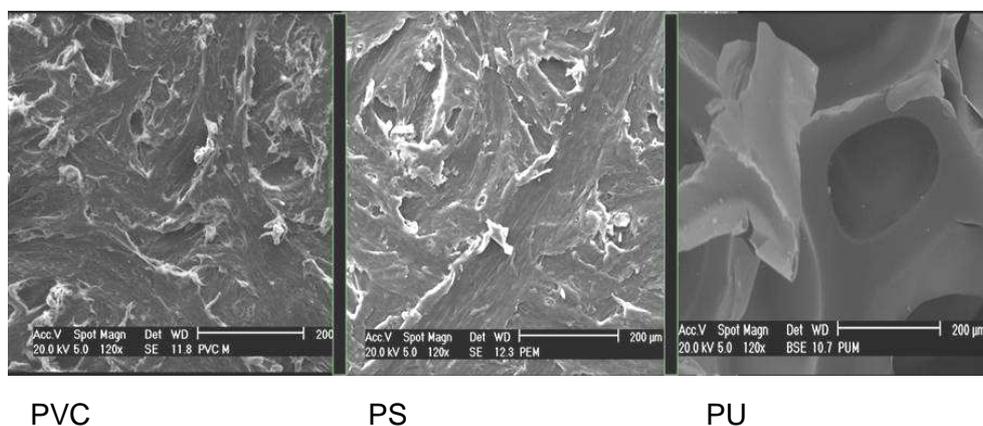


Figura 5.32: Fotografias com aumento de 120 vezes dos materiais exibindo sua estrutura superficial.

No início da operação dos reatores, constatava-se visualmente o fácil desprendimento dos biofilmes aderidos às placas, onde os mesmos voltavam a se formar após algum tempo. Tal constatação era mais evidente no reator PVC, e, como se pode observar, tanto na Tabela 5.9, como na Figura 5.33, o reator PVC

apresenta valores de SST retirados do fundo do reator mais altos em seguida o Poliuretano e por último o Poliestireno. No entanto, deve-se levar em conta que o PU apesar de liberar mais biomassa do que o PS, por ser muito poroso, retém uma maior quantidade de biomassa em seu interior. Em períodos mais avançados (461 dias) os três convergem para valores, em média, bem próximos, apresentando biofilmes mais estáveis.

Tabela 5.9: Determinação de sólidos suspensos totais retirados do fundo dos reatores ao longo do período de operação

Dia de operação	PVC (mgSST·L ⁻¹)	PS (mgSST·L ⁻¹)	PU (mgSST·L ⁻¹)
229 dias	1735	1208	1510
320 dias	1090	675	865
461 dias	408	374	404
624 dias	626	552	488

Dentre os materiais utilizados, o que levou mais tempo até poder-se visualizar uma camada de biofilme densa foi o PVC, e foi também o que apresentou valores maiores de biomassa desprendida. O PS apresentou uma boa uniformidade na formação do biofilme e uma boa estabilidade também, resistindo melhor aos aumentos de carga, em relação ao desprendimento do biofilme. Como se pode visualizar na Figura 5.33 assim como na Tabela 5.5, o PS foi o que apresentou menores valores de desprendimento de SST. Após os 400 dias de operação a quantidade de biofilme desprendido apresenta valores bem próximos, não sendo possível afirmar qual dos materiais teve maior ou menor desprendimento de biomassa.

Entretanto, apesar do PS ter um menor desprendimento de biomassa, não foi o reator que apresentou a melhor eficiência em termos de remoção de nitrogênio. Esta observação nos leva a crer que, não apenas a fixação dos microrganismos seja importante, mas que principalmente, a possibilidade de

formação de um biofilme mais espesso seja decisiva na implementação do processo anammox.

Cumprе ressaltar que, em certo momento houve problemas operacionais, onde os biodiscos ficaram parados durante um período de 72 horas, após este período, estando as condições operacionais dos reatores normalizadas, a parte exposta ao ar, dos biofilmes nos reatores PVC e PS se desprenderam completamente do material suporte, causando uma forte queda na eficiência destes reatores (dados não mostrados), o que não aconteceu com o reator PU, que inicialmente apresentou queda na eficiência, mas logo depois recuperou-se rapidamente.

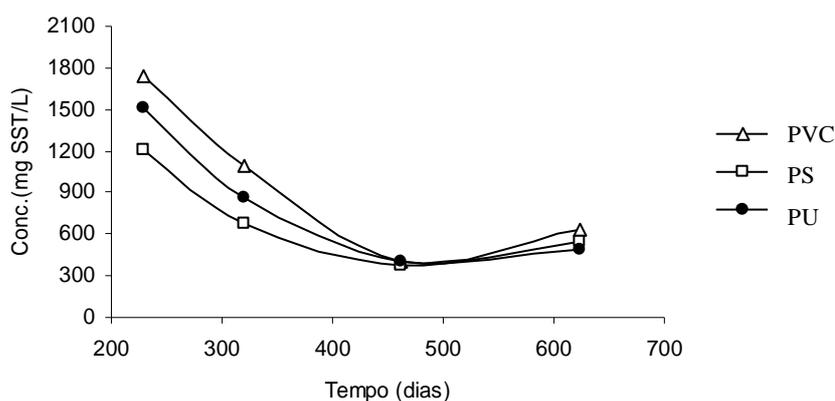


Figura 5.33: Valores de SST obtidos para o fundo dos reatores PVC, PS e PU.

Através das fotos realizadas por microscopia eletrônica no dia de operação 333, apresentadas na Figura 5.34, pode-se verificar que a espessura do biofilme de PS (0,23mm) foi em média seis vezes maior do que o biofilme PVC. No entanto, na Etapa 5 após a adição de matéria orgânica no reator PVC, como já comentado no item 5.1.5, a espessura do biofilme aumentou expressivamente, chegando a preencher todo o espaço vazio entre as três primeiras placas do reator. A espessura do biofilme nestas cinco primeiras placas ficou igual à distância entre as placas do reator PVC, que, neste caso foi de 0,7cm.

Como o PU é um material extremamente poroso, não é possível definir onde o biofilme inicia ou termina. Considerou-se como a espessura do biofilme, a própria espessura do disco (10mm).

Cumprе ressaltar, que, periodicamente, os lodos acumulados nos fundos dos reatores eram removidos, garantindo que os resultados apresentados na Tabela 5.5 refletem as quantidades de sólidos gerados e desprendidos do meio suporte. Além disto, os resultados de eficiência dos reatores, apresentados na Figura 5.7 também referem-se apenas a atividade da biomassa aderida.

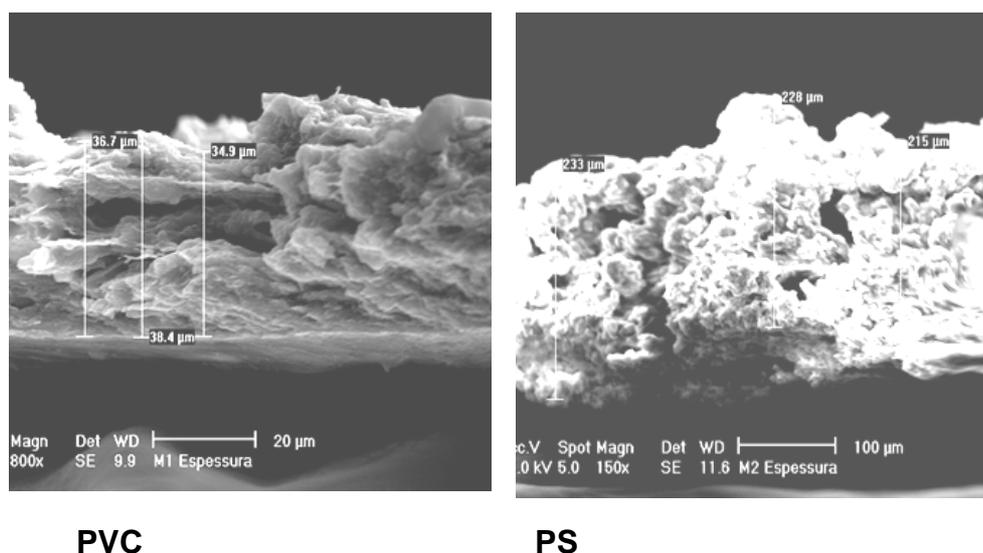


Figura 5.34: Fotografias obtidas através de microscópio eletrônico de varredura dos biofilmes PVC e PS após 333 dias de operação dos reatores.

5.9 . CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DOS BIOFILMES

O estudo da microbiota dos biofilmes formados nos diferentes materiais suporte foram realizados pela técnica do número mais provável para as bactérias nitrificantes, pela observação em microscópio ótico, bem como pela técnica de *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH).

5.9.1 . Número Mais Provável (NMP)

Os resultados apresentados na Tabela 5.10 exibem os valores estimados para as populações de bactérias oxidadoras de amônia (BOA) e bactérias oxidadoras de nitrito (BON) no lodo utilizado como inóculo e nos materiais suporte após 319 (Etapa 3) e 460 dias (Etapa 4) de operação dos reatores. É possível observar-se, que, de um modo geral, houve um aumento na população de BOA e uma diminuição na população de BON durante este período, provavelmente, porque a população de BON sofreu, aparentemente, os efeitos de limitação de OD devido às altas concentrações de amônia aplicadas ao sistema. No entanto, mesmo a concentração de BON apresentando-se bem baixa, percebe-se, ao se observar a Figura 5.6, que durante este período a nitrificação completa não foi muito afetada nos reatores PVC e PS, tal efeito foi mais intenso no reator PU apresentando acúmulo de nitrito.

Tabela 5.10: Estimativa das populações de BOA e BON expressa em NMP/gSST durante o período de operação dos reatores.

Amostra	PVC		PS		PU	
	BOA	BON	BOA	BON	BOA	BON
Inóculo	$1,3 \times 10^6$	$4,7 \times 10^4$	$1,3 \times 10^6$	$4,7 \times 10^4$	$1,3 \times 10^6$	$4,7 \times 10^4$
319	$>10^9$	$1,45 \times 10^2$	$5,23 \times 10^6$	<10	$>10^9$	<10
460	$2,2 \times 10^8$	$1,2 \times 10$	$2,9 \times 10^9$	<10	$1,3 \times 10^9$	$9,7 \times 10$

5.9.2 . Fluorescence in Situ Hybridization (FISH)

Os resultados das análises de FISH das amostragens realizadas nos 3 materiais suporte em relação ao inóculo encontram-se divididos entre os grandes grupos de bactérias nas Figuras 5.35a, 5.35b e 5.35c e os grupos mais específicos das bactérias oxidadoras de amônio (BOA) e das bactérias oxidadoras de nitrito (BON), nas Figuras 5.36a, 5.36b e 5.36c e 5.37a, 5.37b e 5.37c, respectivamente.

De uma maneira geral, pode-se afirmar que nas diferentes cargas de amônio aplicadas aos reatores as Eubactérias aumentaram no decorrer da operação dos mesmos. Por outro lado, as Alf1b, onde se encontram várias espécies de oxidadoras de nitrito incluindo o gênero *Nitrobacter*, diminuíram no PS e PU (Figuras 5.35b e 5.35c), As gama-proteobactérias permaneceram relativamente constantes, tendo um decréscimo apenas na primeira Etapa de operação.

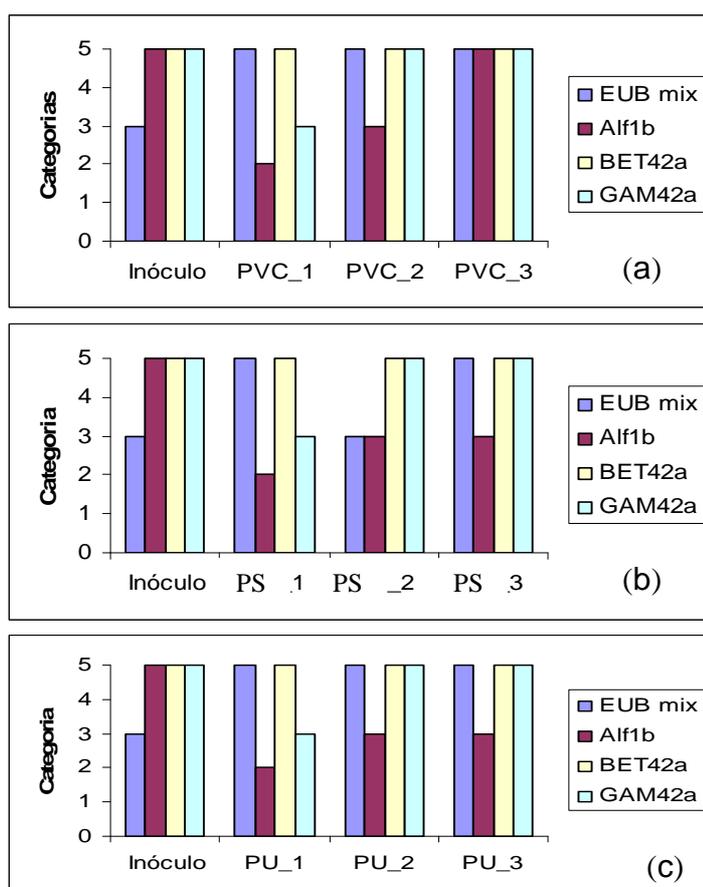


Figura 5.35: Grandes grupos de eubactérias.

Quanto às bactérias responsáveis pela oxidação do amônio (Figuras 5.36a, 5.36b e 5.36c), além das *Nitrosomonas sp*, presentes em todas as etapas de operação dos reatores, houve, principalmente, o aparecimento do gênero *Nitrosococos mobilis*, observado pela sonda Nmv. No reator PVC, a espécie *Nitrosococos mobilis*, esteve presente durante todas as Etapas, enquanto nos suportes de PS e PU esta espécie surgiu apenas nas Etapas 2 e 3 com cargas mais altas de amônio. Este gênero de BOA foi mais abundante no reator PU.

Nitrosolobus multiformis, *Nitrosospira briensis*, *Nitrosovibrio tenuis* também foram oxidadoras de amônio que apareceram nas etapas dos reatores onde cargas mais elevadas foram aplicadas.

Quanto às oxidadoras de nitrito o único gênero de BON observado no inóculo foi o filo *Nitrospira* (sonda Ntspa712) e o gênero *Nitrospira sp* (sonda Ntspa662). Bactérias do filo *Nitrospira* foram as que apresentaram menor abundância, exceto no reator com PVC na etapa 2, não foi detectada na etapa 4 (540 dias) no PVC e foram raras nos reatores PS e PU, confirmando os resultados obtidos no teste NMP (Tabela 5.6).

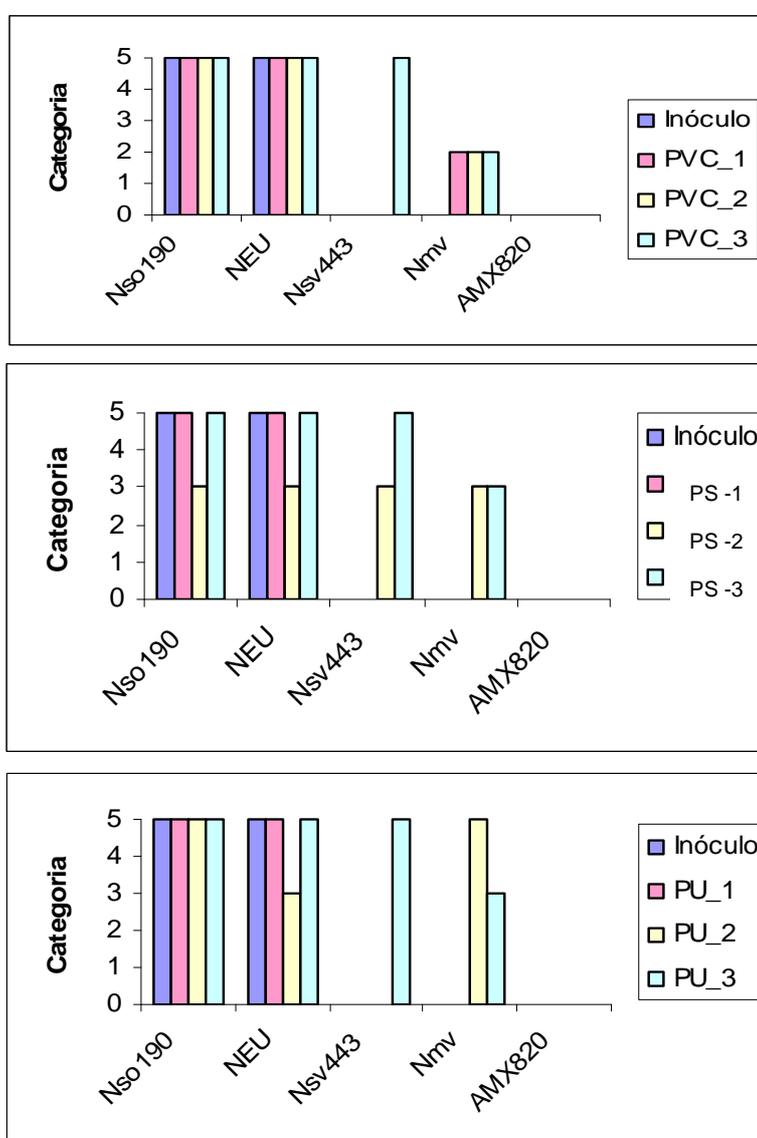


Figura 5.36: grupos específicos de bactérias oxidadoras de amônio nos 3 reatores nas difentes fases.

É interessante destacar que, apesar do gênero *Nitrobacter* sp ser citado na literatura como o gênero mais comum de BON, este não foi detectado no inóculo, que era lodo de um sistema de lodos ativados tratando esgoto doméstico, onde a carga de nitrogênio é de aproximadamente $20\text{mg.L}^{-1}.\text{d}$. O aumento de carga aplicado aos reatores, deram lugar a outros gêneros de BON anteriormente não detectados, como a *Nitrobacter* sp e a *Nitrococos mobilis*.

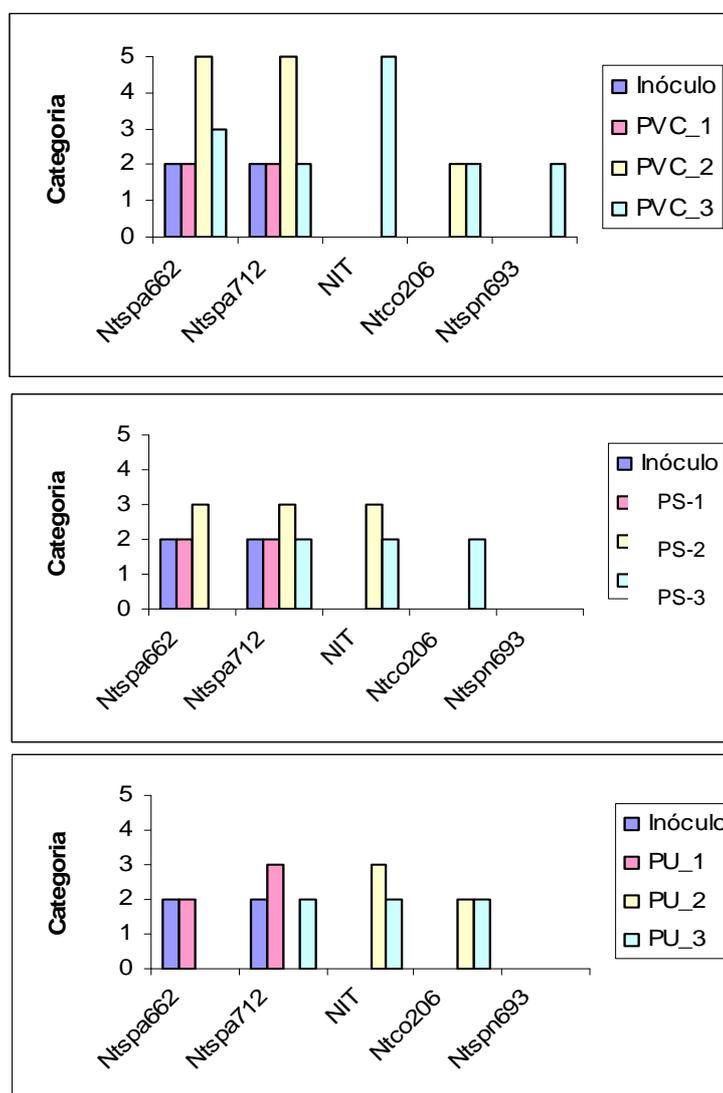


Figura 5.37: grupos específicos de bactérias oxidadoras de nitrito nos 3 reatores nas diferentes fases.

É importante destacar que o Reator PVC como material suporte (Figura 5.35a) apresentou a presença de *Nitrospina gracilis* (sonda Ntspn 693) na carga mais elevada. Esta bactéria nunca foi anteriormente descrita em sistemas de tratamento de efluentes, e, por ser uma halófila obrigatória, parece ter se favorecido do aumento da concentração de cloreto de amônio no meio sintético de alimentação. Entretanto, esta mesma bactéria não foi observada nos demais materiais suporte estudados.

No Reator PU com carga de $3310 \text{ mg N.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$ (Etapa 2), não foi mais observada a *Nitrospira* sp, dando lugar a outras oxidadoras de nitrito, conforme pode ser observado na Figura 5.35.c, como as do gênero *Nitrobacter* sp e *Nitrococcus mobilis*. Nesta Etapa, pode-se observar nos resultados de acompanhamento do desempenho dos reatores apresentados na Figura 5.6 ocorreu um acúmulo temporário de nitrito, especialmente no reator contendo PU, o que pode ter favorecido a aparecimento destas bactérias. HUNIK *et al.*, (1994), relataram a elevada resistência de *Nitrobacter gracilis* ao substrato nitrito em valores de pH entre 6,5 e 8,5. Além disto, o *Nitrococos mobilis* é uma halófila obrigatória e apareceu em todos os reatores nas cargas mais elevadas, provavelmente pela sua elevada tolerância ao sal.

Reatores do tipo RBR têm sido freqüentemente descritos na literatura para o estabelecimento do processo de oxidação anaeróbia do íon amônio (ANAMMOX) (PYNAERT *et al.*, (2003), SIEGRIEST *et al.*, (2001) no interior do biofilme formado. Entretanto, bactérias responsáveis por este processo, normalmente detectadas pela sonda AMX820, não foram observadas em nenhum dos reatores. Apenas na Etapa 4 estas bactérias foram detectadas (raras) nos reatores PS e PU (20ª. placa), sugerindo que tais bactérias estavam presentes nos reatores desde o início, porém em quantidades que não poderiam ser detectadas pelo método FISH e como o seu crescimento é bastante lento sua presença pôde ser detectada apenas após 540 dias de operação.

5.9.3 . Microscópia Ótica dos Biofilmes

A estrutura dos biofilmes, a abundância de bactérias filamentosas e a presença de protozoários/micrometazoários foram analisados através de

microscopia ótica em amostras retiradas dos três materiais suporte. Durante o período de pouco mais de 300 dias, observou-se, ainda, a presença de protozoários, muito embora se saiba que tais microrganismos têm seu crescimento limitado através da utilização de efluente sintético, juntamente com altas concentrações de nitrato e nitrito.

As Figuras 5.38, 5.39 e 5.40 apresentam fotografias realizadas pela observação com microscópio eletrônico mostrando algumas das características microbiológicas dos reatores PVC, PS e PU.

A função dos Protozoários é frequentemente discutida, especialmente em reatores nitrificantes. van DONGEN *et al.* (2001), trabalhando com um reator sharon de fluxo contínuo, com TRH de um dia, sem retenção de lodo, constatou que os ciliados livres exerceram um efeito negativo sobre a estabilidade e eficiência de tal reator. VERHAGEN & LAANBROEK (1993) trabalhando com



Figura 5.38: Características microbiológicas do reator PVC: a) bactérias filamentosas na Etapa 1, b) abundância de ciliados, c) presença de nematóides.

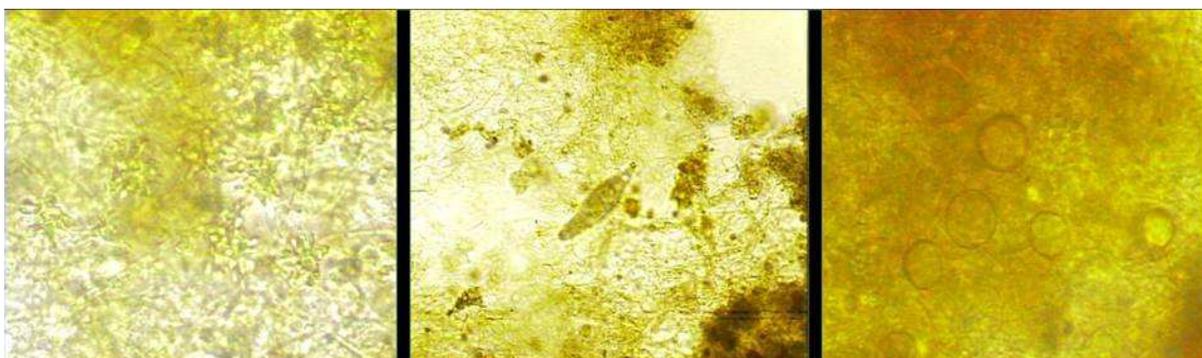


Figura 5.39: Características microbiológicas do reator PS: a) bactérias filamentosas, b) abundância de rotíferos, c) presença de protozoários.

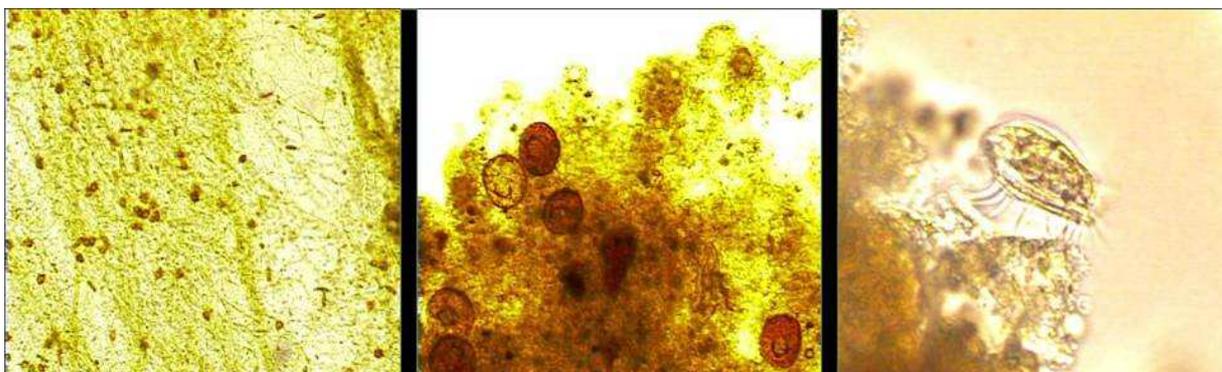


Figura 5.40: Características microbiológicas do reator PU: a) bactérias filamentosas, b) bactérias filamentosas e tecamebas, c) ciliados.

sistemas mistos: autotróficos/heterotróficos, atribuem uma queda na eficiência de nitrificação a uma concentração excessiva de rotíferos e flagelados. No entanto, ROESSINK & EIKELBOOM (1997) demonstraram que os ciliados livres têm sua importância na qualidade de efluentes de sistema mistos de biofilmes. Entretanto, apesar de todas as considerações anteriores, pode-se observar que a presença de protozoários não afetou a nitrificação em nenhum dos reatores com os quais se trabalhou aqui.

Uma alta densidade de bactérias filamentosas foi observada nos três reatores durante o período de formação inicial dos biofilmes, quando as cargas mais baixas estavam sendo aplicadas, no entanto, as mesmas não foram observadas em períodos mais avançados, quando o biofilme já apresentava uma maior espessura, o que leva-se a crer, que, provavelmente, tais bactérias exercem um papel importante na sustentação de uma base para o posterior desenvolvimento do biofilme. A presença de bactérias filamentosas também foi relatada por EGLI *et al.* (2003), quando os mesmos, estavam estudando a composição microbiana de biofilmes formados em reatores de biodiscos utilizados na remoção de nitrogênio.

A variedade de microrganismos encontrados no reator PVC foi diferente dos reatores PS e PU, mesmo sua carga sendo igual àquela aplicada no reator PS. A principal diferença do reator PVC, é que o mesmo apresenta uma maior variedade de ciliados livres, como *Metopus spec.* e *Euplotes spec.*, na Etapa 1; e

Aspidisca spec. nas Etapas 2 e 3; rotíferos nas Etapas 1 e 2 e nematóides em todas as fases. Estes foram detectados, tanto no lodo que estava depositado no fundo do reator, quanto no lodo aderido às placas. Segundo informações fornecidas pela bibliografia, sabe-se que os nematóides exercem um efeito negativo na formação de biofilmes, desprendendo o biofilme, prejudicando, assim, sua adesão. Tal fato nos leva a crer, que, provavelmente, a presença de nematóides no reator PVC levou aos frequentes desprendimentos do biofilme observados no mesmo durante a etapa inicial de formação destes.

Observou-se a presença de ciliados aderidos às placas do reator PVC apenas durante a etapa 3 e no reator PU durante todas as etapas. No reator PS, entretanto, tais microrganismos não foram encontrados, indicando que provavelmente o poliuretano, por ser um material com maior porosidade, apresentou melhores condições de fixação e proteção para a formação do biofilme.

6 . CONCLUSÕES

Uma carga em torno de $1200 \text{ mg N.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$ pode ser aplicada no "start-up" dos reatores RBR, obtendo-se a estabilização dos mesmos por volta de 50 dias.

Não foi necessário utilizar na partida dos reatores uma cultura selecionada com altas velocidades específicas de nitrificação. O inóculo utilizado na partida, obtido de uma estação de esgotos municipal, mostrou-se tão efetivo quanto culturas especializadas utilizadas em trabalhos citados na literatura.

Os reatores apresentaram alta capacidade de oxidação do amônio, mesmo quando operados com cargas de N-NH_4^+ elevadas, apresentando valores de 4902, 5403, 5336 $\text{mg N-NH}_4/\text{m}^{-2}.\text{d}^{-1}$ oxidados, para os reatores PVC, PS e PU, respectivamente.

Os perfis de OD demonstraram que estabeleceu-se condições limitantes de OD em torno de 0,4 a 0,6 $\text{mg O}_2.\text{L}^{-1}$ para os reatores PVC e PS. O reator PU apresentou concentrações mais baixas variando entre 0,26 a 0,08 $\text{mg O}_2.\text{L}^{-1}$.

Uma intensa supressão da ação das bactérias oxidadoras de nitrito (BON) foi obtida nos reatores de biodiscos rotativos, através da aplicação de altas cargas de amônio, acima de $6670 \text{ mg N.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$, e baixas concentrações de oxigênio dissolvido no meio entre 0,4 a 0,6 $\text{mg O}_2.\text{L}^{-1}$.

Bactérias Oxidadoras de Amônia são versáteis e apresentaram remoção autotrófica de nitrogênio em condições completamente aeróbias, bem como sob condições limitantes de oxigênio (processo NO_x), sem que houvesse o fornecimento de quantidades traços de óxidos de nitrogênio (NO , NO_2) às mesmas.

A adição de uma fonte de carbono, com baixa relação C:N, assim como a inoculação de lodo anaeróbio aos reatores de biodiscos rotativos são medidas úteis para alcançar um bom desempenho destes, em termos de remoção de nitrogênio.

A imposição de condições limitantes de OD e detecção de bactérias anammox através dos testes FISH, evidenciaram o estabelecimento do processo ANAMMOX no reator PU, levando a uma alta remoção de nitrogênio, em torno de 50% correspondendo a $3340 \text{ mg N.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$.

Dentre os biofilmes testados, a biomassa removida do reator PU nos testes em condições limitantes de oxigênio foi a que apresentou a mais alta velocidade específica de remoção de nitrogênio, assim como, apresentou remoção autotrófica completamente aeróbia, sendo ainda, a única que apresentou remoção anaeróbia. Além disto, o reator confeccionado em poliuretano apresentou uma camada de biofilme mais homogênea, uma maior adesão dos microrganismos, e também uma maior remoção de nitrogênio, apresentando-se assim como o melhor material suporte, dentre os que foram testados: cloreto de polivinila (PVC) e poliestireno (PS).

Apesar das altas concentrações de nitrito encontradas nos reatores, foi detectado a presença de bactérias anammox através dos testes de FISH nos reatores PVC, PS e PU no final da etapa 4, podendo provavelmente indicar que altas concentrações de nitrito poderiam não ter efeito completamente inibitórios sobre as bactérias anammox como sugerido na literatura.

Os testes FISH confirmaram, não só a presença de *Nitrosomonas* sp (NEU) em todas as etapas de operação dos reatores, assim como de uma variedade de outras BOA como: *Nitrosolobus multiformis*, *Nitrosospira briensis*, *Nitrosovibrio tenuis*, as quais apareceram nas etapas com cargas mais elevadas, além de *Nitrosococcus mobilis*, que foi mais abundante no reator PU, indicando que, com este material suporte e cargas mais elevadas de amônio, estas prevalecem sobre *Nitrosomonas* sp.

As bactérias filamentosas, observadas nos três reatores durante o período de formação inicial dos biofilmes, exercem um papel importante na sustentação de uma base para o posterior desenvolvimento do biofilme.

7 . SUGESTÕES DE CONTINUIDADE

Elevar as cargas aplicadas aos reatores até que estas fiquem em torno de 10.000 mg N.m⁻².d⁻¹, valores próximos aos utilizados na literatura.

Realizar testes cinéticos em anaerobiose utilizando biomassa dos RBR com NH₄⁺, adicionando-se óxidos gasosos de nitrogênio (NO, NO₂)

Realizar testes cinéticos utilizando biomassa dos RBR com diferentes concentrações de oxigênio dissolvido.

Realizar testes cinéticos utilizando biomassa dos RBR com diferentes concentrações de NH₄⁺.

Estudo dos RBR com efluente natural contendo elevadas concentrações de amônio, como por exemplo o da suinocultura.

8 . BIBLIOGRAFIA

- ABELLING, U. & SEYFRIED, C.F. (1992). Anaerobic-aerobic treatment of high strength ammonium wastewater - nitrogen removal via nitrite. *Wat. Sci Tech.*, v. 26 (5-6), p. 1007-1015.
- ABELIOVICH, A. & VONKAK, A. (1992). Anaerobic metabolism of *Nitrosomonas europaea*. *Arch. Microbiol.*, n. 158, p. 267-270.
- ABREU, L.M. de. (1994). Aspectos Microbiologicos de los procesos de nitrificacion-denitrificacion. In: **Taller y Seminario Latinoamericano de Tratamiento Anaeróbico de Aguas Residuales Anais** - Montevideo, p.55-63.
- AHN, Y-H. (2006). Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. *Process Biochemistry*. *Process Biochemistry*, v.xxx, p.xxx-xxx. Article in Press.
- AKKERMANS, ADL; MIRZA, MJ; HARMSSEN, HJM; BLOK, HJ; HERRON, PR; SESSITSCH, A; AKKERMANS, WM. (1994). Molecular ecology of microbes: a review of promises, pitfalls and true progress. *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 15, p. 185-194.
- ALEXANDER, M.; CLARK, F. E.. "Nitrifying bacteria". In C. A. Black (ed.), *Methods of soil analysis, part 2. Chemical and microbiological properties*, pp. 1477 – 1483. American Society of Agronomy. Madison, Wis. 1982.
- AMANN, R.; SNAIDR, J.; WAGNER, M.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. (1996). In situ visualisation of high genetic diversity in a natural microbial community. *J. Bacteriol.*, v. 178, p. 3496–3500.
- AMANN, R.I. (1995). *In situ* identification of microorganisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. In: *Molec Microb Ecol Manual*, 3.3.6. Dluwer Academic Publishers (eds.), Netherlands, pp. 1-15.
- AMARAL, J.A.; KNOWLES, R. (1995). Growth of methanotrophs in methane and oxygen counter gradients. *FEMS Microbiol Lett*, n. 126, p. 215-220.
- ANTHONISEN, A. C.; LOEHR, R. C.; PRAKASAN, T. B. S.; SRINATH, E. G.. "Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid". *Journal WPCF*, Vol. 48, No. 5, p. 835-852, 1976.
- AOI, Y. (2002). In situ identification of microorganisms in biofilm communities. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 94, n. 6, p. 552-556.

- APILÁNEZ, I.; GUTIÉRREZ, A.; DÍAZ, M. (1998). Effect of surface materials on initial biofilm development. *Bioresource Technology*, n. 66, p. 225-230.
- BAIER, R.E. (1972). Influence of the initial surface condition of material on bioadhesion. In: *Proc. 3rd. Int. Congr. Mar. Corros. Biofouling*. Gaithersburg, Md.
- BAYER, A.S.; SPEERT, D.P.; PARK, S.; TU, J.; WITT, M. (1991). Functional role of mucoid exopolysaccharide (alginate) in antibiotic-induced and polymorphonuclear leukocyte-mediated killing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.*, n. 59, p. 302-308.
- BELKHADIR, R. (1986). Etude fondamentale des biomasses fixées. Description et modelisation des film biologiques anaérobies. Thèse de Doctorat n. 18, INSA. Toulouse.
- BITTON, G. (1994). *Wastewater microbiology*. John Wiley & Sons, inc. Publication.
- BOCK, E.; SCHMIDT, I.; STÜVEN, R.; ZART, D. (1995). Nitrogen loss caused by denitrifying *Nitrosomonas* cells using ammonia or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor. *Arch Microbiol.*, n. 163, p. 16-20.
- BOYD, A. & CHACRABARTY, A.M. (1995). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: role of the alginate exopolysaccharide. *J. Ind. Microbiol.*, n. 15, p. 162-168.
- BRAR, S.K. & GUPTA, S.K. (2000). Biodegradation of trichloroethylene in a rotating biological contactor. *Water Research*, v. 34, n. 17, p. 4207-4214.
- BROCK, T.D. & MANDIGAN, M.T.. *Biology of microorganisms*, Prentice Hall, sixth edition, 1991.
- BRODA, E. (1976). Two kinds of lithotrophs missing in nature. *Z. Allg. Mikrobiol.*, n. 17, p. 491-493.
- BROUWER, M.; Van LOOSDRECHT, M.C.M.; HEIJNEN, J.J. (1996). One reactor system for ammonium removal via nitrite. STOWA Report. 96-01. STOWA, Utrecht, The Netherlands. (ISBN 90 74476 55 4).
- CABEZAS, A. . Microbiología de los procesos biológicos de nitrificación – desnitrificación en la descontaminación de desechos. Tese de mestrado. Universidade de la República, Facultad de Química, Pedeciba Química. Montevideo, setembro de 2005.
- CAMPOS, J.L.; MOSQUERA-CORAL, A.; SÁNCHEZ, M.; MÉNDEZ, R.; LEMA, J.M. (2002). Nitrification in saline wastewater with high ammonia concentration In an activated sludge unit. *Water Research*, n. 36, p. 2555-2560.

- CAPDEVILLE, B. & NGUYEN, K.M. (1990). Kinetics and modelling of aerobic film growth. *Wat. Sci. Technol.*, n. 22, vol. 1, p. 149-170.
- CATALDO, D.A.; HAROON, M.; SCHRADER, L.E.; YOUNGS, V.L. (1975). Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Comum Soil Sci. Plant Anal.*, n. 6, p. 71-80.
- CHAZAL, P.M. & LENS, P.N.L. *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution*. Iwa Publishing. London, 2000.
- COSTA, C.; DIJKEMA, C.; FREDRICH, M.; GARCIA-ENCINA, P.; FERNANDEZ-POLANCO, F.; STAMS, A.J.M. (2000). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, n. 53 p. 754-762.
- COSTERON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R.; LAPPIN-SCOTT, H.M. (1995). Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.*, n. 49, p. 711-745.
- DAVIES, T.R. (1973). Isolation of bacteria capable of utilizing methane as a hydrogen donor in the process of denitrification. *Water Res.* n. 7, p. 575-579.
- de BEER, D. & STOODLEY, P. Microbial biofilms.
http://141.150.157.117:8080/prokpub/chaphtm/267/01_00.htm.
(07.jun. 2005).
- de BEER, D.; STOODLEY, P.; ROE, F.; LEWANDOWSKI, Z. (1994). Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnol. Bioengng.*, n. 43, p. 1131-1138.
- DEUTSCHES Hepatitis C Forum e.V., Germany.
(<http://www.genome.gov/10000207http>). Copyright 1996-2005.
Last Modification: 08.31.2001. Página acessada em 18/10/2005.
- DIJKMAN, H.; STROUS, M. Process for ammonia removal from wastewater. Patent 1999; PCT/NL99/00446.
- ECKENFELDER, W. & MUSTERMAN, J. (1995). Activated sludge treatment of industrial wastewater. *Water Environment*. vol. 46, p. 145-147.
- EGLI, K.; FANGER, U.; ALVAREZ, P.J.J.; SIEGRIST, H.; van der MEER, J.R.; ZEHNDER, A.J.B. (2001). Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium rich leachate. *Arch. Microbiol.*, n.175, p. 198-207.
- EGLI, K.; BOSSHARD, F.; WERLEN, C.; LAIS, P.; SIEGRIST, H.; ZEHNDER, A.J.B.; van der MEER, J.R. (2003). Microbial composition and structure of a rotating biological contactor biofilm treating ammonium-rich wastewater without organic carbon. *Microbial Ecology*, n. 45, p. 419-432.

- EPA - U.S. Environmental Protection Agency- Technology Transfer. Process design manual for nitrogen control. Washington - U.S.A., 1975.
- EPA - U.S. Environmental Protection Agency- Technology Transfer. Nitrogen control. Washington - U.S.A., 1993.
- ETCHEBERE, C. Remoção de nitrogênio: microbiologia, ecologia e bioquímica. In: V Curso de Tratamento Biológico de Resíduos. Projeto Prosul/CNPq-UFSC/UDELAR/UNLP. Florianópolis, abril de 2005.
- FLETCHER, M. (1980). Adherence of microorganisms to smooth surfaces. In: *Bact. Adher.*, ed. E.H. Beachy. Chapman and Hall. London.
- GACESA, P. (1998). Bacterial alginate biosynthesis: recent progress and future prospects. *Microbiology*, n. 144, p. 1133-1143.
- GEESEY, G.G.; RICHARDSON, W.T.; YEOMANS, H.G.; IRVIN, R.T.; COSTERTON, J.W. (1977). Microscopic examination of natural sessile bacterial populations from an alpine stream. *Can. J. Microbiol.*, n. 23, vol. 12, p. 1733-1736.
- GINIGE, M.P.; HGENHOLTZ, P.; DAIMS, H.; WAGNER, M.; KELLER, J.; BLACKALL, L. (2004). Use of stable-isotope probing, full-cycle rRNA analysis, and fluorescent in situ hybridization- microautoradiography to study a methanol-fed denitrifying microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.*, n. 70, vol 1, p. 588-596.
- GONCALVES, R. F. ; CHERNICHARO, C. A. L. ; ANDRADE NETO, C. O. ; ALÉM SOBRINHO, P. ; KATO, M. T. ; COSTA, R. H. R. ; AISSE, M. M. ; ZAIAT, M. . Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios por reatores com biofilme. In: Carlos Augusto Lemos Chernicharo. (Org.). Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios. 1 ed. Belo Horizonte: FINEP, 2001, v. , p. 171-278.
- GRUNDITZ, C.; GUMAELIUS L.; DALHAMMAR, G. (1998). Comparison of inhibition assays using nitrogen removing bacteria: application to industrial wastewater. *Water Research*, v. 32, n. 10, p. 2995-3000.
- GUIMARÃES, C.; PORTO, P.; OLIVEIRA, R.; MOTA, M. (2005). Continuous decolourization of a sugar refinery wastewater in a modified rotating biological contactor with *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on polyurethane foam disks. *Process Biochemistry*, n. 40, p.535-540
- GUPTA, A.B. & GUPTA, S.K. (1999). Simultaneous carbon and nitrogen removal in a mixed culture aerobic RBC biofilm. *Water Research*, v. 33, n. 2, p. 555-561.
- HAGOPIAN, D.S. & RILEY, J.G. (1998). A closer look at the bacteriology of nitrification. *Aquacultural Engineering*, n. 18, p. 223-244.

- HANAKI, K.; WANTAWIN, C.; OGAKI, S. (1990). Nitrification at low levels of dissolved oxygen with and without organic loading in a suspended-growth reactor. *Water Res.*, n. 24, p. 297-302.
- HAO, X.; HEIJNEN, J.J.; van LOOSDRECHT, M.C.M. (2002). Model-based evaluation of temperature and inflow variations on a partial nitrification anammox biofilm process. *Water Research*, n. 36, p. 4839-4849.
- HAUGLAND, R.A.; HECKMAN, J.L.; WYMER, L.J. (1999). Evaluation of different methods for the extraction of DNA from fungal conidia by quantitative competitive PCR analysis. *Journal Of Microbiological Methods*, vol. 37, n.2, p. 165-176.
- HELDER, M.N. & de VRIES, E.G. (1983). Estuarine nitrite maxima and nitrifying bacteria (Ems-Dollard estuary. *Neth. J. Sea Res.*, n. 17, p. 1-18.
- HELLINGA, C.; SCHELLEA, A. A. J. C.; MULDER, J. W.; LOOSDRECHT, M. C. M.; HEIJNEN, J. J. "The SHARON process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich wastewater". *Water Science Technology*. No. 9, p. 135-142, 1998.
- HELMER, C.; TROMM, C.; HIPPEN, A.; ROSENWINKEL, K.H.; SEYFRIED, C.F.; KUNST, S. (2001). Single stage biological nitrogen removal by nitritation and anaerobic ammonium oxidation in biofilm systems. *Water Sci. Technol.*, n. 43, p. 311-320.
- HEM, L.J.; RUSTEN, B.; ODEGARRD, H. (1994). Nitrification in a moving bed biofilm reactor. *Water Research*, n. 28, p. 1425-1433.
- HIRAS, D.N.; MANARIOTIS, I.D.; GRIGOROPOULOS, S.G. (2004). Organic and nitrogen removal in a two-stage rotating biological contactor treating municipal wastewater. *Bioresource Technology*, v. 93, n. 1, p. 91-98.
- HOOPER, A.B. & TERRY, K.R.. (1979). Hydroxylamine oxidoreductase of *Nitrosomonas* production of nitric oxide from hydroxylamine. *Biochim. Biophys*, n.571, p.12-20.
- HOOPER, A.B.; VANELLI, T.; BERGMANN, D.J.; ARCIERO, D.M. (1997). Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, n. 71, p. 59-67.
- IWAI, S. & KITAO, T. (1994). *Wastewater treatment with microbial films*. Technomic Publishing Co., Lancaster, EUA. 184p.
- JETTEN, M.S.M.; HOM, S.J.; van LOOSDRECHT, M.C.M. (1997). Towards a more sustainable municipal wastewater treatment system. *Water Sci. Technol.*, n. 35, p. 171-180.
- JETTEN, M.S.M.; STROUS, M.; van de PAS-SCHOONEN, K.T.; SCHALK, J.; van DONGEN, L.; 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.*, n. 22, p. 421-437.
- JETTEN, M.S.M.; WAGNER, M.; FUERST, J.; van LOOSDRECHT, M.; KUENEN, G.; STROUS, M. (2001). Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation ('anammox') process. *Current Opinion in Biotechnology*, n. 12, p. 283-288.
- JETTEN, M.S.M.; SCHMID, M.; SCHMIDT, I.; WUBBEN, M.; van DONGEN, U.; ABMA, W.; *et al.* (2002). Improved nitrogen removal by application of new nitrogen cycle bacteria. *Rev. Environ. Sci Biotechnol.*, n. 1, p. 51-63.
- JIANLONG, W. (2000). Production of citric acid by immobilized *Aspergillus niger* using a rotating biological contactor (RBC). *Bioresource Technology*, n. 75, p. 245-247.
- JONES, H.R. (1974). Pollution control in the dairy industry. Noyes Data Corporation, Park Ridge, New Jersey.
- JUNG, J.Y., KANG, S.H., CHUNG, Y.C., AHN, D.H. (2007). Factors affecting the activity of anammox bacteria during start up in the continuous culture reactor. *Water Science & Technology*, v.55, n.1. p. 459-468.
- KHIN, T.; ANNACHHATRE, A.P. (2004). Novel microbial nitrogen removal processes. *Biotechnology Advances*, n. 22, p. 519-532.
- KIELING, D.D. Estudo da remoção biológica de nitrogênio a partir de lodo nitrificante cultivado em meio autotrófico sob condições anóxicas. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos. Florianópolis, 2004.
- KLESS, R.; SILVERSTEIN, J. (1992). Improved biological nitrification using recirculation in rotating biological contactors. *Water Sci. Technol.*, n. 26, p. 545-553.
- KUAI, L. & VERSTRAETE, W. (1998). Ammonium removal by the oxygen-limited autotrophic nitrification-denitrification system. *Appl. Environ. Microbiol.*, n. 64, p. 4500-4506.
- KUENEN, J.G., ROBERTSON, L.A. (1994). Combined nitrification-denitrification processes. *FEMS Microbiol. Rev.* n. 15, p. 109-118.
- LANBROEK, J.J., GERARDS, S. (1993). Competition for limiting amounts of oxygen between *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradsky* grown in mixed continuous cultures. *Arch Microbiol.*, n. 159, p. 453-459.
- LAWRENCE, J.R.; KORBER, D.R.; HOYLE, B.D.; COSTERTON, J.W.; CALDWELL, D.E. (1991). Optical sectioning of microbial biofilms. *J. Bacteriol.*, n. 173, vol. 20, p. 6558-6567.

- LEE, H.J.; BAE, J.H.; CHO, K.M. (2001) Simultaneous nitrification and denitrification in a mixed methanotrophic culture. *Biotechnol Lett.*, n. 23, p. 935-941.
- LEITÃO, R.P.; SANTANA, F.; PELLIZZARO, A.; VASCONCELLOS, R.; SCHMIDELL, W.; SOARES, H.M.. Nitrificação e desnitrificação simultâneas por bactérias oxidadoras de amônio sob condições aeróbias. In: Anais do XVI Congresso Brasileiro de Engenharia Química e III Congresso Brasileiro de Termodinâmica Aplicada. Setembro, 2006.
- LIU, W.; MARSH, T.; CHENG, H; FORNEY, L. Characterization of Microbial Diversity by Determining Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms of Genes Encoding 16S rRNA. *University,1 and USDA-ARS Avian Disease & Oncology Laboratory,2 East Lansing, Michigan 48824*. Received 19 February 1997/Accepted 15 August 1997.
- LUBBERDING, H.J. (1995). Applied anaerobic digestion. In: *International course on anaerobic treatment*. Wageningen Agricultural University/IHE Delft. Wageningen, p. 17-28.
- MAY, T.B.; SHINABARGER, D.; MAHARAJ, R.; KATO, J.; CHU, L. *et al.* (1991). Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. *Clin. Microbiol. Rev.*, n. 4, vol. 2, p. 191-206.
- MEGRAW, S.R.; KNOWLES, R. (1989). Isolation, characterization and nitrification potential of a methylotroph and two heterotrophic bacteria from a consortium showing methane dependent nitrification. *FEMS Microbiol Ecol.* n. 62, p. 359-374.
- MADIGAN, T.M., MARTINKI, J.M., PARKER, J.. "Brock biology of microorganisms". Prentice Hall, Inc., 8^a. Edição, N.Y., 1997.
- METCALF & EDDY, Inc.. "Wastewater engineering: treatment, disposal and reuse". McGraw-Hill, Inc, 3^a. Edição, N.Y., 1997
- MULDER, A.; van de GRAAF, A.A.; ROBERTSON, L.A.; JUENEN, J.G. (1995). Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol. Ecol.*, n.16, p. 177184.
- OLSSON, L. & NIELSEN, J.. (1997). On-line and *in situ* monitoring of biomass in submerged cultivations. *TIBTECH*, vol. 15, p. 517-522.
- O'TOOLE, G.A.; KAPLAN, H.B.; KOLTER, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.*, n.54, p. 49-79.
- PASSAGLIA, L. M. P.; ZAHA, A.. "Técnicas de DNA Recombinante". In: "Biologia Molecular Básica". Série Ciência XXI. Ed. Mercado Aberto. Porto Alegre. 1996.

- PEL, R., OLHENDUIS, R., BRAND, W., VOLS, A., GOTTSCHAL, J.C., ZWART, K.B. (1997). Stable isotope analysis of a combined nitrification-denitrification sustained by thermophilic methanotrophs under low-oxygen conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* n. 49, p. 1131-1141.
- PELLIZZARO, A.B. Tratamento de esgoto doméstico em lagoas de estabilização com suportes para o desenvolvimento de perifiton – biofilme. Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.
- PENG, Y.Z.; CHEN, Y.; PENG, C.Y.; LIU, M.; WANG, S.Y.; SONG, X.Q.; CUI, Y.W. (2004a). Nitrite accumulation by aeration controlled in sequencing batch reactors treating domestic wastewater. *Water Sci Technol*, n. 50, vol. 10, p. 35-43.
- PENG, Y.Z.; LI, Y.Z.; PENG, C.Y.; WANG, S.Y.. (2004b). Nitrogen removal from pharmaceutical manufacturing wastewater with high concentration of ammonia and free ammonia via partial nitrification and denitrification. *Water Sci Technol*, n. 50, vol. 6, p.:31–36.
- PHILIPOT, L. & HALLIN, S. (2005). Finding the missing link between diversity and activity using denitrifying bacteria as a model functional community. *Curr. Opin. Microbiol.* vol. 8, p. 234-239.
- PICIOREANU, C.; Van LOOSDRECHT, M.C.M.; HEIJNEN, J.J. (1997). Modelling of the effect of oxygen concentration on nitrite accumulation in a biofilm airlift suspension reactor. *Water Sci Technol*, n.36, p.147–156.
- PYNAERT, K.; SPRENGERS, R.; LAENEN, J.; VERSTRAETE, W. (2002). Oxygen-limited nitrification and denitrification in a lab-scale rotating biological contactor. *Environmental Technology*, v. 23, p. 353-362.
- PYNAERT, K.; WYJFELS, S.; SPRENGERS, R.; BOECKX, P.; van CLEEMPUT, O.; VERSTRAETE, W. (2002). Oxygen-limited nitrogen removal in a lab-scale rotating biological contactor treating an ammonium-rich wastewater. *Water Science and Technology*, v. 45, n. 10, p. 357-363.
- PYNAERT, K.; SMETS, B.F.; WYJFELS, S.; BEHEYDT, D.; SICILIANO, S.D.; VERSTRAETE, W. (2003). Characterization of an autotrophic nitrogen-removing biofilm from a highly loaded lab-scale rotating biological contactor. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n.6, p. 3626-3635.
- ROY, R.; KNOWLES, R. (1994). Effect of methane metabolism on nitrification and nitrous oxide production in polluted freshwater sediment. *Appl Environ. Microbiol.*, n. 60, p. 3307-3314.
- RUSTEN, B.; ODEGARD, H.; LUNDAR, A. (1992). Treatment of dairy wastewater in a novel moving bed biofilm reactor. *Water Sci. Technol.*, n. 26, p. 703-711.

- SCHMID, M.; TWACHTMANN, U.; KLEIN, M.; STROUS, M.; JURETSCHKO, S.; JETTEN, M.S.M. *et al.* (2000). Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonia oxidation. *Sist. Appl. Microbio.*, n. 23, p. 93-106.
- SCHMIDELL NETTO, W.; REGINATTO, V.R. Remoção de nitrogênio. VI.2. Processos de Eliminação de Nitrogênio. In: V Curso de Tratamento Biológico de Resíduos. Projeto PROSUL/CNPq – UFSC/UDELAR/UNLP. Florianópolis, 18 a 30 de abril de 2005.
- SCHMIDT, I. & BOCK, E. (1997). Anaerobic ammonia oxidation with nitrogen dioxide by *Nitrosomonas eutropha*. *Arch. Microbiol.*, n. 167, p. 106-111.
- SCHMIDT, I. & BOCK, E. (1998). Anaerobic ammonia oxidation by cell free extracts of *Nitrosomonas eutropha*. *Antonie van Leeuwenhoek*, n. 73, p. 271-278.
- SCHMIDT, I.; SLIEKERS, O.; SCHMID, M.; CIRPUS, I.; STROUS, M.; BOCK, E.; KUENEN, J.G.; JETTEN, M.S.M. (2001). Aerobic and anaerobic ammonia oxidizing bacteria competitors or natural partners? *FEMS Microbiology Ecology*, n. 39, p. 175-181.
- SCHMIDT, I.; SLIEKERS, O.; SCHMID, M.; BOCK, E.; FUERST, J.; KUENEN, J.G.; JETTEN, M.S.M.; STROUS, M. (2003). New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. *FEMS Microbiology reviews*, n. 27, p.481-492.
- SHIMKETS, L.J. & BRUN, Y.V. (1999). Prokaryotic development: strategies to enhance survival. In: *Prokaryotic Development*, ed.: SHIMKETS, L.J.; BRUN, Y.V., pp. 1-7. Washington, DC: Am Soc. Microbiol.
- SLIEKERS, A.O.; DERWORT, N.; CAMPOS GOMEZ, J.L.; STROUS, M.; KUENEN, J.G.; JETTEN, M.S.M. (2001). Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite in one single reactor. *Water Res.* (in press).
- SLIEKERS, A.O.; THIRD, K.; ABMA, W.; KUENEN, J.G.; JETTEN, M.S.M.; (2003). Canon and Anammox in a gas-lift reactor. *FEMS Microbiology, Lett* 218, p. 339-344.
- SOLLO, F.W.; MUELLER, H.F. (1976). Denitrification of wastewater effluents with methane. *J. Water Poll Control Fed.*, n. 48, p. 1840-1842.
- STROUS, M.; van GERVEN, E.; ZHENG, P.; KUENEN, J.G.; JETTEN, M.S.M. (1997a). Ammonium removal from concentrated waste streams with the anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) process in different reactor configurations. *Water Res.*, n. 31, p. 1955-1962.
- STROUS, M.; HEIJNEN, J.J.; 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.*, n.50, p. 589-596.
- STROUS, M.; FUERST, J.A.; LOGEMANN, S.; MUYZER, G.; van de PAS-SCHOONEN, K.T.; WEBB, R.; KUENEN, J.F.; JETTEN, M.S. (1999a). Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature*, n. 400, p. 446-449.
- STRYER L, (1988). *Biochemistry*, 3rd edition. WH Freeman and Company, New York. Thompson IP, Bailey MJ, Fenlon JS, Fermor TR, Lilley AK, Lynch JM, McCormack PJ,
- TARTAKOVSKY, B.; LOTLAR, E.; SHEINTUCH, M. (1996). Coupled nitrification-denitrification processes in a mixed culture of coimmobilized cells: analysis and experiment. *Chemical Engineering Science*, v. 51, n. 10, p. 2327-2336.
- THALASSO, F.; VALLECILLO, A.; GARCIA-ENCINA, P.; FDZ-POLANCO, F. (1997). The use of methane as a sole carbon source for wastewater denitrification. *Water Res.*, n. 31, p. 55-60.
- THIRD, K.A.; SLIEKERS, A.O.; KUENEN, J.G.; JETTEN, M.S.M. (2001). The CANON system (completely autotrophic nitrogen-removal over nitrite) under ammonia limitation: Interaction and competition between three groups of bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.*, n. 24, p. 588-596.
- TIJHUIS, L., van LOOSDRECHT, M.C.M.; HEIJNEN, J.J. (1994). Formation and growth of heterotrophic aerobic biofilms on small suspended particles in airlift reactors. *Biotechnol. Bioengin.* n. 44, p. 595-608.
- TONKOVIC, Z.. (1998). Nitrite accumulation at the Mornington sewage treatment plant - causes and significance (pp 165–172). 19th Appl Microbiol Biotechnol (2006) n. 73, p. 15-26. 25 Biennial International Conference, Water Quality International, 1998. IAWQ, Vancouver, Canadá.
- TRULEAR, M.G. & CHARACKLIS, W.G. (1982). Dynamics of biofilm processes. *J WPCF*, n.54, vol. 9, p. 1288-1301.
- van DONGEN, U.; JETTEN, M.S.M.; van LOOSDRECHT, M.C.M.. (2001). The SHARON-ANAMMOX process for treatment of ammonium rich wastewater. *Water Sci Technol.*, n. 44, p. 153-160.
- van de GRAAF, A.A.; MULDER, A.; de BRUIJN, P.; JETTEN, M.S.M.; ROBERTSON, L.A.; KUENEN, J.G. (1995). Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. *Appl. Environ. Microbiol.*, n. 61, p. 1246-1251.
- van de GRAAF, A.A., de BRUIJN, P., ROBERTSON, L.A., JETTEN, M.S.M., KUENEN, J.G. (1996). Autotrophic growth of anaerobic, ammonium-oxidising micro-organisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology*, n. 142, p. 2187-2196.

- van de GRAAF, A.A.; de BRUIJN, P.; ROBERTSON, L.A.; JETTEN, M.S.M.; KUENEN, J.G. (1997). Metabolic pathway of anaerobic ammonium oxidation on the basis of N-15 studies in a fluidized bed reactor. *Microbiology*, n.143, p. 2415-2421.
- van LOOSDRECHT, M.C.M. & JETTEN, M.S.M. (1998). Microbiological conversions in nitrogen removal. *Water Sci. Technol.*, n. 38, p. 1-7.
- VARESCHE, M.B.; ZAIAT, M.; VIEIRA, L.G.T.; VAZOLLER, R.F.; FORESTI E. (1997). Microbial colonization of polyurethane foam matrices in horizontal-flow anaerobic immobilized-sludge reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, n. 48, p.534-538.
- VERSTRAETE, W. & PHILIPS, S. (1998). Nitrification-denitrification processes and technologies in new contexts. *Environmental pollution*. n. 102, S1, p. 717-726.
- von SPERLING, M.V. (1997). *Lodos ativados - Princípios do tratamento biológico de águas residuárias*. v. 4., Belo Horizonte, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental; Universidade Federal de Minas Gerais.
- VOGEL, A. I. (1981). *Análise Inorgânica Quantitativa*. Quarta edição., Rio de Janeiro, Guanabara.
- WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION. (1991). Orris E. Albertson (Chairman). Nutrient Control. Manual of practice N^o. FD-7. Prepared by task force on nutrient control.
- WERNER, M. & KAYSER, R.; (1991). Denitrification with biogas as a external carbon source. *Water Sci Technol.*, n. 23, p. 701-708.
- WS ATKINS Environment. Identification of Microorganisms in the Environment. Review of the Methodologies for the Extraction, Detection and Final Report. May 2000.
- WUHRMANN, K. In: Mitchell R, editor. Stream purification in water pollution microbiology. New York: Wiley Interscience, 1972, p. 119-200.
- YANG, L & ALLEMAN, J.E. (1992). Investigation of batchwise nitrite build-up by an enriched nitrification culture. *Water Sci Technol*, n. 26, vol. 5-6, p. 997-1005.
- YOO, H.S.; ANN, K.H.; LEE, H.J.; LEE, K.H.; KWAK, Y.J.; SONG, K.G.. (1999). Nitrogen removal from synthetic wastewater by simultaneous nitrification and denitrification (SND) via nitrite in an intermittently aerated reactor. *Water Research*, n. 33, vol.1, p.145-154.
- ZDRADEK, C.P. Seleção de linhagens oxidadoras de amônio e remoção de nitrogênio via nitrito em reator descontínuo alimentado (SBR), sob condições de limitação de nitrogênio. Tese de Doutorado. Universidade Federal de

Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos. Florianópolis, 2005.

ANEXO A

Tabela A1: Acompanhamento analítico do reator PVC durante 913 dias de operação.

Tempo (dias)	Concentração (meio) mg N-NH ₄ /L	Concentração (saída reator) mg N-NH ₄ /L	Concentração (saída reator) mg N-NO ₂ /L	Concentração (saída reator) mg N-NO ₃ /L
2	109,86	10,86	1,41	56,15
4	201,32	10,62	1,04	8,80
6	202,27	70,06	0,95	22,30
8	201,80	92,80	0,86	5,98
10	200,37	151,56	1,87	3,74
12	175,26	34,04	49,99	16,64
15	162,94	22,19	45,42	49,45
17	186,63	30,31	12,30	96,90
19	205,91	30,22	1,14	118,68
22	204,92	24,31	2,05	112,08
24	182,53	30,07	1,50	127,72
26	185,68	28,41	1,04	111,38
29	177,63	28,77	1,14	111,38
31	178,58	28,77	0,72	104,50
33	183,79	27,23	0,63	107,08
36	185,21	27,23	0,77	112,24
38	193,47	15,86	1,04	112,24
40	199,45	10,88	0,82	116,11
43	198,95	11,47	3,05	132,02
45	198,95	0,69	1,00	134,05
47	193,97	85,99	3,24	62,41
50	201,93	0,34	0,62	131,90
52	191,84	14,79	6,37	86,05
54	187,58	0,57	0,62	121,16
59	188,05	1,17	0,29	128,32
61	195,64	0,00	0,20	129,73
64	193,27	3,53	0,76	130,43
66	169,57	1,25	0,76	172,53
68	171,32	1,06	0,06	171,12
71	148,72	2,22	1,27	171,12
73	197,06	0,84	0,71	140,14
75	184,26	0,00	0,43	140,56
80	180,57	1,34	1,04	125,41
82	189,46	0,00	0,48	114,88

Tabela A1: Acompanhamento analítico do reator PVC durante 913 dias de operação (continuação).

Tempo (dias)	Concentração (meio) mg N-NH ₄ /L	Concentração (saída reator) mg N-NH ₄ /L	Concentração (saída reator) mg N-NO ₂ /L	Concentração (saída reator) mg N-NO ₃ /L
85	165,76	0,00	0,53	124,57
87	166,61	0,13	0,43	127,51
89	192,48	0,20	0,76	125,41
92	185,02	0,00	0,39	127,93
113	184,52	0,00	0,76	147,97
115	179,54	11,95	0,34	131,13
121	184,52	0,00	0,20	139,55
123	204,42	6,14	0,43	114,99
127	204,42	21,66	0,29	123,41
129	193,97	0,00	0,29	130,43
131	194,97	0,00	0,25	127,62
134	192,98	0,00	0,01	125,52
136	193,47	0,10	0,96	126,22
138	195,47	0,00	1,18	125,52
141	195,96	15,14	0,65	133,94
144	200,44	15,74	0,70	131,83
146	194,97	2,71	0,61	127,62
148	191,48	0,00	0,61	137,44
150	182,03	11,00	0,70	129,02
152	186,51	0,00	0,57	128,32
163	492,64	19,86	98,68	230,35
165	431,04	5,41	161,43	170,87
167	463,02	0,00	13,11	408,76
169	512,78	0,00	6,09	433,54
173	569,65	6,60	7,41	418,67
176	523,44	0,00	6,09	433,54
179	513,97	0,00	6,70	478,71
181	518,71	0,00	6,70	424,20
186	515,15	0,00	7,67	424,20
188	581,49	0,00	0,74	409,66
194	521,07	0,00	1,00	424,20
194	490,27	0,00	0,74	436,85
198	521,07	0,00	0,74	438,50
200	508,04	0,00	0,61	400,50

Tabela A1: Acompanhamento analítico do reator PVC durante 913 dias de operação (continuação).

Tempo (dias)	Concentração (meio) mg N-NH ₄ /L	Concentração (saída reator) mg N-NH ₄ /L	Concentração (saída reator) mg N-NO ₂ /L	Concentração (saída reator) mg N-NO ₃ /L
201	515,15	0,00	0,87	431,89
205	495,01	0,00	0,65	426,93
219	1094,28	149,08	28,28	455,49
221	1091,91	380,10	91,03	399,32
222	1129,82	400,24	94,32	418,32
225	999,50	464,02	92,14	402,39
227	1046,89	497,19	114,34	291,54
231	1039,78	407,15	170,82	258,83
234	1046,89	513,77	186,75	267,92
236	1032,67	409,52	406,36	198,86
241	963,96	331,33	455,92	199,25
243	1061,10	186,80	528,54	202,72
247	1037,41	191,53	523,91	195,78
250	1023,19	267,36	522,36	161,09
253	1044,52	193,90	367,84	379,65
255	1049,26	103,87	265,85	480,26
283	1040,52	228,59	156,25	626,68
285	1071,28	230,95	178,19	612,52
289	1038,16	105,57	130,26	683,31
295	1057,08	8,57	166,81	831,95
297	1061,81	65,35	79,89	793,02
306	1035,79	1,49	7,34	888,57
309	986,11	2,20	5,42	863,80
311	1031,06	0,55	1,82	909,81
313	1028,69	0,31	3,79	874,42
316	1064,18	1,73	10,62	835,49
318	1066,55	0,42	6,59	846,11
323	1031,06	0,30	0,20	793,02
330	1045,25	0,35	0,00	807,17
340	971,91	1,02	0,41	886,81
352	1045,25	17,70	4,48	889,00
354	863,09	0,00	0,06	900,58
362	1012,13	17,60	0,00	742,22
366	1021,60	0,94	0,00	869,60

Tabela A1: Acompanhamento analítico do reator PVC durante 913 dias de operação (continuação).

Tempo (dias)	Concentração (meio) mg N-NH ₄ /L	Concentração (saída reator) mg N-NH ₄ /L	Concentração (saída reator) mg N-NO ₂ /L	Concentração (saída reator) mg N-NO ₃ /L
369	979,01	0,00	0,00	786,97
380	1040,52	0,00	0,00	736,00
383	981,38	2,24	0,00	719,25
395	1090,20	0,00	0,00	626,47
396	1000,30	0,00	0,00	585,73
397	908,04	1,93	0,00	608,64
410	1033,09	134,60	119,57	550,13
425	1006,15	120,77	125,61	630,00
426	988,19	386,67	71,25	448,48
430	1072,00	484,73	75,28	386,77
433	931,32	312,49	206,15	328,68
437	961,25	323,81	250,45	372,25
443	958,26	284,56	387,36	154,43
446	925,33	160,34	228,30	361,36
453	865,46	268,10	455,82	165,32
464	763,69	270,30	448,21	156,30
471	1033,09	269,60	588,71	129,02
475	1036,08	327,97	645,09	28,27
485	982,20	190,27	524,39	84,63
495	1030,09	206,74	538,78	83,76
502	1033,09	278,58	567,54	60,42
516	1033,09	250,14	557,95	32,74
520	1033,09	224,70	524,39	88,44
527	1018,12	345,93	514,81	70,40
530	1021,11	274,09	687,39	20,97
534	985,20	247,15	615,48	34,78
537	1057,03	205,24	706,56	33,99
550	892,40	200,75	615,48	20,81
551	793,62	182,79	653,83	23,17
565	958,26	176,80	601,10	44,35
576	1149,83	244,15	596,30	78,40
585	949,28	208,23	586,72	72,59
586	1054,04	211,23	591,51	71,97
605	1057,03	124,42	572,33	143,31
607	1063,02	149,86	466,87	69,30

Tabela A1: Acompanhamento analítico do reator PVC durante 913 dias de operação (continuação).

Tempo (dias)	Concentração (meio) mg N-NH ₄ /L	Concentração (saída reator) mg N-NH ₄ /L	Concentração (saída reator) mg N-NO ₂ /L	Concentração (saída reator) mg N-NO ₃ /L
614	937,30	266,60	351,29	107,84
619	1069,01	356,40	409,34	161,07
629	1236,63	504,57	155,26	157,93
656	1245,61	477,63	270,31	172,05
662	1104,93	568,93	136,08	172,05
675	1009,14	880,23	148,02	192,45
683	1009,14	821,86	49,27	63,79
704	1107,92	760,50	71,07	208,25
711	1119,89	763,49	8,76	323,89
717	1120,89	733,76	26,02	294,44
720	1121,89	679,88	42,80	332,10
733	991,18	627,30	23,47	141,75
738	1030,09	627,30	12,15	164,46
746	994,18	533,01	9,28	155,73
748	994,18	446,20	10,24	188,91
753	1024,11	417,77	36,32	173,19
754	1018,12	428,24	101,13	190,66
762	1033,09	380,35	23,97	192,41
767	985,20	404,30	11,27	192,41
769	1086,97	387,83	27,57	99,83
774	955,26	384,84	98,49	160,97
776	1012,13	390,83	170,41	120,79
781	988,19	371,37	88,06	61,40
783	985,20	356,40	181,88	66,64
788	1030,09	401,30	73,35	127,52
795	1027,10	407,29	44,05	175,16
798	1051,05	489,60	36,47	171,99
803	970,23	558,45	29,99	79,89
817	991,18	654,24	20,18	56,29
822	979,21	522,53	13,55	170,62
836	1077,99	666,21	27,19	104,56
850	1080,98	664,71	26,81	107,10
869	997,17	546,48	19,04	157,47
871	991,18	547,97	27,57	119,05
879	1104,93	676,69	29,85	110,31
881	1074,99	705,12	21,13	80,62
913	1030,09	688,86	8,62	152,23

Tabela A2: Acompanhamento analítico do reator PS durante 913 dias de operação.

Tempo (dias)	Concentração (meio) mg N-NH ₄ /L	Concentração (saída reator) mg N-NH ₄ /L	Concentração (saída reator) mg N-NO ₂ /L	Concentração (saída reator) mg N-NO ₃ /L
2	109,86	20,30	1,59	53,73
4	201,32	19,35	1,14	11,02
6	202,27	67,21	0,95	29,35
8	201,80	89,01	0,82	7,59
10	200,37	151,09	2,55	4,03
12	175,26	26,46	31,94	24,66
15	162,94	25,04	38,34	52,75
17	186,63	39,43	15,04	94,03
19	205,91	37,95	1,14	115,24
22	204,92	36,91	1,32	112,66
24	182,53	33,15	1,32	125,14
26	153,93	33,03	1,14	116,11
29	185,68	35,17	1,00	116,54
31	177,63	28,29	0,95	109,23
33	178,58	29,12	0,77	108,37
36	186,63	34,46	8,67	103,22
38	183,79	24,86	4,71	85,59
40	199,90	21,66	0,77	89,89
43	185,21	16,80	0,50	124,28
45	202,43	0,10	1,14	141,22
47	193,47	22,37	2,12	116,86
50	199,45	3,77	1,18	133,34
52	202,43	14,67	4,50	86,77
54	198,95	0,34	0,53	103,96
59	198,95	1,64	0,01	130,43
61	193,97	0,00	0,01	130,43
64	201,93	2,59	0,15	129,02
66	191,84	2,39	0,53	172,53
68	187,58	2,20	0,29	165,51
71	188,05	0,42	0,20	195,68
73	195,64	0,06	0,57	143,09
75	193,27	0,20	0,34	144,35
80	169,57	0,20	0,43	126,25
82	171,32	0,00	0,48	114,88

Tabela A2: Acompanhamento analítico do reator Ps durante 913 dias de operação (continuação).

Tempo (dias)	Concentração (meio) mg N-NH ₄ /L	Concentração (saída reator) mg N-NH ₄ /L	Concentração (saída reator) mg N-NO ₂ /L	Concentração (saída reator) mg N-NO ₃ /L
85	148,72	0,00	0,39	122,04
87	197,06	0,06	0,62	125,83
89	184,26	0,00	0,34	131,72
92	180,57	0,00	0,39	126,67
113	184,52	0,00	0,48	141,65
115	179,54	10,17	0,39	130,43
121	184,52	0,00	0,39	136,74
123	204,42	6,97	0,39	114,29
127	204,42	20,12	0,15	126,22
129	193,97	0,00	0,11	132,53
131	194,97	0,00	0,15	128,32
134	192,98	0,00	0,01	125,52
136	193,47	0,00	0,78	129,73
138	195,47	0,10	0,65	129,02
141	195,96	11,71	1,22	133,23
144	200,44	17,87	0,78	131,13
146	194,97	3,18	0,65	138,15
148	192,48	0,00	0,92	138,15
150	182,03	11,59	0,78	125,52
152	186,51	0,00	0,57	133,23
163	492,64	16,31	52,17	286,51
165	431,04	3,75	95,61	273,30
167	463,02	0,00	10,92	412,07
169	512,78	3,28	6,53	464,93
173	569,65	0,00	6,97	425,28
176	523,44	2,20	7,18	444,19
177	486,72	0,00	6,70	451,46
179	513,97	0,00	6,70	451,46
181	518,71	0,00	7,67	424,20
186	515,15	0,00	0,83	426,01
188	581,49	0,00	1,05	422,38
194	521,07	0,00	0,70	418,67
194	490,27	0,00	0,83	418,67
198	521,07	0,00	0,78	426,93
200	508,04	0,00	0,70	397,20

Tabela A2: Acompanhamento analítico do reator PS durante 913 dias de operação (continuação).

Tempo (dias)	Concentração (meio) mg N-NH ₄ /L	Concentração (saída reator) mg N-NH ₄ /L	Concentração (saída reator) mg N-NO ₂ /L	Concentração (saída reator) mg N-NO ₃ /L
201	515,15	0,00	0,96	428,59
205	495,01	0,00	0,61	415,37
219	1094,28	235,56	51,10	438,97
221	1091,91	631,25	121,53	286,16
222	1129,82	628,88	101,56	274,59
225	999,50	497,19	92,14	347,88
227	1046,89	499,56	26,97	453,27
231	1039,78	461,65	60,28	440,55
234	1046,89	485,34	14,42	484,17
236	1032,67	433,21	26,74	538,68
241	963,96	222,34	275,12	279,04
243	1061,10	198,64	160,77	535,76
247	1037,41	208,12	166,95	504,54
250	1023,19	286,31	170,04	341,49
277	1118,59	143,42	390,49	337,30
289	1038,16	260,25	235,86	279,84
292	1052,35	113,34	202,56	463,88
295	1057,08	535,10	144,07	329,39
302	1061,81	9,56	176,30	555,90
304	1045,25	113,34	113,18	577,13
306	1035,79	70,69	126,83	570,05
309	986,11	63,59	154,13	580,67
311	1031,06	61,22	43,24	824,87
313	1028,69	6,39	0,60	831,95
316	1064,18	17,33	2,17	902,73
318	1066,55	0,23	0,90	902,73
323	1031,06	0,28	0,34	750,55
327	950,62	6,88	2,73	807,17
330	1045,25	0,19	0,34	835,49
340	971,91	0,00	0,83	755,99
352	1045,25	3,06	3,22	976,31
366	1021,60	1,52	0,00	900,58
383	981,38	7,92	27,51	724,57
395	1090,20	9,08	20,00	539,91
396	1000,30	5,09	11,72	570,46

Tabela A2: Acompanhamento analítico do reator PS durante 913 dias de operação (continuação).

Tempo (dias)	Concentração (meio) mg N-NH ₄ /L	Concentração (saída reator) mg N-NH ₄ /L	Concentração (saída reator) mg N-NO ₂ /L	Concentração (saída reator) mg N-NO ₃ /L
397	908,04	11,07	8,20	588,28
410	1033,09	156,60	145,75	593,69
425	1006,15	233,92	498,10	394,03
426	988,19	396,10	264,54	194,36
430	1072,00	286,72	306,82	110,87
433	931,32	378,50	415,55	92,72
437	961,25	366,55	453,81	74,56
443	958,26	280,07	550,45	56,17
446	925,33	275,96	639,04	34,84
453	865,46	347,42	592,74	26,20
464	763,69	301,10	653,14	44,00
471	1033,09	263,61	757,84	17,55
475	1036,08	263,61	668,21	17,21
485	982,20	239,66	673,01	26,20
488	1030,09	289,05	653,83	22,05
495	1030,09	320,48	653,83	20,32
499	1018,12	194,76	754,50	30,86
502	1033,09	197,76	778,47	30,52
516	1035,00	256,13	735,33	19,25
520	1035,00	235,17	783,27	24,27
527	1035,00	393,82	629,86	14,54
530	1035,00	313,00	696,98	17,05
534	1035,00	295,04	658,62	17,52
537	1035,00	336,95	658,62	17,21
550	1035,00	200,75	639,45	26,15
551	1035,00	185,78	644,24	19,25
565	1035,00	187,28	653,83	33,99
576	1035,00	330,96	553,16	46,39
579	1035,00	251,64	452,48	101,94
584	1035,00	420,76	332,64	106,64
585	1035,00	360,89	366,19	82,17
586	1035,00	314,50	433,31	95,97
605	1035,00	131,90	562,75	90,48
607	1035,00	125,92	505,22	90,64
612	1035,00	238,17	581,92	87,66

Tabela A2: Acompanhamento analítico do reator PS durante 913 dias de operação (continuação).

Tempo (dias)	Concentração (meio) mg N-NH ₄ /L	Concentração (saída reator) mg N-NH ₄ /L	Concentração (saída reator) mg N-NO ₂ /L	Concentração (saída reator) mg N-NO ₃ /L
614	1035,00	161,84	591,51	69,87
619	1035,00	143,88	385,37	361,92
629	1035,00	311,50	160,05	489,01
634	1035,00	305,52	505,22	310,13
641	1035,00	286,06	126,50	258,30
646	1035,00	351,91	64,17	679,45
648	1035,00	392,32	279,90	499,94
656	1035,00	79,52	255,93	663,18
660	1035,00	75,03	265,52	479,60
662	1035,00	75,03	59,38	586,30
670	1035,00	10,68	22,42	650,63
675	1035,00	30,13	46,39	489,01
683	828,26	31,63	14,75	672,60
704	828,26	10,25	2,72	418,82
711	828,26	119,28	3,78	392,93
717	828,26	195,20	2,57	281,89
720	828,26	223,94	2,76	330,53
733	670,90	97,48	6,84	382,80
738	667,91	72,04	8,00	436,94
746	670,90	88,50	13,84	410,74
748	643,96	46,60	10,97	491,09
753	620,01	21,78	11,25	526,02
754	584,09	22,76	12,88	519,04
762	694,85	34,46	38,52	470,13
767	623,01	8,42	23,74	503,32
769	655,93	13,51	42,97	496,33
774	596,07	48,53	327,82	129,53
776	949,28	49,43	128,72	428,21
781	928,32	21,59	296,55	402,01
783	973,22	28,78	247,55	608,12
788	886,42	107,96	111,25	807,15
795	1039,07	2,52	19,41	813,50
798	1191,73	2,64	0,42	934,18
803	1191,73	2,46	7,72	851,61
809	1083,97	2,76	1,28	861,13

Tabela A2: Acompanhamento analítico do reator PS durante 913 dias de operação (continuação).

Tempo (dias)	Concentração (meio) mg N-NH ₄ /L	Concentração (saída reator) mg N-NH ₄ /L	Concentração (saída reator) mg N-NO ₂ /L	Concentração (saída reator) mg N-NO ₃ /L
811	1092,95	47,96	143,55	765,13
817	1206,70	97,29	269,59	650,80
822	1269,56	168,56	234,52	566,96
830	1257,59	138,33	426,90	325,60
850	1404,26	193,07	516,92	414,52
869	1176,77	152,36	658,78	232,58
871	1185,75	181,58	596,61	279,74
873	1182,75	141,83	752,78	183,67
879	1383,30	154,53	749,55	134,77
881	1209,69	118,02	893,60	98,09
886	1482,08	809,89	9,76	368,82
888	1341,40	715,60	1,80	510,30
913	1027,10	631,99	5,44	272,75

Tabela A3: Acompanhamento analítico do reator PU durante 913 dias de operação.

Tempo (dias)	Concentração (meio) mg N-NH ₄ /L	Concentração (saída reator) mg N-NH ₄ /L	Concentração (saída reator) mg N-NO ₂ /L	Concentração (saída reator) mg N-NO ₃ /L
2	109,86	11,57	1,96	57,76
4	201,32	10,86	1,68	9,81
6	202,27	122,66	1,14	23,91
8	201,80	179,05	0,91	8,00
10	200,37	143,03	7,58	5,17
12	175,26	53,47	58,21	11,91
15	162,94	33,09	40,85	45,15
17	186,63	44,65	12,07	96,90
19	205,91	39,61	1,18	122,11
22	204,92	33,87	1,64	114,38
24	182,53	33,27	1,36	110,52
26	153,93	32,92	1,27	110,95
29	185,68	33,39	1,27	111,81
31	177,63	26,04	0,95	113,10

Tabela A2: Acompanhamento analítico do reator PU durante 913 dias de operação (continuação).

Tempo (dias)	Concentração (meio) mg N-NH ₄ /L	Concentração (saída reator) mg N-NH ₄ /L	Concentração (saída reator) mg N-NO ₂ /L	Concentração (saída reator) mg N-NO ₃ /L
33	178,58	24,98	1,18	118,26
36	186,63	33,51	0,91	116,97
38	183,79	29,84	0,50	114,39
40	199,90	22,96	0,54	118,26
43	185,21	23,67	0,59	126,43
45	202,43	2,59	1,14	132,62
47	193,47	59,81	3,10	87,48
50	199,45	4,01	0,85	132,62
52	202,43	8,27	0,67	124,74
54	198,95	0,10	0,76	108,26
59	198,95	0,00	0,11	135,34
61	193,97	1,28	0,06	129,73
64	201,93	5,07	0,53	128,32
66	191,84	2,93	0,34	174,63
68	187,58	2,01	0,01	172,53
71	188,05	4,26	0,34	169,02
73	195,64	1,48	0,05	140,98
75	193,27	2,33	0,57	140,14
80	169,57	0,98	0,67	127,51
82	171,32	0,34	0,67	119,93
85	148,72	0,06	0,53	118,67
87	197,06	0,00	0,53	125,83
89	192,48	9,87	0,85	127,51
92	185,02	0,06	0,62	128,35
113	184,52	0,10	0,57	139,55
115	179,54	11,35	0,34	129,73
121	184,52	0,00	0,43	131,83
123	204,42	16,09	0,39	105,87
127	204,42	20,24	0,15	122,71
129	193,97	0,00	0,15	131,83
131	194,97	0,00	0,25	122,71
134	192,98	0,00	0,15	122,71
136	193,47	0,45	1,22	125,52
138	195,47	0,00	0,92	123,41

Tabela A3: Acompanhamento analítico do reator PU durante 913 dias de operação (continuação).

Tempo (dias)	Concentração (meio) mg N-NH ₄ /L	Concentração (saída reator) mg N-NH ₄ /L	Concentração (saída reator) mg N-NO ₂ /L	Concentração (saída reator) mg N-NO ₃ /L
141	195,96	0,00	1,18	126,22
144	200,44	15,97	0,92	131,83
146	194,97	3,42	0,78	129,02
148	200,44	0,00	0,78	131,13
150	182,03	3,06	0,57	130,43
152	186,51	0,93	0,65	116,39
163	492,64	51,61	38,13	284,86
165	431,04	38,35	63,14	293,12
167	463,02	3,04	8,72	405,46
169	512,78	3,04	16,18	407,11
173	569,65	18,44	10,92	405,46
176	523,44	7,26	6,70	449,64
177	486,72	1,00	6,70	424,20
179	513,97	1,00	6,70	424,20
181	518,71	2,56	7,67	416,93
186	515,15	0,00	3,55	416,93
188	581,49	0,00	0,78	411,48
194	521,07	0,00	0,78	425,28
194	490,27	5,55	1,53	393,89
198	521,07	0,34	0,70	418,67
200	508,04	0,00	0,87	428,59
201	515,15	0,00	0,83	413,72
205	495,01	0,00	0,74	425,28
221	1091,91	585,05	5,24	362,15
222	1129,82	606,37	75,89	286,98
225	999,50	490,08	110,48	300,63
227	1046,89	535,10	87,31	346,06
231	1039,78	464,02	132,20	295,18
234	1046,89	518,51	87,79	333,34
236	1032,67	468,75	31,60	496,89
241	963,96	310,00	125,23	504,54
243	1061,10	253,14	174,68	449,03
247	1037,41	236,55	132,96	449,03
250	1023,19	385,83	112,87	462,91

Tabela A3: Acompanhamento analítico do reator PU durante 913 dias de operação (continuação).

Tempo (dias)	Concentração (meio) mg N-NH ₄ /L	Concentração (saída reator) mg N-NH ₄ /L	Concentração (saída reator) mg N-NO ₂ /L	Concentração (saída reator) mg N-NO ₃ /L
302	1061,81	242,78	689,79	85,19
304	1045,25	98,47	700,03	216,14
306	1035,79	51,15	664,20	301,08
311	1031,06	29,86	660,79	318,77
313	1028,69	166,74	713,67	145,36
316	1064,18	184,63	771,68	163,05
318	1066,55	213,44	648,59	131,20
323	1031,06	118,05	493,75	262,15
327	950,62	131,97	299,11	460,34
330	1045,25	84,27	471,63	347,09
340	971,91	90,23	321,22	535,67
352	1045,25	203,51	184,09	556,33
354	863,09	258,16	101,51	439,28
362	1012,13	118,55	6,24	680,26
369	979,01	228,35	406,75	611,41
374	962,45	298,40	20,73	562,82
380	1040,52	274,06	20,73	659,56
396	1000,30	288,87	72,73	415,16
397	908,04	318,27	76,34	298,05
410	1033,09	457,70	49,10	404,92
425	1006,15	374,10	296,76	183,47
426	988,19	332,61	399,44	176,21
430	1072,00	497,93	373,27	81,83
433	931,32	247,75	538,37	45,52
437	961,25	357,12	526,29	23,74
443	958,26	271,09	610,86	23,85
446	925,33	173,81	697,44	20,15
453	865,46	348,92	689,38	19,11
471	1033,09	265,11	753,81	13,58
475	1036,08	227,69	716,15	6,49
485	982,20	202,25	831,21	29,14
488	1030,09	221,70	792,85	17,73
495	1030,09	221,70	773,68	23,78
499	1018,12	173,81	778,47	26,37

Tabela A3: Acompanhamento analítico do reator PU durante 913 dias de operação (continuação).

Tempo (dias)	Concentração (meio) mg N-NH ₄ /L	Concentração (saída reator) mg N-NH ₄ /L	Concentração (saída reator) mg N-NO ₂ /L	Concentração (saída reator) mg N-NO ₃ /L
502	1033,09	268,10	764,09	25,85
506	1035	260,62	816,82	17,52
516	1035	257,62	735,33	20,81
520	1035	167,82	864,76	23,48
527	1035	260,62	812,03	15,79
530	1035	181,29	840,79	16,26
534	1035	176,80	816,82	17,36
537	1035	182,79	850,38	16,26
550	1035	127,42	658,62	44,04
551	1035	170,82	668,21	35,88
584	1035	347,42	251,14	219,13
629	1035	304,02	279,90	311,70
641	1035	311,50	83,35	268,66
660	1035	194,76	1,05	322,69
675	828,26	95,99	0,57	333,67
704	828,26	1,36	10,39	403,28
711	828,26	92,99	4,35	386,02
717	828,26	199,99	2,15	212,85
720	828,26	210,17	1,38	205,01
817	1206,70	693,15	4,83	119,80
822	1269,56	663,22	7,81	155,37
830	1257,59	756,01	4,97	74,07
836	1287,52	643,76	6,39	0,00
869	1176,77	667,71	7,81	0,18
871	1185,75	706,62	6,86	0,00
873	1182,75	706,62	7,81	0,02
879	1392,28	756,01	4,26	0,00
913	1326,43	637,97	21,51	124,00

ANEXO B

Tabela B1 – Concentração e percentual de remoção de nitrogênio em função do tempo em teste aeróbio realizado com meio autotrófico.

Tempo (horas)	Conc. mg N-NH ₄ /L	Conc. mg N-NO ₂ /L	Conc. mg N-NO ₃ /L	Remoção %
0	498,58	11,39	0,42	0
1	464,16	16,37	0,57	3,50
2	443,21	23,09	0,57	6,36
3	413,28	32,48	0,42	10,51
4	402,80	40,54	0,57	10,96
5	395,32	49,16	0,73	10,70
19	327,97	102,53	5,28	12,59
43	57,07	207,99	8,89	45,05
70	1,50	265,52	11,87	44,06

ANEXO C

Tabela C1: Análise detalhada dos componentes inorgânicos de nitrogênio (amônia, nitrito e nitrato) e pH ao longo do reator PVC durante a Etapa 1.

Distância (cm)	Concentração mg N-NH ₄ /L	Concentração mg N-NO ₂ /L	Concentração mg N-NO ₃ /L	pH
1	60,62	4,79	73,41	7,91
5	20,10	3,65	124,62	7,8
10	5,65	2,55	139,49	7,83
15	0,00	1,09	142,79	8,02
20	0,00	0,82	142,79	8,19
25	0,00	0,72	142,43	8,29
30	0,00	0,77	149,87	8,33
35	0,00	0,82	149,04	8,39
40	0,00	0,82	149,04	8,38
45	0,00	0,72	147,39	8,43

Tabela C2: Análise detalhada dos componentes inorgânicos de nitrogênio (amônia, nitrito e nitrato) e pH ao longo do reator PS durante a Etapa 1.

Distância (cm)	Concentração mg N-NH ₄ /L	Concentração mg N-NO ₂ /L	Concentração mg N-NO ₃ /L	pH
1	131,70	2,60	28,80	7,85
5	16,78	3,01	132,88	7,87
10	14,18	1,87	144,44	7,95
15	4,70	1,00	147,75	7,98
20	0,10	0,77	149,40	8,05
25	0,00	0,77	149,87	8,01
30	0,00	0,82	156,47	8,12
35	0,00	0,68	154,00	8,29
40	0,00	0,82	153,17	8,35
45	0,00	0,77	149,87	8,42

Tabela C3: Análise detalhada dos componentes inorgânicos de nitrogênio (amônia, nitrito e nitrato) e pH ao longo do reator PU durante a Etapa 1.

Distância (cm)	Concentração mg N-NH ₄ /L	Concentração mg N-NO ₂ /L	Concentração mg N-NO ₃ /L	pH
1	33,84	1,78	118,01	8,15
5	20,34	1,23	129,57	8,10
10	16,07	1,04	137,83	8,08
15	13,70	0,95	139,49	8,01
20	4,70	1,09	137,83	7,95
25	11,59	0,86	140,78	7,95
30	7,09	0,86	141,61	7,87
35	13,13	1,04	144,08	7,85
40	0,00	0,82	153,17	8,35
45	0,00	0,77	149,87	8,42

Tabela C4: Análise detalhada dos componentes inorgânicos de nitrogênio (amônia, nitrito e nitrato) e pH ao longo do reator PVC durante a Etapa 2.

Distância (cm)	Concentração mg N-NH ₄ /L	Concentração mg N-NO ₂ /L	Concentração mg N-NO ₃ /L	pH
1	86,50	46,89	322,58	7,75
5	75,55	42,28	355,77	7,83
10	62,61	33,99	378,99	7,47
15	38,73	24,77	405,54	7,14
20	5,39	14,63	422,13	6,96
25	0,00	6,09	423,81	6,86
30	0,00	6,97	430,13	6,79
35	0,00	9,60	420,52	6,73
40	0,00	6,97	412,75	6,71
45	0,00	7,41	419,07	6,68

Tabela C5: Análise detalhada dos componentes inorgânicos de nitrogênio (amônia, nitrito e nitrato) e pH ao longo do reator PS durante a Etapa 2.

Distância (cm)	Concentração mg N-NH ₄ /L	Concentração mg N-NO ₂ /L	Concentração mg N-NO ₃ /L	pH
1	66,30	30,67	314,78	7,7
5	59,67	31,10	321,10	7,48
10	39,77	21,01	359,02	7,4
15	19,39	16,18	374,83	7,3
20	12,05	12,23	384,31	7,07
25	3,04	11,36	404,85	7,24
30	0,44	8,29	408,01	6,94
35	0,00	6,09	412,75	6,82
40	0,00	13,55	396,95	6,8
45	0,00	8,29	400,11	6,78

Tabela C6: Análise detalhada dos componentes inorgânicos de nitrogênio (amônia, nitrito e nitrato) e pH ao longo do reator PU durante a Etapa 2.

Distância (cm)	Concentração mg N-NH ₄ /L	Concentração mg N-NO ₂ /L	Concentração mg N-NO ₃ /L	pH
1	66,54	20,13	330,58	7,68
5	49,48	20,13	357,44	7,51
10	41,90	20,57	347,96	7,42
15	33,84	20,57	357,44	7,34
20	37,40	18,82	354,28	7,32
25	24,37	17,50	362,18	7,35
30	8,73	16,62	376,41	7,38
35	8,73	18,38	370,09	7,35
40	8,49	15,31	377,99	7,31
45	11,10	15,31	376,41	7,35

Tabela C7: Análise detalhada dos componentes inorgânicos de nitrogênio (amônia, nitrito e nitrato) e pH ao longo do reator PVC durante a Etapa 3.

Distância (cm)	Concentração mg N-NH ₄ /L	Concentração mg N-NO ₂ /L	Concentração mg N-NO ₃ /L	pH
1	264,08	242,84	378,94	8,25
5	212,03	249,66	424,95	8,26
10	176,54	251,37	453,26	8,23
15	117,40	169,48	591,29	8,16
20	27,50	84,18	704,54	7,97
25	22,76	63,71	736,39	7,8
30	52,97	41,54	828,41	7,76
35	40,55	31,01	814,25	7,75
40	24,16	18,42	842,57	7,75
45	7,26	10,62	835,49	7,74

Tabela C8: Análise detalhada dos componentes inorgânicos de nitrogênio (amônia, nitrito e nitrato) e pH ao longo do reator PS durante a Etapa 3.

Distância (cm)	Concentração mg N-NH ₄ /L	Concentração mg N-NO ₂ /L	Concentração mg N-NO ₃ /L	pH
1	287,73	213,35	439,11	8,08
5	200,20	211,25	442,64	8,17
10	129,23	199,31	566,51	8,11
15	70,08	126,28	619,60	8,02
20	34,59	108,02	761,17	7,82
25	44,53	39,91	824,87	7,65
30	31,61	35,00	867,34	7,58
35	17,20	10,42	885,04	7,52
40	9,75	0,59	881,50	7,5
45	13,23	0,33	902,73	7,49

Tabela C9: Análise detalhada dos componentes inorgânicos de nitrogênio (amônia, nitrito e nitrato) e pH ao longo do reator PU durante a Etapa 3.

Distância (cm)	Concentração mg N-NH ₄ /L	Concentração mg N-NO ₂ /L	Concentração mg N-NO ₃ /L	pH
1	292,05	625,07	7,53	7,6
5	283,07	615,48	15,65	7,5
10	260,62	649,04	5,63	7,36
15	242,66	677,80	7,01	7,35
20	227,69	711,36	7,70	7,2
25	278,58	711,36	15,31	7,18
30	232,18	725,74	10,98	7,18
35	232,18	720,95	18,24	7,15
40	229,19	701,77	7,18	7,15
45	227,69	716,15	8,05	7,15

Tabela C10: Análise detalhada dos componentes inorgânicos de nitrogênio (amônia, nitrito e nitrato) e pH ao longo do reator PVC durante a Etapa 4.

Distância (cm)	Concentração mg N-NH ₄ /L	Concentração mg N-NO ₂ /L	Concentração mg N-NO ₃ /L	pH
1	413,28	524,39	10,62	8,08
5	341,44	596,30	10,93	8,08
10	281,57	649,04	13,28	8,05
15	239,66	692,18	17,36	7,91
20	209,73	711,36	18,15	7,74
25	163,33	720,95	22,23	7,49
30	152,86	716,15	28,03	7,34
35	146,87	720,95	37,76	7,03
40	152,86	720,95	37,13	6,97
45	0,00	0,00	0,00	6,91

Tabela C11: Análise detalhada dos componentes inorgânicos de nitrogênio (amônia, nitrito e nitrato) e pH ao longo do reator PS durante a Etapa 4.

Distância (cm)	Concentração mg N-NH ₄ /L	Concentração mg N-NO ₂ /L	Concentração mg N-NO ₃ /L	pH
1	541,99	390,16	4,50	8,3
5	470,15	471,66	9,36	8,24
10	429,74	510,01	8,58	8,2
15	362,39	529,19	8,26	8,04
20	320,48	591,51	7,95	7,88
25	286,06	629,86	10,14	7,78
30	260,62	663,42	9,83	7,5
35	257,62	696,98	9,83	7,46
40	247,15	711,36	16,58	7,36
45	247,15	711,36	14,85	7,42

Tabela C12: Análise detalhada dos componentes inorgânicos de nitrogênio (amônia, nitrito e nitrato) e pH ao longo do reator PU durante a Etapa 4.

Distância (cm)	Concentração mg N-NH ₄ /L	Concentração mg N-NO ₂ /L	Concentração mg N-NO ₃ /L	pH
1	269,60	286,72	15,79	7,73
5	238,17	339,45	14,69	7,67
10	224,70	341,48	12,50	7,53
15	196,26	368,21	17,68	7,47
20	170,82	382,59	16,11	7,36
25	157,35	396,98	17,68	7,2
30	155,85	406,56	19,25	7,17
35	158,84	411,36	15,64	7,12
40	155,85	411,36	20,19	7,14
45	154,35	406,56	19,56	7,13

Tabela C13: Análise detalhada dos componentes inorgânicos de nitrogênio (amônia, nitrito e nitrato) e pH ao longo do reator PVC durante a Etapa 5.

Distância (cm)	Concentração mg N-NH ₄ /L	Concentração mg N-NO ₂ /L	Concentração mg N-NO ₃ /L	pH
1	688,86	14,50	138,26	8,27
10	664,91	15,06	150,49	8,25
20	670,90	16,20	148,74	8,23
30	664,91	14,31	155,73	8,03
45	659,04	13,22	148,03	7,96

Tabela C14: Análise detalhada dos componentes inorgânicos de nitrogênio (amônia, nitrito e nitrato) e pH ao longo do reator PS durante a Etapa 5.

Distância (cm)	Concentração mg N-NH ₄ /L	Concentração mg N-NO ₂ /L	Concentração mg N-NO ₃ /L	pH
1	398,51	354,88	167,95	8,35
10	320,68	395,62	194,15	8,21
20	251,84	418,37	246,55	8,16
30	221,90	214,87	381,05	8,14
45	224,90	124,84	438,69	8,13

Tabela C15: Análise detalhada dos componentes inorgânicos de nitrogênio (amônia, nitrito e nitrato) e pH ao longo do reator PU durante a Etapa 5.

Distância (cm)	Concentração mg N-NH ₄ /L	Concentração mg N-NO ₂ /L	Concentração mg N-NO ₃ /L	pH
1	803,94	18,77	37,30	7,95
10	761,94	19,34	35,40	7,87
20	716,94	21,33	42,07	7,83
30	684,94	22,01	43,02	7,67
45	637,97	21,51	43,97	7,55

ANEXO D

Tabela D1: Medidas de oxigênio dissolvido nos reatores durante o dia 430 de operação, referentes à Etapa 4 nos reatores PVC e PS e Etapa 3 no reator PU.

Distância (cm)	Concentração (mg O ₂ /L)		
	PVC	PS	PU
1	0,43	0,39	0,28
10	0,41	0,42	0,27
20	0,27	0,35	0,34
30	0,36	0,32	0,40
45	0,45	0,39	0,42

Tabela D2: Medidas de oxigênio dissolvido nos reatores durante o dia 473 de operação, referentes à Etapa 4 nos reatores PVC e PS e Etapa 3 no reator PU.

Distância (cm)	Concentração (mg O ₂ /L)		
	PVC	PS	PU
1	0,55	0,58	0,54
20	0,45	0,62	0,49
45	0,46	0,45	0,39

Tabela D3: Medidas de oxigênio dissolvido nos reatores durante o dia 913 de operação, referentes à Etapa 5 nos reatores PVC e PS e PU.

Distância (cm)	Concentração (mg O ₂ /L)		
	PVC	PS	PU
1	0,58	0,42	0,26
20	0,39	0,21	0,12
45	0,32	0,83	0,08

ANEXO E

Tabela E1: Teste cinético de atividade anammox com biomassa suspensa para os reatores PVC, PS e PU.

Tempo (horas)	PVC		PS		PU	
	N-NH ₄	N-NO ₂	Concentração (mg/L)		N-NH ₄	N-NO ₂
0	91,23	26,21	91,23	25,98	91,23	26,92
24	91,33	25,93	100,86	26,03	93,47	21,33
48	90,48	26,33	100,86	25,83	86,29	17,94
72	91,23	26,21	100,86	26,08	76,50	14,92

Tabela E2: Teste cinético de atividade aeróbia para os reatores PVC e PS e de atividade anammox para o reator PU com biomassa suspensa

Tempo (horas)	PVC		PS		PU	
	N-NH ₄	N-NO ₂	Concentração (mg/L)		N-NH ₄	N-NO ₂
0	91,33	26,21	100,86	26,21	76,50	69,32
24	77,31	10,18	68,33	27,85	77,91	68,46
48	64,14	9,70	54,56	25,58	80,30	64,19
72	61,14	2,60	24,62	20,65	84,49	64,19

Tabela E3: Teste cinético de atividade aeróbia para os reatores PVC, PS e PU com biomassa suspensa.

Tempo (horas)	PVC		PS		PU	
	N-NH ₄	N-NO ₂	Concentração (mg/L)		N-NH ₄	N-NO ₂
0	61,14	2,6	24,62	20,65	84,49	64,19
24	2,56	0	0,32	0	6,12	48,56
48	2,71	0	0,00	0,00	6,07	50,45
72	2,56	0	0,32	0,00	6,12	48,56

